



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-
66 asociado a la pungencia en *Capsicum annuum*
(Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

DANIELA SALDAÑA ROMERO

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa
COASESORA: M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Identificación del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 asociado a la pungencia en *Capsicum annum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

Que presenta la pasante: **Daniela Saldaña Romero**
Con número de cuenta: **311284139** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
1er. SUPLENTE	M. en C. Araceli Ulloa Saavedra	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatorias

A mí madre siempre en primer lugar, por sus palabras de aliento y apoyo cada vez que llegaba una derrota. Me enseñaste a confiar en que los tiempos de Dios son los mejores y tu amor es lo que siempre me mantiene de pie.

A mí padre por su disposición, apoyo y paciencia en esta travesía. Espero hacerte sentir orgulloso

A mis hermanas, porque este logro también es suyo. Ustedes son el mejor ejemplo a seguir y espero poder serlo también para mí sobrino Emmanuel.

A Luisa y Beto porque nuestra amistad perdura a pesar de la distancia. Ustedes siempre me animaron y apoyaron cuando estaba en momentos difíciles, sé que puedo confiar enteramente en ustedes.

A Joel porque me diste ese último impulso para llegar al final.

A mis amigos Wendy, Vale, Jaisel, Dani, Erick, Chema, Jonathan y otros que estuvieron conmigo por los recuerdos para toda la vida.

En memoria de mis abuelos Agustina y Cesar, descansen en paz †

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Montiel Sosa, por su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto.

A la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza, por los conocimientos que compartió conmigo, su asesoría y paciencia para poder culminar este trabajo a pesar de todos los obstáculos.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por todo su apoyo y guía durante este proyecto

A los sinodales, que dedicaron el tiempo a la revisión del este trabajo el cual enriquecieron para lograr su culminación de la mejor manera.

A la UNAM, máxima casa de estudios y mi segundo hogar, a la cual debo mi formación académica y de carácter por profesores de la FES Cuautitlán como Antonio Trejo Lugo, Francisco Javier López Martínez, Mayra Vaely Coronel Flores y a Víctor Manuel Ávalos Ávila (D. E. P)

Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN226419 *Asociación del fondo genético mitocondrial en enfermedades mitocondriales de la población mexicana.*

Índice

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	iii
Resumen	1
Introducción.....	2
Capítulo 1. Antecedentes	4
1.1 El género <i>Capsicum</i>	4
1.1.1 Historia	4
1.1.2 Taxonomía.....	5
1.1.3 Morfología y composición química	6
1.1.4 Capsaicinoides y capsaicina.....	8
1.1.5 Características organolépticas	11
1.1.6 Pungencia: niveles y clasificación (Escala Scoville)	11
1.1.7 Usos y productos.....	12
1.1.8 Consumo en México	13
1.1.9 Producción nacional	14
1.1.10 Producción mundial	16
1.2 El ADN	16
1.2.1 Exón e intrón	21
1.2.2 Enzimas de restricción.....	22
1.2.3 Mutaciones y tipos	23
1.2.4 Polimorfismo.....	25
1.2.5 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	25
1.3 Genes asociados a la pungencia en <i>Capsicum</i>	26
1.4 Polimorfismo G/T-200	28

1.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
1.5.1	Diseño de primers	36
1.5.2	Ventajas y desventajas	37
1.5.3	Aplicaciones	38
1.6	Electroforesis	39
1.7	Técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	40
Capítulo 2. Metodología		42
2.1	Justificación	42
2.2	Cuadro metodológico	44
2.3	Hipótesis	46
2.4	Objetivo general	46
2.4.1	Objetivo específico 1	46
2.4.2	Objetivo específico 2	47
2.4.3	Objetivo específico 3	47
2.4.4	Objetivo específico 4	48
2.4.5	Objetivo específico 5	48
2.5	Materiales y métodos	49
2.5.1	Extracción de ADN	50
2.5.2	Cuantificación de ADN	51
2.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
2.5.4	Electroforesis	53
2.5.5	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	54
Capítulo 3. Resultados y discusión		56
3.1	Objetivo específico 1	56
4.2	Objetivo específico 2	57

3.3 Objetivo específico 3.....	58
3.4 Objetivo específico 4.....	65
3.5 Objetivo específico 5.....	67
Contrastación de hipótesis	69
Conclusiones.....	71
Bibliografía	72
Anexos	79

Índice de figuras

Figura 1. Corte transversal de un fruto de chile habanero (<i>C. chinense</i> Jacq.), en el que se aprecian las estructuras internas. Fuente (Martínez Estevez, Manuel, Ruiz-Lau, & Medina Lara, 2011)	7
Figura 2. Estructuras químicas de la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Recuperado de (Pimientos picantes: acciones farmacológicas y propiedades terapéuticas, 2016)	8
Figura 3. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género <i>Capsicum</i> . Fuente (Vázquez et al., 2007)	10
Figura 4. Estacionalidad de la producción de chiles en México. Fuente (SAGARPA, 2017)	15
Figura 5. Principales países productores de chile. Creación propia de datos obtenidos de Food and Agriculture Organization (FAOSTAT, 2016).	16
Figura 6. Estructura de los nucleótidos del ADN. Fuente (Curtis et. al., 2011).	17
Figura 7. Estructura del ADN, doble hélice. Fuente (Curtis et. al., 2011).	19
Figura 8. Dogma central de la biología molecular propuesto por Francis Crick, creación propia. Fuente (Watson et al., 2005).	20
Figura 9. Síntesis proteica Fuente (Asociación Cultural Bosco, 2016)	21
Figura 10. Distintas endonucleasas de restricción. Fuente (Curtis et al., 2011)	22
Figura 11. Polimorfismo G/T-200 de estudios anteriores. Fuente (Garcés et al., 2007).	28
Figura 12. Etapas de la PCR. Fuente (Biggs et al., 2012)	33
Figura 13. Técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Fuente (Jiménez & Nuño, 2013).	41
Figura 14. Programa de PCR con Tm calculada.	57
Figura 15. Gel de electroforesis de especificidad de primers. MP: marcador de peso molecular, B: blanco, C+: control positivo de <i>Capsicum</i> , Za: zanahoria, Tr: trigo, Av: avena, Po: pollo, Ce: cerdo, Bo: bovino.	58
Figura 16. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 1M y 2M pertenecientes a <i>Capsicum annuum</i> , MP ₁₀₀ : marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco. ...	61

Figura 17. Gel de electroforesis al 1.5% de la muestra 3M perteneciente a <i>Capsicum annuum</i> , MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.	62
Figura 18. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 4M Y 5M (<i>Capsicum annuum</i>), 1H, 2H, 3H y 4H (<i>Capsicum chinense</i>), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.	62
Figura 19. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 6M, 7M, 8M, 9M, 10M (<i>Capsicum annuum</i>), 5H y 6H (<i>Capsicum chinense</i>), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.	63
Figura 20. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 7H, 8H y 9H (<i>Capsicum chinense</i>), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.	64
Figura 21. Gel de electroforesis al 1.5% de la muestra 10H (<i>Capsicum chinense</i>), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.	64
Figura 22. Gel de electroforesis resultados de RFLP con las muestras 1M, 2M, 3M, 6M, 7M, 8M, 9M y 10M pertenecientes a <i>Capsicum annuum</i> (Morrón).....	65
Figura 23. Gel de electroforesis con los resultados de RFLP de las muestras 4M y 5M pertenecientes a <i>Capsicum annuum</i> (Morrón), 1H,2H, 3H, 4H y 10H pertenecientes a <i>Capsicum chinense</i> (Habanero).....	66
Figura 24. Gel de electroforesis con los resultados de RFLP de las muestras 5H, 6H, 7H, 8H, y 9H pertenecientes a <i>Capsicum chinense</i> (Habanero).....	67
Figura 25. Grafico comparativo de las frecuencias genóticas obtenidas en <i>Capsicum annuum</i> y <i>Capsicum chinense</i>	68

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación general por jerarquías taxonómicas para Capsicum CONABIO (2009).....	5
Cuadro 2. Composición química pimiento verde. Fuente: (Gebhardt & Thomas, 2002).	7
Cuadro 3. Escala Scoville y las principales especies/variedades de Capsicum spp. Fuente: (Yáñez, Balseca, & Rivadeneira, 2015).	12
Cuadro 4. Destino de exportaciones de Chiles y Pimientos. Fuente (SAGARPA, 2017)	15
Cuadro 5. Clones de ADNc ligados a la pungencia por el gen Pun1. Fuente: (Kim, Kim, Kim, & Kim, 2001)	27
Cuadro 6. Ventajas y desventajas de la PCR.	38
Cuadro 7. Muestras de Capsicum utilizadas en la experimentación.	49
Cuadro 8. Componentes para la reacción de PCR.	52
Cuadro 9. Componentes de la digestión enzimática.	54
Cuadro 10. Primers diseñados para la experimentación.....	56
Cuadro 11. Concentraciones y pureza de las muestras de extracción de ADN de Capsicum annuum.	59
Cuadro 12. Concentraciones y pureza de las muestras de extracción de ADN de Capsicum chinense.....	60
Cuadro 13. Frecuencias genotípicas obtenidas en Capsicum annuum y Capsicum chinense.....	67

Resumen

Los polimorfismos genéticos son los responsables de la gran variabilidad que existe en los individuos de una misma especie, su expresión en el fenotipo puede llegar a determinar la altura en humanos, los colores en la concha de un caracol o la característica pungente que presenta el fruto de *Capsicum* (chile o pimiento) como es el caso del objeto de estudio de este proyecto.

En el gen SB2-66, implicado en la síntesis de capsaicinoides, se ha detectado un polimorfismo que parece tener una influencia directa en la característica pungente de las variedades de *Capsicum*, el cambio de guanina por timina en la posición 200 de la secuencia del gen lo identifica como el polimorfismo G/T-200.

Para la evaluación de la presencia del polimorfismo y su influencia en el carácter pungente de la especie *Capsicum* se analizaron 20 muestras: 10 pertenecientes a *Capsicum annuum* (chile Morrón) y 10 pertenecientes a *Capsicum chinense* (chile Habanero), las cuales fueron adquiridas en diferentes puntos del Estado de México y la Ciudad de México. El material genético fue extraído de las semillas y sus germinados, fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente a una digestión enzimática RFLP.

Los resultados obtenidos mostraron que el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 no está relacionado con la presencia de pungencia o acritud en *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero) ya que las 20 muestras no exhibieron el polimorfismo y menos de la mitad de los organismos resultaron ser heterocigotos sin haber relación alguna con su característica acre, es decir, si eran pungentes no.

Introducción

El fruto *Capsicum spp.* es conocido por su nombre común chile, pimiento o ají tiene una larga tradición cultural en México y es, desde la época prehispánica, parte importante de nuestra dieta diaria (Mendoza, 2006). La sensación de calor está dada por compuestos llamados capsaicinoides, que son un grupo de metabolitos secundarios (Collins, Mayer Wasmund, & Bosland, 1995) compuestos de amidas de ácidos aromáticos derivados de la fenilalanina y la leucina o valina (Paran I., A. Ben-Chaim, K. Byoung-Cheorl, & Jahn, 2006). El uso principal de *Capsicum spp.* es en el área gastronómica de muchos países del mundo. En la industria alimentaria se elaboran una amplia variedad de productos debido a su alta demanda (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SAGARPA], 2017). Aunque la relevancia del chile se reconoce también medicinalmente ya que los capsaicinoides tienen muchos beneficios para la salud de los seres humanos: inhibiendo el crecimiento del cáncer, la artritis y otros padecimientos, reducen el apetito y promueven la pérdida de peso (Kim *et al.*, 2014).

A nivel económico, México se encuentra en segundo lugar a nivel mundial como productor de chile (*Capsicum*) ya que en el año 2015 la SAGARPA reportó que es el 8° cultivo de mayor valor en el país generando hasta 720 mdd al año actividad en la que participan más de 12 mil productores y 144 mil hectáreas.

Las mutaciones que dan lugar a cambios que no afectan sustancialmente a la secuencia de la proteína se conocen como polimorfismos (Mota Caparrós, Cuenca Pardo, & Sipán Sarrion, 2016) tienen muchas y diversas aplicaciones, entre ellas la correlación de fenotipos con genotipos y la identificación entre estructura y funciones de los productos codificados por los genes, son responsables de la gran variabilidad existente entre los individuos de una misma especie (Torrades, 2002) como son el color del fruto, el crecimiento del mismo o como en este caso, la pungencia, la cual se ha documentado anteriormente que se ubica en el segundo exón del gen *SB2-66* que tiene una longitud de 383 pb y se ha relacionado a la síntesis de capsaicinoides (Garcés-Claver, Moore Fellman, Gil-Ortega, Jahn, & Arnedo-Andrés, 2007).

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una reacción enzimática que permite replicar cientos de miles y millones de veces en cuestión de horas e in vitro una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco o también llamada diana, es copiada fielmente (Tamay de Dios , Ibarra , & Velasquillo , 2013).

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 El género *Capsicum*

1.1.1 Historia

El fruto de *Capsicum spp.* conocido como chile, ají o pimiento, fue originalmente un cultivo de los habitantes de América precolombina y era el equivalente de la pimienta para los asiáticos y europeos (Mendoza, 2006), este tiene una larga tradición cultural en México y es, desde la época prehispánica, parte importante de la dieta regional. La sensación de calor creada por compuestos llamados capsaicinoides de los cuales se hablará posteriormente, es un aspecto tan característico de este cultivo que el nombre de género *Capsicum* proviene del griego “*kapto*”, que significa "morder" (Kim *et al.*, 2014).

Este cultivo constituye uno de los primeros domesticados por el hombre, los genetistas coinciden en que la región andina es el origen de *Capsicum spp.* pudiéndose considerar México como otro centro de origen secundario (Bartolomé García, Coletto Martínez, & Velázquez Otero, 2015). En México, el chile fue uno de los productos tributarios más comunes en la época prehispánica, cada zona de la república contribuía con las especies más comunes de la localidad (Pérez- Castañeda, Castañón Najera, Ramírez Meraz, & Mayek Pérez, 2015). Las diversas culturas prehispánicas, inmortalizaron su imagen en códices y glifos hechos sobre piedra siendo *Capsicum annuum* es la especie más ampliamente distribuida en México (Instituto Nacional de Antropología e Historia [INAH], 2013).

Su difusión se dio desde siglo XVI a partir de su llegada a España por Cristóbal Colón y a Portugal debido a su poder y dominio en el océano Índico establecieron contacto marítimo entre Europa y la India, gracias a esto se dio la expansión de chile hacia toda Europa, India y Asia, y finalmente África por la colonización europea (Long, 1998). En algunas de estas regiones ya se conocían algunos tipos de pimiento.

1.1.2 Taxonomía

Las plantas se clasifican por la posesión o ausencia de varios caracteres o relaciones comunes; por lo tanto, su reconocimiento suele depender de la combinación de los mismos (Long, 1998). El género *Capsicum*, miembro de la familia Solanaceae, posee más de treinta variedades de su especie de las cuales solo cinco han sido domesticadas: *Capsicum annuum* a la que pertenecen la mayoría de las variedades de pimientos dulces, agridulces y algunos picantes cultivados en el mundo, particularmente en Europa y América del Norte; *Capsicum frutescens* que comprende la mayoría de las variedades picantes cultivadas en América y Asia y, en menor medida en Europa, y *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* y *Capsicum pubescens* cultivadas casi exclusivamente en México (*C. chinense*) y en Los Andes (*C. baccatum* y *C. pubescens*) (Bartolomé *et al.*, 2015).

La clasificación taxonómica aceptada por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2009) se muestra en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Clasificación general por jerarquías taxonómicas para *Capsicum* CONABIO (2009)

Jerarquía	
Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Manoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanácea
Género	<i>Capsicum</i>

Los análisis de ADN indican jerarquías taxonómicas como, por ejemplo, el ADNc extraído de cloroplastos indican que el género *Capsicum* pertenece a la familia de las Solanáceas (Pérez *et al.*, 2015).

1.1.3 Morfología y composición química

Como habíamos mencionado, el género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae e incluye diferentes variantes de chiles que se reconocen fácilmente por su tamaño, forma, color y grado de pungencia, pero los estudios morfológicos se han restringido a ciertas especies, subespecies, variedades y morfotipos (Pérez *et al.*, 2015). El conocimiento de las variaciones antes mencionadas, además de su distribución geográfica es de considerable interés para entender la evolución de las especies y trabajar en su conservación. Entre los factores geográficos influyen en la diferenciación de las poblaciones están el clima, la latitud y la altitud.

Actualmente, se utilizan los descriptores de *Capsicum* publicados por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 1995) y, con base en éstos, se han descrito diferentes tipos y variedades de chile en el mundo. Algunas de estas características son:

Tallo: Erecto de hasta 2m o más de altura. Es anguloso y provisto de ramificaciones dicotómicas. Son ricas en estomas.

Hojas: Son alternas, brillantes con lámina ovada o elíptica y margen entero. La expansión de las láminas foliares está en relación a las dimensiones de los frutos.

Flores: Son hermafroditas. La antesis floral dura 2-3 días en cada flor, pero en toda la planta es escalonada y, en algunos cultivares y en condiciones favorables por varios meses.

Frutos: De bayas carnosas que van desde pequeñas (<10g) en algunas variedades, hasta grandes (>500g). La forma que puede ser elongada, casi redonda, triangular. Se evalúan el color en una etapa intermedia del cultivo y ya maduro, así como el largo, ancho y peso del fruto además del grosor de la piel. Las partes internas del fruto se muestran en la figura 1.

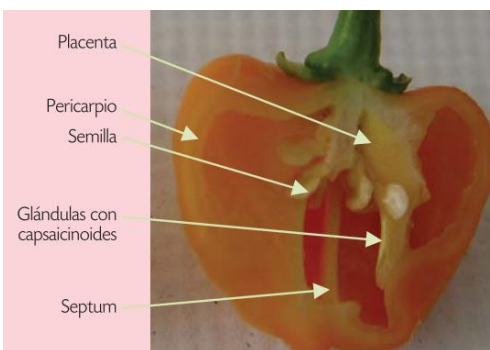


Figura 1. Corte transversal de un fruto de chile habanero (*C. chinense* Jacq.), en el que se aprecian las estructuras internas. Fuente (Martínez Estevez, Manuel, Ruiz-Lau, & Medina Lara, 2011)

Semillas: Las semillas (0,25% en peso del fruto) son reniformes aplastadas, de color marrón claro y son levemente pungentes. La viabilidad dura tres o cuatro años, según las condiciones de humedad y temperatura durante su almacenamiento. No presenta dormición, por lo que para germinar solo necesitan agua, oxígeno y temperatura.

El valor nutrimental del chile es mayor que el de muchas hortalizas, a continuación, en el Cuadro 2 se muestra la composición química del pimiento verde:

Cuadro 2. Composición química pimiento verde. Fuente: (Gebhardt & Thomas, 2002).

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Agua (%)	88	Potasio (mg)	153
Calorías (kcal)	18	Sodio (mg)	3
Proteína (g)	1	Vitamina A (UI)*	347
Lípidos (g)	Traza	Vitamina A (RE)**	35
Carbohidratos (g)	4	Tiamina (mg)	0.04
Fibra (g)	0.7	Riboflavina (mg)	0.04
Calcio (mg)	8	Niacina (mg)	0.4
Hierro (mg)	0.5	Ácido ascórbico (mg)	109

*(UI) Unidades internacionales

** (RE) Equivalente de retinol.

Se puede observar que el género *Capsicum* es rico principalmente en vitamina A, tiamina (vitamina B1) y ácido ascórbico (vitamina C).

1.1.4 Capsaicinoides y capsaicina

La sensación típica de ardor causada por los chiles es la pungencia y se debe a la presencia de capsaicinoides, un grupo de amidas de ácidos aromáticos derivados de la fenilalanina y la leucina o valina (Paran I. *et al.*, 2006). Los capsaicinoides se producen solo dentro del género *Capsicum* y su presencia ha impulsado la domesticación de varias especies (Stewart, Mazourek, Stellari, O'Connell, & Jahn, 2007).

La capsaicina y la dihidrocapsaicina (Figura 2) constituyen los capsaicinoides primarios, que se producen exclusivamente en las glándulas de la placenta de la fruta (Kim *et al.*, 2014). Estos son metabolitos secundarios y tanto la acumulación de capsaicinoides como la actividad de sus enzimas de biosíntesis son sensibles a las condiciones ambientales (Mendoza, 2013). Muchas enzimas están involucradas en la biosíntesis de capsaicinoides, pero su vía metabólica sigue sin ser propiamente caracterizada. Con más de 22 capsaicinoides aislados, este cultivo proporciona un excelente ejemplo para explorar la evolución de metabolitos secundarios en plantas.

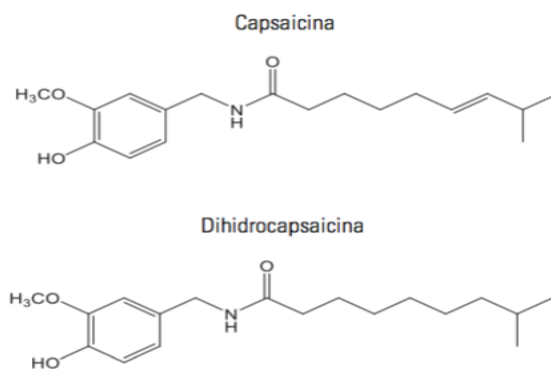


Figura 2. Estructuras químicas de la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Recuperado de (*Pimientos picantes: acciones farmacológicas y propiedades terapéuticas*, 2016)

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

Estos compuestos pueden ser cuantificados, actualmente el análisis de capsaicinoides se realiza mediante espectrofotometría, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estudios confirman que las técnicas que utilizan HPLC proporcionan análisis precisos y eficientes del contenido de capsaicinoides presentes en una muestra de chile (Collins *et al.*, 1995).

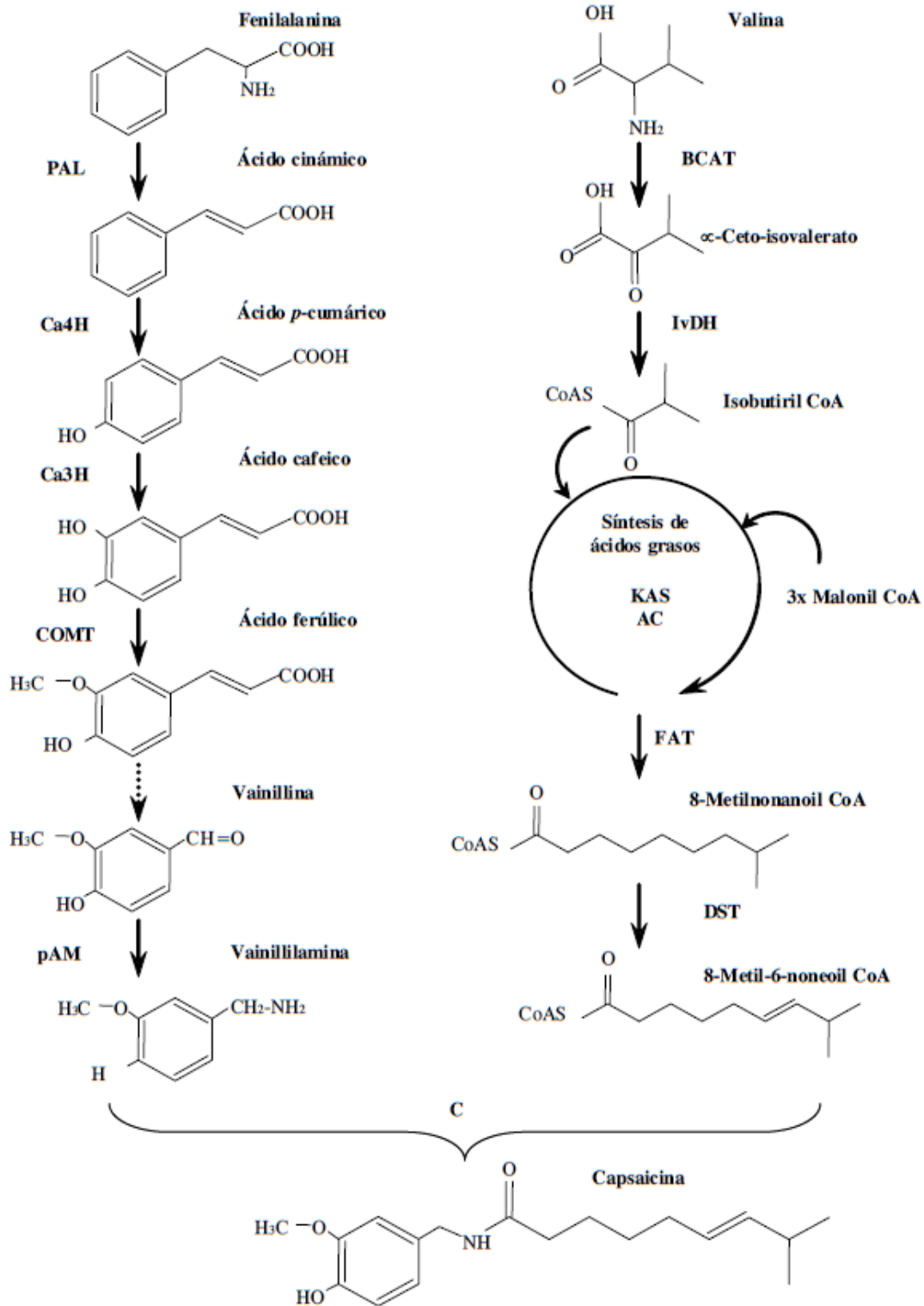


Figura 3. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género *Capsicum*. Fuente (Vázquez *et al.*, 2007)

1.1.5 Características organolépticas

Las propiedades organolépticas son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene un alimento y que se perciben por medio de los sentidos; por ejemplo: su sabor, textura, olor, color. Su estudio es importante en las ramas de la ciencia en que es habitual evaluar inicialmente las características de la materia sin la ayuda de instrumentos científicos (Narvaez, 2013) sin embargo existen escalas o niveles para estandarizarlas. En este caso las sustancias transportadas por aire pueden estimular tanto el nervio olfativo como el trigeminal en la nariz dando lugar a sensaciones de olor y pungencia (irritante), este último también se identifica por el sentido del gusto (Cain, Abraham, & Cometto-Muñiz, 1998) .

1.1.6 Pungencia: niveles y clasificación (Escala Scoville)

La pungencia del chile picante se debe a la acumulación de capsaicinoides, un grupo de alcaloides que son únicos del género *Capsicum* y se pueden clasificar por su grado de picor (Kim *et al.*, 2014).

La primera medida confiable reportada de la pungencia del chile es la Prueba Organoléptica de Scoville también conocido como el método *Estándar Internacional* (ISO 3513-1977) para la aplicación en extractos o productos de *Capsicum* para evaluar su grado de pungencia. Esta prueba usa un panel de degustación de cinco personas que evalúan una muestra de chile y luego registran el nivel de sabor pungente. Posteriormente se diluye una muestra hasta que ya no se pueda detectar la acritud. Esta dilución se conoce como la Unidad de Calor de Scoville (Collins, 1995).

Para determinar el Valor de Pungencia en Unidades Scoville (SHU), en cada muestra es necesario multiplicar la concentración de Capsaicina presente (g/g) por el SHU del compuesto puro, al añadir este valor se obtiene un valor total de SHU

En este sentido se cumple la igualdad:

1 ppm Capsaicina = 15 unidades Scoville = 1 unidad ASTA

El rango de unidades Scoville (SHU) aceptado internacionalmente para chiles frescos. Utilizando la equivalencia para convertir a unidades Scoville en el Cuadro 3 se muestran algunas variedades de Chile.

Cuadro 3. Escala Scoville y las principales especies/variedades de *Capsicum spp.* Fuente: (Yáñez, Balseca, & Rivadeneira, 2015).

Unidad Scoville	Variedad/Chile
850 000 – 1 001 304	Bhut Jolokia (India, Sri Lanka)
350 000 – 570 000	Red Savina Habanero (California, Usa)
100 000 – 350 000	Chile Habanero
100 000 – 325 000	Scotch Habanero
100 000 – 200 000	Chile Jamaicano
50 000 – 100 000	Chilpete, Piquín, Chile Thai
30 000 – 50 000	Pimienta Cayanna, Chile Tabasco
10 000 – 30 000	Chile Serrano, Chile de árbol
2 500 – 8 000	Chile Jalapeño
2 500 – 5 000	Salsa Tabasco
1 000 – 1 500	Chile Poblano
0	Chile Dulce (Pimiento dulce, Chile Verde)

La medición precisa de la pungencia se ha vuelto importante debido a la mayor demanda de los consumidores de alimentos picantes alrededor del mundo, además, también se necesita una determinación precisa de los niveles de diversos capsaicinoides debido a su mayor uso en productos farmacéuticos. Por otro lado, en la industria alimentaria también necesitan procedimientos analíticos fiables, seguros y estándar que sean útiles para comparar los niveles de punción entre diferentes muestras (Collins *et al.*, 1995).

1.1.7 Usos y productos

El uso principal es como saborizante en la cocina mundial, pueden comerse frescos, cocidos o como condimentos en platillos típicos. En la industria se elabora una gran variedad de productos: chiles congelados, deshidratados, encurtidos y enlatados; se les encuentra en pastas y en una infinita variedad de salsas, aunque la relevancia del Chile se reconoce también medicinalmente (SAGARPA, 2017). Se ha encontrado que los

capsaicinoides en la naturaleza tienen propiedades antifúngicas y antibacterianas, que actúan como un elemento disuasivo de la depredación de los animales cuando se ingieren y que tienen propiedades inherentes que ayudan a la dispersión de las semillas de las aves. Así mismo se han realizado estudios que comprueban muchos beneficios para la salud de los seres humanos: son efectivos para inhibir el crecimiento de varias formas de cáncer, son un analgésico para la artritis y otros dolores, reducen el apetito y promueven la pérdida de peso (Kim *et al.*, 2014).

El consumo y cultivo del chile se ha incrementado debido a que es rico en vitaminas A, C y B6, antioxidantes, β -carotenos, flavonoides, pigmentos, útil como saborizante, aceites fijos y volátiles y oleorresinas (Pérez *et al.*, 2015).

También se usa en ungüentos, lociones y cremas para tratar externamente problemas de dolor crónico relacionado con artritis, gota, neuralgias y cicatrices quirúrgicas. Del chile habanero se extraen oleorresinas, cuya aplicación, además de la industria alimentaria, se extiende a la industria química para la elaboración de pinturas y barnices, gases lacrimógenos, etcétera (Martínez Estevez, Manuel, Ruiz-Lau, & Medina Lara, 2011).

1.1.8 Consumo en México

El chile en cualquiera de sus presentaciones, verde o seco, solo o combinado con otros ingredientes, al natural o procesado, representa un papel central en la cultura alimenticia de México. Datos de la SAGARPA reportan que en el 2017 el consumo per cápita de chile verde en México es de 16 kilogramos al año, un kilo más de lo reportado hace 10 años.

El chile más consumido por el mexicano es el jalapeño, también conocido como cuaresmeño cuando aún está verde, y llamado chipotle en seco. Ya que somos uno de los países que más lo consume a nivel mundial y posee la mayor variedad gracias a sus distintas condiciones climáticas y geográficas, que permiten que prácticamente en todos los rincones de la república se pueda cultivar una especie (INAH, 2013).

El consumo de este producto es tan recurrente en México debido a que produce cierto placer al comer, pues se liberan dopaminas que son hormonas o sustancias que ayudan al disfrute, por ello es fácil comprender por qué 90% de los platillos lo contienen (INAH, 2013).

1.1.9 Producción nacional

El grupo de chiles y pimientos que se producen en México está constituido principalmente por los cultivos de *Capsicum annuum* (chile de árbol, chile ancho y chile anaheim) y *Capsicum chinense* (chile habanero y chile bell). Con una producción anual de 3.2 millones de toneladas y crecimiento anual promedio de 4.82% en el periodo 2003-2016, estos productos mostraron una participación creciente y estable en la oferta nacional (SAGARPA. 2017).

Este cultivo es producido en las 32 entidades del país, las cinco principales son Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí y Michoacán, las cuales aportan el 77.1 por ciento de la producción nacional. La superficie dedicada al cultivo en el país es de 150 mil hectáreas, con un valor de la producción de 22 mil 585 millones de pesos según lo reportados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2010).

Actualmente, son cultivos importantes de exportación, ya que 29.71% de la producción total se destina al mercado internacional. En particular, las exportaciones mexicanas representaron un porcentaje muy significativo de las importaciones de chiles y pimientos que hacen los países de Estados Unidos, 77.99%; Canadá, 55.45% y, Guatemala, 52.25 % (SAGARPA 2017).

Actualmente, México es uno de los grandes competidores a nivel internacional; así mismo, sus ventajas comparativas lo posicionan como un proveedor predilecto en el comercio internacional de este cultivo. Los principales destinos de exportación se muestran en el Cuadro 4, siendo Estados Unidos a quien se le exportan una mayor cantidad de megatoneladas (Mt).

Cuadro 4. Destino de exportaciones de Chiles y Pimientos. Fuente (SAGARPA, 2017)

Exportaciones	Mt
Estados Unidos	982.48
Canadá	3.10
Guatemala	0.47
España	0.10
Otros	0.30

Hoy en día, se satisface 100% de los requerimientos nacionales con producción interna; asimismo, las importaciones mundiales han aumentado 32.55% en la última década, lo que ha generado un incremento en las exportaciones mexicanas (SAGARPA, 2017).

Estas exportaciones tienen una variante de flujo comercial cada mes que se muestran en la Figura 4.

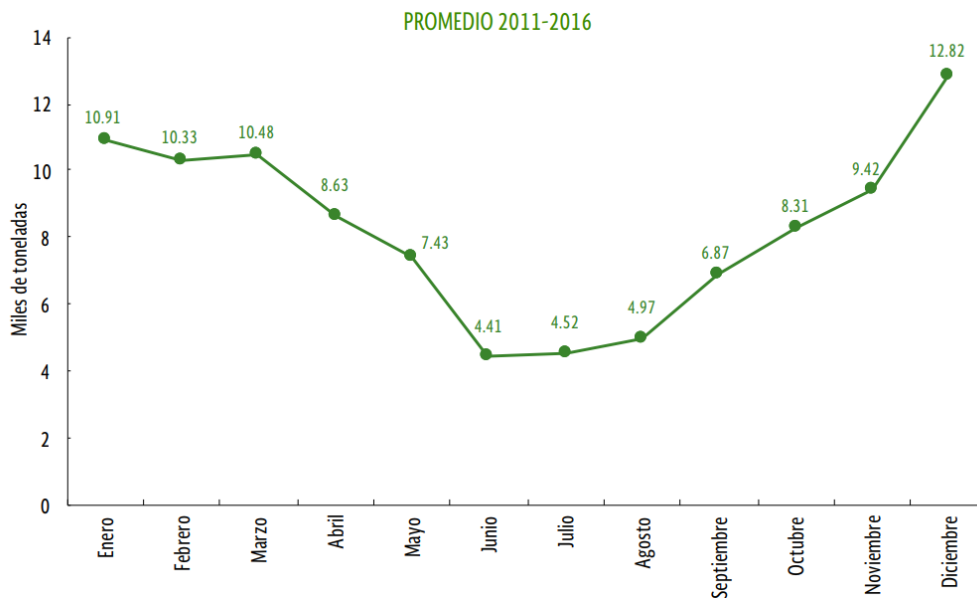


Figura 4. Estacionalidad de la producción de chiles en México. Fuente (SAGARPA, 2017)

En la gráfica se observa que los meses de diciembre y marzo son los meses con mayor flujo comercial al extranjero.

1.1.10 Producción mundial

En los últimos 10 años, la producción mundial de los chiles ha tenido un crecimiento espectacular, con 44% de incremento en el área cosechada y con 92% en los volúmenes de producción (SAGARPA, 2017). La incorporación de nuevos países a la producción de chiles es un hecho evidente. Este hecho demuestra las oportunidades que tiene el cultivo en la adopción de tecnologías de vanguardia, estudios genéticos, mapeo morfológico y demuestra también la demanda que existe en el mercado internacional de este producto.

En México ha resultado de suma importancia el incremento en la producción de chile, en la Figuras 5 se puede observar que para el año 2017 ya se ocupa el segundo mayor productor ubicado detrás de China y seguido muy de cerca por Turquía.

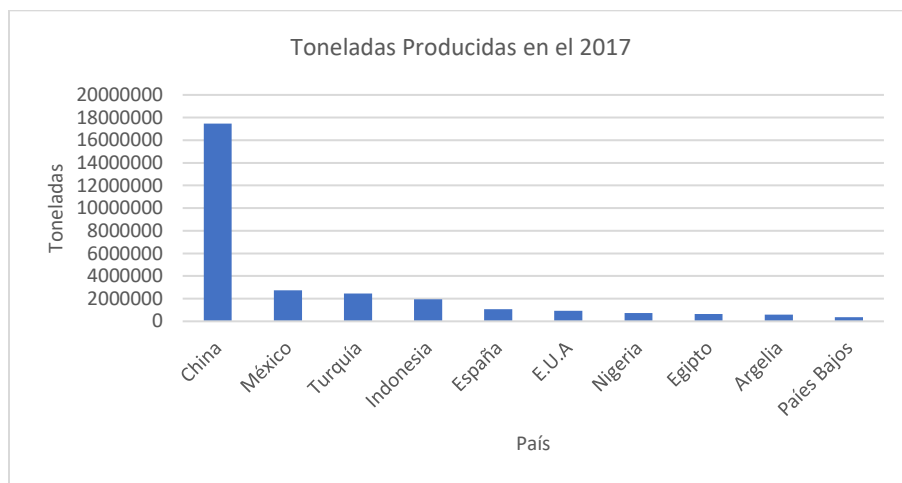


Figura 5. Principales países productores de chile. Creación propia de datos obtenidos de Food and Agriculture Organization (FAOSTAT, 2016).

1.2 El ADN

El ADN (Ácido desoxirribonucleico) es el soporte físico de la información genética ya que almacena y transmite a sus descendientes las instrucciones precisas a toda célula, con estas debe de ser capaz de producir un gran número de proteínas con ayuda de ARN y así realizar numerosas funciones (Izquierdo, 2014), el ADN se localiza contenido en el núcleo células eucariotas, mitocondria y cloroplastos, estos últimos solo en el caso de

las células vegetales (Gardner, Simmons, Snustad, & Calderon, 1998). El ADN fue aislado por primera vez en 1869 por el bioquímico suizo Frederich Miescher, pocos años después de que Darwin publicará su más destacada obra “El origen de las especies” y que Mendel presentará sus resultados a la Sociedad de Historia Natural de Brünn (Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini, 2011).

Por otro lado, desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un poli nucleótido o polímero. Las unidades de este polímero se le llaman nucleótidos que están formados a su vez de una pentosa (Desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada que puede ser adenina, guanina, citosina o timina (Klug, Cummings, Spencer, & Paladino, 2013). Estas bases, descubiertas por el bioquímico alemán Albrecht Kossel en 1885, se dividen en dos clases las purinas (que se caracterizan por que en su estructura hay un doble anillo): la adenina (A) y guanina (G) y las pirimidinas (que cuentan únicamente con un anillo en su estructura); la citosina (C) y timina (T) (Curtis *et al.*, 2011). Su estructura de muestra en la Figura 6.

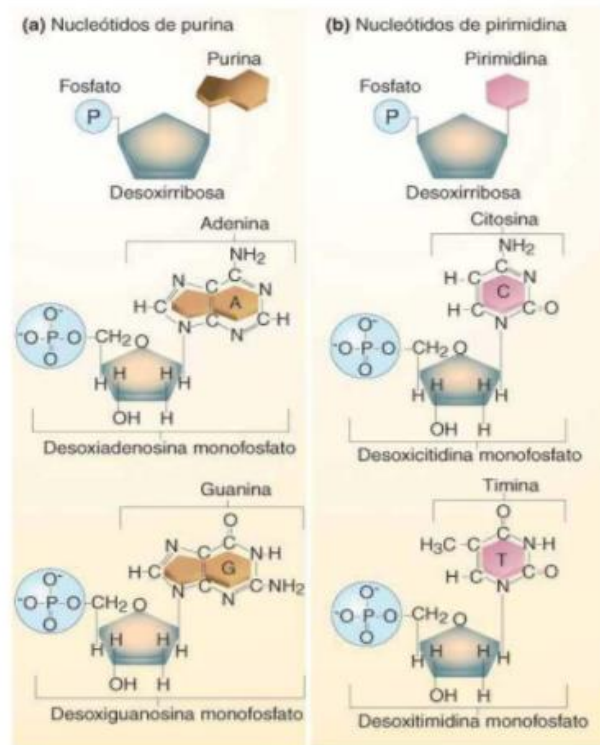


Figura 6. Estructura de los nucleótidos del ADN. Fuente (Curtis et. al., 2011).

En el caso del ARN (ácido ribonucleico), el otro tipo de ácido nucleico que se distingue por la del azúcar ribosa, pero también formado por un grupo fosfato y una base nitrogenada; adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U) (en lugar de timina). Este puede ser de tipo mensajero (ARNm), ribosomal (ARNr) o de transferencia (ARNt) y está involucrado principalmente en la síntesis de proteínas (Gardner *et al.*, 1998).

Se cree que la diferencia de la existencia de timina en el ADN y de uracilo en el ARN se debe a las desaminaciones accidentales (oxidativas) que hacen que la citosina pueda perder espontáneamente su $-NH_2$ (reemplazado por OH) y transformarse en uracilo (Étienne, 2001).

Las bases nitrogenadas cumplen la ley de la complementariedad, descubierta por Watson y Crick hasta la década de 1950, ya que estas se unirán entre sí mediante puentes de hidrógeno, la adenina siempre se unirá a la timina (para el ADN) o uracilo (para el caso del ARN) por un doble enlace ($A=T$ o $A=U$) y la guanina con la citosina por un triple enlace ($G\equiv C$). Esta complementariedad le da al ADN su estructura característica de cadena de doble hélice (Figura 8), cabe destacar que al ARN es una larga cadena simple (Gardner *et al.*, 1998).

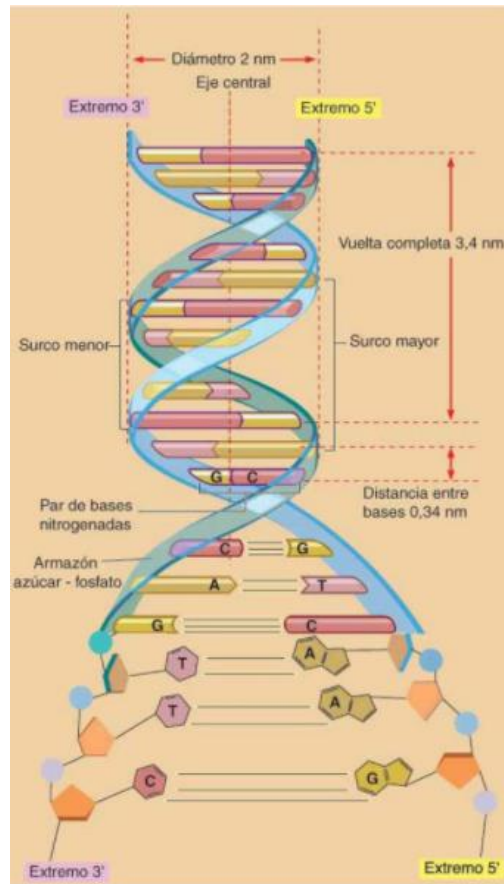


Figura 7. Estructura del ADN, doble hélice. Fuente (Curtis et. al., 2011).

Como se puede observar en la Figura 7 la cadena de ADN es antiparalela, esto debido a que, en su estructura, la pentosa (desoxirribosa) se une con el grupo fosfato formando enlaces fosfodiéster entre los átomos de carbono 3' y 5', la formación de estos enlaces asimétricos le da la dirección a la hebra de ADN 5'→3' y 3'→5' (Curtis *et al.*, 2011).

Retomando lo antes mencionado, la síntesis de proteínas es dirigida por el ADN que funciona como plantilla para el ARN y posteriormente este se traslada al citoplasma donde determina la disposición de los aminoácidos dentro de las proteínas. En 1956, Francis Crick llamó "Dogma Central de la biología molecular" a este mecanismo de flujo de información genética (Watson *et al.*, 2005).

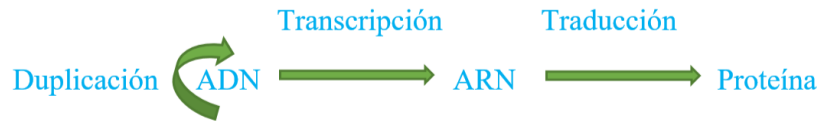


Figura 8. Dogma central de la biología molecular propuesto por Francis Crick, creación propia. Fuente (Watson *et al.*, 2005).

Como se observa en la Figura 8, la flecha curva que rodea al ADN significa que este es la plantilla para su propia duplicación, como siguiente aparece la flecha que indica la transcripción, es decir, la síntesis de ARN y finalmente la traducción que es dirigida por una plantilla de ARN para la síntesis de proteínas (Watson *et al.*, 2005).

La síntesis de proteínas (Figura 9), de manera muy general, es un proceso que se denomina traducción porque el alfabeto de cuatro letras de las bases nitrogenadas se traduce en un alfabeto completamente diferente en los aminoácidos. La traducción se efectúa con el paso de información presente en el ARN mensajero (ARNm) en forma de triadas de nucleótidos conocidas como codones a una secuencia específica de aminoácidos (unidades de las proteínas) a lo largo de una cadena peptídica (Ondarza, 2006). En otras palabras, la transcripción del mensaje escrito en el ADN da como resultado un ARNm y éste, al traducirse al nivel de los ribosomas, resulta en una proteína.

No toda la secuencia ARNm se traduce en proteínas, sólo la región desde el codón de inicio (e incluido éste) hasta el codón de terminación. Según McLennan, Bates y Turner (2014) el mecanismo real de síntesis de proteínas que se lleva a cabo en el citoplasma de la célula puede dividirse en tres etapas:

- Inicio: El propósito de este paso es ensamblar un ribosoma completo en una molécula de ARNm en el punto de inicio correcto, el codón de inicio que suele ser la combinación AUG. Los componentes que intervienen son las subunidades ribosómicas grandes y pequeñas con el ARNr, el ARNm, el ARNt iniciador.
- Elongación: Estos ciclos repetidos de adición de aminoácidos se subdivide en tres pasos: 1) entrega de aminoacil-tARN; 2) formación de un enlace peptídico, y 3) translocación.

→ Terminación: liberación de la nueva cadena de proteínas terminada por un codón que lo indique.

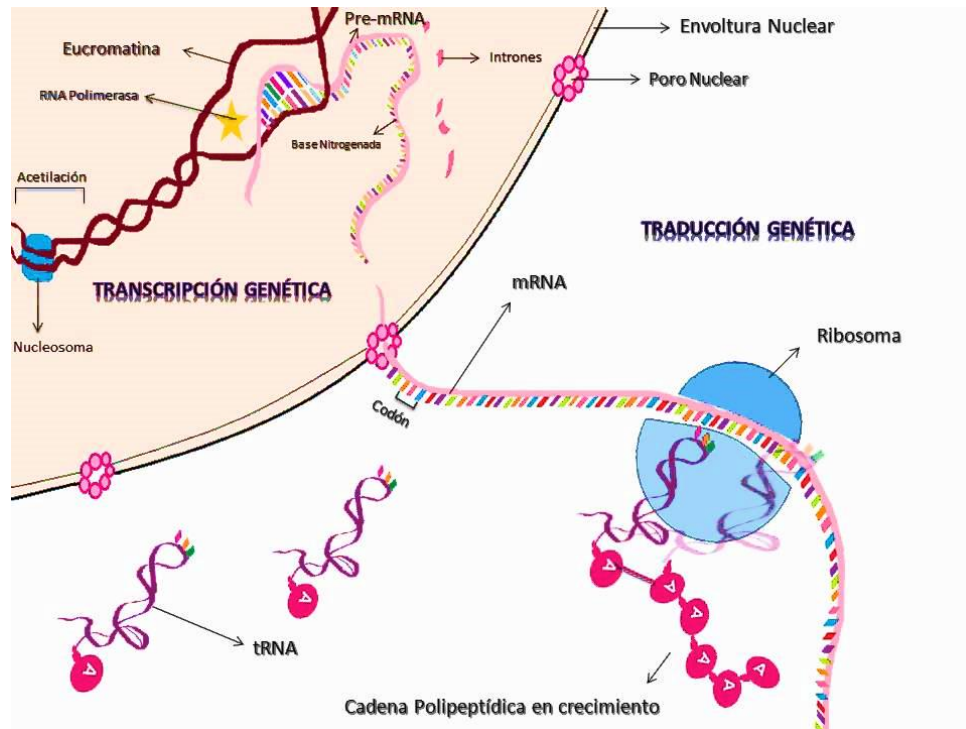


Figura 9. Síntesis proteica Fuente (Asociación Cultural Bosco, 2016)

1.2.1 Exón e intrón

Como se mencionó anteriormente, los organismos eucariotas tienen ADN contenido en su núcleo, mitocondria y cloroplastos (solo en el caso de las células vegetales), la secuencia que va a empezar en algún lugar del ADN y va a terminar en otro se conoce como gen y dentro de estos organismos se dice que es discontinuo o que el mensaje del gen está fragmentado ya que está comprendido por:

→ Exones: aquellos que contienen la información hereditaria y que generalmente se expresan siendo traducidos en proteínas.

→ Intrones: también llamadas secuencias intercalas, están interpuestos en medio de la región que contiene información. Serán transcritos, pero no traducidos. Se desconoce actualmente la función de estas secuencias de ADN que aparentemente no se expresan (Étienne, 2001).

Durante el procesamiento del ARN mensajero, los intrones deben de ser retirados enzimáticamente antes de que el ARNm pueda activarse. Una vez retirados los intrones, los exones se unen para formar la molécula final de ARNm, este proceso es complejo debe de realizarse con la mayor precisión posible porque la pérdida o ganancia de un solo nucleótido daría como resultado una proteína defectuosa durante la traducción en la síntesis de proteínas según el dogma central de la biología molecular (Wallace, King, & Sanders, 1991).

1.2.2 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción también llamadas endonucleasas de restricción son enzimas de origen bacteriano que cortan los enlaces fosfodiéster del ADN rompiendo su estructura de doble hélice. Estas reconocen secuencias cortas de 4 a 8 pares de bases de tipo palíndromo, que son sitios de restricción y son distintas dependiendo de la bacteria de la que proceden (Mota *et al.*, 2016) como se observa en la Figura 10.

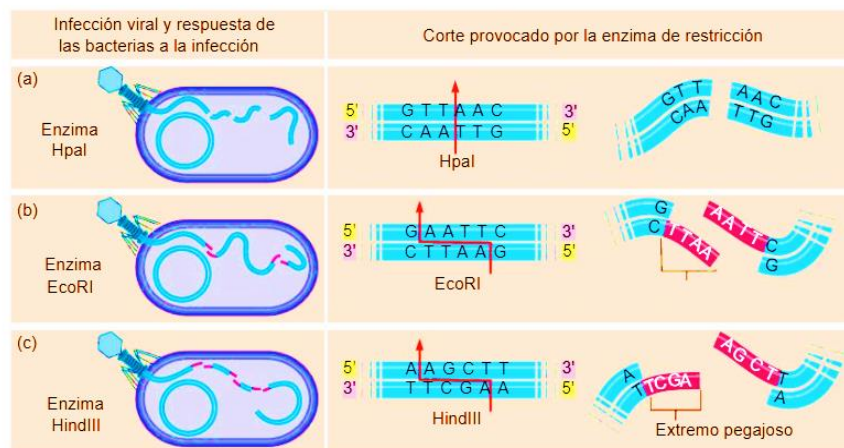


Figura 10. Distintas endonucleasas de restricción. Fuente (Curtis *et al.*, 2011).

En la Figura 10 también se puede observar que existen dos tipos de corte por el cual se pueden clasificar:

- Las enzimas que cortan de forma simétrica creando cortes romos
- Las enzimas que cortan de forma asimétrica creando extremos pegajosos o cohesivos

Desde su descubrimiento a finales de la década de 1960, los científicos han identificado y aislado cientos de endonucleasas de restricción que usaron como herramientas para aislar genes específicos o regiones de genoma. Cuando la enzima se adhiere al ADN del genoma, crea fragmentos de diferentes tamaños (Biggs *et al.*, 2012). Estudios sobre bacteriófagos mostraron que los virus que infectan la cepa de *Escherichia coli* en general son incapaces de infectar otra cepa. Se descubrió que esta restricción de la infección viral se debe a que las enzimas que cortan ADN extraño antes de que se replique o transcriba, así este fenómeno sucede en una amplia variedad de bacterias (Curtis *et al.*, 2011).

1.2.3 Mutaciones y tipos

La mitosis aumenta el número de células somáticas (del cuerpo). La meiosis resulta en la formación de gametos (células sexuales). En ambos casos la nueva célula debe recibir el número correcto de cromosomas y de genes que los cromosomas llevan. Sin embargo, en los cromosomas y en los genes pueden ocurrir cambios. Estos cambios en el material hereditario se conocen como mutaciones (Alexander, Jean, Chaves, Courts, & D'Alessio, 1992).

El fenotipo de un organismo es simplemente el aspecto de este, la suma de sus caracteres físicos. El fenotipo de cada organismo está controlado por su genotipo (todos los genes que porta) en interacción con el ambiente (Gardner *et al.*, 1998).

$$\text{Genotipo} + \text{ambiente} = \text{fenotipo}$$

Habiendo dicho esto, un cambio en la naturaleza química del ADN es una mutación genética y puede o no ser visible en el fenotipo, sin embargo, un cambio en la estructura o número de cromosomas conocida como alteración cromosómica son más usuales en el fenotipo (Sierra & Sierra, 2015).

Así, la importancia de las mutaciones al ser tanto protectoras de la vida como causa de gran sufrimiento. Por un lado, por ser la fuente de toda la variación genética, la materia de la evolución. La capacidad de los organismos de adaptarse al cambio de ambiente. Por otra parte, las mutaciones son la fuente de muchas enfermedades y trastornos (Pierce, 2016).

Las mutaciones que incluyen cambios menores en las secuencias del ADN son llamadas mutaciones puntuales y son mucho más sutiles y menos destructivas, pero tienen mayor probabilidad de ser transmitidas de generación en generación. Los tres tipos más comunes de mutaciones puntuales (Wallace *et al.*, 1991) son:

1. Las sustituciones de bases: se conserva el número de pares de bases nucleotídicas en una región del ADN, pero un par de bases es cambiado por otro diferente. Este es el tipo más común de mutación.
2. Inserción: se agrega una o más bases.
3. Supresión: se pierden una o más bases y se cierra el hueco dejado por ellas.

Las mutaciones ocurren al azar. Las causas de la mayor parte de las mutaciones espontaneas que ocurren naturalmente se desconocen. Sin embargo, se han identificado sustancias y formas de energía que aumentan la frecuencia de las mutaciones. Se conocen como agentes mutágenos a los que pueden causar mutaciones como los son varias formas de radiación como los rayos X y los ultravioletas y otras sustancias químicas como al asbesto, el benceno y el formaldehído (Alexander *et al.*, 1992).

1.2.4 Polimorfismo

Las mutaciones que dan lugar a cambios que no afectan sustancialmente a la secuencia de la proteína se conocen como polimorfismos (Mota *et al.*, 2016). Polimorfismo significa literalmente “muchas formas”. Así, el polimorfismo es el responsable de la gran variabilidad existente entre los individuos una misma especie, aquellos con alteración del fenotipo, pero que no influyen a la susceptibilidad a enfermedades, determinan las características diferenciales entre los individuos de una misma especie, como la estatura, el color del pelo y de los ojos, el grupo sanguíneo, etc. (Torrades, 2002).

Por otro lado, ya que los ácidos nucleicos y las proteínas tienen la propiedad de presentarse en diferentes formas moleculares o en múltiples alelos, pueden tener implicaciones en las patologías moleculares. Un polimorfismo puede observarse en un individuo completo (polimorfismo fenotípico), en formas variables de proteínas o grupos sanguíneos (polimorfismo bioquímico), en las características morfológicas de los cromosomas (polimorfismo cromosómico) o en el ADN, por diferencias en la secuencia nucleotídica (polimorfismos del ADN) (Montes, Rodríguez, & Borunda, 2013).

1.2.5 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Existen varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones o cambios en el número de secuencias repetidas) pero los más frecuentes son los SNP o polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés “single nucleotide polymorphism”). Se trata de una secuencia de ADN que afecta a solo una base (adenina, guanina, timina o citocina vistas en el capítulo 1.2 El ADN) representados por la deleción, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleotídica normal. Una de estas variaciones debe darse al menos en el 1% de la población de una especie para considerarse como un SNP, de no ser así y se presenta en menos del 1% no se considera un SNP y sí una mutación puntual (Mota *et al.*, 2016).

La mayoría de los SNP tiene dos alelos los cuales están representados por la sustitución de una base por otra. Debido a que los humanos son diploides un individuo puede tener uno de tres genotipos siguientes:

- Homocigoto para el alelo más frecuente.
- Heterocigoto.
- Homocigoto para el alelo menos frecuente.

En los últimos años, el descubrimiento de SNP y el desarrollo de marcadores han aumentado exponencialmente en una amplia gama de especies de plantas y animales. Los marcadores SNP ofrecen un gran potencial para una amplia cobertura del genoma y un análisis de alto rendimiento en la cría a través de selección de marcadores y otros estudios. La identificación de rasgos de calidad de focalización selectiva, así como de genes de resistencia a enfermedades, ya está avanzada en varias especies importantes en el comercio (Acquadro, Lee, Chiapparino, & Comino, 2003).

1.3 Genes asociados a la pungencia en *Capsicum*

La pungencia o acritud está dada por ciento genes, como en los otros cultivos, la búsqueda de descendientes con la mejor capacidad de combinación general es una parte extremadamente importante de la cría híbrida de *Capsicum*. En este el género, las especies silvestres han sido útiles en el mejoramiento para resistencia a enfermedades, alto rendimiento, características deseadas y adaptabilidad al estrés ambiental. Sin embargo, la incompatibilidad inter-específica que resulta en un híbrido no viable ha sido uno de los factores limitantes en el uso de especies silvestres y relacionadas en el programa de mejoramiento. Hoy en día, los criadores usan pimientos picantes como donantes en la crianza de pimientos dulces para ingresar genes resistentes de chiles pungentes en chiles no pungentes, porque muchos genes resistentes se encontraron en *C. chinense* (Truong *et al.*, 2009).

Algunos de los genes que se han identificado como causantes de la pungencia están basados en un mapa genético del cromosoma 2 de *C. annuum*, en el que se encuentra el *locus C*, y mediante un análisis de secuencias cortas de expresión propias de placenta de variedades pungentes de Chile, el producto del *locus C* fue identificado y aislado, y se propuso cambiar la nomenclatura para este locus a *Pun1* (Stewart *et al.*, 2005).

El producto de *Pun1*, denominado AT3, corresponde a una presunta aciltransferasa específica para la placenta de los genotipos pungentes de *C. annuum* y de *C. chinense*, y cuya mayor expresión coincide con acumulación de capsaicinoides. El alelo *Pun1* tiene un comportamiento dominante simple que determina la ocurrencia del fenotipo picoso. El alelo recesivo (*pun 1*) ocupa el locus equivalente en los genotipos dulces o no picosos y carece de un fragmento de 2.5 kb (1 kb=mil pares de nucleótidos) próximo al extremo 5' que abarca una porción del promotor y del primer exón (Reddy *et al.*, 2014).

Recientemente ha sido purificada y caracterizada la enzima capsaicina sintetasa (CS). La actividad de CS fue correlacionada con los niveles de capsaicina y estudios de inmunolocalización confirmaron que estaba específicamente localizada en el tejido placentario de los frutos de *Capsicum*. Además, a partir del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, se clonó el gen y se secuenció la longitud total del ADN complementario (ADNc) (981pb). Identificado el gen *csy1*, se estudió su funcionalidad a través de su expresión en *E. coli*. Aun no se dispone de información sobre la localización de este gen en el mapa de *Capsicum* (Curry *et al.*, 1998).

Otras secuencias de ADN relacionadas con esta ruta de biosíntesis de los capsaicinoides han sido publicadas, como es el caso de *Catf1* y *Catf2*. Mientras que la secuencia *Catf2* no ha sido estudiada, la secuencia de *Catf1* parece corresponder a la aciltransferasa AT3 (Reddy *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Clones de ADNc ligados a la pungencia por el gen *Pun1*. Fuente: (Kim, Kim, Kim, & Kim, 2001)

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
SB2-149	SB2-20	SB1-17	SB1-14
SB1-58		SB4-88	SB1-101
SB2-66		SB1-26	SB2-123
SB2-115		SB2-98	

Kim *et al.* (2001) aisló clones de ADNc que se vinculan al gen *Pun 1* y los dividió en grupos (Cuadro 5); el grupo I- enzimas metabólicas, el grupo II-supuestas proteínas de la pared celular, grupo III- inducidos por estrés biótico y abiótico y el grupo IV- clones de ADNc que no presentan homología.

El gen *SB2-66* del grupo I, está estrechamente vinculado al *Pun1* y co-localizado con este gen de la síntesis de capsaicinoides, se demostró que es causa de la falta de síntesis de capsaicinoides en frutos de *Capsicum* no pungentes debido a una delección de 2,5 kb o miles de pares de nucleótidos (Curry *et al.*, 1998).

1.4 Polimorfismo G/T-200

El polimorfismo G/T-200 que es objeto de estudio en este proyecto está asociado a la pungencia en frutos *Capsicum*. Este se ubica en el en el segundo exón del gen *SB2-66* que tiene una longitud de 383 pb y se ha estudiado como una de las causas de la síntesis de capsaicinoides.

El nombre del polimorfismo está dado por el cambio de base que presenta, guanina (G) por timina (T), en la posición 200 pb de el gen mencionado anteriormente.

Este es un tipo de polimorfismo SNP en el cual se sustituye una base nitrogenada por otra en una secuencia de ADN como se observa en la Figura 11 la cual muestra el polimorfismo encontrado en estudios anteriores de *Capsicum*.

	185 195 205 215 225 235
307 bp SCM	AGTTT T GGAG TAAC T GGATG T-----
307 bp YW	AGTTT G GGAG TAAC T GGATG T-----
307 bp Hb	AGTTT T GGAG TAAC T GGATG T-----
362 bp SCM	AGTTT T GGAG TAATTGGATG TCATTCCAA GTC T TTTGTG GTGTTT G ATT GAAGAGAGAG
362 bp Hb	AGTTT T GGAG TAATTGGATG TCATTCCAA GTC T TTTGTG GTGTTT G ATT GAAGAGAGAG
SB2-66	AGTTT T GGAG TAATTGGATG TCATTCCAA GTC T TTTGTG GTGTTT G ATT GAAGAGAGAG

	245 255 265 275 285 295
307 bp SCM	GGATTTTACC AAATAAA--- -----
307 bp YW	GGATTTTACC AAATAAA--- -----
307 bp Hb	GGATTTTACC AAATAAA--- -----
362 bp SCM	GGATTTTACG AAATAAAGGA ATACTTTTGA AACTTACGAA ACAAAGGTAG GAATAATTT
362 bp Hb	GGATTTTACG AAATAAAGGA ATACTTTTGA AACTTACGAA ACAAAGGTAG GAATAATTT
SB2-66	GGGTTTACG AAATAAAGGA ATACTTTTGA AACTTACGAA ACAAAGGTAG GAATAATTT

Figura 11. Polimorfismo G/T-200 de estudios anteriores. Fuente (Garcés *et al.*, 2007).

1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica más revolucionaria de las últimas décadas en ingeniería genética ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha dado nuevos medios para la biotecnología de una forma moderna. Fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80 (Cortazar & Silva, 2004), revolucionando la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento.

Una vez que se conoce la secuencia de un fragmento de ADN, puede usarse esta reacción enzimática que crea millones de copias de *in-vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco o también llamada diana, es copiada fielmente (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa (Proveniente de *Thermophilus aquaticus*) que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Es importante saber con exactitud la secuencia de ADN que se quiere replicar, este se puede extraer de extractos crudos de tejido, muestras de sangre, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, etc. La reacción se lleva a cabo en un termociclador, invención del mismo Mullis, que es básicamente un intercambiador de calor que sube y baja la temperatura según se requiera (Lodish *et al.*, 2016).

Los elementos necesarios para llevar a cabo la reacción según Bolivar, Rojas, & García (2014) son los siguientes:

→ ADN molde o ADN diana

Contiene la región de ADN que se va a amplificar. La cantidad de este molde puede ser de tan sólo 1ng en caso de material genético clonado o de un mínimo de 20 ng cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. En cuanto a concentración debe de ser de 40-90 ng/ μ L (60 ng/ μ L idealmente). En la actualidad existen variados protocolos de extracción en función del tipo de muestra de partida. Otro parámetro importante de la muestra es la pureza, cuyo valor debe fluctuar entre 1.7 y 1.9 dada la relación 260/280 de la longitud de onda

(λ) del ADN y las proteínas, respectivamente, medida mediante un espectrofotómetro. El molde puede ser también ARN previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR.

→ Taq ADN polimerasa

Es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas de alrededor de 72°C las cuales permiten principalmente la eliminación de la mayoría de las estructuras secundarias indeseables presentes en la molécula blanco. La Taq polimerasa se encarga de unir los dNTP's al ADN molde para crear las réplicas que son el objetivo de la PCR. Sin embargo, la Taq polimerasa no posee la actividad correctora 3'→ 5' con lo que su tasa de error es del orden de 10⁻⁴.

✓ Primers (cebadores, oligonucleótidos)

Son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Al ser reconocidos por la enzima permiten iniciar la reacción. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada forward, frontal o sentido y otra reward, reverso o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente). Las consideraciones para su diseño se abordarán posteriormente.

✓ Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's)

Los cuatro dNTP's (las cuatro bases nitrogenadas A, G, T Y C) son los ladrillos para construir las nuevas cadenas de ADN. Las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos entre 0,2 mM a 1 mM, las variaciones en su concentración afectan especificidad y fidelidad ya que concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la enzima e incluso pueden llegar a inhibirla. Los dNTP's pueden

captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar siempre la misma relación.

✓ Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes actúan como cofactores de la enzima por tanto tienen una función crítica en la reacción. Se suele usar Mg^{2+} , agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), requiriéndose que sea usado a una concentración que oscila regularmente entre 0,5 mM y 2,5 mM. En muchos casos la concentración debe optimizarse para cada ensayo, ya que concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento mientras que el exceso tiende a producir amplificaciones inespecíficas o puede llegar a afectar el rendimiento de la Taq polimerasa. Entre los iones monovalentes el más empleado es el potasio (K), generalmente unido a otros iones como el cloro (KCl) en una solución tampón (buffer).

✓ Solución tampón (buffer)

Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento del ADN polimerasa. Por lo general incluye 10 mM tris-HCl (pH=8.4 a T^a ambiente), 50 mM KCl, 0.1% w/v gelatina y 1.5 mM $MgCl_2$.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes como dimetilsulfóxido (DMSO), detergentes como el Tween 20 o el Tritón X-100, polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida y seroalbúmina bovina, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción en cadena de la polimerasa.

✓ Agua libre de nucleasas

Usada como solvente. Se requiere al menos que sea desionizada de 18 m-chms o milli-Q grado molecular.

Habiendo descrito los componentes de la PCR podemos describir cómo funciona la reacción en sus tres etapas (Tamay de Dios *et al.*, 2013):

- ✓ **Desnaturalización:** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que, como se describió anteriormente, el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.
- ✓ **Hibridación:** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad pesos moleculares para elegir el de nuestro interés y especificidad del complejo será eficiente.
- ✓ **Extensión:** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las amplificaciones con un tamaño dictado por los primers y el número total de pares de bases (pb) deberá ser conocido por el investigador.

En la Figura 12 se muestran las tres etapas básicas de la reacción en cadena de la polimerasa.

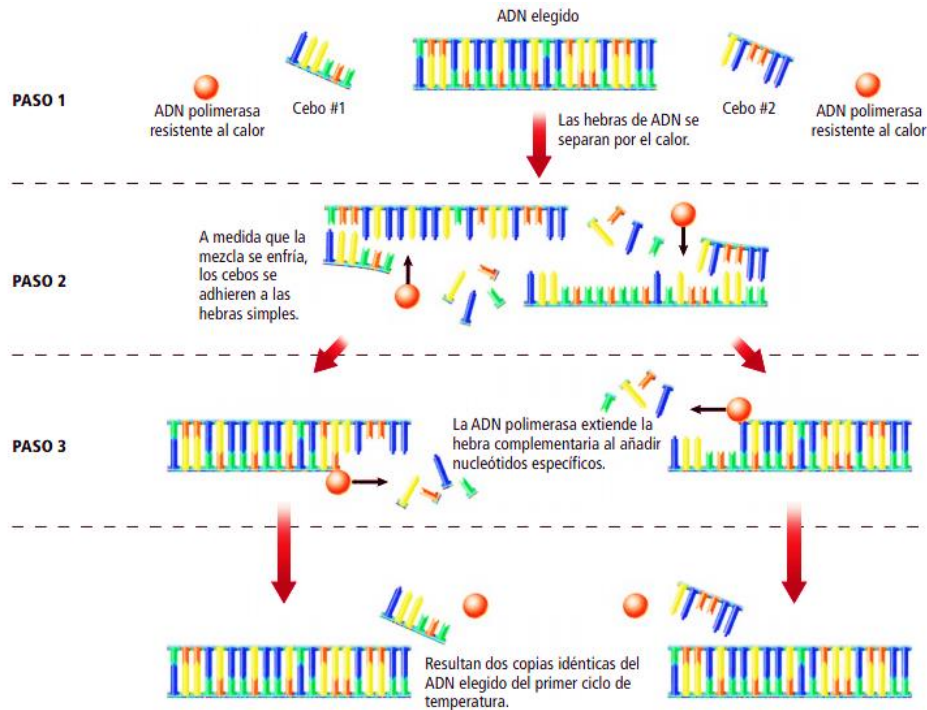


Figura 12. Etapas de la PCR. Fuente (Biggs *et al.*, 2012).

A demás de estas tres etapas básicas, la PCR suele tener dos etapas adicionales antes y después de las antes mencionadas además de un almacenamiento, es decir el esquema convencional de una PCR (Montes *et al.*, 2013), incluye los siguientes pasos que se presentan de manera gráfica en la Figura 14, pag. 58:

1. Inicio de la desnaturalización.
2. Ciclos de amplificación.
 - Temperatura de desnaturalización.
 - Temperatura de alineamiento.
 - Temperatura de extensión.
3. Amplificación final.
4. Almacenamiento temporal.

Para el inicio de la desnaturalización es necesaria una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN, en el caso del ADN genómico, o el rompimiento de estructuras secundarias, en el ADNc. Esta temperatura se mantiene por

cinco minutos al inicio de la PCR. La parte cíclica de la PCR con las tres etapas básicas descritas anteriormente se repite continuamente por 30 a 35 ocasiones para obtener las copias del ADN diana. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra. Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas. Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto. Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria. Generalmente cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su estudio (Mas *et al.*, 2001).

Teóricamente, en cada uno de los ciclos de amplificación se duplica la cantidad de producto inicial. Así, el producto de PCR aumenta exponencialmente conforme al número de ciclos de PCR (n). Sin embargo, el producto de PCR depende del número inicial de copias del molde de ADN (T), por lo que se aplica la fórmula según Montes y otros (2013):

$$P = (2)^{nT}$$

Donde:

P = número de moléculas producto de PCR;

n = número de ciclos;

T = número de copias inicial de la molécula molde.

Finalmente, el almacenamiento temporal se realiza a 4°C lo que permite conservar los productos de la PCR hasta que se retiren los tubos de la reacción del equipo, inclusive varias horas después de haber terminado (Montes *et al.*, 2013).

En la actualidad, debido a la gran variedad de aplicaciones y ventajas de la técnica de PCR han surgido diversas modalidades, algunas de las más relevantes se enlistan a continuación:

PCR cualitativa: Esta modalidad de PCR permite detectar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado. Es decir, sólo reporta si una muestra es positiva o negativa ante la presencia de un determinado ADN. Se emplea para el

diagnóstico de enfermedades infecciosas y sólo permite confirmar la presencia o ausencia de un determinado agente patógeno (Montes *et al.*, 2013).

PCR cuantitativa: En esta modalidad de PCR, el producto de PCR es cuantificable, lo que permite reportar en números absolutos la cantidad de un microorganismo o del ARNm de un gen en una muestra. Para la cuantificación absoluta se amplifica al mismo tiempo una curva con muestras de concentración conocida del ADN que se quiere analizar. Los resultados de las muestras se traslapan a los valores de la curva y de esta manera se conoce la concentración de la muestra (Montes *et al.*, 2013).

PCR múltiple (varias regiones o varios genes): En este tipo de PCR se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o más juegos de primers (cada juego para un gen en particular). Tiene la ventaja de que ahorra tiempo y reactivos, pero presenta el inconveniente de que el diseño de los primers debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (hibridaciones inespecíficas). La PCR múltiple o multiplex puede emplearse para la búsqueda de varias deleciones, mutaciones y polimorfismos en un solo gen o en múltiples. Esta técnica se utiliza para el análisis simultáneo de múltiples marcadores moleculares asociados a alguna enfermedad, para la detección simultánea de varios agentes patógenos, organismos genéticamente modificados, etc. (Montes *et al.*, 2013).

RT-PCR: Requiere que primero se cree una cadena de ADNc a partir de una preparación de ARNm, como en la construcción de una biblioteca de ADNc y que luego se amplifique un ADNc de esta población mediante PCR utilizando preparadores específicos de un gen. Ésta suele ser la forma más rápida de producir un ADNc de doble hebra específico para clonación (por ejemplo, para la producción de proteínas recombinantes) y evita la necesidad de hacer una biblioteca de ADNc completa. También puede utilizarse para la cuantificación de ARNm (McLennan *et al.*, 2014).

PCR in situ: Se realiza en una muestra de tejido embebida en parafina (laminilla) o congelada y cortada en criostato. No requiere extracción del ADN del tejido. En la laminilla se añaden los reactivos necesarios para la PCR y se colocan en un termociclador especial, ya que en lugar de tener orificios para colocar tubos contiene ranuras para colocar las laminillas. Esta modalidad de PCR permite saber qué tipo celular presente en un tejido expresa un determinado gen o cuál célula está infectada por un patógeno (Montes *et al.*, 2013).

PCR anidada (nested-PCR): Esta variante de la PCR convencional proporciona mayor sensibilidad a la técnica, al amplificar las secuencias de ADN en dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o primers en cada una. Esto es, primero se realiza una PCR con un par de iniciadores externos para amplificar una región de ADN extensa, que contiene el segmento diana que se desea amplificar. Después, este producto de amplificación sirve de molde para una segunda PCR con otro par de iniciadores internos (primers anidados) para amplificar una región más pequeña (interna). Por lo tanto, la longitud del producto de amplificación de la segunda PCR, o PCR anidada, será menor que la del primer producto de PCR (Montes *et al.*, 2013).

1.5.1 Diseño de primers

Como se explicó anteriormente, los primers, también llamados cebadores o iniciadores, son secuencias complementarias del ADN molde que sirven como delimitantes para la amplificación de una secuencia de interés. Su diseño debe de cumplir ciertas especificaciones para que la PCR se realice con éxito (Mas *et al.*, 2001). Las especificaciones son las siguientes:

- La concentración óptima de los primers deberá de ser de 0.1 M y 0.5 M.
- Normalmente deben tener un tamaño o longitud de 18-25 pb.
- ✓ El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50 %.
- ✓ La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60 % /40 %.

- ✓ Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base, es decir, regiones con poli-guaninas o poli-citocinas pueden no tener un reconocimiento específico.
 - ✓ No seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria.
 - ✓ Se recomienda que los extremos las últimas bases sean G (guanina) o C (citocina).
 - ✓ Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de primers. Si ésta existe entre los extremos 3', se aumenta la posibilidad de que se creen dímeros de primers.
- La temperatura de hibridación de los cebadores ha de ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 55°C y 60°C.

Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers, hoy en día existen programas informáticos para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados. Incluso, hay laboratorios de biología molecular que se dedican a diseñarlos, sintetizarlos y validarlos para garantizar su especificidad (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.5.2 Ventajas y desventajas

Habiendo descrito la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa podemos decir que a pesar de ser una técnica revolucionaria y ampliamente usada tiene sus ventajas y desventajas las cuales se muestran en el Cuadro 6:

Cuadro 6. Ventajas y desventajas de la PCR.

Ventajas	Desventajas
La PCR es una técnica muy sensible, vemos que una de sus mayores ventajas de la técnica, se convierte a la vez en el principal inconveniente, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no es real (Mas <i>et al.</i> , 2001).	
La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses por lo que la rapidez es de sus principales ventajas (Mas <i>et al.</i> , 2001).	Una desventaja de la PCR como método de clonación de ADN ha sido el tamaño de las secuencias de ADN que permite clonar. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. (Cuenca, 2006).
La cantidad y estado de la muestra no es un impedimento para poder llevar a cabo la reacción ya que se necesita poca muestra y hasta ADN de células muertas o degradadas (Mas <i>et al.</i> , 2001)	Para poder construir primers específicos para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN se necesita un conocimiento preciso de esta (Cuenca, 2006).

1.5.3 Aplicaciones

Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte de la labor científica de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones, pueden utilizarse, en medicina forense, entre otras muchas aplicaciones (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La PCR se encuentra al alcance económico de la mayoría de los laboratorios y en los últimos años se ha convertido en una técnica indispensable para el diagnóstico médico. Con ella se pueden amplificar segmentos que contienen una mutación conocida o bien mutaciones desconocidas que se secuenciarán y determinarán después de una PCR. Esto ha sido de gran ayuda para el diagnóstico y la correlación de variaciones génicas con enfermedades. En cuanto a las enfermedades adquiridas, la detección de genomas de patógenos es la aplicación diagnóstica más empleada de la PCR (Montes *et al.*, 2013).

1.6 Electroforesis

La electroforesis es una técnica empleada para separar moléculas de una mezcla, por la influencia de un campo eléctrico aplicado y es una de las técnicas utilizadas con mayor frecuencia para estudiar las proteínas y los ácidos nucleicos. Las moléculas disueltas en un campo eléctrico se mueven o migran a una velocidad determinada por su cociente carga/masa y las propiedades físicas del medio a través del cual migran (Lodish *et al.*, 2016).

La electroforesis para la separación de los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica, se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Para realizar una electroforesis se requiere de una serie de elementos que se describen a continuación de acuerdo con Montes y otros (2013):

→ Cámara de electroforesis:

Es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel donde se depositan las muestras. La cámara cuenta con dos polos que se conectan a una fuente de energía. Los geles pueden ser de agarosa o poliacrilamida según el tipo de muestra que se tenga (proteínas o ácidos nucleicos).

→ Buffer de corrimiento:

Es de la misma composición y pH que el buffer con el que se prepara el gel de resolución, ya sea de agarosa o de acrilamida. Éste proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza el corrimiento.

→ Marcador de peso molecular:

Son moléculas de ADN o de proteínas cuyo peso molecular es conocido y que permiten determinar por comparación el tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos o proteínas contenidos en las muestras sometidas a electroforesis.

→ El transiluminador:

Transmite luz del espectro ultravioleta a través de la muestra, excitando la molécula cromogénica que emite energía fluorescente que permite visualizar los fragmentos de ADN.

1.7 Técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica de RFLP se basa en la detección de aquellas variaciones de secuencia del ADN, que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción. Una diana de restricción es aquella región conocida del genoma que se puede cortar con unas proteínas conocidas con el nombre de enzimas de restricción y que realizan la función de tijeras. Los fragmentos que se obtienen, mediante estas enzimas de restricción, serán de diferente tamaño en función de los alelos que presente. Estos fragmentos de ADN representan la diversidad del genoma dentro de una población. Se han detectado un gran número de RFLP en el genoma humano, adquiriendo el carácter de marcadores genéticos, que tienen múltiples aplicaciones (Torrades, 2002).

Una mutación puede cambiar la secuencia de reconocimiento si se pierde un sitio de corte, por lo que al analizar dos moléculas de ADN distintas pueden obtenerse patrones de bandas diferentes, es decir, polimorfismos detectados por diferente longitud de las bandas obtenidas tras la digestión enzimática que se visualizan mediante una electroforesis en gel (Jiménez & Nuño, 2013). Los RFLP se heredan siguiendo un patrón mendeliano y generalmente son codominantes. De cada sitio de corte pueden considerarse dos alelos: presencia o ausencia del sitio de corte (Krebs, Kilpatrick, & Goldstein, 2011).

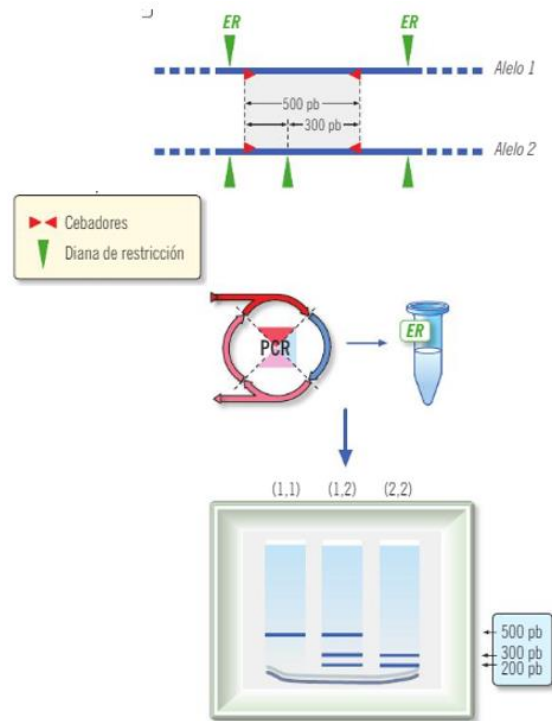


Figura 13. Técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Fuente (Jiménez & Nuño, 2013).

Para analizar RFLP (Figura 13) es necesario determinar la longitud de uno o dos fragmentos diagnósticos acompañados de multitud de fragmentos irrelevantes. Se pueden observar RFLP directamente sobre geles de agarosa si se estudia una región concreta del genoma amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), flanqueando el sitio de corte utilizando como marcador, pues en este caso los productos de digestión se reducen a unos pocos fragmentos distinguibles en el gel (Jiménez & Nuño, 2013).

Los RFLP han sido especialmente valiosos para cartografiado del genoma humano, ya que los investigadores solo disponen de la segregación de mutaciones espontáneas que ocurren en genealogías para estimar las distancias genéticas (Étienne, 2001).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Justificación

México es el segundo productor de chile (*Capsicum*) a nivel mundial ya que según la SAGARPA (2015) es el 8° cultivo de mayor valor en el país generando hasta 720 mdd al año. Este fruto es no solo para usos gastronómicos sino también para fines medicinales, es por eso que el estudio de sus cualidades es de alto interés.

La pungencia, picor, o acritud es la sensación de ardor en el gusto que se experimenta al consumir productos como el chile, esta característica es causada por los capsaicinoides y está determinada por el gen Pun 1, SB2-66, SB2-149, SB1-58, entre otros (Garcés *et al.*, 2017), esto es de sumo interés sobre todo a la industria alimentaria, ya que influye en la aceptación de un producto por el consumidor y por otro lado genera información sobre el comportamiento de las cruces en *Capsicum* y sus progenitores. Además la introducción de genes asociados a la producción de capsaicinoides en *Capsicum* conferiría características de interés a otras especies de plantas como son las antifúngicas y antibacterianas.

Para determinar si existe o no pungencia lo más común es usar un análisis sensorial por un panel de degustación, pero esta técnica tiene una limitación que un análisis genético no, y esto es la detección del fenotipo desde una etapa muy temprana en el cultivo de este fruto.

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permite replicar cientos de miles y millones de veces en cuestión de horas e in vitro, pequeños fragmentos de ADN (Mota *et al.*, 2016) que son de interés para una investigación, en este caso para el gen SB2-66 en donde se encuentra el polimorfismo de nucleótido simple G/T-200.

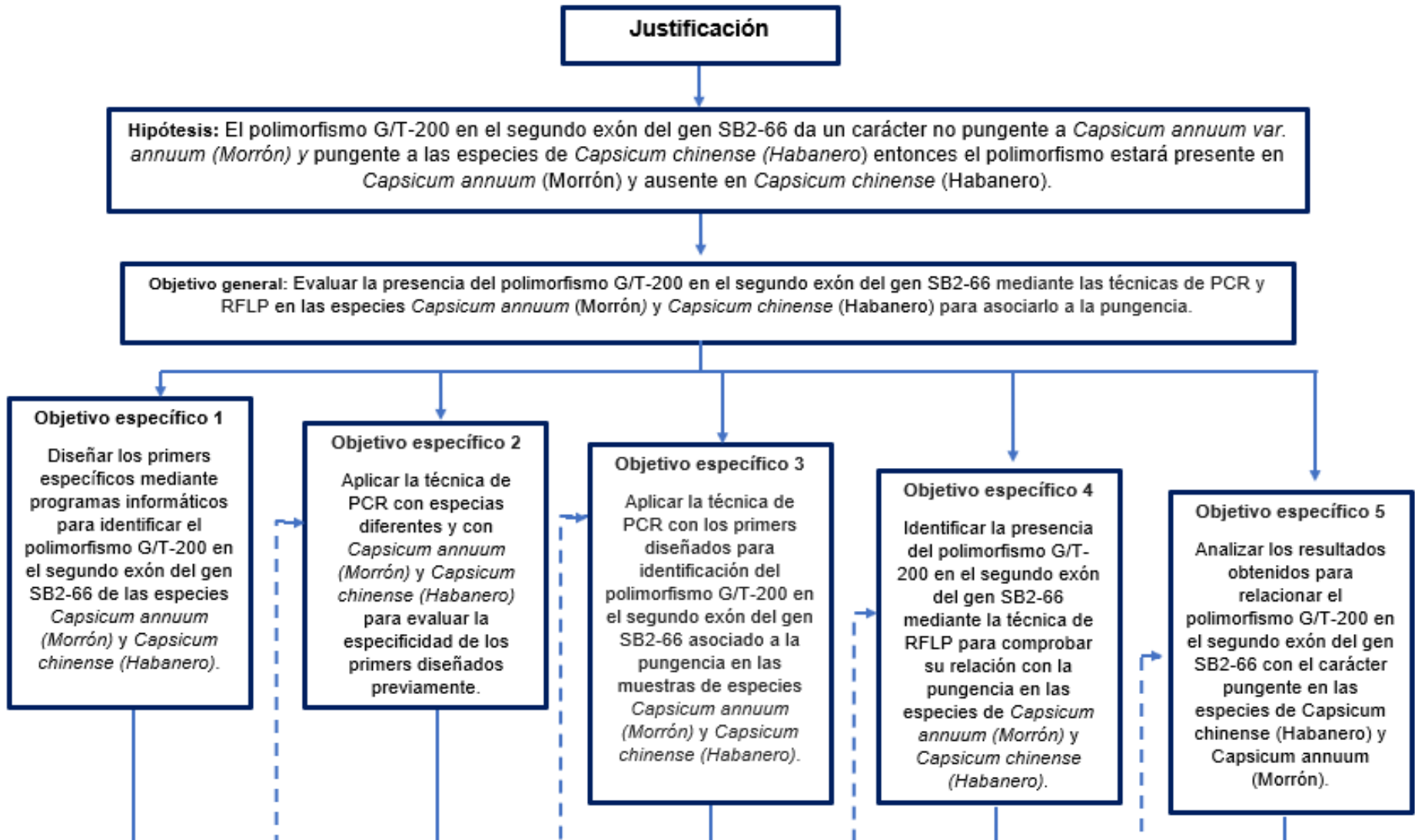
Los polimorfismos tienen muchas y diversas aplicaciones, entre ellas la correlación de fenotipos con genotipos y la identificación entre estructura y funciones de los productos codificados por los genes (Mota *et al.*, 2016), estas mutaciones se pueden expresar en

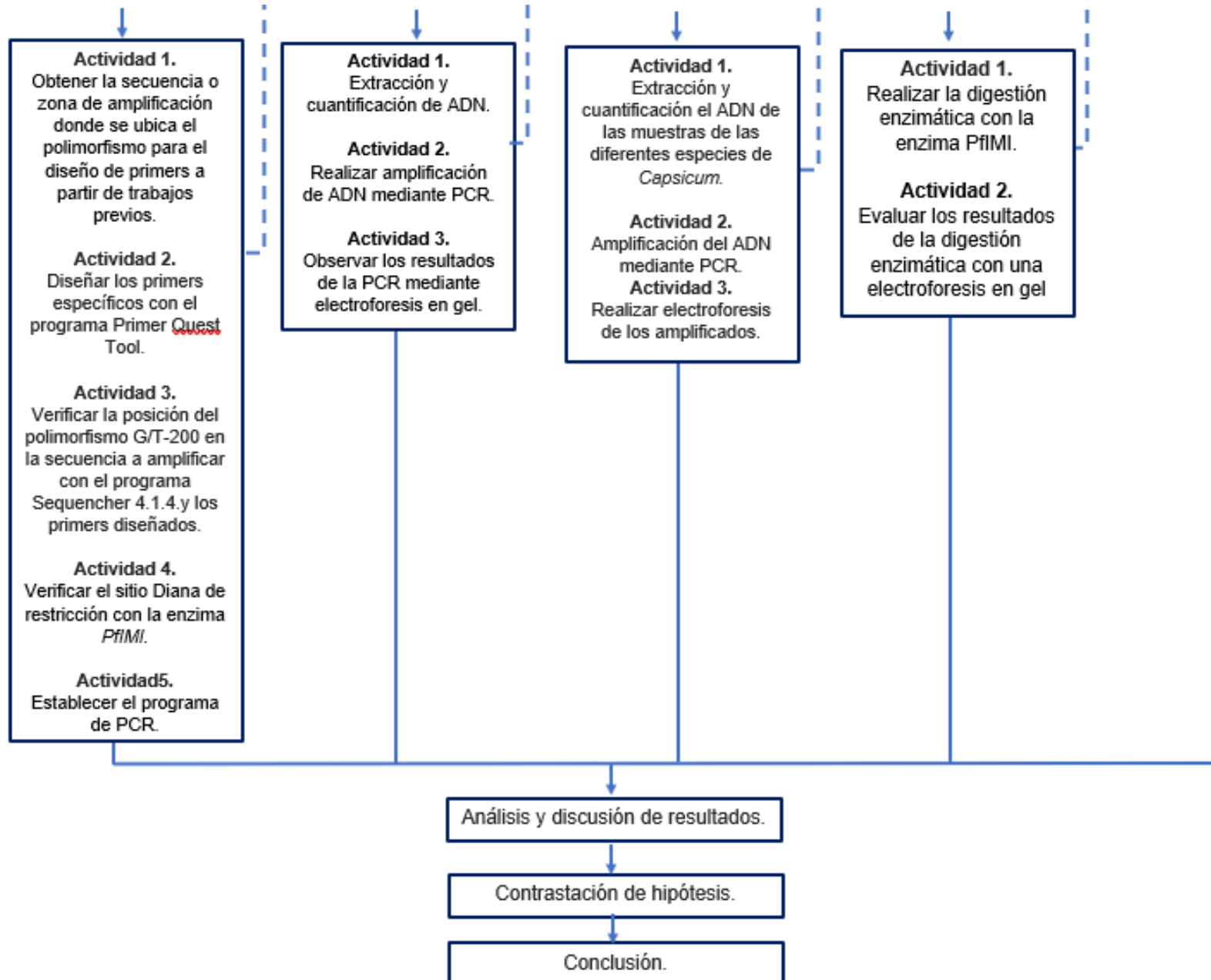
fenotipos de diferentes formas como son el color del fruto, el crecimiento del mismo o como en este caso, la pungencia.

En este estudio se evaluó si existe el polimorfismo G/T-200 que asocia esta característica pungente en las especies de *Capsicum chinense* (Habanero) y no pungente a *Capsicum annuum* (Morrón) para que se pueda predecir en la cruce de especies.

2.2 Cuadro metodológico

Identificación del polimorfismo G/T-200 en el segundo exón del gen SB2-66 asociado a la pungencia en *Capsicum annuum* var. *annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).





2.3 Hipótesis

El polimorfismo G/T-200 en el segundo exón del gen SB2-66 da un carácter no pungente a *Capsicum annuum* (Morrón) y pungente a las especies de *Capsicum chinense* (Habanero) entonces el polimorfismo estará presente en *Capsicum annuum* (Morrón) y ausente en *Capsicum chinense* (Habanero).

2.4 Objetivo general

Evaluar la presencia del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 mediante las técnicas de PCR y RFLP en las especies *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero) para asociarlo a la pungencia.

2.4.1 Objetivo específico 1

Diseñar los primers específicos mediante programas bioinformáticos para identificar el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 de las especies *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

Actividad 1.

Obtener la secuencia o zona de amplificación donde se ubica el polimorfismo para el diseño de primers a partir de trabajos previos.

Actividad 2.

Diseñar los primers específicos con el programa Primer Quest Tool.

Actividad 3.

Verificar la posición del polimorfismo G/T-200 en la secuencia a amplificar con el programa Sequencher 4.1.4.y los primers diseñados

Actividad 4.

Verificar el sitio Diana de restricción con la enzima *PfIMI*

Actividad 5.

Establecer el programa de PCR.

2.4.2 Objetivo específico 2

Aplicar la técnica de PCR con especias filogenéticamente cercanas y lejanas, y con *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero) para evaluar la especificidad de los primers diseñados previamente.

Actividad 1.

Extracción y cuantificación de ADN.

Actividad 2.

Realizar amplificación de ADN mediante PCR.

Actividad 3.

Observar los resultados de la PCR mediante electroforesis en gel.

2.4.3 Objetivo específico 3.

Aplicar la técnica de PCR para identificación del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 asociado a la pungencia en las muestras de especies *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

Actividad 1.

Extracción y cuantificación el ADN de las muestras de las diferentes especies de *Capsicum*.

Actividad 2.

Amplificación del ADN mediante PCR.

Actividad 3.

Realizar electroforesis de los amplificados.

2.4.4 Objetivo específico 4

Identificar la presencia del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 mediante la técnica de RFLP para comprobar su relación con la pungencia en las especies de *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

Actividad 1.

Realizar la digestión enzimática con la enzima PflMI.

Actividad 2.

Evaluar los resultados de la digestión enzimática con una electroforesis en gel.

2.4.5 Objetivo específico 5

Analizar los resultados obtenidos para relacionar el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 con el carácter pungente en las especies de *Capsicum chinense* (Habanero) y *Capsicum annuum* (Morrón).

2.5 Materiales y métodos

Para evaluar la presencia del polimorfismo se extrajo ADN de 10 muestras de *Capsicum chinense* (Habanero) y 11 muestras *Capsicum annuum* (Morrón) procedentes de diferentes puntos de venta, los cuales se describen en el Cuadro 7. La compra de dichos productos se realizó en el periodo de agosto a noviembre del año 2018.

Cuadro 7. Muestras de *Capsicum* utilizadas en la experimentación.

<i>Capsicum chinense</i> (Habanero) (Pungente)			<i>Capsicum annuum</i> (Morrón) (No Pungente)		
Muestra	Procedencia	Costo (Kg)	Muestra	Procedencia	Costo (Kg)
1	Mercado 1, Coacalco, Estado de México.	\$35.0	11	Mercado 1, Coacalco, Estado de México.	\$100.0
2	Mercado 2, Coacalco, Estado de México.	\$37.0	12	Mercado 2, Coacalco, Estado de México.	\$105.0
3	Mercado 3, Coacalco, Estado de México.	\$37.0	13	Mercado 3, Coacalco, Estado de México.	\$120.0
4	Walmart, Coacalco, Estado de México.	\$37.9	14	Walmart, Coacalco, Estado de México.	\$99.9
5	Soriana, Buena Vista, CDMX.	\$69.0	15	Soriana, Buena Vista, CDMX.	\$120.0
6	Chedraui, Coacalco, Estado de México.	\$59.8	16	Chedraui, Coacalco, Estado de México.	\$80.0
7	Mercado 1, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	\$40.0	17	Mercado 1, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	\$95.0
8	Mercado 2, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	\$38.0	18	Mercado 2, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	\$100.0
9	Central de abastos 1, Ecatepec, Estado de México.	\$35.0	19	Central de abastos 1, Ecatepec, Estado de México.	\$90.0
10	Central de abastos 2, Ecatepec, Estado de México.	\$35.0	20	Central de abastos 2, Ecatepec, Estado de México.	\$100.0
C+	Central de abastos 1, Ecatepec, Estado de México.	\$35.0			

De la tabla anterior podemos observar que los costos, si bien variados, tienen una tendencia a ser menores en lugares como los mercados y la central de abastos, en esta,

ultima el costo del fruto disminuía en la compra por mayoreo. Mientras que en las cadenas de supermercados el costo era más elevado.

2.5.1 Extracción de ADN

Materiales y equipos

- Agitador Vortex Genie K-550-G
- Centrifuga Minispin plus Eppendorf
- Juego de micropipetas, Rainin de 0.5-1000 μ L.
- Microcentrífuga, Wigen hauser.
- Mortero
- Termoblok Thermomixer compact Eppendorf.
- Tubos eppendorf de 2 mL.

Reactivos

- Agua libre de nucleasas con pH de 7
- Enzima proteinasa K
- Etanol frío
- Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
- Solución de lisis (Tris base 50nM, pH de 8, EDTA 0,1M, SDS 0.5%)

Procedimiento

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Sambrook (2001), el primer paso fue la disgregación del tejido, esta se realizó moliendo la muestra con ayuda de un mortero hasta formar una mezcla o masa homogénea, se pesaron 0.125g en un tubo eppendorf y se agregó 1250 μ L de solución de lisis. Posteriormente se adicionó la cantidad de 7 μ L de la enzima Proteinasa K. Las muestras recolectadas de los germinados de *Capsicum* se almacenaron al menos doce horas antes de ser incubadas mientras que las muestras de recolectadas directamente de las semillas del fruto se incubaron inmediatamente en

el termoblock a 50°C, después de dos horas se elevó la temperatura a 60°C y se incubó una hora más para desactivar la enzima. Dichas condiciones se aplicaron a los dos tipos de muestra.

El segundo paso fue la extracción de proteínas y polisacáridos del ADN para esto se agregaron 250 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a la muestra que se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos de la cual se recuperó la fase acuosa del ADN. Esta fase se repitió dos o tres veces según el caso para recuperar la mayor cantidad de ADN y no los pigmentos.

Finalmente, la precipitación de ADN se realizó añadiendo aproximadamente 1500µL de etanol frío a la muestra y centrifugándolo de nuevo por 10 minutos a 10,000 rpm. Se decantó el etanol y se dejó secar al rededor una hora a 37°C y se adiciono 50µL de agua desionizada para re-suspender el ADN y poder cuantificarlo posteriormente.

2.5.2 Cuantificación de ADN

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000)
- Juego de micropipetas

Reactivos

- Agua libre de nucleasas con pH de 7
- Muestras de ADN

Procedimiento

Para la cuantificación de ADN se utilizó el equipo Nanodrop (ND-1000) que es un espectrofotómetro conectado a una computadora el cual nos permite cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos y la pureza de la muestra (relación 260/280) entre otros parámetros.

La lectura se realiza poniendo 2 μ L de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo, se limpió el sensor y nuevamente 2 μ L de agua libre de nucleasas que sirvieron como blanco. A continuación, se procedió a poner 2 μ L de la muestra para su lectura.

Los datos obtenidos deben de ser aproximados a la concentración ideal de ADN de 60 ng/ μ L de no ser así la muestra se debe diluir o repetir la extracción según sea el caso y la relación 260/280 debe oscilar entre 1.7 a 1.9.

2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Materiales y equipos

- Agitador Vortex Genie K-550-G
- Juego de micropipetas de 0.5-1000 μ L
- Microcentrífuga, Wigggen hauser.
- Termociclador Apollo instrumentation ATC 401
- Tubos eppendorf de 0.2 mL

Para realizar la reacción de PCR se realizaron los cálculos necesarios para determinar la cantidad de cada componente de la reacción, los cuales fueron:

Cuadro 8. Componentes para la reacción de PCR.

Componente	Cantidad (μ L)
Kit GoTaq	6.25
Agua libre de nucleasas	5.75
Primer frontal	0.25
Primer reverso	0.25
ADN	0.5

Se prepararon las muestras en cada tubo y centrifugaron por 5 segundos aproximadamente. Se programo el termociclador según las condiciones del programa de PCR.

2.5.4 Electroforesis

Materiales y equipos

- Balanza analítica electrónica, Sartorius.
- Espátula
- Horno de microondas, Mirage JMI-010.
- Matraz 50ml
- Papel Parafilm
- Probeta 100ml
- Trasluminador de luz UV, Cleaver Scientific LTD.

Reactivos

- Agarosa
- BRET (bromuro de etidio)
- TAE 1X

Procedimiento

Para la electroforesis se preparó el gel de agarosa al 1.5% en TAE1X, esta disolución se calentó en el horno de microondas por 1 minuto aproximadamente hasta que se disolvió por completo la agarosa. Posteriormente con extremo cuidado se añadió una gota de BRET, se vertió la mezcla en la cámara de electroforesis y se colocaron los peines. Una vez gelificada la solución se retiraron los peines y se agregó TAE1X a la cámara de modo que el gel quedara cubierto

Una vez realizado lo anterior, con ayuda de un trozo de parafilm colocar 3 μ L de BRET, 3 μ L de blue-orange y 5 μ L de muestra resultante de la PCR o 1 μ L de marcador de peso molecular. Activar el campo eléctrico a 70 V con especial cuidado del lado positivo y el negativo en sus respectivos lugares. La corrida se suspende hasta que el colorante avance $\frac{3}{4}$ del gel.

Para visualizar los fragmentos se coloca cuidadosamente el gel en el centro dentro del transluminador, una vez prendido el equipo, se enciende la luz ultravioleta y se fotografía el gel.

2.5.5 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Materiales y equipos

- Juego de micropipetas, de 0.5-1000 μL
- Papel Parafilm
- Termociclador ATC 4011

Reactivos

Para la digestión enzimática:

- Buffer
- Enzima PflMI
- Producto de PCR
- Agua libre de nucleasas pH7
- Poliacrilamida
- BRET (bromuro de etidio)
- TBE 5X

Para la digestión con la enzima de corte PflMI se utilizaron los fragmentos resultantes de la PCR en la siguiente reacción de 10 mL los cuales se incubaron a 37°C por un periodo de 40 minutos.

Cuadro 9. Componentes de la digestión enzimática.

Componente	Cantidad (μL)
Buffer	1.0
Enzima PflMI	0.4
Agua libre de nucleasas	3.6
Producto de PCR	5.0

Los fragmentos resultantes se observaron con un gel de poliacrilamida al 12% compuesto por 40mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 39.9mL de agua bidestilada, 20mL de TBE 5X, 0.7mL de APS (persulfato de amonio) al 10% y 35 μ L de TEMED.

Para cargar el gel cada pocillo se cargó con 3 μ L de blue/orange y 5 μ L de la muestra resultante de la digestión enzimática ó 1.5 μ L de marcador de peso de 100 pares de bases. Dicho gel se corrió a 80 V por aproximadamente una hora.

Los fragmentos observados deberán de ser:

- Homocigoto para el polimorfismo (presencia del polimorfismo):154 pb y 162 pb
- Homocigoto para la secuencia original (ausencia del polimorfismo): 316 pb
- Heterocigoto: 316 pb, 154 pb y 162 pb.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Objetivo específico 1

Diseñar los primers específicos mediante programas informáticos para identificar el polimorfismo G/T-200 en el segundo exón del gen SB2-66 de las especies *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

Para el diseño de primers se utilizó el número de acceso de GenBank o GI del gen SB2-66 reportado en el artículo “Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp.” (Garcés *et al.*, 2007), la metodología completa del diseño se muestra en el Anexo 1.

Con estos primers se verificó que el polimorfismo G/T-200 estuviera presente en el gen SB2-66 con el programa Sequencher 4.1.4, esta metodología se incluye en el anexo 3, por lo que se concluyó que el sitio diana de restricción aparece en la posición 151 de la secuencia amplificada por los primers.

Los primers elegidos se muestran en el Cuadro 10:

Cuadro 10. Primers diseñados para la experimentación.

Primer	Secuencia	Amplificado
Frontal	GGAAATGGTCCCTCCAAGAAT	316
Reverso	TGACCGTAAACTTCCGTTGTAA	

La temperatura de hibridación de los primers utilizada en el programa de la PCR fue determinada mediante un gradiente de temperatura usando como punto de partida la temperatura promedio sugerida por el fabricante (64°C) y la calculada (57°C) que se puede revisar en el anexo 2.

Cuando se establecieron los primers y su temperatura de hibridación se procedió a realizar el programa de la PCR que se muestra en la Figura 14.

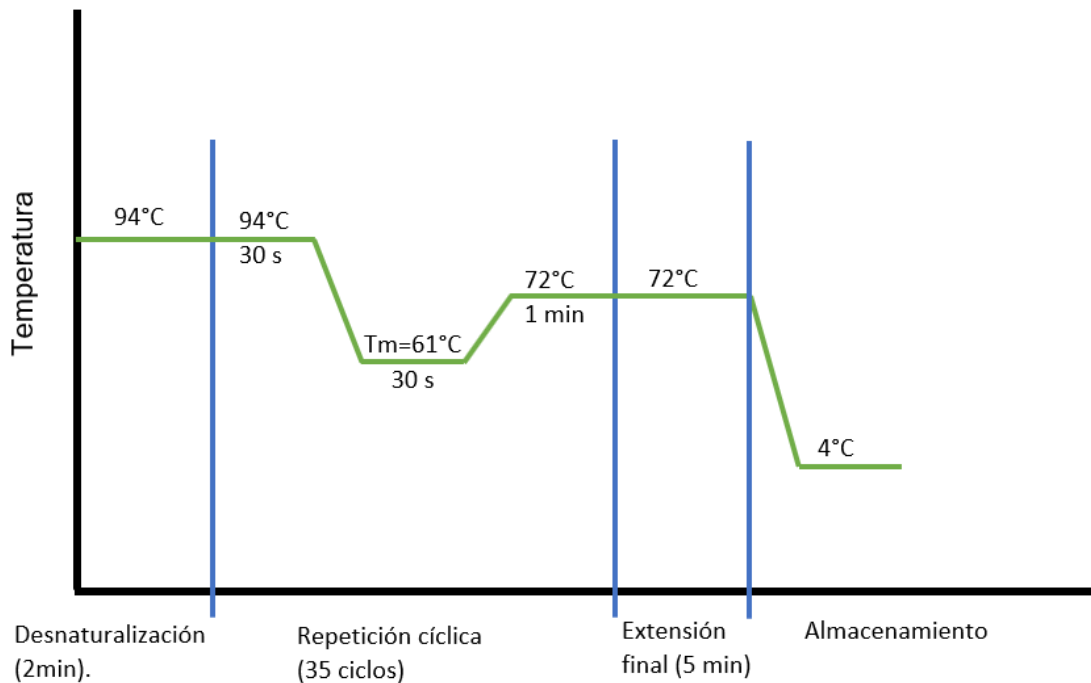


Figura 14. Programa de PCR con T_m calculada.

4.2 Objetivo específico 2

Aplicar la técnica de PCR con especies filogenéticamente cercanas y lejanas, y con *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero) para evaluar la especificidad de los primers diseñados previamente.

Como siguiente paso se llevó a cabo la especificidad de los primers diseñados antes de someter las muestras a la PCR. Se utilizó el ADN de especies filogenéticamente cercanas por ser de origen vegetal (zanahoria, trigo y avena) y lejanas por ser de origen animal (pollo, cerdo, bovino), se puede apreciar en la Figura 15 que el único amplificado es el del control positivo (C+) de *Capsicum* con 316 pb, lo cual comprueba que los primers si son específicos para la especie de interés.

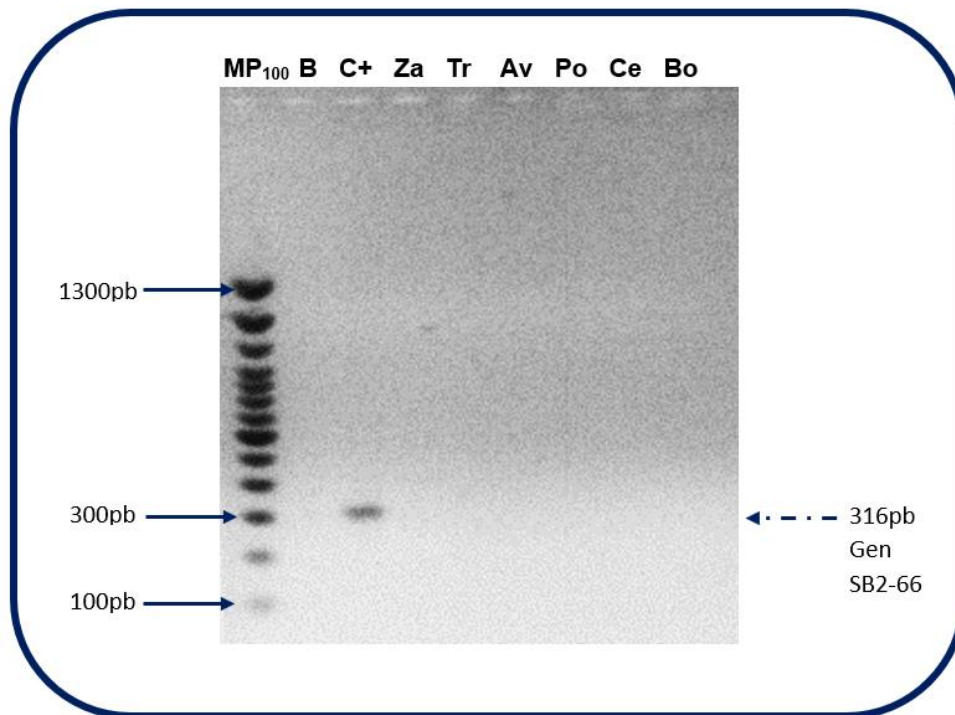


Figura 15. Gel de electroforesis de especificidad de primers. MP: marcador de peso molecular, B: blanco, C+: control positivo de *Capsicum*, Za: zanahoria, Tr: trigo, Av: avena, Po: pollo, Ce: cerdo, Bo: bovino.

3.3 Objetivo específico 3

Aplicar la técnica de PCR para identificación del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 asociado a la pungencia en las muestras de especies *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

Se utilizaron las semillas y los germinados de estas para obtener en total 10 muestras de ADN de *Capsicum annuum* y 10 de *Capsicum chinense* para realizar la extracción de ADN mediante el método Sambrook (2001) detallado anteriormente en la metodología experimental, posteriormente las muestras se cuantificaron mediante espectrofotometría en un Nanodrop (modelo ND-1000). Algunas muestras fueron diluidas para que su alta concentración de ADN no afectara la PCR.

La concentración óptima para llevar a cabo la reacción de la PCR es de 40-80 ng/μL, pero para este caso se obtuvieron resultados satisfactorios con una concentración de hasta 174 ng/μL. Los resultados de la cuantificación de *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense* se muestran en los cuadros 11 y 12 respectivamente.

Cuadro 11. Concentraciones y pureza de las muestras de extracción de ADN de *Capsicum annuum*.

Numero y tipo de muestra	Muestra concentrada		Muestra diluida	
	Concentración (ng/ μL)	Relación 260/280	Concentración (ng/ μL)	Relación 260/280
1M (Germinado)	80.1	1.70	-	-
2M (Germinado)	80.9	1.62	-	-
3M (Germinado)	174.6	1.73	-	-
4M (Semilla)	243.7	1.62	95.3	1.50
5M (Semilla)	481.5	1.63	137.9	1.60
6M (Semilla)	834.7	1.57	164.6	1.62
7M (Semilla)	377.1	1.75	113.9	1.60
8M (Semilla)	390.2	1.71	69.7	1.60
9M (Semilla)	427.2	1.77	84.4	1.63
10M (Semilla)	830.3	1.56	80.3	1.58
C+ (Germinado)	121.6	1.64	-	-

Cuadro 12. Concentraciones y pureza de las muestras de extracción de ADN de *Capsicum chinense*

Numero de muestra	Muestra concentrada		Muestra diluida	
	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260/280	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260/280
1H (Germinado)	576.7	1.76	110.3	1.55
2H (Germinado)	899.8	1.63	98.6	1.63
3H (Semilla)	436.3	1.68	136.4	1.63
4H (Semilla)	897.3	1.53	119.2	1.40
5H (Germinado)	1436.4	1.72	114.4	1.68
6H (Semilla)	320.4	1.66	90.5	1.55
7H (Semilla)	227.2	1.62	100.3	1.46
8H (Semilla)	227.8	1.58	110.0	1.59
9H (Semilla)	312.7	1.52	172.2	1.48
10H (Semilla)	234.8	1.61	173.1	1.49

Como se observa en los cuadros 11 y 12, las concentraciones fueron ajustadas y la pureza del ADN representada por la relación 260/280 está dentro del rango aceptable para llevar a cabo la reacción de la PCR ya que no se ve afectada por proteínas restantes durante la extracción de ADN.

Posteriormente a realizar la prueba de especificidad de los primers se procedió a realizar la PCR con las 20 muestras de ADN extraídas, los resultados de la reacción fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en un campo eléctrico de 70V.

En la Figura 16 se muestra el control positivo (C+) que nos asegura que la reacción se llevó a cabo de manera correcta, el blanco (B) que indica que la reacción no está contaminada y los amplificadores de las muestras 1M y 2M en los últimos dos carriles del gel de electroforesis.

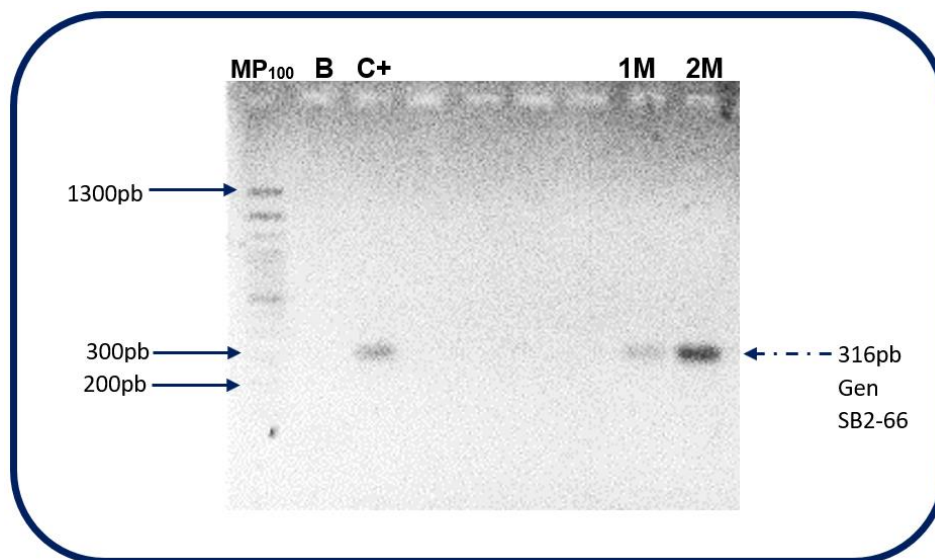


Figura 16. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 1M y 2M pertenecientes a *Capsicum annuum*, MP₁₀₀: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.

A continuación, en la Figura 17 se muestran de igual manera la muestra 3M que fue extraída de *Capsicum annuum* También se observa el correspondiente C+ de la reacción, el blanco y el marcador de peso molecular de 100 pares de bases. En el carril que se encuentra entre el control positivo y la muestra 3M se observa una muestra más que se cargó en el gel de electroforesis, pero no se utilizó ya que se observaba débil y por tanto no era apta para la digestión enzimática.

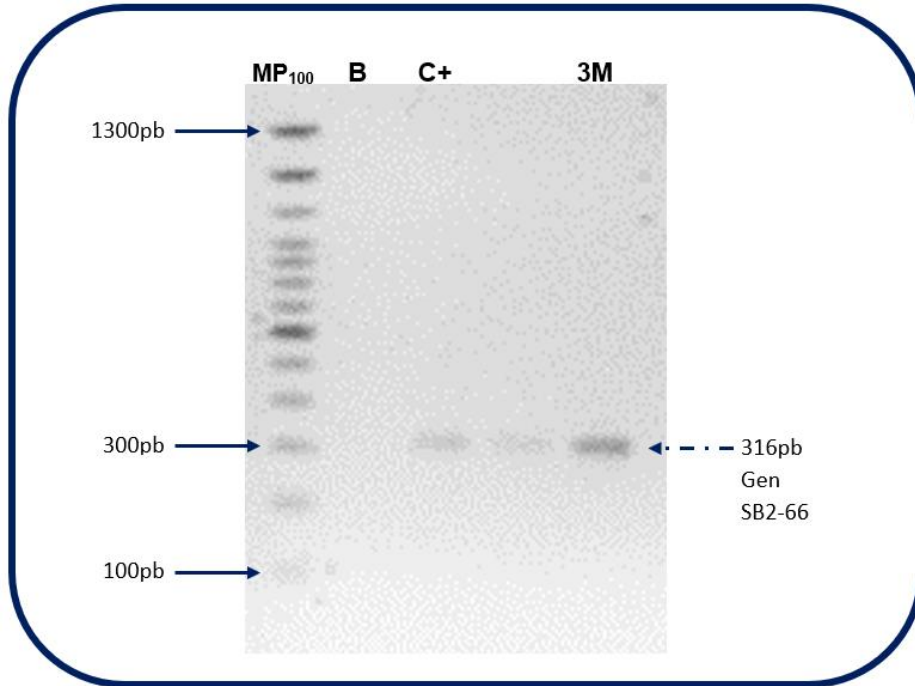


Figura 17. Gel de electroforesis al 1.5% de la muestra 3M perteneciente a *Capsicum annuum*, MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.

La Figura 18 muestra los amplificados de la PCR con las muestras 4M y 5M que fueron extraídas de *Capsicum annuum* y las muestras 1H, 2H, 3H y 4H de *Capsicum chinense*. De la misma manera se observan los carriles con: marcador de peso molecular, blanco y control positivo.

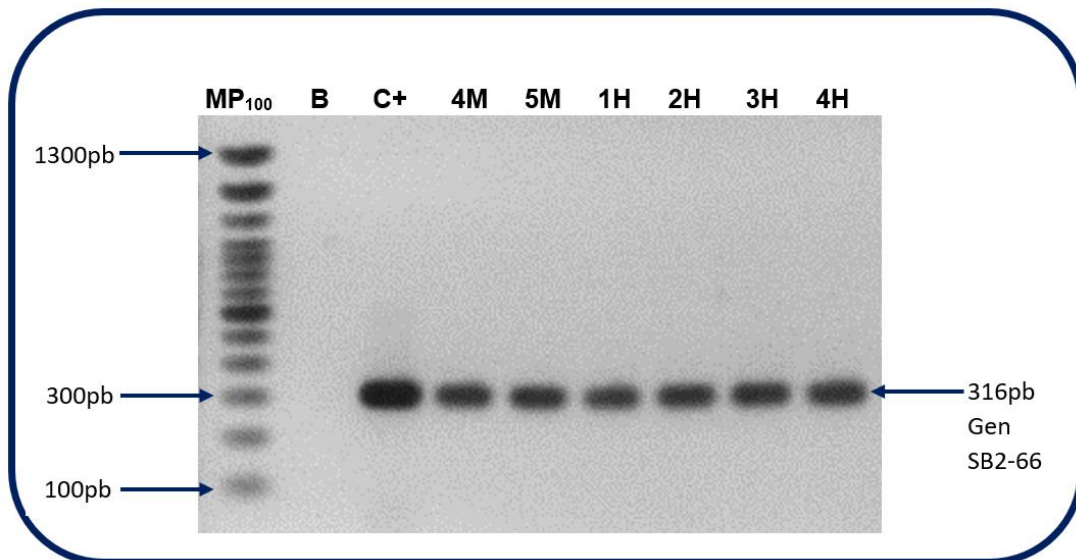


Figura 18. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 4M Y 5M (*Capsicum annuum*), 1H, 2H, 3H y 4H (*Capsicum chinense*), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.

La siguiente Figura, muestra siete resultados de la PCR que pertenecen tanto a *Capsicum annuum* como a *Capsicum chinense*. Las siete bandas son claras además del control positivo, todas posicionadas en 300 pares de bases según el marcador de peso molecular. Cabe destacar que en todos los geles electroforéticos se observaron las bandas en 300 pb aproximadamente ya que el amplificado esperado fue de 316pb.

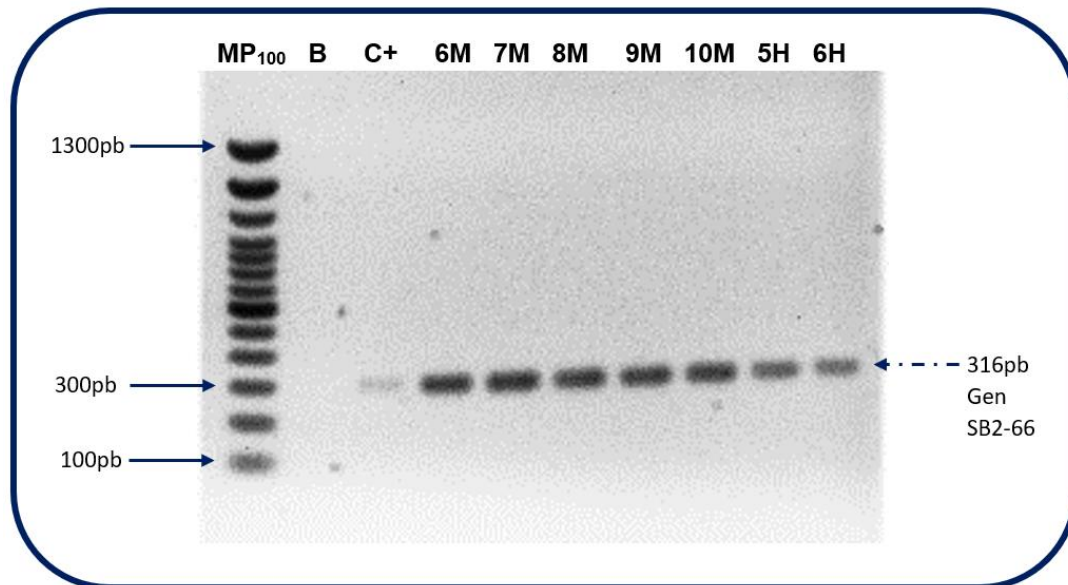


Figura 19. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 6M, 7M, 8M, 9M, 10M (*Capsicum annuum*), 5H y 6H (*Capsicum chinense*), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.

En la Figura 20 se observan los amplificados de tres muestras más, la 7H, 8H y 9H y sutilmente dos muestras más que no se utilizaron ya que la banda era muy tenue y por lo tanto indicaba una concentración mas baja de ADN que no hubiera sido apta para llevar a cabo RFLP.

Finalmente, la Figura 21 muestra el amplificado faltante, 10H. En el gel se observan bandas más débiles que se descartaron por no ser adecuados para la digestión enzimática por su baja concentración de ADN.

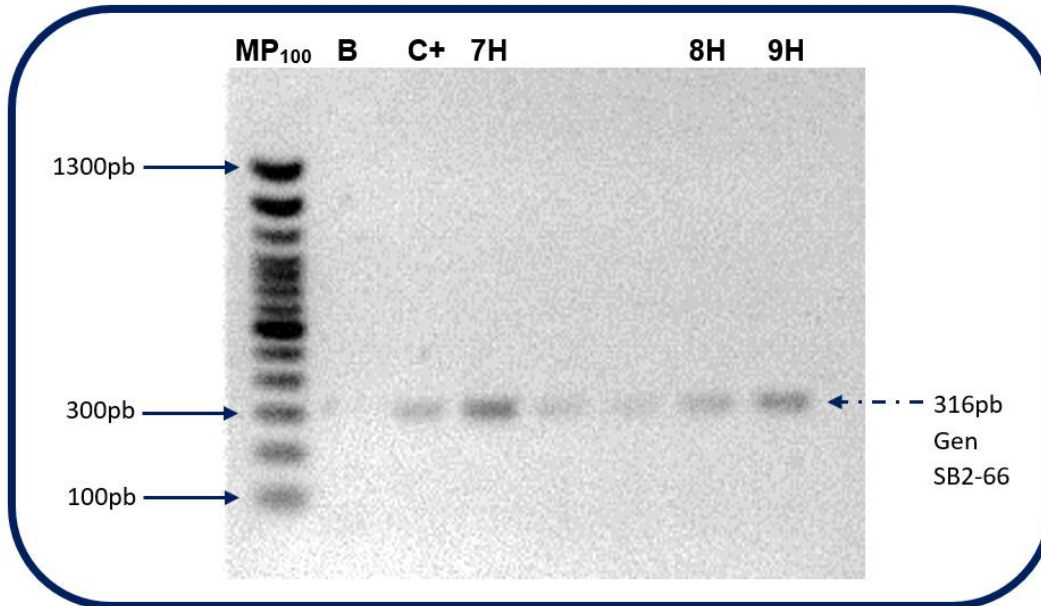


Figura 20. Gel de electroforesis al 1.5% de las muestras 7H, 8H y 9H (*Capsicum chinense*), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.

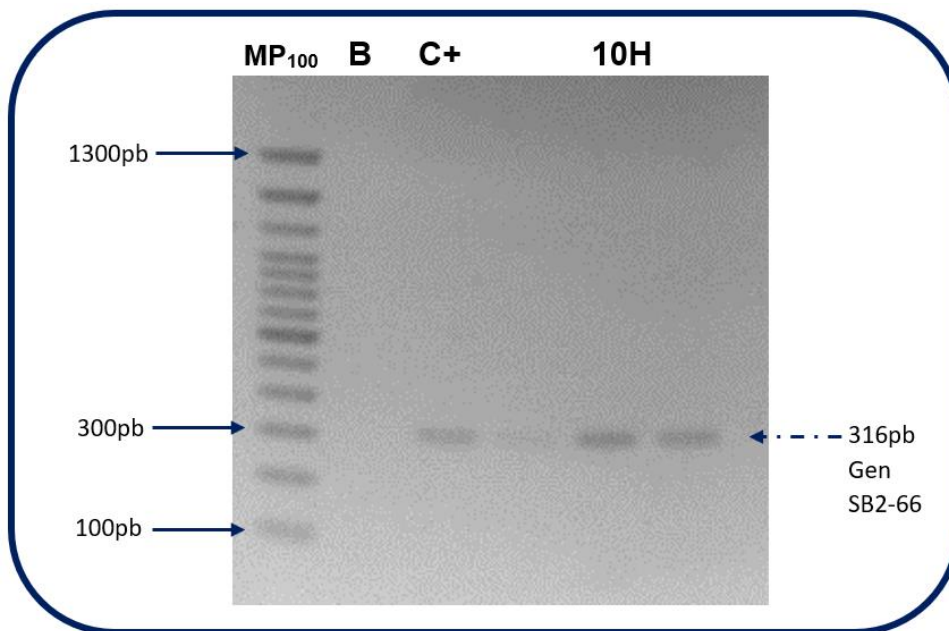


Figura 21. Gel de electroforesis al 1.5% de la muestra 10H (*Capsicum chinense*), MP100: marcador de peso molecular de 100pb, C+ y B: Blanco.

Una vez obtenidos los amplificadores observados en los gels de electroforesis anteriores de las 20 muestras necesarias, se procedió a realizar la digestión enzimática con la enzima PMIFI.

3.4 Objetivo específico 4

Identificar la presencia del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 mediante la técnica de RFLP para comprobar su relación con la pungencia en las especies de *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero).

El amplificado de 316pb de las 20 muestras de *Capsicum* fue sometido al método de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima PflMI, el sitio diana de restricción que reconoce dicha enzima se muestra en los anexos. La presencia del polimorfismo en un organismo homocigoto (G/G) presenta un amplificado es de 316 pb, un organismo homocigoto (T/T) lo cual indica la ausencia del polimorfismo los amplificados de 151 pb y 165 pb y un organismo heterocigoto presenta amplificados de 316 pb, 151 pb y 165 pb.

En la Figura 22, las muestras de *Capsicum annuum* (Morrón) todas exhiben el polimorfismo y tres de ellas (2M, 6M y 9M) provienen de organismos heterocigotos ya que se observan tres bandas con los amplificados de 316 pb, 151 pb y 165 pb.

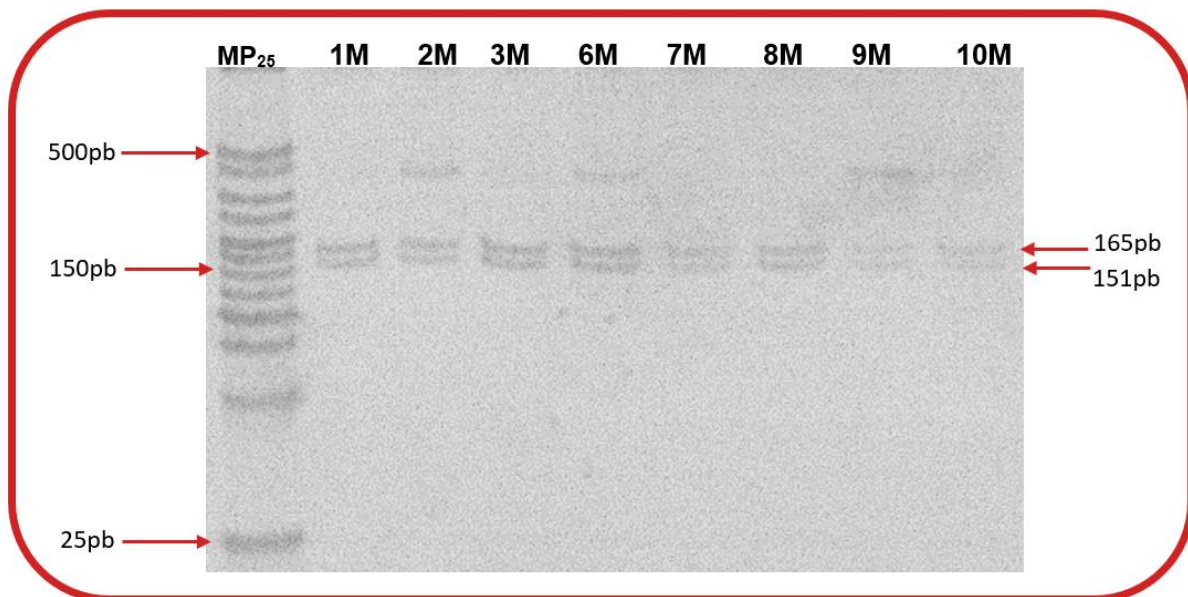


Figura 22. Gel de electroforesis resultados de RFLP con las muestras 1M, 2M, 3M, 6M, 7M, 8M, 9M y 10M pertenecientes a *Capsicum annuum* (Morrón).

En el siguiente gel de la Figura 23 se encuentran muestras pertenecientes a *Capsicum annuum* (Morrón), ambas presentan el polimorfismo y una de ellas proveniente de un organismo heterocigoto, mientras que las muestras de *Capsicum chinense* (Habanero) todas presentan el polimorfismo y cuatro de ellas de organismos heterocigotos y solo una de un homocigoto.

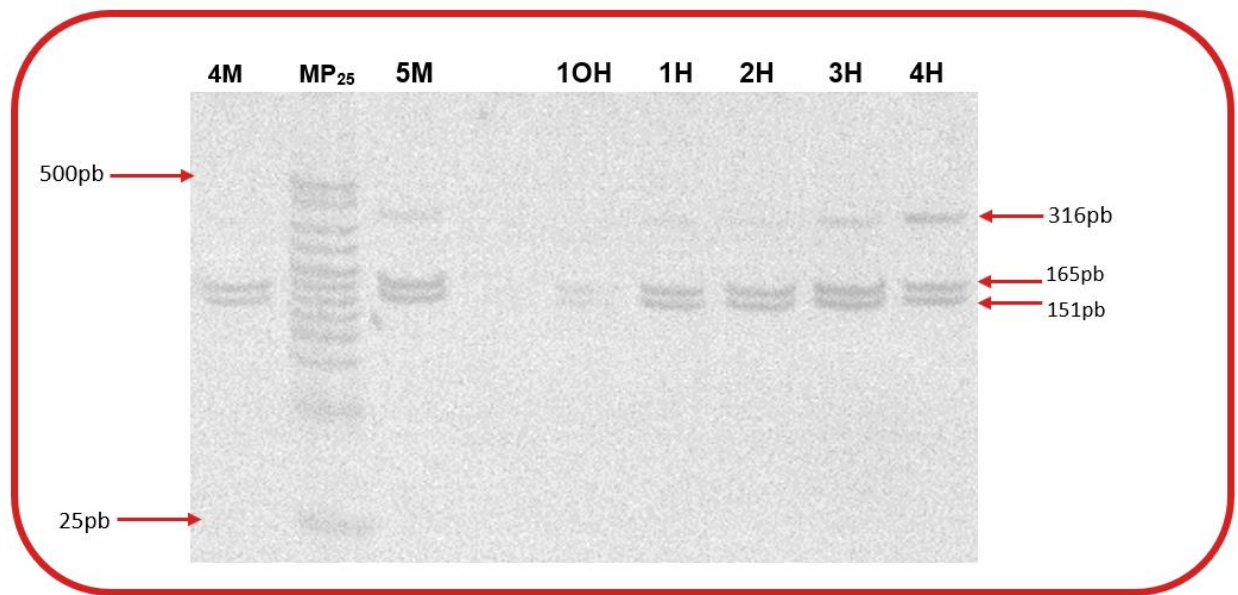


Figura 23. Gel de electroforesis con los resultados de RFLP de las muestras 4M y 5M pertenecientes a *Capsicum annuum* (Morrón), 1H,2H, 3H, 4H y 10H pertenecientes a *Capsicum chinense* (Habanero).

Finalmente, las muestras restantes de *Capsicum chinense* (Habanero) todas presentan el polimorfismo de organismos homocigotos.

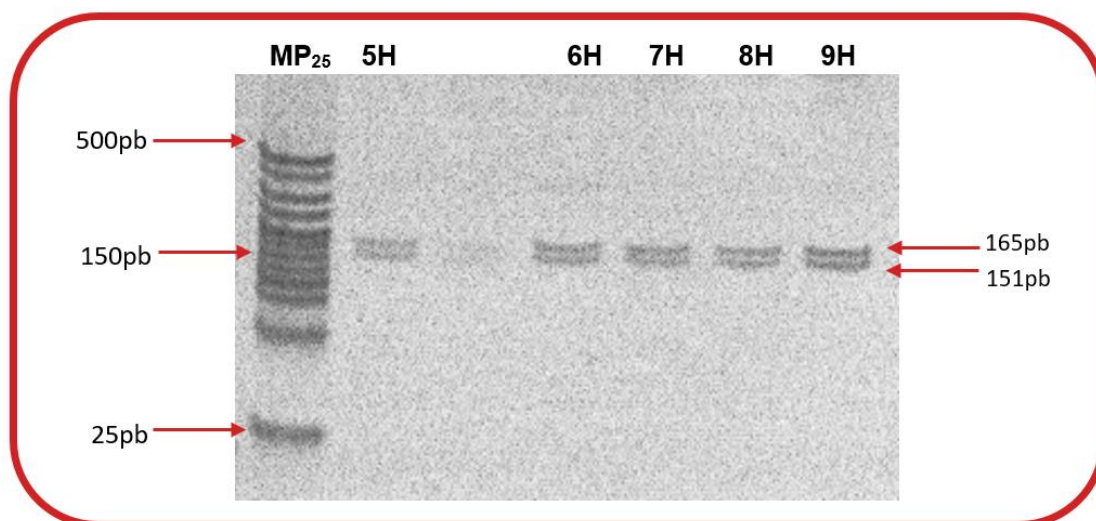


Figura 24. Gel de electroforesis con los resultados de RFLP de las muestras 5H, 6H, 7H, 8H, y 9H pertenecientes a *Capsicum chinense* (Habanero).

3.5 Objetivo específico 5

Analizar los resultados obtenidos para relacionar el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 con el carácter pungente en las especies de *Capsicum chinense* (Habanero) y *Capsicum annuum* (Morrón).

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la frecuencia genotípica obtenidas en la identificación del polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 de las muestras de *Capsicum*.

Cuadro 13. Frecuencias genotípicas obtenidas en *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense*.

Polimorfismo G/T-200				
	<i>Capsicum annuum</i>		<i>Capsicum chinense</i>	
	No. de muestras	Frecuencia	No. de muestras	Frecuencia
T/T (normal)	6	0.6	6	0.6
T/G o G/T	4	0.4	4	0.4
G/G (polimorfismo)	0	0	0	0
Total	10	1	10	1

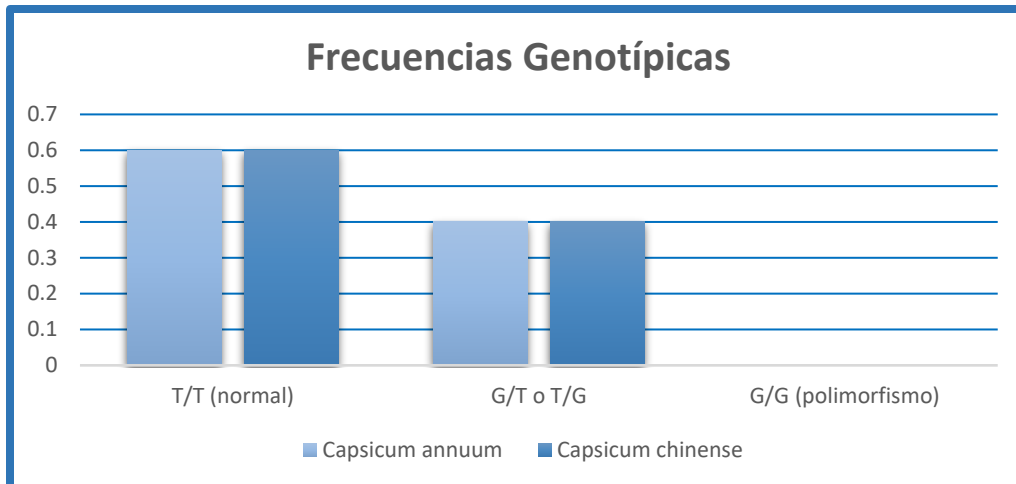


Figura 25. Grafico comparativo de las frecuencias genotípicas obtenidas en *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense*.

En el Cuadro 13 se observan los resultados de frecuencia genotípica de *Capsicum annuum* (Morrón) así como de *Capsicum chinense* (Habanero), las 20 muestras de las dos variedades no presentan el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 y la frecuencia genotípica para en ambos casos fue de 0.4 para organismos heterocigotos (G/T o T/G) y de 0.6 para organismos homocigotos (T/T). La figura 25 muestra la gráfica comparativa de los resultados obtenidos del cálculo de frecuencia genotípica.

Contrastación de hipótesis

La hipótesis planteada fue la siguiente:

El polimorfismo G/T-200 en el segundo exón del gen SB2-66 da un carácter no pungente a *Capsicum annuum* (Morrón) y pungente a las especies de *Capsicum chinense* (Habanero) entonces el polimorfismo estará presente en *Capsicum annuum* (Morrón) y ausente en *Capsicum chinense* (Habanero).

Después de haber analizado los resultados obtenidos de las 20 muestras de *Capsicum* mediante la técnica de RFLP señalan que el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 no está presente en ninguna ellas, ya que los fragmentos obtenidos indican que, si hubo corte por la enzima que reconoció el sitio de restricción con el alelo T, siendo seis de cada diez los organismos homocigotos (T/T).

En ambas variedades de *Capsicum* 4 de las 10 muestras fueron organismos heterocigotos lo cual tampoco vincula el polimorfismo G/T-200 a la pungencia, lo que esto indicaría es que el alelo T podría ser un dominante, que las muestras provienen de cruzas entre organismos heterocigotos (G/T o T/G) u homocigotos (T/T) ya que no se presentó el polimorfismo G/T-200 en las variedades estudiadas y a que la producción de capsaicinoides, una característica propia de *Capsicum*, ya sea en menor o mayor cantidad si esta codificado por este gen y su dominancia. De acuerdo con Reddy *et al.* (2014) la acumulación de capsaicinoides depende de la expresión del gen, ya sea que este sea dominante o recesivo, como es el caso del Pun 1, el cual está vinculado al gen SB2-66 como se menciona en el apartado 1.3.

Los resultados obtenidos por Garcés y col., 2007, indican que el polimorfismo está directamente relacionado con la pungencia en diferentes especies *Capsicum*, incluyendo a las analizadas en este proyecto, ellos utilizaron dos diferentes metodologías para la detección del SNP; tetra-primer ARMS-PCR y RFLP. Los resultados que estos autores obtuvieron fueron concluyentes para el método de tetra-primer ARMS-PCR así como para el de RFLP, sin embargo, los obtenidos mediante RFLP no fueron mostrados en el

artículo argumentando que el método de tetra-primer ARMS-PCR era más eficiente para su estudio aunque ambos fueran concluyentes.

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que no existe relación entre el polimorfismo G/T-200 del gen SB2-66 con la pungencia en *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero) a diferencia de lo obtenido por Garcés y col., 2007, esto podría deberse a la amplia gama de variedades que se pueden estudiar, así como el método utilizado para la detección del polimorfismo.

Conclusiones

Las técnicas PCR, llevada a cabo con los primers específicos, al igual que RFLP con la enzima de restricción PflMI resultaron de manera satisfactoria ya que los amplificadores observados en la electroforesis fueron coincidentes con lo planteado y la presencia del polimorfismo G/T-200 puede ser detectada.

La ausencia del polimorfismo G/T-200 fue definitiva en las 20 muestras de ADN analizadas pertenecientes a *Capsicum annuum* (Morrón) y *Capsicum chinense* (Habanero), por lo que no se puede atribuir una relación entre la presencia del polimorfismo y la pungencia de las variedades *Capsicum* utilizadas en este proyecto.

Este trabajo se puede continuar mediante el análisis de muestras que pertenezcan a otras variedades de *Capsicum*, con niveles de pungencia intermedios a las trabajadas y asociar los resultados mediante una cuantificación de capsaicinoides por un método espectrofotometría, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a todas las muestras estudiadas. La información obtenida de gama más amplia de variedades de *Capsicum* podría resultar en la asociación del polimorfismo y la pungencia, o confirmar que estos no están relacionados.

Bibliografía

1. Acquadro, A., Lee, D., Chiapparino, E., & Comino, C. (2003). Detection and characterisation of SNPs in Capsicum spp. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 22, 37-40. Recuperado el Marzo de 2018, de <https://www.researchgate.net/publication/268163866>
2. Alexander, P., Jean, B. M., Chaves, J., Courts, G., & D'Alessio, S. (1992). *Biología*. New Jersey: Prentice Hall.
3. *Asociación Cultural Bosco*. (2016 de Mayo de 2016). Recuperado el Marzo de 2018, de Ciencias Biológicas: Ciclo Celular y Dogma Central de la Biología: <http://acbosco.edublogs.org/2016/05/31/ciclo-celular-y-dogma-central-de-la-biologia/>
4. Bartolomé García, T., Coletto Martínez, J., & Velázquez Otero, R. (2015). *La agricultura y la ganadería extremeñas 2015*. España: Fundación CB.
5. Biggs, A., Hagins, W. C., Holliday, W. G., Kapicka, C. L., Lundgren, L., MacKenzie, A. H., . . . Zike, D. (2012). *Biología*. México: McGraw-Hill.
6. Bolivar, A. M., Rojas, A., & García-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33. doi:10.5123/S2176-6223201000020000
7. Cain, W., Abraham, M., & Cometto-Muñiz, J. (1998). Nasal pungency and odor of homologous aldehydes and carboxylic acids. *Experimental Brain Research*(118), 180-188. doi:10.1007/s002210050270
8. Collins, M., Mayer Wasmund, L., & Bosland, P. (1995). Improved Method for Quantifying Capsaicinoids in Capsicum Using High- performance Liquid Chromatography. *Hortscience*, 30(301), 137-139. doi:<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.1.137>

9. CONABIO. (2009). Obtenido de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm#1.%20Nombres>
10. Cortazar Martínez , A., & Silva Rincón, E. P. (2004). *Métodos físico-químicos en biotecnología*. Mexico: Instituto de Biotecnología.
11. Cuenca, V. C. (2006). La técnica de PCR : ¿En qué fase de desarrollo técnico se encuentra? *Appplus+ LABAQUA*, 6(1-2), 85-88. Recuperado el Marzo de 2018, de <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/301>
12. Curry, J., Aluru, M., Mendoza, M., Nevarez, J., Melendrez, M., & Connell, M. A. (1998). Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent Capsicum spp. *Plant Science*, 148, 47-57. doi:10.1016/S0168-9452(99)00118-1
13. Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Massarini, A. (2011). *Curtis Biología (7a edición ed.)*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
14. Étienne, J. (2001). *Bioquímica genética Biología molecular*. Paris: MASSON.
15. FAOSTAT. (2016). Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
16. Garcés-Claver, A., Moore Fellman, S., Gil-Ortega, R., Jahn, M., & Arnedo-Andrés, M. S. (2007). Identification , validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in Capsicum spp. *Theor Appl Genet*, 115, 907–916. doi:10.1007/s00122-007-0617-y
17. Gardner, E. J., Simmons, M. J., Snustad, D. P., & Calderon, c. e. (1998). *Principios de genética*. México, DF.: Limusa.
18. Gebhardt, S., & Thomas, }. (2002). *Nutritive Value of Foods (Vol. 72)*. Beltsville, Maryland: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory.
19. INAH. (2013). *Chiles y salsas en México. Un sabor a identidad*.

20. IPGRI, AVRDC y CATIE. (1995). *Descriptors for Capsicum (Capsicum spp.)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; the Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Taiwan, and the Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
21. Izquierdo, R. M. (2014). *Curso de genética molecular e ingeniería genética*. Madrid, España: Difusora Larousse - Ediciones Pirámide.
22. Jiménez, C. B., & Nuño, F. J. (2013). *Genética; Conceptos esenciales* (1 ed.). España: Medica Panamericana.
23. Kim, M., Kim, S., Kim, S., & Kim, B.-D. (2001). Isolation of cDNA Clones Differentially Accumulated in the Placenta of Pungent Pepper by Suppression Subtractive Hybridization. *Molecules and Cells*, 11(2), 210-219. Recuperado el Marzo de 2018, de <http://www.molcells.org/journal/view.html?year=2001&volume=11&number=2&page=213>
24. Kim, S., Park, M., Yeom, S.-I., Kim, Y.-M., Lee, J., & Lee, H.-A. (Marzo de 2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in Capsicum species. *Nature Genetics*, 46(3), 270-278. doi:10.1038/ng.2877
25. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Paladino, M. A. (2013). *Conceptos de genética* (10 ed.). PEARSON EDUCATION.
26. Krebs, J. E., Kilpatrick, S. T., & Goldstein, E. S. (2011). *Lewin's genes X*. (10th ed.). Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers Inc.
27. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., . . . Scott, M. P. (2016). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
28. Long-Solís, J. (1998). *Capsicum y cultura: La historia del chilli*. México: FONDO DE CULTURA ECONÓMICA.

29. Martínez Estevez, Manuel, M., Ruiz-Lau, N., & Medina Lara, F. (Julio de 2011). El Chile Habanero su Origen y Usos. *Ciencia- Academia Mexicana de Ciencias*, 62(3), 70-77. Recuperado el 28 de Marzo de 2018, de http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/62_3/PDF/Habanero.pdf
30. Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC*. Recuperado el Marzo de 2018, de <http://revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139>
31. McLennan, A., Bates, A., & Turner, P. (2014). *Bios. Notas instantáneas de biología molecular* (4 ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
32. Mendoza Sánchez, L. G. (2013). *Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del chile jalapeño (Capsicum annuum var. annuum) fresco y seco*. Xalapa-Enríquez, Veracruz: Instituto de ciencias básicas.
33. Mendoza, R. (2006). Sistemática e historia de ají Capsicum Tourn. *Universalía*, 11(2), 80–88. Recuperado el Marzo de 2018, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2924765.pdf>
34. Montes, A. M., Rodríguez, A. S., & Borunda, J. S. (2013). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana.
35. Mota Caparrós, M., Cuenca Pardo, J. B., & Sipán Sarrion, M. (2016). *Biología molecular y citogenética*. España: Paraninfo.
36. Narvaez, J. J. (2013). *Efecto de una película plástica de polipropileno y refrigeración sobre las características de calidad del chile habanero naranja (Capsicum chinense jacq)*. Yucatán, México: Instituto Tecnológico de Mérida.
37. Ondarza, R. N. (2006). *Biología Moderna: la célula, bioquímica, genética y biología molecular, biología general*. (11 ed.). México: Trillas.

38. Paran I., A. Ben-Chaim, K. Byoung-Cheorl, & Jahn, M. (2006). *Capsicums, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Theory Apply Genet.
39. Pérez- Castañeda, L. M., Castañón Najera, G., Ramírez Meraz, M., & Mayek Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 117-128. doi:10.14198/cdbio.2008.27.02
40. Pierce, B. A. (2016). *Genética : un enfoque conceptual*. Madrid: Médica Panamerican.
41. *Pimientos picantes: acciones farmacológicas y propiedades terapéuticas*. (16 de Marzo de 2016). Obtenido de <https://www.fitoterapia.net/noticias/pimientos-ge769nero-icapsicumi-acciones-farmacolo769gicas-10211.html>
42. Reddy, U. K., Almeida, A., Abburi, V. L., Alaparthi, S. B., Unself, D., Hankins, G., . . . Nimmakayala, P. (2014). Identification of Gene-Specific Polymorphisms and Association with Capsaicin Pathway Metabolites in *Capsicum annuum* L . Collections. *Plos One*, 9(1), 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0086393
43. SAGARPA. (2017). *Agrícola Nacional*. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/Potencial-Chiles_y_Pimientos-parte_uno.pdf
44. Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. . Nueva York: Spring Harbor Laboratory Press.
45. SIAP. (2010). *Un panorama del cultivo del chile*. . Obtenido de <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
46. Sierra, L. A., & Sierra, E. M. (2015). *Biología Conceptial*. México: Trillas.
47. Stewart, C., Kang, B. C., Liu, K., Mazourek, M., Moore, S. L., Eun, Y. Y., . . . Jahn, M. M. (2005). The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative

- acyltransferase. *Plant Journal*, 42(5), 675-688. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02410.x
48. Stewart, J. C., Mazourek, M., Stellari, G. M., O'Connell, M., & Jahn, M. (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*, 5(56), 979-991. doi:10.1093/jxb/erl243
49. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 70-78. doi:10.1157/13059826
50. Torrades, S. (2002). Diversidad del genoma humano : los polimorfismos. *OFFARM*, 21(5), 122-126. Recuperado el 3 de Abril de 2018, de <http://www.elsevier>.
51. Truong, H. T., Kim, K.-T., Kim, S., Kim, H.-R., Cho, M.-C., & Woo, J.-G. (2009). Development of gene-based markers for the Pun1 pungency gene in pepper (*Capsicum* spp.) for marker-assisted selection. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 50(4), 358-365. Recuperado el Marzo de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/235731496_Development_of_gene-based_markers_for_the_Pun1_pungency_gene_in_pepper_Capsicum_spp_for_marker-assisted_selection
52. Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, M., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., & Nieto-Pelayo, Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Fitotec*, 30(4), 353-360. Recuperado el Marzo de 2018, de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61030402>
53. Wallace, R. A., King, J. L., & Sanders, G. P. (1991). *Biología molecular y herencia*. México: Trillas.
54. Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2005). *Biología Molecular del Gen* (5 ed.). (O. Giovanello, J. Negrete, & K. Tzal, Trads.) Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana.

55. Yáñez, P., Balseca, D., & Rivadeneira, L. (2015). Características morfológicas y de concentración de Capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 22(2), 12-32. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047267002>

Anexos

Anexo 1

Para evaluar los primers diseñados se consultó la página:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/18030706> con el GI obtenido del artículo “Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in Capsicum spp.” (Garcés-Claver et. al., 2007).

The screenshot shows the NCBI GenBank entry for Hab-pi-EST00004. The entry title is "Hab-pi-EST00004 cDNA subtraction library of pungent pepper Capsicum chinense cDNA clone SB2-66, mRNA sequence". The GenBank accession number is BF723664.1. The entry includes identifiers such as dbEST ID (7260806), EST name (Hab-p1-EST00004), and GenBank accession (BF723664). It also provides clone information (Clone ID: SB2-66, DNA type: cDNA) and primer information (PolyA Tail: Unknown). The sequence is displayed in a monospaced font, with a specific region highlighted in orange: ACTACACTGTAGATTTGGATGGGGAAGACCTGAAAGAGTCTGTCTAGGAAATGGTCCCTCCAAGAATGCCTTCTCTGAAAGATTACAAGCTGGCAAGCGTGGAGCCGCGGGTGTGTTGCACAAGCAACAATGCTGAATTTGAACGCAATGAGGAACCTCTTGAGTTCATTGCCTAATTAATTCACAGTTTGGAGTAATTTGGATGCTATTTCCAAGCTCTTTGGTGTGTTGATTGAAGAGAGAGGGGTTTACGAAATAAAGGAATACTTTTGAACCTACGAAACAATGTAGGAATAATTTGTAATTTGTGTGTTTCATCAACATAATTACAACGGAAATTTACGGTCAACAAAAA. The entry was created on Jan 1 2002 and last updated on May 13 2010. The library information includes Lib Name: LIBEST_007310 cDNA subtraction library of pungent pepper and Organism: Capsicum chinense.

Después se utilizó el GI para diseñar los primers en la página de PrimerQuest Tool

The screenshot shows the PrimerQuest Tool interface. The browser address bar displays "Integrated DNA Technologies, Inc. [US] | https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index". The page title is "PrimerQuest Tool". The main content area is titled "Sequence Entry" and includes a "Download sequence(s) using Genbank or Accession ID" section. A text input field for "NCBI ID#" contains "BF723664", and a "GET SEQUENCE" button is visible. Below this, a text area displays the sequence: >ACC# BF723664 ACTACACTGTAGATTTGGATGGGGAAGACCTGAAAGAGTCTGTCTAGGAAATGGTCCCTCCAAGAATGCCTTCTCTGAAAGATTACAAGCTGGCAAGCGTGGAGCCGCGGGTGTGTTGCACAAGCAACAATGCTGAATTTGAACGCAATGAGGAACCTCTTGAGTTCATTGCCTAATTAATTCACAGTTTGGAGTAATTTGGATGCTATTTCCAAGCTCTTTGGTGTGTTGATTGAAGAGAGGGGTTTACGAAATAAAGGAATACTTTGAAACTACGAAACAATGTAGGAATAATTTGTAATTTGTGTGTTTCATCAACATAATTACAACGGAAATTTACGGTCAACAAAAA. A "Sequence Name" input field and a "CLEAR SEQUENCE ENTRY" button are also present. On the right side, a "Hints" section lists instructions: "Enter Genbank or Accession ID", "NM_001111 or 301601652", "Comma Separated for Batch", "NM_001234, 301601652", "Sequence length must be greater than 80 bases", and "PrimerQuest accepts only nucleic acid bases".

Esta página mostró opciones de primers con sus características

Assay Design / Results / Help / About

Assay Set Locations for ACC# BF723664

ADD TO ORDER In order to export results you must Login CUSTOMIZE ASSAY DESIGN SHOW CUSTOM TARGET REGIONS

Set 1 ACC# BF723664

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Amplicon Length: 316 View Assay Details					
Forward	48	69	21	62	47.6
Reverse	342	364	22	62	40.9

Se eligió la primera opción por su porcentaje de G/C y longitud.

Assay Design / Results / Help / About

ACC# BF723664 Assay Set 1 Details

[BACK TO RESULTS](#)

Parameter Set: General PCR (Primers only)
Sequence Name: ACC# BF723664
Amplicon Length: 316

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward GGAAATGGTCCTCCAAGAAT(Sense) Hairpin Blast	48	69	21	62	47.6
Reverse TGACCGTAAACTCCGTTGTAA(AntiSense)	342	364	22	62	40.9

Base	Sequence
1	ACTACACTGTAGATTTTGGATGGGGGAAGACCTGAAAGAGTCTGTCTAGGAAATGGTCCTCCAAGAATGCCCTTCTCTTGAARAGATTACAAAGCTGGGCA
101	AGGCGTGGAGGCGCGGGTGTATGTCACRAGCACCAATGTCTGAATTTGAAACGCAATGAGGAACTCCTTGAGTTCATTGCCTAATTAATCCAAAGTTTT
201	GGAGTAATTGGATGTCATTTCCAAGTCTTTTGGTGTGTTGATTGAAGAGAGAGGGGTTTTACGAAATRAAGGAATACTTTTGAACCTACGAAACCAATG
301	GTAGGAATAATTTGTAATTTGTTGTGTTTCATCAACATAA TTACAACG9AAGTTTACGGTCA ACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Con la opción de “Hairpin” se verificaron que las temperaturas no concidieran con la T_M para ambos primers

Primer frontal:

ACC# BF723664

General Information # Bases 21

Run Date: 2/26/2018 1:51:19 AM

GGAAATGGTCCCTCCAAGAAAT

Nucleotide Type: DNA

Temperature: 25 °C

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Sequence Type: linear

Max Foldings: 20

Start Position:

Stop Position:

UPDATE ORDER

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_M (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-1.37	43.6	-23.3	-73.56	Ct Det
2		-0.62	34	-21.1	-68.69	Ct Det

*Note dNTP Concentration is not taken into account.

Primer reverso:

ACC# BF723664

General Information # Bases 22

Run Date: 2/26/2018 1:53:37 AM

TGACCGTAAACTCCGTTGTAA

Nucleotide Type: DNA

Temperature: 25 °C

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Sequence Type: linear

Max Foldings: 20

Start Position:

Stop Position:

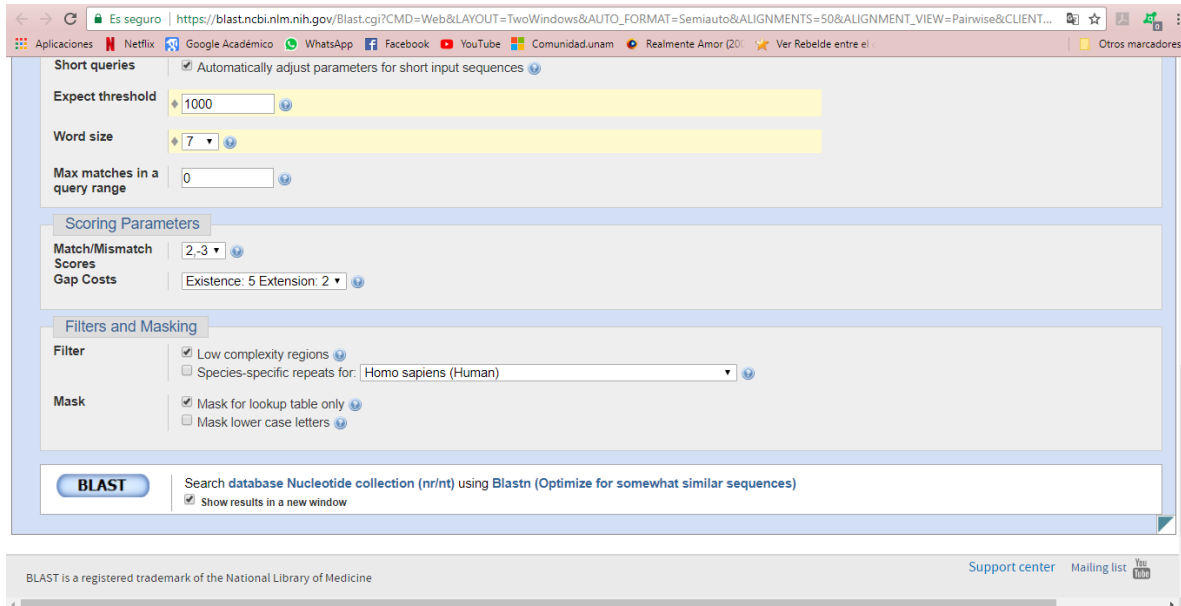
UPDATE ORDER

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_M (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-0.22	28.5	-18.6	-61.66	Ct Det
2		0.44	19.1	-21.9	-74.94	Ct Det

*Note dNTP Concentration is not taken into account.

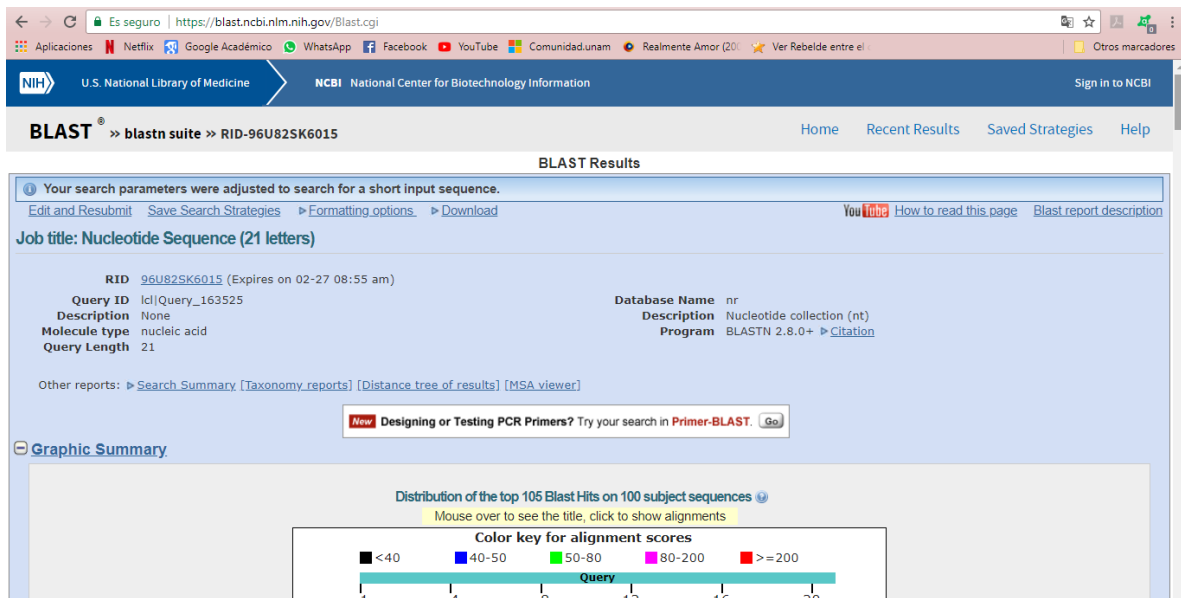
IDT's licensed IINAFold software is available to our customers for the design of oligonucleotide sequences and for use of the resulting oligos purchased from IDT

Posteriormente se eligió la opción “Blast”. Esta opción nos dio información de secuencias similares que podría amplificar los primers.

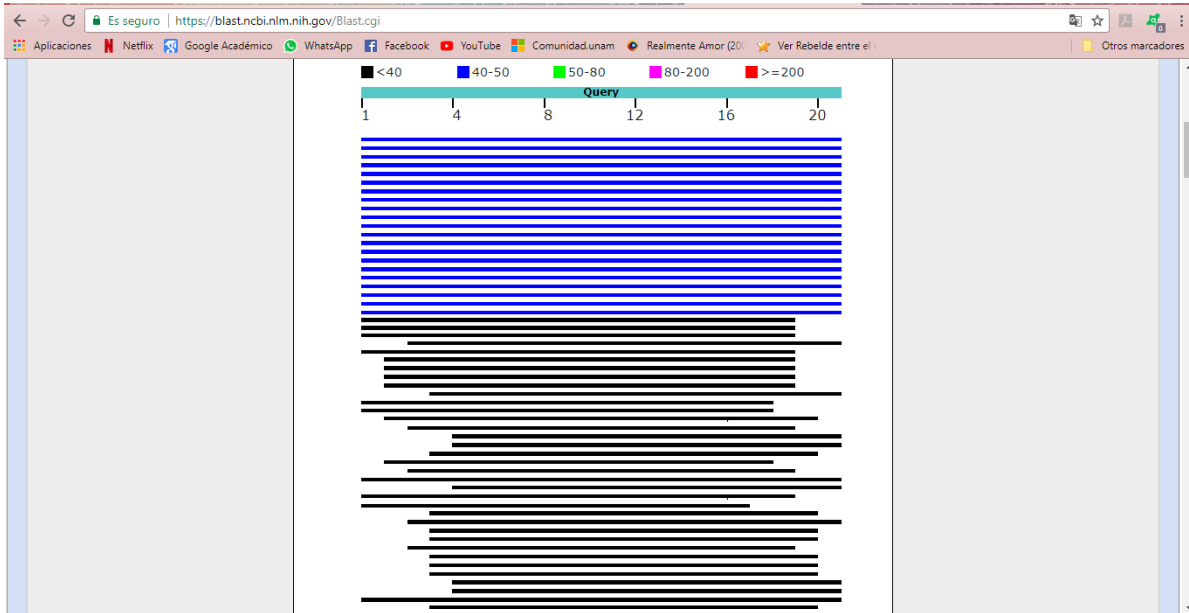


Se comprobó que ningún primer amplificó para ninguna especie que pudiera afectar el proyecto. Este proceso se realizó para ambos primers, frontal y reverso.

Para el primer frontal:



Así, continua la página del Blast



Los nombres científicos de las especies que se podían alinear con los primers

Es seguro | <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Es seguro | <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum acylsugar acyltransferase 3-like (LOC107859694)_mRNA	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii1027854513 NM_001324769.1
<input type="checkbox"/> Capsicum frutescens cultivar shuanlia acyltransferase (Pun1)_gene_Pun1-1 allele_complete cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii307950833 HM854860.1
<input type="checkbox"/> Capsicum chacoense BAHD acyltransferase (AT3)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii269148238 FJ871984.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum cultivar Yidu-Red inbred 201 acyltransferase (Pun1)_mRNA_complete cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii283766072 GU300812.1
<input type="checkbox"/> Capsicum chacoense acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320288 FJ755176.1
<input type="checkbox"/> Capsicum frutescens cultivar PI594141 acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320286 FJ755175.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum cultivar RNaky acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320282 FJ755173.1
<input type="checkbox"/> Lycianthes dejecta acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320280 FJ755172.1
<input type="checkbox"/> Nicotiana benthamiana acyltransferase (AT3-1)_pseudogene_partial sequence	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320279 FJ755171.1
<input type="checkbox"/> Solanum melongena cultivar Ichiban acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320277 FJ755170.1
<input type="checkbox"/> Petunia axillaris subsp. parodii acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320275 FJ755169.1
<input type="checkbox"/> Solanum pennellii acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320273 FJ755168.1
<input type="checkbox"/> Datura stramonium acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320271 FJ755167.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum cultivar Alcía Craig acyltransferase (AT3-1)_gene_partial cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii226320269 FJ755166.1
<input type="checkbox"/> Capsicum chinense cultivar NMC30036 nonfunctional acyltransferase (Pun1)_gene_Pun1-2 allele_complete cds	42.1	42.1	100%	0.071	100%	gii118574041 EF104610.1

Cyclostephanus goldi genome assembly C_goldi_Cheshire_scaffold CGOC_scaffold0011650	34.2	34.2	77%	18	100%	gii688792967/LL3787/19.1
Leptospira santarosai strain U160 chromosome 1	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1370526542 CP027843.1
Peptostreptococcaceae bacterium oral taxon 929 strain W2294 chromosome_complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1359146657 CP027242.1
Bacteroides zoogloeiformans strain ATCC 33285 chromosome_complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1359131477 CP027231.1
Culicoides sonorensis genome assembly_scaffold scaffold19	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1333881533 LN483369.1
PREDICTED: Cucurbita pepo subsp. pepo uncharacterized LOC111780657 (LOC111780657), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1333171523 XM_023661124.1
PREDICTED: Cucurbita pepo subsp. pepo uncharacterized LOC111780657 (LOC111780657), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1333171521 XM_023661123.1
Alteromonas macleodii strain Te101 chromosome_complete genome	32.2	32.2	90%	70	95%	gii1318708260 CP018321.1
PREDICTED: Cucurbita maxima uncharacterized LOC111485387 (LOC111485387), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1281008052 XM_023132255.1
PREDICTED: Cucurbita maxima uncharacterized LOC111485387 (LOC111485387), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1281008050 XM_023132253.1
PREDICTED: Cucurbita moschata uncharacterized LOC111461757 (LOC111461757), transcript variant X3, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1279815146 XM_023105398.1
PREDICTED: Cucurbita moschata uncharacterized LOC111461757 (LOC111461757), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1279815144 XM_023105397.1
PREDICTED: Cucurbita moschata uncharacterized LOC111461757 (LOC111461757), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1279815142 XM_023105396.1
Gossypium hirsutum cultivar TM1 chromosome D11	32.2	157	77%	70	100%	gii1253338739 CP023744.1
Neisseria zoodegmatidis strain NCTC12230 genome assembly_chromosome_1	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1231652849 LT906434.1
PREDICTED: Folsomia candida uncharacterized LOC110853429 (LOC110853429), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1228397030 XM_022101692.1
PREDICTED: Aedes aegypti tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9 (LOC5566564), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1218254090 XM_021851023.1
Vibrio shilonii strain QT6D1 chromosome 1, complete sequence	32.2	62.4	90%	70	100%	gii1214532358 CP018308.1
Streptomyces albireticuli strain MDJK11, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1206162294 CP021744.1
Sphingobacteriaceae bacterium GW460-11-11-14-LB5, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1195002891 CP021237.1
Neisseria lactamica strain Y92-1009, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii115
Yersinia nestis strain 195/P, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii114

Questions/comm

Yersinia pseudotuberculosis isolate 194713 genome assembly_chromosome_1	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1120609799 LT930221.1
PREDICTED: Alligator mississippiensis eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (LOC106736899), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1113757363 XM_019488517.1
Clostridium estertheticum subsp. estertheticum strain DSM 8809, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1102307778 CP015756.1
Pichia membranifaciens NRRL Y-2026 hypothetical protein mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1102163878 XM_019160868.1
Yersinia pestis strain Cadman chromosome, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1046912481 CP016273.1
Serratia plymuthica PRI-2C, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1043710169 CP015613.1
Pongo pygmaeus genome assembly_chromosome_XII	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1043015352 LT571452.1
PREDICTED: Gossypium hirsutum putative dual specificity protein phosphatase DSP8 (LOC107924351), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1029101751 XM_016854751.1
PREDICTED: Sinocyclohelius grahami MTSS1-like protein (LOC107565685), partial mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1020535239 XM_016250945.1
Marinobacter sp. LQ44, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1008271296 CP014754.1
PREDICTED: Acropora digitifera brain-specific homeobox protein homolog (LOC107337717), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1005418545 XM_015902979.1
Obesumbacterium proteus strain DSM 2777, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1004380552 CP014608.1
PREDICTED: Alligator sinensis eukaryotic translation initiation factor 4 gamma_1 (EIF4G1), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii944330605 XM_014527818.1
Bipolaris maydis ATCC 48331 hypothetical protein mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii928528695 XM_014227670.1
Yersinia pestis 1045 sequence	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908262105 CP006794.1
Yersinia pestis 3067, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908258101 CP006754.1
Yersinia pestis 3770, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908253871 CP006751.1
Yersinia pestis 8787, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908249689 CP006748.1
Yersinia pestis 790, genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908245216 CP006806.1
Yersinia pestis 1522, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908241204 CP006758.1
Yersinia pestis 1413, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908
Yersinia nestis 2944, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908

Questions/comm

Para el primer reverso

BLAST » blastn suite » RID-BVMXHCW701R

BLAST Results

Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

Job title: **Nucleotide Sequence (22 letters)**

RID: **BVMXHCW701R** (Expires on 03-31 14:05 pm)

Query ID: Icd|Query_238593

Description: None

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 22

Database Name: nr

Description: Nucleotide collection (nt)

Program: BLASTN 2.8.0+ » Citation

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [MSA viewer]

Graphic Summary

Distribution of the top 106 Blast Hits on 100 subject sequences

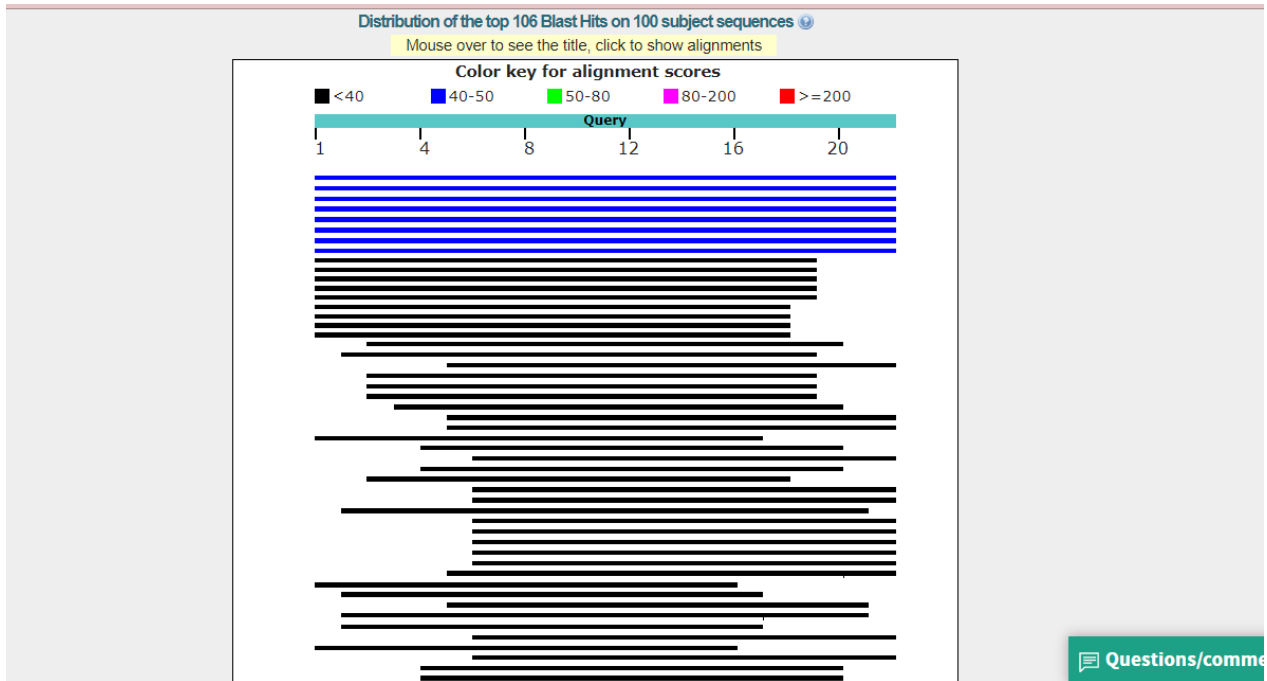
Color key for alignment scores

- <40
- 40-50
- 50-80
- 80-200
- >=200

Query

1 4 8 12 16 20

Questions/comments



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum acylsugar acyltransferase 3-like (LOC107859694).mRNA	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij1027854513 NM_001324769.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum cultivar Yidu-Red inbred 201 acyltransferase (Pun1).mRNA, complete cds	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij283766072 GU300812.1
<input type="checkbox"/> Capsicum chinense cultivar NMCA30036 nonfunctional acyltransferase (Pun1).gene_Pun1-2 allele, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij118574041 EF104910.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum catf1 gene for acyl-transferase, partial cds	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij67003510 AB206919.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum cultivar Jupiter acyltransferase (Pun1).gene, partial sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij55824328 AY819030.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum cultivar Thai Hot acyltransferase (Pun1).gene, complete cds	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij55824326 AY819029.1
<input type="checkbox"/> Capsicum chinense cultivar habanero acyltransferase (Pun1).gene, complete cds	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij55824322 AY819027.1
<input type="checkbox"/> Capsicum frutescens cultivar BG2814-6 acyltransferase (Pun1).gene_Pun1-1 allele, complete cds	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gij55824320 AY819026.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Capsicum annuum acylsugar acyltransferase 3-like (LOC107859692).mRNA	38.2	38.2	86%	1.1	100%	gij1026028011 XM_016704776.1
<input type="checkbox"/> Capsicum frutescens capsaicin synthase (csy1).gene, complete cds	38.2	38.2	86%	1.1	100%	gij199739100 FJ157227.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum capsaicin synthase (csy1).mRNA, complete cds	38.2	76.3	86%	1.1	100%	gij85700227 DQ349223.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum catf2 gene for acyl-transferase, partial cds	38.2	38.2	86%	1.1	100%	gij67003512 AB206920.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum cultivar Hot 1493 acyltransferase (Pun1).gene, complete cds	38.2	38.2	86%	1.1	100%	gij55824324 AY819028.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Ziziphus jujuba BEACH domain-containing protein B (LOC107434511).transcript variant X4, mRNA	36.2	36.2	81%	4.5	100%	gij1009166216 XM_016045986.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Ziziphus jujuba BEACH domain-containing protein B (LOC107434511).transcript variant X3, mRNA	36.2	36.2	81%	4.5	100%	gij1009166214 XM_016045985.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Ziziphus jujuba BEACH domain-containing protein B (LOC107434511).transcript variant X2, mRNA	36.2	36.2	81%	4.5	100%	gij1009166215 XM_016045987.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Ziziphus jujuba BEACH domain-containing protein B (LOC107434511).transcript variant X1, mRNA	36.2	36.2	81%	4.5	100%	gij1009166213 XM_016045984.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Serinus canaria connector enhancer of kinase suppressor of ras 2-like (LOC103816575).mRNA	34.2	34.2	77%	18	100%	gij1095993616 XM_018914432.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Zonotrichia albicollis connector enhancer of kinase suppressor of ras 2-like (LOC106629447).mRNA	34.2	34.2	77%	18	100%	gij929481261 XM_014267914.1
<input type="checkbox"/> Cylicostephanus goldi genome assembly_C_goldi_Cheshire_scaffold CGOC_scaffold0011650	34.2	34.2	77%	18	100%	gij688792967 ILL378719.1
<input type="checkbox"/> Leptospira santarosai strain U160 chromosome_1	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1370526542 CP027843.1
<input type="checkbox"/> Peptostreptococaceae bacterium oral taxon 929 strain W2294 chromosome, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1359146657 CP027242.1
<input type="checkbox"/> Bacteroides zoogloeiformans strain ATCC 33285 chromosome, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1359131477 CP027231.1
<input type="checkbox"/> Culicoides sonorensis genome assembly_scaffold_scaffold19	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1333881533 LN483369.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita pepo subsp. pepo uncharacterized LOC111780657 (LOC111780657).transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1333171523 XM_023661124.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita pepo subsp. pepo uncharacterized LOC111780657 (LOC111780657).transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1333171521 XM_023661123.1
<input type="checkbox"/> Alteromonas macleodii strain Te101 chromosome, complete genome	32.2	32.2	90%	70	95%	gij1318708260 CP018321.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita maxima uncharacterized LOC111485387 (LOC111485387).transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1281008052 XM_023132255.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita maxima uncharacterized LOC111485387 (LOC111485387).transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1281008050 XM_023132253.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita moschata uncharacterized LOC111461757 (LOC111461757).transcript variant X3, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1279815146 XM_023105398.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita moschata uncharacterized LOC111461757 (LOC111461757).transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1279815144 XM_023105397.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucurbita moschata uncharacterized LOC111461757 (LOC111461757).transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1279815142 XM_023105396.1
<input type="checkbox"/> Gossypium hirsutum cultivar TM1 chromosome D11	32.2	157	77%	70	100%	gij1253338739 CP023744.1
<input type="checkbox"/> Neisseria zoodegmatidis strain NCTC12230 genome assembly_chromosome_1	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1231652849 ILT906434.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Folsomia candida uncharacterized LOC110853429 (LOC110853429).mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1228397030 XM_022101692.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Aedes aegypti tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9 (LOC5566564).transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1218254090 XM_021851023.1
<input type="checkbox"/> Vibrio shilonii strain QT6D1 chromosome_1, complete sequence	32.2	62.4	90%	70	100%	gij1214532358 CP018308.1
<input type="checkbox"/> Streptomyces albireticuli strain MDJK11, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gij1201111111 CP018308.1

Questions/comm

Questions/comm

Streptomyces albireticuli strain MDJK11, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1206162294 CP021744.1
Sphingobacteriaceae bacterium GW460-11-11-14-LB5, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1195002891 CP021237.1
Neisseria lactamica strain Y92-1009, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1153510554 CP019894.1
Yersinia pestis strain 195/P, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1148994967 CP019708.1
PREDICTED: Esox lucius zinc finger protein 507 (znf507), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1137488304 XM_010891402.2
PREDICTED: Esox lucius zinc finger protein 507 (znf507), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1137488303 XM_010891401.2
Yersinia pseudotuberculosis isolate NZYP4713, genome assembly, chromosome_1	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1126835759 ILT596221.1
PREDICTED: Alligator mississippiensis eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (LOC106736899), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1113757363 XM_019488517.1
Clostridium estertheticum subsp. estertheticum strain DSM 8809, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1102307778 CP015756.1
Pichia membranifaciens NRRL Y-2026 hypothetical protein mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1102163878 XM_019160868.1
Yersinia pestis strain Cadman chromosome, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1046912481 CP016273.1
Serratia plymuthica PRI-2C, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1043710169 CP015613.1
Pongo pygmaeus genome assembly, chromosome: XII	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1043015352 ILT571452.1
PREDICTED: Gossypium hirsutum putative dual specificity protein phosphatase DSP8 (LOC107924351), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1029101751 XM_016854751.1
PREDICTED: Sinocyclocheilus grahami MTSS1-like protein (LOC107565685), partial mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1020535239 XM_016250945.1
Marinobacter sp. LQ44, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1008271296 CP014754.1
PREDICTED: Acropora digitifera brain-specific homeobox protein homolog (LOC107337717), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1005418545 XM_015902979.1
Obesumbacterium proteus strain DSM 2777, complete genome	32.2	32.2	72%	70	100%	gii1004380552 CP014608.1
PREDICTED: Alligator sinensis eukaryotic translation initiation factor 4 gamma_1 (EIF4G1), mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii944330605 XM_014527818.1
Bipolaris maydis ATCC 48331 hypothetical protein mRNA	32.2	32.2	72%	70	100%	gii928528695 XM_014227670.1
Yersinia pestis 1045 sequence	32.2	32.2	72%	70	100%	gii908

Questions/comme

Anexo 2

Tm de primers.

Primer	Secuencia	Amplificado
PF	GGAAATGGTCCCTCCAAGAAT	316
PR	TGACCGTAAACTTCCGTTGTAA	

Para calcular Tm de ambos primers se utilizó la siguiente ecuación:

$$Tm = [(G + C)4 + (A + T)2] - 5$$

Donde:

Tm: es la temperatura de hibridación de hibridación del primer

G: es el número de guaninas

C: es el número de citocinas

A: es el número de adeninas

T: es el número de timinas

Sustituyendo en la ecuación anterior para el primer frontal PF:

$$Tm = [(5 + 5)4 + (7 + 4)2] - 5 = 57^{\circ}C$$

A continuación, para el primer reverso PR:

$$Tm = [(4 + 5)4 + (6 + 7)2] - 5 = 57^{\circ}C$$

Promediando las temperaturas de hibridación tenemos como resultado:

$$\overline{Tm} = 57^{\circ}C$$

Anexo 3

Evaluación de la zona de amplificación del polimorfismo G/T-200 en el segundo exón del gen SB2-66

Se utilizó el programa Sequencher 4.1.4 en donde se cargó la secuencia de amplificación en formato Fasta de la página de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/18030706>

EST Limits Advanced

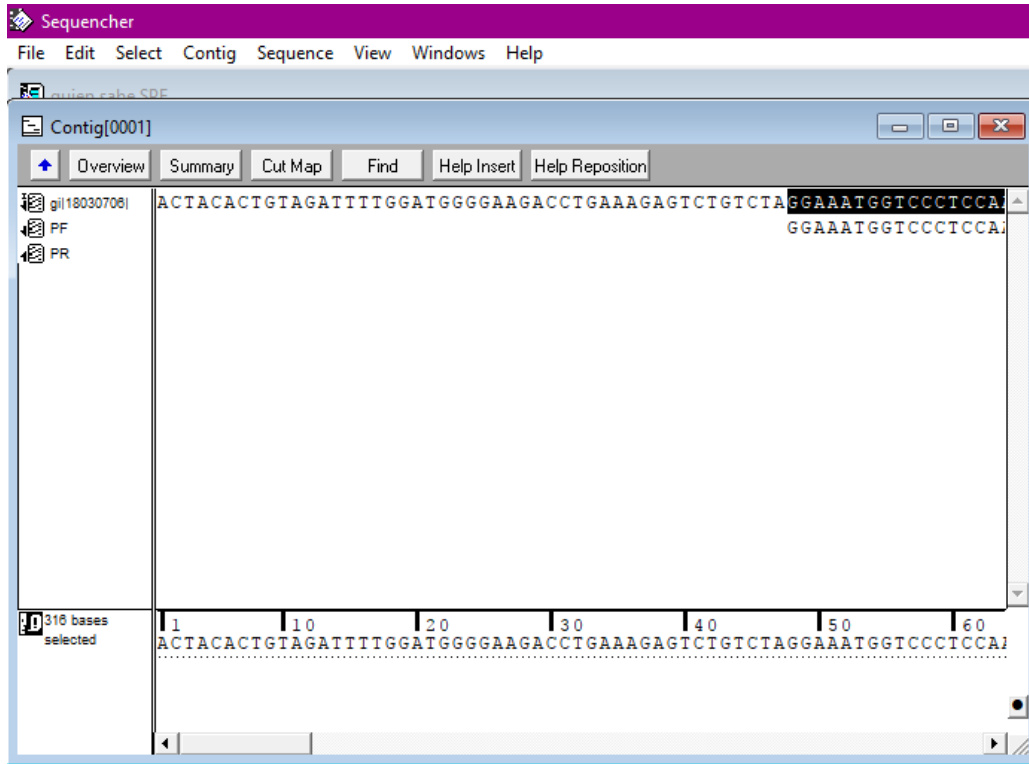
FASTA

Hab-p1-EST00004 cDNA subtraction library of pungent pepper *Capsicum chinense* cDNA clone SB2-66, mRNA sequence

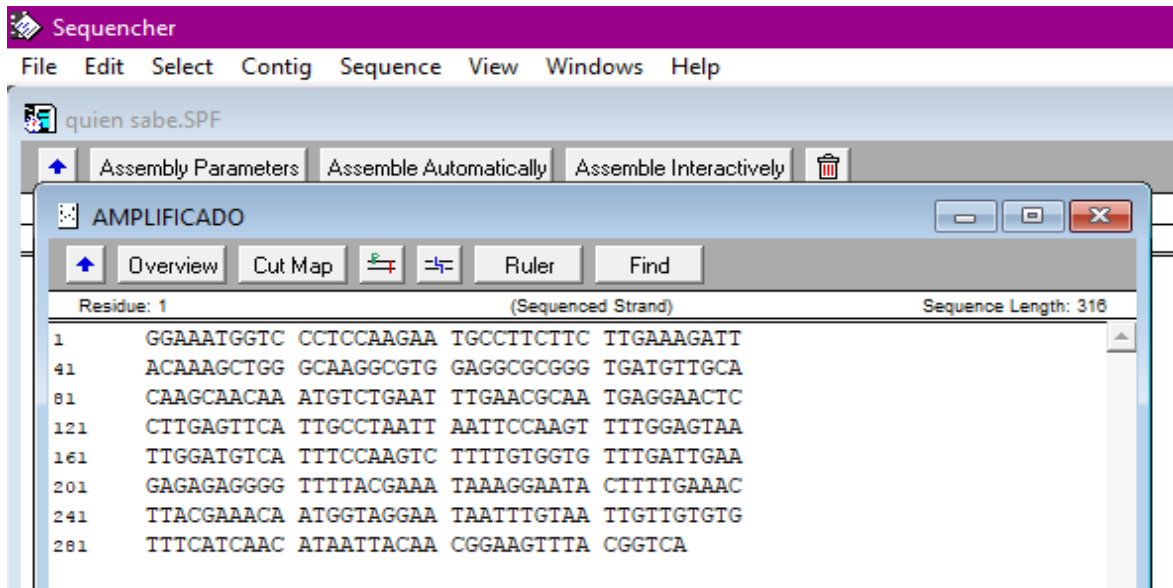
GenBank: BF723664.1
[EST](#) [GenBank](#)

```
>BF723664.1 Hab-p1-EST00004 cDNA subtraction library of pungent pepper Capsicum chinense
cDNA clone SB2-66, mRNA sequence
ACTACACTGTAGATTTGGATGGGGAAGACCTGAAAGAGTCTGTCTAGGAAATGGTCCCTCCAAGAATGC
CTTCTTCTTGAAAGATTACAAAGCTGGGCAAGGCGTGGAGGC GCGGGTGATGTTGCAACAAGCAACAAATG
TCTGAATTTGAACGCAATGAGGAACCTCTTGAGTTCATTGCCAATTAATCCAAGTTTTGGAGTAATTG
GATGTCATTTCCAAGTCTTTTGTGGTGTGATTGAAGAGAGAGGGGTTTACGAAATAAAGGAATACTT
TTGAAACTTACGAAACAATGGTAGGAATAATTTGTAATTGTTGTGTGTTTCATCAACATAATTACAACGG
AAGTTTACGGTCAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

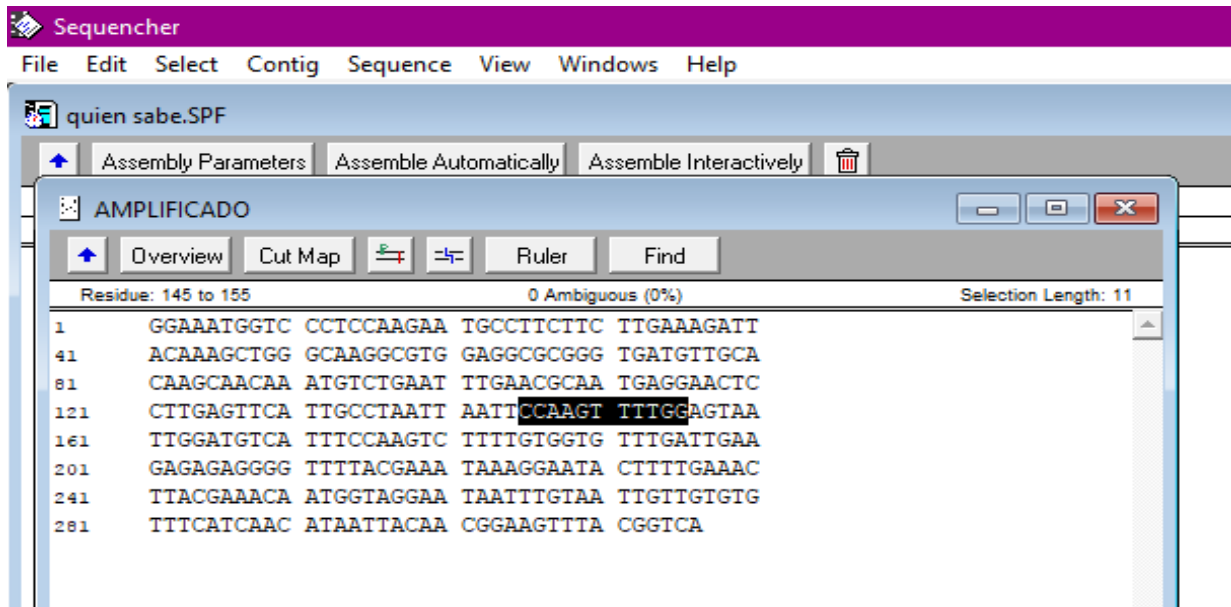
En el Sequencher 4.1.4 se copiaron los primers diseñados y se alinearon a la secuencia de nucleótidos del gen SB2-66



La secuencia de 316 pb resultante de seleccionar la zona de amplificación de los primers se copió en una nueva ventana



Se identifico la zona del polimorfismo que corta la enzima PfIMI



Así se identificó que con la enzima PflMI en presencia del polimorfismo hay un corte en la posición 151 de la secuencia de 316 pb del gen SB2-66. Los cortes por la enzima esperados son de una longitud de 151 pb y 165 pb que significarían:

- Homocigoto G/G (presencia del polimorfismo): 316 pb
- Homocigoto T/T (ausencia del polimorfismo): 151 pb y 165 pb
- Heterocigoto G/T o T/G: 316 pb, 151 pb y 165 pb

El sitio diana de restricción que reconoce esta enzima es el siguiente

