



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“Huella genética de cultivares de *Capsicum Annuum* L. y su
relación con el perfil de carotenoides y fenoles”**

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
Presenta:

Lic. Nut. Ivonne Guadalupe Troconis Torres

Directores de Tesis:
Dra. María Eugenia Jaramillo Flores
Dra. María de Lourdes Villa Tanaca

México, D.F. Enero, 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de enero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Alimentos para examinar la tesis de titulada:

Huella genética de cultivares de *Capsicum annum* L. y su relación con el perfil de carotenoides y fenoles

Presentada por el alumno:

TROCONIS

Apellido paterno

TORRES

Apellido materno

IVONNE GUADALUPE

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	1	3	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO

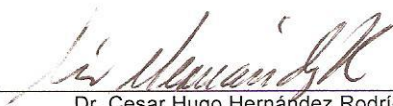
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores


Dra. María de Lourdes Villa Tanaca


Dr. Cesar Hugo Hernández Rodríguez

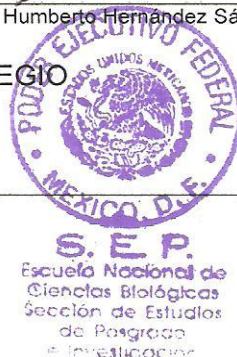

Dra. Lidia Dorantes Alvarez


Dr. Marlon Rojas López


Dr. Humberto Hernández Sánchez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Manuel Jesús Piñón López





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 10 del mes de enero del año **2012**, el (la) que suscribe **Ivonne Guadalupe Troconis Torres**, alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **A080130**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dra. María Eugenia Jaramillo Flores y Dra. María de Lourdes Villa Tanaca** y ceden los derechos del trabajo intitulado: "**Huella genética de cultivares de *Capsicum annuum* L. y su relación con el perfil de carotenoides y fenoles**", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: igtrocto@hotmail.com; jaramillo_flores@hotmail.com; lourdesvilla@hotmail.com; el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Lic. Nut. Ivonne Guadalupe Troconis Torres

Vo. Bo

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores
Director de Tesis

Dra. María de Lourdes Villa Tanaca
Director de Tesis

Relationship between the content of carotenoids and phenolic compounds and molecular markers in commercial samples of *Capsicum annuum* L.

Troconis-Torres Ivonne Guadalupe ^a; Rojas-López Marlon; ^b Hernández-Rodríguez César; ^c Villa-Tanaca Lourdes ^c Maldonado-Mendoza Ignacio ^d Dorantes-Álvarez Lidia ^a Tellez-Medina Dario ^a, Jaramillo-Flores María Eugenia ^{a*}

^aGraduados e Investigación en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional. Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco de Santo Tomás. CP.11340 México, D.F., MEXICO.

^bCentro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Exhacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac- Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P 90700 MEXICO

^cDepartamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional. Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco de Santo Tomás. CP.11340 México, D.F., MEXICO.

^dDepartamento de Biotecnología Agrícola. Bulevar Juan de Dios Batiz Paredes N. 250, Guasave Sinaloa.MEXICO

*Corresponding author: e-mail: jaramillo_flores@hotmail.com

PhD María Eugenia Jaramillo Flores.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN

Carpio y Plan de Ayala. Casco de Santo Tomás.

CP 11340 México, México.

FAX: (52) 55-57296000 Ext. 62359

Troconis Torres Ivonne Guadalupe: e-mail: igtrocto@hotmail.com

Rojas López Marlon: e-mail: marionrl@yahoo.com.mx

Hernández Rodríguez César Hugo: e-mail: chdez38@hotmail.com

Villa Tanaca María de Lourdes: e-mail: lourdesvilla@hotmail.com

Maldonado Mendoza Ignacio: e-mail:

Dorantes Álvarez Lidia: e-mail: ldoran@ipn.mx

Téllez Medina Dario: e-mail: darioiker@gmail.com

Este proyecto fue apoyado y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con una beca escolar 215834 y proyecto SIP 20110329.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	
2. ANTECEDENTES	
2.1 Género <i>Capsicum spp</i>	1
2.2.1 Composición química	
2.2.1 Carotenoides	7
2.2.2 Compuestos Fenólicos	12
2.3 Espectroscopía de infrarrojo	15
2.4 Marcadores Genéticos	16
2.4.1. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	
5. OBJETIVOS	
5.1.1 Objetivo General	
5.2 Objetivos Específicos	19
6. DIAGRAMA DE ACTIVIDADES	
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Material Biológico	
7.2 Determinación de tamaño	20
7.3 Determinación de carotenoides	
7.3.1 Extracción	
7.3.2 Determinación de carotenoides totales	
7.3.3 Identificación y cuantificación	21
7.4 Determinación de fenoles	
7.4.1 Extracción de fenoles libres	
7.4.2 Extracción de fenoles conjugados	
7.4.3 Extracción de fenoles enlazados	
7.4.4 Cuantificación de fenoles de los extractos empleando el reactivo de Folin–Ciocalteu	22
7.4.3 Identificación y cuantificación de fenoles por HPLC.	
7.5. Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)	
7.6. Análisis Estadístico	
7.7 Análisis RAPD	

7.7.1 Desinfección de la muestra	23
7.7.2 Extracción de ADN	24
7.7.3 Amplificación RAPD	
7.7.4. Construcción de matrices y dendogramas	
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
8.1 Determinación de tamaño y peso.	25
8.2 Determinación de carotenoides totales	26
8.2.1 Identificación y cuantificación de carotenoides	28
8.3 Determinación de fenoles	
8.3.1 Fenoles libres	30
8.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC	
8.4.1. Fenoles Libres	32
8.5. Análisis por espectroscopía de infrarrojo	
8.5.1. Carotenoides	35
8.5.2 Compuestos Fenólicos	36
8.6 Análisis RAPD	37
8.7. Análisis Genético con perfiles cromatográficos	
8.7.1 RAPD OPE-18 con carotenoides	41
8.7.2 RAPD OPE-18 con compuestos fenólicos	
9. CONCLUSIONES	43
10. NOMENCLATURA	46
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de biosíntesis de los carotenoides	10
Figura 2. Vía de los poliacetatos	13
Figura 3. Vía del ácido Shikimico	15
Figura 4. Diagrama de actividades	20
Figura 5. Cromatogramas del perfil de carotenoides en chiles verdes.	29
Figura 6. Cromatogramas del perfil de carotenoides en chiles maduros.	30
Figura 7. Cromatogramas del perfil de fenoles libres en chiles verdes.	34
Figura 8. Cromatogramas del perfil de fenoles libres en chiles maduros.	34
Figura 9. Espectros de los extractos de carotenoides de las muestras de chile, de acuerdo, de acuerdo a la región de β -caroteno.	35
Figura 10. Gráfica de la predicción FTIR del contenido de β -caroteno en chile usando las concentraciones de UV-visible mediante PLS	35
Figure 11. Espectros de FTIR de compuestos fenólicos en las muestras de chile	36
Figure 12. Análisis de PCA de los compuestos fenólicos en las muestras de chile, agrupados por región	37
Figura 13. Perfil de RAPD de los chiles Serrano, Jalapeño y Habanero	38
Figura 14. Dendograma de <i>C. annunm</i> L. (chiles Jalapeño y Serrano) y <i>C. chinense</i> Jacq. (chiles Habanero) basado en los marcadores de RAPD OPE-18, por medio de la distancia Euclidiana.	39
Figura 15. Dendograma de <i>C. annunm</i> L. (chiles Jalapeño y Serrano) y <i>C. chinense</i> Jacq. (chiles Habanero) basado en los marcadores de RAPD MFG18, MEFG17, C51 y C52, por medio del coeficiente de Dice.	40
Figura 16. Dendograma de chiles Jalapeño, Serrano y Habanero, considerando la presencia/ausencia de fragmentos polimórficos por el método RAPD, utilizando el oligonucleótido OPE-18 y el perfil cromatográfico de carotenoides en chiles verdes	41
Figura 17. Dendograma de chiles Jalapeño, Serrano y Habanero, considerando la presencia/ausencia de fragmentos polimórficos por el método RAPD, utilizando el oligonucleótido OPE-18 y el perfil cromatográfico de carotenoides en chiles maduros	42
Figura 18. Dendograma de chiles Jalapeño, Serrano y Habanero, considerando	

la presencia/ausencia de fragmentos polimórficos por el método
RAPD, utilizando el oligonucleótido OPE-18 y el perfil cromatográfico
de fenoles libres en chiles

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tamaño y peso de las variedades de chile Serrano, Jalapeño y Habanero	26
Cuadro 2. Contenido de carotenoides en muestras de chile	27
Cuadro 3. Intervalo de las concentraciones de diferentes carotenoides en las distintas variedades de chile	28
Cuadro 4. Contenido de fenoles libres en las variedades de chile	31
Cuadro 5. Contenido de compuestos fenólicos libres en las muestras de chile	33

RESUMEN

El género *Capsicum* provee a la dieta compuestos antioxidantes importantes, como los fenoles y carotenoides. En México existe una gran diversidad de especies y variedades de chile y es un fruto de gran importancia cultural y gastronómica. En el presente trabajo se investigó la relación entre los perfiles de carotenoides y fenoles con la huella digital de RAPD de diferentes cultivares de chiles comerciales provenientes de diferentes regiones geográficas. A través de RAPD, se lograron diferenciar las especies de chile por medio de los diferentes iniciadores (OPE-18, MFG-17, MFG-18, C51 y C52), encontrando una distancia genética de 2.6 con el oligonucleótido OPE-18. Esta diferencia se mantuvo cuando se analizaron simultáneamente el perfil cromatográfico de los carotenoides correspondientes a los chiles maduros con los marcadores moleculares, lo que sugiere que existe una relación cercana entre el perfil de carotenoides y el perfil genético. Además, a través de la espectroscopía infrarroja y el análisis de PCA, se encontraron diferencias explicadas por el origen geográfico, por lo que la metodología utilizada pudiera ser una alternativa para la identificación de especies de chile con respecto al origen geográfico

ABSTRACT

The genus *Capsicum* provides antioxidant compounds, such as phenolics and carotenoids, into the diet. In Mexico a wide diversity of species and varieties of chilli exist, a fruit with local cultural and gastronomic importance. In the present work, the relationship between the carotenoid and phenolic profiles and RAPD fingerprint of different commercial cultivars and origins of chilli was investigated. Through RAPD, the species of chilli were differentiated by means of different primers (OPE-18, MFG-17, MFG-18, C51 and C52); the genetic distance found with OPE 18 was in the order of 2.6. The observed differences were maintained when the chromatographic profile of carotenoids and the molecular markers were simultaneously analyzed, which suggests a close relationship between carotenoids and the genetic profile. In addition, by using infrared spectroscopy and statistical PCA, method differences explained by geographic origin were found; thus, this could be an alternative for identification of chilli species with respect to their geographic origin.

INTRODUCCIÓN

En México, los chiles (*Capsicum spp*) son un símbolo cultural y una tradición culinaria, y debido a su gran diversidad en el mercado son considerados de importancia para la economía del país (Pino y col. 2007). El centro de origen del chile es América del Sur y comprende de 20 a 23 especies, entre las cuales México cuenta con las cinco principales que se cultivan. En los últimos años su popularidad ha crecido debido a su gran contenido de carotenoides y compuestos fenólicos utilizados por constituir pigmentos naturales y por su efecto antioxidante (Suna y col. 2007). Los compuestos fenólicos constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios, sintetizados por las plantas como resultado de la adaptación a condiciones de estrés (Deepa y col. 2007), mientras que los carotenoides son los pigmentos, responsables de los colores amarillos, naranjas y rojos, de animales, flores, frutas y vegetales (Ferriol y col. 2003).

Diversos estudios han demostrado que el contenido de carotenoides y compuestos fenólicos puede variar de acuerdo con el cultivar de los chiles, es decir, los nutrientes se ven afectados por el genotipo, madurez y condiciones de cultivo. Por lo tanto, las diferencias en estos perfiles pueden dar lugar a cambios complejos en la actividad antioxidante y otras bioactividades del fruto (Vega y col. 2009, Matsufuji y col. 2007).

Dado lo anterior se plantea que, si el perfil de carotenoides y compuestos fenólicos son específicos de cada cultivar de chiles, entonces servirán como una huella digital para su identificación, para lo cual se partirá con la determinación de la variación genética utilizando marcadores genéticos (RAPD) en los diferentes cultivares de chile y se relacionará con su perfil de carotenoides y compuestos fenólicos.

1. ANTECEDENTES

2.1 Género *Capsicum spp*

El chile (*Capsicum spp.*) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en México, formando parte de su cultura al consumir los diferentes tipos como ingredientes de distintos platillos, debido a sus diversos sabores, olores, colores y pungencia que caracterizan a la comida mexicana (Ochoa y col. 2001)

El género *Capsicum* pertenece a la familia de las solanáceas y comprende más de 200 variedades, entre las que se encuentran principalmente: *Capsicum annuum*, *Capsicum*

frutescens L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum baccatum* Jacq. y *Capsicum pubescens* L. (Pino J y col. 2007, Conforti F y col. 2007), siendo las más importantes, por el área sembrada y volumen de producción, los de la especie *C. annuum*, mientras que las otras se consumen en menor escala o se usan casi exclusivamente para exportación (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), INIA. 1984).

***Capsicum annuum* L.**

Dentro de las cinco especies cultivadas de los chiles, ésta es la más conocida y la de mayor importancia económica, ya que presenta una distribución mundial. El centro de origen y/o domesticación se da en el continente americano, principalmente en México, Guatemala y el sur de los Estados Unidos (Oboh G y col. 2007). México es el país que presenta la mayor variabilidad de formas cultivadas y silvestres, entre las que destacan: el chile ancho, serrano, jalapeño, morrón, mirasol, pasilla y mulato. Además, presenta la mayor variabilidad en cuanto a tamaño, forma, y color de los frutos, los cuales pueden variar de 1 a 30 cm de longitud, con formas alargadas, cónicas o redondas y cuerpos gruesos macizos o aplanados. Los frutos presentan coloración verde o amarilla cuando están inmaduros y roja, amarilla, anaranjada o café en estado maduro. (Montes H y col. 2004). En esta especie los chiles de mayor importancia comercial son el serrano y el jalapeño. (SARH, INIA. 1984).

El Chile Serrano es originario de las serranías del norte de Puebla e Hidalgo, en donde se sembró originalmente, sin embargo, su cultivo se ha desplazado a otras regiones como los estados de Veracruz, Tamaulipas, Nayarit y Sinaloa, donde se encontraron condiciones favorables para su desarrollo debido al amplio rango de adaptación y al constante incremento de la demanda del producto.

La planta de este tipo de chile tiene mucha variabilidad en cuanto a morfología, es así como se observan hábitos de crecimiento compacto, postrado y erecto. La altura varía de 0.40 a 1.50 m. Las hojas y el tallo presentan diferentes grados de pubescencia, lo cual da diversas tonalidades de verde a la planta. Las raíces varían en cuanto a forma y tamaño: desde la raíz típica o pivotante, con diferentes grados de ramificación y profundidad, hasta las raíces fibrosas. Los frutos son rectos, alargados o ligeramente encorvados y algunos de forma cónica. Tienen de 2 a 10 cm de longitud, con cuerpo cilíndrico y epidermis lisa, presentan de 2 a 3 lóculos. Son muy picantes, de color verde que varía desde el claro al

muy oscuro cuando inmaduro, cambiando luego a color rojo al madurar. Se clasifican por su forma y tamaño en tres categorías:

- Balín. Frutos de 2 a 4 cm de longitud, de forma cónica o alargada y muy firme.
- Típico. Frutos de 4 a 8 cm de largo, alargados, rectos, lisos, de ápice aguda o redondeada.
- Largo. Frutos de mayor de 8 cm de longitud, puntiagudos y encorvados.

La calidad en el chile serrano se ha descrito en función de los siguientes aspectos:

- Apariencia. Se prefieren frutos de 6 a 8 cm de largo, rectos y de epidermis lisa, de color verde normal a verde oscuro brillante. El pedúnculo debe permanecer adherido al fruto para evitar una rápida deshidratación y los problemas de enfermedades durante el almacenaje.
- Firmeza. Le confiere al fruto un mayor peso unitario, resistencia al transporte y mayor tiempo de exposición en el mercado, por lo que este carácter esta dado por un buen llenado por la placenta y semillas de las cavidades internas y por el grosor del pericarpio, el cual no debe de ser menor de 1.8 mm.
- Pungencia. Se requiere que el fruto sea muy picante y de buen sabor.

Más del 90% de la producción nacional se utiliza en fresco, mientras que el resto se utiliza en encurtidos por la industria enlatadora (SARH, INIA. 1984).

Por otra parte, el nombre del chile Jalapeño proviene de la ciudad de Xalapa, Veracruz, en donde antiguamente se comercializaba el producto, aún cuando en esa región no se siembra este tipo de chile. Es un chile picante; sus frutos son firmes, aromáticos, de buen sabor y de aspecto atractivo por lo que tienen muy buena aceptación en el mercado.

Las tres zonas productoras más importantes son: a) La cuenca baja del río Papaloapan; b) el norte del estado de Veracruz; c) La región de Delicias, Chihuahua. Hay otras regiones en las cuales se cultiva este tipo de chile en pequeñas escala como Jalisco, Sonora, Sinaloa y Chiapas. (SARH, INIA. 1984).

Dadas las características del fruto y el hábito de crecimiento de las plantas se definen cuatro subtipos de chile jalapeño:

- 1) Típico. Plantas compactas, no más altas de 65cm, las ramas son largas y crecen en forma de cruz. El fruto es cónico, de forma cilíndrica, mide de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho.
- 2) Peludo. Conocido como Cuaresmeño, es liso, de forma alargada y cuerpo angular, de 6 a 9 cm de longitud por 3 a 4 cm de ancho, tiene 3 ó 4 lóculos, con un pericarpio grueso (0.5 cm de espesor).
- 3) Espinalteco. Los frutos son largos, delgados y con ápice puntiagudo, tiene una longitud de 6 a 9 cm y un ancho de 2.5 a 3 cm.
- 4) Morita. Los frutos son redondos o cónicos, de 3 a 4 cm de largo por 2 a 3 de ancho. Tienen pericarpio grueso y lisos.
- 5) Cultivares americanos. Los frutos son de forma alargada, de 8 cm de largo por 2 a 5 cm de diámetro; tienen tres lóculos grandes lo cual reduce la consistencia del fruto; el pericarpio es delgado (0.4 cm de espesor).
- 6) Early. El fruto es de forma cónica, chato, de 6 a 8 cm de longitud y color verde claro; tiene tres lóculos grandes, con pericarpio intermedio de 0,4 a 0.5 cm de espesor pero se rompe fácilmente.

Dentro de los caracteres de calidad del fruto se encuentran:

- Tamaño y peso. El ideal es de 6 a 8 cm de largo y con un peso unitario mínimo de 10g.
- Forma. El fruto ideal es de forma cónica.
- Corchosidad. Este factor es importante para el proceso industrial ya que evita que la cutícula del fruto se desprenda durante el proceso de encurtido, por lo que se prefieren un porcentaje de 30 a 60.
- Pericarpio. Debe de ser grueso para resistir los problemas de transporte, proceso de esterilización, lavado y aplicación de presión.
- Pedúnculo. Es necesario que quede adherido al fruto con el fin de evitar daños de hongos y bacterias en el almacenaje.
- Color. Se prefieren los frutos de color verde intenso y brillante.
- Pungencia. Los frutos que contengan una pungencia intermedia son preferidos.

Se estima que el 60% de la producción va a la industria en encurtidos, el 20% se consume fresco y el 20% se utiliza en la elaboración del “chipotle”. (SARH, INIA. 1984).

***Capsicum chinense* Jacq.**

Se cree que esta especie fue introducida a la península de Yucatán desde Cuba en tiempos precolombinos a través del comercio de los mayas. Su centro de origen se ubica en la Amazonia, Sudamérica. Esta especie se ha hecho famosa recientemente por su alto contenido de capsaicina, lo que la hace la especie más pungente dentro del género. Este cultivar nativo tiene la particularidad de poseer frutos de color naranja intenso, los cuales son cultivados generalmente en los huertos tropicales caseros de los pueblos. En un huerto tropical, el número de plantas de chile habanero no sobrepasa las 100 plantas. Esto se debe en especial al hecho de que una sola planta puede llegar a producir más de 100 frutos en un período de producción de hasta cinco meses. Adicionalmente, se hace necesario el riego continuo y el manejo hortícola intenso, en especial el de protección vegetal. A veces se llega al extremo de utilizar tapescos para proteger a las plantas del intenso Sol y de la evapotranspiración excesiva (González S y col. 2006).

El Chile Habanero es sembrado exclusivamente en la península de Yucatán, donde está adaptado a las condiciones especiales de clima y suelo imperante en esa región. El origen de este tipo de chile es desconocido, aunque se podría sugerir que es originario de América del sur; se supone, por el nombre que lleva, que en alguna época muy lejana fue introducida de Cuba.

Las plantas tienen el hábito de crecimiento indeterminado, comportándose como una planta perenne, presenta una altura no menor de 1.30 m. El tallo principal está bien diferenciado, con variación en cuanto al tipo de ramificación, la cual, generalmente, es erecta y produce de 3 a 5 ramas primarias por 9 a 13 ramas secundarias. Tienen hojas grandes, de 15 cm de largo por 10 cm de ancho, de color verde oscuro brillante. Los frutos se presentan hasta por seis por axila; la forma de estos varía de redonda a oblonga. Por lo general son ondulados con un ensanchamiento en la parte apical y tienen de 3 a 4 lóculos. El tamaño de los frutos varía de 2 a 6 cm de largo por 2 a 4 cm de ancho, son de color verde cuando tiernos y al madurar pueden ser anaranjados, amarillos, blancos o rojos, predominando el color anaranjado, son extremadamente pungentes y aromáticos.

La calidad del chile habanero la determina la apariencia del fruto; el tamaño que se espera de 5.5 cm de largo a 3.5 cm de ancho, en cuanto al peso se espera encontrar que sea mayor a 10 g, así como la firmeza y el color.

De la producción total, el 75% es para consumo en fresco, el 22% lo utiliza la industria en la elaboración de salsas y el 3% se destina a la obtención de semilla (SARH, INIA. 1984).

***Capsicum frutescens* L.**

Es otra de las especies de chile que ha ido cobrando importancia económica ya que a ella pertenecen los chiles tipo “Tabasco” y “Cayene” comercializados en todo el mundo. Además, es una de las principales especies de donde se extraen los capsaicinoides, metabolitos secundarios utilizados en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. En Baja California Sur el cultivo de chile se realiza bajo condiciones de precipitación pluvial escasa, la cual oscila entre 100 y 200 mm, con evapotranspiración potencial media anual de 2000 mm y temperaturas de 35 a 40°C durante el verano, por lo que sólo puede mantenerse hasta fines de primavera, con riegos y fertilización adecuados. Presenta características de adaptación a las condiciones ambientales de la región, incluyendo sequías prevalecientes y altas temperaturas, por lo que ha desarrollado mecanismos ecofisiológicos con bajos requerimientos de agua, ciclo de vida más largo y producción sostenida. No ha alcanzado una condición completa de domesticación a causa de su bajo porcentaje de germinación, pero a su vez ha superado condiciones silvestres, como el estado de latencia en semillas sujeto a la oscuridad y a la condición de potencial hídrico (Nieto G y col. 2006).

***Capsicum baccatum* Jacq.**

Es una especie originaria de Sudamérica, extendida en Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil, donde comúnmente se denomina ají. Sus frutos están muy arraigados en la alimentación y la cultura gastronómica de países como Bolivia, Ecuador o Perú. Se adapta satisfactoriamente a las condiciones de cultivo de la costa Mediterránea. (Rodríguez B y col. 2007).

***Capsicum pubescens* L.**

El chile más importante económicamente en esta especie es el chile manzano o perón, el cual es muy particular ya que solamente se adapta a los lugares fríos en donde inclusive, puede tolerar heladas. Este chile es originario de América del Sur. Su nombre técnico proviene de los tallos y hojas completamente cubiertas de vellosidades o pubescencias.

El chile se cultiva en pequeña escala a nivel nacional, principalmente, en los alrededores de Pátzcuaro, Michoacán. Produce abundantes frutos muy carnosos de color verde

brillante cuando inmaduros, y de muy atractivo color rojo o más comúnmente amarillo, al madurar. A diferencia del resto de los chiles sus semillas son negras. Los frutos son muy picantes y aromáticos y se consumen exclusivamente frescos, aunque preferentemente maduros, ya que por su carnosidad no pueden secarse o deshidratarse. (SARH, INIA. 1984).

2.4 Composición química

La composición química del chile se ha estudiado bastante bien, sobre todo con respecto a las vitaminas C y A, contenido de pigmentos carotenoides y fenoles (Conforti F y col. 2007).

Los carotenoides son responsables de la coloración amarilla o roja de los frutos, se han descrito compuestos como el β -caroteno, y xantofilas (capsantina, zeaxantina y capsorrubina). Se han utilizado como aditivos de alimentos para ganado bovino con la finalidad de imprimirle una coloración más intensa (amarilla o anaranjada) a los productos lácteos, principalmente a la mantequilla. Otro tipo de pigmentos producidos de forma natural son los flavonoides, como las antiocianinas, responsables de un amplio rango de color rojo o púrpura. En el caso de *Capsicum*, generalmente le imprimen una coloración morada a los tejidos y puede ser utilizada como aditivo de alimentos, pudiendo conferirle tonalidad a productos de importancia industrial como los vinos o bien como antioxidantes (Ochoa A y col. 2001).

2.2.1 Carotenoides

Constituyen uno de los principales pigmentos de ciertas frutas, verduras, flores y de muchos microorganismos, como las algas rojas y verdes, hongos y bacterias fotosintéticas. Estas moléculas se encuentran libres en los tejidos de las plantas, en forma de cristales, como sólidos amorfos o en solución en medio lipídico, o bien, pueden presentarse como ésteres o combinados con azúcares y proteínas (Fennema, 1985).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera tal que el orden se invierte al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias maneras, como por ejemplo por hidrogenación, dehidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización,

introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras.

Los carotenoides hidrocarbonados se denominan carotenos y son solubles en éter y muy poco solubles en etanol (licopeno, α y β -caroteno). Mientras que los que contienen oxígeno se designan como xantofilas que son solubles en etanol e insolubles en éter de petróleo (luteína). Los carotenoides, ya sea carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula, formando uno o dos anillos β de seis miembros (a veces denominados β -ionona) (Rodríguez A. 1999).

Pueden existir en dos configuraciones de isómeros geométricos cis o trans. La mayoría de los carotenoides están en su forma trans porque son moléculas lineales y termodinámicamente más estables que los isómeros cis debido a que el sistema de dobles enlaces conjugados es extenso (Van den Berg y col. 2000). Este sistema extenso de dobles enlaces conjugados, que alterna enlaces carbono-carbono simples y dobles, por lo general se denomina cadena poliénica. Esta parte de la molécula conocida como el cromóforo, es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y en consecuencia su gran capacidad de coloración. Se requieren al menos siete enlaces dobles conjugados para que un carotenoide produzca color como en el β -caroteno, el cual es amarillo suave. El fitoflueno con cinco de tales enlaces es incoloro. El color se acentúa a medida que se extiende el sistema conjugado, así el licopeno es rojo. La ciclación causa algún impedimento, por tanto el α -caroteno y el β -caroteno son de color naranja y rojo-naranja respectivamente, aunque tienen el mismo número de enlaces dobles conjugados que el licopeno (once). La intensidad y matiz de los colores en los alimentos dependen de cuáles carotenoides están presentes, sus concentraciones y estado físico (Rodríguez A. 1999).

El pigmento representante de pimiento rojo (*Capsicum annuum*) es la capsantina; las largas cadenas de dobles enlaces que terminan en uno o dos cetonas polares absorber eficientemente la luz verde para dar un color rojo-naranja, y el grupo hidroxilo de la estructura de anillo es esterificado con ácidos grasos en monoésteres y diésteres así como apareciendo en forma libre. Las propiedades estructurales de capsantina, que contiene once dobles enlaces conjugados, un grupo cetona conjugado y un anillo de

ciclopentano, puede estimular la capacidad quelante del oxígeno (Matsufuji H y col. 2007, Deepa N y col. 2007). Otros pigmentos, que se traducen en un color amarillo-naranja, son violaxantina, capsantina-5, 6 epóxido, zeaxantina, luteína, β -criptoxantina y β -caroteno. La maduración del chile rojo está directamente relacionada con la formación y transformación de los pigmentos. Mientras los pigmentos clorofílicos como la luteína y la neoxantina desaparecen, el β -caroteno, violaxantina, capsantina y capsorrubina aumentan durante la maduración (Conforti F y col. 2007).

Uno de los carotenoides importante en el chile es el β -caroteno, una característica importante de su molécula es el sistema de dobles enlaces conjugados, responsables de la reactividad química, de la intensa absorción en la región visible, base para su identificación y cuantificación, dando como resultado colores como el amarillo, naranja y rojo; y los diferentes matices propios de muchos alimentos. Su molécula es una estructura doble de retinol por lo que debería de dar lugar a dos moléculas de retinol (Rodríguez A. 2001), sin embargo, la disparidad entre su estructura química y su actividad biológica se debe, en parte, a la absorción incompleta y a la falta de estequiometría de la reacción, debido a la formación de metabolitos oxidados de retinol. Así, por ejemplo, se considera que 2 mg de β -caroteno en solución oleosa equivalen a 1 mg de retinol.

Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de β -ionona pueden convertirse en retinol en los animales, por lo que el carotenoide principal como pro vitamina A, es el β -caroteno, que contiene dos de estos anillos. El α , β y el γ -caroteno, sin embargo, no pueden convertirse en retinol en los animales con la misma eficacia que el β -caroteno, ya que el anillo ϵ del α -caroteno no puede convertirse en el organismo en γ -ionona, y la estructura abierta de la cadena del γ -caroteno no puede hacerse cíclica en los animales. Por lo tanto, el α -caroteno y el γ -caroteno se transforman en retinol con la mitad de eficiencia que el β -caroteno. La actividad biológica del anillo de β -ionona en los carotenos cesa por la introducción de un grupo hidroxilo. La β -criptoxantina, con un anillo de β -ionona sustituido por un hidroxilo y el otro intacto, tiene la misma actividad provitamínica A que α y γ caroteno, mientras que la zeaxantina no tiene la misma acción ya que tiene dos anillos de β -ionona hidroxilados (Melendez, 2004).

En la mayoría de las frutas que contienen carotenoides, la maduración se ve acompañada por un aumento de la biosíntesis de carotenoides. A medida que la clorofila se

descompone y los cloroplastos se convierten en cromoplastos, el patrón de carotenoides de los cloroplastos se transforma en una composición compleja y los carotenoides aumentan en forma significativa, tanto en número como en cantidad, especialmente los pigmentos principales (Rodríguez A. 2001).

Biosíntesis de los carotenoides

La síntesis se realiza en los cromoplastos y tienen la función de proteger el aparato fotosintético de las reacciones oxidativas deletéreas (Camara y col. 1982). Los precursores isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil-difosfato (DMAPP) eran sintetizados por todos los organismos vivos a través de una ruta metabólica universal denominada vía mevalónica (MVA) que opera en el citoplasma de prácticamente todos los eucariontes y por la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), presente en la mayoría de las eubacterias y en organismos fotosintéticos (algas y plantas superiores), y ausente en las arqueobacterias, en hongos y animales (por lo que estos sólo sintetizan sus isoprenoides exclusivamente por MVA (León y Guevara-García, 2007). Por lo tanto, en algas como en plantas la biosíntesis de isoprenoides se realiza a través de ambas rutas (Rodríguez y col. 2002). como se puede observar en la figura 1 (León P y col. 2007).

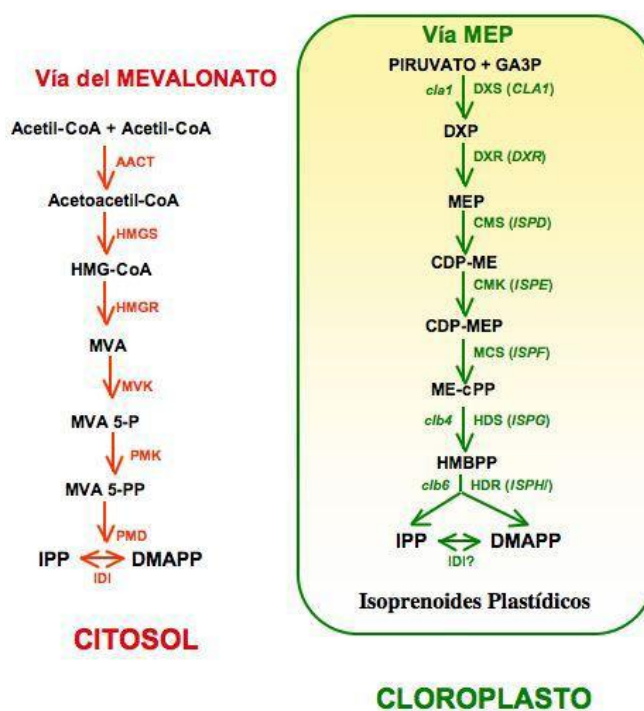


Figura 1. Rutas de biosíntesis de los carotenoides

Vía mevalónica

Inicia a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (CoA) por la acción de tres enzimas que producen ácido mevalónico, primer intermediario comprometido de esta vía. A través de tres enzimas adicionales el ácido mevalónico es convertido a IPP. Finalmente, la enzima IPP isomerasa (IDI) utiliza este compuesto como sustrato para producir DMAPP, transformándose a geranil difosfato (C10), formando monoterpenos (C10) y triterpenos (C30); del farnesil difosfato (C15), el cual da origen al escualeno y sesquiterpenos (C15), finalmente se forma el geranil-geranil difosfato, originando por un lado los diterpenos (C20), los fitoles y la clorofila y por el otro, compuestos de cadena larga como poliprenoles, ubiquinona, plastiquinona y fitoeno incoloro. Este por reacciones de desaturación origina el licopeno, cuya doble ciclización da origen al β -caroteno y a la formación de dos núcleos de β -ionona. La oxigenación del β -caroteno, confiere la coloración naranja de la cantaxantina, posteriormente la hidroxilación de ésta, daría la formación de xantofilas y los diversos pigmentos carotenoides: β -caroteno, luteína, zeaxantina, equinenona, cantaxantina y astaxantina (Young y Britton, 1993).

Vía MEP

Existe una nueva vía para la síntesis de isoprenoides tanto en bacterias como en plantas denominada MEP, con base en el primer intermediario comprometido, el 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato. La primer reacción de esta vía involucra la condensación de una molécula de piruvato con el gliceraldehído 3-fosfato (GA3-P) a través de una enzima de tipo transcetolasa, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), produciendo el producto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP). En el segundo paso biosintético, el DXP es convertido a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa (DXR). En los pasos subsecuentes de la vía, el MEP es transformado en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) por la acción consecutiva de las enzimas 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa (CMS), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa (CMK), 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa (MCS) y 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (HDS). En el último paso de la vía, la enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR), convierte el 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) en isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil difosfato (DMAPP) que son los productos finales de esta ruta biosintética (León y Guevara-García, 2007).

Muchos de los carotenoides son lipofílicos, es decir, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, como acetona, alcohol, éter, cloroformo y acetato de etilo. También son muy solubles en éter de petróleo, hexano y tolueno; mientras que las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol.

Las principales causas de la degradación de los carotenoides son el daño oxidativo, estimulado por la luz, enzimas, metales y la co-oxidación de los lípidos (Rodríguez A. 2001).

2.2.2 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios, que son sintetizados por las plantas como resultado de la adaptación a condiciones de estrés bióticos y abióticos (infección, lesiones, estrés hídrico, el frío, de alta la luz visible) (Materska M. 2005). Su estructura consiste en un núcleo aromático que contiene un grupo hidroxílico libre o sustituido (Adzet y col. 1987), y es precisamente a esta estructura por lo que se clasifican, así como por su origen biológico. El grupo más sencillo corresponde a los ácidos fenólicos y cetonas polifenólicas; también se encuentran los fenilpropanoides (cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos) basados en un núcleo C₆C₃. Otro grupo son las xantonas (con un esqueleto C₆-C₂-C₆), las quinonas (benzo-, nafto) y antraquinonas. Por último, destacan los flavonoides, que suponen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas y que se dividen en antocianinas (pigmentos), flavonoides menores (flavanonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados (Castillo G y col. 2007).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado su forma (libre, glicósido ó sulfato). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors y col. 1990). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo

muy tenue hasta el rojo, las antocianidinas pueden ser de color rojo intenso, morado, violeta y azul. Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal (Martínez-Flórez y col. 2002).

Entre las rutas de biosíntesis se encuentran la del ácido shikímico que conduce, mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), a los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano), y la ruta de los poliacetatos por la cual se originan quinonas, xantonas, orcinoles, etc. Existen compuestos fenólicos que se originan a través de rutas mixtas (sikimato y acetato), como los flavonoides, o a través de la combinación de la vía del mevalonato, origen de los compuestos terpénicos, con la vía del sikimato (furano y piranocumarinas, etc.) (Adzet y col., 1987).

Vía de los poliacetatos

J. Birch hace cuarenta años, propuso como hipótesis para la biogénesis de estos compuestos, la unión consecutiva de unidades de acetato para producir, de manera controlada, un policétido de cadena abierta que ciclará toda vez que se ha completado la secuencia de átomos de carbono (Figura 2).

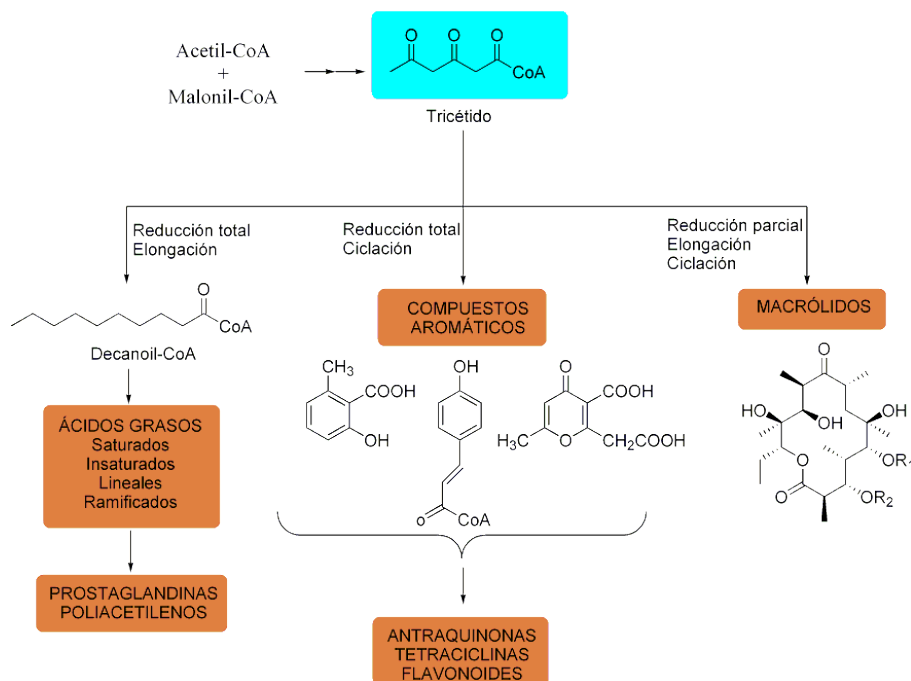


Figura 2. Vía de los poliacetatos (<http://www.ugr.es/~quiored/pnatu/fig/rutapoliceti.gif>)

Eventualmente, la secuencia de unidades de C2 no puede seguirse de manera coherente al examinar las estructuras de ciertos productos y ello puede tener varias causas: metilaciones, propagadores diferentes del malonato, ensamblaje del esqueleto a partir de dos unidades independientes de poliacétidos y rompimiento (una vez formados) de los anillos aromáticos por vías oxidativas seguido de reciclación. Estos últimos son los más complejos de detectar. Las descarboxilaciones son frecuentes, tal es el caso de la formación del orcinol a partir del ácido orselínico; también son usuales las dimerizaciones por acoplamiento C-O y C-C, y son responsables de la formación de varios pigmentos quinoideos.

La presencia de grupos metilenos activos puede originar tres tipos de ciclizaciones a través de condensaciones aldólicas, de Claisen y de esterificación intra o intermolecular de enoles; las estructuras resultantes se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las estructuras resultantes muestran un patrón de oxigenación meta, el cual puede alterarse por oxidaciones posteriores. Los derivados más representativos de estas acetogeninas aromáticas son quinonas, xantonas, cumarinas, cromanos y cromonas, así como sus productos de degradación

Vía del ácido Shikímico

La glucosa es el precursor de los fenilpropanoides a través del intermediario clave: el ácido shikímico. Este compuesto fue aislado en 1885 de un árbol japonés y su intervención en la bioformación de fenoles naturales fue establecida en 1955. La ruta metabólica que conduce al ácido shikímico, figura 3, involucra un intermediario de 7 átomos de carbono proveniente de la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa.

El ácido shikímico precursor de ácidos benzoicos sustituidos, se condensa de nuevo con una unidad de fosfoenolpiruvato y produce ácido chorísmico, precursor de los fenilpropanoides, el cual es el más abundante y comprende el mayor número de variaciones estructurales que van desde moléculas con esqueletos C6-C3 hasta polímeros, mientras que los derivados del ácido benzoico con esqueletos C6-C1, son reducidos en número y es frecuente encontrarlos como parte de los sustituyentes de otras estructuras.

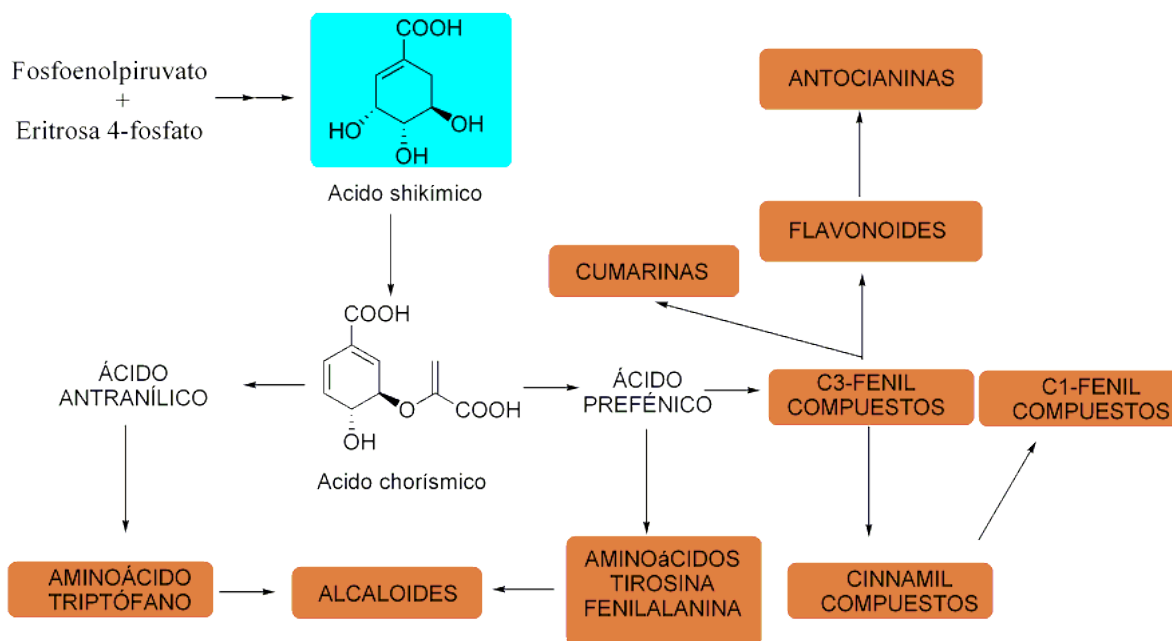


Figura 3. Vía del ácido Shikímico (<http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/fig/rutashikimi.gif>)

Las semillas de distintas fuentes de la planta han demostrado que contribuyen de manera significativa a alto contenido de fenoles totales. Por otra parte, la edad de la planta y la madurez son los principales determinantes de la variación en el contenido fenólico, sin embargo, se encuentran principalmente localizados en la cáscara (Deepa N y col. 2007). Los frutos de chile también acumulan compuestos nutricionalmente importantes como la vitamina C y A (Curry y col. 1999).

De esta manera, se ha encontrado que el tipo de cultivar, estado de madurez y condiciones de crecimiento, son factores que afectan el contenido total de carotenoides en el fruto (Méndez T y col. 2005). Mientras que para los compuestos fenólicos se ha encontrado que la cantidad depende de la variedad de pimiento (Navarro J y col. 2006). Por lo que no todos los genotipos de los chiles pueden contener un perfil o proporciones similares de carotenoides y fenoles, las diferencias en estos perfiles pueden dar lugar a cambios complejos en la actividad antioxidante y otras bioactividades (Vega Gálvez y col. 2009).

2.5 Espectroscopía de infrarrojo

El método utiliza la región infrarrojo cercano de longitudes de onda entre los 700 y 2500 nm. del espectro electromagnético, cuando la luz (energía) incide sobre una muestra, una

parte de los fotones se transmite a través de la misma, siendo el resto absorbida. La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces entre Carbono e Hidrógeno (C-H); principales constituyentes de la estructura básica de las sustancias orgánicas; vibren en distintas formas. La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación. Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea el espectro obtenido en la región infrarrojo cercano sea una combinación de bandas de absorción parciales sobrepuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro. Al desarrollar una calibración NIRS, se relaciona mediante un algoritmo la información espectral (óptica) con la información de la composición físico-química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos como son la regresión múltiple, los componentes principales y los cuadrados mínimos parciales. (Cozzolino D. 2002).

La aplicación de la espectroscopía infrarrojo ha tenido múltiples aplicaciones en diferentes campos, sin embargo algunas de las investigaciones que se han realizado con el fin de identificar diversos alimentos de acuerdo a su origen geográfico, como Etzold y col 2008 que describen el empleo de la espectroscopía IRTF para determinar el origen botánico de una muestra de miel, mientras que Romdhane y col 2001. utilizaron el método para diferenciar las diferentes altitudes donde pueden ser elaborados los quesos suizos. También se ha empleado para clasificar muestras de aceite de oliva turcos con respecto a su tipo de cultivo, origen o año de recolección (Gurdeniz y col. 2008), así como 84 variedades de aceite de oliva de ocho regiones italianas fueron recogidos y elaborados por análisis de componentes principales considerando la región de la huella dactilar (Bendini y col. 2007). De esta manera, podemos considerar a la espectroscopía IRTF como una herramienta para la identificación de diferentes muestras.

2.4 Marcadores Genéticos

Los análisis de expresión génica diferencial, frecuentemente referidos como genómica funcional, son el eslabón entre la fisiología y la biología molecular. Los cambios fisiológicos específicos durante el desarrollo de las plantas se deben a un número limitado de genes que se expresan exclusivamente en algunas células, tejidos u órganos

específicos en etapas determinadas o transitorias. En el caso del Chile, se han reportado genes de expresión diferencial en tejido de placenta de los frutos picantes, sitio de acumulación específica de los capsaicinoides, y que muy probablemente están involucrados en la biosíntesis de los compuestos picantes (Curry y col. 1999).

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia controlada genéticamente, considerando a cualquier molécula, orgánica o inorgánica, característica de un organismo o proceso como un marcador, como pudiera ser una proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido, que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen, cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (Azofeifa D. 2006).

En la actualidad se dispone de diversos tipos de marcadores moleculares para evaluar la diversidad genética en plantas, basados en la presencia de secuencias repetitivas de ADN, las cuales representan una proporción importante del genoma de organismos eucariotas. Dentro de esta clase de marcadores se encuentran las repeticiones de secuencia simple (SSR) o microsatélites y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) (Posso D y col. 2006).

2.4.1. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

Este análisis fue descrito por primera vez en 1990. El método RAPD, nombrado así por sus siglas en inglés (Random Amplified Polymorphic DNA) es un proceso simple basado en la amplificación de DNA genómico con iniciadores (uno por reacción de PCR) de secuencia de nucleótidos arbitraria, que detecta polimorfismos que funcionan como marcadores genéticos. Cada iniciador amplifica por PCR varios segmentos de DNA (detectados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio) donde pueden aparecer polimorfismos entre las especies analizadas. El método RAPD fue adoptado de inmediato por su simplicidad y bajo costo, además de no requerir de marcadores radioactivos y utilizar cantidades mínimas de DNA (Xena de Enrech N. 2005).

Los polimorfismos producidos con esta técnica se denominan marcadores RAPD, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que éste se una a la cadena, o también pueden ser el

producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general, el tamaño de las variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus.

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos:

- 1) ADN molde: ADN proveniente de la muestra a analizar.
- 2) El iniciador: es un oligonucleótido corto (aproximadamente 10 nucleótidos), con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Debe tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente.
- 3) Desoxirribonucleótidos: se requiere de concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena.
- 4) Solución reguladora.
- 5) Taq-polimerasa: es una enzima ADNpolimerasa ADN dependiente termoestable. Tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto determinado, fijado en este caso, por el iniciador.

Durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas en forma cíclica de manera similar a lo que ocurre en una reacción PCR pero contemplando la modificación mencionada anteriormente. La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: el número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura (Azofeifa D. 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

Los esfuerzos encaminados a mejorar la producción de chiles han originado la creación de nuevas variedades, más productivas, uniformes, resistentes a enfermedades y de mejor calidad, por lo que son aceptadas rápidamente por los agricultores, quienes no vuelven a sembrar sus tipos criollos, ocasionando un cultivo más productivo y remunerativo, que puede beneficiar al consumidor al adquirir un mejor producto.

La identificación que permita la diferenciación de cultivares de una misma especie de plantas o frutos dentro del campo de la horticultura ha sido tema de múltiples

investigaciones para definir su identidad, pureza y estabilidad, requiriéndose de la implementación de nuevas técnicas que permitan su identificación.

Los estudios que se han realizado por el momento, han estado enfocados en obtener información sobre la diversidad genética de cultivares de diferentes frutos como la granada (Sarkhosh y col. 2009) y el durazno (Baránek y col. 2006), mientras que otros lo relacionan con características físicas como el peso de la raíz (Lin y col. 2009) y el color de la piel (Inoue y col. 2006) e inclusive con características bioquímicas como en el caso de los ácidos grasos en cultivares de granada (Ercisli y col. 2007).

Por otra parte, aún no se ha establecido la relación entre los perfiles cromatográficos de carotenoides y fenoles con las huellas genéticas mediante las técnicas RAPD.

3. HIPÓTESIS

El perfil de carotenoides y compuestos fenólicos presentes en cada cultivar de Chile tendrá relación directa con RAPD y por lo tanto servirán como una huella digital para su identificación.

4. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la variación genética de las diferentes cultivares de Chile y conocer su relación con el perfil de carotenoides y fenoles.

5.2 Objetivos Específicos

- Establecer el perfil de carotenoides en los diferentes cultivares de Chile.
- Determinar el perfil de compuestos fenólicos en los diferentes cultivares de Chile.
- Obtener la huella genética de los diferentes cultivares de Chile, por medio de un análisis RAPD.
- Relacionar el perfil de carotenoides y compuestos fenólicos con la huella genética de los diferentes cultivares de Chile, así como entre especies.

5. DIAGRAMA DE ACTIVIDADES



Figura 4. Diagrama de actividades

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

Se emplearon muestras de chile Jalapeño (J) y Serrano (S) de la variedad de *C. annuum* L. y chile –Habanero (H) de la variedad *C. Chinense* Jacq. de diferentes regiones de México [centro: Tlaxcala (Tx) con un clima templado, Puebla (P) con clima subhúmedo, dos regiones de Veracruz (V1) y (V2) con un clima subhúmedo; norte: Jalisco (Jc) con clima cálido subhúmedo, Sinaloa (Si) con climas que van desde cálido subhúmedo, hasta seco y semiseco y Tamaulipas (T) con un clima subhúmedo]. Las muestras colectadas fueron lavadas con agua destilada y almacenadas a -70°C.

7.2 Determinación de tamaño

El tamaño de los chiles se determinó en base a su largo, ancho y peso. El largo y ancho se midió con un vernier, expresando la medida en centímetros. El largo se tomó de la base al ápice del fruto sin considerar el pedúnculo y el ancho se midió de la parte de mayor amplitud del chile (NMX-FF-025-SCFI-2007). Para el peso se utilizó una balanza analítica.

7.3 Determinación de carotenoides

7.3.1 Extracción

La extracción de carotenoides fue llevada a cabo con 2 g de chile, triturados con tierra de diatomeas y acetona a 10°C. Después se filtró el extracto al vacío con papel Whatman no.2 y se transfiriéndolo a 10 mL de éter de petróleo. La fase etérea se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar la acetona residual, mientras que los residuos de agua fueron eliminados por agitación con sulfato de sodio anhidro. El éter de petróleo se eliminó mediante corriente de nitrógeno gaseoso de alta pureza. Los extractos fueron almacenados a -20°C y protegidos de la luz (Jaramillo et al., 2005).

7.3.2 Determinación de carotenoides totales

A partir de 1 mL del extracto obtenido se determinó el contenido de carotenoides, por medio de espectrofotometría [GBC-VIS/UV198] y la concentración se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$x(\mu g) = \frac{(A * y * 10^6)}{(A\%_{cm} * 100)}$$

Donde:

x = concentración de carotenoides en μg .

y = volumen de la solución (mL) que da una absorbancia de A en una longitud de onda específica.

$A\%_{cm}$ = coeficiente de absorción del carotenoide en el disolvente usado, según especificaciones (Para éter de petróleo es 2592) (Rodríguez, 1999).

7.3.3 Identificación y cuantificación

Los extractos obtenidos de carotenoides fueron resuspendidos en 500 μL de acetato de etilo grado HPLC y se filtró a través de una membrana de nylon con poro de 0.45 μm para después ser inyectados en una columna C18 [SUPELCO, SUPELCOSIL™ (25 cm x4.6 mm; 5 μm) LC-18-DB; 58355-U; 65476-03] de HPLC [Perkin Elmer Binary LC pump 250; series 200 uv/vis Detector].

Se utilizó un sistema de elusión isocrática con acetonitrilo: metanol: acetato de etilo (73:20:7) como fase móvil a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min, y la lectura se hizo a

450 nm, durante 70 min. (Rodríguez, 1999). Cada pico fue comparado con los estándares respectivos.

7.4 Determinación de fenoles

7.4.1 Extracción de fenoles libres

Se agregó 8 mL de etanol al 80% a 2 g de muestra, agitando durante 10 min a 200 r.p.m. La mezcla se centrifugó a 13000 r.p.m a 4°C durante 10 min. Los sobrenadantes fueron separados por decantación, colocándolo en un frasco ámbar. El sedimento se resuspendió en otros 8 mL de etanol al 80%, repitiéndose los pasos anteriores. De tal manera, que se obtuvo un segundo sobrenadante, sin juntar el primero con el segundo, se almacenaron en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su análisis. El sedimento del chile se guardó en atmósfera de nitrógeno y en refrigeración (Kafui, 2002). Se juntaron tres extracciones de cada muestra para obtener una mayor concentración. Las muestras fueron selladas en una atmósfera de nitrógeno y almacenadas en congelación hasta el momento de su análisis en oscuridad.

7.4.2 Extracción de fenoles conjugados

Se tomaron 0.5 mL de los extractos de los fenoles libres para ser digeridos con NaOH 2M por 1 h en atmósfera de nitrógeno, posteriormente se neutralizó la solución con HCl. Después, la mezcla se lavó 5 veces con 3 mL. de acetato de etilo. La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno, protegiéndolos de la luz. Referencia.

7.4.3 Extracción de fenoles enlazados

Se pesaron 4 mg del sedimento obtenido de la extracción de fenoles libres, agregándoles 6 mL de hidróxido de sodio 2N dejando reposar. Posteriormente, se neutralizó la reacción con HCl 5M. Después se realizaron 3 lavados con 10 mL de hexano para remover lípidos. La solución final se lavó 5 veces con acetato de etilo. Los extractos se evaporaron a sequedad con nitrógeno referencia).

7.4.4 Cuantificación de fenoles de los extractos empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu

A 100 µL de cada extracto se le adicionó 0.75 mL del reactivo Folin Ciocalteu diluido 10 veces con agua destilada, la mezcla se dejó reposar durante 5 min en ausencia de luz. Después de este tiempo se agregó 0.75 mL de solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en una concentración de 60 g/L, para neutralizar la reacción. Se dejó reposar

durante 90 min y se leyó a una absorbancia de 725 nm. El resultado de la concentración fue expresado como equivalentes de ácido ferúlico. (Sun y col. 2007)

7.4.3 Identificación y cuantificación de fenoles por HPLC.

La identificación y cuantificación se llevó a cabo empleando una columna C18 [SUPELCO, SUPELCOSIL™ (25 cm x 4.6 mm; 5 µm) LC-18-DB; 58355-U; 65476-03] de HPLC [Perkin Elmer Binary LC pump 250; series 200 uv/vis Detector] en un sistema binario utilizando como fase móvil una solución de ácido trifluoroacético al 0.1% en agua como Fase A y como Fase B acetonitrilo 100%. Se inyectaron 50 µL de la muestra leyendo los polifenoles a 280 nm. Se empleó un sistema de gradiente de 90-10 de % fase A y % de fase B respectivamente, para finalizar a los 50 min con 55-45 de % fase A y % fase B durante 10 min hasta obtener un gradiente de 60 – 40 en un tiempo final de 60 min a un flujo de 1 mL/min. (Harbaum y col. 2008) Cada pico se comparó con los estándares respectivos.

7.5. Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)

Los extractos evaporados de cada compuesto fueron reconstituídas en éter de petróleo, para carotenoides y en etanol para los compuestos fenólico, de tal manera que se obtuvo una consistencia semisólida de la muestra. Después, las mezclas fueron analizadas en un espectrómetro de infrarrojo por la Transformada de Fourier (FT) (Bruker Vertex 70), utilizando el método de muestreo ATR (Attenuated Total Reflectance), colocando una pequeña cantidad de muestra sobre un cristal de ZnSe, donde la radiación infrarroja se propagó, interactuando con las muestras, obteniendo el espectro correspondiente, el cual, fue un promedio de varios datos. (Versari y col. 2010)

7

7.6. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando la prueba por diferencia de medias de Student-Newman-Keuls, utilizando el software SigmaStat 3.5. Por otra parte, el Análisis de Componentes Principales (PCA) fue empleado para los espectros de FTIR, utilizando el software OPUS QUANT (versión 6.5) y el programa Minitab (versión 14).

7.7 Análisis RAPD

7.7.1 Desinfección de la muestra

Todas las muestras de chile fueron lavadas al chorro de agua, para luego someterlas a siete lavados, los dos primeros con hipoclorito de sodio al 10 y al 30% respectivamente, los siguientes dos lavados se realizaron con etanol al 70% y los últimos tres fueron con agua destilada durante 20 min cada uno. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, las muestras fueron maceradas en morteros y almacenadas a -70°C.

7.7.2 Extracción de ADN

Para la extracción de DNA se empleó el método descrito por Allers y Litchen con algunas modificaciones. Las muestras de chile fueron maceradas en morteros, con ayuda de nitrógeno líquido, obteniendo 100 mg por muestra, adicionando 400 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 200 mM, pH 6.5; EDTA 70 mM, pH 8; NaCl 2 mM; PVP 40 al 2%; metabisulfito de sodio 20 mM; Triton X-100 al 1%; MgCl₂/MgSO₄ 24 mM; espermina al 0.1% y espermidina al 0.1%), previamente calentado a 60°C. La mezcla se agitó e incubó a 60°C durante 60 min, para ser transferidos en hielo y añadiendo 400 µL de PCP al 10% agitando por inversión, se dejó reposar durante 60 min a -20°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 30 min. 400 µL de cada sobrenadante se transfirieron a tubos nuevos, donde se les adicionó 5 µL de RNasa (10 mg/mL) incubando durante 10 min a 37°C. Inmediatamente, los sobrenadantes fueron precipitados por la adición de 200 µL de acetato de amonio 10 M y 600 µL de isopropanol frío; la mezcla se agitó por inversión y se incubó toda la noche a -20°C. Para finalizar, la mezcla se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 30 min a 10°C, el isopropanol se eliminó y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol frío al 70%, seguido por una centrifugación durante 10 min, en las mismas condiciones. Por último el etanol fue eliminado y las pastillas se dejaron secar por 20 min a temperatura ambiente.

Finalmente, la pastilla de DNA fue reconstituida con 200 µL de Tris 10 mM, pH 8. El DNA se precipitó, nuevamente, con 200 µL de PEG 8000 al 30% y 200 µL de NaCl 1.2 M a 4°C durante 60 min. Después, la mezcla se centrifugó durante 30 min a 4000 r.p.m. a 10°C. Los sobrenadantes de PEG fueron eliminados y la pastillas de DNA se lavaron con 1.5 mL de etanol frío al 70%, para pasar por una última centrifugación de 15 min a 4000 r.p.m. El etanol fue removido y la pastillas de DNA se dejaron secar. Las pastillas de ADN fueron reconstituías con 200 µL de Tris 10 mM, pH 8 (Allers y col. 2000)

La pureza del ADN extraído se determinó por espectroscopia (Varian 50Conc), tomando la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm, considerando un ADN de buena calidad aquel que presentó una relación mayor a 1.8. El ADN se cuantificó por su A_{280} , la concentración de ADN se calculó de la siguiente manera: $A_{260} \times \text{dilución de la muestra de DNA} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g/mL de ADN}$ (Sambrock y col. 2001)

7.7.3 Amplificación RAPD

Para la amplificación de ADN se utilizó un termociclador (Bioer XP cycler) bajo las siguientes condiciones: se programó un ciclo de 5 min a 94°C; 40 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 36°C, 2 min a 72°C; y un paso para asegurar la extensión de 10 min a 72°C. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μL , conteniendo buffer de PCR 1X, 50 nM de MgCl_2 , 200 μM de dNTP, 1.5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen Brazil) y 40-100 ng/ μL de los extractos de ADN [Baustista y col. 2010]. Se realizaron cuatro reacciones independientes, utilizando 0.4 μM del oligonucleótido OPE18 (CGGCCCCACGT), ó 0.2 μM del oligonucleótido MFG17 (CGCGTTCTTG), 0.2 μM del oligonucleótido MFG18 (CGGCCCCACGT), ó una mezcla de los oligonucleótidos C51 (ATCAACGTACGT) 0.2 μM y C52 (GTCGACGGACGT) 0.2 μM (Invitrogen) (Hermosillo y col. 2008; Sitthiwong y col. 2005).

Los productos de amplificación de ADN fueron analizados por electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 1.5%, empleando como buffer TAE 1x. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.2 $\mu\text{L/mL}$) de 10 a 15 min, para ser observados con un transiluminador-UV (Stratagene Eagle Eye).

7.574. Construcción de matrices y dendogramas

Las bandas polimórficas y las señales de los cromatogramas obtenidos de las diferentes muestras, fueron consideradas como “presentes” o “ausentes” para la construcción de la matriz de similaridad. Para los cromatogramas, fueron considerados como presentes, sólo las señales por arriba de 40 miliunidades de absorbancia. Se utilizó el método de agrupación UPGMA, determinado por un análisis de agrupación por promedio, empleando el software Paleontological Statistics (PAST) 2.10, tomando en cuenta el coeficiente de similitud de Dice y la distancia Euclideana.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Determinación de tamaño y peso.

El peso de las diferentes variedades de chiles se encontró en un rango de 3 a 46 g. En general, las muestras con mejores características morfológicas (color, tamaño, textura y peso) fueron los que conformaron a región norte, con la excepción de la muestra JV1. La longitud osciló de 4.3 a 9.5 cm, mientras que el ancho se encuentra en un rango de 0.1 a 3.34 cm. Las tres variedades de chile mostraron diferencias en peso y tamaño, con mayor similitud entre la misma especie (Jalapeño y Serrano), así como entre las muestras de áreas cercanas, como Tx, P y V1, que conforman la región centro. Por medio del análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas en peso y ancho entre las variedades, pero no entre el largo de los chiles de la misma especie (Serrano y Jalapeño), sin embargo, se encontraron diferencias entre estos dos con respecto al chile Habanero (diferentes especies), como se puede observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tamaño y peso de las variedades de chile Serrano, Jalapeño y Habanero

Muestra	Procedencia	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Jalapeño	Tamaulipas	46.5 ± 4.1	8.6 ± 0.8	3.4 ± 0.2
	Sinaloa	25.9 ± 3.6	7.3 ± 0.6	2.8 ± 0.2
	Jalisco	33.7 ± 6.1	7.5 ± 0.8	3.2 ± 0.3
	Puebla	25.9 ± 4.2	7.1 ± 1.0	3.0 ± 0.3
	Veracruz 1	31.8 ± 5.5	7.6 ± 0.8	3.0 ± 0.2
	Veracruz 2	45.9 ± 3.6	9.5 ± 0.6	3.3 ± 0.4
	Tlaxcala	33.7 ± 3.2	8.9 ± 0.6	2.9 ± 0.2
Serrano	Tamaulipas	11.2 ± 2.5	6.7 ± 0.8	1.7 ± 0.2
	Sinaloa	12.8 ± 2.8	7.3 ± 0.8	1.9 ± 0.2
	Jalisco	16.4 ± 2.5	9.0 ± 0.9	1.9 ± 0.1
	Puebla	3.8 ± 1.3	7.6 ± 0.9	0.1 ± 0.01
	Veracruz 1	3.0 ± 0.9	6.7 ± 0.5	0.9 ± 0.08
	Veracruz 2	9.6 ± 2.2	7.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1
	Tlaxcala	3.3 ± 0.9	6.5 ± 0.4	0.8 ± 0.1
Habanero	Tamaulipas	8.1 ± 1.3	4.3 ± 0.4	2.6 ± 0.3

Valores correspondientes a la medición de varias piezas de chile

8.2 Determinación de carotenoides totales

El contenido de carotenoides en los chiles frescos varió en un intervalo de 0.083 a 0.99 mg/g en base seca (BS), mientras que para los chiles maduros el rango fue de 0.69 a 13.85 mg/g BS. El contenido de carotenoides se incrementó en el estado maduro, que va de acuerdo al proceso de biosíntesis de pigmentos durante la madurez (Marín y col. 2004). De acuerdo al análisis estadístico, para los chiles frescos se encontraron diferencias significativas entre Jalapeños y Serranos, como se observa en el cuadro 2, mientras que, para los chiles maduros, no se encontraron diferencias entre los tres cultivares, estos resultados se relacionan con la habilidad de los fruto para sintetizar carotenoides durante el proceso de maduración, independientemente de la especie (Collera y col. 2005). De acuerdo a las regiones, se encontraron diferencias entre los chiles Jalapeño frescos de Tx, P y Jc con respecto a V y Si, mientras que para los chiles Serrano frescos, sólo para Jc con T y V2 con Si no se encontraron diferencias significativas. Para los chiles maduros, Los chiles de Si mostraron diferencias con respecto a los de T, P, V1 y V2; por lo tanto, no se encontró una asociación entre las concentraciones de carotenoides y el origen geográfico.

Los resultados anteriores pueden deberse también por las condiciones ambientales, tales como la temperatura, la humedad relativa, el tipo de suelo, etc., por lo tanto, la proximidad entre las diferentes regiones geográficas.

Cuadro 2. Contenido de carotenoides en muestras de chile

Muestra	Contenido de carotenoides (mg/g BS ¹)	
	Fresco	Maduro
J T	n.d. ²	3.059 ± 0.17
J Si	0.359 ± 0.32	2.0917 ± 0.72
J P	0.998 ± 0.13	2.488 ± 0.06
J V1	0.128 ± 0.02	2.682 ± 0.31
J V2	0.161 ± 0.004	0.711 ± 0
J Tx	0.943 ± 0.03	1.317 ± 0.2612

S T	n. d.	0.696 ± 0.16
S Si	0.083 ± 0.01	13.850 ± 3.11
S Jc	0.935 ± 0.14	5.690 ± 0.11
S P	0.520 ± 0.07	0.792 ± 0.25
S Tx	0.889 ± 0.26	6.444 ± 1.09
H T	n. d.	0.730 ± 0.27

¹ base seca,

² no disponible

Jalapeño: (J); Serrano (S); Habanero (H); Tamaulipas (T); Sinaloa (Si); Jalisco (Jc);
Puebla (P); Veracruz (V); Tlaxcala (Tx)

8.2.1 Identificación y cuantificación de carotenoides

Entre los carotenoides identificados se encontraron luteína, β -criptoxantina, licopeno y β -caroteno, con una mayor concentración de luteína y licopeno, estos últimos compuestos forman parte de los principales carotenoides presentes en el chile (Zhang y col. 2003; Marín y col. 2004). Las concentración de Luteína se mantuvo constante para los chiles Jalapeño, mientras que disminuyó en los Serrano, como lo observado entre los chiles maduros y frescos. Sin embargo, ha sido reportado que la luteína desaparece en el estado maduro debido a la síntesis de pigmentos en los cromoplastos (Deepa y y col. 2007), así, muchos de los carotenoides hidroxilados son progresivamente esterificados con ácidos grasos. (Matsufuji y col. 2007). Por otra parte, el licopeno tiende a disminuir con la maduración, a diferencia de la β -criptoxantina y el β -caroteno, los cuales incrementan en el estado maduro, debido a que durante el proceso de maduración, el contenido total incrementa cuatro veces, como lo reportado por Marin y col. 2004.

De acuerdo al análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas para los chiles frescos en concentraciones de luteína, licopeno y β -criptoxantina entre los cultivares Jalapeño y Serrano, sin embargo, se encontraron diferencias en el contenido de β -caroteno, compuesto principal en diferentes variedades de *C. annuum* L. (Colleray col. 2005). Mientras que para los chiles maduros, solo hubo diferencias en las concentraciones de luteína y licopeno entre los chiles Serrano y Jalapeño, como se puede observar en el cuadro 3.

Cuadro 3. Intervalo de las concentraciones de diferentes carotenoides en las distintas variedades de chile

Muestra	Contenido de carotenoides ($\mu\text{g/g BS}^1$)			
	Luteína	Licopeno	β -criptoxantina	β -caroteno
Jalapeño				
Fresco	243.4 – 512.1	259.9 – 512.1	42.8 – 47.1	188.6 – 394.7
maduro	157.9 – 868.4	157.9 – 868.4	37.8 – 115.1	8.2 – 496.6
Serrano				
fresco	102.6 – 728.9	102.6 – 728.9	7.1 – 164.5	62.5 – 523.0
maduro	77.8 – 486.3	199.6 – 486.3	44.0 – 70.1	76.0 – 485.3
Habaneros				
maduro	37.5	37.5	55.9	62.7

¹ Base seca.

Promedios obtenidos por triplicados

Para el perfil de los carotenoides se encontró que la mayoría de las muestras de chiles verdes Jalapeño, se presenta un patrón similar, sin embargo, los de Tx mostraron una señal en el minuto 9, que en los chiles de Si no se presentó, como se muestra en la figura 5 y entre los chiles serranos se presenta el mismo caso, con una señal en el minuto 19 en la muestra de Veracruz 2, que no se aprecia en la de Jc. Ahora bien, haciendo una comparación entre variedades, encontramos un perfil similar, donde el compuesto no identificado, alrededor del minuto 14 se hace presente en todos los casos, pero parece haber una mejor definición de los picos con una mayor concentración en los chiles Jalapeño.

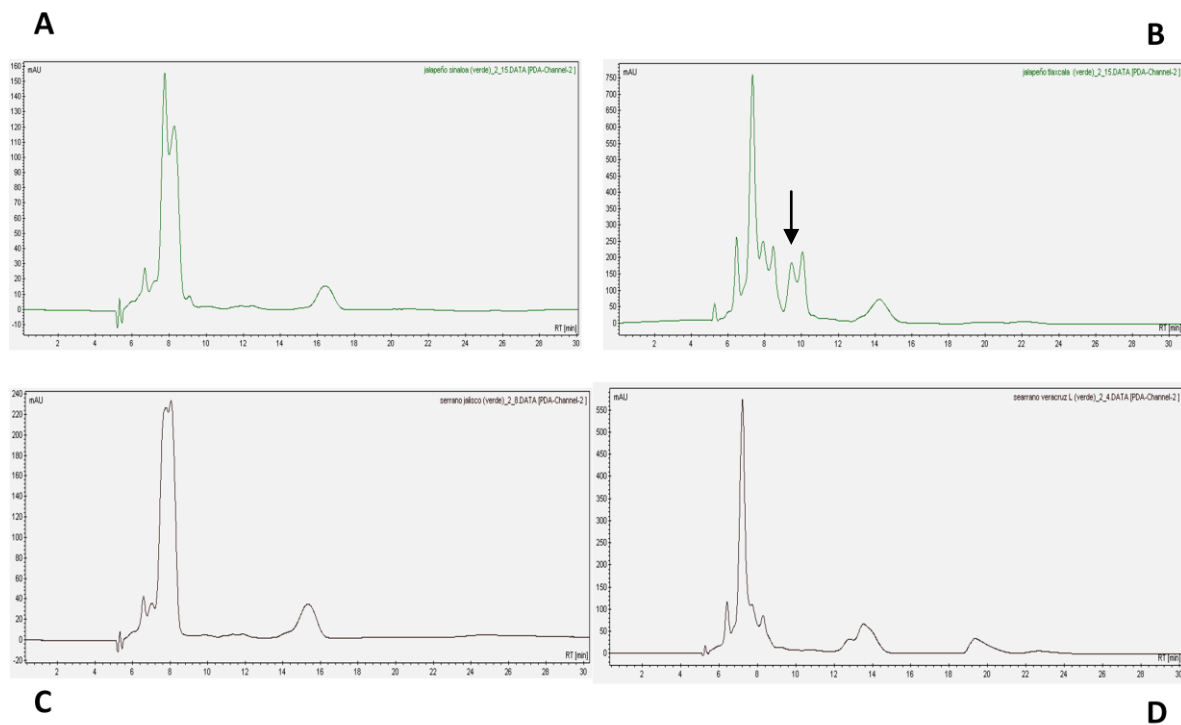


Figura 5. Cromatogramas del perfil de carotenoides en chiles verdes. Panel A: JSi, Panel B: JTx, Panel C: SJc y Panel D: SV2

Por otra parte, de acuerdo a los cromatogramas de los chiles maduros (Figura 6) el perfil de carotenoides en las tres variedades de chiles es semejante, con mejor definición de picos en los Jalapeño.

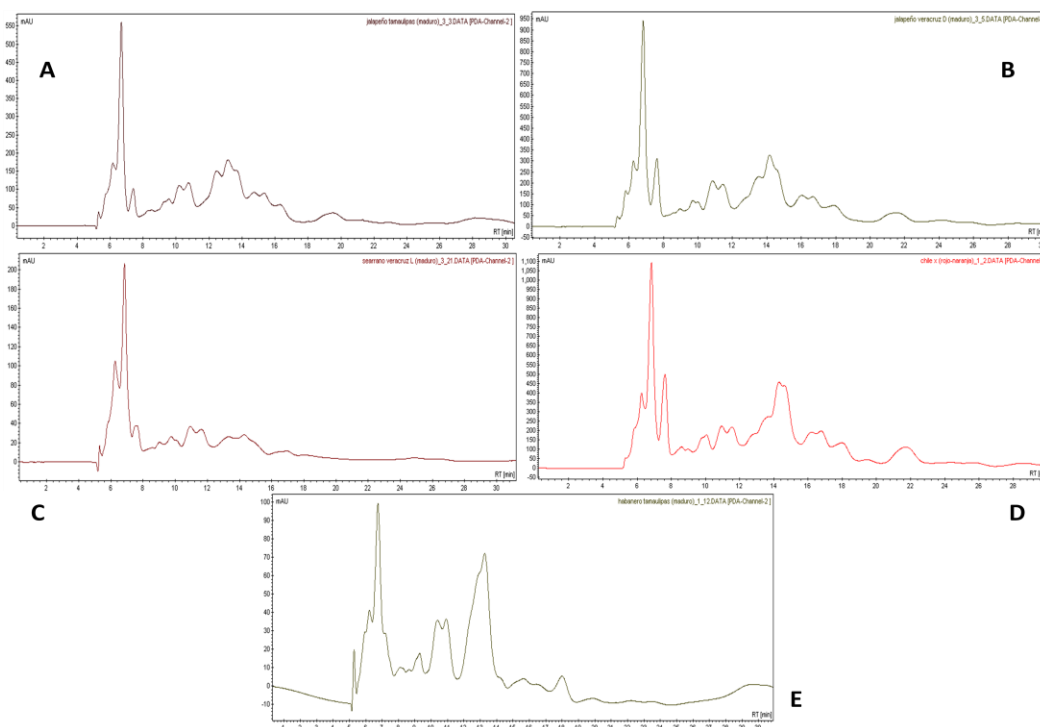


Figura 6. Cromatogramas del perfil de carotenoides en chiles maduros. Panel A: JT, Panel B: JV1, Panel C: SV1, Panel D: STx y Panel E: HT

8.3 Determinación de fenoles

8.3.1 Fenoles libres

La concentración de compuestos fenólicos en chiles frescos osciló entre 30.2 a 128.4 mg/g, mientras en los chiles maduros este rango se encontró entre 38.6 a 297.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, BS. En la mayoría de las muestras se observa un notable incremento cuando los chiles maduran, que coincide con los resultados de Deepa y col. 2007, aunque en otros estudios como los de Oboh y col.2007 y Zhang y Hamauzu reportan que el contenido de compuestos fenólicos es mayor en los chiles frescos en comparación con los maduros. Dado lo anterior, los principales factores que intervienen en la en contenido de fenoles son el estado de maduración, así como la edad de la planta, según lo reportado por Deepa y col. 2007

Cuando se comparó el contenido de fenoles entre las variedades, se encontraron diferencias significativas entre los chiles Serrano y Jalapeño verdes y maduros. No se encontraron diferencias entre las especies de chile, es decir, entre los Serranos y Jalapeños, con respecto a los Habaneros, estos resultados, no concuerdan con lo

reportado por Oboh y col. 2007, donde el contenido de fenoles fue significativamente mayor en la especie *C. annuum* L. que para la especie *C. Chinense* Jacq.

Con respecto a la región, se encontraron diferencias en la mayoría de los chiles Jalapeño verdes, excepto entre P y V, V1 y V2 y entre Si y Jc; mientras que para los chiles Serrano las diferencias se encontraron entre Tx y P con respecto a Jc y V2. Para las muestras maduras la región no mostró relevancia, como se puede observar en el cuadro 4. Dado los resultados anteriores, ciertos patrones indicaron diferencias entre variedades y otros entre cultivares, como lo reportado por Antonious y col.2006 quien encontró diferencias significativas entre cultivares de *C. baccatum* L. y *C. chinense* Jacq, y entre dos genotipos de la última variedad.

Cuadro 4. Contenido de fenoles libres en las variedades de chile

Muestra	Equivalentes de ácido ferúlico ($\mu\text{g/g BS}^1$)	
	Fresco	Maduro
JT	n. d. ²	38.6 ± 0.9
JSi	128.4 ± 1.1	67.5 ± 5.9
JJ	121.4 ± 15.6	61.4 ± 0.0
JP	44.4 ± 2.1	94.0 ± 4.0
JV1	37.0 ± 0.7	72.8 ± 1.1
JV2	30.2 ± 1.3	66.8 ± 2.1
JTx	62.8 ± 2.2	72.1 ± 0.8
ST	n. d.	108.0 ± 19.2
SSi	55.7 ± 1.2	67.3 ± 2.7
SJc	42.1 ± 5.2	297.8 ± 26.2
SP	60.3 ± 0.8	167 ± 48.9
SV1	48.8 ± 7.4	79.9 ± 8.1
SV2	43.1 ± 5.4	60.8 ± 2.1
STx	63.6 ± 3.2	83.2 ± 3.5
HT	n. d.	89.5 ± 1.5

¹ base seca, ² no disponible Jalapeño: (J); Serrano (S); Habanero (H); Tamaulipas (T); Sinaloa (Si); Jalisco (Jc); Puebla (P); Veracruz (V); Tlaxcala (Tx)

8.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Los compuestos fenólicos encontrados en las muestras de chile fueron el ácido gálico, protocatecuico, ferúlico, *o*-cumárico, *p*-cumárico, sinápico, trans-cinámico y caféico,

quercetina, catequina, rutina y vainillina; muchos de estos compuestos pertenecen a la vía de los fenilpropanoides, característica de las especies de Chile.

8.4.1. Fenoles Libres

Se encontraron diferencias significativas entre los chiles Jalapeño y Serrano en el contenido de ácido gálico y *p*-cumárico, independientemente del estado de maduración; mientras que para el ácido protocatecuico y caféico, catequina y vainillina sólo se encontraron diferencias en los chiles frescos. Entre estados de maduración, se encontraron diferencias entre las dos variedades en el contenido de ácido trans-cinámico, como se puede observar en el cuadro 5.

De acuerdo al lugar de origen, entre los chiles Jalapeño verdes se encontraron diferencias en el contenido de ácido sinápico, donde Si difiere del resto, ambas muestras de V presentaron diferencias en el contenido de catequina con respecto a P y Tx, a pesar de que pertenecen a la región centro; para el contenido de ácido *p*-cumárico P mostró diferencias con respecto a V1, Tx y Si. Por otro lado, los chiles Serrano verdes presentaron diferencias en la concentración de ácido gálico para las muestras de Si con respecto a P y V, para el contenido de ácido protocatecuico, P fue diferente al resto de las muestras, al igual que V2 para el contenido de ácido caféico y rutina. Finalmente, la mayoría de las regiones mostraron diferencias en el contenido de ácido *p*-cumárico, excepto entre V2 y P y Si; V1 con Jc y Tx; P con Si y Jc con Tx.

Para los chiles maduros, se encontró que los Jalapeño de T mostraron diferencias con respecto a los de Si, en el contenido de ácido gálico y con respecto a V1 en ácido protocatecuico, mientras que los chiles Serrano no presentaron diferencias.

Tomando en cuenta el estado de maduración, las diferencias encontradas entre los chiles verdes y maduros fue en concentraciones de ácido gálico, protocatecuico, trans-cinámico y *p*-cumárico, así como en quercetina, rutina y vainillina. Para el resto de los compuestos no se encontraron diferencias.

Dentro de los chiles jalapeño, se encontraron diferencias en el contenido de ácido gálico, mientras que para el ácido ferúlico no, tomando en cuenta el estado de maduración. Entre los chiles maduros no se observaron diferencias entre las tres variedades en

concentraciones de ácido protocatecuico, caféico y catequina, mientras que para las muestras frescas las diferencias fueron en el contenido de ácido *p*-cumárico, catequina y vainillina.

Dado lo anterior, los resultados encontrados muestran diversas variaciones entre las tres variables y concentraciones. Algunas interacciones pueden ser explicadas por la proximidad del área geográfica, como en el caso de P, Tx y V, otros pueden ser debido a las condiciones de cultivo de cada región, así como por el genotipo de Chile. Silva y col. 2006 investigó el contenido de rutina en un fruto medicinal de Brasil y encontró una alta variabilidad en concentraciones, así como en genética, explicando que puede estar asociada no sólo a las diferencias genéticas, sino también a las condiciones ambientales, tal como pudo haber sucedido en nuestro estudio.

Cuadro 5. Contenido de compuestos fenólicos libres en las muestras de Chile

Muestra	Contenido de compuestos fenólicos (M*)					
	Ácido Gálico	Ácido protocatecuico	Ácido Ferúlico	Ácido <i>o</i> -cumárico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido Sinápico
Jalapeño fresco	0.15 – 0.18	0.06 – 0.33	0.31 – 0.81	0.58 – 3.05	0.05 – 0.42	0.14 – 0.78
maduro	35.8 – 2783.2	0.40 – 1.36	0.10 – 1.13	0.80 – 5.40	1.82 – 6.93	0.07 – 0.64
Serrano fresco	1.84 – 9.27	0.10 – 0.18	0.04 – 0.47	0.54 – 2.77	0.04 – 0.57	0.07 – 0.55
maduro	0.36 – 8.68	0.10 – 1.21	0.019 – 0.47	0.67 – 2.22	0.59 – 4.13	0.05 – 0.79
Habanero maduro	0.98	0.004	0.13	0.71	0.25	8.55
	Ácido trans-cinámico	Ácido cafeico	Quercetina	Catequina	Rutina	Vainillina
Jalapeño fresco	0.12 – 0.68	0.09 – 0.42	0.15 – 0.18	3.72 – 22.1	0.01 – 0.16	0.03 – 0.36
maduro	0.09 – 1.53	0.08 – 0.41	0.23 – 1.35	5.8 – 7.96	0.31 – 0.74	0.03 – 2.84
Serrano fresco	0.02 – 0.35	0.04 – 1.22	0.10 – 0.28	0.84 – 7.35	0.04 – 0.31	0.13 – 0.83
maduro	0.16 – 0.76	0.03 – 1.30	0.10 – 1.08	1.79 – 15.85	0.03 – 0.77	0.20 – 0.57
Habanero maduro	1.25	0.55	0.15	1.80	0.03	0.65

En cuanto a la identificación de los fenoles libres, podemos observar en las siguientes figuras los cromatogramas de algunas de las muestras de Chile fresco, mostrando que los perfiles de los chiles, independientemente de la variedad se asemejan, presentando ocho picos principales, difiriendo en la señal que aparece entre el minuto 55 y 60, donde algunas muestras de Chile Jalapeño y otras de Chile Serrano la presentan y otras, de ambos chiles no, sin relación a la variedad o la zona de procedencia.

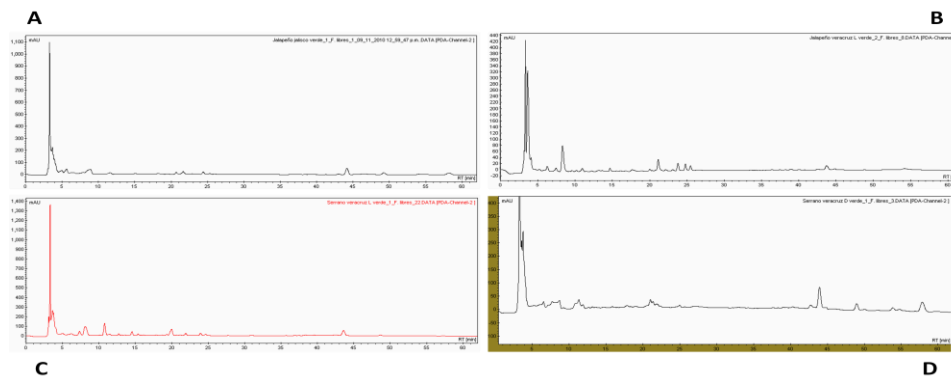


Figura 7. Cromatogramas del perfil de fenoles libres en chiles verdes. Panel A: JJc, Panel B: JV2, Panel C: SV2y Panel D: SV1

Para los chiles maduros podemos observar, en la figura 8 que la señal del minuto 55-60, aparece en todas las muestras, dejando claro que este compuesto sin identificar se hace presente de una manera más clara, cuando el fruto ya está maduro. También podemos observar un mismo patrón para todos los chiles Jalapeño, al igual que para los chiles Serrano y entre estos, sin embargo entre especies, notamos que el chile Habanero muestra en el minuto 25 una señal que el resto de los chiles a penas y puede apreciarse, identificándolo como ácido trans-cinámico.

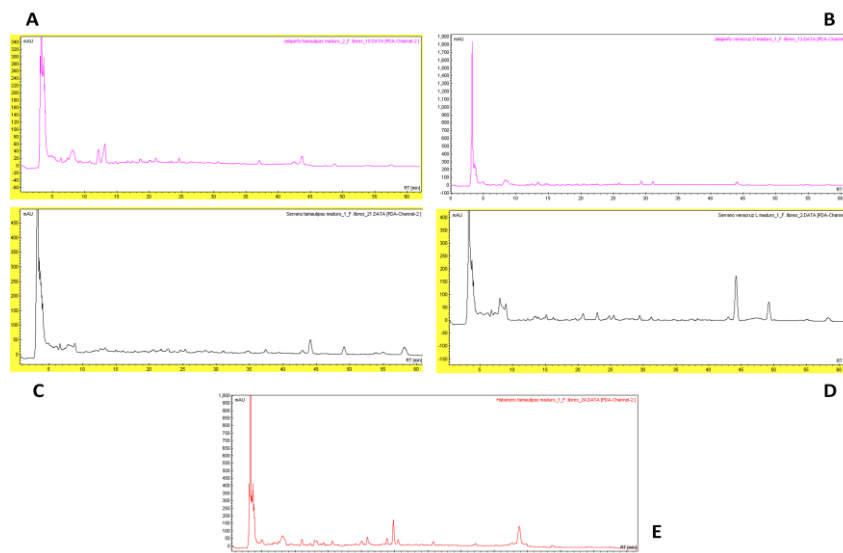


Figura 8. Cromatogramas del perfil de fenoles libres en chiles maduros. Panel A: JT, Panel B: JV1, Panel C: ST, Panel D: SV1y Panel E: HT

8.5. Análisis por espectroscopía de infrarrojo

8.5.1. Carotenoides

De acuerdo a lo reportado por Moh M y col. 1999., la absorción infrarroja debida al β -caroteno en vegetales se presenta aproximadamente en la región de $920-980\text{ cm}^{-1}$ y de acuerdo a los espectros obtenidos de las muestras de los extractos de carotenoides en chiles, los cuales se presentan en la figura 9:

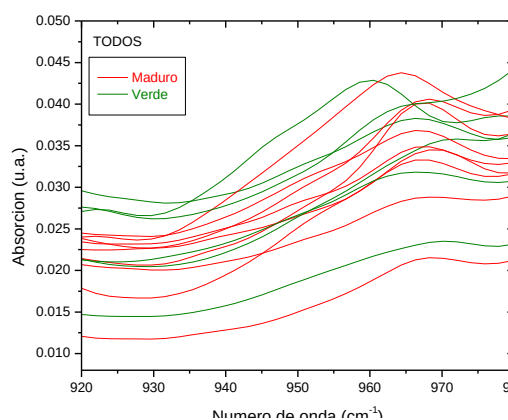


Figura 9. Espectros de los extractos de carotenoides de las muestras de chile, de acuerdo, de acuerdo a la región de β -caroteno.

De todas las muestras analizadas, quince muestras solamente fueron las que mostraron una concordancia y una tendencia predictiva lógica, al ser analizados quimiométricamente por el método PLS, a continuación se presenta la predicción FTIR del contenido de β -caroteno en chile usando como referencia los valores determinados mediante UV-visible ($R^2=0.986$)

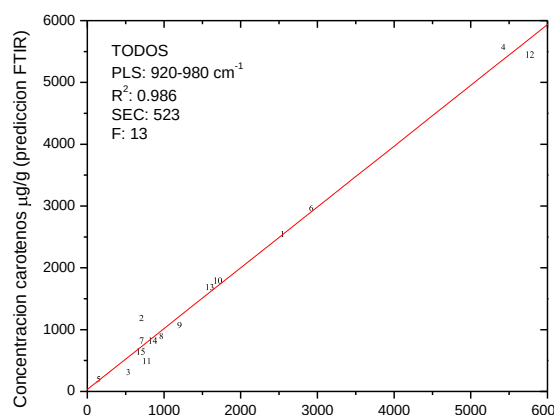


Figura 10. Gráfica de la predicción FTIR del contenido de β -caroteno en chile usando las concentraciones de UV-visible mediante PLS

De acuerdo con los resultados anteriores, no se logró obtener una agrupación por tipo de chile, ni por estado de maduración, ni por región geográfica, por lo que hace falta realizar un análisis de componentes principales, para ver si se logra una identificación y/o agrupación de los extractos de las muestras por alguna de las variables estudiadas

8.5.2 Compuestos Fenólicos

Los movimientos moleculares de la mayoría de las moléculas emitieron bandas de absorción únicas y superpuestas en la región por debajo de 1750 cm^{-1} números de onda del espectro infrarrojo. La figura 11 muestra los espectros típicos ($600 - 2000\text{ cm}^{-1}$) de los extractos fenólicos de las diferentes muestras de chile. Estos espectros no mostraron una clara diferencia entre las muestras, sin embargo, después de aplicar el análisis de componentes principales para la segunda derivada, se encontraron cuatro agrupaciones, en la primera las muestras de P aparecen con un eje de variación paralelo al segundo grupo de Tx, y V, que tuvieron características químicas similares, mientras que las muestras de Si y T fueron capaces de asociarse pero de manera perpendicular a las muestras anteriores y las muestras de Jc, por lo que los otros tres están relacionados entre sí pero no mostraron diferencias con el primero.

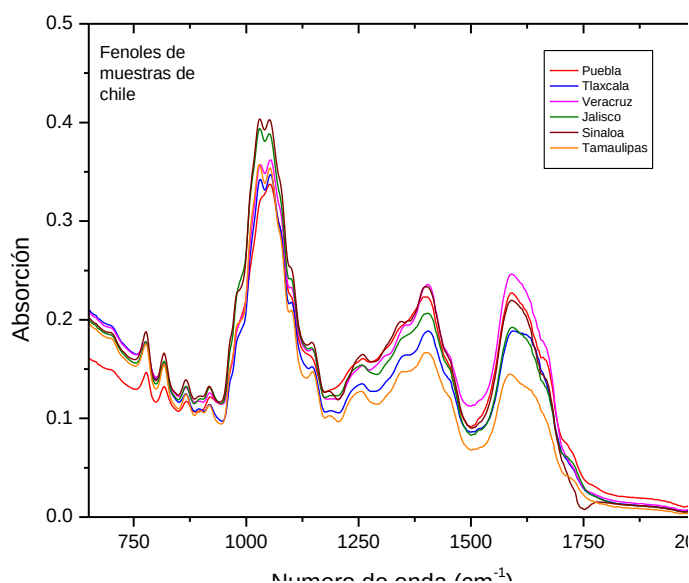


Figure 11. Espectros de FTIR de compuestos fenólicos en las muestras de chile

Las asociaciones encontradas se relacionan con la localización geográfica, donde Tx, V y P se encuentran muy cerca entre sí, mientras que Si y T pertenecen a la zona norte y Jc

se encuentra cercano a Si, por lo tanto, se puede decir que las condiciones ambientales, así como las condiciones de cultivo de cada área, determinan la concentración de compuestos fenólicos en chile. Los grupos de los resultados por PCA con respecto a la zona geográfica se muestran en la figura 12.

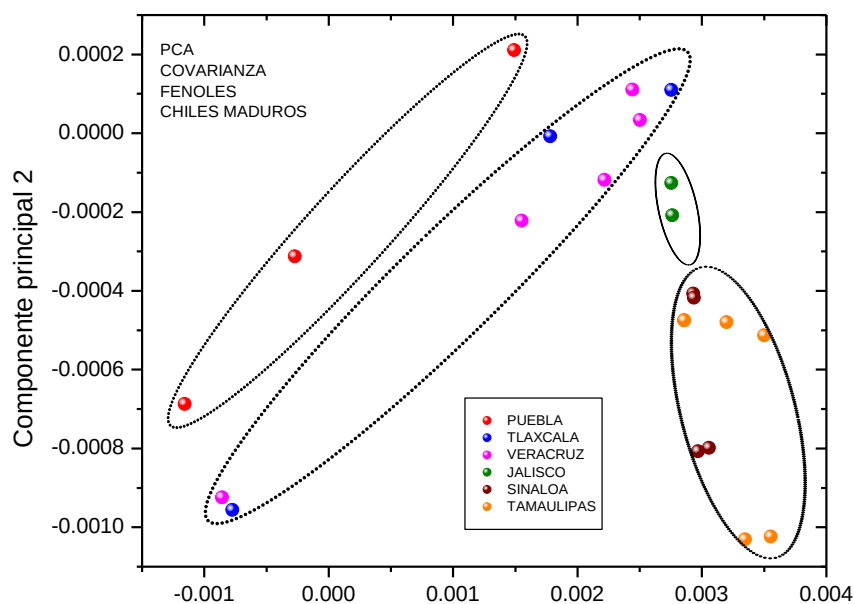


Figure 12. Análisis de PCA de los compuestos fenólicos en las muestras de chile, agrupados por región

De esta manera, al unir estos resultados con el contenido total de fenoles y por medio de la cromatografía, como en concentraciones de ácido trans-cinámico, gálico p-cumárico, protocatecuico, quercetina y catequina, se encontró una misma asociación entre las muestras procedentes de P, Tx y V.

8.6 Análisis RAPD

Entre los oligonucleótidos probados, el iniciador OPE-18 fue el que presentó mayor polimorfismo, generando un total de 15 a 18 bandas. Por otra parte, con las reacciones llevadas a cabo con los oligonucleótidos MFG-17 y MFG-18 y la mezcla de C51 y C52 se obtuvieron un total de 25 y 17 bandas, respectivamente. Ahora bien, independientemente de los iniciadores empleados las muestras de chile Jalapeño y Serrano mostraron perfiles de RAPD similares., mientras que las muestras de chile Habanero presentaron un perfil particular, con 3 ó 4 bandas en común. La mayoría de las bandas fueron polimórficas,

aunque e llegaron a observar algunas bandas monomórficas, como la 18, mostrada en la figura 13.

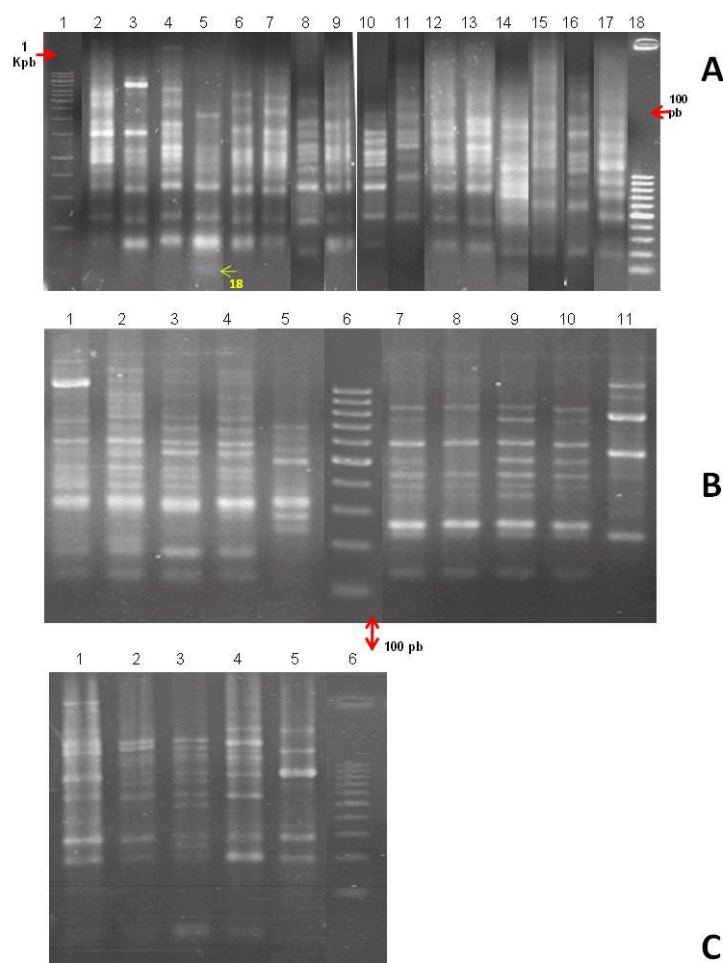


Figura 13. Perfil de RAPD de los chiles Serrano, Jalapeño y Habanero. Panel A: oligonucleótido OPE-18. 1 y 18: marcadores de ADN de 1000 y 100 bp, respectivamente; 2: J T; 3 y 4: J Si; 5: J J; 6: J P; 7: J V1; 8: J Tx; 9: J V2; 10: S Tx; 11: S T; 12: S Si; 13: S J; 14: S P; 15: S V1; 16: S V2; 17: H T. Panel B: oligonucleótido MFG-17 (derecha) y MFG-18 (izquierda): 1 y 7, JSi; 2 y 8, JV1; 3 y 9, STx; 4 y 10, ST; 5 y 11, HT; 6, marcador de ADN de 100 bp. Panel C: mezcla de los oligonucleótidos C51 y C52: 1, JSi; 2, JV1; 3, STx; 4, ST; 5, HT; 6, marcador de ADN de 100 pb.

A partir de las matrices construidas se generaron dos dendogramas, el primero se obtuvo con el iniciador OPE-18 ($r=0.80$), que proporcionó mayor información, donde encontramos que las muestras de la especie *C. chinense* Jacq. (chile Habanero) se lograron agrupar

claramente de las muestras de *C. annuum* L. (chiles Jalapeño y Serrano), confirmando con un coeficiente de 2.60, por medio de la distancia Euclidiana claras diferencias entre los perfiles de RAPD, como se puede observar en la figura 14.

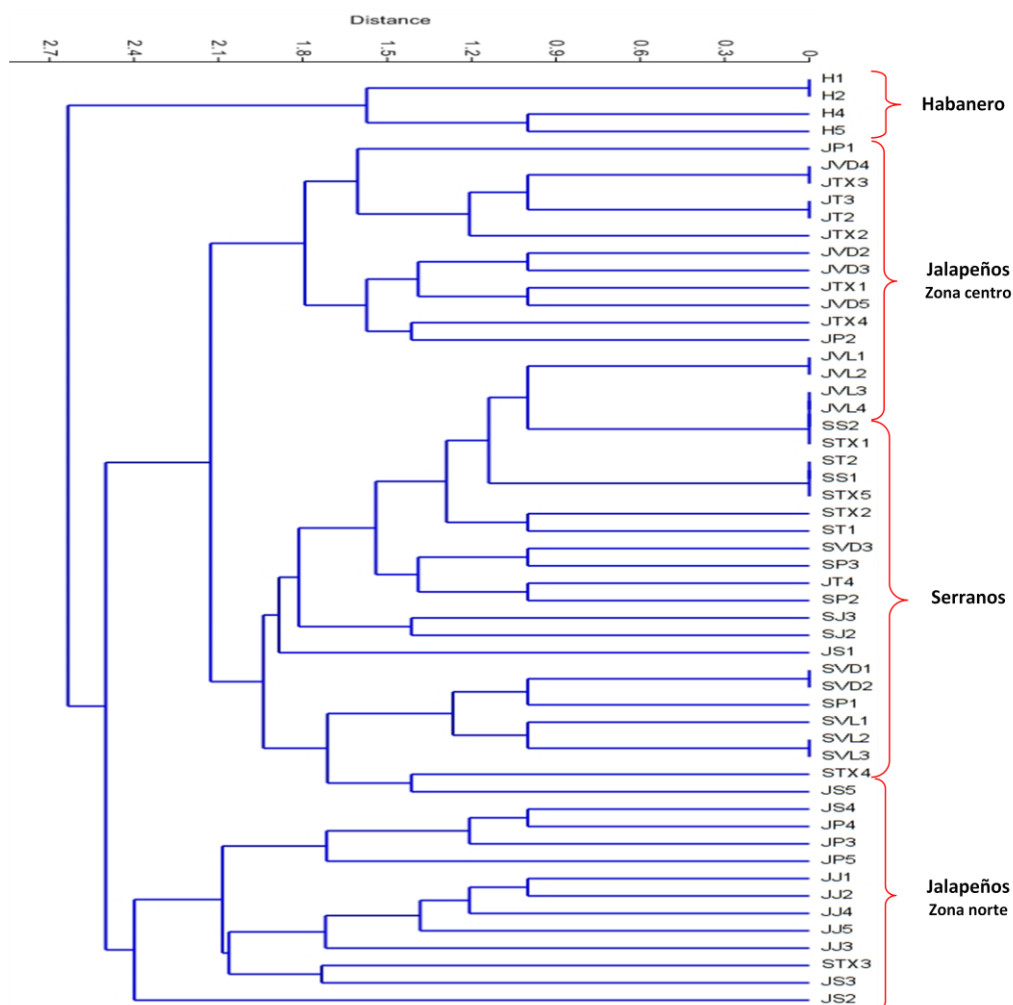


Figura 14. Dendrograma de *C. annuum* L. (chiles Jalapeño y Serrano) y *C. chinense* Jacq. (chiles Habanero) basado en los marcadores de RAPD OPE-18, por medio de la distancia Euclidiana.

Básicamente todas las muestras se concentraron en 4 grupos: el primero conformado por los chiles Habanero, el segundo por los chiles Serrano y dos grupos de chiles Jalapeño; un grupo donde la mayoría de las muestras pertenecen a la zona centro y otro donde las muestras, en su mayoría proceden de la zona norte.

El segundo dendograma ($r=0.99$) se obtuvo con los cuatro iniciadores restantes donde podemos observar en la figura 15, que se mantiene la misma separación entre especies, agrupando por un lado los chiles habaneros y por otro a los chiles Jalapeño y Serrano, con un coeficiente de Dice de 0.3, sin embargo, en este análisis se pierden la clara separación entre las variedades de la misma especie, es decir, no se logran separar los chiles Jalapeño de los chiles Serrano.

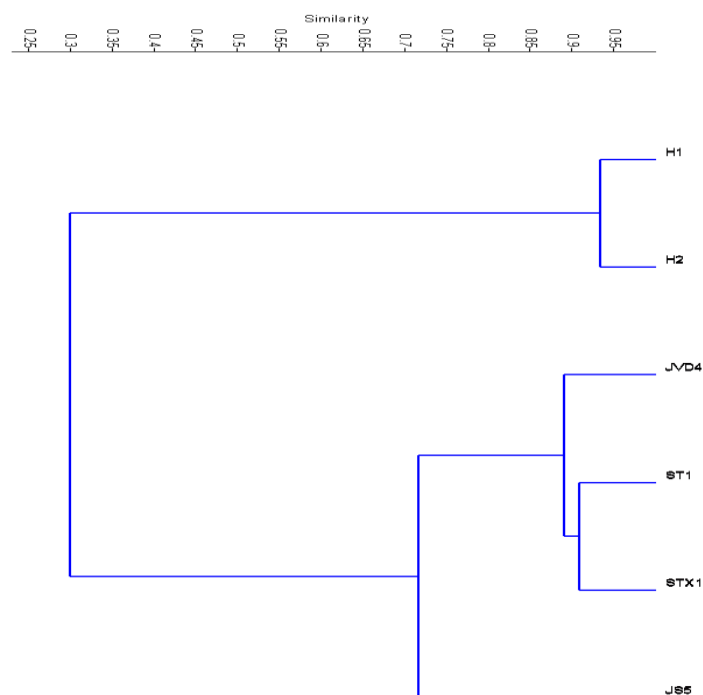


Figura 15. Dendograma de *C. annum* L. (chiles Jalapeño y Serrano) y *C. chinense* Jacq. (chiles Habanero) basado en los marcadores de RAPD MFG18, MFG17, C51 y C52, por medio del coeficiente de Dice.

Un análisis previo de RAPD, usando 10 muestras de germoplasma de *C. annum* L. provenientes de Tailandia, mostraron una mayor diversidad de perfiles de RAPD que las muestras provenientes de México (Sitthiwong y col. 2005). También, otro análisis de diversidad por medio de RAPD de muestras de *C. annum* de la variedad “Cuneo” originarias del noroestes de Italia, permitieron diferenciar cinco poblaciones (Lanteri y col. 2006). Posiblemente, el limitado perfil de diversidad y la alta similitud observada en las dos variedades mexicanas estudiadas pueden ser explicadas por una presión en la selección de los especímenes derivados de prácticas culturales y a intereses comerciales. Evidentemente, la técnica de RAPD confirmó la gran diversidad morfológica observada

entre las variedades de *C. annuum* L. a lo largo del mundo, pero es necesario realizar un estudio extensivo de diversidad molecular intraespecífica y genética de población incluyendo más variedades de *C. annuum* L. de diferentes regiones del mundo.

8.7. Análisis Genético con perfiles cromatográficos

8.7.1 RAPD OPE-18 con carotenoides

El dendograma correspondiente (Figura 16) al perfil cromatográfico de fenoles y RAPD, OPE-18 de los chiles verdes no muestra una clara agrupación entre las variedades de chile, sin embargo se puede observar una división de los chiles jalapeños en la parte superior y de los serranos en la parte inferior, sin embargo, alguna muestra SSi se interpone con los chiles Jalapeños y la muestra JTx se mezcla con los chiles Serrano, mientras que la muestra JSi se separa del resto con un coeficiente de 0.49. Por todo lo anterior, se hace difícil observar con claridad una identificación y diferenciación de las muestras.

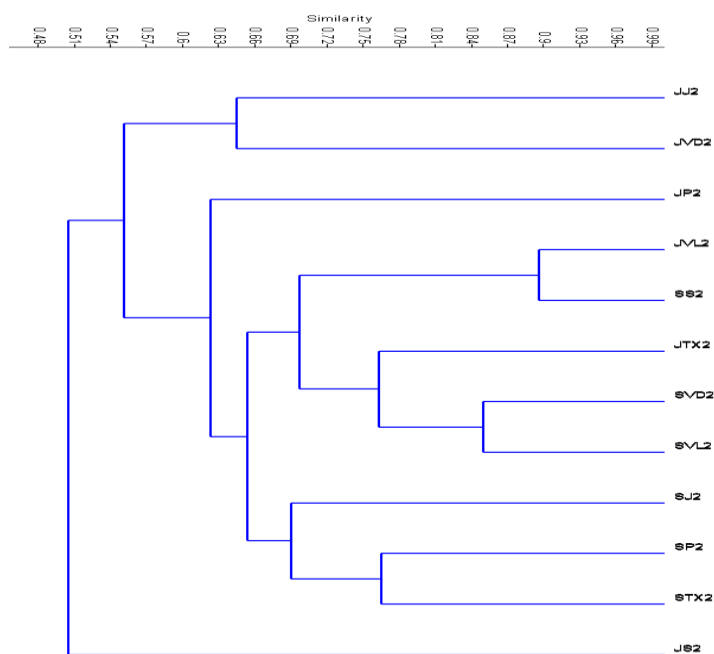


Figura 16. Dendograma de chiles Jalapeño, Serrano y Habanero, considerando la presencia/ausencia de fragmentos polimórficos por el método RAPD, utilizando el oligonucleótido OPE-18 y el perfil cromatográfico de carotenoides en chiles verdes

Por otro lado, de acuerdo al dendograma acoplado de la amplificación de RAPD con el iniciador OPE-18 y los perfiles cromatográficos de carotenoides en chiles maduro ($r=0.69$), mostrado en la figura 17, se puede observar que la separación entre los chiles Habanero con respecto a los chiles Jalapeño y Serrano sigue permaneciendo, como cuando se utilizó sólo los marcadores moleculares, este resultado, quizá pudiera estar influenciado sólo por los marcadores de RAPD, ya que los dendogramas donde se incluyen únicamente los perfiles cromatográficos no mostraron esta separación, sin embargo, también estos resultados pueden dar la pauta para pensar que los carotenoides pudieran estar cercanamente asociados a los marcadores moleculares, específicamente OPE-18, ya que esta diferenciación entre especies en muestras de chile maduro no ocurrió con el análisis de los compuestos fenólicos, aunque no fue posible identificar entre las variedades de una misma especie o bien, entre regiones, como con los marcadores moleculares, como en el trabajo de Amorim y col. 2009 donde el contenido de carotenoides y el uso de marcadores moleculares en diferentes genotipos de plátanos, apporto información importante en la selección de parentesco por cruce entre diferentes genotipos con el fin de desarrollar nuevas variedades con propiedades funcionales.

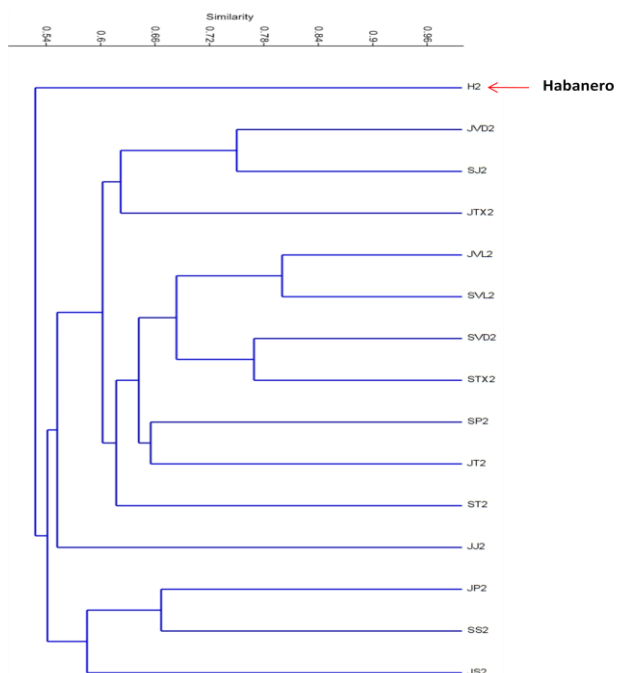


Figura 17. Dendograma de chiles Jalapeño, Serrano y Habanero, considerando la presencia/ausencia de fragmentos polimórficos por el método RAPD, utilizando el oligonucleótido OPE-18 y el perfil cromatográfico de carotenoides en chiles maduros

8.7.2 RAPD OPE-18 con compuestos fenólicos

Al analizar los resultados obtenidos de la unión de los perfiles cromatográficos de los compuestos fenólicos, tanto en chiles maduros como en frescos, con el perfil genético no se logro identificar, ni agrupar las muestras, como se puede observar en la siguiente figura:

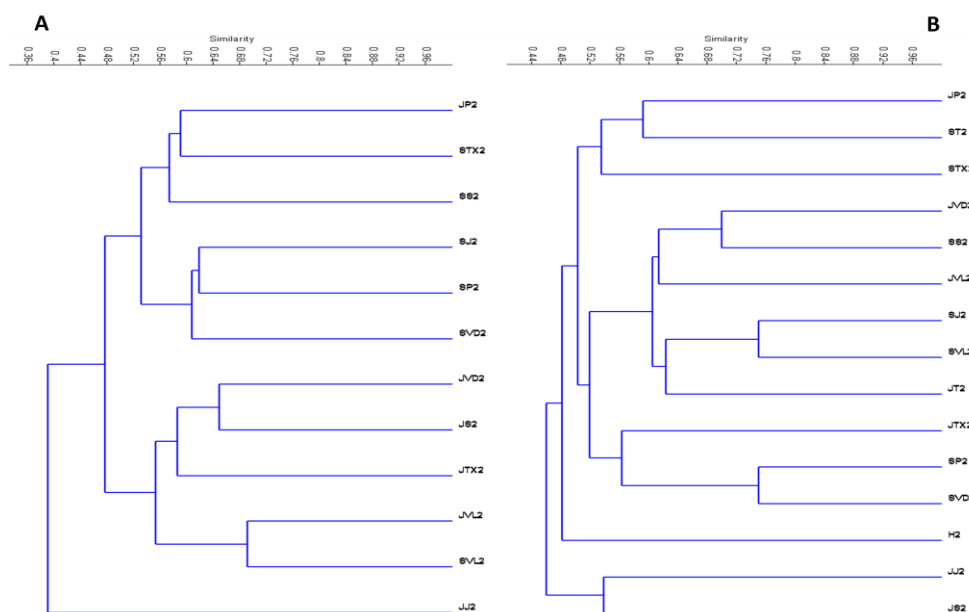


Figura 18. Dendrograma de chiles Jalapeño, Serrano y Habanero, considerando la presencia/ausencia de fragmentos polimórficos por el método RAPD, utilizando el oligonucleótido OPE-18 y el perfil cromatográfico de fenoles libres en chiles verdes (panel A) y maduros (panel B).

De esta manera, podemos observar una ligera asociación entre las variedades Jalapeño y Serrano en el dendrograma que corresponde a los chiles verdes, con un coeficiente de similitud de 0.46, mostrando ciertas diferencias entre estos chiles, pero sin asociación por origen geográfico

9. CONCLUSIONES

Entre las características morfológicas, los chiles Serrano presentaron diferencias significativas a los chiles Jalapeños en peso y longitud, mientras que para el ancho, los habaneros se diferencian de ambos chiles. Entre regiones, las diferencias se presentaron

entre Sinaloa, Puebla, Tlaxcala y Veracruz 1 en peso y longitud, intercambiándose Puebla con Tlaxcala en el último, mientras que para el ancho, la mayoría presentaron diferencias.

En la determinación de los carotenoides encontramos que la concentración de los compuestos van incrementándose conforme al estado de maduración. También se encontraron diferencias entre las variedades de chile, sólo cuando las muestras fueron verdes. Considerando el origen de procedencia encontramos diferencias entre la zona norte con respecto a la zona sur de los chiles Jalapeño verdes. En cuanto a la identificación, se encontró que no se presentan diferencias entre variedades del contenido de luteína, licopeno y β -criptoxantina de los chiles verdes, pero sí para el contenido de β -caroteno, mientras que para los chiles maduros sólo hubo diferencias en las concentraciones de luteína y licopeno entre los chiles Jalapeño y Serrano.

La concentración de compuestos fenólicos, en la mayoría de las muestras se incrementa cuando los chiles maduran, encontrando diferencias significativas entre los chiles Serrano y Jalapeño de ambos estados de maduración. Con respecto a la región, se encontraron diferencias entre las muestras del centro con respecto a las muestras del norte de los chiles Jalapeño y Serrano verdes. Tomando en cuenta los compuestos identificados, se observan diferencias entre el contenido de estos con referencia al estado de maduración y variedad de chile, sin presentar un patrón particular. Y considerando la región geográfica, tampoco se observaron resultados congruentes a su procedencia.

Dado lo anterior, los resultados encontrados de los compuestos fenólicos, así como los carotenoides muestran diversas variaciones entre las tres variables y concentraciones. Algunas interacciones pueden ser explicadas por la proximidad del área geográfica, como en el caso de P, Tx y, V, otros pueden ser debido a las condiciones de cultivo de cada región, así como por el genotipo de chile

De todas las muestras analizadas, aproximadamente la mitad pudieron mostrar una concordancia y una tendencia predictiva lógica, al ser analizados quimiométricamente por el método PLS, con respecto al contenido de β -caroteno usando los valores de UV-visible, donde no se logró obtener una agrupación e identificación de ninguna de las tres variables

Por otra parte, por medio de la espectroscopía de infrarrojo, a través del análisis de componentes principales de los compuestos fenólicos en chiles, se obtuvo cuatro grupos de muestras de acuerdo al lugar de origen, por lo que esta técnica puede ser usada para identificar entre variedades de chiles procedentes de diferentes áreas geográficas y por lo tanto, los compuestos fenólicos, a través de PCA puede ser una alternativa para la identificación de cultivares de Chile.

Se logró establecer una separación y diferenciación entre especies de *C. annuum* L. y *C. chinense* Jacq, entre variedades (Jalapeño y Serrano) y entre origen geográfico (centro y norte) a través del método molecular de RAPD usando diferentes iniciadores, así como reconocer diferentes

Con respecto a los resultados del perfil cromatográfico de fenoles y RAPD, OPE-18 de los chiles verdes se observó una separación entre los chiles Jalapeño y los chiles Serrano no muy clara permitiendo una diferenciación, aproximadamente de la mitad en la escala de similitud.

El perfil cromatográfico de los carotenoides conjuntado con los perfiles de RAPD OPE-18 de los chiles maduros mostraron ser herramientas útiles en la identificación y diferenciación entre especies, aunque no permitió reconocer variedades de una misma especie.

Dado lo anterior, las técnicas, marcadores moleculares y bioquímicos, utilizadas en este trabajo pudieran ser una alternativa para la protección de derechos de autor de las diferentes variedades, para análisis de diversidad y filogenéticos, para la confirmación de híbridos, entre otros.

Finalmente, de todos nuestros resultados podemos decir que algunos de los compuestos pudieron asociarse con los resultados de los marcadores genéticos, mientras que otros se asociaron por el origen geográfico y otros no mostraron correlación. Por lo tanto, es necesario continuar con el estudio, de tal manera que se puedan obtener mejores resultados y más claros.

10. NOMENCLATURA

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

As: absorbancia

ATR: reflectancia atenuada total

Bs: Base seca

C. annum: *Capsicum. Annum*

CMK: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa

CMS: enzimas 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa

CoA: coenzima A

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

DMAPP: dimetil-alil-difosfato

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

dTTP: timidina trifosfato

DXP: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato

DXR: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa

DXS: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FT: Transformada de Fourier

GA3-P: gliceraldehído 3-fosfato

H: Habanero

HDR: 1-hidroxi-2-metil-butenil 4-difosfato reductasa

HDS: 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa

HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

IPP: isopentenil difosfato

IRTF: espectroscopía infrarroja por la Transformada de Fourier

J: Jalapeño

Jc: Jalisco

MCS: 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa

MEP: vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato

MVA: vía mevalónica

Nd: no determinado

NIRS: región espectral del infrarrojo cercano

P: Puebla

PAST: Estadística Paleontológica

Pb: pares de bases

PCA: Análisis de Componentes Principales

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilen glicol

PVP: Polivinil Pirrolidona

RAPD: amplificación aleatoria del ADN polimórfico

S: Serrano

Si: Sinaloa

SSR: repeticiones de secuencia simple

T: Tamaulipas

TAE: Tris-acetato-EDTA

taq: thermus aquaticus

Tx: Tlaxcala

UPGMA: Método del grupo del par de Unweighted con medio aritmético

V1: Veracruz 1

V2: Veracruz 2

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allers T, Lichten M. 2000. A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Research*, 28 (2), 1-7.
2. Amorim E, Vilarinhos A, Cohen K, Amorim V, dos Santos J, Oliveira S, Pestana K, dos Santos V, Paes N, Monte D, dos Reis R. 2009. Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by diversity arrays technology (DART). *Genetics and Molecular Biology*, 32 (1), 96-103.
3. Antonious G, Kochhar T, Jarret R, Snyder J. 2006. Antioxidants in hot pepper: variation among accessions. *Journal of Environmental Science and Health part b*, 41, 1237-1243.
4. Azofeifa D. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*. 2006;17(2):221-42.
5. Baránek M, Raddová J, Pidra M. Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*. 2006;108:253-9.
6. Bautista M, Boldo M, Villa T, Hernández R. 2003. Identification of *Candida* spp by Randomly Amplified. Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (1), 414-420.
7. Bendini A, Cerretani L, Di Virgilio F, Belloni P, Bonoli-Carbognin M, Lercker G. Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality*. 2007, 30, 424-437.
8. Camara B, Bardat F, Moneger R. *Eur. J. Biochem*. 1982;127:255-58.
9. Castillo G, Martínez S. Manual de fitoterapia. Ed. ELSEVIER-MASSON, 1ª ed. España, 2007; pp.33.
10. Collera Z, Federico G, Meléndez G. 2005. Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry*, 90, 109-114.

11. Conforti F, Statti G, Menichini F. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*. 2007;102:1096–04.
12. Cozzolino D. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia*. 2002, 5 (2), 25-32.
13. Curry J, Aluru M, Mendoza M. et al. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp* *Plant Sci*. 1999;148:47-57.
14. Deepaa N, Kaura C, Binoy G. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT* 40. 2007;121–9.
15. Ercisli S, Agar G, Orhan E, et al. Insterspcific variablility of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) growing in Southern Anatolia region in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007; 35:764-9.
16. Etzold E, Lichtenberg-Kraag B. Determination of the botanical origin of honey bye Fourier-transformed infrared spectroscopy: an approach for routine analysis. *Eur. Food. Res. Technol*. 2008, 227, 579-586.
17. Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*. 2003, 107, 271–282.
18. González S. Mejora genética en chile habanero, *capsicum chinense* jacq. ciclos de selección: (s1, s2 y s3).
19. Gurdeniz G, Ozen B, Tokatli F. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *Eur. Food Res. Technol*. 2008, 227, 1275-1281.
20. Harbaum B, Hubbermann E, Zhu Z, Schwarz K. 2008. Free and bound phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). *Food Chemistry*, 110, 838–846.
21. Hermosillo M, González J, Romero S, Luján M, Hernández A, Arévalo S. 2008. Relación genética de materiales experimentales de chile tipo chilaca con variedades comerciales. *Revista de Chapingo Serie Horticultura*, 14 (3), 301-307.
22. Inoue E, Kasumi M, Sakuma F, et al. Identification of RAPD marker linked to fruit skin color in japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Scientia Horticulturae*. 2006;107:254-8.

23. Jaramillo F, Lugo M, Ramírez S, Montellano R, Dorantes A, Hernández S. 2005. Effect of Sodium Chloride, Acetic Acid, and Enzymes on Carotene Extraction in Carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Science*, 70 (2), 136-142.
24. Kafui K. 2002. Antioxidant Activity of Grains. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
25. Lanteri S, Acquadro A, Quagliotti L, Portis E. 2003. RAPD and FLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper *Capsicum annuum* L.) grown in North-West Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 723-735.
26. León P, Guevara G. La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y beneficio humano. *Mensaje Bioquímico*, vol. XXXI. Depto de Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F. 2007, 77-91.
27. Lin K, Lai Y, Lo S. et al. Genetic variation and its relationship ti root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*. 2009;120:2-7.
28. Marin A, Ferreres F, Tomas-Barberan F, Gil M. 2004. Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 52, 3861-3869.
29. Martínez-F, González Gallego, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* (2002) , XVII (6), 271-278
30. Materska M, Perucka I, Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2005: 53:1750-6.
31. Matsufuji H, Ishikawa K, Nunomura O. Antioxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Science and Technology*. 2007: 42:1482–88.
32. Melendez M, Antonio J, Vicario, Heredia F. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *ALAN*. 2004, 54 (2), 149-155.
33. Méndez Trujillo, González M, Gutiérrez M. Contenido de carotenoides y colores extractable de nuevos cultivares en chile pimiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2005:11(2):215-8.
34. Montes H, Heredia G, Aguirre G. Fenología del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.). *Primera Convención Mundial del Chile*. 2004.
35. Nieto G, Troyo D, Pimienta B. Respuesta de variables morfológicas al déficit hídrico de dos especies de chile (*Capsicum frutescens* L. y *Capsicum annuum* L., solanaceae). *scientia-CUCBA*. 2007:9(1):1-8.

36. NMX-FF-025-SCFI-2007. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano - chile fresco (*capsicum* spp). 2007
37. Oboh G, Puntel R, Rocha J. Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum* chinese, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain – in vitro. Food Chemistry. 2007;102:178–85.
38. Ochoa N, Ramírez R. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2001.;37:701-29.
39. Pino J, González M, Ceballos L. et al. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. Food Chemistry. 2007;104:1682–6.
40. Posso D, Ghneim H. Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. Manual de laboratorio. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Unidad de Ecología Genética. 2006.
41. Rodríguez A. 1999. A guide to carotenoides analysis in foods. Washington, D.C.: ILSI Press. 64 p.
42. Rodríguez B. Contenido en carotenoides del ají, *Capsicum baccatum*, bajo condiciones de cultivo del Mediterráneo español. Actas de Horticultura nº 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 2007.
43. Rodríguez Concepción, Flores O, Martinez Garcia, Gonzalez V, Phillips M, Ferrer A, Boronat A. Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development. *Plant Cell*. 2004 **16**: 144–156
44. Rodriguez-Amaya. La retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. 1999.
45. Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3° ed. CSH Press, pp., 1.32
46. SARH (Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos), INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas). 1984. Presente y pasado del chile en México.; 1ª reimpresión Num 85. México D.F. pp. 18
47. Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, et al. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*. 2009;121:313-9.
48. Silva M, Ming L, Pereira A, Bertoni B, Batistini A, Pereira P. 2006. Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from Sao Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. *Revista Brasileira de Plantas Medicinales*, 8, 159-166.

49. Sitthiwong K, Matsui T, Sukprakarn S, Okuda N, Kosugi Y. 2005. Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions by RAPD analysis. *Biotechnology*. 4(4), 305-309.
50. Sun T, Xu Z, Wu C, Janes M, Prinyawiwatkul W, H. K. 2007. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.) *Journal of Food Science*, 72 (2), 98-102.
51. Suna K, Tae Y, Jaebok P. Characteristics of pigment composition and colour value by the difference of harvesting times in Korean red pepper varieties (*Capsicum annuum*, L.). *Journal of Food Science and Technology*. 2007:1-6.
52. Van den Berg H, Faulks R, Granado R, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture Special Issue: Nutritional Enhancement of Plant-based Food in European Trade (NEODIET)*. 2000, 80, 7, 880–912.
53. Vega G, Di Scala K, Rodríguez K. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*. 2009:117:647–53.
54. Versari A., Parpinello G.P., Scazzina F., Del Rio D. 2010. Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Control* 21, 786-789.
55. Xena de Enrech N. Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana*. 2000:51: 197-06.
56. Zhang D, Hamauzu Y. 2003. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 1 (2), 22-27.