



**ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL CARÁCTER
PICANTE EN PIMIENTO (CAPSICUM SPP.):
TÉCNICAS DE EVALUACIÓN, ANÁLISIS
GENÉTICO Y MOLECULAR**

ANA GARCÉS CLAVER

T E S I S D O C T O R A L

**Estudio de los componentes del
carácter picante en pimiento
(*Capsicum* spp.):**

técnicas de evaluación,
análisis genético
y molecular.

Ana Garcés Claver

Tesis doctoral

Centro de Investigación y Tecnología
Agroalimentaria (CITA),
Unidad de Tecnología en Producción Vegetal.

Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Julio 2007

ISBN: 978-84-7733-957-1

DL: Z-3718-2007

D. Ramiro Gil Ortega y Dña. María Soledad Arnedo Andrés, Investigadores del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de los componentes del carácter picante en pimiento (*Capsicum* spp.): técnicas de evaluación, análisis genético y molecular**”, ha sido realizada por Ana Garcés Claver, Ingeniero Agrónomo, bajo su dirección en la Unidad de Tecnología en Producción Vegetal y reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, Julio de 2007

Fdo. Ramiro Gil Ortega

Fdo. María Soledad Arnedo Andrés

Agradecimientos

A los Doctores Ramiro Gil Ortega y María Soledad Arnedo Andrés por su excelente labor de dirección, por todo el apoyo prestado y por haber confiado en mí para realizar esta tesis.

Al Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) por financiar los proyectos que me han permitido llevar a cabo esta tesis y al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) por la beca predoctoral que me ha permitido realizar parte de este trabajo.

A todo el personal de las Unidades de Tecnología en Producción Vegetal y Fruticultura por su buena acogida y relación durante estos años de trabajo, en especial a Elisa y Mari, por su valiosa ayuda en la realización de la parte experimental, a M^a Antonia por ayudarme en el mundo paralelo de la administración, y a las Dras. Ana Pina y Cristina Mallor, por sus consejos y risas durante este tiempo.

Al Dr. Javier Abadía y Dra. Ana Álvarez de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas por permitirme realizar parte de este trabajo en sus laboratorios, por sus consejos y por toda su inestimable ayuda.

A la Dr. Molly Jahn por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y a Shanna Moore y Giulia Stelleri por su acogida y ayuda.

A nonoray por el magnífico diseño de la encuadernación.

A mis padres, mis abuelos y mi hermana por enseñarme a ser persona.

A Enrique por entenderme, animarme y ayudarme cada día.

A mi familia

A Enrique

RESUMEN

El carácter ‘picante’ del pimiento (*Capsicum* spp) es considerado como un factor de calidad de sus frutos. Esta característica es conferida por la presencia de unos compuestos tipo alcaloides, denominados capsicinoides y que únicamente están presentes en el género *Capsicum*. La capsicina y la dihidrocapsicina son, generalmente, los dos capsicinoides mayoritarios en los frutos, aunque son conocidos, al menos, nueve más.

En este trabajo, el estudio del carácter picante en el pimiento ha sido abordado desde tres enfoques distintos, aunque relacionados: (i) la determinación y cuantificación de algunos de los compuestos responsables del carácter; (ii) el estudio del mecanismo genético que controla su herencia; y (iii) el estudio a nivel molecular de algunas de las secuencias génicas implicadas en su biosíntesis.

Así, en este trabajo, se desarrolló y validó un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas [HPLC-ESI/MS(TOF)] para la cuantificación de capsicina y dihidrocapsicina. La separación cromatográfica de ambos compuestos se realizó en una columna C₁₈ de fase reversa y empleando un gradiente de metanol y agua. La cuantificación se realizó utilizando un estándar interno (DMBMO) que no se encuentra de manera natural en los frutos de *Capsicum*. Los límites de detección que se obtuvieron fueron 20 pmol para la capsicina y 4 pmol para la dihidrocapsicina, también se evaluó la reproducibilidad y el porcentaje de recuperación del método. Este método ha permitido el análisis, con alta selectividad, sensibilidad y buena reproducibilidad, de diferentes genotipos de *Capsicum*, los cuales variaron en sus contenidos de capsicina y dihidrocapsicina. Además, la alta resolución obtenida del analizador de masas tipo TOF proporcionó información acerca de la distribución isotópica de ambos compuestos, permitiendo el uso de esta técnica como una herramienta en estudios metabólicos con isótopos estables.

La herencia cuantitativa de los contenidos de capsicina y dihidrocapsicina fue estudiada en un cruce intra-específico de *C. annuum* L., cuyas plantas fueron cultivadas en dos ambientes, primavera y verano. El método HPLC-ESI/MS(TOF) desarrollado fue utilizado para identificar y cuantificar capsicina y dihidrocapsicina a partir de extractos de frutos pertenecientes a las seis familias (parentales, F₁, F₂ y retrocruces) del citado cruce. La sensibilidad del método permitió detectar capsicina y/o dihidrocapsicina en genotipos que habrían sido clasificados como no picantes, utilizando otras técnicas analíticas hasta ahora empleadas. Los contenidos de los dos capsicinoides variaron ampliamente entre familias, las cuales no respondieron similarmente a la producción de estos compuestos cuando sus frutos fueron desarrollados en primavera o en verano. Se detectó heterosis para el carácter picante, y una segregación transgresiva, indicando una contribución alélica por parte del parental no picante. Las estimas de los efectos genéticos de aditividad, dominancia e interacciones, que se realizaron a partir del análisis de medias de las seis familias relacionadas, se ajustó a un modelo con efectos epistáticos, los cuales fueron diferentes para capsicina y dihidrocapsicina y, posiblemente diferentes, para cada ambiente.

El estudio de secuencias génicas relacionadas con la producción de capsicinoides permitió identificar tanto un SNP asociado al carácter picante como una secuencia posiblemente relacionada también con este carácter. Para la detección del SNP se desarrollaron dos tipos de marcadores, CAPS y alelo-específicos derivados de la metodología PCR-ARMS. Este marcador SNP presenta algunas ventajas a la hora de seleccionar genotipos de interés para este carácter, frente a otros marcadores ya existentes, ya que ha sido detectado en ocho especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. chinense*, *C.*

frutescens, *C. galapagoense*, *C. tovarii*, *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. baccatum*), mientras que los marcadores CAPS y SCAR desarrollados hasta el momento y asociados al locus *Pun1*, únicamente se mantienen en genotipos de la especie *C. annuum*. Este SNP se localizó en una secuencia que presentó una homología del 81% con *Pun1* y del 100% con una secuencia parcial denominada *Catf2*. La evaluación, en función de la presencia de *Pun1* y *Catf2*, de un amplio número de genotipos picantes y no picantes de diferentes especies de *Capsicum*, determinó la existencia de varios genotipos, fenotípicamente picantes, en los que no se pudo detectar el alelo *Pun1*, mientras que sí estaba presente la secuencia parcial *Catf2* con el SNP asociado al fenotipo picante.

SUMMARY

One of the important quality attributes of pepper (*Capsicum* spp.) is pungency, which is caused by the presence of a group of alkaloids known as capsaicinoids. Capsaicinoids are synthesized exclusively in *Capsicum* placental tissue. The two major capsaicinoids are capsaicin and dihydrocapsaicin, but at least nine more minor capsaicinoids are occurring in pepper fruits.

In this work, three different aspects, though related to pungency trait, have been studied: (i) determination and quantification of some of the compounds responsible for pungency; (ii) gene action that controls the inheritance of some individual capsaicinoids; and (iii) some genetic sequences related to capsaicinoid biosynthesis.

An liquid chromatography-electrospray ionization/time of flight mass spectrometry [HPLC-ESI/MS(TOF)] method has been developed and validated for the determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in pepper fruit extracts. Samples were chromatographed using a C₁₈ reversed phase column and a gradient of methanol and water. Quantification was done using an internal standard (DMBMO) not found in nature in pepper fruits. Limits of detection were 20 pmol for capsaicin and 4 pmol for dihydrocapsaicin, and reproducibility and analyte recoveries were also evaluated. The developed method has been applied to the identification and quantification, with high selectivity, sensitivity, and sufficient reproducibility, of capsaicin and dihydrocapsaicin in fruit extracts from different *Capsicum* genotypes and the contents of both capsaicinoids varied largely. Also, the high resolution of the MS(TOF) spectrometer used gave information on the isotopic distribution of both compounds, allowing its use as a tool in metabolic studies with stable isotopes.

The quantitative inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin contents in fruits has been studied in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. across two environments, Spring and Summer. The HPLC-ESI/MS(TOF) method was used to identify and quantify capsaicin and dihydrocapsaicin in extracts of pepper fruits belonging to six families (parental lines, F₁, F₂, and backcrosses). The analytical method was able to determine the pungency of genotypes that, using other methods, would have been classified as nonpungent. Capsaicin and dihydrocapsaicin contents varied largely among families, and families did not respond similarly in producing these capsaicinoids when their fruits were grown in Spring and Summer. Heterosis for the pungency (capsaicin and dihydrocapsaicin contents) trait was found. Nonpungent parent alleles appeared to contribute to the capsaicin and dihydrocapsaicin contents, since transgressive segregation occurred. Also, the type of gene action was a model with epistatic effects, varying between capsaicin and dihydrocapsaicin, and the seasonal effect detected could suggest additional differences in gene action.

During the analysis of expressed sequences tag related to capsaicinoid biosynthesis, a SNP associated with pungency and an additional sequence possibly also relate to such trait have been identified. Two methods were chosen for the development of the SNP markers linked to pungency: tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR (tetra-primer ARMS-PCR) and cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS). This SNP marker was associated with phenotypic pungent character in eight *Capsicum* tested species (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. galapagoense*, *C. tovarii*, *C. eximium*, *C. cardenasii*, and *C. baccatum*), whereas the CAPS and SCAR markers published so far, all associated with the *Pun1* locus, only have been detected in *C. annuum*. The genetic sequence, where the SNP is located, showed 81% homology with *Pun1* and 100% with a partial

sequence, named *Catf2*. The characterization of a large and diverse number of *Capsicum* genotypes, belonging to several species, by their pungent phenotype and for the presence of *Pun1* and *Catf2* revealed the existence of several pungent genotypes where the *Pun1* allele was not detected, whereas the *Catf2* partial sequence and the associated pungent SNP it was present.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El pimiento	2
Botánica del género	2
Origen y domesticación del pimiento	2
Citogenética del género <i>Capsicum</i>	3
Producción de pimiento	4
Usos del pimiento	4
El carácter picante en pimiento	7
Los capsicinoides	7
Métodos de determinación y cuantificación de los capsicinoides	8
Herencia del carácter picante en el género <i>Capsicum</i>	10
Biosíntesis de los capsicinoides	12
Objetivos	15
Bibliografía	16

Capítulo 2. DETERMINATION OF CAPSAICIN AND DIHYDROCAPSAICIN IN *Capsicum* FRUITS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY/TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY.

Introduction	26
Materials and methods	29
Chemical and reagents	29
Standard preparations	29
Plant material	29
Extraction of capsaicinoids	30
HPLC-ESI/MS(TOF) analysis	30
Results	32
ESI/MS(TOF) analysis	32
HPLC-ESI/MS(TOF) analysis	32
Validation of the HPLC-ESI/MS(TOF) method	34
Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in fruits extracts	37
Discussion	40
Literature cited	43

Capítulo 3. INHERITANCE OF CAPSAICIN AND DIHYDROCAPSAICIN, DETERMINED BY HPLC-ESI/MS(TOF), IN AN INTRASPECIFIC CROSS OF *Capsicum annuum* L.

Introduction	50
Materials and methods	51
Plant material	51
Sample preparation and capsaicinoid extraction	52
Qualitative assessment of pungency	53
Quantitative analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin	53
Statistical analysis	54
Results	55
Genotype and environmental effects on pungency	55
Quantitative inheritance of pungency	59
Correlation coefficients between capsaicin and dihydrocapsaicin contents	61
Suitability of a qualitative assessment to distinguish the degree of pungency	61
Discussion	62
Literature cited	66

Capítulo 4. IDENTIFICATION, VALIDATION AND SURVEY OF A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) ASSOCIATED WITH PUNGENCY IN *Capsicum* spp.

Introduction	70
Materials and methods	72
Plant material and DNA extraction	72
Phenotyping of <i>Capsicum</i> spp	73
RT-PCR and sequencing	73
SNP discovery	73
SNP validation	74
Results	75
Detection of the SNP	75
Validation of the SNP	77
Application of tetra-primer ARMS-PCR method to SNP genotyping	79
Discussion	82
Literature cited	85

Capítulo 5. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE UNA SECUENCIA DE ADN PARCIAL RELACIONADA CON EL CARÁCTER PICANTE.

Introducción	90
Material y métodos	92
Material vegetal	92
Extracción y cuantificación de ADN	92
Diseño de cebadores y amplificación mediante PCR	93
Extracción de ARN y RT-PCR	94
Cuantificación de capsicina y dihidrocapsicina	95
Alineación y análisis de secuencias	96
Rastreo de una genoteca	96
Evaluación de especies de pimiento	97
Fenotipado para el carácter picante	99
Resultados	99
Identificación de una nueva secuencia de ADNc posiblemente relacionada con el carácter picante	99
Rastreo de una genoteca	103
Caracterización de entradas de pimiento en función de su fenotipo y de la presencia/ausencia de <i>Pun1</i> y <i>Catf2</i>	106
Discusión	111
Bibliografía	114

DISCUSIÓN GENERAL	117
CONCLUSIONES	127
ANEXOS	131
Anexo 1. Método de extracción de ADN	133
Anexo 2. Método de extracción de ARN total	134
Anexo 3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	135
Anexo 4. Clonación de fragmentos de PCR y purificación de plásmidos	136
Anexo 5. Hibridación y marcaje de sonda	139

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL PIMIENTO

Botánica del género

Todas las variedades de pimiento existentes pertenecen al género *Capsicum*, que se incluye dentro de la familia de las Solanáceas:

Reino:	Eucariota
División:	<i>Spermatophyta</i>
Línea XIV:	<i>Angiospermae</i>
Clase A:	<i>Dicotyledones</i>
Rama 2:	Malvales-Tubiflorae
Orden XXI:	<i>Solanales (Personatae)</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia:	<i>Solanoideae</i>
Género:	<i>Capsicum</i>

Dentro del género *Capsicum* existen unas 30 especies. Sin embargo, las principales especies cultivadas son cinco: *C. annum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* Ruiz-Pavón. De éstas, *C. annum*, que incluye entradas que producen frutos picantes y no picantes, es la especie más cultivada y con mayor importancia económica. Además de estas especies, el género *Capsicum* incluye 22 especies silvestres, de las cuales 11 son empleadas por el hombre (Nuez et al. 1996).

La taxonomía de *Capsicum* ha sido ampliamente estudiada por Hunziker (1950, 1998), Heiser y Smith (1953), Eshbaugh (1979) y Pickersgill et al. (1979).

Origen y domesticación del pimiento

El pimiento es una planta originaria de América, que se conocía y consumía antes del establecimiento de la agricultura, alrededor del año 7000 a.C., como se identificó en restos arqueológicos del valle de Tehuacan al sudeste de Méjico (Pickersgill, 1969). Recientes estudios arqueológicos han encontrado microfósiles de almidón pertenecientes al pimiento en siete yacimientos que se distribuyen desde

las Bahamas hasta el sur de Perú, los cuales han sido fechados 6000 años antes del primer contacto de este género con Europa. Estos descubrimientos demuestran que el maíz y el pimiento coexistieron como un antiguo y extendido complejo alimenticio de plantas Neotropicales (Perry et al. 2007). McLeod et al. (1982) proponen la hipótesis sobre el origen de una importante porción del género *Capsicum* en un área nuclear en Bolivia sud-central y una posterior migración hacia los Andes y tierras bajas de la Amazonía. Estos autores también propusieron que *C. chacoense*, o un ancestro suyo, pudo dar origen a *C. baccatum*, durante la migración hacia la cuenca del Amazonas, y a *C. eximium*, en la migración a tierras altas de los Andes. A su vez, mientras que *C. baccatum* pudo dar lugar a *C. tovarii* y al complejo *annuum* (*C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*) (Eshbaugh et al. 1983), *C. eximium* pudo ser el progenitor de *C. cardenasii* y *C. pubescens* (Walsh y Hoot, 2001).

La domesticación de las diferentes especies de pimiento ocurrió entre los años 5200 y 3400 a.C. (Andrews, 1984), pudiendo darse independientemente en varias áreas y empleando diferentes especies silvestres. La combinación de evidencias arqueológicas, análisis genéticos y la distribución actual de las plantas, ha permitido a los investigadores sugerir que *C. annuum* fue inicialmente domesticado en México o en el norte de América Central, *C. frutescens* en el Caribe, *C. baccatum* en Bolivia, *C. chinense* en el norte de la Amazonía y *C. pubescens* en el sur de los Andes (Pickersgill, 1984; Eshbaugh, 1993).

El pimiento fue traído a Europa ya en el primero de los viajes de Colón desde América. Su fácil germinación y la belleza de sus frutos lo llevaron pronto a todos los rincones de la Península Ibérica. Rápidamente se difundió al resto de Europa y del Mundo. En el siglo XVI, el pimiento aparece ampliamente extendido por Europa, es también durante este mismo siglo cuando se inició su expansión tanto en el Extremo Oriente como en África (Pénzes, 1967).

Citogenética del género *Capsicum*

El género *Capsicum* es mayoritariamente diploide, y aunque existe un pequeño número de especies silvestres que cuentan con un número cromosómico básico de $x = 13$ ($2n = 2x = 26$; como *C. campylopodium* Sendt. y *C. rhomboideum*), la mayoría de las especies de *Capsicum* presentan el número cromosómico de $x = 12$ ($2n = 2x = 24$) (Moscone et al. 1995, 2003).

El genoma de *Capsicum* es grande, con contenidos 1C de ADN nuclear que varían desde los 3,32 (picogramos por núcleo) pg en *C. annuum* L. hasta los 5,77 pg en *C. parvifolium* Sendtn. Estos valores corresponden a una longitud del genoma (1C) de 3381 y 5655 Mbp en *C. annuum* y *C. parvifolium* Sendtn., respectivamente (Moscone et al. 2003). El genoma de *C. annuum* es aproximadamente 3 ó 4 veces superior en tamaño al genoma del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Arumuganathan y Earle, 1991) y 20 veces mayor que el de *Arabidopsis thaliana*.

Producción de pimiento

En los últimos años, la producción mundial de pimiento ha llegado a superar los 24 millones de toneladas métricas en 3,66 millones de hectáreas. El mayor productor mundial es China con el 47% de la producción mundial, seguido de Turquía (6,5%), México (6%) y España (3,9%) (FAOSTAT, 2005).

A nivel europeo, España es el primer productor de pimiento fresco y para seco (con 1.053.600 t), seguido de Italia (con 362994 t) y Países Bajos (345.000 t).

A nivel de España, las últimas estadísticas oficiales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, referidas al año 2005, nos indican que se cultivaron unas 24.000 ha, de las que aproximadamente un 50-60% estaban cultivadas en invernadero. En superficie cultivada, el pimiento se encuentra en quinto lugar tras el tomate (107.400 ha), melón (38.100 ha), lechuga (37.500 ha) y la coliflor (26.500 ha). En relación a la producción, el pimiento con 1.076,9 mil toneladas de producto, queda en tercera posición, tras el tomate (6.593,5 mil t) y el melón (1.102,4 mil t). Cifras oficiales del MAPA, referidas al año 2003, indican que la principal zona productora es la provincia de Almería, con 8.600 ha en las que se obtiene el 49% de la producción nacional y el 75% de la producción bajo abrigo. Le sigue en importancia Castilla La Mancha (1.984 ha) y la Región de Murcia (1.810 ha). En relación al cultivo de pimiento para la obtención de pimentón, en España se destinaron un total de 2.583 ha. La Comunidad Autónoma de Extremadura figura en primer lugar, con una superficie de 1.800 ha, seguida de la Región de Murcia, con 543 ha (MAPA, 2004).

Estas cifras indican la gran importancia de este cultivo en nuestro país y su liderazgo como principal suministrador de pimiento en Europa.

Usos del pimiento

El principal uso del pimiento es en la alimentación. Su éxito radica en sus tres principales vías de consumo: en fresco, en conserva y como especia. No obstante, el deseo de diversificación del consumidor está dando cabida a nuevos productos (**Figura 1.1**).

Hoy en día son muchas las industrias y particulares que se dedican en España al cultivo y envasado de pimientos, lo que ha fomentado el desarrollo de denominaciones de origen o indicaciones geográficas, como las del Pimiento Asado del Bierzo (Castilla y León), Piquillo de Lodosa (Comunidad Foral de Navarra), Pimentón de la Vera (Extremadura), Pimentón de Murcia (Murcia), Pimiento Riojano (La Rioja), Pimiento de Ezpeleta (Euskadi), Pimiento de Gernika (Euskadi), Pimiento de Arnoia (Galicia), Pimiento de Herbón, Pimiento de O Cauto (Galicia) y Pimiento de Oimbra (Galicia), entre otras (MAPA, 2005).



Figura 1.1. Ejemplo de dos nuevos productos alimenticios, paté de pimienta y bombones picantes, cuya materia prima es el pimiento.

Como posteriormente será explicado, los capsicinoides confieren al pimiento la característica del picante. El hombre ha sabido sacar provecho desde hace cientos de años a esta característica intrínseca y única de los frutos del género *Capsicum*, siendo conocida su utilidad, además de como condimento alimentario, como medicamento tradicional (Govindarajan, 1985; Snyman et al. 2001). Los usos médicos de los capsicinoides tienen una larga historia, remontándose hasta la civilización Maya, que los usaban para calmar la tos y el dolor de garganta. Los aztecas utilizaban los pimientos picantes para combatir el dolor de muelas.

Actualmente, la capsicina está siendo utilizada como agente analgésico en tratamientos de trastornos dolorosos, como la artritis, causando pérdida de sensibilidad. La industria farmacéutica está aprovechando esta propiedad de la capsicina para el desarrollo de cremas analgésicas de uso tópico (Carmichael, 1991). El principio en el que se basa la industria farmacéutica es el siguiente: cuando se produce una lesión o traumatismo directo sobre un tejido por estímulos mecánicos, térmicos o químicos se produce un daño celular, desencadenándose una serie de sucesos que producen la activación de terminales nociceptivos aferentes con una liberación local de mediadores inflamatorios y otras sustancias productoras del dolor, como la sustancia P (SP). La sustancia P, un péptido que consta de once aminoácidos, es un neurotransmisor que se libera por los axones de las neuronas sensitivas a nivel medular y cuya función es informar al cerebro que algo doloroso está sucediendo. El interés en la investigación de la capsicina proviene de la observación de que este compuesto tiene la capacidad de activar y, a altas dosis, bloquear y lesionar varios tipos de fibras aferentes primarias C y A δ . Cuando la capsicina se pone en contacto con los nociceptores, las neuronas se excitan y se desencadena la liberación de SP, y posterior inhibición de la producción de más cantidad de SP en el organismo. La capsicina se une a un receptor, tipo canal iónico, llamado vainiloide subtipo 1 (VR-1). VR-1 es probablemente un transductor de calor (Caterina et al. 1997), lo cual explicaría la calidad ardiente del dolor inducido por la capsicina. Por analogía con otros sistemas, debería existir un neurotransmisor endógeno que activara los receptores VR-1 y se cree que podrían ser los protones (Franco-Cereceda et al. 1994). Se piensa que el VR-1 sería activado a la vez por la capsicina, protones y estímulos térmicos (>43°C) (Kress y Zeilhofer, 1999). El gen que codifica a este receptor vainiloide en células sensoriales pequeñas

ya ha sido clonado (Caterina et al. 2000). También ha sido caracterizado el gen VR-1 humano (Hayes et al. 2000) y se están llevando a cabo los primeros análisis para determinar variantes alélicas que permitan realizar estudios de asociación.

No todos los animales son sensibles a la capsicina. Se ha comprobado que la capsicina no tiene efecto nociceptivo en las aves, ya que sus neuronas sensoriales primarias son insensibles a este compuesto (Wood et al. 1988). En estudios posteriores, se ha identificado una zona de la secuencia genética del gen VR-1 común para todos los mamíferos (Jordt y Julius, 2002). Sin embargo, en las aves esa zona es diferente, y por tanto, no es codificado el segmento que se une específicamente a la capsicina. Al no ligarse la capsicina al receptor no hay transmisión de ninguna señal dolorosa al cerebro del ave que puede estar engullendo un trozo de fruto picante (picante para otros seres, no para el ave). La clonación de este receptor vainiloide homólogo ha sido descrita, y se ha confirmado que, aunque no se activa frente a la capsicina, sí es funcional frente a estímulos nocivos (Jordt y Julius, 2002). La capsicina podría ser, según algunos investigadores, un mecanismo de las plantas de pimiento para evitar que los mamíferos se alimentaran de sus frutos, y que contrariamente, no impediría que las aves si lo hicieran para así poder dispersar sus semillas (Levey et al. 2006). Las aves han sido considerados como agentes fundamentales de la dispersión de las especies silvestres de *Capsicum* (Tewksbury y Nabhan, 2001).

Otra aplicación del pimiento, derivada de la presencia de los capsicinoides, es su uso como pulverizador de autodefensa (Hyder, 1996), pero lo cierto es que esta aplicación tampoco es novedosa. En la época prehispánica, la cultura indígena mexicana elaboró una colección de importantes códices, entre ellos, el Códice Mendocino, que presentaba al pimiento picante no sólo como un atributo, sino también como una forma de castigo familiar. En él se representa como un padre castiga a su hijo respirando el humo de una fogata a la que se han arrojado chiles secos y como una madre amenaza a su hija con el mismo castigo (Labored y Pozo, 1984).

Recientemente, los capsicinoides se han aplicado también a otros propósitos como la investigación neurobiológica (Szallasi y Blumberg, 1999; Okere y Waterhouse, 2004), para la pérdida de peso (Lejeune et al. 2003), como analgésico local/general (Lazzeri et al. 1996; Karai et al. 2004) y para defensa antimicrobiana (Jones et al. 1997; Kurita et al. 2002). Recientes investigaciones médicas han descubierto que la capsicina tiene potentes efectos contra algunos tipos de células cancerígenas y es capaz de eliminar las células malignas atacando su fuente de energía, que son mitocondrias (Athanasίου et al. 2007).

EL CARÁCTER PICANTE EN PIMIENTO

Los capsicinoides

Los capsicinoides, responsables del carácter picante en pimiento, son compuestos alcaloides que únicamente están presentes en el género *Capsicum*. Estos compuestos se sintetizan y acumulan dentro de vesículas en la superficie del tejido del septo o/y placentario del fruto, comenzando su biosíntesis entre los 15–25 días después de antesis (dpa) (Iwai et al. 1979; Fujiwake et al. 1980; Stewart et al. 2007) (**Figura 1.2**). La biosíntesis continúa durante el desarrollo del fruto hasta el final de la fase de crecimiento, que se detiene, estacionándose el contenido de capsicinoides, e incluso en algunos casos, decreciendo posteriormente, por la posible degradación causada por unas enzimas peroxidasas (Bernal et al. 1993).

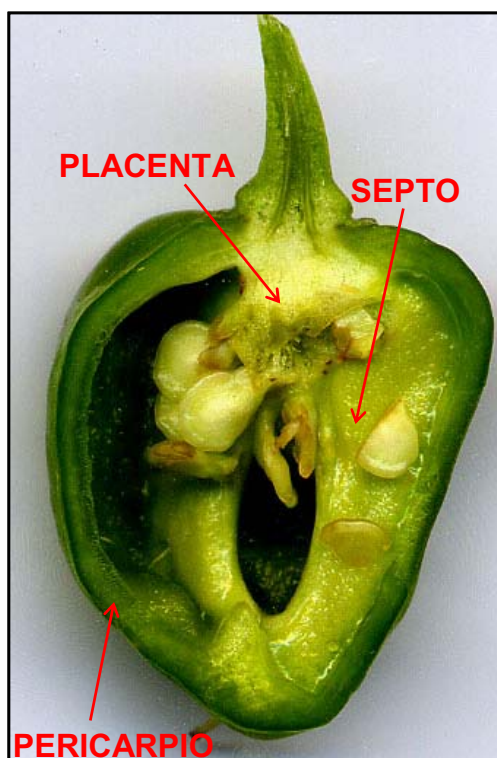


Figura 1.2. Corte longitudinal de un fruto de pimiento

Los capsicinoides se forman por condensación del grupo vainillilamina, común a todos ellos, con una cadena de ácido graso (C9-C11). El resultado son al menos 11 capsicinoides, que difieren en su cadena, respecto a su longitud y grado de saturación (capsicina, dihidrocapsicina, nordihidrocapsicina, homocapsicina I, homocapsicina II, homodihidrocapsaicin I, homodihidrocapsaicin II, octanoil-

vainillilamida, nonanoil-vainillilamida, decanoil-vainillilamida, nonivamida; Maillard et al. 1997). La capsicina y la dihidrocapsicina, generalmente, son los capsicinoides mayoritarios y pueden representar hasta el 90% del contenido total de la mezcla (Govindarajan et al. 1987), aunque esto depende de la variedad. La sensación de picante en los frutos del pimiento depende del tipo de capsicinoide presente en el fruto y de la cantidad de cada uno en el conjunto (Krajewska y Powers 1988; Tood et al. 1977). Las propiedades químicas de los dos capsicinoides mayoritarios se exponen en el **Tabla 1.1**

Tabla 1.1. Propiedades químicas de la capsicina y dihidrocapsicina

	Capsicina	Dihidrocapsicina
Número CAS	404-86-4	19408-84-5
Punto de fusión	65 °C	
Punto de ebullición	210-220 °C	
UV máxima	227 nm, 281nm	
Solubilidad	Soluble en etanol, éter, benceno, cloroformo, acetona. Insoluble en agua.	
Forma cristalina	Prismas o escamas	

CAS: Chemical Abstract Service; Número de registro del analito; UV: Ultravioleta

Métodos de determinación y cuantificación de los capsicinoides

La separación y cuantificación de los capsicinoides presentes en un fruto resulta de gran utilidad para los estudios de la variabilidad de este carácter, tanto en el campo de la industria como en la investigación. El intento de separar y, posteriormente, detectar para cuantificar los diversos capsicinoides ha llevado al desarrollo de diferentes metodologías analíticas. El primer intento por medir el nivel de picante se basó en el Test Organoléptico Scoville (Scoville, 1912), este método resulta subjetivo y poco fiable, por lo que muchos investigadores intentaron reemplazarlo por otros métodos más rápidos y precisos, como la espectrofotometría (Ramos, 1979; Bajaj, 1980; Rymal et al. 1984) y las cromatografía de papel (Trejo-Gonzalez y Wild-Al Tamirano, 1973), de capa fina (Todd et al. 1975; Tolan et al. 2004), de gases (Todd et al. 1977; Iwai et al. 1979; Krajewska y Powers 1987; Manirakiza et al. 1999; Jurenitsch y Leinmuller, 1980; Thomas et al. 1998; Hawer et al. 1994) y líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a diferentes técnicas de detección de espectrofotometría UV-visible, fluorescencia (Lee et al. 1976; Sticher et al. 1978; Iwai et al. 1979; Jurenitsch et al. 1979; Johnson et al. 1979; Woodbury 1980; Fujiwake et al. 1982; Hoffman et al. 1983; Cooper et al. 1991; ASTA 1993;

Collins et al. 1994; Collins et al. 1995; Maillard et al. 1997; Sato et al. 1999; Reilly et al. 2001; Tucker, 2001; Karnka et al. 2002; Kozukue et al. 2005) y espectrometría de masas (Reilly et al. 2001; Reilly et al. 2002; Thompson et al. 2005; Schweiggert et al. 2006).

De todas estas técnicas, concretamente la cromatografía líquida (HPLC) ha sido la más estudiada y utilizada, por su universalidad, su efectividad en la separación de algunos capsicinoides y por su capacidad para una posterior detección selectiva. Para algunos investigadores, como Yao et al. (1994) y Contreras-Padilla et al. (1998), la cromatografía líquida (HPLC) acoplada a UV es el método considerado más rápido y fiable para la identificación y cuantificación de capsicinoides. Estas técnicas permiten determinar la capsicina, la dihidrocapsicina y algunos análogos, pero están limitadas fundamentalmente por dos aspectos, la selectividad y la sensibilidad. Esto es debido a que existen capsicinoides con igual comportamiento cromatográfico y que sólo pueden ser cuantificados determinando un parámetro específico, como puede ser su masa. Además, los diferentes capsicinoides se presentan en cantidades muy diversas y por consiguiente, se precisa de métodos muy sensibles que permitan determinar aquellos componentes minoritarios, así como, determinar la evolución de la cantidad de aquellos capsicinoides mayoritarios, por ejemplo, durante la maduración del fruto. Métodos más sensibles y selectivos, como la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas, podrían determinar qué tipos de capsicinoides están presentes y cuantificar con alta precisión sus concentraciones en frutos de *Capsicum*.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite la determinación de la relación masa-carga (m/z) de los iones moleculares cargados positiva o negativamente obtenidos de una muestra analizada. La relación masa-carga se expresa en unidades de masa atómica (1 a.m.u. = 1/12 de la masa del ^{12}C) o en Daltons (1 Da = masa de un átomo de hidrogeno). Los iones moleculares, producidos en una fuente de ionización, son acelerados y posteriormente separados por el analizador antes de ser detectados por el detector. Todos estos procesos tienen lugar en una cámara donde existe un vacío de entre 10^{-3} y 10^{-6} Pa, proporcionado por una bomba de vacío. Los espectros resultantes muestran la relativa abundancia de las diferentes especies iónicas presentes en función de su m/z . La señal correspondiente a un ión estará representada por varios picos que corresponderán a la distribución isotópica del ión. Esta distribución se denomina perfil isotópico y el pico que representa al isótopo más abundante se denomina pico monoisotópico.

El acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas se realiza por diferentes técnicas que actúan como interfaz. La utilización de una fuente de ionización por electrospray (ESI) ha proporcionado un método eficiente de ionización de los analitos en solución y ha permitido el acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas. La capacidad de la técnica HPLC-ESI/MS para detectar iones en diversas matrices químicas, como las que se pueden encontrar en la industria farmacéutica y alimentaria, y en las investigaciones

biológicas y de medio-ambiente, ha permitido a esta técnica expandirse rápidamente.

Actualmente ya se está aplicando la espectrometría de masas a la determinación de algún capsicinoide en las áreas de investigación forense y farmacéutica. Un ejemplo es el método desarrollado por Reilly et al. (2002), cuyo objetivo era desarrollar un método analítico que fuera capaz de determinar capsicina, dihidrocapsicina y otro análogo en diferentes matrices como tejidos, sangre o aerosoles derivados de extractos de pimiento picante. Sin embargo, todavía no se ha conseguido desarrollar, validar y aplicar un método de HPLC-ESI/MS(TOF) para determinar y cuantificar con alta selectividad y sensibilidad los dos capsicinoides mayoritarios presentes en matrices tan complejas como los frutos de *Capsicum*.

Herencia del carácter picante en el género *Capsicum*

Los primeros estudios de herencia del carácter picante apuntaron que el control genético de este carácter obedecía a la presencia de un gen dominante, *C*, (Webber, 1911; Deshpande, 1935). En estos trabajos, la obtención del fenotipo se realizó mediante pruebas gustativas, clasificando los frutos en dos grupos: picantes y no picantes. Sin embargo, otros estudios posteriores propusieron que la presencia del carácter picante estaba controlada por varios genes. Ohta (1962) identificó varios niveles de picor en la generación F_1 de un cruce intraespecífico de *C. annuum* y una distribución bimodal en la F_2 y en los retrocruces. En este trabajo, la determinación del picor se realizó con un método cuantitativo (cromatografía de papel) y evidenció la herencia poligénica. Estos resultados fueron confirmados por Gill et al. (1973), que a pesar de que el fenotipado del carácter picante lo hicieron sensorialmente, obtuvieron a partir de un cruce entre *C. annuum* y *C. frutescens*, una segregación transgresiva en la F_2 , y una distribución F_2 indicadora de un control multifactorial del contenido de capsicina.

La teoría de que el control de la ausencia de picante fuera ejercido por un único gen recesivo, fue también rebatida por Loaiza-Figueroa y Tanksley (1988), que describieron un segundo gen independiente, C_2 , condicionante de la ausencia de picor. A dicha conclusión llegaron al obtener, a partir de un cruce entre parentales no picantes de *C. annuum*, una F_1 picante y una segregación en la F_2 de dos genes independientes con epistasia. Posteriormente, Blum et al. (2002), en su trabajo de localización del *locus C* en el cromosoma 2 de un mapa del pimiento, expusieron que las conclusiones a las que habían llegado Loaiza-Figueroa y Tanksley (1988) podrían no ser correctas, ya que una de las líneas no picantes (BG 3547) que se había utilizado en el cruce era realmente picante, aunque este carácter era mostrado más tardíamente en el desarrollo del fruto. No obstante, Blum et al. (2002), apuntaron que, aunque *C* era el único gen conocido que controlaba cualitativamente el picante, había una gran variación en el contenido de capsicinoides entre

diferentes variedades y que sería muy probable que hubiera múltiples orígenes de los alelos *c* recesivos. De hecho, años después, fue presentada una nueva fuente del origen no picante distinta del *locus C* (Votava y Bosland, 2002). En este trabajo se presentó un segundo *locus*, denominado *lov* (*loss of vesicle*), que se consideró responsable, junto con *C*, de la ausencia del picante en dos entradas de *C. chienense*, una de *C. chacoense*, y otra de *C. frutescens*. El nuevo *locus lov* se heredaba como un gen recesivo y era responsable de la ausencia de vesículas acumuladoras de capsicinoides.

Posteriormente, el *locus C* pasó a denominarse *Pun1* (Daskalov y Poulos, 1994). Este gen codifica a una putativa aciltransferasa llamada *AT3* (Stewart et al. 2005). Sin embargo, la función específica de esta enzima en la biosíntesis de los capsicinoides no ha sido todavía averiguada. La única variación fenotípica adscrita a este *locus* de presencia/ausencia de picante es una consecuencia de pérdida de función de los alelos *pun1* en *C. annuum* y *pun1*² en *C. Chinense* (segundo alelo recesivo del *locus Pun1*; Stewart et al. 2007), resultado de una delección de 2.5 kb a lo largo del primer exón y parte del promotor en *pun1* (Stewart et al. 2005) y de una delección de 4 pb en el centro del primer exón en *pun1*². Además, también se ha aclarado que el *locus lov*, identificado por Votava y Bosland (2002), es en realidad este segundo *locus* recesivo, que por convenios de la nomenclatura de los genes de *Capsicum*, se ha propuesto denominar como *pun1*², con sinónimo *lov*.

Aunque hasta la fecha, sólo podemos decir que la presencia/ausencia del picante es controlada por el gen *Pun1*, que parece actuar a modo de interruptor, la cantidad de capsicinoides que se producen en el pimiento podría considerarse un carácter de herencia cuantitativa. Zewdie y Bosland (2000), usando la técnica HPLC para la determinación del contenido individual de cinco capsicinoides, estudió la herencia cuantitativa de estos cinco capsicinoides, y concluyó que la síntesis de cada capsicinoide podría estar controlada por diferentes genes. Blum et al. (2003) identificaron un QTL, denominado *cap*, que controlaba el contenido de capsicinoides en un cruce entre un parental no picante (*C. annuum* cv. Maor) y otro picante (*C. frutescens* BG2816). Este QTL, localizado en el cromosoma 7, fue detectado tanto para capsicina como dihidrocapsicina y es capaz de explicar alrededor del 34% de la variación fenotípica del contenido total de capsicinoides. La existencia de *cap* fue confirmada por Ben-Chaim et al. (2006), que detectaron, además de *cap*, cinco QTLs más, en los grupos de ligamiento 3, 4 y 7, controlando el contenido de capsicinoides.

En relación al desarrollo de marcadores moleculares asociados al carácter picante, hasta el momento se han identificado en *C. annuum*, diversos tipos de marcadores moleculares pero siempre ligados al alelo *Pun1* (Tanksley et al. 1998; Blum et al. 2002; Minamiyama et al. 2005; Lee et al. 2005). Estos marcadores se han empleando en programas de mejora.

El nivel de picante no es únicamente dependiente del factor genético, ya que hay estudios donde se muestra que el picante es el resultado de una interacción genotipo por ambiente (Lindsey y Bosland, 1995). La influencia ambiental ha sido estudiada en diferentes ocasiones revelando su efecto sobre el contenido de

capsicinoides a través de la temperatura, la luz, el tipo de sustrato y el nivel de fertilización (Harvell y Bosland, 1997; Estrada et al. 1998; Estrada et al. 1999; Zewdie y Bosland, 2000).

La industria agroalimentaria exige niveles específicos de picante para poder realizar un etiquetado fiable del producto en función de su nivel poco, medio o muy picante. Por lo tanto, para que las variedades de pimiento tengan un valor comercial, deben de mostrar un nivel de picante dentro de un intervalo específico. Este es uno de los objetivos de los mejoradores, y para alcanzarlo es necesario un correcto avance en la mejora y manipulación del carácter picante, lo cual depende del conocimiento de los mecanismos genéticos que controlan este carácter.

Biosíntesis de los capsicinoides

La primera ruta de biosíntesis de los capsicinoides fue propuesta paralelamente por Bennet y Kirby (1968) y por Leete y Louden (1968). Recientemente ha sido propuesta la última versión de la ruta (Stewart et al. 2007) con ampliaciones de nuevos procesos enzimáticos (**Figura 1.3**).

Esta ruta se compone de dos vías, una de las cuales convierte la fenilalanina en vainillilamina y la otra, la valina es convertida a un ácido graso de longitud variable entre 9 y 11 carbonos (en capscina es el ácido 8-metil-nonenoico). La capscina y sus análogos son sintetizados por condensación de ambos productos.

La conversión de la fenilalanina en la vainillilamina es a través de la ruta de los fenilpropanoides (Iwai et al. 1979). Esta ruta permite la síntesis de importantes metabolitos secundarios como las ligninas, los flavonoides y los antocianos. Por tanto la biosíntesis de capsicinoides compite con la acumulación de otros compuestos (Hall et al. 1987; Halbrock y Scheel, 1989; Sukrasno y Yeoman, 1993; Dixon y Paiva, 1995).

En la ruta de los capsicinoides, la fenilalanina es convertida a ácido cinámico por medio de la acción catalítica de la enzima fenilalanina amonilasa (*Pal*). Este ácido a su vez es doblemente hidroxilado, dando lugar, primero, al ácido coumárico y, posteriormente, al ácido cafeico. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas cinámico-4-hidrolasa (*Ca4h*) y coumárico-3-hidroxilasa (*Ca3h*), respectivamente. La enzima cafeico-3-*O*-metiltransferasa (*Comt*) cataliza la conversión del ácido cafeico a ácido ferúlico por metilación del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo de benceno. Esta enzima ha sido descrita por participar también en procesos de lignificación (Inoue et al. 1998). Transcritos de las enzimas *Pal*, *Ca4h* y *Comt* fueron positivamente correlacionados con la acumulación de capsicinoides (Curry et al. 1999). Y posteriormente, *Comt* y *Pal* fueron localizadas en el grupo de ligamiento 2 y *Ca4h* en el 4, de un mapa construido a partir de una población F₂ procedente del cruce interespecífico *C. annuum* × *C. chinense* (Kang et al. 2001).

El ácido ferúlico, uno de los productos intermedios más importante de esta ruta de biosíntesis de capsicinoides, es convertido en vainillina, y ésta en vainillilamina por medio de una aminotransferasa (*pAmt*) (Sukrasno y Yerman, 1993), cuyo gen ha sido aislado (Curry et al. 1999). Las conversiones del ácido ferúlico en vainillina y, ésta su vez, en vainillilamina no son comunes a otras plantas. La degradación del ácido ferúlico no es conocida y la enzima responsable no ha sido identificada en *Capsicum*. El metabolismo del ácido ferúlico a vainillina ha sido estudiado en microorganismos, pero con el único objetivo de la producción biotecnológica de vainillina (Gasson et al. 1998).

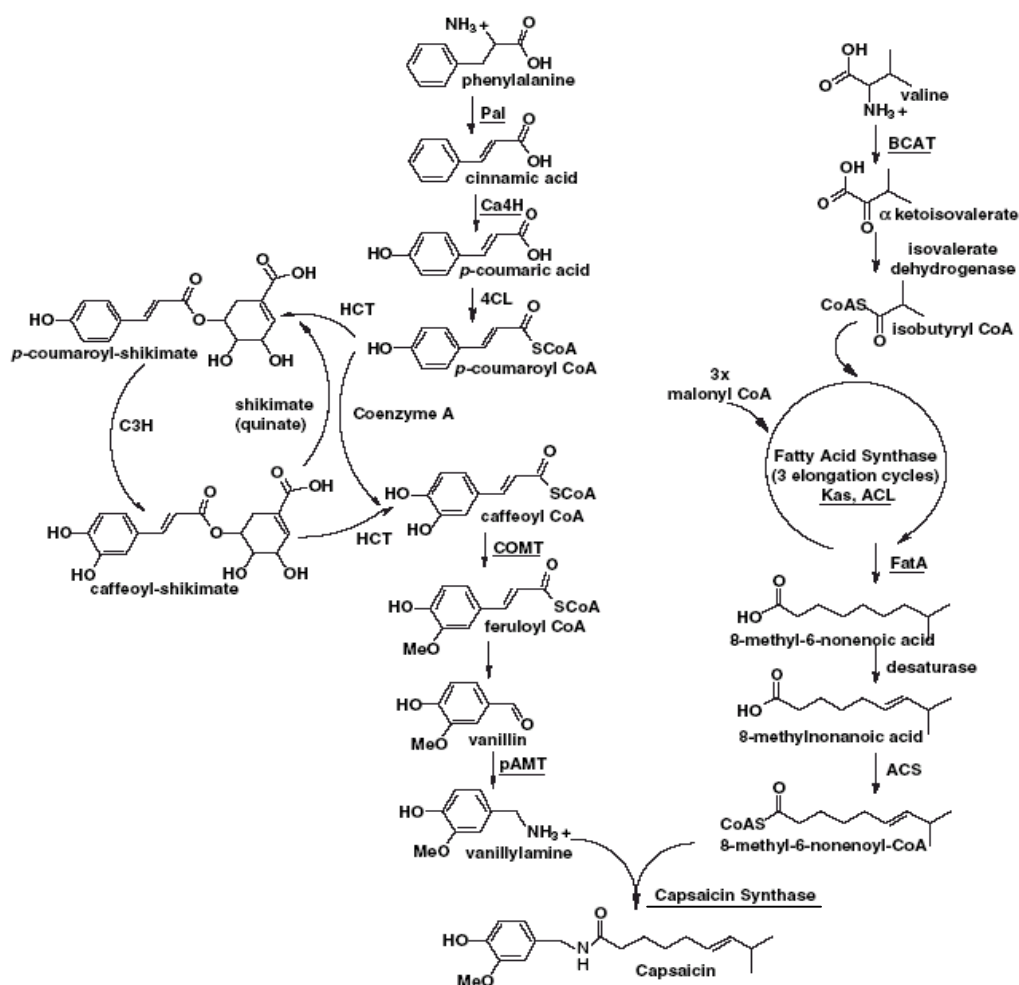


Figura 1.3. Modelo de la ruta de biosíntesis de los capsicinoides propuesto por Stewart et al. (2007). Las enzimas cuyos genes ya han sido clonados aparecen subrayadas.

El ácido 8-metil-nonenoico ha sido considerado delimitante y regulador de la biosíntesis de los capsicinoides (Prasad et al. 2006). Este ácido deriva de la valina o leucina. Las enzimas que intervienen en la formación del ácido graso están altamente conservadas y sus funciones han sido estudiadas en la biosíntesis de ácidos grasos en otras Solanáceas. En pimiento han sido parcialmente

caracterizados los genes para una 3-keto-acyl-ACP cistasa (*Kas*), una proteína transportadora del grupo acil (*AcI*) y una tiosterasa (*Fat*) (Aluru et al. 2003). Transcritos de estas enzimas también ha sido positivamente correlacionados con la acumulación de capsicinoides. Estos tres genes fueron mapeados e integrados en el mapa de Livingstone et al. 1999. Ninguna de las posibles localizaciones de estos tres genes se superponía con la posición de *Pun1*, por tanto, estos tres genes fueron excluidos como candidatos de *Pun1* (Aluru et al. 2003).

En la ruta de biosíntesis de los capsicinoides, se ha considerado un punto clave la condensación de la vainillilamina y el ácido 8-metil-nonenoico, y han sido varios grupos de investigación los que se han centrado en el estudio de la enzima catalizadora de este último paso. Kim et al. (2001) obtuvieron un alto número de genes expresados únicamente en placenta de genotipos picantes. Una de las secuencias obtenidas, denominada SB2-66 (GenBank entrada nº BF723664), supuso el punto de partida para diversos estudios. Por homología de secuencias, SB2-66 se incluyó en el grupo de enzimas “acil-transferasas”, y por su patrón de expresión y a través de la técnica “northern blot”, se confirmó que la citada secuencia sólo se expresaba en tejido de placenta y 30 días después de antesis. Estos trabajos se realizaron con tejido procedente de la variedad Habanero de *C. chinense*, conocida como la variedad de pimiento más picante. El grupo liderado por la Dra. Molly Jahn, de la Universidad de Cornell (Ithaca, NY), describió la secuencia completa del gen, *Pun1*, responsable de la presencia/ausencia de “picor” en los frutos de pimiento. *Pun1* corresponde a una putativa acil-transferasa, denominada *AT3*, en la cual se incluye el fragmento SB2-66 en la parte final de su segundo exón. Dicha acil-transferasa posee una importante función en la ruta de síntesis de estos compuestos pero no está aclarado el papel que juega dentro de dicha ruta (Stewart et al. 2005). Recientemente ha sido purificada y caracterizada la enzima capsicina sintetasa (*CS*) (Prasad et al. 2006). La actividad de *CS* fue correlacionada con los niveles de capsicina y estudios de inmunolocalización confirmaron que estaba específicamente localizada en el tejido placentario de los frutos de *Capsicum*. Además, a partir del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, se clonó el gen y se secuenció la longitud total del ADN complementario (ADNc) (981pb). Identificado el gen *csy1*, se estudió su funcionalidad a través de su expresión en *E. coli*. Aun no se dispone de información sobre la localización de este gen en el mapa de pimiento.

Actualmente, dentro de la ruta biosintética de los capsicinoides existen hasta trece enzimas conocidas que intervienen en la producción de estos compuestos. La complejidad de la ruta de síntesis, el elevado número de enzimas que participan en ella, algunas todavía no conocidas, y el incompleto conocimiento de la ruta de síntesis de estos compuestos, justifica que sería necesario continuar el estudio a nivel molecular de secuencias génicas relacionadas con la producción de estos compuestos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el estudio del carácter picante en pimiento, abordado desde tres de sus aspectos: la determinación y cuantificación de los compuestos responsables del carácter, el mecanismo genético que controla su herencia y finalmente, el estudio a nivel molecular de algunas de las secuencias génicas implicadas en su biosíntesis. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Desarrollar y validar un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas [HPLC-ESI/MS(TOF)] para la cuantificación de los dos principales capsicinoides, capsicina y dihidrocapsicina.
- Estudiar la herencia de los dos principales capsicinoides, determinados por HPLC-ESI/MS(TOF), en un cruce intraespecífico de *Capsicum annuum* L.
- Identificar y aplicar marcadores moleculares asociados al carácter picante y estudiar nuevas secuencias génicas involucradas en la ruta de biosíntesis de los capsicinoides.

Estos objetivos se van a acometer en los capítulos 2, 3, 4 y 5 de esta tesis. En cada capítulo se describen los objetivos correspondientes de forma más detallada.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA (2003) Differential expression of fatty acid synthesis genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *J Exp Bot* 54:165-1664
- American Spice Trade Association (ASTA) (1985) Official analytical methods of the American Spice Trade Association. Amer. Spice Trade Assn. Englewood Cliffs, NJ.
- Andrews J (1984) En: Peppers, the domesticated *Capsicums*. University Texas Press, pp. 170
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208-218
- Athanasiou A, Smith PA, Vakilpour S, Kumaran NM, Turner AE, Bagiokou D, Layfield R, Ray DE, Westwell AD, Alexander SP, Kendall DA, Lobo DN, Watson SA, Lophatanon A, Muir KA, Guo DA, Bates TE (2007) Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 354(1):50-55
- Bajaj KL (1980) Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits. *J Assoc Offic Anal Chem* 63:1314-1316
- Ben-Chaim A, Paran I, Grube R, Jahn M, van Wijk R, Peleman J (2001) QTL mapping of fruit related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theor Appl Genet* 102:1016-1028
- Ben-Chaim A, Borovsky Y, Falise M, Mazourek M, Kang BC, Paran I, Jahn M (2006) QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 113(8):1481-90
- Blum E, Liu K, Mazourek M, Yoo EY, Jahn MM, Paran I (2002) Molecular mapping of the *C locus* for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45:702-705
- Bennett DJ, Kirby GW (1968) Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J Chem Soc C*:442-446
- Bernal AM, Calderón AA, Pedreño MA, Muñoz R, Barceló AR, Merino FC (1993) Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (var. *annuum*) fruits. *J Agric Food Chem* 41:1041-1044
- Carmichael J K (1991) Treatment of herpes zoster and post herpetic neuralgia. *Amer Family Physician* 44:203-210
- Blum E, Liu K, Mazourek M, Yoo EY, Jahn MM, Paran I (2002) Molecular mapping of the *C locus* for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45:702-705
- Blum E, Mazourek M, O'Connell MA, Curry J, Thorup T, Liu K, Jahn MM, Paran I (2003) Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 108:79-86
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824

- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat rev Neurosci* 2:387-396
- Collins M, Bosland P (1994) Rare and novel capsaicinoid profiles in *Capsicum*. *Capsicum Eggplant Nswl* 13:48-51
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30 (1):137-139
- Contreras-Padilla M, Yahia EM (1998) Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J Agric Food Chem* 46:2075-2079
- Cooper TH, Guzinski JA, Fisher C (1991) Improved high-performance liquid chromatography methods for the determination of major capsaicinoids in *Capsicum* oleoresins. *J Agr Food Chem* 39:2253-2256
- Curry J, Aluru M, Mendoza M, Nevarez J, Melendrez M, O'Connell MA (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Sci* 148:47-57
- Daskalov S, Poulos JM (1994) Updated *Capsicum* gene list. *Capsicum Eggplant Nswl* 13:16-26
- Deshpande RB (1935) Studies in Indian chillies: 4. Inheritance of pungency in *Capsicum annuum* L. *Indian J Agric Sci* 5:513-516
- Dixon R, Paiva N (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* 7:1085-1097
- Eshbaugh WH (1979) Biosystematic and evolutionary study of the *Capsicum pubescens* complex. National Geographic Society Research Reports (USA) 1970:143-162
- Eshbaugh WH (1993) En: *New Crops*, J. Janick, JE Simon, Eds. Wiley, New York, pp. 132-139
- Eshbaugh WH, Smith PG, Nickrent DL (1983) *Capsicum tovarii* (Solanaceae), a new species of pepper from Peru. *Brittonia* 35:55-60
- Estrada B, Díaz J, Merino F, Bernal MA (1999) The effect of seasonal changes on the pungency level of 'Padron' pepper fruits. *Capsicum Eggplant Nswl* 18:60-64
- Estrada B, Pomar F, Díaz J, Merino F, Bernal MA (1998) Effects of mineral fertilizer supplementation on fruits development and pungency in 'Padrón' peppers. *J Hortic Sci Biotechnol* 73:493-497
- FAOSTAT (2005) <http://faostat.fao.org>
- Franco-Cereceda A, Kallner G, Lundberg JM (1994) Cyclo-oxygenase products released by low pH have capsaicin-like actions on sensory nerves in the isolated guinea pig heart. *Cardiovasc Res.* 28:365-369
- Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiology* 21:1023-1030

- Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K (1982) Capsaicinoids formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric Biol Chem* 46:2591-2592
- Gasson MJ, Kitamura Y, Russell-McLauchlan W, Narbad A, Parr AJ, Parson EL, Payne J, Rhodes MJC, Walton NJ (1998) Metabolism of ferulic acid to vanillin. *J Biol Chem* 273:4163-4170
- Gill KS, Ghai BS, Singh JR (1973) Inheritance of amount of capsaicin in chilli (*Capsicum frutescens* L. and *C. annuum* L.). *Indian J. Agric. Sci.* 43:839-841
- Govindarajan VS (1985) *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. Part I: history, botany, cultivation, and primary processing. *CRC Crit Rev Food Sci Nut.* 22:109-176
- Govindarajan VS, Rajalakshmi D, Chand N (1987) *Capsicum*-production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 25:185-282
- Hall RD, Holden MA, Yeoman MM (1987) The accumulation of phenylpropanoids and capsaicinoid compounds in cell structures and whole fruit of the chili pepper *Capsicum frutescens* Mill. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 8:163-179
- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 40:347-369
- Harvell KP, Bosland PW (1997) The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience* 32:1292
- Hawer WS, Ha J, Hwang J, Nam Y (1994) Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography. *Food Chem* 49:99-103
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, et al. (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88:205-15
- Heiser CB, Smith PG (1953) The cultivated *Capsicum* peppers. *Economic Botany* 7:214-227
- Hoffman PG, Lego MC Galetto WG (1983) Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.* 31:1326-1330
- Hunziker AT (1950) Estudios sobre *Solanaceae*. I. Sinopsis de las especies silvestres de *Capsicum* de Argentina y Paraguay. *Darwiniana* 9:225-247
- Hunziker AT (1998) Estudios sobre *Solanaceae*. XLVI. Los ajíes silvestres de Argentina (*Capsicum*). *Darwiniana* 36:201-203
- Hyder K (1996) Is CS the wrong solution? *New Sci* 149:12-13
- Inoue K, Sewalt VJ, Balance GM, Ni W, Sturzen C, Dixon RA (1998) Developmental expression and substrate specificities of α,α -caffeic acid-3-*O*-methyltransferase and caffeoylcoenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol* 117:761-770
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogous, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agr Biol Chem* 43:2493-2498

- Jones NL, Shabib S, Sherman PM (1997) Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 146:223-227
- Johnson EL, Majors RE, Werum L, Reiche P (1979) The determination of naturally occurring capsaicins by HPLC, En: Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages, Vol.1, Charalambous G, Ed., Academic Press, NY
- Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. Cell 108:421-30
- Jurenitsch J, Leinmuller R (1980) Quantification of nonyllic acid vanillylamide and other capsaicinoids in the pungent principle of *capsicum* fruits and preparation by gas liquid chromatography on glass capillary columns (in German) J Chromatogr 189:389-393
- Jurenitsch J, Bingler E, Becker H, Kubelka W (1979) Simple HPLC methods for determination of total and single capsaicinoids in *Capsicum* fruits (in German). Planta Medica 36:54
- Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, Gandal M et al. (2004) Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. J. Clin. Invest. 113:1344-1352
- Karnka R, Rayanakorn M, Watanesk S, Vaneesorn Y (2002) Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. Anal Sci 18:661-665
- Kim M, Kim S, Kim S, Kim BD (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. Mol Cells 11:213-219
- Kozukue N, Han J, Lee S, Kim J, Lee K, Park M, Levin CE, Friedman M (2005) Analysis of seven capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by liquid chromatography-mass spectrometry. J Agric Food Chem 53:9172-9181
- Krajewska AM, Powers JJ (1988) Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. J. Food Sci 53:902-905
- Kress M, Zeilhofer HU (1999) Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. TiPS 20:112-118
- Kurita S, Kitagawa E, Kim CH, Momose Y, Iwahashi H (2002) Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray. Biosci Biotechnol Biochem 66:532-536
- Laborde JA, Pozo O (1984) En: Presente y pasado del chile en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Mexico. N° 85, pp. 9-17
- Lazzeri M, Beneforti P, Benaim G, Maggi CA, Lecci A, Turini D (1996) Intravesical capsaicin for treatment of severe bladder pain: a randomized placebo controlled study. J Urol 156:947-952
- Lee CJ, Yoo EY, Shin JH, Lee J, Hwang HS, Kim BD (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the Capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. Mol Cells 19:262-267

- Lee KR, Suzuki T, Kobashi M, Hasegawa K, Iwai K (1976) Quantitative micro analysis of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *J Chromatogr* 123:119-128
- Leete E, Loudem MCL (1968) Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J Am Chem Soc* 90:6837-6841
- Lejeune MP, Kovacs EM, Westerterp-Plantenga MS (2003) Effect of capsaicin on substrate oxidation and weight maintenance after modest body-weight loss in human subjects. *Br J Nutr* 90:651-659
- Levey DJ, Tewksbury JJ, Cipollini ML, Carlo TA (2006) A field test of the directed deterrence hypothesis in two species of wild chili. *Oecología* 150:61-68
- Lindsey K, Bosland PW (1995) A field study of environmental interaction on pungency. *Capsicum Eggplant Nswl* 14:36-38
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, Jahn MK (1999) Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics* 152:1183-1202
- Loaiza-Figueroa F, Tanksley SD (1988) Genetic of a second locus determining pungency in chili peppers *capsicum*. *J Heredity* 79:314-315
- Maillard MN, Giampaoli P, Richard HMJ (1997) Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour Fragrance J* 12:409-413
- Manirakiza P, Covaci A, schepens P (1999) Solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric determination of capsaicin and some of its analogues from chilli peppers (*Capsicum* spp.) *J. Assoc. Off Anal Chem Int* 82:1399-1405
- MAPA (2005) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, [http:// www.mapa.es](http://www.mapa.es), <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/Denominacion>
- McLeod MJ, Guttman SI, Eshbaugh WH (1982) Early evolution of chile peppers (*Capsicum*). *Econ Bot* 36:361-386
- Minamiyama Y, Kinoshita S, Inaba K, Inoue M (2005) Development of a cleaved amplified sequence (CAPS) marker linked to pungency in pepper. *Plant Breed* 124:288-291
- Moscone EA, Baranyi M, Ebert I, Greilhuber J, Ehrendorfer F, Hunziker AT (2003) Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Ann Bot* 92:21-29
- Moscone EA, Loidl J, Ehrendorfer F, Hunziker AT (1995) Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer J Bot* 82:276-287
- Nuez F, Gil Ortega R, Costa J (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajis. Ediciones Mundi –Prensa, pp 16-17
- Ohta Y (1962) Physiological and genetical studies on the pungency of *Capsicum*, V. Inheritance of pungency. *Jap Jour Genet* 37:169-175
- Okere CO, Waterhouse BD (2004) Capsaicin increases GFAP and glutamine synthetase immunoreactivity in rat arcuate nucleus and median eminence. *Neuroreport* 15:255-8
- Pénczes I (1967) A Magyar fuszertpaprika (Hungarian Specie Paprika). Budapest, Akadémiai Kiadó

- Perry L, Dickau R, Zarrillo S, Holst I, Pearsall DM, Piperno DR, Berman MJ et al. (2007) Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* 314:986-988
- Pickersgill B (1969) En: The domestication of chili peppers. The domestication and exploitation of plants and animal. London University Press, pp. 443-450
- Pickersgill B (1984) En: Pre-Columbian plant migration, Stone D, Ed., Harvard University Press, Cambridge, MA, pp. 105-123
- Pickersgill B, Heiser CB, McNeill J (1979) Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. En: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD, Eds., The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Linnean Society Symposium 7. London: Academic Press, pp. 678-700
- Prasad BCN, Kumar V, Gururaj HB, Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA (2006) Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13315-13320
- Prescott ED, Julius D (2003) A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300:1284-1288
- Ramos PJ (1979) Further study of the spectrophotometric determination of capsaicin. *J Assn Offic Anal Chem* 62:1168-1170
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS (2001) Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin *capsicum* and pepper spray products. *J Forensic Sci* 46:502-509
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA (2002) Determination of capsaicin, nonivamide and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 26:313-319
- Rymal KS, Cosper RD, Smith DA (1984) Injection-extraction procedure for rapid determination of relative pungency in fresh jalapeño peppers. *J Assn Offic Anal Chem* 67:658-659
- Sato K, Sasaki SS, Goda Y, Yamada T, Nunomura O, Ishikawa K, Maitani T (1999) Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*. *J Agric Food Chem* 47:4665-4668
- Schweiggert U, Carle R, Schieber A (2006) Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 557:236-244
- Scoville WL (1912) Note *Capsicum*. *J Amer Pharm Assn* 1:453
- Stewart C, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyl-transferase. *Plant J* 42:675-688
- Stewart C, Mazourek M, Stellari GM, O'Connell M, Jahn MM (2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. *Plant J* 58:979-991
- Sticher O, Soldati F, Joshi RK (1978) High performance liquid chromatography separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and

- homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures of *Capsicum* fruits (in German). *J Chromatogr* 166:221
- Snyman T, Stewart MJ, Steenkamp V (2001) A fatal case of pepper poisoning. *Forensic Sci Int* 124:43
- Stebbins G (1971) En: Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Publishing London. pp 215
- Sukrasno N, Yeoman MM (1993) Phenyl propanoid pathway metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* 32:839-844
- Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51:159-212
- Tanksley SD, Bernatzky R, Lapitan NL, Prince JP (1988) Conservation of gene repertoire but gene order in pepper and tomato. *Proc Natl Acad Sci* 85:6419-6423
- Tewksbury J, Nabhan GP (2001) Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature* 412:403-404
- Thomas BV, Shreiber AA, Weisskopf CP (1988) Simple method for quantification of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography. *J Agric Food Chem* 46:2655-2663
- Thompson RQ, Phinney KW, Welch MJ, White VE (2005) Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 381:1441-1451
- Todd P Jr, Bensinger M, Biftu T (1975) TLC screening techniques for the qualitative determination of natural and synthetic capsaicinoids. *J Chromatogr Sci* 13:577-579
- Todd PH, Bensinger MG, Biftu T (1977) Determination of pungency due to capsaicin by gas-liquid chromatography. *J Food Sci* 42:660-665
- Tolan I, Ragoobirsingh D, Morrison EY (2004) Isolation and purification of the hypoglycaemic principle present in *Capsicum frutescens*. *Phytother Res* 18:95-96
- Trejo-Gonzalez and Wild-Al Tamirano (1973) A new method for the determination of Capsaicin in *Capsicum* fruits. *J Food Sci* 38:342-344
- Tucker SP (2001) Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in air in a pickle and pepper processing plant. *AIHAJ* 62:45-48
- Votaba EJ, Bosland PW (2002) Novel sources of non-pungency in *Capsicum* species. *Capsicum Eggplant Nwsl* 21:66-68
- Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S (1988) Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* 8:3208-3220
- Walsh BM, Hoot SB (2001) Phylogenetic relationship of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear *waxy* introns. *Int J Plant Sci* 162:1409-1418
- Webber H (1911) Preliminary notes on pepper hybrids. *Am Breeders Assoc Annu Report* 7:188-199
- Woodbury JE (1980) Determination of *Capsicum* pungency by high-performance liquid chromatography and spectrofluorometric detection. *J Assn Offic Anal Chem* 63:556-558

Yao J, Nair MG, Chandra A (1994) Supercritical carbon dioxide extraction of scotch bonnet (*Capsicum annuum*) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. *J Agric Food Chem* 42:1303-1305

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

Capítulo 2

DETERMINATION OF CAPSAICIN AND DIHYDROCAPSAICIN IN *Capsicum* FRUITS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - ELECTROSPRAY/TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY ¹

Abstract: A simple, highly selective, sensitive, and reproducible liquid chromatography-electrospray ionization/time of flight mass spectrometry method has been developed for the direct and simultaneous determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit extracts. Capsaicin and dihydrocapsaicin are the two major members of the so-called capsaicinoid family, which includes other minor analogues, and usually account for at least 90% of the pungency trait in *Capsicum* fruits. Chromatographic separation of capsaicin and dihydrocapsaicin was achieved with a reversed-phase chromatography column, using a gradient of methanol and water. Quantification was done using as an internal standard (4,5-dimethoxybenzyl)-4-methyloctamide, a synthetic capsaicin analogue not found in nature. Analytes were base-peak resolved in less than 16 min, and limits of detection were 20 pmol for capsaicin and 4 pmol for dihydrocapsaicin. The intraday repeatability values were lower than 0.5 and 12% for retention time and peak area, respectively, whereas the interday repeatability values were lower than 0.6 and 14% for retention time and peak area, respectively. Analyte recoveries found were 86 and 93% for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively. The method developed has been applied to the identification and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in fruit extracts from different *Capsicum* genotypes, and concentrations found ranged from 2 to 6639 mg/kg.

Keywords: capsaicin, *Capsicum*, dihydrocapsaicin, liquid chromatography, mass spectrometry, pepper, time-of-flight

¹ Garcés-Claver, A.; Arnedo-Andrés, M. S.; Abadía, J.; Gil-Ortega, R.; Álvarez-Fernández, A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography–electrospray/time–of–flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9303–9311 (Anexo 6)

“Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 9303-9311. Copyright 2006 American Chemical Society.”

INTRODUCTION

Fruits of pepper (*Capsicum*) plants are among the most consumed spices throughout the world. These fruits contain capsaicinoids, a family of compounds that give them the characteristic pungent taste. The two major capsaicinoids, capsaicin and dihydrocapsaicin, are responsible for up to 90% of the total pungency of pepper fruits (Bennett and Kirby, 1968; Kobata et al. 1998). Besides capsaicin and dihydrocapsaicin, at least nine minor capsaicinoids (**Figure 2.1**) have been shown to occur in peppers (Rangoonwala, 1969; Rangoonwala and Seitz, 1970; Jurenitsch et al. 1979; Suzuki et al. 1980). Capsaicinoid compounds have been widely studied and are currently used in the food industry, for medical purposes, as pharmaceuticals, and in defensive sprays (Andrews, 1995; Daood et al. 2002; Henry and Emery, 1986; Carmichael, 1991; Schulzeck and Wulf, 1997; NIJTA, 1994; Lee et al. 1996; Caterina et al. 2000).

Capsaicinoids are alkaloids produced by a condensation reaction between an aromatic moiety and a C9-C11 branched-chain fatty acid. The aromatic moiety is vanillylamine, a phenylalanine derivative. Branched-chain fatty acids are biosynthesized from valine and leucine, and in the case of capsaicin and dihydrocapsaicin those acids differ in the degree of unsaturation of the 9-carbon fatty acid side chain (Bennett and Kirby, 1968; Suzuki et al. 1981). Suzuki and Iwai (1984) reviewed aspects related to the chemistry, analysis, biochemistry, and pharmacology of the pungency principle of *Capsicum* spp. Further work on the chemistry and analysis methods for total and individual capsaicinoids has been reviewed by Govindarajan (1986), Anu and Peter (2000), and Pruthi (2003).

Capsaicinoids are synthesized exclusively in the epidermal cells of the placenta of *Capsicum* fruits and are accumulated in blisters along the epidermis (Ohta, 1962; Suzuki et al. 1980; Fujiwake et al. 1982). Their biosynthesis begins approximately 20 days post-anthesis (Iwai et al. 1979), with a number of enzymes being involved in the biosynthetic pathway. The degree of pungency depends on the *Capsicum* species and cultivars, and the capsaicin and dihydrocapsaicin contents can be affected by different factors such as the developmental stage of the fruit (Sukrasno and Yeoman, 1993) and the environmental growth conditions (Lindsey and Bosland, 1995; Estrada et al. 1998; Zewdie and Bosland, 2000). For instance, Kozukue et al. (2005) reported values for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively, ranging from a minimum of 2.6 and 8.2 $\mu\text{g/g}$ of fresh weight (FW) in canned sliced 'Jalapeño' to maxima of 1187 and 771 $\mu\text{g/g}$ of FW in 'Habanero' fresh pepper. The content of capsaicinoids in a given cultivar may differ by as much as 90 mg per fruit depending on environmental factors (Harvell and Bosland, 1997). Phenolic intermediates can influence the biosynthesis of capsaicinoids (Sudhakar and Ravishankar, 1996), and, for instance, it has been demonstrated that 8-methyl-nonenoic acid could have an important regulatory role in the capsaicinoid biosynthesis pathway (Chayapathy et al. 2006).

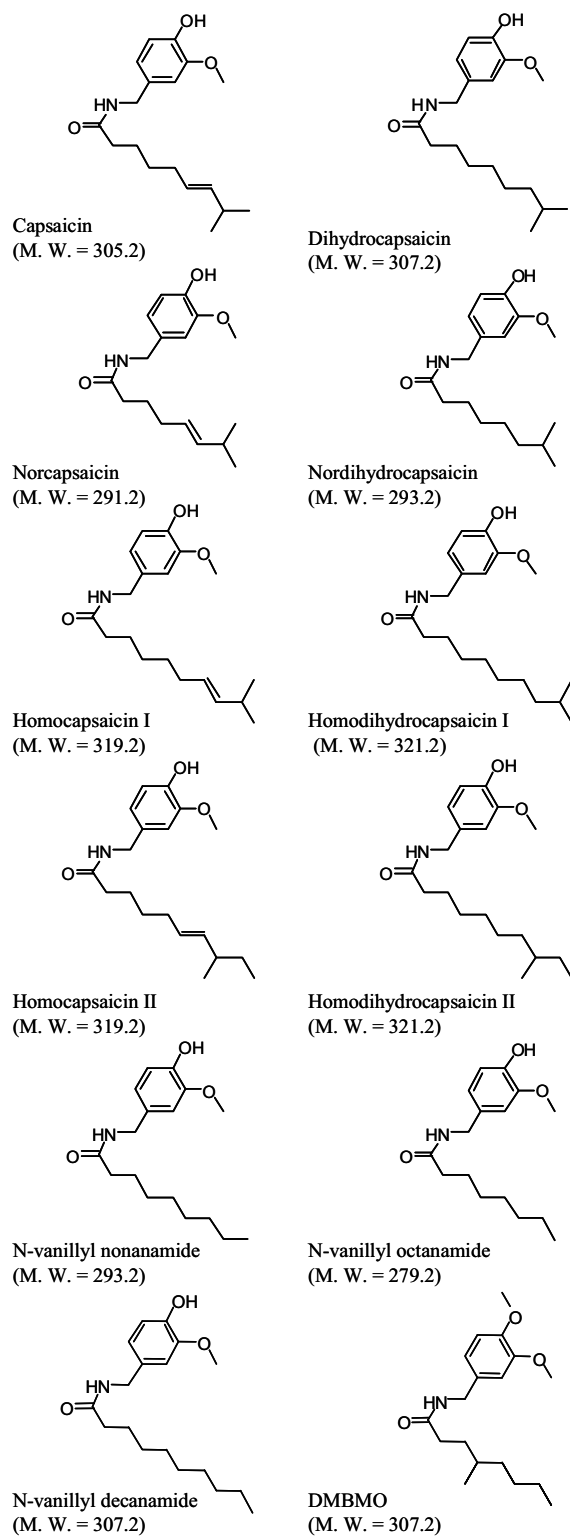


Figure 2.1. Chemical structures and molecular weight (M.W.) of capsaicinoids and DMBMO.

The first method developed to assess the pungency of fruits was the Scoville Organoleptic Test (Scoville, 1912), which estimates pungency (total capsaicinoid concentration) from the burning mouth sensation, using diluted samples and a tasting panel of five individuals. This test is subjective and does not permit the determination of the levels of individual capsaicinoids. Subsequently, capsaicinoids have been analyzed using spectrophotometry (Mori et al. 1976; Ramos, 1979; Bajaj, 1980; Rymal et al. 1984) and near-infrared reflectance spectroscopy (NIR) (Iwamoto et al. 1984; Samson et al. 1997). Techniques used to separate capsaicinoids include paper chromatography (Trejo-Gonzalez and Wild-Al Tamirano, 1973), capillary gas chromatography (Krajewska and Powers, 1988; Hawer et al. 1994) and especially high-performance liquid chromatography (HPLC). The latter technique has been often coupled to UV-Vis spectroscopy (Sticher et al. 1978; Johnson et al. 1979; Woodbury, 1980; Hoffman et al. 1983; ASTA, 1985; Weaver and Awde, 1986; Collins et al. 1995; Maillard et al. 1997; Wall and Bosland, 1998; Karnka et al. 2002; Thompson et al. 2005a). Although HPLC-UV methods have been used successfully, they have limited selectivity and sensitivity.

The most recent methods for the determination of capsaicinoids have used HPLC coupled to more selective techniques such as mass spectrometry (Kozukue et al. 2005; Reilly et al. 2002; Thompson et al. 2005b; Schweiggert et al. 2006). Mass spectrometry had already been used to determine capsaicinoids in the past using off-line monitoring of HPLC effluents (Heresch and Jurenitsch, 1979), HPLC-MS (Games et al. 1984), and field-desorption (van Der Greef et al. 1985). In the past decade, capsaicinoid analytical techniques have been developed by using ionization techniques that permit HPLC-MS coupling, such as atmospheric pressure chemical ionization (APCI) (Schweiggert et al. 2006; de Wasch et al. 2001) and electrospray (ESI) interfaces (Kozukue et al. 2005; Reilly et al. 2001), using ion-trap or quadrupole mass spectrometers. The high selectivity of HPLC-MS techniques could possibly be applied to determine directly the concentrations of minor capsaicinoids in pepper fruits. Methods have been developed for different matrices, such as self-defense materials (Reilly et al. 2001), *Capsicum* oleoresin (Cooper et al. 1991), and capsaicinoid-exposed blood (Reilly et al. 2001). As far as we are aware, no reports on the determination of capsaicinoids in *Capsicum* fruits have been developed using time-of-flight MS [MS(TOF)], a technique that allows the determination of exact mass and is capable of isotopic resolution in the whole mass range without compromising sensitivity (Choi et al. 2003).

This study was aimed to develop and validate a selective and sensitive HPLC-ESI/MS(TOF) analytical method, allowing the identification and accurate quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin, the two major capsaicinoids in *Capsicum* fruits. The method would be particularly suitable to routinely analyze capsaicinoids in breeding programs and may be used to determine the concentrations of other minor capsaicinoids once appropriate standards are available.

MATERIALS AND METHODS

Chemical and reagents

All eluents, buffers, and standard solutions were prepared with analytical grade type I water (Milli-Q Synthesis, Millipore, Bedford, MA). Capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-*trans*-6-nonenamide) ($\geq 97\%$), dihydrocapsaicin (8-methyl-*N*-vanillylnonamide) ($\geq 90\%$), formic acid (50%), methanol ($\geq 99.9\%$, LC-MS grade), acetonitrile (LC-MS grade), 2-propanol (LC-MS grade), lithium hydroxide monohydrate (99.995%), methionine (99%), and leucine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The capsaicin analogue (4,5-dimethoxybenzyl)-4-methyloctamide (DMBMO) was synthesized according to the method of Cooper et al. (1991) and used as an internal standard. The identity of DMBMO was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry, and its purity was $>98\%$. Labeled KNO_3 (10% ^{15}N) and NH_4NO_3 (5% ^{15}N) were purchased from Cambridge Isotopes Laboratory (Andover, MA). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and Fe(III)-EDTA were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and NH_4NO_3 and $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ were purchased from Sigma-Aldrich. KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain).

Standard preparations

Solutions for tuning the ESI-MS(TOF) were (i) 10 mM LiOH, 0.2% (v/v) formic acid, and 50% (v/v) 2-propanol and (ii) 1 μM leucine-enkephalin, 20 μM methionine, 5 μM glutathione, 0.1% (v/v) formic acid, and 50% (v/v) methanol.

Standard 1 mM stock solutions of capsaicin and dihydrocapsaicin were prepared by dissolving the appropriate quantity of each compound in 5 ml of acetonitrile. Stock solutions of 1 mM DMBMO were prepared in 5 ml of methanol. All standards were prepared in triplicate and were stored at -20°C .

Plant material

Eleven *Capsicum* spp. genotypes were analyzed, covering the whole range of pepper fruit pungency. These included two non-pungent *C. annuum* genotypes ('Yolo Wonder' and 'Jupiter'), five pungent *C. annuum* genotypes ['Agridulce', 'Sincap', 'Serrano Criollo de Morelos-334' (SCM-334), 'Nigrum' and 'Perennial'], three pungent *C. chinense* cultivars ('Chinense Sweet', 'Orange Habanero', and

‘Mild Habanero’), and one pungent *C. frutescens* cultivar (‘Tabasco’). Plants were grown in a climatized greenhouse in black plastic pots, 11 cm in diameter (one plant per pot), containing a substrate mixture of peat, sand, clay-loam soil, and Humin Substrat (Klasman-Deilmann, Geeste, Germany) (1:1:1:1, v:v). Two grams of a slow-release fertilizer (Osmocote 16N-4P-9K, Scotts, Tarragona, Spain) was top-dressed on each pot. Plants were watered daily to maintain optimum growth, and the average maximum and minimum temperatures in the greenhouse during the growth period were 27.3 and 19.3 °C, respectively.

¹⁵N-labeled pepper fruits were obtained in a hydroponics system. Germinated seeds of ‘Habanero’ were transferred to hydroponic boxes (18 × 18 × 11 cm) filled with a continuously aerated nutrient solution containing (in mM) 2.25 Ca(NO₃)₂, 2.5 KNO₃, 1.0 MgSO₄, 1.0 KH₂PO₄, 0.25 NH₄NO₃, and (in μM) 45 Fe(III)-EDTA, 23.1 H₃BO₃, 4.6 MnCl₂, 1.2 ZnSO₄, 0.19 CuSO₂, 0.06 Na₂MoO₄. Plants were grown in a growth chamber under a 16/8 h light/dark regime and at 25 °C. To obtain ¹⁵N-labeled capsaicinoids some plants were grown in nutrient solution containing 2.5 mM KNO₃ (10% ¹⁵N) and 0.25 mM NH₄NO₃ (5% ¹⁵N as ¹⁵NH₄¹⁵NO₃).

Extraction of capsaicinoids

The fruits were oven-dried at 55 °C for 4-5 days and then ground in a Polytron grinder. One hundred milligrams of dried tissue samples was extracted with 1 ml of pure acetonitrile, containing a small amount of the internal standard DMBMO. Acetonitrile was used for extraction because it gives a high extraction rate while leading to a minimum level of impurities (Karnka et al. 2002). The final concentration of DMBMO was 5 μM. The suspension of dried powder in acetonitrile was constantly shaken at room temperature for 1 h (orbital shaker from New Brunswick Scientific, Edison, NJ, operating at 250 rpm), and then heated in a water bath without shaking at 65 °C for 1 h. The mixture was then shaken again at room temperature for another hour in the conditions indicated above. Then, the suspension was centrifuged for 15 min at 16000 g, and the supernatant was collected and brought to a volume of 1 ml with acetonitrile. Finally, the supernatant was filtered successively through 0.45 and 0.22 μm PVDF membrane filters (Millipore, Bedford, MA) before analysis. Three replicates of each extract were carried out.

HPLC-ESI/MS(TOF) analysis

Analyses were carried out with a BioTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA) coaxial multipass time-of-flight mass spectrometer [MS(TOF)] equipped with

an Apollo electrospray ionization source (ESI) and coupled to a Waters Alliance 2795 HPLC system (Waters, Milford, MA).

The BioTOF II was operated with endplate and spray tip potentials at 2.8 and 3.3 kV, respectively, in the positive ion mode, and at 3.0 and 3.5 kV, respectively, in the negative ion mode. Drying gas (N₂) and nebulizer pressures were kept at 30 and 60 psi, respectively. The mass axis was calibrated using lithium-formate adducts in negative ion mode and a mixture of 1 μM leucine-enkephalinin and 20 μM methionine in positive ion mode. Spectra were acquired in the 100-500 mass/charge ratio (*m/z*) range.

To optimize the MS signal, direct injection of 10 μM capsaicin and dihydrocapsaicin standards was carried out using a syringe pump (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL) operated at 2 μl/min. Capillary voltage and gas drying temperature were tested in the ranges of 60-120 V and 150-250 °C, respectively, and final values chosen as optimal were 90 V for capillary voltage and 200 °C for gas temperature.

Samples were chromatographed using a Waters Symmetry C18 column (4.6 × 250 mm; 5 μm) coupled with a Waters Symmetry C18 guard column (3.9 × 20 mm; 5 μm). The autosampler and column were maintained at 4 and 30 °C, respectively, and the injection volume was 20 μl. Capsaicinoids were eluted using a gradient of methanol and Milli-Q water and a flow rate gradient between 0.9 and 1.8 ml/min (**Table 2.1**). After each injection, the column was re-equilibrated for 10 min with 30% water/70% methanol, at a flow rate of 0.9 ml/min. Total analysis run time was 40 min.

Table 2.1. Elution profile for the HPLC-ESI/MS(TOF) method developed to analyze capsaicinoids.

HPLC solvent gradient		HPLC flow gradient	
Time (min)	Methanol (%)	Time (min)	Flow (ml/min)
0	70	0	0.9
11	70	14	0.9
12	80	16	1.3
13	100	18	1.6
27	100	22	1.8
30	70	24	1.3
40	70	26	0.9

The gradient was designed to improve the separation of analytes, and a flow rate gradient was included in order to obtain optimal column cleaning and equilibration.

The exit flow from the column was split with a T-connector (Upchurch, Oak Harbor, WA) that led 9.4% of the total efflux (85-170 $\mu\text{l}/\text{min}$) from the HPLC to the ESI interface of the MS(TOF) apparatus.

The system was controlled with the software packages BioTOF v. 2.2 (Bruker Daltonics) and Hyphenation Star v.2.3 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Data were processed with Data Analysis v.3.2 software (Bruker Daltonik).

Validation was carried out by obtaining calibration curves corrected with DMBMO as an internal standard, limits of detection [LOD, signal to noise (S/N) ratio of 3], limits of quantification [LOQ, signal-to-noise (S/N) ratio of 10], intra- and interday repeatabilities and recoveries using as a matrix an extract of *Capsicum* fruits.

RESULTS

ESI/MS(TOF) analysis

Negative ion mode ESI/MS(TOF) spectra of standard analyte solutions showed major $[\text{M} - \text{H}]^{-1}$ ions at m/z 304.2 for capsaicin (**Figure 2.2A**), m/z 306.2 for dihydrocapsaicin (**Figure 2.2B**), and m/z 306.2 for DMBMO (**Figure 2.2C**). The latter compound was used as internal standard in further experiments. Positive ion mode ESI/MS(TOF) spectra showed major $[\text{M} + \text{H}]^{+1}$ ions at m/z values of 306.2 for capsaicin and 308.2 for dihydrocapsaicin (data not shown). Ionization for both compounds was less intense in the positive than in the negative mode, the intensity of the $[\text{M} + \text{H}]^{+1}$ ions being 75 and 94% lower than those of the $[\text{M} - \text{H}]^{-1}$ ions for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively. Therefore, the negative ion mode was chosen for further experiments.

HPLC-ESI/MS(TOF) analysis

Analytes were separated with a solvent and flow elution gradient in a C18 column, and mass spectra were acquired by using ESI/MS(TOF) in the m/z 200 to 400 range during the whole chromatographic run, obtaining 3-D chromatograms (time, m/z , and intensity). Ion chromatograms were extracted for the exact m/z values corresponding to the $[\text{M} - \text{H}]^{-1}$ species of each analyte and the compound

used as internal standard (**Figure 2.3**). Results show that the HPLC-ESI/MS(TOF) method developed is capable of resolving adequately capsaicin, DMBMO, and dihydrocapsaicin when present in a combined standard solution, with retention times of 11.6 (**Figure 2.3A**), 14.0, and 15.2 min (**Figure 2.3B**), respectively. The resolution (R_s) of dihydrocapsaicin and DMBMO (defined as 2 times the separation between peaks divided by the sum of base peak widths) was 1.2, a value that can be considered as adequate. Separation time for all compounds was approximately 16 min, with column washing and regeneration accounting for 24 min more, leading to a total analysis time of 40 min.

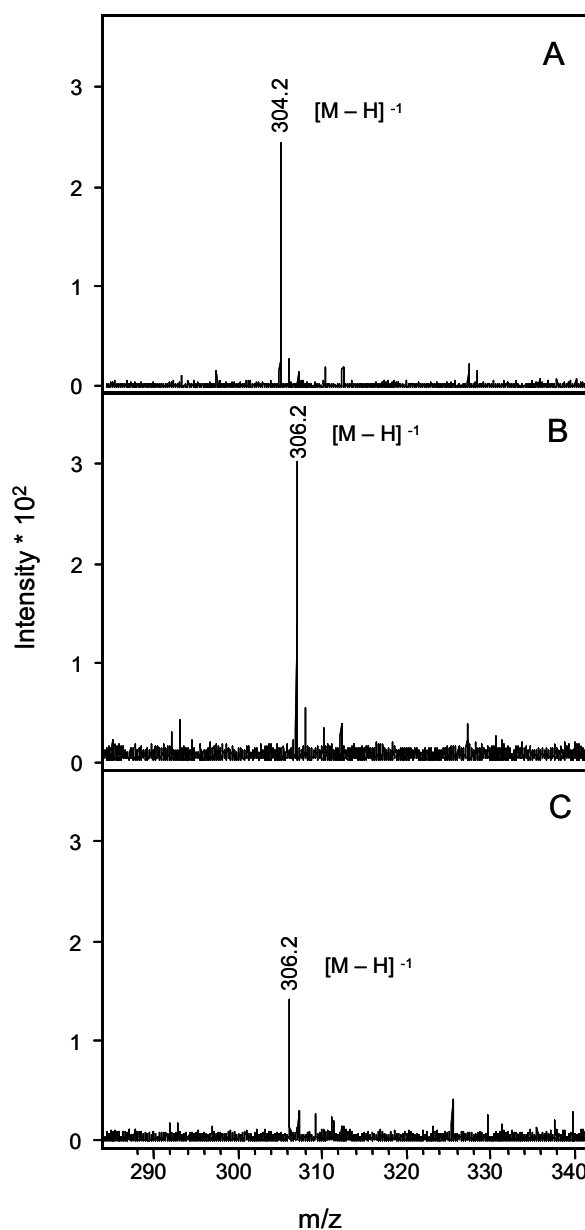


Figure 2.2. ESI/MS(TOF) mass spectra in negative-ion mode of standard solutions in 70% methanol: 30 μ M capsaicin (**A**), 30 μ M dihydrocapsaicin (**B**) and 30 μ M DMBMO (**C**).

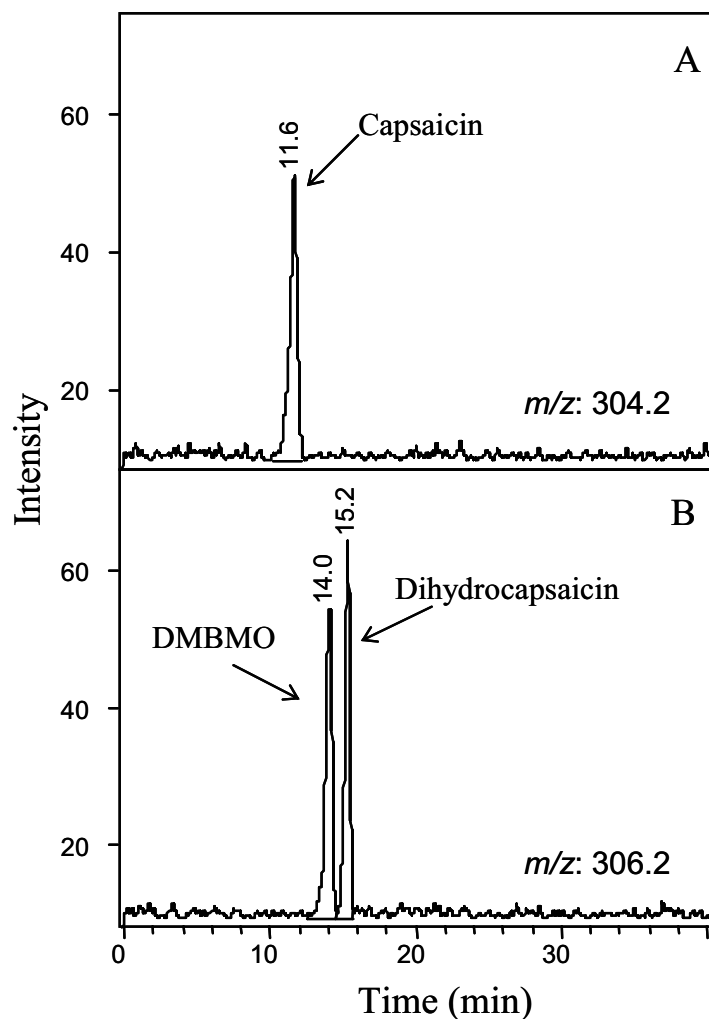


Figure 2.3. HPLC-ESI/MS(TOF) chromatograms in negative-ion mode of a combined standard solution of 10 μM capsaicin (**A**), 5 μM DMBMO (**B**) and 10 μM dihydrocapsaicin (**B**) in 100% acetonitrile.

Validation of the HPLC-ESI/MS(TOF) method

The HPLC-ESI/MS(TOF) method was validated by using analyte solutions in acetonitrile. Calibration curves corrected using DMBMO as internal standard, LODs, LOQs, and intra- and interday repeatability and recoveries were measured. Extracts of fruits from different *Capsicum* genotypes were also analyzed.

Standard solutions were prepared in acetonitrile in the range of 0.5-60 μM . Calibration curves, corrected by internal standardization, were obtained by plotting the peak area ratio (analyte/internal standard) against concentration. Data fit well to a second-degree polynomial regression, both for capsaicin (R^2 of 0.964; **Figure 2.4A**) and dihydrocapsaicin (R^2 of 0.942; **Figure 2.4B**). The calibration curves were linear from the LOQ values to 30 μM , for both capsaicin and dihydrocapsaicin.

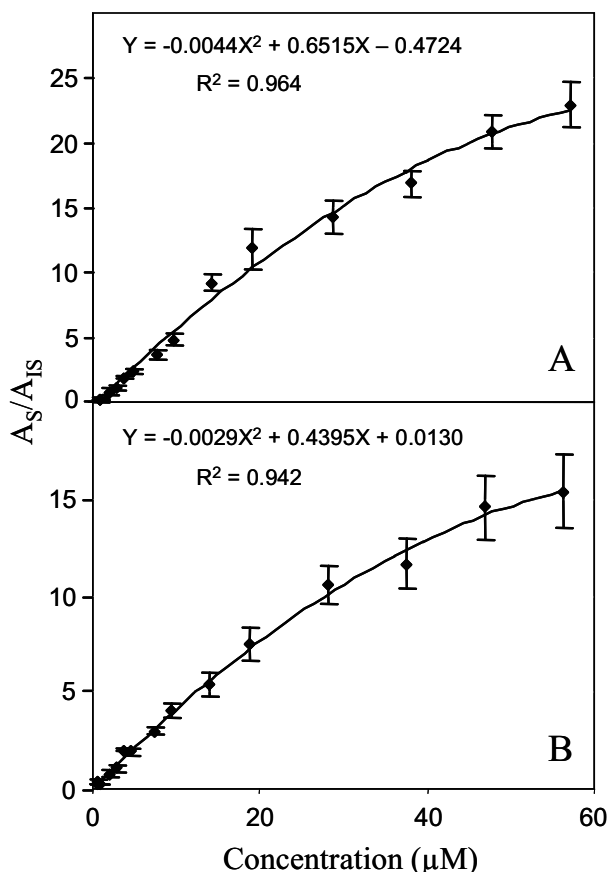


Figure 2.4. Calibration curves for capsaicin (**A**) and dihydrocapsaicin (**B**) obtained by plotting the peak area ratio (sample area/area of the internal standard; A_S/A_{IS}) vs. the analyte concentration injected. The concentration of internal standard was 5 μM . Solutions were made in 100% acetonitrile. Bars are SE for triplicate measurements.

LOD, defined as the analyte amount giving a S/N ratio of 3, was better for dihydrocapsaicin (4 pmol) than for capsaicin (20 pmol). Using a 20- μl injection volume, these values are equivalent to analyte concentrations in the injected sample solution of 0.2 μM for dihydrocapsaicin and 1 μM for capsaicin. LOQ values, defined as the amounts giving a S/N ratio of 10, were 60 pmol for capsaicin and 12 pmol for dihydrocapsaicin.

The intraday repeatability for retention time and peak area ratio was evaluated using 10 consecutive analyses with two different levels of concentrations for each analyte, whereas the interday repeatability was evaluated by analyzing the same standard solutions for 10 consecutive days (**Table 2.2**). The relative standard deviation (RSD) for peak retention time was always lower than 0.5% in the intraday test and 0.6% in the interday test. The RSD for peak area ratio was in the range of 5.3-11.9% in the intraday test and between 9.2 and 13.5% in the case of the interday test. The RSD for DMBMO peak retention time was always lower than 0.7%.

Table 2.2. Intra- (n = 10) and interday (n = 10) repeatability for retention times (R.T.) and peak area ratios (A_S/A_{IS}) of the HPLC-ESI/MS(TOF) method developed. DMBMO (internal standard) was used at a concentration of 5 μM .

Analyte	Concentration (μM)	RSD (%)			
		Intraday		Interday	
		R.T. (min)	A_S/A_{IS}	R.T. (min)	A_S/A_{IS}
Capsaicin					
	4	0.42	11.9	0.57	9.6
	20	0.36	5.3	0.49	9.2
Dihydrocapsaicin					
	2	0.01	5.4	0.21	13.5
	20	0.01	8.7	0.44	10.2

Recovery assays were carried out for capsaicin and dihydrocapsaicin by spiking fruit extracts of the ‘SCM-334’ genotype with known amounts of both analyte standards and the internal standard (DMBMO). Recovery was calculated by dividing the amount of analyte found in the spiked sample by the sum of the amount found in the sample plus the amount added. Analyte recoveries found were between 78.7 and 94.9% (**Table 2.3**).

Table 2.3. Recoveries obtained for capsaicin and dihydrocapsaicin, using extracts of pepper fruits from the ‘SCM-334’ genotype spiked with solutions containing the amount of standard analytes indicated below. Results are means \pm SE (n = 5).

	Amount added (μM)	Amount found (μM)	Recovery (%)
Capsaicin			
	0	18.0 \pm 0.2	
	4.8 \pm 0.2	21.8 \pm 0.2	78.7 \pm 0.8
	21.3 \pm 1.9	37.7 \pm 0.2	92.4 \pm 0.4
Dihydrocapsaicin			
	0	22.0 \pm 0.6	
	5.9 \pm 0.4	27.2 \pm 1.2	90.3 \pm 3.1
	37.2 \pm 1.5	55.8 \pm 0.2	94.9 \pm 1.5

Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in fruits extracts

A chromatogram example of an extract of ‘Orange Habanero’ fruits grown in normal nutrient solution (not enriched with ^{15}N) is shown in **Figure 2.5A**. Three peaks, corresponding to capsaicin, DMBMO and dihydrocapsaicin, were detected at retention times of 11.6, 14.0, and 15.2 min, respectively. The resolution of the MS(TOF) detector used is higher than 10000 fwhm (full width at half mass), and therefore the MS(TOF) spectra provide information on the elemental isotopic distribution of any compound detected in the chromatographic run. The two insets of **Figure 2.5A** show the zoomed mass spectra of the peaks corresponding to capsaicin and dihydrocapsaicin, with the corresponding major $[\text{M} - \text{H}]^{-1}$ ions at 304.2 and 306.2. These spectra also show minor peaks at 305.2 and 307.2, due to the natural isotopic composition of the analytes (mainly due to the presence of ^{15}N and ^{13}C isotopes).

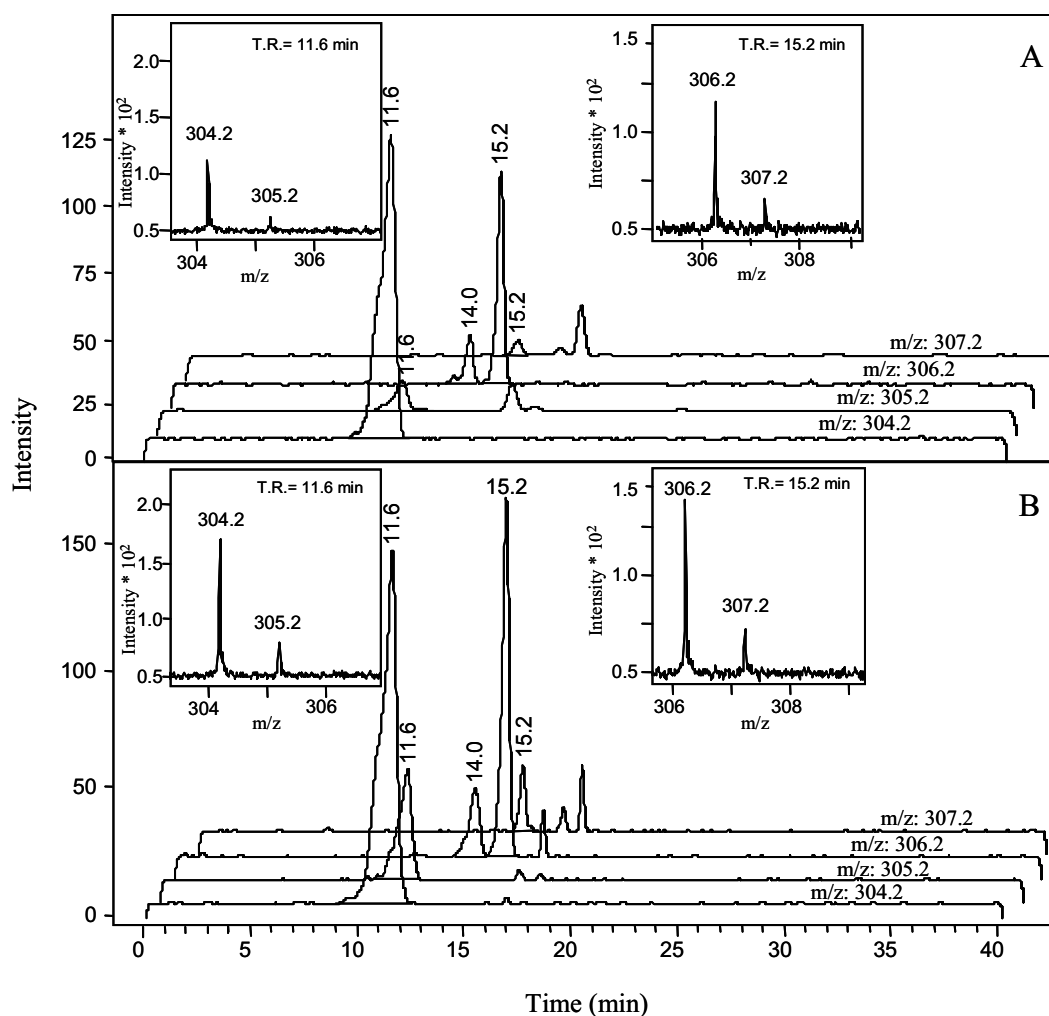


Figure 2.5. HPLC-ESI/MS(TOF) chromatograms in negative-ion mode of fruit extracts from ‘Orange Habanero’ plants grown in normal, control nutrient solution (A) and in nutrient solution enriched with ^{15}N (B).

When pepper plants were grown in a ^{15}N -enriched nutrient solution, the m/z signals at 305.2 and 307.2 increased relative to the signals at m/z 304.2 and 306.2 (**Figure 2.5B**). The peak area ratios 304.2/305.2 (capsaicin) and 306.2/307.2 (dihydrocapsaicin) were approximately 2-fold lower in fruits from plants grown in ^{15}N -enriched nutrient solution as compared to those from fruits grown in normal nutrient solutions (**Table 2.4**). The peak area ratios 304.2/305.2 and 306.2/307.2 were not significantly different in standard solutions of capsaicin and dihydrocapsaicin and in extracts of fruits from plants grown in normal nutrient solution.

Table 2.4. Peak area ratios 304.2/305.2 m/z (corresponding to capsaicin) and 306.2/307.2 (corresponding to dihydrocapsaicin) for standard solutions, ‘Orange Habanero’ fruit extracts from plant grown in normal (control) solution and ^{15}N -enriched nutrient solution. Values are means \pm SE (n = 3). Means followed by different letters in the same column are significantly different (P < 0.05).

	Peak are ratio	
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin
Standard	11.2 \pm 1.5 a	9.1 \pm 2.0 a
Control	11.1 \pm 0.5 a	10.9 \pm 0.8 a
^{15}N -enriched	5.3 \pm 0.3 b	6.1 \pm 0.6 b

Although commercial standards of minor capsaicinoids are not available yet, the chromatogram of ‘Orange Habanero’ fruit extract shows a peak at 16.1 min (m/z 320.2), which could be putatively attributed to the $[\text{M} - \text{H}]^{-1}$ ion of any of the homodihydrocapsaicin isomers, and a peak at 17.0 min (m/z 306.2) that could be putatively attributed to the $[\text{M} - \text{H}]^{-1}$ ion of *N*-vanillyl-decanamide (**Figure 2.6**). In the latter case, a good separation between this compound, dihydrocapsaicin, and DMBMO, all three having the same molecular mass, was obtained. Of course, other techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy would be necessary to identify unequivocally these two chromatographic peaks.

A number of *Capsicum* genotypes differing in pungency level have been analyzed for capsaicin and dihydrocapsaicin with the method developed, and results are shown in **Table 2.5**. Concentrations found were in the range of 8-6639 mg/kg of dried fruit for capsaicin and 2-3727 mg/kg of dried fruit for dihydrocapsaicin. The genotype ‘Orange Habanero’ contained the highest concentrations, and, as expected, neither capsaicin nor dihydrocapsaicin was detected in ‘Yolo Wonder’ and ‘Jupiter’, because both varieties are considered to be non-pungent. In the case of ‘Sincap’ only dihydrocapsaicin was detected, and this could be expected because this variety was selected by its low level of pungency (González, 1999). The capsaicin and dihydrocapsaicin contents are associated with the level of pungency, so these results show that the 11 genotypes studied can be classified into four

categories: non-pungent ('Yolo Wonder' and 'Jupiter'), slightly pungent ('Sincap' and 'Agridulce'), pungent ('Sweet Chinense', 'Mild Habanero', 'Perennial', 'Nigrum', 'Tabasco'), and extremely pungent ('Orange Habanero').

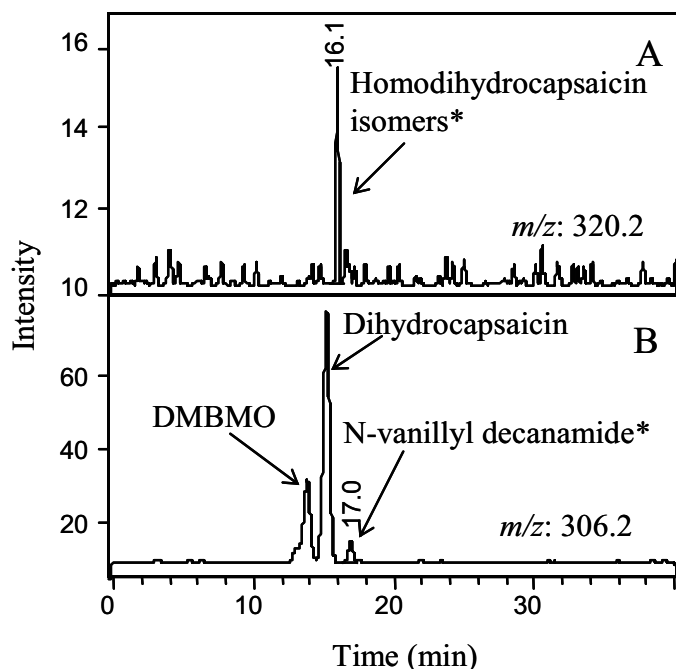


Figure 2.6. Chromatograms at 320.2 (A) and 306.3 (B) m/z of fruit extracts from 'Orange Habanero' plants grown in normal, control nutrient solution. (*): putative assignment.

Table 2.5. Concentrations of capsaicin and dihydrocapsaicin in different *Capsicum* genotypes determined by the HPLC-ESI/MS(TOF) method developed. Values are means \pm SE ($n = 3$) (ND, not detected, below LOD; DW, dry weight).

Genotype	Capsaicin (mg/kg DW)	Dihydrocapsaicin (mg/kg DW)
Yolo Wonder	ND	ND
Jupiter	ND	ND
Sincap	ND	2.3 \pm 0.2
Agridulce	8.7 \pm 0.1	8.3 \pm 0.8
Sweet Chinense	16.5 \pm 0.2	12.9 \pm 1.8
Mild Habanero	17.7 \pm 1.6	13.4 \pm 2.4
Perennial	164 \pm 7	192 \pm 8
Nigrum	905 \pm 41	1468 \pm 81
Tabasco	3785 \pm 235	2461 \pm 80
Orange Habanero	6639 \pm 348	3727 \pm 179

DISCUSSION

Two members of the capsaicinoid family, capsaicin and dihydrocapsaicin, are the main compounds responsible for the pungency of *Capsicum* fruits. Pungency is considered to be one of the major quality factors in the pepper industry, and therefore reliable methods aimed to analyze these compounds are needed. We have developed and validated an HPLC-ESI/MS(TOF) method for the determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in pepper fruit extracts, which includes separation by reverse phase HPLC, ionization by ESI, and highly selective detection of the analytes, using exact mass measurements with a TOF mass spectrometer. This is the first time, to our knowledge, that capsaicin and dihydrocapsaicin have been determined by an HPLC-ESI/MS method using a TOF mass spectrometer. This method can be applied in routine analysis in breeding programs and also in metabolic tracing studies. The number of analyses per day in routine batches would be approximately 35, with the apparatus running unattended for 5 days (192 samples in total).

The method developed has been validated for capsaicin and dihydrocapsaicin with respect to LODs, LOQs, calibration curves, reproducibility, and analyte recoveries, always using the internal standard DMBMO. Limits of detection obtained were 20 pmol (equivalent to a concentration of 1 μM in the extract) for capsaicin and 4 pmol (equivalent to a concentration of 0.2 μM in the extract) for dihydrocapsaicin. The LODs were better than most of those obtained using HPLC-coupled to UV-Vis, which are in the range of 6 μM (Karnka et al. 2002) to 9 μM (Collins et al. 1995), but not as good as that found with single-quadrupole MS by Thompson et al. (2005b), which are approximately 0.01 pmol (in the range of 3 and 7 pg injected). The lowest LOQ found so far (0.03 μM) was obtained in a HPLC-MS method designed to measure capsaicin and dihydrocapsaicin in forensic sciences by using single-quadrupole MS (Reilly et al. 2001). In these particular applications, very low limits of detection are needed to trace the presence of extremely low amounts of biological and non-biological residues of self-defense spray weapons.

The method repeatability for peak area, with RSD values in the range of 5-14% for intra- and interdays, was similar to those obtained in other HPLC-ESI/MS methods, which were in the ranges of 2-10% (Reilly et al. 2001) and 3-10% (Thompson et al. 2005b) for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively. The recoveries obtained by spiking fruit extracts of the 'SCM-334' cultivar were good, ranging from 79 to 95%, similar to the range (86-114%) found in 'Korean Hansuwi' red pepper using HPLC-ESI/MS with an ion trap mass analyzer (Kozukue et al. 2005). Recoveries somewhat higher (99-103%) were found by Thompson et al. (2005b) using HPLC-ESI/MS with a single-quadrupole MS analyzer.

The contents of capsaicin and dihydrocapsaicin found here for the different pepper genotypes are in good agreement with those found by other authors. According to our results, 'Orange Habanero', one of the most pungent varieties

(Bosland, 1992), had the highest capsaicinoid contents, with values of 6639 and 3727 mg/kg of fruit dry weight (DW) for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively. Considering that DW is approximately 10% of FW, these values are very similar to the values reported for ‘Habanero’ of 660 and 350 $\mu\text{g/g}$ of FW for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively, using HPLC-ESI/MS (Thompson et al. 2005b). Also, these values are within the range obtained with HPLC-UV methods. For instance, values of 2438 and 1621 mg/kg of DW for capsaicin and dihydrocapsaicin, respectively, were found by Cázares-Sánchez et al. (2005), and a capsaicin plus dihydrocapsaicin content of 20069 mg/kg DW was measured by Yazawa et al. (2004) in ‘Habanero’. The dihydrocapsaicin content of ‘Sincap’ (2.3 mg/kg of DW) is within the range of values previously reported (between 2.7 and 27.4 mg/kg of DW) by using HPLC-UV (González, 1999). Although capsaicin is usually the most abundant capsaicinoid, the contents of dihydrocapsaicin were higher than those of capsaicin in the genotypes ‘Sincap’, ‘Perennial’, and ‘Nigrum’. Similar patterns, with dihydrocapsaicin being the predominant capsaicinoid, have already been previously reported in other cultivars of *C. annuum* and *C. pubescens* (Collins and Bosland, 1994). As far as we know, data for capsaicin and dihydrocapsaicin for the rest of the genotypes analyzed have not been reported before.

This method has significant advantages over HPLC-UV methods commonly used to determine capsaicinoids in plant tissue extracts, which are complex matrices. First, MS(TOF) provides a higher reliability for the identification and quantification of compounds, based on the high selectivity provided by the exact m/z ratio of each analyte. For instance, this would rule out the possibility of assigning erroneously a peak to a given capsaicinoid, which could occur when identification is based only on retention time and UV spectra. Second, this method has a higher sensitivity (LODs of 0.2 and 1 μM for dihydrocapsaicin and capsaicin, respectively) than those of most HPLC-UV methods (e.g., LODs of 6 and 9 μM) (Collins et al. 1995; Karnka et al. 2002). Third, the amount of information obtained for each peak (e.g., high resolution mass spectra with isotopic signature) is more extensive than that obtained with HPLC-UV only.

The mass analysis technique used in this work (TOF) differs from that used in quadrupole analyzers, which are most widely used for LC-MS instrumentation (Choi et al. 2003). Quadrupole mass analyzers are scanning instruments, where sensitivity (the maximum S/N ratio) decreases with the mass range to be scanned. In this case, however, sensitivity is very high when only a few specific masses (SIM mode) are scanned. In contrast, TOF analyzers are not scanning instruments and characterize simultaneously the masses of all ions in the full mass range with the same sensitivity. The mass resolution of the quadrupole detectors is generally lower than those of the TOF analyzers, although it can be improved to similar values at the expense of overall signal response. To obtain a signal quality similar to that of high mass resolution instruments such as MS(TOF) with low-resolution mass analyzers, it could be often necessary to apply special sample cleanup procedures to reduce the noise introduced by co-eluted matrix components (Choi et al. 2003). In

the particular case of study a large number of *Capsicum* genotypes for which a relatively large number of capsaicinoids could be present, TOF(MS) would offer the possibility of detecting such compounds while still having sufficient sensitivity to adequately determine the major capsaicinoids capsaicin and dihydrocapsaicin in the full range of *Capsicum* fruit pungency. A higher mass resolution, as given by a TOF detector, can improve the quality of the extracted ion chromatograms, allowing more selective signal acquisition and thereby reducing the noise introduced by co-eluted matrix components.

An additional advantage of the method presented here is the use as an internal standard of a capsaicin analogue not present in natural *Capsicum* fruits, DMBMO, as first proposed by Cooper et al. (1991). ESI-MS analysis usually requires the use of internal standards, to control differences in analyte ionization caused by the complexity of the samples, and some studies have used for this purpose minor capsaicinoids present in fruits such as *N*-vanillyl-octanamide (Reilly et al. 2001). It is unlikely that the chemical differences between DMBMO and capsaicinoids could lead to significant quantification errors, because the ionization behavior of DMBMO in was not very different from those of capsaicin and dihydrocapsaicin (**Figures 2.2 and 2.3**), and the chromatographic conditions were optimized to obtain retention times similar to those of the analytes (DMBMO must be separated from dihydrocapsaicin, because both compounds have the same molecular mass). In fact, the separation between internal standard and the analytes is smaller in our method (**Figure 2.3**) than in previous LC-MS methods using minor capsaicinoids as internal standards (Thompson et al. 2005a; Thompson et al. 2005b; Reilly et al. 2001).

In summary, the method developed permits the direct and simultaneous analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin, the two major capsaicinoids in pepper fruits, with high selectivity and sensitivity and sufficient reproducibility. The method developed has wide possibilities of application. So far, it has been tested with several *Capsicum* genotypes, showing its suitability to perform routine analyses in breeding programs aimed to select accessions with high contents of individual capsaicinoids. In addition, the high resolution of the MS(TOF) spectrometer used also gives information on isotopic distribution, allowing its use as a tool in metabolic studies with stable isotopes. For example, plants subjected to different growth conditions (e.g., light, temperature, stress) can be fed with ¹⁵N labeled compounds to follow the capsaicinoid metabolic pathways. Furthermore, the present method could be used to detect simultaneously other minor capsaicinoids by their exact *m/z* ratio, once appropriate standards are available.

LITERATURE CITED

- American Spice Trade Association (ASTA) (1985) Official analytical methods of the American Spice Trade Association. Amer. Spice Trade Assn. Englewood Cliffs, NJ.
- Andrews J (1995) Peppers, the domesticated capsicums. University of Texas Press, Austin.
- Anu A, Peter KV (2000) The chemistry of paprika. *Indian Spices* 37:15-18
- Bajaj KL (1980) Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits. *J Assoc Off Anal Chem* 63:1314-1316
- Bennett DJ, Kirby GW (1968) Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J Chem Soc C* 442
- Bosland PW (1992) Chiles: a diverse crop. *HortTechnology* 2:6-10
- Carmichael JK (1991) Treatment of herpes zoster and post herpetic neuralgia. *Am Family Physician* 44:203-210
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitk KR, et al. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313
- Cázares-Sánchez E, Ramírez-Vallejo P, Castillo-González F, Soto-Hernández RM, Rodríguez-González MT, Chávez-Servia JL (2005) Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*Capsicum annuum* L.) of east-central Yucatán. *Agrociencia* 39:627-638
- Chayapathy B, Prasad N, Gururaj HB, Kumar V, Giridhar P, Parimalan R, Sharma A, Ravishankar GA (2006) Influence of 8-methyl-nonenoic acid on capsaicin biosynthesis in in-vivo and in-vitro cell cultures of *Capsicum* spp. *J Agric Food Chem* 54:1854-1859
- Choi BK, Hercules DM, Zhang T, Gusev AI (2003) Comparison of quadrupole, time-of-flight, and Fourier transform mass analyzers for LC-MS applications. *Curr. Trends Mass Spectrom* 18:524-531
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30:137-139
- Collins M, Bosland P (1994) Rare and novel capsaicinoid profiles in *Capsicum*. *Capsicum Eggplant Newsl* 13:48-51
- Cooper TH, Guzinski JA, Fisher C (1991) Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in *Capsicum* oleoresins. *J Agric Food Chem* 39:2253-2256
- Daood HG, Illes V, Gnayfeed MH, Meszaros B, Horvath G, Biacs PA (2002) Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and sub critical propane. *J Supercrit Fluids* 23:143-152
- de Wasch K, de Brabander HF, Impens S, Okerman L, Kamel CH (2001) Detection of the major components of *capsicum* oleoresin and zigerone by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biol active Phytochem Food* 269:134-139

- Estrada B, Pomar F, Díaz J, Merino F, Bernal MA (1998) Effects of mineral fertilizer supplementation on fruits development and pungency in “Padrón” peppers. *J Hortic Sci Biotechnol* 73:493-497
- Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K (1982) Capsaicinoids formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric Biol Chem* 46:2591-2592
- Games DE, Alcock N, Greef van Der J, Nyseen L, Maarse H, Ten Noever de Brauw M (1984) Analysis of pepper and *capsicum* oleoresins by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and field desorption mass spectrometry. *J Chromatogr* 294:269-279
- González C (1999) Estudio de la influencia de factores agroclimáticos sobre el contenido en capsicinoides en el pimiento del piquillo. Memoria Final. Centro Nacional Seguridad Alimentaria
- Govindarajan VS (1986) *Capsicum*: production, technology, chemistry and quality. III. Chemistry of the colour, aroma and pungency stimuli. *Crit Rev Food Sci Nutr*.24:245-355
- Harvell KP, Bosland PW (1997) The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *Hortic Sci* 32:1292
- Hawer WS, Ha J, Hwang J, Nam Y (1994) Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography. *Food Chem* 63:1314-1316
- Henry CJ, Emery B (1986) Effect of spiced food on metabolic rate. *Hum Nutr Clin Nutr* 40:165-268
- Heresch, Jurenitsch J (1979) Off-line mass spectrometric monitoring of HPLC-effluents - an improved identification and quantitation method for mixtures of similar compounds: natural capsaicinoids. *Chromatographia* 12:647-650
- Hoffman PG, Lego MC, Galetto WG (1983) Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 31:1326-1330
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different stages of flowering. *Agric Biol Chem* 43:2493-2498
- Iwamoto M, Cho RK, Uozumi J, Lino K (1984) Near infrared reflectance spectrum of red pepper and its applicability to determination of capsaicin content. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 31:120-125
- Johnson EL, Majors RE, Werum L, Reiche P (1979) The determination of naturally occurring capsaicins by HPLC. In *Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages*; Charalambous, G., Ed.; Academic Press: New York, Vol.1
- Jurenitsch J, David M, Heresch G, Kubelka M (1979) Detection and identification of new pungent compounds in fruits of *Capsicum*. *Planta Med* 36:61
- Karnka R, Rayanakorn M, Watanesk S, Vaneesorn Y (2002) Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Anal Sci* 18:661-665

- Kobata K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T (1998) Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 46:1695-1697
- Kosuge S, Furata M (1970) Studies on the pungent principle of *Capsicum*. Part XIV: chemical constitution of the pungent principle. *Agric Biol Chem* 34:248-256
- Kozukue N, Han J, Lee S, Kim J, Lee K, Park M, Levin CE, Friedman M (2005) Analysis of seven capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53:9172-9181
- Krajewska AM, Powers JJ (1988) Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. *J Food Sci* 53:902-905
- Lee RJ, Yolton RL, Yolton DP, Schnider C, Janin ML (1996) Personal defense sprays: effects and management of exposure. *J Am Optometric Assoc* 67:548-560
- Lindsey K, Bosland PW (1995) A field study of environmental interaction on pungency. *Capsicum Eggplant Newsl* 14:36-38
- Maillard MN, Giampaoli P, Richard HMJ (1997) Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour Fragrance J* 12:409-413
- Mori K, Sawada H, Nishiura Y (1976) Determination of pungent principles in *Capsicum* pepper. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 23:199-205
- National Institute of Justice Technology Assessment Program (1994) Oleoresin *Capsicum*: pepper spray as a force alternative
- Ohta Y (1962) Physiological and genetical studies on the pungency of *Capsicum*, IV. Secretory organs, receptacles and distribution of capsaicin in the *Capsicum* fruit. *Jpn J Breed* 12: 43-47
- Pruthi JS (2003) Chemistry and quality control of *Capsicum* and *Capsicum* products. In *Capsicum*; Krishna De, A., Ed.; Taylor and Francis: London, UK; Vol.33, pp 25-70
- Ramos PJ (1979) Further study of the spectrophotometric determination of capsaicin. *J Assoc Off Anal Chem* 62:1168-1170
- Rangoonwala R (1969) Beitrag zur trennung von capsaicin, 'cis-capsaicin', pelargonsaurevanillylamid und dihydrocapsaicin. *J Chromatogr* 41:265-266
- Rangoonwala R., Seitz G (1970) Cis-capsaicin. Ein beitrage zur synthese, analitik und dem vermuteten vorkommen in *Capsicum* fruchten. *Dtsch Apoth Ztg* 110:1946
- Reilly C A, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA (2002) Determination of capsaicin, nonivamide and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 26:313-319
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA (2001) Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defence weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 912:259-267
- Rymal KS, Cospers RD, Smith DA (1984) Injection-extraction procedure for rapid determination of relative pungency in fresh jalapeño peppers. *J Assoc Off Anal Chem* 67:658-659

- Samson CS, Tung-Liang H, Berke T (1997) Use of near infra-red reflectance to measure capsaicinoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Capsicum Eggplant Newsl* 16:56-59
- Schulzeck S, Wulf H (1997) Local therapy with capsaicin or ASS in chronic pain. *Der Schmerz* 11:345-352
- Schweiggert U, Carle R, Schieber A (2006) Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 557:236-244
- Scoville WL (1912) Note *capsicum*. *J Am Pharm Assoc* 1:453
- Sticher O, Soldati F, Joshi RK (1978) High performance liquid chromatography separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures of *Capsicum* fruits (in German). *J Chromatogr* 166:221
- Sudhakar Johnson T, Ravishankar GA (1996) Precursor biotransformation in immobilized placental tissues of *Capsicum frutescens* Mill. I. Influence of feeding intermediate metabolites of the capsaicinoid pathway on capsaicin and dihydrocapsaicin accumulation. *J Plant Physiol* 147:481-485
- Sukrasno N, Yeoman MM (1993) Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* 32:839-844
- Suzuki T, Fujiwake H, Iwai K (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit. I. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol* 21:839-853
- Suzuki T, Iwai K (1984) Constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. In *The Alkaloids*; Academic Press: Inc.: Orlando, FL; Vol.23, pp 227-299
- Suzuki T, Kawada T, Iwai K (1981) Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol* 22:23-32
- Suzuki T, Kawada T, Iwai K (1980) Effective separation of capsaicin and its analogues by reverse-phase high performance thin layer chromatography. *J Chromatogr* 198:217-223
- Thompson RQ, Phinney KW, Sander LC, Welch MJ (2005a) Reversed-phase liquid chromatography and argentation chromatography of the minor capsaicinoids. *Anal Bioanal Chem* 381:1432-1440
- Thompson RQ, Phinney KW, Welch MJ, White VE (2005b) Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 381:1441-1451
- Trejo-Gonzalez A, Wild-Al Tamirano C (1973) A new method for the determination of capsaicin in *Capsicum* fruits. *J Food Sci* 38:342-344
- van Der Greef J, Nyseen L, Maarse H, Ten Noever de Brauw M, Games DE, Alcock N (1985) The applicability of field desorption mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of the pungent principles of *Capsicum* and black pepper. *Dev Food Sci* 10:603-612

Wall MM, Bosland PW (1998) Analytical methods for colour and pungency of chilis (*Capsicum*). Instrum. Methods Food Beverage Anal 347-373

Weaver KM, Awde DB (1986) Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of very low capsaicin levels. J Chromatogr 367:438-442

Woodbury JE (1980) Determination of *Capsicum* pungency by high pressure liquid chromatography and spectrofluorometric detection. J Assoc Off Anal Chem 63:556-558

Yazawa S, Yoneda H, Hosokawa M, Fushiki T, Watanabe T (2004) Novel capsaicinoid like substances in the fruits of new non-pungent cultivar 'CH-19 sweet' of pepper (*Capsicum annuum*). Capsicum Eggplant Newsl 23:17-20

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

Capítulo 3

INHERITANCE OF CAPSAICIN AND DIHYDROCAPSAICIN, DETERMINED BY HPLC-ESI/MS, IN AN INTRASPECIFIC CROSS OF *Capsicum annuum* L.²

Abstract: The quantitative inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin contents in fruits has been studied in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. across two different environments, namely fruits developed in Spring and Summer. A liquid chromatography-electrospray ionization/time of flight mass spectrometry [HPLC-ESI/MS(TOF)] method was used to identify and quantify capsaicin and dihydrocapsaicin in extracts of pepper fruits. The analytical method used was able to determine the pungency of genotypes that, using other methods, would have been classified as non-pungent. Capsaicin and dihydrocapsaicin contents varied largely among families, and families did not respond similarly in producing these capsaicinoids when their fruits were grown in Spring and Summer, with some families showing no increase whereas in others the increase was more than two-fold. Heterosis for the pungency trait, assessed by the capsaicin and dihydrocapsaicin contents in fruits, was found, indicating the existence of epistasis, overdominance, or dominance complementation. Nonpungent parent alleles contributed to the capsaicin and dihydrocapsaicin contents, since transgressive segregation did occur. Furthermore, the type of gene action varied between capsaicin and dihydrocapsaicin, and a seasonal effect during fruit development could affect gene action.

Keywords: Capsaicin; dihydrocapsaicin; family × environment interaction; HPLC; intraspecific cross; mass spectrometry; quantitative inheritance

² Garcés-Claver, A.; Gil-Ortega, R.; Álvarez-Fernández, A.; Arnedo-Andrés, M. S. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. *J. Agric. Food Chem.* (aceptado).

“Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 6951-6957. Copyright 2007, American Chemical Society.”

INTRODUCTION

Pepper fruits (*Capsicum* spp.) are among the most consumed vegetables in the world. A significant property of this genus is pungency, which is caused by the presence in the fruit of alkaloid compounds of the capsaicinoid group. Capsaicinoids are only found in the *Capsicum* genus, and are bioactive molecules currently relevant in medical and food sciences (Caterina et al. 1997; Caterina et al. 2000; Chu et al. 2003) as well as in the defense weapon industry (Lee et al. 1996). Capsaicinoids occur in the placental tissue of pepper fruits (Iwai et al. 1979) and their biosynthesis depends on a complex and still not fully characterized enzymatic pathway. The two major capsaicinoids, responsible for up to 90% of pungency, are capsaicin and dihydrocapsaicin (**Figure 3.1**) (Govindarajan et al. 1987), with at least nine more minor capsaicinoids occurring in pepper fruits (Suzuki et al. 1980; Kozukue et al. 2005). The type and amount of each capsaicinoid affect both the degree and characteristics of pungency (Todd et al. 1977; Krajewska and Powers, 1988). Capsaicinoid levels depend on the genotype (DeWitt and Bosland, 1993) and also change during fruit development (Contreras-Padilla and Yahia, 1998; Estrada et al. 2000; Estrada et al. 2002). Moreover, environmental and nutritional conditions occurring during the cultivation of pepper can affect the capsaicinoid content. For instance, significant differences in pungency were found in double-haploid chile plants grown in five different plots of the same field (Harvell and Bosland, 1997), and the total capsaicinoid content in ‘Padrón’ pepper fruits developed in summer was found to be larger than in those fruits developed in Autumn (Estrada et al. 1999). Also, the production of five capsaicinoids in four pepper genotypes was found to depend both on field location and year (Zewdie and Bosland, 2000a).

Genetic mechanisms underlying the inheritance of pungency have long been studied, although they are still poorly understood. Early studies, employing organoleptic tests, found that the presence/absence of pungency was controlled by a single dominant gene, known as *C* (Webeer, 1911; Deshpande, 1935; Greenleaf, 1952). This gene, renamed *Pun1*, has been mapped to the chromosome 2 of the genus *Capsicum* (Blum et al. 2002) and encodes the acyl transferase enzyme *AT3* (Stewart et al. 2005). The recessive gene *pun1*, with a 2.5 kb deletion spanning the putative promoter and first exon, results in the absence of pungency in *C. annuum*.

Other studies have shown that pungency is inherited quantitatively. Since in these studies the determination of capsaicinoid contents is a mandatory requirement, several analytical techniques and different methods, using paper chromatography, thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC) as separation techniques and UV/Vis spectroscopy as detection techniques, have been employed (Gill et al. 1973; Ohta, 1962; Ahmed et al. 1982; Zewdie and Bosland, 2000b; Blum et al. 2003; Ben-Chaim et al. 2006). An HPLC-UV method developed for the determination of five individual capsaicinoids, including capsaicin and dihydrocapsaicin, (Collins et al. 1995) was

used to confirm that pungency is inherited quantitatively in pepper, and also that the biosynthesis of the five capsaicinoids studied was under different genetic control (Zewdie and Bosland, 2000b).

The large variability in capsaicinoid content found naturally in pepper genotypes is a critical point in breeding and production. For instance, capsaicin and dihydrocapsaicin contents ranged from 2 to 6639 mg/kg in eight different pepper genotypes (Garcés-Claver et al. 2006). Therefore, there is a requirement for analytical techniques able to determine very low amounts of capsaicinoids. Also, these techniques should be capable of determining amounts of the different capsaicinoid molecules, which have very similar chemical structures. These requirements are met by HPLC-MS (mass spectrometry) techniques, which have high selectivity and sensitivity and have been used for determination of capsaicinoids in forensic, medical, and food sciences (Reilly et al. 2002; Thompson et al. 2005; Garcés-Claver et al. 2006). HPLC-MS methods can determine up to six capsaicinoids with limits of detection (LODs) in the range of 0.03–1 μM , better than those of HPLC-UV methods commonly used in genetic analysis, which have LOD values of approximately 9 μM (Collins et al. 1995). The high selectivity and sensitivity of HPLC-MS techniques may also reduce the possibility of assigning false negatives (i.e., when a pungent individual is considered as a nonpungent one), allowing for a more accurate phenotyping, an essential step in capsaicinoid inheritance studies.

So far, only three studies regarding the genetic control of quantitative variation for individual capsaicinoids have been published. Previous studies made use of interspecific crosses of *C. chinense* \times *C. annuum* (Zewdie and Bosland, 2000) and *C. annuum* \times *C. frutescens* (Blum et al. 2003; Ben-Chaim et al. 2006). The aim of the present study was to investigate the inheritance for capsaicin and dihydrocapsaicin contents in an intraspecific cross of *C. annuum*, using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS), a highly selective and sensitive technique (Garcés-Claver et al. 2006). In addition, the interaction family \times environment was studied, and quantitative results obtained, using the HPLC-ESI/MS method, were compared to those obtained from a qualitative pungency assessment.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The *C. annuum* L. nonpungent bell inbred variety ‘Yolo Wonder’ (Y; *pun1/pun1*) and the *C. annuum* L. pungent inbred line ‘Serrano Criollo de Morelos-334’ (SCM-334; *Pun1/Pun1*) were used as parental lines P₁ and P₂, respectively. Families F₁ (Y \times SCM-334), F₂, and backcrosses (F₁ \times Y and F₁ \times SCM-334) were

obtained, and these populations and the parents were grown in 2003 and 2004. The number of plants in each family, 7, 7, 26, 32, 18, and 7 for P₁, P₂, F₁, F₂, BC_{P1}, and BC_{P2}, respectively, were evaluated for fruits developed and collected during Spring. A different group of plants, 11, 26, 16, 39, 9, and 17 for P₁, P₂, F₁, F₂, BC_{P1}, and BC_{P2}, respectively, were evaluated for fruits developed and collected during Summer. Seeds were germinated in Petri dishes and when cotyledons were developed each plant was placed on a Jiffy-7 pot (Clause-Tezier Ibérica, Valencia, Spain). When plants had three true leaves each jiffy pot was planted into a black plastic pot (11 cm in diameter). Plants were grown randomly distributed in a climatized greenhouse with a substrate mixture of peat, sand, clay-loam soil, and Humin Substrat (Klasman-Deilmann, Germany) (1:1:1:1, v:v). Two grams of Osmocote 16N-4P-9K slow-release fertilizer (Scotts, Spain) were top-dressed on each pot at beginning of growth. Plants were watered daily to maintain optimum growth. The average minimum and maximum temperatures in the greenhouse were 14–24 °C during spring and 19–27 °C during Summer. Fruits were harvested from each plant when they reached maturity. In 2004, fruits were harvested in Spring (from April to June) from a group of plants and in Summer (from July to October) from the other one.

Sample preparation and capsaicinoid extraction

Mature red fruits were oven-dried at 55 °C for 4–5 days and then ground individually in a Polytron grinder. Ground tissue of each individual fruit was employed for capsaicinoids extraction and qualitative pungency assessment.

Capsaicinoids were extracted from ground fruits according to the method described by Garcés-Claver et al. (2006). One hundred mg of dried tissue samples were extracted with 1 ml of pure acetonitrile, containing a small amount of the internal standard (4,5-dimethoxybenzyl)-4-methyloctamide (DMBMO). Acetonitrile was used for extraction because it gives a high extraction rate, whereas impurities were kept to a minimum. The final DMBMO concentration was 5 µM. The suspension of dried powder in acetonitrile was shaken at room temperature for 60 min in an orbital shaker operating at 250 rpm, and then heated in a water bath without shaking at 65 °C for 1 h. The mixture was then shaken again at room temperature for another 60 min in the conditions indicated above. Then, the suspension was centrifuged for 15 min at 16000 g, and the supernatant was collected and brought to a volume of 1 ml with acetonitrile. Finally, the supernatant was filtered successively through a 0.45 and a 0.22 µm PVDF membrane filter (Millipore, Bedford, MA) before analysis.

Qualitative assessment of pungency

A qualitative assessment to distinguish degrees of pungency was carried out using fruits from plants belonging to the F₂ family. One to five fruits per plant were tasted at least by two different persons. When a single fruit was found pungent by the tasters the genotype was considered pungent, whereas a genotype was considered as nonpungent only when all five fruits were assessed as nonpungent. The degree of pungency was classified into four categories: 1 for nonpungent, 2 for slightly pungent, 3 for pungent, and 4 for extremely pungent.

Quantitative analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin

Chemicals and reagents

All eluents, buffers, and standard solutions were prepared with analytical grade type I water (Milli-Q Synthesis, Millipore, Bedford, MA). Capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-*trans*-6-nonenamide) ($\geq 97\%$), dihydrocapsaicin (8-methyl-*N*-vanillylnonamide) ($\geq 90\%$), methanol ($\geq 99.9\%$, LC-MS grade), acetonitrile (LC-MS grade), and lithium hydroxide monohydrate (99.995%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Standard 1 mM stock solutions of capsaicin and dihydrocapsaicin were prepared by dissolving the appropriate quantity of each compound in 5 ml of acetonitrile. The capsaicin analogue DMBMO was synthesized according to the method of Cooper et al. (1991) and used as an internal standard. The identity of DMBMO was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry, and its purity was $>98\%$.

HPLC-ESI/MS(TOF) analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin

Capsaicin and dihydrocapsaicin were determined in capsaicinoid extracts using the HPLC-ESI/MS(TOF) analytical method developed by Garcés-Claver et al. (30). Analyses were carried out with a BioTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA) coaxial multipass time-of-flight mass spectrometer [MS(TOF)] equipped with an Apollo electrospray ionization source (ESI) and coupled to a Waters Alliance 2795 HPLC system (Waters, Milford, MA). The BioTOF II was operated with endplate and spray tip potentials at 3.0 kV and 3.5 kV, respectively, in the negative ion mode, with drying gas (N₂) and nebulizer pressures of 30 and 60 psi, capillary voltage of 90 V and gas drying temperature of 200 °C. Spectra were acquired in the 100–500 mass/charge ratio (*m/z*) range. The mass axis was calibrated using lithium–formate adducts. Samples were chromatographed using a 5 μm particle

size, 4.6 × 250 mm Waters Symmetry C₁₈ column coupled with a 5 µm particle size, 3.9 × 20 mm Waters Symmetry C₁₈ guard column, and a gradient of methanol and Milli-Q water, using a flow rate gradient between 0.9 and 1.8 ml/min (Garcés-Claver et al. 2006). After each injection, the column was re-equilibrated for 10 min with 30% water:70% methanol, at a flow rate of 0.9 ml/min. Total analysis run time was 40 min. The autosampler and column were maintained at 4 and 30 °C, respectively, and the injection volume was 20 µl. The system was controlled with the software packages BioTOF v. 2.2 (Bruker Daltonics) and Hyphenation Star v. 2.3 (Bruker DaltoniK, Bremen, Germany). Data were processed with Data Analysis v. 3.2 software (Bruker DaltoniK).

Capsaicin and dihydrocapsaicin concentrations of the pepper fruit extracts were expressed as mg/kg of dried weight (DW) fruit. The sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents was calculated and presented as total capsaicinoid content.

Statistical analysis

A combined ANOVA for the capsaicin, dihydrocapsaicin, and total capsaicinoid contents data for generations across the two environments (Spring and Summer) was carried out according to the general linear model (GLM), using the SAS software package v. 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC). Families and environments were considered as fixed effects. Means were compared using Duncan's LSD test. Correlation analyses were performed with the PROC CORR procedure of the SAS software package using the Pearson correlation test.

To study the quantitative inheritance of pungency, the JNTSCALE software (Ng, 1990) was used. A joint scaling test and the individual scaling tests A, B, and C were carried out to provide estimates for the mean, additive effects, and dominance effects. As the family × environment interaction resulted significant, data of each season were considered separately for generation mean analysis. Tests evaluated the goodness of fit of the three-parameter model [midparental value (m), additive (d), and dominance (h) effects] to the observed data, assuming that the sum of squared deviations weighed with the appropriate coefficients follows a chi-square distribution with three degrees of freedom (Mather and Jinks, 1977), and where a failure of the model is considered as an indication of epistasis. Since the three-parameter genetic model was not adequate to explain the data, the six-parameter genetic model for epistasis was used, incorporating to the midparental value (m), additive effect (d), and dominance (h) effect, the three digenic interactions [additive × additive (i), additive × dominance (j), and dominance × dominance (l)].

To estimate the suitability of the qualitative analysis to distinguish degrees of pungency, analysis of variance (ANOVA) of capsaicin, dihydrocapsaicin, and total capsaicinoid contents data for the qualitative categories was carried out. Means

were compared using Duncan's LSD test. Statistical analyses were carried out using the SAS software package.

RESULTS

Genotype and environmental effects on pungency

Capsaicin and dihydrocapsaicin were quantified by HPLC-ESI/MS. A chromatogram of a pungent F₁ fruit extract, including the peaks for capsaicin and dihydrocapsaicin at the corresponding m/z ratios and retention times, is shown in **Figure 3.1**.

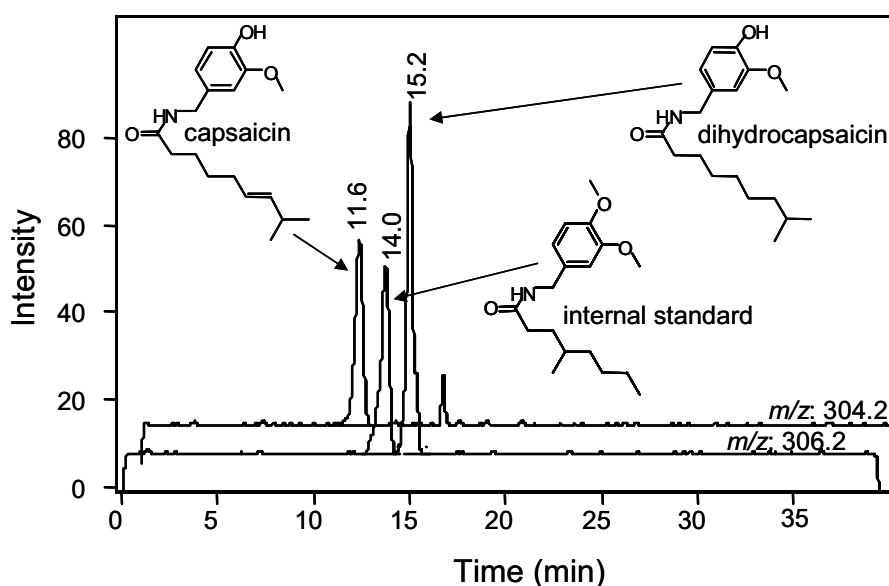


Figure 3.1. HPLC-ESI/MS chromatogram at 304.2 and 306.2 mass charge ratio (m/z) of a pungent F₁ fruit extract from an intraspecific cross of *C. annuum* L. The chemical structures of capsaicin, dihydrocapsaicin and the internal standard are also depicted.

In this work, the averages coefficients of variation for capsaicin and dihydrocapsaicin contents of each individual fruit were 8.7 and 9.8, respectively. The analysis of variance for capsaicin, dihydrocapsaicin, and total capsaicinoid contents across the two environments showed very highly significant differences ($p < 0.001$) among families and highly significant differences ($p < 0.01$) between environments (**Table 3.1**). The family \times environment interaction was also very highly significant.

Table 3.1. Mean squares for capsaicin (CAP), dihydrocapsaicin (DHC) and total capsaicinoid contents of six families of an intraspecific cross of *C. annuum* L. across two environments.

source of variation	df ^a	CAP	DHC	Total capsaicinoids ^b
Families (F)	5	20865***	11837***	63955***
Environment (E)	1	11928**	6156*	35229**
F x E	5	6884***	5462***	23856***
Error	203	1361	1028	4442

^a df, degrees of freedom; ^b Total capsaicinoids considered as the sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents; *, **, *** Significant at $p < 0.05$, 0.01, or 0.001, respectively.

When considering all analyzed fruits over the families, the mean values for capsaicin, dihydrocapsaicin, and total capsaicinoid contents were in the ranges of 9–110, 9–88, and 19–197 mg/kg of DW, respectively (**Table 3.2**). Parental line fruits had total capsaicinoid contents ranging from very low (not detected with the method LOD of 0.6 mg/kg of DW) in P₁ to 21 mg/kg of DW in P₂. Fruits from the F₁ progeny had values for total capsaicinoids higher than those of the midparent values, and also higher than the P₂ parental line, therefore indicating heterosis. For the F₂ family, values for total capsaicinoid contents shifted toward the P₂ parental line values, reaching higher values than the midparent and surpassing the P₂ parental line contents. Both backcrosses had also higher total capsaicinoid contents than the P₂ parental line.

In three families (F₁, BC_{P1} and BC_{P2}) fruits harvested in Summer had higher total capsaicinoid contents than those collected in Spring (**Table 3.2**). Large increases in capsaicinoid content were found in Summer in the F₁ (2.8-fold), the BC_{P1} (2.2-fold), and the BC_{P2} families (2.1-fold), whereas in the case of the P₂ parental line and the F₂ families the total capsaicinoid content Summer increase was practically nil.

The frequency distributions for total fruit capsaicinoid contents developed in Spring and Summer from the segregating families and the P₂ and F₁ families are shown in **Figure 3.2**. Capsaicin contents were in a wide range, from values below the LOD to 166 and 174 mg/kg of DW in Spring and Summer, respectively. Dihydrocapsaicin content ranges varied as broadly as those of capsaicin in both seasons (data not shown). A continuous distribution of the values for capsaicin and dihydrocapsaicin contents was observed when the individuals of F₂ segregating family were examined.

Table 3.2. Capsaicin (CAP), dihydrocapsaicin (DHC) and total capsaicinoid contents (results are mean \pm SE) in pepper fruits grown in spring and summer. Fruits were from the P₁ ('Yolo Wonder') and P₂ ('Serrano Criollo de Morelos-334') parental lines, their F₁ and F₂ families and the backcrosses (BC_{P1} and BC_{P2})^a.

	number of plants	contents (mg/kg of DW ^b)		
		CAP	DHC	total capsaicinoids ^c
Spring				
P ₁	7	0 d a	0 a	0 a
P ₂	7	9.7 \pm 3.9 b	9.7 \pm 4.1 b	19.4 \pm 8.0 b
BC _{P1}	18	12.6 \pm 8.5 b	8.5 \pm 7.3 b	21.1 \pm 15.2 b
BC _{P2}	7	22.8 \pm 9.3 c	21.7 \pm 7.1 c	44.5 \pm 16.3 c
F ₁	26	40.0 \pm 7.1 d	30.6 \pm 6.3 cd	70.6 \pm 12.6 cd
F ₂	32	40.0 \pm 7.9 d	37.5 \pm 7.7 d	77.5 \pm 15.3 d
Midparent		4.9	4.9	9.7
Summer				
P ₁	11	0 a	0 a	0 a
P ₂	26	9.6 \pm 2.2 b	11.1 \pm 2.4 b	20.7 \pm 4.6 b
BC _{P1}	9	20.5 \pm 8.6 c	26.7 \pm 10.4 c	47.3 \pm 18.9 b
BC _{P2}	17	54.1 \pm 9.9 d	38.5 \pm 8.5 c	92.6 \pm 17.9 c
F ₁	16	109.3 \pm 9.3 e	87.5 \pm 8.9 d	196.8 \pm 18.0 d
F ₂	39	48.6 \pm 7.9 d	31.2 \pm 6.0 c	79.8 \pm 13.5 c
Midparent		4.8	5.6	10.4

^a Means followed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$); ^b DW, dry weight; ^c Total capsaicinoids considered as the sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents; ^d Content below the limit of detection of the method.

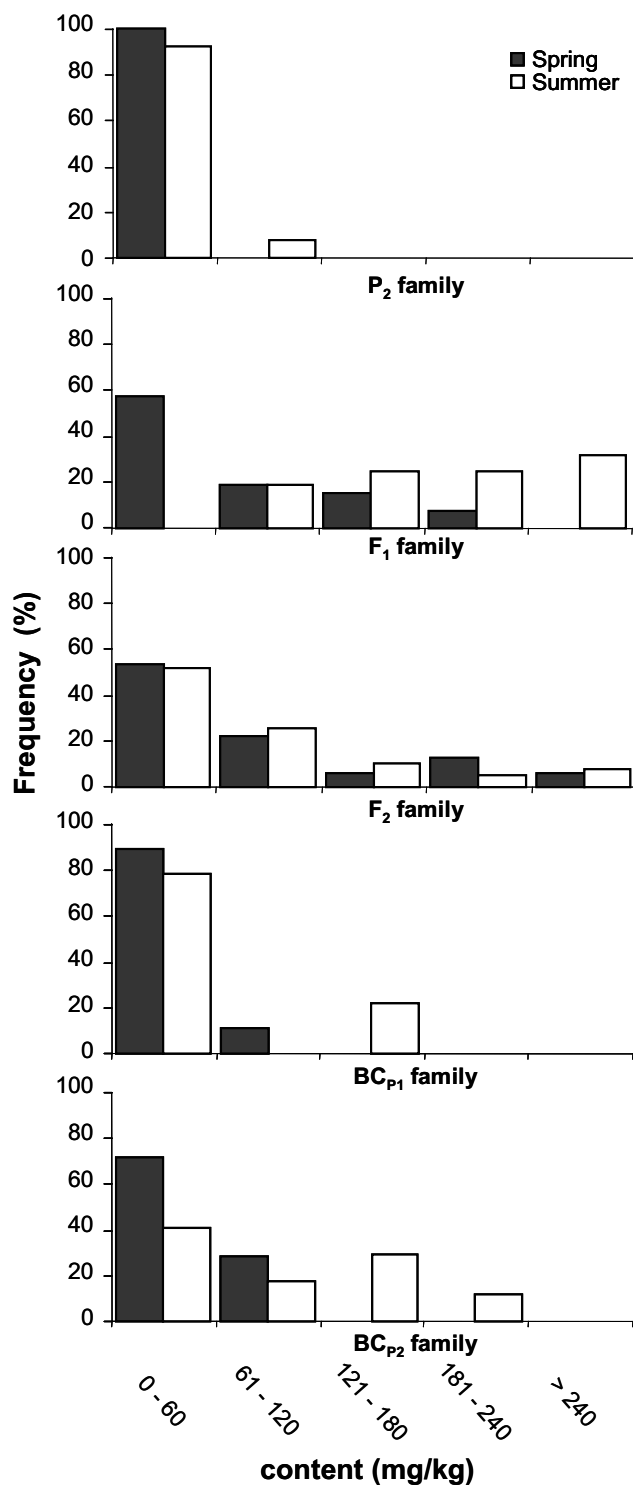


Figure 3.2. Frequency distribution of P₂, F₁, F₂, BC_{p1}, and BC_{p2} families for total capsaicinoid content in an intraspecific cross of *C. annuum* L. across two environments (Spring and Summer).

Quantitative inheritance of pungency

The joint three-parameter scaling test indicated that an additive-dominance model based on estimates of χ^2 could be adequate to explain the variation of capsaicin, dihydrocapsaicin, and total capsaicinoid contents in Spring and the variation of dihydrocapsaicin in Summer because these probabilities were $P > 0.05$ (Table 3.3).

Table 3.3. Joint scaling test and estimates (\pm SE) obtained using a three-parameter model and individual scaling test A, B, and C models using the means of six families for capsaicin (CAP), dihydrocapsaicin (DHC), and total capsaicinoids of an intraspecific cross of *C. annuum* L. across two environments.

	CAP	DHC	total capsaicinoids ^a
Spring			
three parameter model			
m ^b	4.8* \pm 1.8	5.1** \pm 2.0	10.0* \pm 3.8
[d] ^c	4.8* \pm 1.8	5.1** \pm 2.0	10.0* \pm 3.8
[h] ^d	38.6** \pm 6.3	31.0** \pm 5.7	68.2** \pm 11.5
χ^2	4.8	6.1	5.4
p	0.19	0.11	0.15
scaling tests			
A	-4.2 \pm 13.5	-1.13 \pm 15.9	-1.0 \pm 23.9
B	8.2 \pm 30.3	12.8 \pm 15.5	16.8 \pm 52.9
C	70.3* \pm 34.9	79.1* \pm 33.5	149.9* \pm 66.7
Summer			
three parameter model			
m	4.9** \pm 1.1	5.4** \pm 1.2	10.3** \pm 2.3
[d]	4.9** \pm 1.1	5.4** \pm 1.2	10.3** \pm 2.3
[h]	82.0** \pm 6.7	66.6** \pm 6.5	152.0** \pm 13.1
χ^2	19.4	6.14	9.9
p	0.0002	0.10	0.02
scaling tests			
A	-10.7 \pm 29.1	-21.6 \pm 25.0	-32.3 \pm 52.6
B	-68.2** \pm 15.6	-34.0 \pm 17.6	-102.2** \pm 32.9
C	-33.9 \pm 36.9	-61.2* \pm 29.9	-95.1 \pm 64.9

^a Total capsaicinoids considered as the sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents; ^b m, midparent; ^c [d], additive; ^d [h], dominance; *, ** Significantly different from zero at $p < 0.05$ or 0.01, respectively, based on normal deviates table.

However, the additive-dominance model was finally not accepted because some of the individual ABC scaling tests were significantly different from zero, and therefore a model with epistatic effects was carried out. A five-parameter model could adequately explain the results, showing different epistatic effects for Spring and Summer seasons (**Table 3.4**).

Table 3.4. Joint scaling test and estimates (\pm SE) with five-parameter model using the means of six families for capsaicin (CAP), dihydrocapsaicin (DHC), and total capsaicinoids of an intraspecific cross of *C. annuum* L. across two environments.

	CAP	DHC	Total capsaicinoids ^a
Spring			
m ^b	80.4* \pm 37.9	72.1 \pm 36.8	156.5* \pm 71.4
[d] ^c	4.8* \pm 1.9	4.6* \pm 2.0	9.5* \pm 3.9
[h] ^d	-121.1 \pm 89.3	-96.9 \pm 86.5	-230.0 \pm 165.2
[i] ^e	-75.6* \pm 37.7	-67.5* \pm 36.7	-146.9* \pm 70.9
[j] ^f	—	—	—
[l] ^g	80.7 \pm 54.3	55.4 \pm 52.2	144.1 \pm 98.8
χ^2	0.15	0.46	0.10
<i>p</i>	0.70	0.50	0.75
Summer			
m	4.8** \pm 1.1	5.5** \pm 1.2	10.4** \pm 2.3
[d]	4.8** \pm 1.1	5.5** \pm 1.2	10.4** \pm 2.3
[h]	46.8 \pm 24.0	23.1 \pm 20.5	72.5 \pm 43.5
[i]	—	—	—
[j]	71.5** \pm 27.0	11.1 \pm 26.6	80.7 \pm 52.4
[l]	57.6* \pm 28.9	58.8* \pm 25.5	113.9* \pm 53.2
χ^2	1.05	0.02	0.26
<i>p</i>	0.31	0.88	0.61

^a Total capsaicinoids considered as the sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents; ^b m, midparent; ^c [d], additive; ^d [h], dominance; ^e [i], additive \times additive; ^f [j], additive \times dominance; ^g [l], dominance \times dominance; *, ** Significantly different from zero at $p < 0.05$ or 0.01, respectively, based on normal deviates table.

In Spring, significant positive additive (d) and negative additive \times additive (i) effects were shown to occur for capsaicin, dihydrocapsaicin, and total capsaicinoid contents. Although the dominance effect (h) was not significant, its value was negative and tended to be larger than both the midparental (m) value and the dominance \times dominance (l) effect. In Summer, positive additive (d), additive \times dominance (j), and dominance \times dominance (l) effects were significant for capsaicin content. Significant positive additive (d) and dominance \times dominance (l) effects were observed for total capsaicinoid and dihydrocapsaicin contents. The

dominance effect (h) had a non significant positive value that tended to be higher than the midparental (m) value and lower than the dominance \times dominance (l) effect.

Correlation coefficients between capsaicin and dihydrocapsaicin contents

Correlation coefficients between capsaicin and dihydrocapsaicin contents were highly significant ($p < 0.01$) and showed a strong positive correlation between both capsaicinoids, both in Spring ($r = 0.859$) and Summer ($r = 0.982$) (Table 3.5). The average ratio between capsaicin and dihydrocapsaicin was close to 1:1 in Spring, whereas in Summer the ratio was approximately 1:0.8. A season combined analysis also showed a high positive correlation between both capsaicinoids ($r = 0.892$).

Table 3.5. Correlation coefficients between capsaicin (CAP), dihydrocapsaicin (DHC), and total capsaicinoid contents for pepper fruits grown in Spring and Summer from six families of an intraspecific cross of *C. annuum* L.

	CAP	DHC	total capsaicinoids ^a
Spring			
CAP	1		
DHC	0.859**	1	
total capsaicinoids	0.967**	0.960**	1
Summer			
CAP	1		
DHC	0.982**	1	
total capsaicinoids	0.996**	0.994**	1
combined seasons			
CAP	1		
DHC	0.892**	1	
total capsaicinoids	0.977**	0.967**	1

^a Total capsaicinoid considered as the sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents; *, **, *** Significant at $p < 0.05$, 0.01, or 0.001, respectively.

Suitability of a qualitative assessment to distinguish the degree of pungency

Means of the capsaicin, dihydrocapsaicin and total capsaicinoid contents for each qualitative (tasted) category of pungency are presented in Table 3.6. Fruits belonging to the “tasted as nonpungent” category showed the lowest capsaicin,

dihydrocapsaicin and total capsaicinoid contents, whereas the highest contents were found in the “tasted as extremely pungent” category. The mean capsaicinoid contents determined by HPLC-MS were 2, 59, 84, and 142 mg/kg of DW for the “tasted as nonpungent”, “tasted as slightly pungent”, “tasted as pungent”, and “tasted as extremely pungent” categories. Values for the “tasted as slightly pungent” and “tasted as pungent” categories were not significantly different. Furthermore, a significant number of genotypes in these both categories (33 and 39% in the “tasted as slightly pungent” and “tasted as pungent” categories, respectively) were incorrectly classified by this qualitative test.

Table 3.6. Capsaicin (CAP), dihydrocapsaicin (DHC), and total capsaicinoid contents (means \pm SE, with n varying from 12 to 28) of pepper fruits from F₂ family of a *C. annuum* intraspecific cross for each pungency category assigned by tasting fruits^a

Categories	content (mg/kg of DW ^b)		
	CAP	DHC	total capsaicinoid ^c
Tasted as nonpungent	0.98 \pm 0.33 a	0.87 \pm 0.30 a	1.80 \pm 0.61 a
Tasted as slightly pungent	35.2 \pm 15.8 b	23.6 \pm 10.5 b	58.8 \pm 25.8 b
Tasted as pungent	48.7 \pm 8.2 b	35.5 \pm 6.7 b	84.2 \pm 14.4 b
Tasted as extremely pungent	78.6 \pm 9.9 c	63.1 \pm 10.5 c	141.6 \pm 18.7 c

^a Means followed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$);

^b DW, dry weight; ^c Total capsaicinoid considered as the sum of the capsaicin and dihydrocapsaicin contents.

DISCUSSION

A genetic analysis of the inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin has been carried out using an intraspecific cross of *Capsicum annuum* across two seasons. Capsaicinoids were determined using a validated HPLC-ESI/MS method, which allowed reliable identification and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. This analytical method uses for compound determination not only HPLC retention time but also the exact m/z ratios of capsaicinoids, leading to a high selectivity that avoids errors in capsaicinoid peak assignment during the analysis of complex matrices such as pepper fruit extracts. This method also has a high sensitivity (LODs of 0.6 and 3 mg/kg of DW for dihydrocapsaicin and capsaicin, respectively) minimizing the possibility of assigning false negatives (individuals with low capsaicinoid contents) in inheritance studies. In this work, 67 out of 184 pungent individuals had total capsaicinoid contents between 0.6 (LOD of our method) and 30 [LOD of Collins et al. (1995) method] mg/kg of DW. Thus, in this specific cross 36% of individuals considered as pungent with our methodology would have been considered nonpungent individuals using the HPLC-UV method applied until now in capsaicinoid quantitative inheritance genetic studies in pepper (Collins et al. 1995).

The highest individual and total capsaicinoid contents corresponded to the F₁ family and they were higher than the midparental values, in agreement with the studies of Zewdie and Bosland (2000b) and Blum et al. (2003). The capsaicinoid contents of the F₁ family were also higher than those of the pungent parental line, a fact that was not observed in previous studies (Zewdie and Bosland, 2000b; Blum et al. 2003). This observation would infer the presence of heterosis in this cross, which could be attributed to the existence of interaction among alleles of different *loci* (epistasis), to the superiority of the heterozygote above the homozygote (overdominance), or to dominance complementation (Briggs and Knowles, 1967). The total capsaicinoid content of the F₂ family was higher than that of the pungent parental line, indicating transgressive segregation. Therefore, nonpungent parental line (Yolo Wonder) alleles could contribute to increase the capsaicinoid content. Transgressive segregation for the pungency trait was also found in the F₂ family in a cross between Maor (a nonpungent *C. annuum* parent) and BG2816 (a pungent *C. frutescens* parent), and this was attributed to the Maor alleles (Blum et al. 2003).

The family × environment interaction was also found to be significant and consequently, the families did not respond similarly in producing capsaicin and dihydrocapsaicin when fruits were developed in Spring and Summer. Family × environment interactions for total and individual capsaicinoids have been also examined by other authors. The contents of capsaicin, dihydrocapsaicin and three minor capsaicinoids behaved differently in two double haploid lines, an F₁ hybrid, and an open-pollinated cultivar when grown in two New Mexico locations with either furrow or drip irrigation during 1996 and 1997 (Zewdie and Bosland, 2000a). In contrast, the family × environment interaction was not significant for major and minor capsaicinoid contents in parental lines and families obtained from an interspecific cross when grown either in a greenhouse or in open field (Zewdie and Bosland, 2000b). Also, capsaicin and dihydrocapsaicin contents did not show significant family × environment interactions in fruits harvested in Summer and Winter, using families from another interspecific cross and their parental lines (Blum et al. 2003).

The environmental factor affected capsaicin and dihydrocapsaicin production, and in three of the families (BC_{P1}, BC_{P2}, and F₁) fruits grown in summer had markedly higher capsaicinoid contents than those developed in springtime. For BC_{P1} and BC_{P2}, these differences in the capsaicinoid contents could have been also affected also by the limited segregating families size used, since they could have contained a subset of the genetic variation. An effect of the fruit growing season was observed in previous studies. For instance, fruits have been found to have higher capsaicinoid contents in Summer than in Autumn (Estrada et al. 1999), and capsaicin content was increased in the warmer season as compared with the cooler one (Blum et al. 2003).

Positive correlations between the contents of capsaicin and dihydrocapsaicin were found both in Spring and Summer. Blum et al. (2003) found similar results for fruits harvested in Summer and Winter from an interspecific cross (*C. annuum* Maor × *C. frutescens* BG2816). This supports the hypothesis that

the identification and selection of plants with high capsaicin contents could be linked to selection based on high dihydrocapsaicin contents, regardless of the harvest season. The fact that the ratio between capsaicin and dihydrocapsaicin was lower in Summer than in Spring deserves further investigation.

Capsaicin and dihydrocapsaicin quantitative inheritance in Spring and Summer cannot be adequately explained by a digenic model without epistasis (additive-dominance model). Instead, a model with interactions could explain the data. A negative additive \times additive interaction occurred in Spring, whereas positive both dominance \times dominance and additive \times dominance interactions were found in Summer for total capsaicinoid content. Therefore, genetic control for the two capsaicinoids studied appears to depend on the season. The type of gene action did not vary between capsaicin and dihydrocapsaicin in Spring, whereas in Summer different interactions were observed for both capsaicinoids. The gene pairs seem to be in a dispersive form (Mather and Jinks, 1977), since both additive \times additive interaction and dominance effect had the same sign for capsaicin and dihydrocapsaicin inheritance in Spring. Gene interaction is considered to be complementary when the dominance and dominance \times dominance estimates have the same sign and to be duplicated when the signs differ (Mather and Jinks, 1977). On this basis, whereas duplicate gene action was observed for capsaicin, dihydrocapsaicin and total capsaicinoid in Spring, complementary action for both capsaicinoids and total capsaicinoid was observed in Summer.

Zewdie and Bosland (2000b) did not find an environmental effect and interactions were also different from those observed in this work. Possible explanations for the differences between both studies could be attributed to: (i) the different genotypes used [an intraspecific cross between *C. annuum* ‘Serrano Criollo de Morelos-334’ and *C. annuum* ‘Yolo Wonder’ in this work and an interspecific cross between *C. annuum* PI298646 and *C. chinense* ‘Habanero’ in the work of Zewdie and Bosland (2000b)]; (ii) the different environments (Spring and Summer harvest time in our study and open field and greenhouse growth conditions in their study); and (iii) the different selectivity and sensitivity of the analytical methods for capsaicinoid determination [Garcés-Claver et al. (2006) method in our work and Collins et al. (1995) method in their work]. Therefore, the pungency trait may be inherited differently in specific environments and genotypes.

The pungency inheritance is likely to be polygenic, as supported by the continuous distribution of the F₂ capsaicinoid contents, the transgressive segregation in the F₂ progeny, and the different type of gene action between capsaicin and dihydrocapsaicin in Summer. However, the number of effective factors controlling capsaicin and dihydrocapsaicin inheritance could not be accurately estimated in this study, because of the presence of a major gene (*Pun1*) and the dominance and epistatic effects, as concluded by Kondra and Tomas (1975) and Falconer (1981).

The HPLC-ESI/MS method was much more powerful than the qualitative assessment method used to distinguish between capsaicinoid contents. First, many genotypes considered as non pungent had a measurable amount of capsaicinoids.

Due to this fact, within the “tasted as nonpungent” category two types of individuals, in both cases not producing an organoleptic pungent sensation, were included: individuals those where none capsacinoid was detected and those individuals with certain low amounts of capsacin and dihydrocapsaicin that could be quantified with the used analytical method used. Also, a significant number of genotypes in the “tasted as slightly pungent” and “tasted as pungent intermediate” categories (>30% in both cases) were incorrectly classified by our qualitative test.

In summary, this is the first time that pungency quantitative inheritance study in an intraspecific cross of *C. annuum* was carried out using a highly reliable method for the identification and quantification of capsacin and dihydrocapsaicin. Capsacin and dihydrocapsaicin contents varied largely among families, and these families did not respond similarly in producing these capsacinoids when their fruits were grown in Spring and Summer. The contribution of the environment could be only important in some families (BC_{P1}, BC_{P2}, and F₁). Heterosis for the pungency (capsacin and dihydrocapsaicin contents) trait was found, which indicated the existence of epistasis, overdominance, or dominance complementation. Also, nonpungent parent alleles appear to contribute to the capsacin and dihydrocapsaicin contents, since transgressive segregation occurred. The selection of genotypes with high capsacin contents from the studied population imposes the selection of high dihydrocapsaicin contents regardless fruit growth season. Finally, the type of gene action varied between capsacin and dihydrocapsaicin, and a seasonal effect could suggest additional differences in gene action.

LITERATURE CITED

- Ahmed N, Singh J, Bajaj KL (1982) Genetic of capsaicin content in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) *Capsicum Eggplant Newsl* 1:32
- Ben-Chaim A, Borovsky Y, Falise M, Mazourek M, Kang BC, Paran I, Jahn M (2006) QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 113:1481-90
- Blum E, Liu K, Mazourek M, Yoo EY, Jahn MM, Paran I (2002) Molecular mapping of the *C locus* for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45:702-705
- Blum E, Mazourek M, O'Connell MA, Curry J, Thorup T, Liu K, Jahn MM, Paran I (2003) Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 108:79-86
- Briggs FN, Knowles PF (1967) In: *Introduction to plant breeding*; Reinhold Publishing Corporation Eds.; Publisher: NY; pp 216-221
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Marti WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-13
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-24
- Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 278:13633-9
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30:137-139
- Contreras-Padilla M, Yahia EM (1998) Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J Agric Food Chem* 46:2075-2079
- Cooper TH, Guzinski JA, Fisher C. (1991) Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in *Capsicum* oleoresins. *J Agric Food Chem* 39:2253-2256
- Deshpande RB. (1935) Studies in Indian chillies: 4. Inheritance of pungency in *Capsicum annuum* L. *Indian J Agric Sci* 5:513-516
- DeWitt D, Bosland PW (1993) In *The pepper garden*. Ten Speed Press, Berkeley, California
- Estrada B, Bernal MA, Diaz J, Pomar F, Merino F (2002) Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in relation to fruiting. *J Agric Food Chem* 50:1188-1191
- Estrada B, Bernal MA, Diaz J, Pomar F, Merino F (2000) Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics and peroxidase patterns. *J Agric Food Chem* 48:6234-6239
- Estrada B, Diaz J, Merino F, Bernal MA (1999) The effect of seasonal changes on the pungency level of Padrón pepper fruits. *Capsicum Eggplant Newsl* 18:28-31

- Falconer DS (1981) In *Introduction to quantitative genetics*, edition 2nd. Longman Group Eds.; London, UK
- Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés MS, Abadía J, Gil-Ortega R, Álvarez-Fernández A (2006) Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography–electrospray/time–of–flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 54:9303-9311
- Gill KS, Ghai BS, Singh JR (1973) Inheritance of amount of capsaicin in chilli (*Capsicum frutescens* L. and *C. annuum* L.). *Indian J Agric Sci* 43:839-841
- Govindarajan VS, Rajalakshmi D, Chand N (1987) *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 25:185-282
- Greenleaf WH (1952) Inheritance of pungency and of the deciduous character in peppers (*Capsicum annuum*). *Proc Assoc Agric Workshop* 49:110-111
- Harvell K, Bosland PW (1997) The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience* 32:1292
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different stages of flowering. *Agric Biol Chem* 43:2493-2498
- Kondra ZP, Thomas PM (1975) Inheritance of oleic, linoleic, and linolenic acids in seed oil of rapeseed *Brassica napus*. *Can J Plant Sci* 55:205-210
- Kozukue N, Han J, Lee S, Kim J, Lee K, Park M, Levin CE, Friedman M (2005) Analysis of seven capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53:9172-9181
- Krajewska AM, Powers JJ (1988) Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. *J. Food Sci.* 53:902–905
- Lee RJ, Yolton RL, Yolton DP, Schneider C, Janin ML (1996) Personal defense sprays: effects and management of exposure. *J Am Optom Assoc* 67:548-560
- Mather K, Jinks JL (1977) In: *Introduction to biometrical genetics*. Chapman and Hall Eds.; London, UK
- Ng TJ (1990) Generation means analysis by microcomputer. *HortScience* 25:363
- Ohta Y (1962) Physiological and genetical studies on the pungency of *Capsicum*, V. Inheritance of pungency. *Jap Jour Genet* 37:169-175
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA (2002) Determination of capsaicin, nonivamide and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 26:313-319
- Schweiggert U, Carle R, Schieber A (2006) Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 557:236-244
- Stewart C, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyl-transferase. *Plant J* 42:675-688

Suzuki T, Fujiwaka H, Iwai K (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit. I. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol* 21:839-853

Thompson RQ, Phinney W, Welch MJ, White VE (2005) Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 381:1441-1451

Todd PH, Besinger MG, Biftu T (1977) Determination of pungency due to *Capsicum* by gas-liquid chromatography. *J Food Sci* 42:660-665

Webeer HJ (1911) Preliminary notes on pepper hybrids. *Amer Breeder's Assoc Ann Rep* 7:188-199

Zewdie Y, Bosland PW (2000b) Capsaicinoid inheritance in an interspecific hybridization of *Capsicum annuum* × *C. chinense*. *J Amer Soc Hort Sci* 125:448-453

Zewdie Y, Bosland PW (2000a) Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interactions for capsaicinoid in *Capsicum annuum*. *Euphytica* 111:185-190

Capítulo 4

IDENTIFICATION, VALIDATION AND SURVEY OF A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) ASSOCIATED WITH PUNGENCY IN *Capsicum* spp³.

Abstract: A single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency was detected within an expressed sequence tag (EST) of 307 bp. This fragment was identified after expression analysis of the EST clone SB2-66 in placenta tissue of *Capsicum* fruits. Sequence alignments corresponding to this new fragment allowed us to identify a SNP between pungent and non-pungent accessions. Two methods were chosen for the development of the SNP marker linked to pungency: tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR (tetra-primer ARMS-PCR) and cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS). Results showed that both methods were successful distinguishing genotypes. Nevertheless, tetra-primer ARMS-PCR was chosen for SNP genotyping because it was more rapid, reliable and less cost-effective. The utility of this SNP marker for pungency was demonstrated by the ability to distinguish between twenty-nine pungent and non-pungent cultivars of *Capsicum annuum*. In addition, the SNP was also associated with phenotypic pungent character in the tested genotypes of *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. galapagoense*, *C. eximium*, *C. tovarii* and *C. cardenasii*. This SNP marker is a faster, cheaper and more reproducible method for identifying pungent peppers than other techniques such as panel tasting, and allows rapid screening of the trait in early growth stages.

Keywords: amplification refractory mutation system, *Capsicum*, cleaved amplified polymorphic sequence, genotyping, pungency, SNP marker.

³ Ana Garcés-Claver; Shanna Moore Fellman; Ramiro Gil-Ortega; Molly Jahn; María S. Arnedo-Andrés. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. (enviado)

INTRODUCTION

Pepper (*Capsicum* spp.) is one of the most economical and agriculturally important vegetable crops due to its high consumption, as fresh or processed product, and world-wide commercial value. One of the important quality attributes of pepper is pungency, which is caused by the presence of a group of alkaloids known as capsaicinoids. These compounds have been widely studied and are currently used in the food industry, for medical purposes and in defensive sprays (Henry et al. 1986; Carmichael, 1991; Andrews, 1995; Lee et al. 1996; Schulzeck and Wulf, 1997; Caterina et al. 2000; Daood et al. 2002).

Capsaicinoids are synthesized exclusively in placental tissue, accumulate in epidermal cells in the placenta (Iwai et al. 1979), and their synthesis begins approximately 20 days post-anthesis (dpa) (Suzuki et al. 1980; Fujiwake et al. 1982). So far, thirteen enzymes have been described which putatively catalyze different reactions involved in capsaicinoids production: acyl-CoA synthetase (*ACS*), 4-coumarate CoA ligase (*4CL*), coumaroyl shikimate/quinic acid 3-hydroxylase (*Ca3H*), phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), cinnamic acid 4-hydroxylase (*Ca4H*), caffeic acid *O*-methyl transferase (*COMT*), putative aminotransferase (*pAMT*), branched-chain amino acid transferase (*BCAT*), β -ketoacyl ACP synthase (*KAS*), acyl carrier protein (*ACL*), acyl-ACP thioesterase (*FAT*), acyl-transferase 3 (*AT3*) and capsaicin synthase (*CSY*). The genes encoding the last ten enzymes have been cloned (Lee et al. 1998; Curry et al. 1999; Blum et al. 2003; Stewart et al. 2005; Prasad et al. 2006), but only *KAS* and *CSY* have been functionally characterized (Aluru et al. 2003; Prasad et al. 2006).

Molecular research concerning capsaicinoid biosynthesis is being conducted for a complete understanding of how pungency is controlled. Several studies have focused on identifying genes which encode enzymatic steps in the capsaicinoid pathway. Kim et al. (2001) isolated 39 cDNA clones possibly related to pungency by suppression subtractive hybridization (SSH) technique. One of these, SB2-66 (GenBank accession n° BF723664), showed a placenta-specific expression pattern, as well as similarities to a group of acyl-transferases. Ultimately the cloning and characterization of *AT3* (Stewart et al. 2005) gave full gene length information about SB2-66, which spans the final part of the second exon and 3' untranslated region (UTR) of this putative acyl-transferase. *AT3* encodes *Pun1*, an important gene responsible for pungency. In *C. annuum*, the recessive gene, *pun1*, contains a 2.5 kb deletion spanning the promoter and first exon in non-pungent genotypes which results in absence of pungency. Additional putative *Capsicum* acyl-transferases, *Catf1* and *Catf2*, have also been isolated and associated with pungency (Lang et al. 2006). Most recently, Prasad et al. (2006) have isolated and characterized an important gene in the capsaicinoid biosynthetic pathway, *csy1*, involved in the condensation of vanillylamine with a branched-chain fatty acid. In spite of extensive work concerning this topic, further studies are necessary to fully explain the biosynthesis of capsaicinoids.

To determine the presence or absence of pungency in pepper within breeding programs, different techniques have been developed ranging from panel tasting, such as the Scoville Organoleptic Test (Scoville, 1912) to several analytical techniques, including high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis (Collins et al. 1995). All of these techniques utilize fruit tissue and are limited by plant growth stage and the subsequent development of a sufficient number of fruits for screening. However, the availability of genetic markers allows determination of pungency at very early stages of plant development, reducing the amount of time and effort involved in distinguishing between pungent and non-pungent genotypes. Regarding the development of molecular markers to detect pungency in pepper, some markers have been linked to *Pun1*, such as CD35 (Tanksley et al. 1998) which is more than 10 cM away from the locus, the cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker (Blum et al. 2002), which is closer but was not able to universally distinguish between pungent and non-pungent *C. annuum* varieties, and the CAPS marker (Minamiyama et al. 2005), which is 3.6 cM or 12.2 cM away from the locus depend on F₂ population used in that study. Recently, five sequence-characterized amplified region (SCAR) markers (Lee et al. 2005) were designed based on the deleted region in *AT3*. So far, the only known molecular markers linked to pungency have been developed based on *Pun1*.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) provide an abundant source of DNA variation in plants and animals, and possess desirable properties as molecular markers (Wang et al. 1998; Giordano et al. 1999). In the past decade, the interest in the identification and analysis of SNPs in plant species has increased (Zhu et al. 2003; Moreno et al. 2003; Lopez et al. 2005). Abundance, stability and high-throughput genotyping systems employing SNPs offer enhanced fingerprinting and mapping, reliable phylogenetic analyses and novel assaying schemes for breeding programs. For example, the use of PCR-based SNP markers has been reported to be useful to construct maps in plants such as sunflower and rice (Hayashi et al. 2004; Lai et al. 2005). Other studies have identified SNPs linked to genes of interest, such as the SNP linked to a supernodulation trait in soybean, located on the sequence of the *GmNARK* gene (Kim et al. 2005).

Due to the increase interest in SNPs, a wide range of SNP genotyping methods have been developed and a variety of platforms have been used, including gel electrophoresis, microarrays, mass spectrometry, fluorescence plate readers and flow cytometry (Paris et al. 2003; Lee et al. 2004; Giancola et al. 2006). However, SNP genotyping involving PCR is a simple and economical technique. Methodology, using PCR-markers such as tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR [tetra-primer ARMS-PCR (Ye et al. 2001)] and CAPS (Konieczny and Ausubel 1993), has already been used successfully for SNP genotyping (Chiapparino et al. 2004; Yeam et al. 2005; Kim et al. 2006). CAPS markers identify single nucleotide polymorphisms by restriction endonuclease digestion of PCR products. Alternatively, tetra-primer ARMS-PCR is based on the design of allele specific primers with its 3' end located at the SNP and with an additional second mismatch at -2 bp from the 3' end. This allows for better

amplification by enhancing the selectivity and eliminating the possibility of false-positive extension of the double-mismatched primers.

In this paper, we report the identification and development of a SNP marker associated with pungency. Furthermore, we describe the application of tetra-primer ARMS-PCR and CAPS analysis for SNP confirmation, and we also provide evidence of the validity of this SNP marker by genotyping of a wide range of *Capsicum* spp. This SNP marker could be used for efficient marker-assisted selection in a broad spectrum of peppers cultivars.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and DNA extraction

For the analysis, we used the following pepper genotypes: nineteen non-pungent and seven pungent cultivars of *Capsicum annuum* L. and forty-seven pungent cultivars belonging to *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh, *C. baccatum* var. *praetermissum*, *C. chacoense* Hunz., *C. galapagoense* Hunz., *C. pubescens* Ruiz. and Pav., *C. tovarii* Eshbaugh, Smith and Nickrent, and *C. frutescens* L. The following *Solanaceae* species were used as controls: *Solanum pseudocapsaicum* L., *S. tuberosum* L., *S. melongena* L., *S. lycopersicum* L., *Nicotiana bethamiana* Somin, *N. clevelandii* Gray, *N. tabacum* L., *Petunia hybrida* Vilm., and *Datura stramonium* L. DNA from several genotypes belonging to *C. flexuosum* Sendtn., *C. rhomboidium (ciliatum)* (H.B.K.) O. Kuntze, *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. pubescens* Ruiz. and Pav., *C. frutescens* L., *C. eximium* Hunz., *C. cardenasii* Heiser and Smith, *C. minutiflorum* (Rusby) Hunz., *Lycianthes asaifolia* (Kunth et Boché) Bitter, *L. surotatensis* Gentry, and *L. dejecta* (Fernald) Bitter were obtained from Professor M. Jahn of Cornell University (Ithaca, NY).

To test the suitability of the allele-specific SNP marker to distinguish between homozygous and heterozygous plants, two F₁ plants and their parents, *C. annuum* cv. Serrano Criollo de Morelos-334 (SCM-334; pungent) and *C. annuum* cv. Yolo Wonder (nonpungent), were evaluated.

Plants were grown under greenhouse conditions at Zaragoza (Spain), with a temperature regime that ranged between 15 °C and 25 °C. Total DNA was extracted from leaf tissue of each plant according to Doyle and Doyle (1987), with minor modifications and adapted to small tissue quantities as described in Arnedo-Andrés et al. (2002) (**Anexo 1**).

Phenotyping of *Capsicum* spp

To evaluate pungency, mature red fruits of each genotype were harvested. Each fruit was tasted by at least two persons. Genotypes were considered phenotypically non-pungent when after tasting up to five fruits of the same genotype all were non-pungent. However, when at least one of the tasted fruits was pungent, the genotype was considered phenotypically pungent.

RT-PCR and sequencing

Pepper fruits from *C. annuum* cv. Yolo Wonder, cv. Serrano Criollo de Morelos-334, cv. Jupiter, cv. Maor and *C. chinense* cv. Habanero were harvested at 10, 20, 30, and 60 dpa. Total mRNA was isolated from placenta tissue using Trizol[®] reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA) (**Anexo 2**). cDNA was synthesized using ProtoScript[™] first strand cDNA synthesis kit (New England Biolabs, Beverly, MA) from 1 µg of RNA. Specific PCR primers were designed using the software Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/) to amplify clone SB2-66. The primer sequences were: SB2-66F, 5'-ATTTTGGATGGGGAAG-3' and SB2-66R, 5'-CCGTAAACTTCCGTTG-3'. RT-PCR products were separated by gel-electrophoresis in 2.5% agarose in 1× TAE buffer, stained with ethidium bromide at 50 ng/µl and visualised under UV light with an image analysis system (GelDoc2000, BioRad, Hercules, CA). The amplified fragments of interest were excised from the agarose gel and purified with the Agarose Gel DNA extraction kit (Roche, Basel, Switzerland) (**Anexo 3**). The fragments were then cloned into the pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI) and plasmids were purified with QIAprep (Qiagen, Valencia, CA) (**Anexo 4**). Sequencing was carried out by the Secugen S.L., (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain) (<http://www.secugen.es>). In order to confirm the reliability of the cDNA, ubiquitin primers were designed for cultivars of *C. annuum* and *C. chinense*: U1F, 5'-ATGGTCACAAGAAACTCC-3', U1R, 5'-GAGGGATTTGTGTACGGATA, U2F, 5'-GAAAACATTGAAGCTTGACC-3' and U2R, 5'-ATGTTGCGGCTATACTCACT-3'. These primers were used to amplify the ubiquitin gene from synthesized cDNA.

SNP discovery

Sequences obtained from the above cited cultivars were aligned using BioEdit ver. 5.0.6 (Hall 1999) and putative SNPs were located based on sequence homology.

SNP validation

Tetra-primer ARMS-PCR method

Specific primers (**Table 4.1**) were designed from sequence containing the identified SNP using a program, which is accessible through the Internet at http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. Each PCR was carried out in a total volume of 10 μ l, containing 30 ng of template DNA, 0.75 μ M of inner forward and outer reverse primers, 1.75 μ M of inner reverse and outer forward primers, 200 μ M dNTPs, 3.5 mM MgCl₂, 1 \times buffer, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). PCR amplifications were performed at 95 °C for 1 min, 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 54 °C for annealing, and 1 min of extension at 72 °C, ending with 2 min at 72 °C. Annealing temperature was 72 °C for the first cycle, decreasing by 1°C per cycle until the annealing temperature was reached. The PCR products were separated by gel-electrophoresis in 2.5% MetaPhor[®] agarose gel (FMC Corporation, Princeton, NJ) and visualised as described above.

Table 4.1. PCR primers used to amplify the putative SNP using tetra-primer ARMS-PCR method. Underline characters indicate a deliberate mismatch at position -2 from the 3' termini.

Primer name	Sequence (5' \rightarrow 3')	AT (°C)
Forward outer (FO)	GTGATGTTGCACAAGCAACA	59
Forward inner (FI)	TTATTGCCTAATTAATTCCAAGT <u>CTG</u>	59
Reverse outer (RO)	GACCGTAAACTTCCGTTGAAA	59
Reverse inner (RI)	TTCAATCAAACATCCAGTTACT <u>TCA</u>	59

AT: annealing temperature

CAPS method

Specific PCR primers were used to amplify template DNA that flank the putative SNP. The primer sequences were: SB2-66F, 5'-ATTTTGGATGGGGAAG-3' and PC-R1, 5'-CCCTCTTCAATCAAACATCCA-3'. PCR was carried out in a total volume of 25 μ l, contained 40 ng template DNA, 0.2 μ M dNTPs, 3.0 mM MgCl₂, 1 \times buffer, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). PCR amplifications were performed in a PCR system 9700 thermocycler (Perkin Elmer, Boston, MA) using the following conditions: 94 °C for 2 min, 35 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 51 °C for annealing, and 2 min of extension at 72 °C, ending with 5 min at 72 °C. *Van91* I (Roche) enzyme recognizes the sequence CCANNNN/NTGG, which has the target SNP (/NTGG). A 10 μ l aliquot of the PCR product was digested with 2.5 units of *Van91* I and 2.5 μ l of 10 \times

SuRE/Cut Buffer B, in a total volume of 25 μ l and it was incubated 1 h at 37 °C and 15 min at 65 °C for heat inactivation. The digestion products were separated in a 2.5% MetaPhor[®] agarose gel and visualised as described above.

RESULTS

Detection of the SNP

To analyze the SB2-66 pattern of expression, RT-PCR was performed using the specific primers SB2-66F and SB2-66R in the pungent genotypes, ‘SCM-334’ and ‘Habanero’, and the non-pungent genotype, ‘Yolo Wonder’. After amplification with these primers two fragments of 362 bp and 307 bp were observed in the pungent genotypes and only the 307 bp fragment appeared in the non-pungent genotype.

Transcript accumulations of both fragments were examined from 10 to 60 dpa on the three genotypes of interest (**Figure 4.1**). Transcript levels of the 362 bp fragment were observed at 30 dpa in ‘Habanero’ and at 20 and 30 dpa in ‘SCM-334’, while no transcript was detected in ‘Yolo Wonder’. At the same time, transcript accumulation corresponding to the 307 bp fragment was detected at 30 dpa in ‘Habanero’, at 20 dpa in ‘SCM-334’ and at 20 and 30 dpa in ‘Yolo Wonder’. No transcript of either fragment was detected at 10, 40, and 60 dpa.

The 362 bp and 307 bp fragments were cloned and sequenced from the three listed genotypes. Alignment of these cDNA sequences showed 81% homology between the 362 bp and the 307 bp fragments, revealed three small deletions (**Figure 4.2**) and nine SNPs between the fragments. The alignment between 362 bp fragment and SB2-66 showed that the 362 bp fragment corresponded exactly with the SB2-66 sequence, and therefore indicated that the 362 bp fragment was the final part of the last exon and 3’ UTR region of the putative acyl-transferase *AT3*. Sequence alignment between the 307 bp fragment and the *Catf2* sequence showed 100% homology at the final part of the last exon and 3’ UTR region of *Catf2*. Multiple alignments of the deduced amino acid sequence of the 307 bp fragment with other acyl-transferases showed a highly conserved motif DFGWG, which is characteristic in genes belonging to the BAHD superfamily of acyl-transferases (St. Pierre et al. 1998) (data not shown).

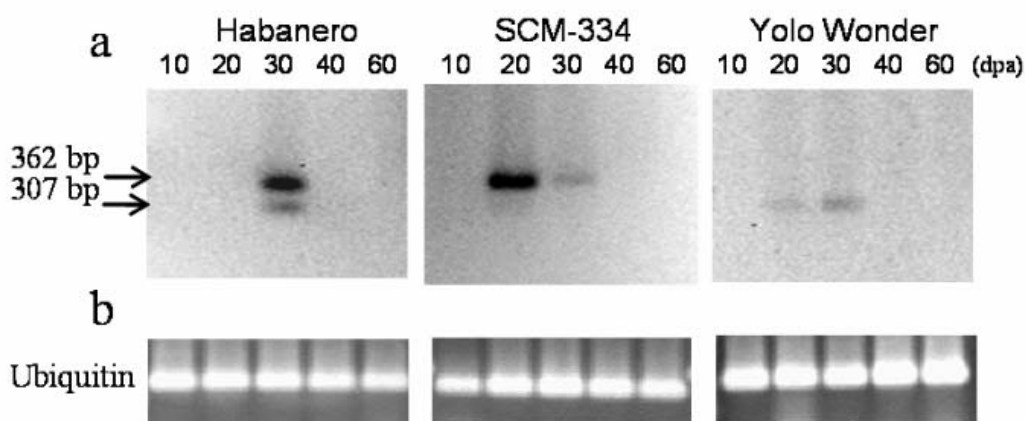


Figure 4.1a. MetaPhor agarose gel photo of reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) of clone SB2-66 at different developmental stages of placenta tissue from 10 to 60 day post-anthesis (dpa) of Habanero, Serrano Criollo de Morelos-334 (SCM-334) and Yolo Wonder. **b.** Agarose gel photo of the ubiquitin products used as internal control in each RT-PCR.

A putative SNP associated with the pungent character was revealed by alignment of the 307 bp fragment sequence between pungent and non-pungent cultivars (**Figure 4.2**). Whereas the pungent cultivars had the T allele, the non-pungent cultivar showed the G allele. Presence of the SNP in two additional non-pungent genotypes, *C. annuum* ‘Maor’ and ‘Jupiter’, was confirmed by sequencing. The SNP (G/T) was located at position 253 bp of this new expressed sequence tag of 307 bp.

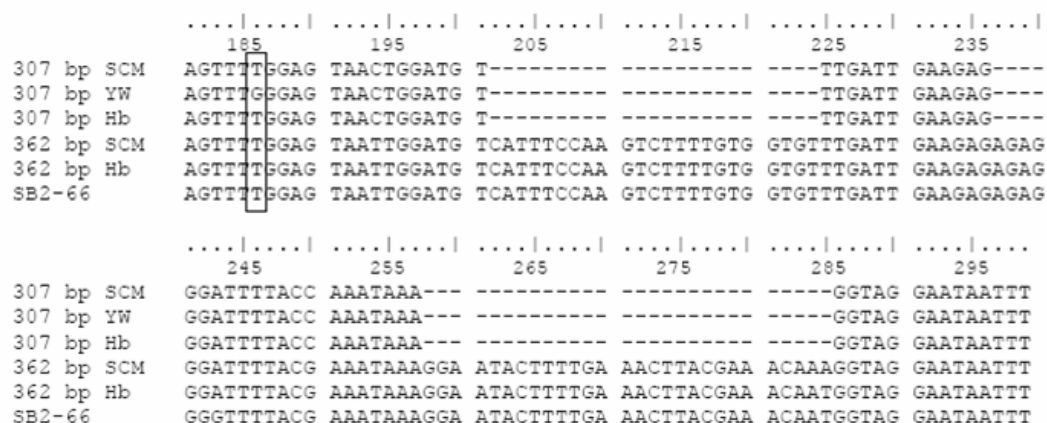


Figure 4.2. Partial sequence alignments obtained after sequencing the 307 bp and 362 bp RT-PCR products. The SNP location is indicated by a box and the three deletions by dashes. SCM: Serrano Criollo de Morelos-334; YW: Yolo Wonder; Hb: Habanero; SB2-66: SB2-66 sequence (BF723664).

Validation of the SNP

The detection of the G/T polymorphism was confirmed by tetra-primer ARMS-PCR method using the two pairs of primers described in the Materials and methods. PCR conditions including primer concentrations, annealing temperature and touchdown program, were adjusted in order to reduce non-specific amplifications. Three fragments of 191 bp, 134 bp, and 108 bp were amplified (**Figure 4.3a**). The 134 bp fragment represented the G allele in non-pungent cultivars, and it was amplified with primer combination FI and RO. The 108 bp fragment, the shortest one, was the product obtained with primer combination FO and RI and it corresponded to the pungent allele (T). The amplification efficiency of this fragment was lower than for the rest of amplification products, possibly due to competitive deprivation of the primers through the largest products. Finally, the 191 bp fragment was amplified with the two outer primers (FO/RO) and served as the template for the amplification of the two allele-specific fragments and as control.

For comparison with tetra-primer ARMS-PCR, CAPS analysis was also performed. PCR amplification of genomic DNA using SB2-66F and PC-R1 primers resulted in a 203 bp fragment. *Van91* I digestion of the PCR amplified product resulted in two restriction fragments of 174 bp and 29 bp in pungent genotypes, while only one undigested 203 bp fragment was observed in the non-pungent genotypes (data not shown). Of these two methods, tetra-primer ARMS-PCR was easier and more economical than CAPS, therefore, tetra-primer ARMS-PCR analysis was chosen for further experiments.

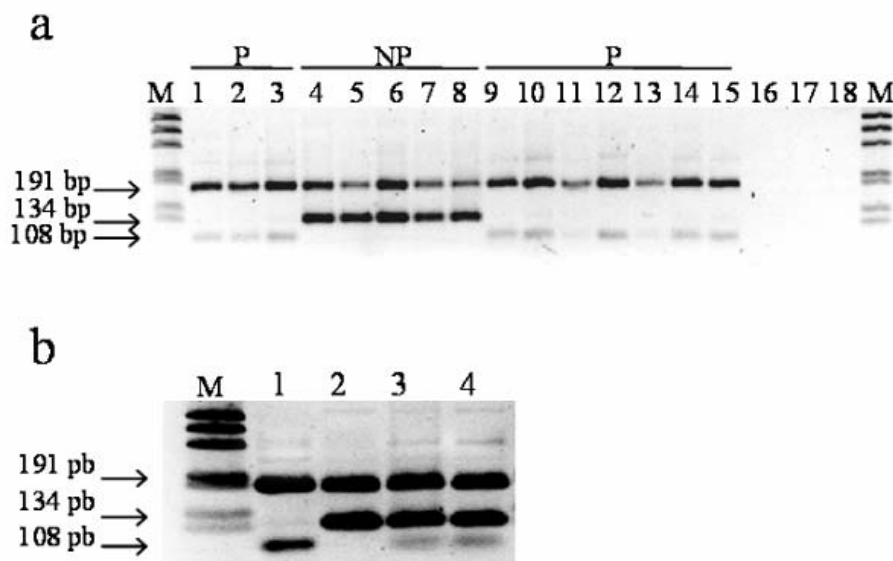


Figure 4.3a. MetaPhor agarose gel photo of allele-specific SNP marker associated with pungency. SNP marker can distinguish the T allele (pungent), which generates a fragment of 108 bp, from G allele (non-pungent), which generates a fragment of 134 bp. 191 bp fragment is common to both alleles and it is used as internal control. Lanes: 1, *C. annuum* cv. SCM-334; 2, *C. annuum* cv. Lungo Dolce Sotille; 3, *C. annuum* cv. Agridulce; 4, *C. annuum* cv. Yolo Wonder; 5, *C. annuum* cv. Jupiter; 6, *C. annuum* cv. Doux des Landes; 7, *C. annuum* cv. Truhart; 8, *C. annuum* cv. Cherry sweet; 9, *C. chinense*; 10, *C. baccatum* var. *pendulum*; 11, *C. baccatum* var. *praetermisum*; 12, *C. galapagoensis*; 13, *C. pubescens*; 14, *C. tovarii*; 15, *C. frutescens*; 16, *Datura stramonium*; 17, *Solanum melongena*; 18, *S. lycopersicum*; M: 1kb DNA ladder; P: pungent; NP: non-pungent. **b.** Amplification of allele-specific SNP marker to distinguish between heterozygous and homozygous plants. Lanes: M, 1kb DNA ladder; 1, *C. annuum* cv. SCM-334 (pungent); 2, *C. annuum* cv. Yolo Wonder (nonpungent); 3 and 4, heterozygous F₁ plants derived from a cross between SCM-334 and Yolo Wonder.

Application of tetra-primer ARMS-PCR method to SNP genotyping

The tetra-primer ARMS-PCR method was utilized to assess additional *Capsicum* genotypes. Phenotypic evaluation using a tasting panel was carried out in all assessed pepper genotypes. Phenotypes and the SNP genotyping results are presented in **Table 4.2**. Results from fifteen *Capsicum* accessions and other three *Solanaceae* species genotyped by tetra-primer ARMS-PCR are shown in **Figure 4.3a**.

Using the described tetra-primer ARMS-PCR method, all examined cultivars belonging to *C. annuum* showed the allele-specific products corresponding to their demonstrated phenotypic trait. The same results occurred when cultivars of *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. galapagoense*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *praetermisum*, *C. eximium*, *C. cardenasii*, and *C. tovarii* were analyzed.

In the case of *C. pubescens*, it was observed that while specific alleles and common fragment were amplified precisely in some genotypes, in others there was no amplification. No fragments were amplified with the developed ARMS-PCR primers in *C. chacoense*, *C. ciliatum*, *C. flexuosum*, and *C. minutifolium*. In order to verify whether the method worked correctly in these genotypes, amplification of genomic DNA with the set of primers SB2-66F and SB2-66R was carried out to confirm the presence of the 307 bp fragment containing the SNP (G/T). When the data were analysed, the expected fragment of 307 bp did not appear, and a different pattern of PCR products were observed (data not shown). In the case of genotypes belonging to *Lycianthes*, *Solanum*, *Nicotiana*, *Petunia* and *Datura*, no 307 bp fragment was amplified, and therefore, no tetra-primer ARMS-PCR products were visualized. Considering the high level of diversity often found in 3' end UTR region, it is not surprising that the specific 307 bp fragment identified is not present in all *Capsicum* and other related members of the *Solanaceae* genus.

Table 4.2. *Capsicum* genotypes, *Solanaceae* species, their phenotypes and their corresponding nucleotide at the SNP position, after genotyping by tetra-primer ARMS-PCR method (P: pungent; NP: non-pungent; ND: non detected)

Genotype	Phenotype	Allele
<i>Capsicum annuum</i> cv. Jupiter	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Yolo Wonder	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Calatauco	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Cherry Sweet	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Antibois	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Canada Cheese	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Podorok Moldovii	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Ikeda-1	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Traba	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Cristal	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Doux D'Alger	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. UF15	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Morrón de fresno	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Yolo Y	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Florida VR2	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Doux des Landes	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Maor	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Truhart	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Sweet 3575	NP	G
<i>C. annuum</i> cv. Hot1493	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Bukeh	P	T
<i>C. annuum</i> cv. RNaky	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Lungo dolce sottile	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Agridulce	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Cayenne	P	T
<i>C. annuum</i> cv. SCM-334	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Papri Queen	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Thai Hot	P	T
<i>C. annuum</i> cv. Chung-Yang	P	T
<i>C. chinense</i> cv. Orange Habanero	P	T
<i>C. chinense</i> '30036'	P	T
<i>C. chinense</i> '30080'	P	T
<i>C. chinense</i> cv. Peach Savina	P	T
<i>C. chinense</i> PII59234	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-130	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-134	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-135	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-137	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-138	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-131	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-209	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-234	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-236	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-237	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-238	P	T

(continuación)

Genotype	Phenotype	Allele
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-323	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-232	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-233	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-235	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-057	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-070	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> C-117	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> C-172	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> C-180	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> C-181	P	T
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> C-182	P	T
<i>C. galapagoense</i> C-167	P	T
<i>C. galapagoense</i> C-179	P	T
<i>C. pubescens</i> C-139	P	ND
<i>C. pubescens</i> C-140	P	ND
<i>C. pubescens</i> C-060	P	T
<i>C. pubescens</i> C-228	P	T
<i>C. pubescens</i> C-342	P	ND
<i>C. pubescens</i> 80062B	P	T
<i>C. pubescens</i> 158277	P	ND
<i>C. eximium</i>	P	T
<i>C. tovarii</i> C-261	P	T
<i>C. frutescens</i> C-126	P	T
<i>C. frutescens</i> C-161	P	T
<i>C. frutescens</i> C-103	P	T
<i>C. frutescens</i> C-162	P	T
<i>C. frutescens</i> C-163	P	T
<i>C. frutescens</i> C-164	P	T
<i>C. frutescens</i> C-166	P	T
<i>C. frutescens</i> C-189	P	T
<i>C. frutescens</i> 1462	P	T
<i>C. chacoense</i> C-153	P	ND
<i>C. chacoense</i> C-154	P	ND
<i>C. chacoense</i> C-175	P	ND
<i>C. chacoense</i> C-176	P	ND
<i>C. cardenasii</i>	P	T
<i>C. minutiflorum</i>	P	ND
<i>C. flexuosum</i>	NP	ND
<i>C. rhombodium</i> (<i>C. ciliatum</i>)	NP	ND
<i>Lycianthes asarifolia</i>	NP	ND
<i>L. surotatensis</i>	NP	ND
<i>L. dejecta</i>	NP	ND
<i>S. pseudocapsicum</i>	NP	ND
<i>S. tuberosum</i> cv. King Edward	NP	ND
<i>S. melongena</i>	NP	ND
<i>S. lycopersicum</i>	NP	ND
<i>Nicotiana benthamiana</i>	NP	ND
<i>N. clevelandii</i>	NP	ND
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	NP	ND
<i>Petunia hybrida</i>	NP	ND
<i>Datura stramonium</i>	NP	ND

The tetra-primer ARMS-PCR method was also used to demonstrate that this SNP marker can distinguish between homozygous and heterozygous plants. The results using the parental lines, SCM-334 and Yolo Wonder, and their corresponding pungent F₁ plants, showed that in the F₁ heterozygous plants the two allele-specific fragments, the pungent allele (T) of 108 pb and the nonpungent allele (G) of 134 pb, were amplified (**Figure 4.3b**). Whereas, only the allele-specific fragment, corresponding to the nonpungent allele (G) and the pungent allele (T), was amplified for non-pungent and pungent parental lines, respectively.

DISCUSSION

We describe the identification, validation and survey of a SNP marker associated with pungency. During the analysis of the EST clone SB2-66, we identified an additional sequence with 81% homology. Alignment of the sequences corresponding to this new fragment allowed us to identify a SNP (G/T) between pungent and non-pungent genotypes.

Recently, *AT3* was characterized and identified as *Pun1*. The recessive allele, *pun1*, is due to a large deletion that spans the promoter and first exon (Stewart et al. 2005). The full nucleotide sequence of *Pun1* identified SB2-66 in the 3' end of *AT3*. A later study identified two acyl-transferases, *Catf1* and *Catf2* (Lang et al. 2006). *Catf1* was described and putatively associated with capsaicin synthase. In contrast with this hypothesis, Prasad et al. (2006) have identified *csy1* and characterized it as capsaicin synthase. The full-length cDNA sequence has indicated that *csy1* sequence does not share significant homology with any of the acyl-transferase genes, including *Pun1*. In addition, to the best of our knowledge, the *Catf1* gene corresponds to the previously described gene *Pun1*, since *Catf1* and *Pun1* match exactly on the sequence level. Based on our results and available published data, the 307 bp fragment, where the SNP is located, shows a 100% homology with the 3' end of the *Catf2*. This sequence has been presented as an acyl-transferase related to pungency in *Capsicum* (Lang et al. 2006), however its role in the capsaicinoid biosynthetic pathway has not been demonstrated yet. In addition, our preliminary mapping results using a tomato population and data obtained from published comparative maps between tomato and pepper (Livingstone et al. 1999) indicate that *AT3* and *Catf2* are not located in close proximity (data not shown).

Currently, we are focused on studying the full-length DNA sequence associated with the 307 bp fragment. In addition, alignment of the 307 bp fragment with *AT3* and other members of the BAHD superfamily of acyl-transferases has allowed the identification of the conserved domain DFGWG at the beginning of the 307 bp sequence (St. Pierre et al. 1998).

To confirm the putative SNP (G/T), we have used two different methods: tetra-primer ARMS-PCR and CAPS markers. Previous studies have already utilized both types of molecular markers successfully (Chiapparino et al. 2004; Acquadro et

al. 2003). Our results have showed that both methods were able to discriminating alleles and were easier and cheaper than direct sequencing. However, tetra-primer ARMS-PCR was chosen due to low cost and fast results for SNP genotyping. This method, using four primers in a simultaneous reaction, is a one-step PCR reaction compared to the digestion needed for the CAPS method. Furthermore, the additional mismatch at -2 bp from the 3'-*termini* allows for better amplification by enhancing the selectivity and eliminating the false-positive extension of the double-mismatched primers. Another advantage of this method is demonstrated by the fact that appropriate commercial restriction enzymes are not always available. In our case, *Van91* I (CCANNNN/NTGG) was found but its recognition site has an ambiguous base (N) within the SNP site. Furthermore, digestion generated small products of 174 and 29 bp, making the resolution by standard agarose gels difficult. For these reasons, ARMS-PCR was chosen for genotyping.

A wide range of species were assayed for the genotyping study, specifically a large group of pungent and non-pungent cultivars belonging to *C. annuum*. For the rest of *Capsicum* species only pungent cultivars were readily available, with the exception of *C. flexuosum* and *C. ciliatum* where non-pungent genotypes were tested. To obtain non-pungent cultivars of *Capsicum* species, apart from *C. annuum*, it is often difficult, in that non-pungent accessions belonging to wild-species have not been widely identified (Andrews, 1995). However, the obtained results are quite promising in *Capsicum* germplasm used widely in research, breeding and by consumers. Use of other *Solanaceae*, including *Solanum*, *Nicotiana*, *Petunia*, and *Datura* spp, allowed us to avoid false-scoring of the presence of PCR products resulting from non-specific primer hybridization. Some *Lycianthes* genotypes were also selected since *Capsicum* spp is considered to be derived from *Lycianthes* (Olmstead et al. 1999).

The SNP marker distinguished the pungency state of all of the twenty-nine *Capsicum annuum* genotypes tested: 19 non-pungent genotypes were identified with the G allele, and 10 pungent ones with the T allele. Based on the classification proposed by Walsh et al. (2001), all varieties in the *C. annuum* complex, consisting of *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* and *C. galapagoense*, have been correctly genotyped with the SNP marker, showing an accurate correlation between allelic status and phenotypic character. Also, the T allele was properly identified in the pungent genotypes of *C. tovarii* and the *eximium* complex, consisting of *C. eximium* and *C. cardenasii*.

The *baccatum* complex, consisting of *C. baccatum* and *C. chacoense*, however has shown a different behaviour. While *C. baccatum*, including its two varieties *praetermissum* and *pendulum*, was associated with the T allele, no SNP was detected in any of the four examined genotypes of *C. chacoense*. Another species whose results are difficult to explain is *C. pubescens*. This species has been described as one the most problematic according to its position within *Capsicum* (Walsh et al. 2001). In our study, we have detected that the genotypes C-060, C-228 and 80062b were correctly identified with the T allele. However, none of the specific allele fragments were amplified in C-139, C-140, C-342 and 158277 of *C.*

pubescens. Neither of the examined genotypes of *C. ciliatum*, *C. minutifolium* and *C. flexuosum* amplified the specific allele fragments. The higher frequency of polymorphism observed in 3' UTRs (Bhatramakki et al. 2002) coupled with the increased diversity commonly seen between domesticated and wild species could explain the absence of specific allele fragments in those genotypes.

This study provides a new allele-specific SNP marker for the identification of the pungency trait in *Capsicum*. The results, after assessing a large number of *Capsicum* genotypes, have clearly demonstrated the feasibility of this allele-specific SNP marker, and its application for germplasm screening and marker-assisted selection. Using an allele-specific SNP marker to identify pungent or non-pungent phenotype offers many attractive features over a panel tasting or analytical techniques. First, analysis can be performed in the early growth stages of plants, requiring only small DNA quantities. Second, a large number of samples can be processed systematically, and finally, SNP genotyping using tetra primer ARMS-PCR methodology has a low cost. Furthermore, the identification of this 307 bp fragment opens new sources to continue the investigation of others potential genes involved in the capsaicinoid biosynthetic pathway.

LITERATURE CITED

- Acquadro A, Lee D, Chiapparino E, Comino C, Portis E, Donini P, Lanteri S (2003) Detection and characterisation of SNPs in *Capsicum* spp. *Capsicum Eggplant Newsl* 22:37-40
- Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA (2003) Differential expression of fatty acid synthesis genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *J Exp Bot* 54:165-1664
- Andrews J (1995) Peppers, the domesticated capsicums. University of Texas Press, Austin
- Arnedo-Andrés MS, Gil-Ortega R, Luis-Arteaga M, Hormaza I (2002) Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Pvr4* locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor Appl Genet* 105:1067-1074
- Bhatramakki D, Dolan M, Hanafey M, Wineland R, Vaske D, Register JC, Tingey SV, Rafalski A (2002) Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Mol Biol* 48:539-547
- Blum E, Liu K, Mazourek M, Yoo EY, Jahn MM, Paran I (2002) Molecular mapping of the *C* locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45:702-705
- Blum E, Mazourek M, O'Connell MA, Curry J, Thorup T, Liu K, Jahn MM, Paran I (2003) Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 108:79-86
- Carmichael JK (1991) Treatment of herpes zoster and post herpetic neuralgia. *Amer Family Physician* 44:203-210
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313
- Chiapparino E, Lee D, Donini P (2004) Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47:414-420
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30:137-139
- Curry J, Aluru M, Mendoza M, Nevarez J, Melendrez M, O'Connell MA (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Sci* 148:47-57
- Daood HG, Illes V, Gnayfeed MH, Meszaros B, Horvath G, Biacs PA (2002) Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and sub critical propane. *J Supercrit Fluids* 23:143-152
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
- Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K (1982) Capsaicinoids formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric Biol Chem* 46:2591-2592

- Giancola S, McKhann HI, Bérard A, Camilleri C, Durand S, Libeau P, Roux F, Reboud X, Gut IG, Brunel D (2006) Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploidy plants. *Theor Appl Genet* 112:1115-1124
- Giordano M, Oefner PJ, Underhill PA, Cavalli-Sforza L, Tosi R, Richiardi PM (1999) Identification by denaturing high-performance liquid chromatography of numerous polymorphisms in a candidate region for multiple sclerosis susceptibility. *Genomics* 56:247-253
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98
- Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor Appl Genet* 108:1212-1220
- Henry CJ, Emery B (1986) Effect of spiced food on metabolic rate. *Hum Nutr Clin Nutr* 40:165-268
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. karayatsubusa at different stages of flowering. *Agric Biol Chem* 43:2493-2498
- Kim DS, Kim DH, Yoo JH, Kim BD (2006) Cleaved amplified polymorphic sequence and amplified fragment length polymorphism markers linked to the fertility restorer gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol Cells* 21:135-40
- Kim M, Kim S, Kim S, Kim BD (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Mol Cells* 11:213-219
- Kim MY, Van K, Lestari P, Moon JK, Lee SH (2005) SNP identification and SNAP marker development for a *GmNARK* gene controlling supernodulation in soybean. *Theor Appl Genet* 110:1003-1010
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4:403-410
- Lai Z, Livingstone K, Zou Y, Church SA, Knapp JS, Andrews J, Rieseberg LH (2005) Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theor Appl Genet* 111:1532-1544
- Lang Y, Yanagawa S, Sasanuma T, Sasakuma T (2006) A gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. *Breed Sci* 56:55-62
- Lee B, Choi D, Lee KW (1998) Isolation and characterization of *o*-diphenol-*O*-methyltransferase cDNA clone in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Plant Biol* 41:9-15
- Lee CJ, Yoo EY, Shin JH, Lee J, Hwang HS, Kim BD (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the *Capsaicinoid synthetase* gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol Cells* 19:262-267
- Lee RJ, Yolton RL, Yolton DP, Schnider C, Janin ML (1996) Personal defense sprays: effects and management of exposure. *J Amer Optometric Assoc* 67:548-560
- Lee SH, Walker DR, Cregan PB, Boerma HR (2004) Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theor Appl Genet* 110:167-174

- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, Jahn MK (1999) Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics* 152:1183-1202
- Loaiza-Figueroa F, Tanksley SD (1988) Genetics of a second *locus* determining pungency in chilli peppers (*Capsicum*). *J Hered* 79:314-315
- Lopez C, Piégu B, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V (2005) Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 110:425-431
- Minamiyama Y, Kinoshita S, Inaba K, Inoue M (2005) Development of a cleaved amplified sequence (CAPS) marker linked to pungency in pepper. *Plant Breed* 124:288-291
- Moreno-Vázquez S, Ochoa OE, Faber N, Chao S, Jacobs JME, Maisonneuve B, Kesseli RV, Michelmore RW (2003) SNP-based codominant markers for a recessive gene conferring resistance to corky root rot (*Rhizomonas suberifaciens*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genome* 46:1059-1069
- Olmstead GR, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L, Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the *Solanaceae* based on chloroplast DNA. *Solanaceae* 4:11-37
- Paris M, Potter RH, Lance RCM, Li CD, Jones MGK (2003) Typing *Mlo* alleles for powdery mildew resistance in barley by single nucleotide polymorphism analysis using MALDI-TOF mass spectrometry. *Austr J Agri Res* 54:1343-1349
- Prasad BCN, Kumar V, Gururaj HB, Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA (2006) Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.) *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13315-13320
- Schulzeck S, Wulf H (1997) Local therapy with capsaicin or ASS in chronic pain. *Der Schmerz* 11:345-352
- Scoville WL (1912) Note *Capsicum*. *J Amer Pharm Assn* 1:453
- Stewart C, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyl-transferase. *Plant J* 42:675-688
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V (1998) The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl-transfer. *Plant J* 14:703-713
- Suzuki T, Fujiwake H, Iwai K (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit. I. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol* 21:839-853
- Tanksley SD, Bernatzky R, Lapitan NL, Prince JP (1988) Conservation of gene repertoire but gene order in pepper and tomato. *Proc Natl Acad Sci* 85:6419-6423
- Walsh BM, Hoot SB (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (*Solanaceae*) using DNA sequences from two non-coding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. *Int J Plant Sci* 162:1409-1418
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ,

Lipshutz R, Chee M, Lander ES (1998) Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29:E88-8

Yeam I, Kang BC, Lindeman W, Frantz JD, Faber N, Jahn MM (2005) Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the *pvr1* locus encoding eIF4E in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 112:178-86

Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli LK, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND, Cregan PB (2003) Single-nucleotide polymorphisms in Soybean. *Genetics* 163:1123-1134

Capítulo 5

**IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE UNA SECUENCIA DE
ADN PARCIAL RELACIONADA CON EL CARÁCTER
PICANTE**

INTRODUCCIÓN

El carácter picante en el género *Capsicum* spp. es el resultado de la presencia de unos compuestos alcaloides denominados capsicinoides. Hasta este momento se sabe que la presencia/ausencia de picor está controlada por el gen dominante *Pun1*, que parece actuar a modo de interruptor. Este gen codifica una enzima con función aciltransfera, llamada *AT3*, de la que no se conoce actualmente su función específica dentro de la ruta de biosíntesis de los capsicinoides. Además de *AT3*, se han descrito hasta el momento 12 enzimas más involucradas en la biosíntesis de estos compuestos (Aluru et al. 1998; Curry et al. 1999; Aluru et al. 2003; Prasad et al. 2006).

Un punto crucial en la ruta de biosíntesis de los capsicinoides es la condensación del ácido graso, 8-metil-6-nonenoico, con la vainillilamina. La vainillilamina es común a todos los capsicinoides, sin embargo, la longitud de la cadena del ácido (desde C₉ hasta C₁₁) y su saturación es lo que diferencia a unos capsicinoides de otros (Bennett y Kirby, 1968). Varios trabajos se han centrado en estudiar a nivel genético, molecular y bioquímico este paso de la ruta, controlado por una enzima del tipo aciltransferasa y denominada capsicina sintetasa (*CS*). Inicialmente, Kim et al. (2001) aislaron 39 clones de ADN-complementario (ADNc) procedentes de tejido placentario de pimientos picantes, mediante la técnica de hibridación sustractiva. De todos estos clones, el SB2-66 (nº de entrada del GenBank BF723664) mostró similitud con un grupo de coenzimas aciltransferasas. Basándose en esta similitud y en el análisis de su expresión diferencial para tejido placentario de individuos picantes, se sugirió que SB2-66 podría formar parte de la secuencia del gen que codifica a la enzima *CS*.

El clon SB2-66 también era un candidato ideal para ser parte de la secuencia del gen *Pun1*, ya que se observó que este clon co-segregaba con el carácter picante y además, se localizaba en la misma región del cromosoma 2 que el locus *Pun1* (Blum et al. 2002). A partir del clon SB2-66 se obtuvo la secuencia completa de ADNc de este gen, mediante la técnica 5' RACE (*Rapid amplification of 5' complementary DNA ends*) y empleando ARN total de tejido placentario inmaduro del genotipo picante 'Habanero' (Stewart et al. 2005). Su análisis reveló que la secuencia de *Pun1* contenía un marco de lectura abierto (*Open-Reading Frame*; ORF) de 1323pb, una región no traducida 5' (*UnTranslated Region*; UTR) de 43 pb y un 3'UTR de 181 pb. Los ADN genómicos de la variedad picante 'Habanero' y no picante 'Júpiter' fueron utilizados para clonar *Pun1* mediante la técnica conocida como paseo cromosómico (*Genome Walking*). La comparación entre la longitud total del ADNc y el ADN genómico reveló que la estructura del gen estaba formada por dos exones de 738 y 585 pb, y un intrón de 348 pb. El estudio de la secuencia genómica en individuos no picantes de *C. annuum*, determinó que una delección de 2.5 kb, situada a lo largo de 1.8 kb del promotor y 0.7 kb del primer exón, era la responsable de la ausencia de picor (*pun1*). Conocida la estructura del gen *Pun1* se supo que el fragmento SB2-66 se localizaba a lo largo

de la parte final del segundo exón y la zona 3'UTR. El análisis de la secuencia de aminoácidos, traducida desde la información genética de *Pun1*, reveló que pertenecía a la superfamilia BAHD de las aciltransferasas, y basándose en la similitud con otras aciltransferasas aisladas en *Capsicum*, la enzima codificada por *Pun1* se denominó aciltransferasa 3 (*AT3*) (Stewart et al. 2005). Actualmente todavía no es conocida la función específica de *AT3* dentro de la ruta de síntesis de los capsicinoides.

En un trabajo paralelo al anterior e iniciando su estudio también a partir del clon SB2-66, se obtuvo, mediante la secuenciación de productos derivados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la misma secuencia genómica de *Pun1*, sin embargo, los autores sugirieron que dicha secuencia podría corresponder funcionalmente a la enzima *CS* (Lee et al. 2005). Esta hipótesis no ha sido confirmada ya que recientemente ha sido publicada la caracterización de *CS* y se ha identificado el gen *csy1* que codifica para esta enzima (Prasad et al. 2006). La enzima *CS* se purificó a partir de tejido placentario del genotipo muy picante 'M-4' de *C. frutescens* y se estudió su actividad enzimática en los genotipos: poco picante *C. annuum* Arka Abhir, medio picante *C. frutescens* AW2 y muy picante *C. frutescens* M-4. Asimismo, se identificó la secuencia del gen (*csy1*) que la codificaba, mediante el uso de cebadores degenerados. La secuencia de *csy1* no mostró homología con ninguna de las secuencias génicas de los genes previamente identificados en la ruta de biosíntesis de los capsicinoides, incluyendo *Pun1*. Con los resultados de este trabajo se concluyó finalmente que la capsicina sintetasa, *CS*, no era *AT3*.

Otras secuencias de ADN relacionadas con esta ruta de biosíntesis de los capsicinoides, han sido publicadas, como es el caso de *Catf1* y *Catf2* (Lang et al. 2006). Mientras que la secuencia *Catf2* no ha sido estudiada, la secuencia de *Catf1* parece corresponder a la ya descrita aciltransferasa *AT3*, como ya ha sido discutido en el capítulo anterior.

Pese al tiempo y esfuerzo dedicado al esclarecimiento de la ruta de biosíntesis de los capsicinoides, en especial a la condensación del ácido graso y el grupo amina, todavía son desconocidas las funciones específicas de algunas enzimas de la ruta y faltan genes por identificar y caracterizar a lo largo de ella.

Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron: primero, la identificación de una secuencia de ADN relacionada con el carácter picante; segundo, el rastreo de una genoteca de 'Bacterial Artificial Chromosomes' (BACs) para seleccionar un clon que contuviera la secuencia identificada; y finalmente, la caracterización de entradas de pimiento en función de su fenotipo y de la presencia/ausencia de *Pun1* y de esta nueva secuencia de interés.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los trabajos de identificación de la secuencia de interés, y su análisis de expresión génica, se utilizaron dos genotipos de *C. annuum*, ‘Yolo Wonder’ (YW) y ‘Serrano Criollo de Morelos-334’ (SCM-334), no picante y picante, respectivamente, y el genotipo picante *C. chinense* cv Habanero.

Las plantas fueron cultivadas en invernadero en las instalaciones del CITA (Zaragoza, España). El ambiente fue controlado con calefacción radiante y con refrigeración evaporativa, variando la temperatura entre 15 y 25 °C. Las siembras se realizaron en placas Petri, sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, para favorecer una germinación rápida y homogénea de las semillas. Las placas se mantuvieron en una cámara en oscuridad a 22 °C y se regaron con agua destilada hasta la germinación. Una vez germinadas, las plántulas fueron transplantadas a pequeñas macetas con sustrato Jiffy-7 (Clause-Tezier Ibérica, Valencia, España) y se llevaron al invernadero. Cuando las plántulas tenían entre 2 y 3 hojas verdaderas fueron transplantadas a macetas de plástico negro de 9 cm de diámetro. Se cultivaron tres repeticiones de cada entrada. Como sustrato se empleó una mezcla de turba, arena, tierra y Humin Substrat (Klasman-Deilmann, Alemania) en partes iguales (1:1:1:1 en v:v). Se abonaron con fertilizantes de liberación lenta (Oscomote 16N-4P-9K, Scotts, España) y se trataron semanalmente con fitosanitarios para prevenir ataques de oídio e insectos (pulgón, trips, mosca blanca, etc). Las plantas fueron regadas diariamente para mantener sus condiciones óptimas de crecimiento y se mantuvieron hasta la maduración de los frutos.

Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico fue aislado a partir de hojas jóvenes de plantas de pimiento utilizando el método de Doyle y Doyle (1978) con modificaciones de Hormaza et al. (1994) como se describe en el **Anexo 1**. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (GeneQuant, PharmaciaBiotech, Inglaterra) mediante absorción a 260 nm. Posteriormente, todas las muestras de ADN se diluyeron a una concentración igual y conocida de 10 ng/ μ l.

Diseño de cebadores y amplificación mediante PCR

Los pares de cebadores empleados en este estudio fueron diseñados empleando el programa Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/). En la **Tabla 5.1** aparecen las secuencias de los distintos cebadores empleados, sus temperaturas de hibridación y las secuencias de origen a partir de las que fueron diseñados.

Tabla 5.1. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de ADN de interés, temperaturas de hibridación y secuencias de origen.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	T ^a (°C)	Secuencia origen
SB2-66F	ATTTTGGATGGGGAAG	45	SB2-66 clon
SB2-66R	CCGTAAACTTCCGTTG	45	SB2-66 clon
PB3F	CCAAGTTTTGGAGTAATTGGA	55	Fragmento 362 pb
PB3R	CCATTGTTTCGTAAGTTTCAA	55	Fragmento 362 pb
C-R#1	CCCTCTTCAATCAAACATCCA	50	Fragmento 307 pb

El par de cebadores SB2-66F/SB2-66R fue diseñado para amplificar el fragmento SB2-66. Ya que de esta amplificación se obtuvieron dos productos de PCR, de 362 y 307 pb, se diseñó un par de cebadores específico de cada fragmento. Para el fragmento de 362 pb fueron diseñados los cebadores PB3F/PB3R, en la región donde se localizan las deleciones encontradas en la secuencia del fragmento de 307 pb. Para el fragmento de 307 pb se utilizaron los cebadores SB2-66F/C-#1R, diseñados a partir de esta secuencia y englobando la primera y segunda deleción. En la **Figura 5.2** se detallan las posiciones de cada uno de estos cebadores dentro de las secuencias correspondientes a los fragmentos de 362 pb y 307 pb.

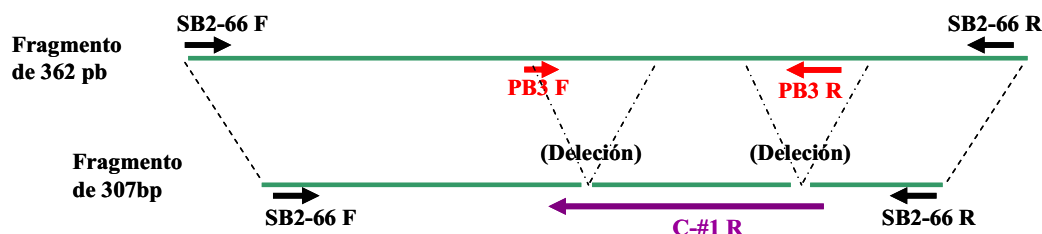


Figura 5.2. Diagrama de la localización de los cebadores SB2-66F/SB2-66R, PB3F/PB3R y C-R#1 a lo largo de las secuencias correspondientes a los fragmentos de 362 pb y 307 pb.

Las amplificaciones de los fragmentos por PCR se realizaron en un volumen total de 20 μ l, conteniendo 40 ng de ADN genómico, 25 mM tampón 10 \times (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 + 50 mM KCl) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs (Invitrogen), 0,2 μ M de cada uno de los cebadores y 0,6 U ADN Taq Polimerasa (Invitrogen), en un termociclador PCR system 9700 (Perkin Elmer, Waltham, MA). Las amplificaciones fueron realizadas a 94 °C durante 2 min, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a la correspondiente temperatura de hibridación, y 2 min a 72 °C, finalizando con 5 min de extensión a 72 °C. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa MetaPhor[®] (FMC Corporation, Princeton, NJ) al 2.5% en tampón 1 \times TAE (0.04 M Tris-Acetato, 1mM EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 50 ng/ μ l y se visualizaron mediante luz ultravioleta en un equipo GelDoc2000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Extracción de ARN y RT-PCR

Para estudiar la expresión diferencial de los fragmentos de 362 pb y 307 pb en relación a la síntesis de capsicinoides, se determinó el nivel de transcritos de estos dos fragmentos a lo largo del desarrollo del fruto [desde 10 hasta 60 días post-antesis (dpa)] usando la técnica de transcripción inversa por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se recolectaron los frutos a los 10, 20, 30, 40 y 60 dpa de los genotipos picantes ('SCM-334' y 'Habanero') y del no picante ('YW'). Inmediatamente después de la recolección, se procedió a separar y pesar el tejido placentario, el cual fue conservado a - 80 °C hasta su utilización.

Cien miligramos de tejido placentario fueron utilizados para la extracción de ARN total, la cual se realizó con Trizol[®] siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) con pequeñas modificaciones (**Anexo 2**). La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro (GeneQuant) mediante absorción a 260 nm.

El ADNc fue sintetizado a partir de 1 μ g de ARN usando el kit 'ProtoScript[™] first strand cDNA synthesis' (New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. La RT-PCR se llevó a cabo con el par de cebadores SB2-66F/SB2-66R. La amplificación de los fragmentos por RT-PCR se realizó en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 1 μ l del ADNc sintetizado, 5 μ l tampón 10 \times (20mM Tris-HCl, pH 8.4 + 50 mM KCl) (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 0.02 mM dNTPs (Invitrogen), 0,5 μ M de cada uno de los cebadores y 0,05 U ADN Taq Polimerasa (Invitrogen), en un termociclador PCR system 9700 (Perkin Elmer). La amplificación fue realizada a 94 °C durante 2 min, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 45 °C, y 2 min a 72 °C, finalizando con 5 min de extensión a 72°C. Como control positivo de la RT-PCR se amplificó parte de la secuencia del gen *Ubiquitina* de pimiento y para ello se diseñaron los cebadores U1F/U1R (5'-ATGGTCACAAGAAACTCC-3'/5'-GAGGGATTTGTGTACGGATA-3'; t^a

hibridación 52 °C) específicos para *C. annuum* y el par U2F/U2R (5'-GAAAACATTGAAGCTTGACC-3'/5'-ATGTTGCGGCTATACTCACT-3'; tª hibridación 52 °C) para *C. chinense*.

Los productos de RT-PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa MetaPhor® (FMC Corporation) al 2.5% en tampón 1× TAE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 50 ng/μl y se visualizaron mediante luz ultravioleta en un equipo GelDoc2000 (Bio-rad).

La especificidad de los productos de RT-PCR de 362 y 307 pb se verificó por clonación y secuenciación de los fragmentos de ADNc extraídos de los geles (**Anexo 3**). Estos productos se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI), que contiene un sitio de clonación específico para productos de PCR con una adenina libre en los extremos 3'. Los protocolos de ligación entre el fragmento de PCR y el plásmido, la transformación de *Escherichia coli* mediante choque térmico, la selección de recombinantes y el aislamiento del ADN plasmídico de *E. coli* se detallan en el **Anexo 4**.

Las cuantificaciones de los plásmidos se realizaron en geles de agarosa al 1% en 1× TAE y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. La secuenciación se realizó en el servicio Secugen S.L., (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España; www.secugen.es).

Cuantificación de capsicina y dihidrocapsicina

El contenido de capsicina y dihidrocapsicina fue cuantificado a partir de tejido placentario de frutos recogidos en diferentes estados de desarrollo (10, 20, 30, 40 y 60 dpa). En la mayoría de los estados de desarrollo, el tejido placentario de un mismo fruto fue suficiente para realizar el estudio de expresión génica (extracción de ARN) y de cuantificación del contenido de capsicina y dihidrocapsicina, a excepción de algunos frutos cuyo estado de desarrollo era de 10 ó 20 dpa. En estos casos en los que el peso del fruto no llegaba al mínimo necesario para sendos análisis, se agrupó tejido placentario de varios frutos, en el mismo estado de desarrollo y de una misma planta, para los dos procesos.

El tejido placentario fue secado en una estufa a 55 °C durante 1 ó 2 días. Una vez seco, el tejido fue molido con un politrón hasta la obtención de un polvo fino. Cien miligramos del tejido molido fueron utilizados para la extracción de los capsicinoides (ver Capítulo 2; sección: Materiales y métodos; apartado: Extracción de capsicinoides). El extracto fue analizado mediante el método HPLC-ESI/MS para cuantificar la capsicina y dihidrocapsicina, como se detalla en el apartado de Material y métodos del Capítulo 2.

Alineación y análisis de secuencias

Las secuencias de los fragmentos de 362 pb y 307 pb obtenidos en el análisis de expresión diferencial fueron alineadas con la secuencia del clon SB2-66 (nº de entrada del GenBank BF723663). La búsqueda de homologías se realizó utilizando el programa BLAST, accesible desde el *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa BioEdit ver. 5.0.6 (Hall 1999).

Rastreo de una genoteca

Para la identificación de clones que contuvieran las secuencias correspondientes al fragmento de 307 pb y al gen *Pun1* se partió de 10 clones (356M10, 60O14, 176P15, 47C23, 114A24, 159M5, 378D3, 43B21, 300C6 y 192N12) pertenecientes a una genoteca de BACs construida a partir de ADN de la línea picante *Capsicum frutescens* BG2816. Dicha genoteca es mantenida en el departamento de Mejora Genética de la Universidad de Cornell (Ithaca, NY). Para identificar correctamente los clones se utilizaron dos técnicas: PCR e hibridación con sondas radioactivas de ADN.

Para llevar a cabo esta PCR se utilizó el par de cebadores PB3F/PB3R específico de *Pun1*, y el par SB2-66F/C-R#1 específico del fragmento de 307 pb. La purificación de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el kit comercial QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La amplificación de los fragmentos se realizó en un volumen total de 30 µl, conteniendo 5 µl de plásmido purificado, 25 mM tampón 10× (Invitrogen), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Invitrogen), 0,2 µM de cada uno de los cebadores y 0,6 U DNA Taq polimerasa (Invitrogen). Se utilizó como testigo, ADN genómico del cultivar 'Habanero'.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% en 1× TAE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 50 ng/µl y se visualizaron mediante luz ultravioleta en un equipo GelDoc2000 (Bio-Rad).

Se verificó la especificidad de estos productos de PCR por secuenciación directa de los fragmentos de ADN extraídos de los geles en el Bioresources Center, Cornell University (Ithaca, NY; <http://www.brc.cornell.edu>).

Para la realización de la hibridación con sondas radioactivas, se prepararon dos membranas de Nylon N⁺ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), en las que se fijaron en orden aleatorio repeticiones de los 10 clones (**Figura 5.3**).

Las dos membranas fueron hibridadas con sondas de ADN marcadas con ³²P, siendo la sonda para una membrana específica de *Pun1* (**Figura 5.3a**), y para la otra, del fragmento de 307 pb (**Figura 5.3b**).

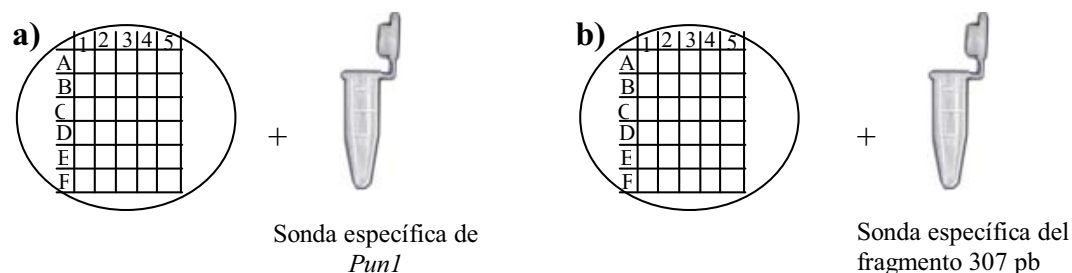


Figura 5.3. Esquema de los dos filtros utilizados para la hibridación. Cada filtro fue dividido en casillas, en las cuales se fijaron los BACs. Cada uno de los dos filtros se hibridó con una sonda marcada específica de *Pun1* (a) y del fragmento de 307 pb (b), respectivamente.

La sonda de ADN genómico específica de *Pun1* se preparó a partir del producto de PCR amplificado con los cebadores PB3F/PB3R. Para la sonda específica del fragmento de 307 pb, se utilizó el propio fragmento, purificado a partir de la reacción de PCR con los cebadores SB2-66F/SB2-66R. El marcaje radioactivo con ^{32}P de las sondas se realizó con el kit Prime-It RmT Random Labelling (Stratagene, La Jolla, CA) (**Anexo 5**). La hibridación con la membrana se realizó siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Rusell (2001) (**Anexo 5**).

Una vez hibridados los filtros, fueron lavados una vez con $2\times$ SSC/0.1% SDS y dos veces más con $1\times$ SSC/0.1% SDS, durante 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. La visualización de los filtros se realizó por autoradiografía, mediante la exposición, al menos, durante 2 semanas, de los filtros a un PhosphorImager Storage Screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Evaluación de especies de pimiento

La presencia/ausencia del alelo *Pun1* y de la secuencia parcial *Catf2* se estudió inicialmente en los genotipos picantes ‘SCM-334’ y ‘Habanero’, y en el no picante ‘YW’.

Para ello se diseñaron tres pares de cebadores de ADN: F1/R1, F2/R2 y F1/R3. La secuencia del alelo *Pun1* (nº de entrada del GenBank AY819028) sirvió de molde para el diseño de los cebadores F1, F2, R1 y R2 (**Figura 5.4**). A partir de la secuencia parcial de *Catf2* (nº de entrada del GenBank AB206920) se diseñó R3.

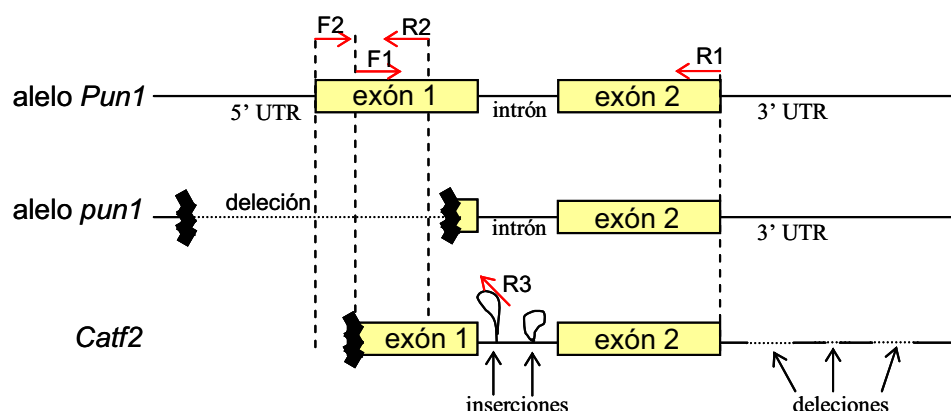


Figura 5.4. Comparación de las estructuras de los alelos *Pun1* y *pun1*, y la secuencia parcial *Catf2*. Las zonas donde los cebadores fueron diseñados se indican por flechas rojas.

El cebador F1 fue diseñado al inicio de la secuencia parcial conocida de *Catf2*, correspondiente al primer exón de *Pun1*. Esta zona es común para el alelo *Pun1* y *Catf2*. El cebador R2 también está localizado en el primer exón de *Pun1* y es común para *Pun1* y *Catf2*. El cebador F2, localizado también en el primer exón de alelo *Pun1*, fue diseñado en la zona todavía no conocida de *Catf2*. El cebador R1 fue diseñado en la parte final del segundo exón, y es común a los alelos *Pun1* y *pun1* y a la secuencia parcial *Catf2*. El cebador R3 fue diseñado en la primera de las dos inserciones del intrón de *Catf2*, inexistentes en los alelos *Pun1* y *pun1*.

Las secuencias de estos cebadores, sus temperaturas de hibridación y sus secuencias de origen aparecen en la **Tabla 5.2**.

Para estudiar simultáneamente la presencia del alelo *Pun1* y de la secuencia parcial *Catf2* se utilizó el par de cebadores F1/R1, ya que fueron diseñados en zonas comunes de ambas secuencias y amplifican diferentes tamaños de bandas en función de que la secuencia presente sea la del alelo *Pun1* o *Catf2*.

Un elevado número de entradas pertenecientes al género *Capsicum* spp. fue estudiado, siendo 56 entradas de *C. annum*, 16 de *C. baccatum*, 11 de *C. chinense*, 8 de *C. frutescens*, 5 de *C. chacoense*, 3 de *C. pubescens*, 2 de *C. galapagoense*, 1 de *C. eximium* y 8 entradas pendientes de evaluar su especie. Todas las entradas fueron obtenidas del Banco de Germoplasma de Hortícolas de Zaragoza (CITA). La siembra y el cultivo de este material vegetal fueron realizados como previamente se ha descrito en el apartado de Material vegetal. Se cultivaron tres repeticiones de cada entrada y las plantas se mantuvieron hasta la maduración de los frutos.

Tabla 5.2. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de ADN de interés, temperaturas de hibridación y secuencias de origen.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	T ^a (°C)	Secuencia origen
F1	TCTTGAGTGTTCTGAATAAAAT	50	alelo <i>Pun1</i>
R1	TTCCTCATTGCGTTCAAATTC	50	alelo <i>Pun1</i>
F2	ATGGCTTTTGCATTACCATC	50	alelo <i>Pun1</i>
R2	TCAAGAATTTTCAGACATGGAACA	50	alelo <i>Pun1</i>
R3	AGGCAACGCATGAATCCTAA	50	secuencia parcial <i>Catf2</i>

Fenotipado para el carácter picante

Todas las entradas de pimiento fueron clasificadas en función de su fenotipo picante o no picante. Para ello se recolectaron frutos en estado maduro de las tres repeticiones y se testaron gustativamente, por al menos dos personas. Si el primer fruto de una planta era picante, la planta era considerada picante, pero si el primer fruto de la planta resultaba no picante, se testaba un segundo o tercer fruto de la misma planta para confirmar su carácter no picante.

RESULTADOS

Identificación de una nueva secuencia de ADNc posiblemente relacionada con el carácter picante

A partir del par de cebadores, SB2-66F/SB2-66R, diseñado para amplificar la secuencia del clon SB2-66, se obtuvieron dos productos de PCR de 362 pb y 307 pb, para los genotipos picantes ('SCM-334', 'Habanero') y el no picante ('YW') (**Figura 5.5**).

La expresión diferencial de los fragmentos de 362 pb y 307 pb, en función del estado de desarrollo del fruto, fue detectada por RT-PCR (**Figura 5.6a**). Transcritos del fragmento de 362 pb pudieron observarse a los 30 dpa en 'Habanero' y a los 20 y 30 dpa en 'SCM-334'. En 'YW' no se observó acumulación de transcritos de este fragmento. Transcritos correspondientes al fragmento de 307 pb se observaron a los 30 dpa en 'Habanero', a los 20 dpa en 'SCM-334', y a los 20 y 30 dpa en 'YW'.

En relación a la cuantificación del contenido de capsicina y dihidrocapsicina mediante el método de HPLC-ESI/MS, para los genotipos 'Habanero' y 'SCM-334' la acumulación de ambos compuestos comenzó con la

expresión de los fragmentos de 362 pb y 307 pb (**Figura 5.6b**). Para el genotipo no picante 'YW', no se detectó ningún contenido de capsicina y dihidrocapsicina.

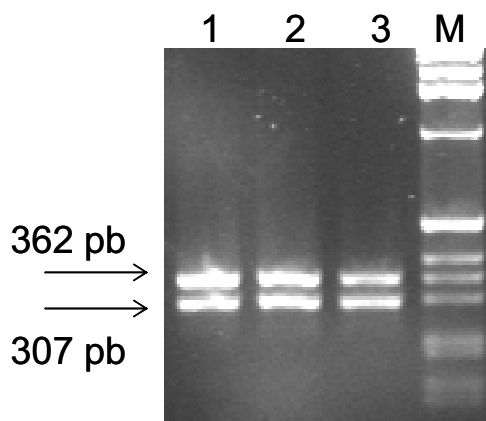


Figura 5.5. Productos amplificados con los cebadores SB2-66F/SB2-66R a partir de ADN de variedades de pimienta. Carril 1, 'Yolo Wonder'; carril 2, 'Serrano Criollo de Morelos-334; carril 3, 'Habanero'; M, marcador de tamaño de fragmentos.

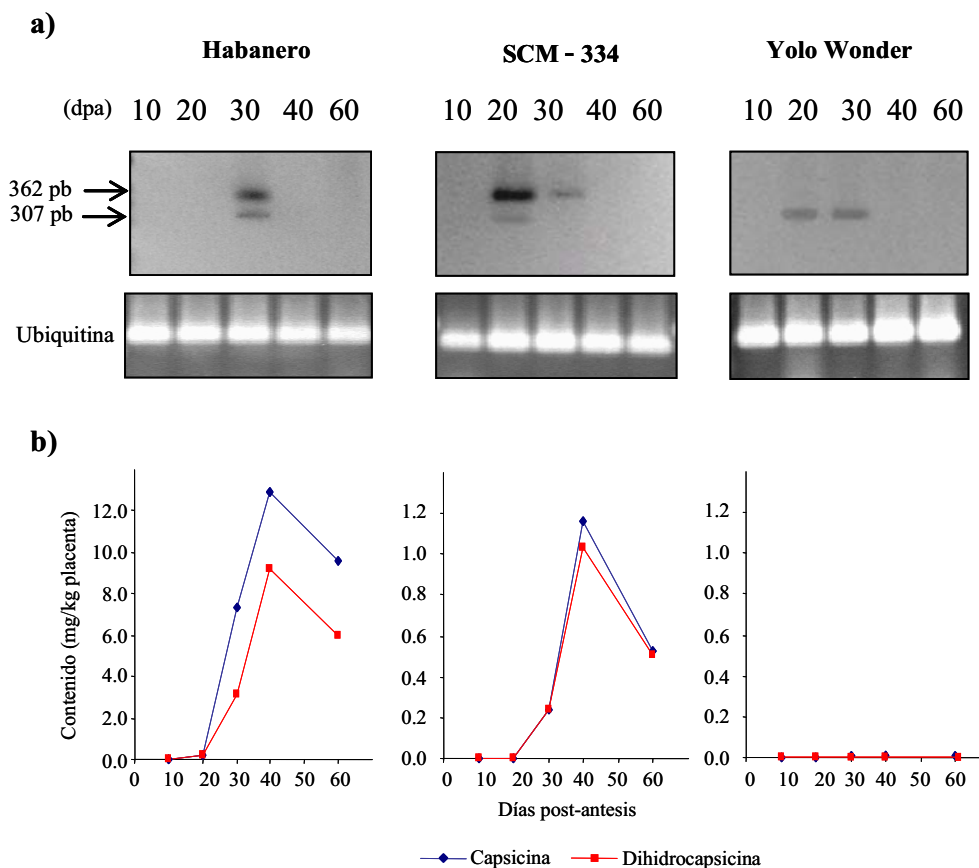


Figura 5.6a. Expresión diferencial de los fragmentos de 362 pb y 307 pb amplificados por RT-PCR con los cebadores SB2-66F/SB2-66R, a partir de tejido placentario de frutos en

diferentes estados de desarrollo. El gen *Ubiquitina* fue amplificado como control de la calidad del ADNc. **b.** Contenidos de capsicina y dihidrocapsicina (mg/kg de materia seca de placenta) a la largo del desarrollo de fruto, cuantificados mediante el método de HPLC-ESI/MS(TOF), en los genotipos picantes ‘Habanero’ y ‘SCM-334’, y no picante ‘Yolo Wonder’.

La alineación de la secuencia génica del fragmento de 362 pb con el clon SB2-66 mostró una homología del 100%, identificándose como SB2-66 (**Figura 5.7**), y consecuentemente, como parte de la secuencia del gen *Pun1*. Las secuencias del fragmento de 307 pb y SB2-66 mostraron una homología del 81% entre si. Sus diferencias fueron 3 pequeñas deleciones: la primera de 23 pb, situada entre los nucleótidos 209 y 232; la segunda de 4 pb entre los nucleótidos 244 y 248; y la tercera de 28 pb entre los nucleótidos 266 y 293. También se observaron 9 cambios puntuales de nucleótidos, en las posiciones 94, 98, 162, 167, 170, 202, 258, 331, y 338.

Dentro del fragmento de 307 pb fueron observados tres cambios puntuales de nucleótidos asociados a las especies, *C. chinense* y *C. annuum*, en las posiciones 39, 43 y 69. También en este fragmento, se observó un polimorfismo de un nucleótido relacionado con el carácter picante, en la posición 194. En el Capítulo anterior se detalló el estudio de este SNP asociado al carácter picante.

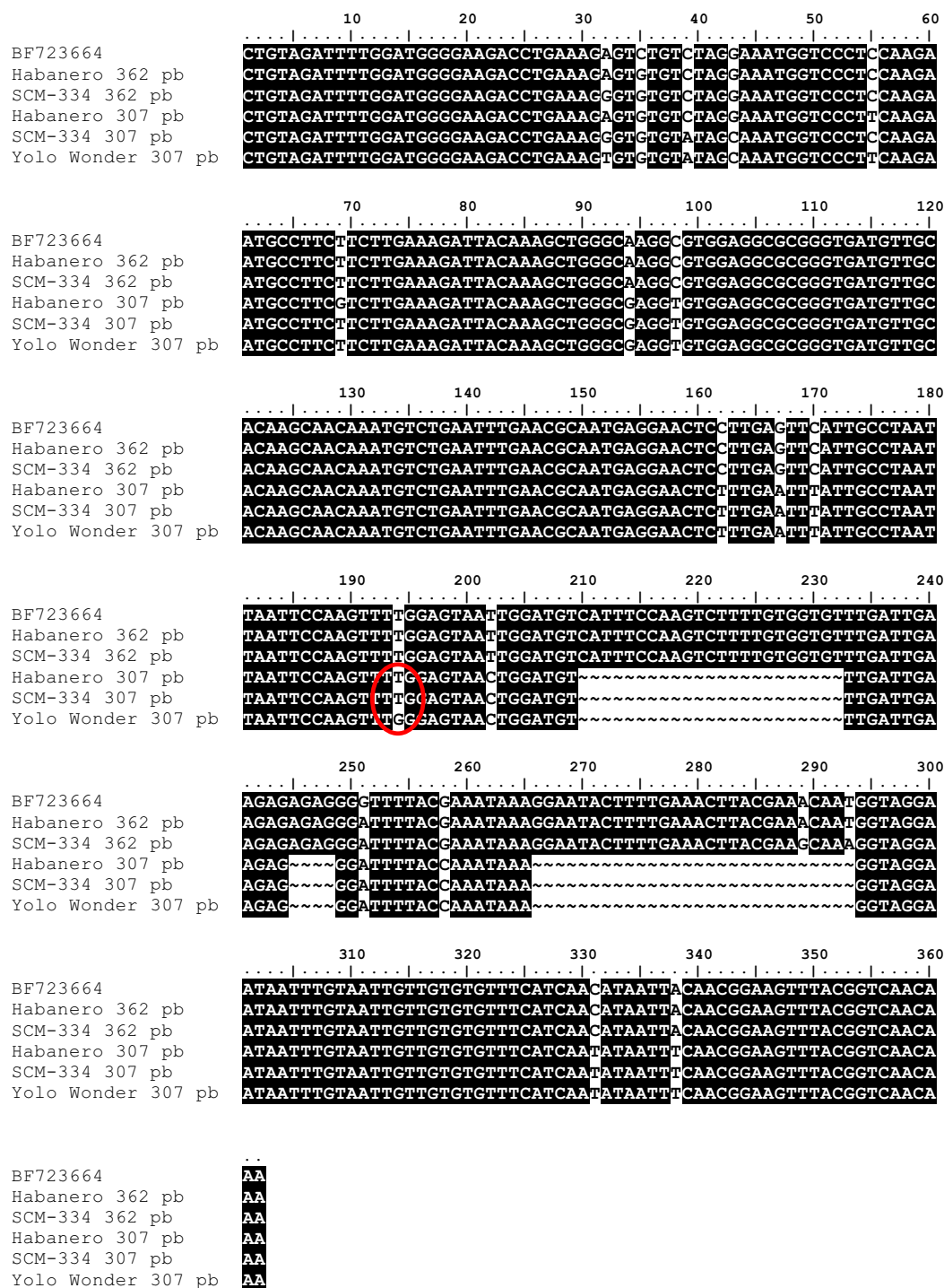


Figura 5.7. Alineamiento de secuencias de ADNc del clon SB2-66 (nº de entrada del GenBank BF723663), y de los fragmentos de 362 pb y de 307 pb de los cultivares ‘Habanero’, ‘SCM-334’ y ‘Yolo Wonder’. El SNP asociado al carácter picante situado en la secuencia del fragmento de 307 pb es indicado con un círculo rojo. Otros cambios puntuales son resaltados en sobre fondo blanco en las posiciones 39, 43, 69, 94, 98, 162, 167, 170, 202, 258, 331, y 338 pb.

Mediante alineamiento múltiple de secuencias se comprobó que el fragmento de 307 pb presentaba una homología del 100% con la parte final de la secuencia parcial publicada *Catf2* (**Figura 5.8**). Por tanto el fragmento de 307 pb se identificó como parte de *Catf2*.

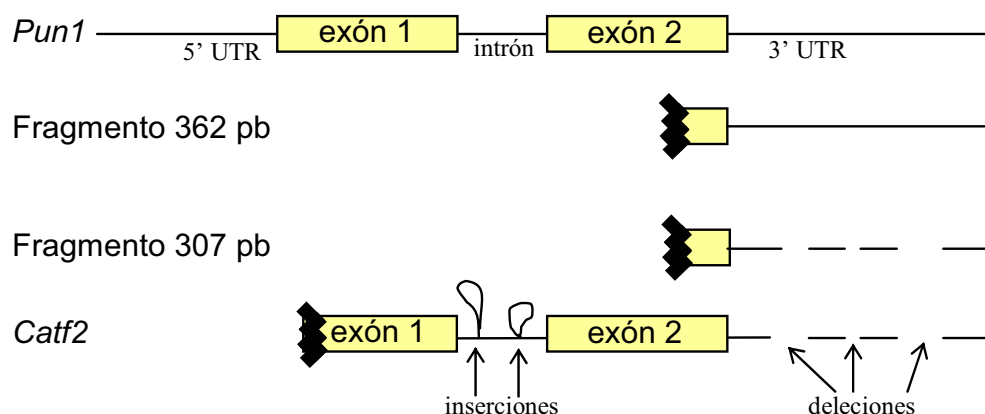


Figura 5.8. Esquema representativo de la alineación del alelo *Pun1*, los fragmentos de 362 y 307 pb y la secuencia parcial *Catf2*. En el esquema se indica con una línea vertical quebrada hasta donde es conocida la secuencia de los fragmentos de 362, 307 pb y *Catf2*.

La alineación de las secuencias de ADN genómico del alelo *Pun1* y la secuencia parcial *Catf2* mostró una homología del 92%. Se observó que sus diferencias estaban localizadas en el intrón y en la zona 3'UTR del alelo *Pun1* (**Figura 5.8**). Por homología, la zona que correspondería al intrón en *Catf2*, contiene dos insertos de 200 y 100 pb y la zona 3'UTR presenta tres pequeñas deleciones, coincidentes con las ya señaladas en el fragmento de 307 pb. También, por homología con la secuencia del alelo *Pun1*, el fragmento de 307 pb estaría localizado a lo largo de la parte final del segundo exón y la zona 3'UTR de la secuencia parcial de *Catf2*.

Rastreo de una genoteca

Identificación de los BACs mediante PCR

La identificación de los clones que contenían al fragmento de 307 pb y a *Pun1* se realizó mediante PCR. La amplificación con el par de cebadores SB2-66F/C#1R, específico del fragmento de 307 pb, dio lugar a un producto de amplificación de 217 pb en los BACs 1, 5 y 6, y en el ADN genómico del cultivar

‘Habenero’ utilizado como control (**Figura 5.9a**). Así mismo, con el par de cebadores PB3F/PB3R, específico de *Pun1*, se amplificó el fragmento esperado de 110 pb en los BACs 3, 6 y 8, y en el ADN genómico de ‘Habenero’ (**Figura 5.9b**). El clonaje y secuenciación de los fragmentos obtenidos con estos dos pares de cebadores, SB2-66F/C#1R y PB3F/PB3R, en los BACs 1, 5 y 6, y en 3, 6 y 8, respectivamente, confirmó que ambos fragmentos correspondían a las secuencias esperadas, específicas del fragmento 307 pb y de *Pun1*.

Identificación de los BACs por hibridación con sondas radioactivas de ADN

Los resultados de la hibridación de los BACs, con las sondas marcadas de ADN específicas para el fragmento de 307 pb y *Pun1*, coincidieron con los obtenidos a través de la técnica PCR. Como se puede observar en la **Figura 5.10**, la hibridación entre el filtro y la sonda específica del fragmento de 307 pb, resultó positiva en los BACs 1, 5 y 6. Para el caso de la hibridación con la sonda específica de *Pun1*, los BACs hibridados fueron los números 3, 6 y 8.

El BAC nº 6 (159M5), que hibridó con el fragmento de 307 pb y con *Pun1*, fue seleccionado para ser secuenciado en su totalidad con el fin de obtener información acerca de la secuencia completa del fragmento de 307 pb y conocer la distancia entre esta secuencia y *Pun1*. El BAC ha sido enviado a TIGR (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD) para su secuenciación.

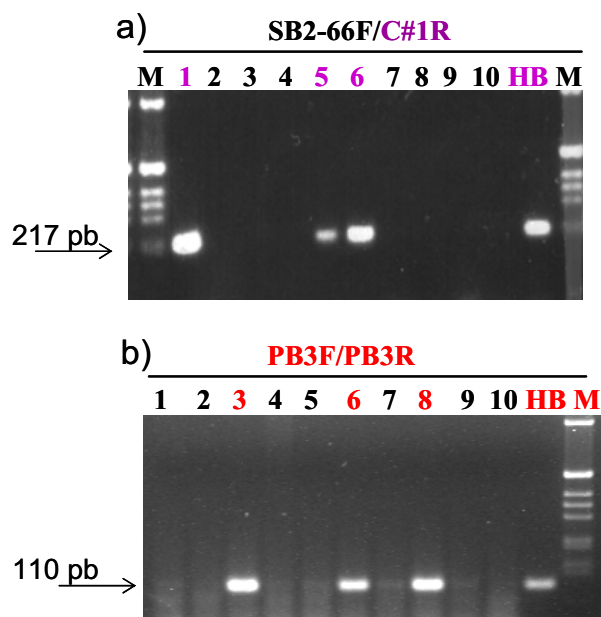


Figura 5.9a. Productos amplificados con los cebadores SB2-66F/C#1R a partir de ADN de BACs de una genoteca de *C. frutescens* BG2816 y con ADN de ‘Habanero’. **b.** productos amplificados con los cebadores PB3F/PB3R a partir de ADN de la misma genoteca de pimiento. Carril 1, BAC 356M10; carril 2, BAC 600I4; carril 3, BAC 176P15; carril 4, BAC 47C23; carril 5, BAC 114A24; carril 6, BAC 159M5; carril 7, BAC 378D3; carril 8, BAC 43B21; carril 9, BAC 300C6; carril 10, BAC 192N12; HB, ‘Habanero’; M, marcador de tamaño de fragmentos.

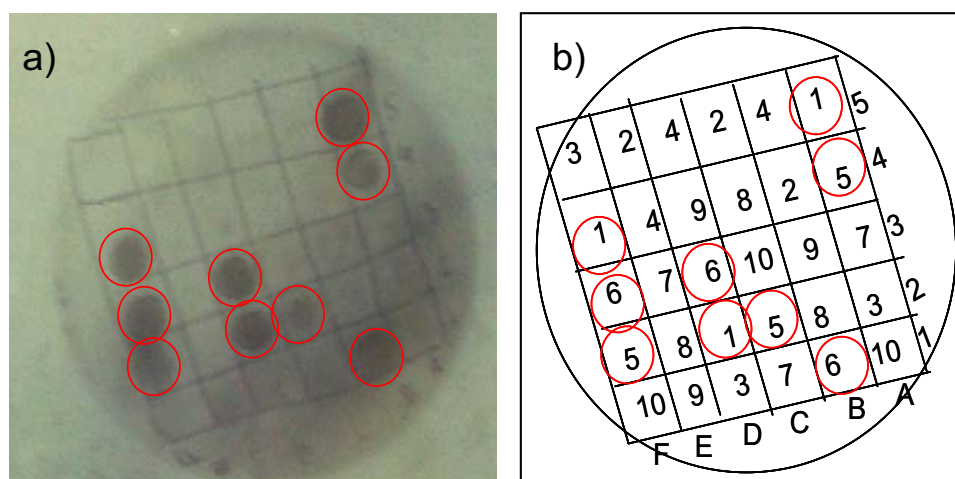


Figura 5.10a. Filtro hibridado con la sonda específica del fragmento 307 pb. **b.** Esquema de colocación de los BACs en el filtro de nylon. En círculo rojo se resaltan los BACs que hibridaron.

Caracterización de entradas de pimiento en función de su fenotipo y de la presencia/ausencia de *Pun1* y *Catf2*

En vista de la localización del fragmento de 307 pb a lo largo de la parte final del segundo exón y la zona 3'UTR de la secuencia parcial de *Catf2* y la alta homología de *Catf2* con el gen *Pun1* se estudió la presencia de estas dos secuencias en entradas picantes y no picantes de pimiento.

Al amplificar mediante PCR las secuencias correspondientes al alelo *Pun1* y la secuencia *Catf2* con el par de cebadores F1/R1, se obtuvieron los fragmentos de amplificación esperados de 1659 y 1330 pb en los genotipos picantes ('Habanero' y 'SCM-334') y un único fragmento de 1659 pb en el genotipo no picante ('YW') (Figura 5.11). El fragmento amplificado de 1659 pb correspondió a la secuencia parcial conocida de *Catf2* (parte final del primer exón, intrón y segundo exón) y el fragmento de 1330 pb correspondió a la parte final del primer exón, el intrón y segundo exón del alelo *Pun1*.

Para los pares de cebadores F2/R2 y F1/R3 también se obtuvieron los fragmentos esperados, de 362 pb para el par F2/R2 y de 586 pb para F1/R3, ambos en genotipos picantes y no picantes.

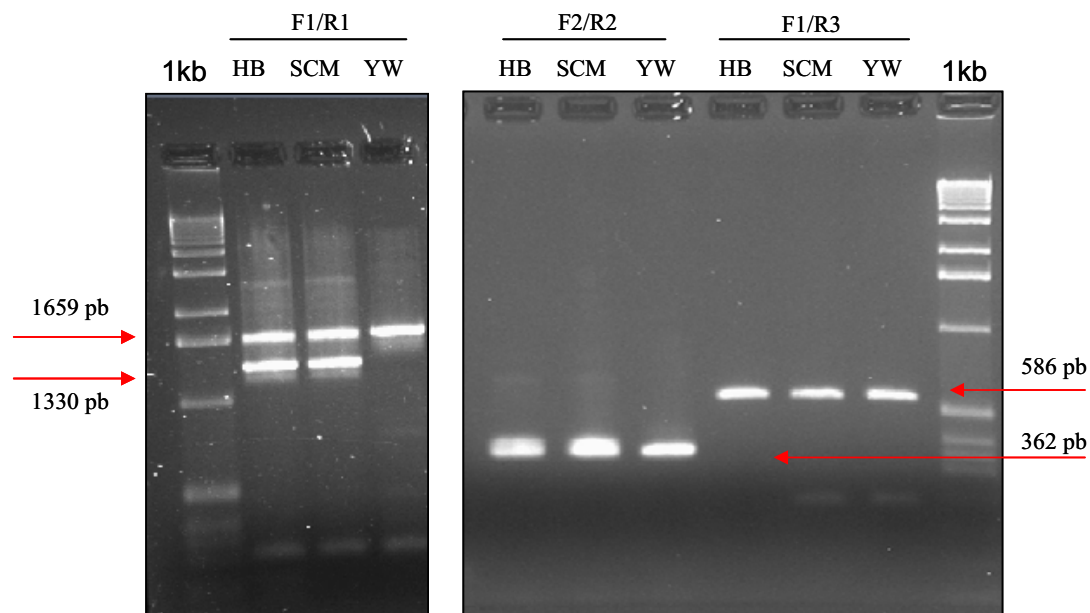


Figura 5.11. Productos de amplificación con los cebadores F1/R1, F2/R2 y F1/R3, a partir de ADN genómico de las variedades de pimiento picante 'Habanero' (HB), 'SCM-334' (SCM), y no picante 'Yolo Wonder' (YW).

Para la caracterización de las entradas de pimiento se escogió el par de cebadores F1/R1 por su capacidad para distinguir la presencia de los alelos *Pun1* (presencia del fragmento de 1330 pb), *pun1* (ausencia del fragmento de 1330 pb) y *Catf2* (presencia del fragmento de 1659 pb). Los resultados de la amplificación mediante PCR de los fragmentos correspondientes al alelo *Pun1* y a la secuencia *Catf2*, en las entradas estudiadas pertenecientes a diferentes especies del género *Capsicum*, así como su fenotipo se detallan en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3. Entradas utilizadas para el análisis fenotípico y genético de *Pun1* y *Catf2*.

Nº Colección	Especie	<i>Pun1</i> (1330 pb)	<i>Catf2</i> (1659 pb)	Fenotipo
3791	<i>C. annuum</i>	SI ^a	SI	P ^b
3799	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ -1384	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ-0115	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ-0335	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ-1166A	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ-1166B	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ-1611	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
BGHZ-2547	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-1	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-100	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-101	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-128	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-168	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-169	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-170	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-20	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-202	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-203	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-214	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-245	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-246	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-247	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P

C-283	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-317	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-341	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-351	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-358	<i>C. annuum</i>	NO ^c	SI	NP ^d
C-365	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-81	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-86	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-87	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-88	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-92	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-94	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC052775	<i>C. annuum</i>	NO	SI	NP
NC055243	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC055247	<i>C. annuum</i>	NO	SI	NP
NC056358	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC056384	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC069143	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC069340	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC069493	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC072687	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC072728	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC072737	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC074354	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC074560	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
NC076176	<i>C. annuum</i>	NO	SI	NP
NC078108	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
XA95	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
Z-00-021	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
Z-00-022	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
Z-02-062	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
Z-03-049	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
Z-03-050	<i>C. annuum</i>	SI	SI	P
C-235	<i>C. baccatum</i>	NO	SI	P

C-138	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-117	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-130	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-131	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-134	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-135	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-137	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-232	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-233	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-234	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-237	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-238	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-57	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-70	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	SI	SI	P
C-181	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>	SI	SI	P
C-152	<i>C. chacoense</i>	SI	SI	P
C-153	<i>C. chacoense</i>	NO	SI	P
C-154	<i>C. chacoense</i>	SI	SI	P
C-175	<i>C. chacoense</i>	SI	SI	P
C-176	<i>C. chacoense</i>	SI	SI	P
C-118	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-143	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-144	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-155	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-156	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-158	<i>C. chinense</i>	NO	SI	P
C-159	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-206	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-231	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-276	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-63	<i>C. chinense</i>	SI	SI	P
C-177	<i>C. eximium</i>	NO	SI	P
C-126	<i>C. frutescens</i>	NO	SI	P
C-161	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P

C-162	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P
C-163	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P
C-164	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P
C-165	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P
C-166	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P
C-189	<i>C. frutescens</i>	SI	SI	P
C-167	<i>C. galapagoense</i>	SI	SI	P
C-179	<i>C. galapagoense</i>	SI	SI	P
C-139	<i>C. pubescens</i>	NO	SI	P
C-228	<i>C. pubescens</i>	NO	SI	P
C-60	<i>C. pubescens</i>	NO	SI	P
C-304	SE ^e	SI	SI	P
YD 96	SE	SI	SI	P
NC056450	SE	NO	SI	NP
756160	SE	SI	SI	P
C-353	SE	SI	SI	P
C-287	SE	SI	SI	P
C-352	SE	SI	SI	P
NC077582	SE	SI	SI	P

^a SI, indica presencia del fragmento amplificado correspondiente a *Pun1* ó *Catf2*; ^b P, fenotipo picante; ^c NO, indica ausencia del fragmento amplificado correspondiente a *Pun1* ó *Catf2*; ^d NP, fenotipo no picante; ^e SE, especie sin evaluar.

El fragmento de 1330 pb, correspondiente al alelo *Pun1*, no fue amplificado en todas las entradas picantes. Ocho (*C. baccatum* C-235, *C. chinense* C-158, *C. frutescens* C-126, *C. pubescens* C-139, C-228 y C-60, *C. eximium* C-177 y *C. chacoense* C-153) de las 105 entradas picantes no fueron identificadas correctamente.

Las cinco entradas no picantes (*C. annuum* C-358, NCO52775, NCO55247, NCO76176 y NCO56450), no amplificaron el fragmento correspondiente al alelo *Pun1*, lo cual era esperado, ya que uno de los cebadores (F1) se une en la zona delecionada de 2.5 kb del alelo *pun1*, presente en los genotipos no picantes de *C. annuum*.

El fragmento de 1659 pb correspondiente a *Catf2* fue amplificado en todas las entradas, tanto picantes como no picantes. Una de las peculiaridades de *Catf2* es la presencia del SNP, identificado en el fragmento de 307 pb, asociado al carácter picante (ver capítulo anterior). Los resultados obtenidos al utilizar este marcador

SNP en las ocho entradas picantes, que no amplificaron el fragmento esperado para *Pun1*, y en las cinco entradas no picantes pueden observarse en la **Figura 5.12**.

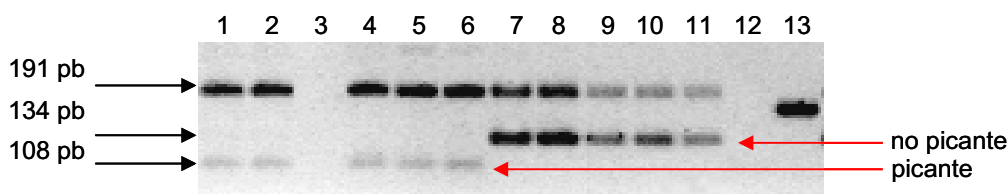


Figura 5.12. Productos amplificados mediante la reacción de tetra-primers ARMS. La presencia del fragmento de menor tamaño (108 pb) indica carácter picante. La presencia del fragmento de 134 pb indica carácter no picante. El fragmento de 191 pb es común a individuos picantes y no picantes. Los genotipos amplificados picantes son: 1, C-235; 2, C-158; 4, C-126; 5, C-228; 6, C-60; los genotipos amplificados no picantes son: 7, C-358; 8, NCO52775; 9, NCO55247; 10, NCO76176; 11, NCO56450. Los genotipos no amplificados son: 3, C-177; 12, C-153; 13, C-139.

Los fenotipos de las entradas no picantes C-358, NCO52775, NCO55247, NCO76176 y NCO56450, pertenecientes a *C. annuum*, fueron correctamente identificadas por el marcador SNP. También los genotipos picantes *C. baccatum* C-235, *C. chinense* C-158, *C. frutescens* C-126 y *C. pubescens* C-228 y C-60 fueron correctamente identificados como picantes con el marcador SNP. Sin embargo, para los genotipos picantes C-177, C-153 y C-139, pertenecientes a las especies *C. eximium*, *C. chacoense* y *C. pubescens*, respectivamente, las amplificaciones obtenidas con el marcador SNP no confirmaron sus fenotipos (**Figura 5.12**).

DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta un fragmento de 307 pb obtenido, mediante RT-PCR, al estudiar la expresión génica del clon SB2-66 (Kim et al. 2001) y se evalúa su posible relación con el carácter picante en pimiento.

Al realizar el estudio del clon SB2-66 en varios genotipos picantes y no picantes se obtuvieron dos fragmentos de RT-PCR de 362 y 307 pb, expresados diferencialmente a lo largo del desarrollo del fruto. El fragmento amplificado de 362 pb fue identificado, por alineamiento de secuencias, como el clon SB2-66. Este clon había sido identificado y expresado diferencialmente en tejido placentario (Kim et al. 2001) y en genotipos picantes (Lee et al. 2005). En un estudio posterior realizado por Stewart et al. (2005) se localizó SB2-66 a lo largo de la parte final del segundo exón y la región 3'UTR de la secuencia clonada en su totalidad del gen *Pun1*. Sin embargo, la secuencia del otro fragmento amplificado de 307 pb no había sido descrita previamente al inicio de este trabajo. En este estudio se observó una

acumulación de ARNm correspondiente a dicho fragmento tanto en genotipo picantes como no picantes y se vio que esta acumulación era diferencial a lo largo del desarrollo del fruto, detectándose sólo en los estados de desarrollo del fruto donde comienza la acumulación de capsicina y dihidrocapsicina (a partir de 20 dpa) (Estrada et al. 2000). Por otro lado, durante el análisis de la secuencia de este fragmento se detectó un SNP asociado al carácter picante (ver capítulo anterior). Así pues, la presencia del SNP y la acumulación diferencial de ARNm suscitaron el interés por seguir estudiando esta secuencia.

Por alineamiento múltiple de secuencias con el fragmento de 307 pb se observó que dicho fragmento presentaba una homología del 100% con la parte final de una secuencia parcial denominada *Catf2*. Recientemente, ha sido descrita esta secuencia parcial, pero contrariamente a nuestros resultados, los autores detectaron expresión de *Catf2* en todos los estados de desarrollo de la placenta de pimiento, tanto picantes como no picantes (Lang et al. 2006).

La secuencia completa de nucleótidos que constituye el gen *Catf2* no se conoce en su totalidad, así como tampoco la función que desempeña dentro de la biosíntesis de capsicinoides, ni su relación con el gen *Pun1*. La alta homología (92%) que hemos detectado entre *Pun1* y la secuencia publicada de *Catf2* (Lang et al. 2006) deriva de que los dos exones constituyentes de la estructura del gen *Pun1* presentan la misma secuencia de ADN que los posibles exones homólogos en *Catf2*. Las únicas diferencias encontradas entre ambas secuencias fueron dos insertos situados en la zona del intrón y tres pequeñas deleciones de la región 3' UTR en *Catf2*.

De la alta homología se podría deducir que *Catf2* fuera una duplicación de *Pun1*. Hasta la fecha, no se sabe si *Catf2* es funcional o no. Una teoría podría ser que *Catf2* fuera un gen homólogo a *Pun1* pero no funcional (pseudogenes) (Kim et al. 2005; Kim et al. 2006) y que se transcribiera en ARNm pero que no se tradujera en proteína. Para confirmar esta hipótesis sería necesario determinar si existe una proteína codificada por *Catf2*. Otra posibilidad que explicara la alta homología entre estas dos secuencias podría ser la duplicación (o multiplicación) a partir de un gen ancestral común. Así, a lo largo de las generaciones, los genes que se habrían consolidado en las especies de *Capsicum* serían aquellos cuyas nuevas formas hubieran resultado exitosas por lograr una adaptación al medio más provechosa (influida entre otros factores por la domesticación de la especie).

La particularidad, hasta hora observada a nivel de ADN en *Catf2* viene marcada por la detección en esta secuencia del SNP asociado al carácter picante en diversas especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. tovarii*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *praetermisum* y *C. pubescens*). Hasta ahora, la deleción de 2,5 kb presente en el alelo recesivo *pun1* se considera responsable de la ausencia de picor, aunque únicamente ha sido caracterizada esta deleción en genotipos no picantes de la especie *C. annuum*. En nuestro estudio sobre la presencia de *Pun1* y *Catf2* y su relación con el fenotipo picante se observó que mientras el fragmento correspondiente a *Pun1* no fue amplificado en 8 entradas picantes, pertenecientes a *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, *C.*

eximium y *C. chacoense*, en cinco de estas entradas se pudo confirmar la presencia del SNP asociado al carácter picante y localizado en *Catf2*. En las tres entradas restantes (*C. eximium*, *C. chacoense* y *C. pubescens* C-139) la técnica empleada para genotipar el SNP no resultó exitosa. Esto podría explicarse porque estas tres especies están bastante alejadas filogenéticamente de *C. annuum* (Walsh et al. 2001), lo que implica cambios entre las secuencias genéticas. Además, la localización del SNP en la región 3'UTR, zona con una alta frecuencia de polimorfismos (Bhatramakki et al. 2002), podría favorecer la presencia de otros polimorfismos adicionales. La presencia de todos estos posibles cambios de nucleótidos en la secuencia implica una disminución en la especificidad de la reacción de 'PCR-ARMS', puesta a punto para la detección del SNP. Por tanto, para confirmar la presencia del SNP asociado al carácter picante en estas tres entradas sería necesaria la secuenciación de esta zona del genoma.

El uso de genotecas de BACs facilita el aislamiento de nuevos genes, el análisis de la estructura del genoma y la exploración de genes cercanos. Por ello, la vía elegida para iniciar el proceso de clonación de la longitud total de esta nueva secuencia fue el rastreo de una genoteca de BACs de pimiento, obtenida a partir de la línea picante *C. frutescens* BG2816. De los clones examinados mediante PCR e hibridación con sondas radioactivas de ADN, se detectaron tres clones que contenían la secuencia de *Pun1*, otros tres con el fragmento de 307 pb y un único clon (159M5) con contenía ambas secuencias. Este último clon, 159M5, ha sido seleccionado para ser secuenciado y posteriormente, establecer la longitud total del fragmento. La secuenciación completa del clon 159M5 aportará información adicional, como la distancia entre ambos genes y la posible existencia de otras secuencias homólogas.

Actualmente, a la espera de obtener los resultados de secuenciación del clon 159M5, hemos iniciado, en nuestro laboratorio, la clonación del gen *Catf2* mediante la técnica 'Genome walking'. Una vez conocida la estructura de este gen en genotipos picantes y no picantes de diferentes especies de *Capsicum*, se pretende estudiar la función específica de este gen.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluru M, Curry J, O'Connell MA (1998) Nucleotide sequence of a probable aminotransferase gene (Accession N° AF085149) from Habanero Chile. *Plant Physiol* 118:1102
- Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA (2003) Differential expression of fatty acid synthesis genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *J Exp Bot* 54:165-1664
- Bennett DJ, Kirby GW (1968) Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc. C.* 442
- Bhatramakki D, Dolan M, Hanafey M, Wineland R, Vaske D, Register JC, Tingey SV, Rafalski A (2002) Insertion–deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Mol Biol* 48:539-547
- Blum E, Liu K, Mazourek M, Yoo EY, Jahn MM, Paran I (2002) Molecular mapping of the *C locus* for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45: 702–705
- Curry J, Aluru M, Mendoza M, Nevarez J, Melendrez M, O'Connell MA (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp.* *Plant Sci* 148:47-57
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
- Estrada B, Bernal MA, Díaz J, Pomar F, Merino F. 2000. Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *J Agric Food Chem* 48:6234-6239
- Hormaza JJ, Dollo L, Pollito VS (1994) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet* 89:9-13
- Kim DH, Kim DB (2005) Development of SCAR markers for early identification of cytoplasmic male sterility genotype in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol Cells* 20:416-22
- Kim DH, Kim DB (2006) The organization of mitochondrial atp6 gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Curr Genet* 49:59-67
- Kim M, Kim S, Kim S, Kim BD (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Mol Cells* 11:213-219
- Lang Y, Yanagawa S, Sasanuma T, Sasakuma T (2006) A gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. *Breed Sci* 56:55-62
- Lee CJ, Yoo EY, Shin JH, Lee J, Hwang HS, Kim BD (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the *Capsaicinoid synthetase* gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol Cells* 19:262-267

Prasad BCN, Kumar V, Gururaj HB, Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA (2006) Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.) Proc Natl Acad Sci USA 103:13315-13320

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Stewart C, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyl-transferase. Plant J 42:675-688

Walsh BM, Hoot SB (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (*Solanaceae*) using DNA sequences from two non-coding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. Int J Plant Sci 162:1409-1418

DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de la historia de la mejora genética en plantas se ha priorizado la selección de aspectos como la productividad, la obtención de variedades resistentes a plagas y enfermedades o la mejora de características agronómicas. El consumidor, cada vez más informado, también ha tenido influencia en la reorientación de los objetivos de la mejora genética hacia la calidad y la variedad del producto en la mesa. Actualmente, el éxito de un producto en el mercado está muy ligado a la capacidad sensorial de agradar al consumidor, a la vez que la de aportar un valor nutritivo adecuado.

El pimiento, por su gran variabilidad, especialmente en colores y formas, siempre ha sido un atrayente natural de los consumidores. Este hecho tiene su reflejo en la naturaleza, así por ejemplo, la atracción hacia los frutos de pimiento, junto a que las aves no tienen funcional el nociceptor responsable de la percepción del picante (Jordt y Julius, 2002), ha ocasionado que las aves sean consideradas los principales agentes de dispersión de las semillas de pimiento (Tewksbury y Nabhan, 2001), alimentándose con toda naturalidad de sus frutos. Mientras que los mamíferos, poseedores del receptor vainilloide (VR1) (Caterina et al. 1997, 2000), sienten una sensación irritante y de calor al consumir un pimiento picante.

Sin embargo, a pesar de la gran diversidad natural existente en el pimiento, los mercados, especialmente los occidentales, han tardado bastante tiempo en demandar otras variaciones de este fruto, más allá de los pimientos verdes o rojos. También, pese a que el picante es una característica única y apreciada de los pimientos en la mayor parte del Mundo, los mercados occidentales, en general, han preferido la ausencia de este atributo. Pese a no ser una característica siempre apreciada, algunos autores han considerado al picante como un quinto sabor, aunque en realidad son sustancias insípidas (Szallasi y Blumberg, 1990).

El atributo 'picante' del pimiento, considerado como un factor de calidad del fruto, pronto despertó el interés de los mejoradores, que se plantearon si este carácter se heredaba cualitativa o cuantitativamente. En esta fase del trabajo ha resultado esencial el método utilizado para la determinación del carácter picante. Los métodos sensoriales utilizados inicialmente (Scoville, 1962) estimaban el picante como un conjunto, y dependían de las valoraciones subjetivas de los catadores. El desarrollo de técnicas analíticas más precisas, como la cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV), permitió determinar que existían diferentes compuestos análogos, que en su conjunto, pasaron a denominarse capsicinoides (Govindarajan, 1986).

El avance en el desarrollo de tecnologías analíticas más sensibles y selectivas, como HPLC acoplada a la espectrometría de masas (MS) ha permitido detectar hasta 12 capsicinoides en los frutos de pimiento (Maillard et al. 1997). En relación a este tema, en el curso de esta tesis, se ha desarrollado y validado un método de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (HPLC-ESI/MS(TOF)), el cual es, a la vez que novedoso, complementario a los que utilizan espectrometría de masas y están disponibles para la comunidad científica.

Las ventajas de esta tecnología frente a la de HPLC-UV, que es la más ampliamente utilizada para la cuantificación de capsicinoides (Collins et al. 1995), incluyen: i) una alta fidelidad en la identificación y cuantificación de los capsicinoides, basada en la alta selectividad proporcionada por la medida de la masa exacta de los capsicinoides. Esto puede evitar, por ejemplo, la posibilidad de asignar erróneamente un pico a un determinado capsicinoide basándose únicamente en el tiempo de retención y en los espectros de UV, ii) una alta sensibilidad, con mejores límites de detección (LODs) que aquellos que ofrecen la mayoría de los métodos de HPLC-UV, y iii) una mayor información (por ejemplo, la huella isotópica) que la obtenida con HPLC-UV.

También, este método HPLC-ESI/MS(TOF) ofrece algunas ventajas frente a los métodos de MS validados para cuantificar capsicinoides, como por ejemplo, el desarrollado por Thompson et al. (2005), que utiliza un analizador de masas tipo cuadrupolo, que es uno de los equipos más extendidos (Choi et al. 2003). Este tipo de analizador es un instrumento de escaneo, donde la sensibilidad (relación señal/ruido) disminuye con el aumento del intervalo que se escanea. Así mismo, la sensibilidad aumenta considerablemente cuando se escanean únicamente unas pocas masas (modo SIM). Sin embargo, el analizador tipo TOF no es un instrumento de escaneado, y caracteriza simultáneamente las masas de todos los iones dentro del rango de masas completo, con la misma sensibilidad y exactitud. Por tanto, puesto que la resolución de los detectores cuadrupolo es, en general, inferior a la de los analizadores TOF, aumentarla para obtener la misma resolución supone perder en respuesta de la señal. Además, sería necesario aplicar procedimientos especiales de limpieza de muestras para reducir el ruido introducido por la co-elución de los componentes (Choi et al. 2003). También, en el caso de estudiar un elevado número de individuos de *Capsicum*, donde varios tipos de capsicinoides podrían estar presentes, el analizador de masas tipo TOF ofrece la posibilidad de detectar tales compuestos, a la vez que ofrece la suficiente sensibilidad para cuantificar adecuadamente los dos capsicinoides mayoritarios, capsicina y dihidrocapsicina, dentro del intervalo completo de masas de los capsicinoides en frutos de *Capsicum*.

Todas estas características que ofrece la tecnología aplicada al método analítico desarrollado, han sido aprovechadas y optimizadas, en el desarrollo de esta tesis, para obtener, por un lado, una buena caracterización fenotípica del carácter picante en el estudio de la herencia individualizada de la capsicina y dihidrocapsicina, y, por otro lado, en el estudio del contenido de ambos capsicinoides a lo largo del desarrollo del fruto.

La disponibilidad de un método analítico, que permita cuantificar con exactitud e individualmente la capsicina y dihidrocapsicina, se brinda como una herramienta muy útil para el estudio cuantitativo de la herencia de este carácter. Así, uno de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar la herencia de estos dos capsicinoides en un cruce intraespecífico de *C. annuum*, estudiando los frutos desarrollados y recolectados en dos ambientes, primavera y verano.

La utilización del método HPLC-ESI/MS(TOF) ha permitido la detección y cuantificación de capsicina y/o dihidrocapsicina en un 36% de individuos picantes,

que habrían sido erróneamente cuantificados con valor cero en contenido de capsicina y/o dihidrocapsicina si se hubiera utilizado el método habitual de HPLC-UV (Collins et al. 1995). Por tanto, el fenotipado más preciso de este carácter cuantitativo ha favorecido la obtención de un resultado más cercano a la realidad para la explicación del tipo de acción génica que controla el carácter picante.

Es conocido que cada capsicinoide posee una intensidad específica de picor y no es igualmente percibido sensorialmente en la cavidad bucal (Krajewska y Powers, 1988). Por tanto, conocer el modo de herencia de los capsicinoides individualmente permitiría a los mejoradores manipular los perfiles de contenido de estos compuestos con más eficiencia, en busca de una variedad con una determinada composición. Sin embargo, no sólo el conocimiento del modo de herencia es importante para el éxito de la mejora del carácter picante, sino también, el de los factores que le influyen, como el ambiental y sus posibles interacciones.

En este sentido, en esta tesis se ha descrito la existencia de una interacción entre familias \times ambiente en el cruce estudiado, observándose, en algunas familias, un aumento evidente del contenido de capsicina y dihidrocapsicina cuando sus frutos eran desarrollados en verano (frente a los de primavera). La detección de esta interacción obligó a realizar los subsiguientes estudios genéticos diferenciando los frutos desarrollados en primavera de los de verano. En ambos ambientes se observó la existencia de heterosis y de una segregación transgresiva, que sugería una contribución de ambos parentales en la producción de capsicina y dihidrocapsicina.

Estos resultados obtenidos parecen indicar que la estación (primavera o verano) de desarrollo y recolección de los frutos influye en la producción de ambos capsicinoides, al menos en determinadas combinaciones genéticas de *Capsicum*, y que, además del gen *Pun1*, podrían existir otros genes modificadores que contribuirían a aumentar los contenidos de estos compuestos que, en el caso del cruce estudiado, estarían aportados por el parental no picante Yolo Wonder. Estos últimos resultados podrían apoyarse por la reciente identificación de seis QTLs involucrados en la producción de capsicinoides (Ben-Chaim et al. 2006).

Además, el método de Mather y Jink (1977), utilizado para estimar los valores aditivos y dominantes de este carácter cuantitativo, ha permitido determinar que la herencia cuantitativa de la capsicina y dihidrocapsicina puede explicarse mejor con un modelo aditivo-dominante con interacciones, las cuales, además, son diferentes en función de cada uno de los dos capsicinoides y del ambiente en el que se han producido.

A diferencia del estudio previo de herencia individual de capsicinoides realizado por Zewdie y Bosland (2000), en el presente trabajo se ha encontrado una interacción familia \times ambiente y unas interacciones diferenciadas por ambientes, entre capsicina y dihidrocapsicina. Las diferencias entre ambos resultados nos aportan indicios sobre la importancia de las condiciones ambientales donde se desarrollan los cultivos, así como sobre la procedencia del material genético utilizado, a la hora de seleccionar genotipos en función de su nivel de picor.

Existen otras vías complementarias para el estudio de los genes involucrados en la biosíntesis de los capsicinoides y sus posibles aplicaciones en la mejora de pimiento como son, la identificación de marcadores moleculares y el estudio de secuencias génicas relacionadas con el carácter picante.

Los marcadores moleculares, además de los métodos analíticos, son una herramienta útil para determinar la presencia o ausencia del carácter picante. Diversos autores han desarrollado marcadores tipo CAPS (Blum et al. 2002; Minamiyama et al. 2005) y tipo SCAR (Lee et al. 2005) ligados al carácter picante, pero todos ellos han sido asociados al *locus Pun1*, gen que fue, finalmente, clonado y caracterizado por Steward et al. 2005. Además, también han sido identificados QTLs asociados al contenido individual de capsicinoides (Blum et al. 2003; Ben Chaim et al. 2006).

En esta tesis se ha identificado un SNP asociado al carácter picante, localizado en una secuencia parcial, de 307 pb y con una homología del 81% con el clon SB2-66, (Kim et al. 2001) localizado en la parte final de la secuencia de *Pun1* (Steward et al. 2005). Esta secuencia podría formar parte de la superfamilia BAHD de las aciltransferasas (una clase de acetil-CoA aciltransferas involucradas en el metabolismo secundario de las plantas), ya que se ha identificado el motivo conservado DFGWG, al comienzo de la secuencia de 307 pb (St. Pierre et al. 1998). Además, también se ha comprobado, en esta tesis, que existe una acumulación diferencial de transcritos de esta secuencia en la placenta a lo largo del desarrollo del fruto.

Para la detección de este SNP se han desarrollado un marcador tipo CAPS (Konieczny y Ausubel, 1993) y marcadores alelo-específicos derivados de la metodología PCR-ARMS (Ye et al. 2001). Esta última metodología, que se basa en la amplificación de alelos específicos mediante PCR y que está siendo utilizada con éxito en áreas de la investigación médica (Hinrichs et al. 2007; Ruiz-Sanz et al. 2007), también ha comenzando a ser aplicada a la biología molecular tanto animal como vegetal (Chiapparino et al. 2004; Acquadro et al. 2003).

Ambas metodologías fueron capaces de distinguir el polimorfismo único, sin embargo, los marcadores PCR-ARMS presentaron ventajas frente a los CAPS, como son mayor rapidez y menor coste, ya que la PCR-ARMS es una única reacción, comparada con la reacción más la digestión, necesarias para la metodología CAPS. Además, no siempre es posible la disponibilidad comercial de enzimas de restricción que se adecuen a un SNP y sus zonas adyacentes.

Este marcador SNP presenta varias ventajas a la hora de seleccionar genotipos de interés debido al carácter picante. La primera es que se trata de un marcador co-dominante, por tanto, identifica los dos nucleótidos posibles en la posición del polimorfismo, el T en los genotipos picantes y el G en los no picantes. Otra ventaja, es que este marcador SNP ha sido detectado en ocho especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. galapagoense*, *C. tovarii*, *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. baccatum*), mientras que los marcadores CAPS y

SCAR desarrollados hasta el momento, únicamente se mantienen dentro de entradas de la especie *C. annuum*.

El análisis molecular de este carácter se ve frenado, además de por la complejidad de la ruta de biosíntesis de los capsicinoides, por el hecho de que la producción de capsicinoides es una característica única del género *Capsicum*, lo que impide la búsqueda de genes análogos en otros géneros. El estudio de secuencias génicas basado en la clonación y secuenciación de regiones de ADN relacionadas con la biosíntesis de los capsicinoides ha permitido, en este trabajo, identificar una secuencia posiblemente relacionada con el carácter picante. Esta secuencia, cuya longitud inicial era de 307 pb y en la que se ha identificado el SNP anteriormente citado, presentó una homología del 81% con *Pun1*, del 100% con la secuencia parcial *Catf2*, recientemente publicada (Lang et al. 2006).

Por otra parte, el estudio llevado a cabo donde se relaciona el fenotipo, picante o no, la presencia de los diferentes alelos en el *locus Pun1* y de la secuencia parcial *Catf2*, ha puesto de manifiesto que existen individuos dentro del género *Capsicum* que siendo fenotípicamente picantes, no presentan el alelo *Pun1*, y sin embargo, sí está presente la secuencia parcial *Catf2* con el SNP asociado al fenotipo picante. Estos resultados parecen corroborar la importancia de esta secuencia en relación al carácter picante y abren nuevas vías de investigación de los capsicinoides.

Actualmente no existe información acerca de la posible relación entre *Pun1* y *Catf2*, ni éste último, ha sido localizado en mapas saturados de marcadores moleculares del género *Capsicum*. En esta tesis, el rastreo de una genoteca de BACs de pimiento ha proporcionado un acercamiento preliminar al conocimiento de la relación entre ambas secuencias. Así, la obtención de BACs que contienen separadamente las secuencias de *Pun1* y *Catf2*, puede indicar que son genes diferentes, y además, que no están localizados en regiones próximas. Asimismo, trabajos preliminares sobre la localización de esta secuencia en mapas de pimiento, han corroborado que *Catf2* no se encuentra en la misma región que *Pun1*, lo que apuntaría, a que no se trata de una duplicación en tandem de *Pun1*.

En resumen, en esta tesis se han revisado conceptos y logrado significativos resultados relacionados con el carácter picante en los frutos del pimiento (*Capsicum* sp.), mediante el empleo de diversas técnicas y herramientas: primero, se ha desarrollado, validado y aplicado un método analítico con alta sensibilidad y selectividad para la determinación de los dos principales capsicinoides, segundo, se ha propuesto un modelo de herencia cuantitativa aditivo-dominante con interacciones para capsicina y dihidrocapsicina, tercero, se ha identificado un marcador SNP asociado al carácter picante y desarrollado marcadores PCR-ARMS para su detección, y finalmente, se ha identificado una secuencia génica posiblemente relacionada con el carácter picante.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquadro A, Lee D, Chiapparino E, Comino C, Portis E, Donini P, Lanteri S (2003) Detection and characterisation of SNPs in *Capsicum* spp. *Capsicum Eggplant Newsl* 22:37-40
- Ben-Chaim A, Borovsky Y, Falise M, Mazourek M, Kang BC, Paran I, Jahn M (2006) QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 113:1481-90
- Blum E, Liu K, Mazourek M, Yoo EY, Jahn MM, Paran I (2002) Molecular mapping of the *C* locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45:702-705
- Blum E, Mazourek M, O'Connell MA, Curry J, Thorup T, Liu K, Jahn MM, Paran I (2003) Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 108:79-86
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824
- Chiapparino E, Lee D, Donini P (2004) Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47:414-420
- Choi BK, Hercules DM, Zhang T, Gusev AI (2003) Comparison of quadrupole, time-of-flight, and Fourier transform mass analyzers for LC-MS applications. *Curr Trends Mass Spectrom* 18:524-531
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30:137-139
- Govindarajan VS (1986) Capsicum-production, technology, chemistry and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma and pungency stimuli. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 22:245-2355
- Hinrichs JW, Smallegoor WD, van Baalen-Benedek EH, Welker C, van der Weide J. (2007) Detection of CYP2D6 polymorphisms *9, *10, and *41 using ARMS-PCR and their allelic frequencies in 400 psychiatric patients. *Clin Chem Lab Med* 45:555-557
- Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108:421-30
- Kim M, Kim S, Kim S, Kim BD (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Mol Cells* 11:213-219
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4:403-410
- Krajewska AM, Powers JJ (1988) Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. *J Food Sci* 53:902-905

- Lang Y, Yanagawa S, Sasanuma T, Sasakuma T (2006) A gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. *Breed Sci* 56:55-62
- Lee CJ, Yoo EY, Shin JH, Lee J, Hwang HS, Kim BD (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the *Capsaicinoid synthetase* gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol Cells* 19:262-267
- Maillard MN, Giampaoli P, Richard HMJ (1997) Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour Fragrance J* 12:409-413
- Mather K, Jinks JL. In *Introduction to biometrical genetics*. Chapman and Hall Eds.; London, UK. 1977
- Minamiyama Y, Kinoshita S, Inaba K, Inoue M (2005) Development of a cleaved amplified sequence (CAPS) marker linked to pungency in pepper. *Plant Breed* 124:288-291
- Ruiz-Sanz JI, Aurrekoetxea I, Ruiz del Agua A, Ruiz-Larrea MB (2007) Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR. *Mol Cell Probes* 21:202-207
- Scoville WL (1912) Note *Capsicum*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1, 453
- Stewart C, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyl-transferase. *Plant J* 42:675-688
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl-transfer. *Plant J* 14:703-713
- Szallasi A, Blumberg PM (1990) Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (Capsaicin) receptor. *Life Sciences* 47:1399-1408
- Tewksbury J, Nabhan GP (2001) Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature* 412:403-404
- Thompson RQ, Phinney KW, Welch MJ, White VE (2005) Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 381:1441-1451
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29:E88-8
- Zewdie Y, Bosland PW (2000) Capsaicinoid inheritance in an interspecific hybridization of *Capsicum annuum* × *C. chinense*. *J Am Soc Hort Sci* 125:448-453

CONCLUSIONES

1. El método HPLC-ESI/MS(TOF) desarrollado y validado en este trabajo permitió el análisis simultáneo de capsicina y dihidrocapsicina, los dos capsicinoides mayoritarios en los frutos de pimiento, con alta selectividad y sensibilidad, y con una buena reproducibilidad.
2. El método HPLC-ESI/MS(TOF) tiene amplias posibilidades de aplicación. Ha sido testado en varios genotipos de *Capsicum* con diferentes niveles de picor y aplicado para la cuantificación de capsicina y dihidrocapsicina en seis familias de un cruce intraespecífico de *C. annuum*, mostrando su capacidad para realizar análisis rutinarios. Además, la alta resolución proporcionada por el analizador de masas tipo “tiempo de vuelo” (TOF) aporta información de la distribución isotópica de estos compuestos, siendo una herramienta adecuada en estudios metabólicos con isótopos estables.
3. La alta sensibilidad del método HPLC-ESI/MS(TOF) desarrollado permitió clasificar correctamente, como fenotipos picantes, un 36% de los individuos picantes del cruce Yolo Wonder × Serrano Criollo de Morelos-334 que habrían sido considerados como no picantes utilizando el método de análisis HPLC-UV, aplicado hasta el momento en estudios de herencia cuantitativa de capsicinoides.
4. Los contenidos de capsicina y dihidrocapsicina variaron ampliamente entre las familias del cruce desarrollado en este estudio, y además se detectó una interacción familia × ambiente, ya que estas familias no respondieron similarmente a la producción de ambos capsicinoides, cuando sus frutos se desarrollaron en primavera o en verano.
5. El análisis genético del cruce desarrollado en este trabajo puso de manifiesto la existencia de heterosis para el carácter picante, pudiendo subyacer varias causas genéticas, no necesariamente excluyentes, como la superdominancia, la epistasia y la dominancia. Además, el parental no picante parece contribuir a la producción de capsicinoides, ya que se observó una segregación transgresiva en la F₂.
6. El estudio de herencia cuantitativa del carácter picante reveló que el tipo de acción génica varía entre capsicina y dihidrocapsicina, y además, que el efecto ambiental (primavera o verano) podría implicar diferencias adicionales en la acción génica.

7. Se ha identificado un SNP asociado al carácter picante en el género *Capsicum*. Es el primer marcador molecular asociado al carácter picante que no está asociado al locus *Pun1*, ya que ha sido localizado en otra secuencia de ADNc presumiblemente involucrada en el carácter picante.

8. La metodología que resultó más óptima para detectar este polimorfismo fue la PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction). Este método presenta ventajas frente a otros métodos moleculares, ya que se identifican las dos variantes nucleotídicas en una única reacción de PCR, con mayor rapidez y menor coste.

9. Este marcador SNP a diferencia de otros existentes, es de gran utilidad para la selección de genotipos, ya que está presente en un gran número de cultivares picantes y no picantes de *Capsicum*, pertenecientes a las especies: *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. galapagoense*, *C. tovarii*, *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. baccatum*.

10. Los estudios de secuencias génicas involucradas en la ruta de biosíntesis de los capsicinoides han permitido identificar una secuencia génica que muestra un 92% de homología con la secuencia del gen *Pun1* y una homología total con la secuencia parcial *Catf2*.

11. El estudio de numerosas entradas de *Capsicum* en relación con la presencia del alelo *Pun1*, la secuencia parcial *Catf2* y con el fenotipo del carácter en estudio, ha revelado la existencia de individuos con fenotipo picante que no presentaban el alelo *Pun1*, mientras, que fueron correctamente identificados con el marcador SNP localizado en *Catf2*.

12. La identificación de esta secuencia génica, posiblemente relacionada con el carácter picante, abre nuevas vías para continuar la investigación de otros genes involucrados en la biosíntesis de los capsicinoides.

ANEXOS

Anexo 1

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN [basado en el método de Doyle y Doyle (1987), con modificaciones Hormaza et al. (1994)]

- Triturar 0.2 gr de hojas sin nervaduras en 800 µl de tampón CTAB
- Añadir 0.8 µl de 2-mercaptoetanol. Mezclar suavemente por inversión
- Incubar en baño a 65 °C durante 60 min, mezclando habitualmente por inversión
- Añadir 800 µl de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1), mezclando suavemente por inversión hasta conseguir una mezcla homogénea
- Centrifugar a 13000 g durante 15 min
- Transferir el sobrenadante y añadir 2/3 del volumen total de isopropanol frío mezclando suavemente hasta la precipitación del ADN
- Centrifugar a 13000 g durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y añadir 400 µl de tampón de lavado
- Lavar durante 20 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a 13000 g durante 5 min
- Eliminar el sobrenadante y dejar el precipitado secando durante varias horas a t^a ambiente
- Resuspender el precipitado en MTE, durante una noche a 4 °C o en baño a 60 °C durante 15 min
- Centrifugar a 13000 g durante 5 min. Guardar el sobrenadante para su cuantificación

Soluciones

Tampón de extracción (CTAB): 100 mM Tris HCl a pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP, 0.1% bisulfito sódico.

Tampón de lavado: 10 mM acetato de amonio en etanol al 76%.

Tampón de disolución (MTE): 10 mM Tris HCl a pH 8.0, 0.1 mM EDTA.

Anexo 2

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (se utilizó el método Trizol[®] Reagent de extracción de ARN a partir de plantas, con pequeñas modificaciones)

- Triturar 100 mg de tejido en 1 ml de Trizol, con ayuda de N₂ líquido. Mezclar hasta que este completamente homogéneo
- Cuando la mezcla adquiera una textura líquida, transferirla a un tubo Eppendorf de 1.5 ó 2 ml
- Vortear dos veces durante 20 s
- Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C
- Transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf y añadir 200 µl de cloroformo (para 1 ml de Trizol)
- Agitar vigorosamente la muestra (con la mano) durante 15 s e incubarla a temperatura ambiente durante 5 min
- Centrifugar a 13000 rpm durante 20 min a 4 °C
- Transferir la fase superior acuosa a un tubo de 2 ml. Estimar la cantidad transferida
- Añadir 0.5 ml de IPA (2-propanol) y 0.5 ml de [0.8M Na-citrate + 1,2M NaCl] por ml de fase acuosa, mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 10 min
- Centrifugar a 13000 rpm durante 20 min a 4 °C
- Recoger cuidadosamente el sobrenadante y lavarlo con 1 ml de 70% EtOH (para 1 ml de Trizol), mezclar la muestra y centrifugarla a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C
- Eliminar el sobrenadante cuidadosamente y dejar secar el precipitado
- Resuspender el precipitado en 30 µl H₂O-DEPC, guardarlo a -80 °C hasta su cuantificación

Soluciones

Para 1 litro H₂O-DEPC:

1ml de DEPC + 999 ml de H₂O Mili-Q

Agitar la mezcla y dejar toda la noche a temperatura ambiente. Autoclavar.

Anexo 3

PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA (Se purificó mediante el sistema 'Kit de extracción de ADN de gel de Agarosa', ROCHE)

- Tras separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa/1x TAE, cortar aquellos fragmentos de interés con una cuchilla
- Transferir las bandas cortadas a un tubo Eppendorf previamente pesado
- Añadir 300 μ l de buffer de solubilización de agarosa por cada 100 mg de gel de agarosa. Aplicar 600 μ l si la concentración de agarosa es mayor del 2%
- Resuspender la suspensión de sílice hasta que se vea homogénea. Añadir 10 μ l de esta suspensión a la muestra. Si la muestra contiene más de 2.5 μ g ADN aumentar la cantidad de suspensión de sílice 4 μ l por cada μ g adicional de ADN
- Incubar la mezcla a 56-60 °C durante 10 min. Y vortear cada 2-3 min
- Centrifugar durante 30 s a la máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante
- Resuspender con 500 μ l de buffer envolvente de ácido nucleico. Vortear, centrifugar y eliminar el sobrenadante como en el paso anterior
- Lavar el precipitado con 500 μ l de buffer de lavado. Centrifugar y eliminar el sobrenadante. Repetir el lavado una vez más
- Eliminar todo el líquido con una pipeta, invertir el tubo sobre un papel absorbente y dejar secar a temperatura ambiente durante 15 min. El color de la matriz se torna brillante cuando está seco
- Resuspender el ADN en 50 μ l de MTE. Para que sea más eficaz, hacer dos ciclos de dilución: 2 \times 25 μ l
- Vortear e incubar 10 min a 15-25 °C. Vortear cada 2-3 min

Soluciones

MTE: 10 mM Tris HCl a pH 8.0, 0.1 mM EDTA

Anexo 4

CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Preparación del medio LB (Medio Luria-Bertani)

Por litro:

-Añadir a 950 ml de agua destilada: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de lavadura, y 10 g de NaCl

-Mezclar y ajustar el pH a 7.00. Ajustar el volumen a 1 litro. Autoclavar

Para preparar medio LB sólido, añadir antes de autoclavar 15 g de agar por litro.

Diluir el antibiótico ampicilina en agua destilada, a través de un filtro de 0.20 μm (\emptyset) a 100 mg/ml. Añadir al medio LB a una concentración de 1 $\mu\text{l/ml}$ de medio cuando la temperatura del medio esté por debajo de 50 °C

Añadir a cada placa de LB con ampicilina 40 μl de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-gañoctosidasa (X-gal) de una solución de 20 mg/ml en dimetilformanida, y 12.5 μl de 0.8 M isopropyltio- β -D-galactosidasa (IPTG).

Reacción de A-Tailing

Este paso se realiza para asegurar que la enzima Taq polimerasa añada un residuo de deoxyadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados. Este residuo resulta necesario para la posterior ligación al vector a través de extremos cohesivos.

Para la reacción A-Tailing, al fragmento de PCR purificado se añade 1 μl de tampón 10 \times (20mM Tris-HCl, pH 8.4 + 50 mM KCl), 0.5 μl de 50mM MgCl₂, dATP a una concentración final de 0.2 mM y 5 unidades de Taq DNA Polymerase. Se lleva a un volumen final de 10 μl y se incuba a 70 °C durante 30 min.

Reacción de ligación inserto-plásmido

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar entre inserto y vector de aproximadamente 3:1. La reacción de ligación contenía 50

ng de vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EEUU), la cantidad de inserto (cortado y purificado) necesaria para obtener las proporciones molares mencionadas, el tampón de ligación (2× Ligation Buffer, T4 DNA ligase; Promega) y 3 unidad de DNA ligasa del fago T4 (Promega), en un volumen total de 10 µl. Las reacciones de ligación se realizaron a 4 °C durante 16 h.

Transformación mediante choque térmico

Tras descongelar en hielo una alícuota de 50 µl de células competentes JM109, se añadió el producto de ligación y se incubó en hielo 30 min. Transcurrido este tiempo se calentaron a 42 °C durante 45 s y se enfriaron inmediatamente en hielo durante 2 min. Después, del choque térmico se les añadió 1 ml de LB y se incubaron 1 h y 30 min a 37 °C y con agitación de 150 rpm antes de sembrarlas en las placas de medio de selección.

Selección de recombinantes bacterianos

La selección de recombinantes se llevó a cabo mediante la siembra de las células bacterianas transformadas en placas de 9 cm de diámetro con medio sólido LB suplementado con el antibiótico ampicilina, X-gal e IPTG. El vector permite la selección por color, por contener parte de gen de la β-galactosidasa. Las placas fueron incubadas 16 h a 37 °C. Las colonias blancas contienen el inserto.

Aislamiento del ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Para el aislamiento del ADN plasmídico se partió de un cultivo de 3 ml crecido durante una noche a 37 °C y en agitación en medio líquido LB suplementado con ampicilina. Las purificaciones se realizaron según el procedimiento de extracción y purificación de ADN plasmídico de los sistemas de QIAprep Miniprep Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción y purificación de ADN plasmídico (QIAprep Miniprep Kit)

- Resuspender el precipitado de células bacterianas en 250 µl de Buffer P1
- Añadir 250 µl de Buffer P2 y mezclar por inversión de los tubos (de 4 a 6 veces)

- Añadir 350 μ l de Buffer N3, mezclarlo inmediatamente por inversión de los tubos (de 4 a 6 veces)
- Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm
- Transferir el sobrenadante a la columna suministrada por el Kit QIAprep Miniprep
- Centrifugar durante 1 min y eliminar el filtrado
- Lavar con 500 μ l de Buffer PB y centrifugar 1 min. Eliminar el filtrado
- Lavar nuevamente con 750 μ l de Buffer PE y centrifugar 1 min. Eliminar filtrado
- Centrifugar 1 min y eliminar el buffer de lavado filtrado
- Añadir 30 μ l de H₂O Mili-Q a la columna, y después de 1 min, centrifugar. Recoger el filtrado

Anexo 5

HIBRIDACIÓN Y MARCAJE DE SONDA

Prehibridación

- Calentar el CHURCH buffer a 65 °C
- Llevar a ebullición 1 ml ADNst (por membrana) en un baño y mantenerlo durante 10 min
- Colocar en un contenedor de plástico la membrana de nylon (posición hacia arriba), 1 ml ADNst desnaturalizado y 50 ml CHURCH buffer precalentado a 65 °C (por membrana)
- Incubar toda la noche a 65 °C y en agitación a 50 rpm

Preparación de la columna G50 Sephadex

- Realizar con un alfiler un pequeño agujero en el fondo de un tubo Eppendorf de 0.5 ml y cortar la tapa
- Introducir en el fondo de este tubo una pequeña bolita de fibra de nylon
- Colocar la columna dentro de otro tubo Eppendorf de 1.5 ml, que servirá de recolector
- Añadir 750 µl de G50 Sephadex
- Centrifugar 2 min a 1500 rpm

Marcaje de la sonda usando el Kit Stratagene Prime-It RmT

- Calentar dos bloques térmicos a 37 °C y a 100 °C
- Añadir de 25 a 50 ng de sonda de ADN a los tubos de 0.2 ml que suministra el Kit
- Añadir H₂O hasta el volumen de 42 µl
- Incubar el tubo a 100 °C durante 5 min
- Dar un pulso de centrifuga
- Añadir 5 µl ³²P-dCTP y 3 µl kit ADN polimerasa
- Agitar e incubar a 37 °C durante 10 min

-Añadir 2 μ l de 'stop mix' y calentar a 95 °C durante 10 min

Limpieza y desnaturalización de la sonda

-Añadir a la columna G50 Sephadex el contenido de la sonda marcada

-Añadir 100 μ l TEN

-Repetir la adición de TEN 3 veces más (400 μ l en total)

-Centrifugar 2 min a 1500 rpm

-Tirar el tubo de 0.5 ml a un contenedor adecuado y conservar el tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde se encuentra la sonda marcada (aspecto líquido azulado)

-Cerrar el tubo (hacer un pequeño agujero en la tapa) e incubar a 97 °C durante 10 min

-Añadir toda la sonda desnaturalizada a la caja de prehibridación. Hibridar toda la noche a 65 °C

Lavado de las membranas

-Preparar 500 ml 2 \times SSC/0.1% SDS y 500 ml 1 \times SSC/0.1% SDS para cada contenedor. Precalear a 65 °C

-Eliminar la solución de hibridación a un contenedor adecuado (para radioactividad). Añadir sobre 50 ml de la solución de prelavado 2 \times SSC/0.1% SDS al contenedor. Mantener a 65 °C y en agitación a 50 rpm durante 10-15 min

-Realizar dos lavados más usando 1 \times SSC/0.1% SDS durante 10 y 15 min, respectivamente.

-Eliminar la solución de lavado a un contenedor adecuado

Autoradiografía

-Colocar la membrana entre unas hojas de plástico e introducirlas dentro de una carpeta de autoradiografía

-En una habitación oscura, introducir al lado de la membrana una película ó film (sensible a los niveles donde el ADN radioactivo se ha aparejado con el ADN fijado a la membrana)

-Mantener a – 80 °C para su revelado durante 1-4 semanas

Soluciones

0.5 M NaPO₄ Buffer

70 ml 1 M NaH₂PO₄
70 ml H₂O
360 ml 0.5 M Na₂HPO₄

CHURCH Buffer

250 ml 0.5 M NaPO₄ buffer
35 g SDS
5 g BSA
2 ml 0.25 M EDTA
volumen → 500 ml

stDNA

10 g esperma de salmón ADN (Sigma D-1626) en 1 litro de H₂O.
Autoclavar 20 min. Alicuotar en tubos de 50 ml. Conservar a -20 °C.

G50 Sephadex (Sigma G-50-80)

Preparar sephadex mediante lavado 3× H₂O y 3× TE. Dejar TE en exceso.

TEN

1 ml 1 M TRIS, pH 8
400 µl 0.25M EDTA
2 ml 5M NaCl
Volumen final 100 ml

20× SSC

2.5 l H₂O
701.2 g NaCl (remover mientras se añade)
588.4 g sodium citrate (remover mientras se añade)
Ajustar pH 7 con HCl
Ajustar a un volumen final de 4 l

2× SSC/0.1% SDS

Para 1 litro: 100 ml 20× SSC + 5 ml 20% SDS

1× SSC/0.1% SDS

Para 1 litro: 50 ml 20× SSC + 5 ml 20% SDS



www.unizar.es

