

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial

Evaluación de la expresión del gen *pAMT* en fruto de chile habanero por la aplicación de RNA sintético en doble cadena

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Licenciada en Ingeniería Agroindustrial

Presenta:

Estefanía Arellano Ordoñez

Dirigido por:

Dr. Christopher Alexis Cedillo Jiménez

SINODALES

Christopher Alexis Cedillo Jiménez

Presidente

Firma

Ireri Carbajal Valenzuela

Secretario

Firma

Ramón Gerardo Guevara González

Vocal

Firma

Amanda Kim Rico Chávez

Suplente

Firma

Ana Laura Villagómez Aranda

Suplente

Firma

UAQ Campus Amazcala
El Marques
Santiago de Querétaro
Abril de 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

DEDICATORIA

Expreso en este par de líneas mi agradecimiento más sincero a cada una de las personas que estuvieron a lo largo esta etapa en mi vida con plantitas, que culmina o quizá solo comienza con este dramático final llamado, titulación.

Dedico este trabajo a mi familia, quienes han estado a lo largo de mis 23 años. A mis amistades, a mis colegas de laboratorios, de gustos y de investigación. En especial a mí, sí, a mi Estefania Arellano, Fani o Estef para los amigos. Solo yo sé lo complicado, lo difícil y también lo feliz que ha sido realizar esta investigación, dentro y fuera del laboratorio, dentro y fuera del invernadero. Los días en que las cosas no salían, en que el cuerpo pedía descansar, pero los sueños pedían llegar.

A mí, por persistir y resistir

A mí, por amar e innovar.

A mí, por atender y aprender.

A mí, por estudiar y enseñar.

Y a la Estef del futuro, has.

AGRADECIMIENTOS

Gran parte de esta vida científica no sería la misma sin el apoyo del Dr. Christopher Alexis Cedillo Jiménez, quién desde mis primeros días en la carrera me brindó su apoyo, confianza y mentoría en este gran mundo molecular y las plantas. Agradezco tu apoyo en momentos importantes, momentos complicados, pero también momentos de felicidad. Reconozco su valiosa mentoría. Que el grupo interacciones siga creciendo, que los proyectos, las buenas y malas rachas sigan siendo en equipo. Gracias por tanta paciencia y tanta razón.

Agradezco al Dr. Ramón Gerardo Guevara González quien, de manera indirecta me motivo a incursionar en el mundo de la biología molecular, por el acompañamiento y su valioso conocimiento.

Al Dr. Gustavo Alonso Rodríguez, un gran investigador, que a través de sus palabras y ardua revisión a este trabajo me permitió incrementar mi reflexión y criterio científico.

A la Dra. Amanda Rico y a la Dra. Ana Laura Villagómez por su participación en este trabajo de investigación, sobre todo por creer en este proyecto, por su tiempo de revisión, gracias. Al Dr. Benito Parra por la revisión, sugerencias a esta tesis, sobre todo por el conocimiento brindado.

A la Dra. Ileri Carbajal por ser una gran compañera de laboratorio, porque sus palabras siempre fueron de aliento en esos días complicados.

A la Dra. Sam Rivero, por llegar a alegrar mis viernes en el laboratorio y compartir conmigo sus aprendizajes de vida.

Al Centro de Investigación Aplicada a Biosistemas por ser mi lugar seguro, mi segunda casa.

A la Facultad de Ingeniería UAQ, por la beca ocupacional “Divulgación científica”, la que me permitió encontrar mi otra pasión, la comunicación. A mi Isa por capturar con su lente mi vida universitaria.

A mis compañeros de laboratorio a lo largo de estos años de licenciatura, a mis conocidos de estancias y de transporte. A las personas de intendencia, administrativos y trabajadores del Campus por hacer más amena mi estancia en Amazcala.

A la sociedad y a las generaciones anteriores de estudiantes, cuyo esfuerzo ha hecho posible la educación gratuita. Ahora tomo el compromiso y la responsabilidad de retribuirles.

ÍNDICE

RESUMEN	8
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	13
2.1. MECANISMO DE SILENCIAMIENTO POR RNAi.....	13
2.1.1. PRESENCIA DE PEQUEÑOS RNAi (SMALL INTERFERING RNA, SIRNA):.....	14
2.1.2. SILENCIAMIENTO DE MRNA GUIADO POR MICRORNAs (MIRNAs):	14
2.1.3. METILACIÓN DEL DNA Y REPRESIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	14
2.2. APLICACIONES DE RNA CON POTENCIAL INTERFERENTE EN CULTIVOS	15
2.3. CULTIVO DE CHILE HABANERO.....	17
2.4. MANEJO AGRONÓMICO DEL CHILE HABANERO	18
2.5. BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINA Y CAPSIATO	20
2.6. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1. OBJETIVO GENERAL	24
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 MONITOREO DEL DESARROLLO DE FRUTOS DE CHILE HABANERO PREVIO Y POST-ANTESIS.	25
5.1.1 PRODUCCIÓN EN INVERNADERO.....	25
5.1.2 MATERIAL VEGETAL	25
5.1.3 NUTRICIÓN VEGETAL	25

5.2	ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN DEL RNA DE DOBLE CADENA CON POTENCIAL INTERFERENTE AL GEN <i>PAMT</i> , CON SU TRANSCRITO OBJETIVO.	26
5.2.1	DISEÑO, SÍNTESIS DE RNA INTERFERENTE PARA <i>PAMT</i>	26
5.3	ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DEL GEN <i>PAMT</i> EN LA PLACENTA DE FRUTOS DE CHILE HABANERO INYECTADOS CON RNA DE DOBLE CADENA 10 DÍAS POSTERIORES A SU APLICACIÓN.....	27
5.3.1	APLICACIÓN DE RNA INTERFERENTE PARA <i>PAMT</i>	27
5.3.2	PRIMERS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	28
5.3.3	ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR.....	28
5.3.4	EXTRACCIÓN DE RNA.....	29
5.3.5	ANÁLISIS DE ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS.	30
5.3.6	ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE PCR.....	31
5.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1	MONITOREO DEL DESARROLLO DE FRUTOS DE CHILE HABANERO PRE Y POST-ANTESIS.....	32
6.2	ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN DEL RNA DE DOBLE CADENA CON POTENCIAL INTERFERENTE AL GEN <i>PAMT</i> , CON SU TRANSCRITO OBJETIVO.	33
6.3	ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR DE <i>PAMT</i> Y B-ACTINA	36
6.4	ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DEL GEN <i>PAMT</i> EN LA PLACENTA DE FRUTOS DE CHILE HABANERO INYECTADOS CON RNA DE DOBLE CADENA 10 DÍAS POSTERIORES A SU APLICACIÓN.	37
6.4.1	ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DE <i>PAMT</i> DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTO	37
6.4.2	ANÁLISIS LA ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DEL GEN <i>PAMT</i> EN FRUTOS TRATADOS CON <i>DSRpAMT</i>	45
7.	CONCLUSIÓN	53
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9.	ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 DISTRIBUCIÓN DE LA CAPSAICINA EN LOS TEJIDOS DEL CHILE HABANERO.....	18
FIGURA 2 CICLO DE DESARROLLO DEL CHILE HABANERO.....	20
FIGURA 3 RUTA BIOSINTÉTICA CAPSAICINA Y CAPSIATO.	21
FIGURA 4 MÉTODO DE APLICACIÓN DE INYECCIÓN DE RNAi	28
FIGURA 5 MONITOREO DE DESARROLLO DESDE BOTÓN FLORAL HASTA FRUTO MADURO DE CHILE HABANERO ..	32
FIGURA 6 PROMEDIO DE A) LONGITUD, B) DIÁMETRO DE CHILES HABANERO DURANTE 51 DÍAS (N=12).	33
FIGURA 7 POSICIONES 1131 A 1151 ENTRE SLY-MIR9472-3P Y PAMT.....	34
FIGURA 8 SECUENCIA COMPLETA DE LA ENERGÍA LIBRE DE INTERACCIÓN ENTRE EL TRANSCRITO PAMT- SIRPAMT	35
FIGURA 9 SECUENCIA PARTICULAR DE LA ENERGÍA LIBRE DE INTERACCIÓN ENTRE EL TRANSCRITO PAMT- SIRPAMT	35
FIGURA 10 GELES DE ELECTROFORESIS DE RNA TOTAL EXTRAÍDO DE FRUTOS DE CHILE HABANERO EN DIFERENTES DÍAS DE MUESTREO.....	39
FIGURA 11 AMPLIFICACIÓN B-ACTINA	40
FIGURA 12 AMPLIFICACIÓN B-ACTINA	40
FIGURA 13 AMPLIFICACIÓN B-ACTINA	41
FIGURA 14 AMPLIFICACIÓN B-ACTINA	41
FIGURA 15 ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DE PAMT DE 0 A 40 DPA.....	43
FIGURA 16 DESARROLLO FENOLÓGICO DEL CHILE HABANERO Y SU RELACIÓN CON LA ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE PAMT.....	44
FIGURA 17 EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DEL MOMENTO DE INYECCIÓN EN PEDÚNCULOS DE FRUTO EN 10 DPA.	45
FIGURA 18 TAMAÑO DE FRUTOS DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS Y CONTROL	47
FIGURA 19 GEL DE ELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS DE RNA EXPERIMENTALES.	49
FIGURA 20 AMPLIFICACIÓN B-ACTINA	49
FIGURA 21 ANÁLISIS MOLECULAR POST-APLICACIÓN DE DSRNA PARA AMPLICÓN DE PAMT Y B-ACTINA.	50
FIGURA 22 ANÁLISIS DEL NIVEL DE ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DE PAMT EN TRATAMIENTOS Y GRUPO CONTROL.	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 FACTORES AMBIENTALES QUE INTERVIENEN EN LAS BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES	23
TABLA 2 MACRO Y MICRONUTRIENTES PARA CADA ETAPA DEL CICLO DEL CULTIVO EN PPM.....	26
TABLA 3 CONCENTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES	27
TABLA 4 SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS PARA PCR.....	28
TABLA 5 REACTIVOS PARA RETROTRANSCRIPCIÓN CON REVERT AID.....	30
TABLA 6 REACTIVOS PARA PCR PUNTO FINAL	30
TABLA 7 PRIMERS PARA PAMT	36
TABLA 8 PRIMERS PARA B-ACTINA	37
TABLA 9 DATOS DE ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN DE LAS EXTRACCIONES DE RNA	38
TABLA 10 RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA ABUNDANCIA DE TRANSCRITOS DE PAMT.	42
TABLA 11 MEDIDAS DE FRUTOS POST-TRATAMIENTO	46
TABLA 12 CONCENTRACIONES DE RNA RELACIONES DE ABSORBANCIA A 260/230 Y 260/280 NM.....	48
TABLA 13 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA ABUNDANCIA DE PAMT.....	50
TABLA 14 DATOS DE DENSITOMETRÍA DE LAS MUESTRAS (0-40 DPA) DE RNA EN GEL DE ELECTROFORESIS.....	64
TABLA 15 DATOS DE DENSITOMETRÍA DE RNA EN ELECTROFORESIS DE LOS TRATAMIENTOS	65

RESUMEN

El mejoramiento genético de plantas es importante en la agricultura actual, ya que permite desarrollar cultivos con características mejoradas en un plazo corto de tiempo a comparación de técnicas tradicionales. Dentro de este ámbito la biotecnología vegetal ha implementado herramientas como el RNA de doble cadena (dsRNA), que participa en varios procesos biológicos, como el silenciamiento de genes específicos a través del RNA interferente (RNAi). Investigaciones recientes han empleado RNAi para alterar la percepción del etileno en frutos de tomate, optimizando la maduración. En este estudio se exploró el silenciamiento del gen putativo aminotransferasa (*pAMT*) en chile habanero como una estrategia para disminuir la producción de capsaicina y favorecer la síntesis de capsiato, un compuesto no pungente con potencial nutracéutico. El dsRNA se aplicó por inyección en pedúnculo en frutos 10 *Días Post-Antesis* (DPA). Se evaluaron tres tratamientos y un grupo control por triplicado biológico: T1 1000 pmol, T2 100 pmol, T3 10 pmol y el grupo control consistió en agua estéril libre de nucleasas. Los frutos fueron analizados en 20 DPA. Los resultados indicaron que el tratamiento T1 1000, T2 100 y T3 10 pmol de dsRNA redujeron significativamente la expresión del gen *pAMT* en comparación con las plantas control. Este hallazgo sugiere una vía funcional para redirigir la síntesis de compuestos en la ruta de los capsaicinoides, aumentar la producción de capsiato, destacando por su utilizada en la biotecnología aplicada y del sector farmacéutico.

Palabras clave: Silenciamiento génico, siRNA, miRNA, capsaicina, capsiato

SUMMARY

Plant breeding is important in today's agriculture, as it allows the development of crops with improved characteristics in a short period of time compared to traditional techniques. Within this field, plant biotechnology has implemented tools such as double-stranded RNA (dsRNA), which is involved in several biological processes, such as the silencing of specific genes through RNA interference (RNAi). Recent research has employed RNAi to alter ethylene perception in tomato fruits, optimizing ripening. In this study, the silencing of the putative aminotransferase (pAMT) gene in habanero peppers was explored as a strategy to decrease capsaicin production and favor the synthesis of capsiate, a non-pungent compound with nutraceutical potential. The dsRNA was applied by peduncle injection in fruits 10 Days Post-Anthesis (DPA). Three treatments and a biological triplicate control group were evaluated: T1 1000 pmol, T2 100 pmol, T3 10 pmol and the control group consisted of nuclease-free sterile water. The fruits were analyzed at 20 DPA. The results indicated that T1 1000, T2 100 and T3 10 pmol dsRNA treatment significantly reduced pAMT gene expression compared to control plants. This finding suggests a functional pathway to redirect the synthesis of compounds in the capsaicinoid pathway, increasing the production of capsiate, highlighting its use in applied biotechnology and the pharmaceutical sector.

Keywords: Gene silencing, siRNA, miRNA, capsaicin, capsiate.

1. INTRODUCCIÓN

El fitomejoramiento es un proceso clave en la agricultura moderna que permite generar plantas con características nuevas o mejorar las existentes, facilitando la adaptación a condiciones ambientales cambiantes y mejorando la resistencia a patógenos (Cong et al., 2008). En las plantas, como en otros organismos, la expresión genética puede variar según los estímulos ambientales y de desarrollo, lo que tiene implicaciones directas en la fisiología y las interacciones con el entorno. Por ello, la biotecnología vegetal busca alternativas para modificar características de las plantas mientras se mantiene su genoma intacto (Gu, X et al 2021). Una de estas alternativas es el tratamiento con RNA de doble cadena (*double-stranded RNA, dsRNA*), que desempeña un papel importante en el silenciamiento génico post-transcripcional mediante el proceso de interferencia por RNA (RNAi) en organismos eucariontes. Durante el proceso participan enzimas como Dicer-like (DCL), la cual convierte los dsRNA en pequeños RNA interferentes (*small interfering RNA, siRNA*). Posteriormente, los siRNA se integran al complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex, RISC*) el cual degrada moléculas de RNA mensajero (*messenger RNA, mRNA*) de genes que posean homología con el dsRNA, disminuyendo la expresión de dichos genes (Kiselev et al., 2024). Un ejemplo destacado de esta aplicación es el algodón transgénico, que produce dsRNA dirigido al gen del citocromo P450 presente en las larvas del patógeno, que, al ingerir el material vegetal, el dsRNA interfiere en la expresión de genes de desarrollo de la larva (Mao et al., 2007). Otro caso relevante es el de la cebada transgénica, que produce dsRNA dirigido contra *Blumeria graminis*, mediante genes de avirulencia que como Avra10 y Avk1 (Wang et al., 2017). Estas estrategias muestran el potencial del RNAi como herramienta en el fitomejoramiento y protección de cultivos frente a patógenos.

Además de su aplicación en la protección de cultivos, el RNAi también se utiliza para modificar rutas metabólicas en plantas, con el fin de controlar la producción de metabolitos secundarios de interés agrícola y farmacéutico. En este contexto, el Centro de Investigaciones Aplicadas en Biosistemas (CIAB) en Campus Amazcala, ha comenzado a explorar la inhibición de genes a nivel postranscripcional, en microorganismos fitopatógenos, así como en plantas para la biosíntesis de capsaicina y etileno. Cedillo-Jiménez et al. (2021)

examinaron el uso de miRNAs en la regulación del desarrollo de frutos de tomate, identificando su potencial para controlar la maduración. En investigaciones posteriores, Cedillo-Jiménez et al. (2024) diseñaron moléculas de RNAi dirigidas a los receptores de etileno, logrando alterar la percepción de esta hormona en plántulas y frutos de tomate, lo que ofrece nuevas perspectivas para el control de la maduración de frutas y la prolongación de su vida útil postcosecha.

Paralelamente, el interés por el uso de compuestos naturales como la capsaicina y su análogo no pungente, el capsiato, ha crecido debido a sus aplicaciones en biotecnología aplicada a la salud. Yumiko Tani et al. (2004) desarrollaron una composición de nanoestructuras basada en capsiato para el tratamiento de la arteriosclerosis, cuyas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias son clave para la protección del sistema cardiovascular. Este avance es particularmente significativo, dado que la patente de esta composición sigue vigente hasta 2024.

Un ejemplo destacado es el estudio de Burke Miller (2013), quien investigó el uso de capsiato en el tratamiento de disfagia faríngea oral. Sus hallazgos indican que este compuesto activa el receptor VR-1 de manera similar a la interacción entre la capsaicina y el receptor TRPV-1. No obstante, a diferencia de la capsaicina, el capsiato no genera sensación de ardor ni efectos tóxicos, lo que lo hace una opción segura para aplicaciones médicas (Caterina & Julius, 2001).

Finalmente, el estudio realizado por Chávez (2023) evaluó los efectos del capsiato en el crecimiento de ratones C57BL/6, encontrando que una dosis de 50 ppm promovió el crecimiento y alargamiento óseo sin alterar la composición corporal ni afectar órganos vitales. Este hallazgo subraya el potencial del capsiato como un promotor de crecimiento y sugiere nuevas aplicaciones en el ámbito nutracéutico y médico.

En este trabajo el uso de RNAi aplicado al gen *pAMT* en el fruto de chile habanero busca explorar la reducción de la capsaicina y potencial incremento de la síntesis de capsiato, partiendo de lo reportado por Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo en 2015 en donde al inducir silenciamiento del gen putativo acetiltransferasa (*AT3*), el cual codifica la capsaicina sintasa

(CS) enzima responsable de la síntesis de capsaicina en chile, a través de infección por *Agrobacterium tumefaciens* con pTRV2 -*AT3* se presentó una disminución en el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina en plantas infectadas en comparación a las plantas del control. Lo que sugiere que el silenciamiento de *AT3* afectó de manera negativa en la transcripción de genes pertenecientes a la vía de los ácidos grasos de la ruta de biosíntesis de capsaicinoides. Con esto en mente, podemos sugerir que una interferencia a *pAMT* en la ruta de los capsaicinoides, en la vía de los fenilpropanoides, en la bifurcación previa a la síntesis de capsaicina y capsiato haría que el sustrato disponible para la síntesis de capsaicina sea utilizado en lugar de la vainillilamina para la producción de capsiato.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de inhibir *pAMT* en frutos de chile habanero por la aplicación de una solución de dsRNA diseñada para ser complementaria y antisentido a una región específica del transcrito.

2. ANTECEDENTES

2.1. Mecanismo de silenciamiento por RNAi

El silenciamiento génico postranscripcional (*post transcriptional gene silencing*, *PTGS*) es un mecanismo que resulta en la degradación de secuencias de RNA mensajero (*messenger RNA*, *mRNA*) de origen endógeno o la degradación de mRNA generada por una infección viral. Dicho mecanismo se describió en plantas como co-supresión por Napoli et al., en 1990, cuando se describió en hongos recibió el nombre de *quelling* y en animales RNA de interferencia (RNAi) (Fire et al., 1998). Cuando los virólogos intentaban sobre-expresar genes vegetales en vectores virales recombinantes, obtuvieron la premisa del papel biológico que pueden cumplir los RNAi, debido a que la degradación del mRNA ocurrió antes que la sobreexpresión. (Dunoyer et al., 2006).

En 2006, los investigadores Andrew Fire y Craig Mello fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología por el descubrimiento del mecanismo de interferencia por RNA. Este avance se logró mediante experimentos en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Con el objetivo de comprender el papel de genes específicos durante su desarrollo, Fire y Mello inyectaron RNA relacionado con el gen *unc-22*, un gen asociado con la contracción muscular en estos gusanos. Inicialmente, introdujeron RNA de cadena sencilla (single strand RNA, ssRNA) en los gusanos, pero no observaron cambios visuales significativos, es decir, la contracción muscular permaneció normal. Sin embargo, al inyectar dsRNA, con una secuencia complementaria al gen *unc-22*, los nematodos presentaron espasmos musculares similares a los nematodos que carecían de un gen funcional *unc-22*. Esto demostró que el dsRNA puede inducir un silenciamiento génico específico, ya que este RNA complementario activa mecanismos celulares que bloquean la expresión del gen objetivo. Este hallazgo no solo elucidó el proceso biológico desconocido, sino que abrió la puerta a nuevas posibilidades.

Por su parte Fiallo Olvié (2012) describe tres posibles rutas de silenciamiento en plantas:

2.1.1. Presencia de pequeños RNAi (small interfering RNA, siRNA):

Los siRNAs son moléculas de RNA bicatenario de aproximadamente 21 a 24 nucleótidos que marcan un papel crucial en el silenciamiento génico. Este mecanismo es relevante cuando las plantas son infectadas por virus, ya que el RNA de doble cadena (dsRNA) llega a ser intermediario o incluso ser una estructura secundaria del virus con genoma de RNA (Hamilton et al., 1999).

El mecanismo consta de:

- I. La detección del dsRNA viral como un patrón molecular extraño
- II. El procesamiento del dsRNA en fragmentos más pequeños (siRNAs) por acción de las enzimas DCL
- III. La formación y posterior carga del siRNA en complejos de silenciamiento
- IV. La degradación de RNA viral
- V. La amplificación de la señal de siRNA, a través de RNA polimerasas dependientes de RNA (*RNA Dependent RNA Polymerasa, RdRP*)
- VI. Finalizando en la inmunidad sistémica (Dings et al., 2007; Csorba et al., 2009; Pumplin et al., 2013)

2.1.2. Silenciamiento de mRNA guiado por microRNAs (miRNAs):

Los miRNAs regulan negativamente la expresión génica mediante el apareamiento de bases con mRNAs específicos. Este proceso genera un corte en los mRNAs y detiene la traducción. Los miRNAs se originan a partir de precursores con secuencias repetidas e invertidas que forman regiones de doble cadena (Baulcombe, 2004).

Por su parte, Bravo et al 2022 sugieren la participación de miRNAs cloroplastidiales que podrían desempeñar funciones esenciales en la regulación de genes dentro de los cloroplastos, afectando así procesos como la fotosíntesis y respuesta a factores ambientales.

2.1.3. Metilación del DNA y represión de la transcripción

En plantas la metilación de DNA que es guiada por siRNAs es asociada con la modificación de las histonas y formación de heterocromatina (Volpe et al., 2002; Ziberman et al., 2003).

Se descubrió este silenciamiento a causa de la introducción de secuencias exógenas y RNAs guías a blancos específicos (Mette et al., 2000; Jones et al., 2001).

La biogénesis de siRNAs que genera el PTGS se da de la siguiente manera: la enzima DICER genera dsRNAs pequeños a partir de la fragmentación de dsRNAs (Jaskiewicz and Filipowicz, 2008), luego una de las hebras de dsRNA pequeño se incorpora al complejo ribonucleoprotéico RISC; el complejo RISC guiado por siRNAs reconoce por complementaridad en antisentido secuencias específicas de mRNA que son conducidos a degradación o inhibición de la traducción (Waterhouse et al., 2001; Waterhouse et al., 2003; Dunoyer et al., 2005; Deleris et al., 2006; Waterhouse et al., 2006; Salomon et al., 2010). Así, desde que se descubrió el fenómeno PTGS se ha convertido en una herramienta tecnológica para generar cambios a través de la ingeniería genética (Goldbach et al., 2003).

2.2. Aplicaciones de RNA con potencial interferente en cultivos

Una de las principales estrategias para la protección y mejora de cultivos es el uso de tecnología basada en RNAi (Borges et al., 2015) en las que se puede incluir la expresión de dsRNA y RNA de horquilla (*harpin-RNA*, *hp-RNA*) y el silenciamiento inducido en el huésped (*host-induced gene silencing-RNA*, *HIGS*) (Morozov et al., 2019; Gebremichael et al., 2021; Koch et al., 2021) o el silenciamiento génico inducido por virus (*virus-induced gene silencing*, *VIGS*; Ramegowda et al 2014).

La protección contra patógenos mediante el uso de dsRNA es de alto interés agrícola. Por mencionar, Fan et al., (2024) aplicaron dsRNA para reducir la virulencia de *Fusarium oxysporum*, en cultivos de *Atractylodes macrocephala*, ya que la infección causa pudrición de raíz, lo que afecta negativamente el desarrollo del cultivo. Para ello, utilizaron como blanco el gen *Tup1*. En este caso, la absorción de *Tup1*-dsRNA, redujo la expresión del gen *Tup1*; que a su vez disminuyó el crecimiento del hongo y cambios morfológicos en hifas. Además, se observó una reducción de malondialdehído y niveles de prolina en tejidos radiculares tratados, que se correlaciona con la reducción de la incidencia de la pudrición de raíces.

Otra perspectiva del uso de RNAi es para inhibir genes de plantas. Las investigaciones reportan la aplicación externa de dsRNAs en plantas como *Arabidopsis thaliana* (Mitter et al., 2017; Dubrovina et al., 2019; Kiselev et al 2021) así como, dsRNAs y siRNAs en *Nicotiana benthamiana* (Numata et al., 2014; Dalakouras et al 2016; Dubrovina et al., 2020) para silenciar genes transgénicos que tenían en común, como la expresión de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein, GFP*) y la proteína amarilla fluorescente (*yellow fluorescent protein, YFP*), así como la expresión de la β -glucuronidasa (*β -glucuronidase, GUS*) o la neomicina fosforotransferasa II (*neomycin phosphotransferase II, NPTII*). (Vermeersch et al 2010; Dadami et al 2013; Dadami et al 2014, Kiselev et al 2021).

Andrey et al (2023) investigaron el efecto de la aplicación foliar de dsRNA exógeno específico de gen, centrándose en cuatro genes en tomate, los cuales codifican a represores de transcripción de genes de la familia MYB, presente en la biosíntesis de antocianinas en hojas. Encontraron que la aplicación de dsRNA complementario a los genes *SIMYBATV1*, *SIMYB32*, *SIMYB76* y *SITRY* disminuyó los niveles del mRNA de represores endógenos de antocianinas, lo cual aumentó la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas, y por ende el contenido de estas en hojas. Demostrando así, que la aplicación exógena de dsRNA puede inducir un PTGS en las hojas de tomate (Suprun et al., 2023).

Konstantin et al. (2024) evaluaron el efecto del dsRNA exógeno en hojas de *Arabidopsis thaliana*, centrándose en cinco genes: tres de factores de transcripción (*AtCPC*, *AtMybL2*, *AtANAC032*), el gen de la proteína de unión a la calmodulina (*AtCBP60g*) y el gen de una antocianidina reductasa (*AtBAN*), conocidos por su papel en la regulación negativa de la acumulación de antocianinas. Las aplicaciones de dsRNA se realizaron para inhibición de cada transcrito y otro tratamiento para ambos transcritos, demostrando que la aplicación de dsRNA exógeno provocó una regulación negativa de los cinco genes. Esto se acompañó de un aumento de la expresión del gen de la chalcona sintasa (*AtCH*) y un incremento en el contenido de antocianinas. Además, se observó que la aplicación para inhibición de ambos transcritos fue más eficiente para promover la acumulación de antocianinas en comparación con las aplicaciones para los transcritos blancos individuales.

2.3. Cultivo de chile habanero

El chile habanero pertenece a la familia de las Solanáceas y al género *Capsicum*, siendo su especie *C. chinense* Jacq. Es una planta herbácea anual que presenta un sistema radicular axonomorfo con una longitud de entre 0.20 m y 0.60 m. El tallo es erecto, herbáceo y alcanza una altura entre 0.5 m y 1.5 m. Las hojas son simples y pueden ser ovales o lanceoladas, terminando en un ápice puntiagudo. La cantidad de hojas en promedio es de 8 y 15 hojas antes de la aparición de la primera flor (González, 2010).

La floración en el chile habanero se caracteriza por la aparición de flores terminales en la mayoría de las ramas. Este proceso puede sufrir retrasos si las temperaturas superan los 35°C. Por su lado, la fecundación sigue el proceso típico de las angiospermas (Amador et al 2014).

Los frutos son bayas huecas en su interior, y cambian de coloración de acuerdo con su estado de maduración: verde, amarillo, anaranjado, rojo, morado e incluso alcanza tonalidades cafés (García, 2018). Estos frutos presentan de dos a cuatro cavidades, lo que da lugar a la forma trilobulada característica del chile habanero. En su interior, las paredes incompletas se unen a la parte inferior formando membranas conocidas como venas, que a su vez están conectadas a la placenta, de apariencia esponjosa y blanquecina (García, 2018).

La placenta es el sitio principal de síntesis de los alcaloides responsables de la pungencia, entre los que destacan la capsaicina y la dihidrocapsaicina (Figura 1a) como los compuestos más abundantes (Zamski et al., 1987; García et al., 1995; Stewart et al., 2007; Tewksbury et al., 2008; Sharma et al., 2013; Veloso et al., 2014; García et al., 2018).

Se ha reportado que cultivares con pericarpio y placenta de menor tamaño tienden a ser menos pungentes en comparación con aquellos con pericarpio y placenta de mayor tamaño, en concordancia con las observaciones de Balbaa et al., (1968) y Srivastava, et al., (2024).

La figura 1b) muestra la concentración de capsaicina en las glándulas de capsaicina, así como en el pericarpio, la placenta y semillas.

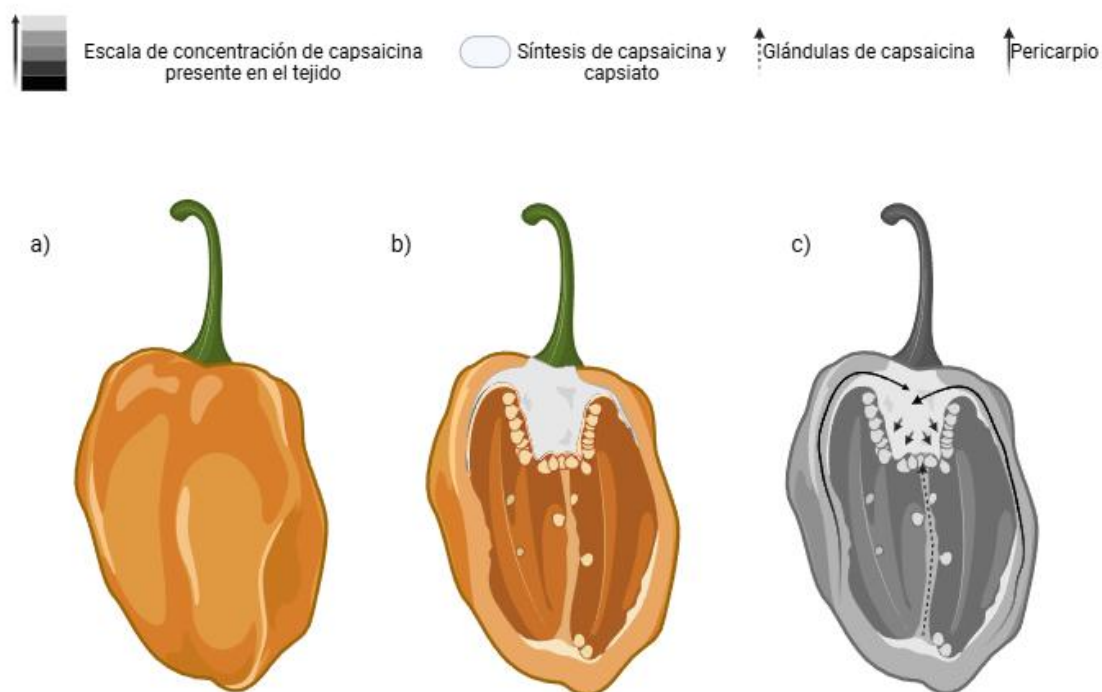


Figura 1 Distribución de la capsaicina en los tejidos del chile habanero.

La figura muestra la concentración de capsaicina en diferentes partes del fruto: a) vista externa, b) sección longitudinal que revela la presencia de glándulas de capsaicina en placenta (sitio en color gris) y c) escala de concentración, donde las áreas más oscuras indican menor concentración de capsaicina y áreas más claras mayor concentración.

Los frutos atraviesan tres etapas principales durante su desarrollo: crecimiento, maduración y senescencia. Tras la polinización de la flor, se inicia el proceso de división y elongación celular, durante el cual el fruto incrementa su tamaño hasta alcanzar la madurez fisiológica.

A lo largo de esta etapa, se producen cambios bioquímicos, genéticos y hormonales que son necesarios para lograr la maduración de consumo. Estos cambios impactan en el color, sabor, aroma, textura y firmeza del fruto. Dichos procesos son irreversibles y conducen al ablandamiento del fruto y deterioro de la membrana hasta causar muerte celular o senescencia (Martínez et al., 2017).

2.4. Manejo agronómico del chile habanero

De acuerdo con Ramírez et al. (2006), el chile habanero necesita las siguientes condiciones para el manejo agronómico:

- a) La temperatura óptima se sitúa en los 30°C, su temperatura mínima es de 10°C y la máxima de 35°C. Si las temperaturas son menores o mayores se limita el desarrollo del cultivo.
- b) Los suelos que favorecen su desarrollo son aquellos que presenten buen drenaje y retención de humedad.
- c) El pH que más favorece es de 6.5 con este valor se asegura una mejor disponibilidad de los nutrientes.
- d) Requiere de una lámina de riego entre 750 a 1000 mm sobre todo en la etapa de floración, fructificación y llenado de fruto.
- e) Humedad relativa entre 65-80 %
- f) La poda con mejores resultados es a 3 tallos (Villa et al., 2013) a partir de la primera bifurcación. Hojas y brotes por debajo de ella se retiran. Al desarrollarse las ramificaciones laterales se dejan 4 nudos y se corta el ápice. Uso de tijeras desinfectadas con solución clorada al 10%.

Las cuatro etapas del cultivo de chile habanero son (Noh-Medina et al., 2010):

- 1) Etapa vegetativa, 50 días después del trasplante
- 2) Etapa de floración, 75-90 días después del trasplante
- 3) Etapa de fructificación, 115-120 después del trasplante
- 4) Etapa de producción, 120-180 días después del trasplante

En la Figura 2 pueden observarse las etapas fenológicas, donde se incluye la maduración fisiológica que se alcanza hasta una vez que se completa el desarrollo del fruto.

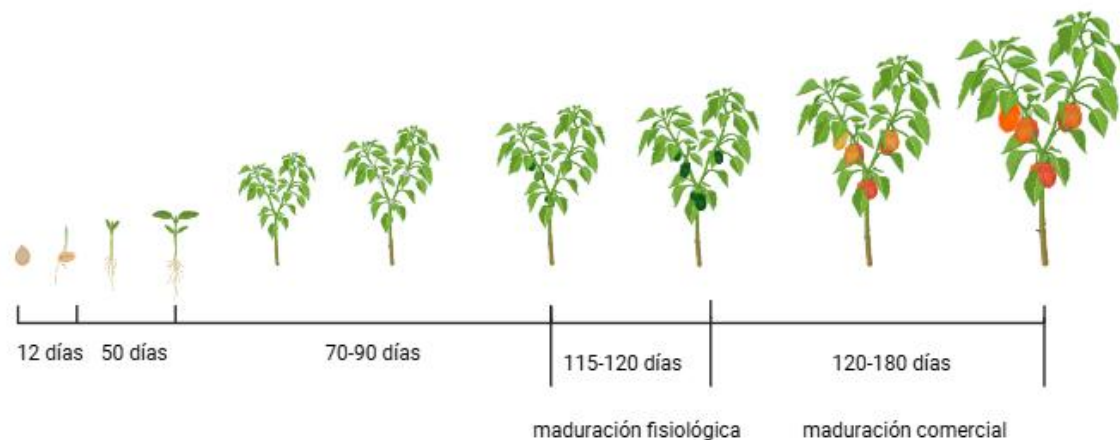


Figura 2 Ciclo de desarrollo del chile habanero.

La figura ilustra las principales etapas fenológicas de la planta, desde la germinación de la semilla hasta la maduración comercial del fruto. Se muestran intervalos de tiempo aproximados para cada fase.

2.5. Biosíntesis de capsaicina y capsaiato

La estructura química de la capsaicina posee un núcleo fenólico unido por un enlace amida a un ácido graso. La vainillilamina conforma la parte fenólica y se obtiene a partir de la ruta de los fenilpropanoides pasando por una serie de conversiones (Figura 3); partiendo de la fenilalanina seguida del ácido cinámico, cumárico, cafeico y ferúlico, en estas conversiones participan enzimas como: fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4hidroxilasa (Ca4H), cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H) y ácido cafeico metiltransferasa (COMT); en este punto la vainillina actúa como intermediario, se amina por presencia de una transaminasa (pAMT) para obtener vainillilamina mediante la enzima CS. Por su parte, el ácido graso se obtiene de cadenas ramificadas de aminoácidos, los cuales suelen ser leucina o valina, que al condensarse con la vainillilamina dan formación a la capsaicina. PAL actúa como la responsable de guiar el carbono obtenido en el metabolismo primario a la síntesis de capsaicinoides, por lo que PAL es una enzima de importancia en la biotecnología encargada de incrementar la síntesis de capsaicinoides (Ochoa-Alejo 2001).

La estructura química es parcialmente similar en capsaicinoides y capsinoides, sin embargo, los primeros presentan una unión de la vainillilamina al grupo ácido graso a través de un enlace amida, para el caso de los segundos, esta unión se da a través de un enlace éster (Sharma et al., 2013; Snitker et al., 2008). La unión de la vainillilamina y el ácido graso es

catalizada mediante la enzima CS (Sutoh, K. et al., 2006) mientras que la síntesis de la vainillilamina es catalizada por la enzima pAMT (Figura 3).

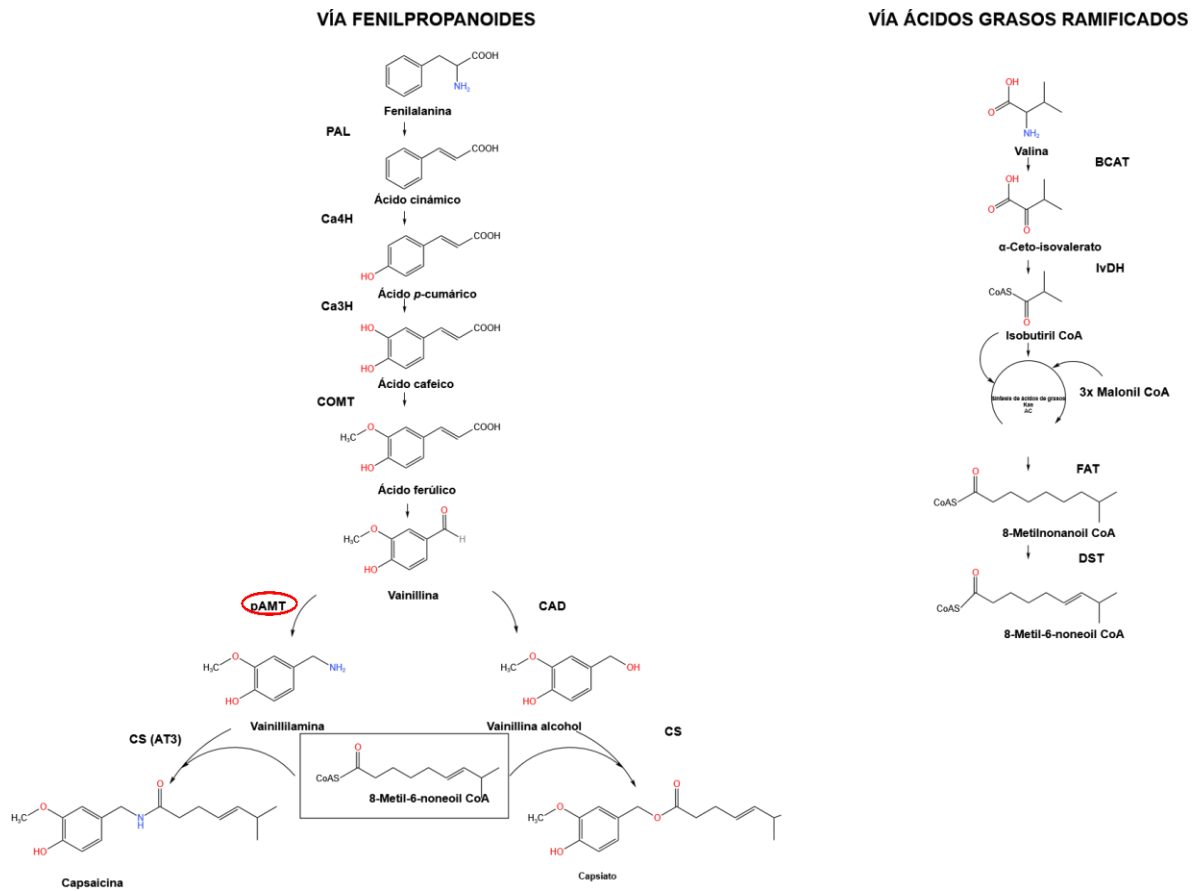


Figura 3 Ruta biosintética capsaicina y capsaiato.

Se ilustra la convergencia de la vía de los fenilpropanoides (precursor fenólico) y la vía de los ácidos grasos ramificados (precursor acílico) para la síntesis de capsaicina y capsaiato, destacando las enzimas clave que participan en cada etapa, encerrando en color rojo pAMT punto clave para la investigación.

Las enzimas que se requieren para la formación de los capsaicinoides se localizan en el tejido que conforma la placenta, esto en frutos inmaduros (Lindsey et al., 1984). El contenido de capsaicina varía de acuerdo con las partes del fruto. Es mayor en la placenta y en el septo, donde representa un 2.5% de la materia seca. Por su parte, las semillas contienen un 0.7%, el fruto un 0.6% y el pericarpio un 0.03% de la materia seca (Núñez et al., 2003).

Otro factor que presenta relevancia sobre la biosíntesis de capsaicinoides es el estado de desarrollo ya que, dependiendo del genotipo y condiciones ambientales, la síntesis de capsaicinoides ocurre alrededor del día 10 al 20 DPA (Días Post Antesis, Days Post

Anthesis). La acumulación de capsaicinoides puede alcanzar entre 120 y 200 μg con un acumulado máximo entre los 20 al 40 DPA (Aza et al., 2011; Barbero et al., 2016; Arce et al., 2017; Arce et al., 2019).

La evaluación de la biosíntesis de la capsaicina y capsato post-antesis permitiría profundizar en la actividad de genes *PAL*, *CS*, *Ca4H*, *ADT* y *pAMT* en su síntesis. En particular, nos enfocamos en *pAMT*, transcrito responsable de la conversión de vainillina a vainillilamina, cuya relevancia dentro de la ruta metabólica de capsaicina ha sido reportada por Nakaniwa et al., 2023.

2.6. Factores que intervienen en la biosíntesis de capsaicinoides

La cantidad de capsaicinoides varía según factores ambientales y las características genéticas de cada genotipo (Hamed et al., 2019). Asimismo, la concentración de capsaicina puede fluctuar según la etapa de maduración del fruto y puede aumentar bajo condiciones de estrés (Tabla 1) controlado, similar a la acumulación de otros metabolitos secundarios en plantas en respuesta a condiciones adversas (Gurung et al., 2011). El estrés ambiental definido como un cambio abrupto en el estado fisiológico, bioquímico y molecular de la planta, impacta negativamente en su crecimiento y desarrollo. Dicho estrés interrumpe la homeostasis vegetal, disminuyendo la producción de energía y comprometiendo la integridad celular (Rivero et al., 2021; Kaur et al., 2023). Bajo estas condiciones, las plantas presentan modificaciones metabólicas y fisiológicas, tales como la reducción de biomasa en raíces y brotes, menor eficiencia fotosintética, disminución de la absorción de nutrientes, inhibición de la floración y germinación, así como un aumento de la producción de metabolitos secundarios como mecanismo de adaptación (Kaur et al., 2023).

Una de las respuestas primarias al estrés es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas desencadenan señales intracelulares que activan la expresión de genes asociados a la respuesta frente a estrés biótico y abiótico, promoviendo la acumulación de metabolitos secundarios (Mejía-Teniente et al., 2013; Chapa-Oliver y Mejía-Teniente, 2016).

Tabla 1 Factores ambientales que intervienen en las biosíntesis de capsaicinoides

Factor ambiental	Ruta de señalización molecular	Efecto en la biosíntesis de capsaicinoides	Genes o enzimas involucradas
Estrés salino	↑ WRKY ↑ CaMYB31	Aumenta la expresión de genes biosintéticos de capsaicinoides	<i>Pal, Kas, pATM, Pun1</i>
Estrés acústico			<i>Pun1, Kas</i>
Estrés por sequía			<i>CaKR1, Kas, pATM, Pun1, Fat, BCAT, ACS, 4CL, BCKDH</i>
Estrés por frío			↑ WRKY ↓ CaMYB31
Estrés por calor	↓ <i>CaMYB31</i>	Reduce la expresión de genes biosintéticos de capsaicinoides	

Tabla de creación propia con información reportada por Aza-González et al., 2011; Arce-Rodríguez and Ochoa Alejo 2017; Zhu et al., 2019

3. HIPÓTESIS

La aplicación de una solución de RNA sintético en doble cadena cuyo diseño es complementario en antisentido a una región del transcrito de *pAMT*, reduce la expresión de este gen en frutos de chile habanero.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de inhibición de *pAMT* en frutos de chile habanero mediante la aplicación de una solución de RNA sintético de doble cadena, diseñada para ser complementaria y antisentido a una región específica del transcrito.

4.2. Objetivos específicos

1. Monitorear el desarrollo de frutos de chile habanero previo y post-antesis.
2. Analizar computacionalmente la interacción del RNA de doble cadena con potencial interferente al gen *pAMT*, con su transcrito objetivo.
3. Analizar la abundancia de transcritos del gen *pAMT* en la placenta de frutos de chile habanero inyectados con RNA de doble cadena 10 días posteriores a su aplicación.

5. METODOLOGÍA

5.1 Monitoreo del desarrollo de frutos de chile habanero previo y post-antesis.

5.1.1 Producción en invernadero

El experimento se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala en el invernadero experimental No.6 de 36m², contó con ventilación natural, riego automatizado.

5.1.2 Material vegetal

Para el experimento se utilizaron semillas certificadas de chile habanero, variedad “El Jaguar”, las cuales se germinaron en charolas de 12 cavidades con medidas 10 cm x 12 cm x 18 cm, con peat moss comercial y perlita como sustrato. Después de la emergencia de las cuatro primeras hojas verdaderas, y pasados entre 15 a 20 días, se trasplantaron en bolsa de 20 L con una mezcla 3:1 de peat moss comercial, y perlita, como sustrato. Se utilizaron en total 18 plantas para el experimento.

En cuanto al manejo cultural, se realizó la poda de acuerdo con lo reportado por Villa et al., (2013). El deshojado se realizó quitando las hojas que se encuentran por debajo de la bifurcación. El entutorado se realizó después de la poda de formación utilizando rafia y anillos de tutorado de plástico.

5.1.3 Nutrición vegetal

La nutrición se aplicó por fertirrigación siguiendo lo reportado por Cedillo-Jiménez (2015). Se programaron 8 riegos al día, comenzando a las 8 a.m. y terminando a las 4 p.m. Con una duración de 1 min por riego. Los valores se encuentran en ppm en la Tabla 2.

Tabla 2 Macro y micronutrientes para cada etapa del ciclo del cultivo en ppm

	Etapa vegetativa	Etapa floración	Etapa fructificación	Etapa de producción
Nutriente	1	2	3	4
NO ₃ ⁻	536	942	496	682
H ₂ PO ₄ ⁻	8.4	82	165	343
SO ₄ ²⁻	554	402	235	273
Ca ²⁺	199	228	120	160
Mg ²⁺	52	42	23	28
K ⁺	258	258	175	262
Fe ²⁺	2	2	2	4
Zn ²⁺	0.05	0.05	0.05	0.05
Mn ²⁺	0.21	0.21	0.21	1
Cu ²⁺	0.5	0.5	0.5	0.5

5.2 Análisis computacional de la interacción del RNA de doble cadena con potencial interferente al gen *pAMT*, con su transcrito objetivo.

5.2.1 Diseño, síntesis de RNA interferente para *pAMT*

Se utilizaron las siguientes secuencias de RNA: U*UCACAAACUCUGUAGAAAGmU y la hebra complementaria a *pAMT* con 2 nucleótidos salientes para el ensamblaje con dsRNA de acuerdo con Ghosh et al., (2009): A*UUCUACAGAGUUUGUGAAmU. Las secuencias fueron químicamente modificadas donde el asterisco (*) indica fosforotiolado y *m* indica que el nucleótido tiene un 2-O-metilo-RNA ya que le confiere estabilidad (Szabat et al., 2017).

Se realizó el análisis de predicción de transcritos objetivos mediante el programa PsRNATarget 2.0 y RNA Up de Vienna RNA Web services (Xinbin et al., 2011; Xinbin et al., 2018). La síntesis de RNA se realizó con la empresa OligoT4. El material genético se entregó liofilizado por lo que se hidrató utilizando agua destilada estéril libre de RNAsas.

5.3 Análisis de la abundancia de transcritos del gen *pAMT* en la placenta de frutos de chile habanero inyectados con RNA de doble cadena 10 días posteriores a su aplicación.

5.3.1 Aplicación de RNA interferente para *pAMT*

La solución de RNAi se preparó siguiendo el protocolo descrito por Dubrovina et al., (2020). El procedimiento consistió en mezclar el RNAi con su cadena complementaria en una relación 1:1, seguido de una incubación a 90°C durante 1 min y un enfriamiento a temperatura ambiente. Posteriormente, se inyectaron 5 µL de la solución de dsRNA en el peciolo del fruto utilizando una jeringa de insulina. Como control, se aplicó el mismo volumen de agua.

El experimento se realizó en frutos con 10 DPA, inyectando un fruto por planta, con triplicado biológico. Los tratamientos se detallan en la Tabla 3 y en la Figura 4, se muestra un ejemplo gráfico de la aplicación.

Tabla 3 Concentración de los tratamientos experimentales

Tratamiento	Concentración
T1	1000 pmol
T2	100 pmol
T3	10 pmol
Control	0 pmol



Figura 4 Método de aplicación de inyección de RNAi

5.3.2 Primers utilizados en este trabajo

En la Tabla 4 se presentan los primers utilizados para el análisis de abundancia de transcritos de *pAMT*: LC423555 y β -actina: AY572427 reportados por Sano et al., 2022.

Tabla 4 Secuencias de primers utilizados para PCR

Identificador	Sentido	Secuencia
LC423555	Forward	CCACTTACATTTCTGCTGGTCTCTC
	Reverse	CAATGAAAGCAGCTACTGTTTCAGG
AY572427	Forward	AGCAACTGGGACGATATGGAGAAG
	Reverse	AAGAGACAACACCGCCTGAATAGC

5.3.3 Estimación del tamaño del producto de PCR

A continuación, se detalla brevemente la forma en que se calculó el tamaño esperado en pares de bases (pb), del amplicón para cada uno de nuestros primers.

- Se obtuvieron las secuencias codificantes (CDS) de NCBI en formato FASTA
- Se utilizó la plataforma https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html para obtener la secuencia inversa y complementaria del primer reverso.
- Se localizó la secuencia del primer forward dentro del archivo FASTA de cada CDS.
- Se localizó el reverso complementario del reverse de cada CDS
- Se contaron las letras desde el inicio hasta el final de los sitios reconocidos.

5.3.4 Extracción de RNA

Se colectaron frutos de chile habanero en diferentes intervalos de tiempo: 0,3,5,10,20,30 y 40 DPA y hoja, con el objetivo de evaluar la abundancia de transcritos de *pAMT*. En las muestras de 0 y 3 DPA, debido al tamaño del fruto, se utilizó el tejido completo para el análisis. A partir de 5 DPA, solo se trabajó con la placenta. En el caso de los frutos tratados con RNAi (20DPA), se utilizó el fruto completo debido a los tamaños presentados.

Se tomó un total aproximado de 100 mg del tejido congelado, posteriormente se extrajo RNA total utilizando TRIzol™ Reagent (Ambion Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Consecuentemente, el material de RNA obtenido se resuspendió en 30 µL de agua estéril y libre de RNAsas.

Para conocer la integridad del material, se realizó un análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% a 60 V por 60 min, se utilizó un fotodocumentador de Biorad Gel Doc™ EZ System y se visualizó en ImageLab™. Se midió la absorbancia de la extracción del material en 230, 260 y 280 nm en µDrop (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland), para determinar su calidad y concentración de RNA. La cantidad de RNA se ajustó a 500 ng/µL para que todas las alícuotas tuvieran la misma concentración para su posterior análisis.

5.3.5 Análisis de abundancia de transcritos.

El análisis de transcritos se realizó mediante reacción de PCR, en primera instancia utilizando el kit *Revert Aid* (Ambion Thermo Fisher Scientific) para la retrotranscripción siguiendo las indicaciones del proveedor (Tabla 5).

Tabla 5 Reactivos para retrotranscripción con Revert Aid

Parte	Reactivo	Cantidad
Primera	RNA 500 ng/ μL	Depende la muestra
	Oligo dT(18)	1 μL
	Agua libre de nucleasas	Vol. para ajustar a 12 μL
Segunda	5X Buffer reaction	5 μL
	Ribolock	1 μL
	10 mM dNTPs	1 μL
	Rivert Aid	1 μL

Posteriormente, para analizar la amplificación se utilizó el kit *Maxima SYBR Green* (Ambion Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor, se detalla en la Tabla 6 las concentraciones de los reactivos utilizados. Se utilizó β -actina como gen de referencia.

Tabla 6 Reactivos para PCR punto final

Reactivo	Cantidad
Maxima™ SYBR™ Green	5 μL
Oligonucleótido forward 10 μM	0.6 μL
Oligonucleótido reverse 10 μM	0.6 μL
c DNA	2 μL
Agua libre de nucleasas	Vol . para ajustar a 10 μL

5.3.6 Análisis del producto de PCR

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 60 V por 60 min utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen) para corroborar el tamaño molecular en los productos de PCR. Las visualizaciones de los geles obtenidas a través de ImageLab se adaptaron con los mismos valores (high 2208, low 409) para la transformación de imagen, de acuerdo con los siguientes pasos:

1. Se exportó la imagen de ImageLab a ImageJ con los valores previamente descritos
2. Se ajustó la imagen exportada a 8 bit
3. Se seleccionó un área aledaña a las amplificaciones, dentro del programa se seleccionó dicho programa se seleccionó “Analyze – Set measurements” seguido de “Analyze-Measure”.
4. Se substrajo el valor obtenido previamente, siguiendo los pasos “Process – Math – subtract”
5. Se seleccionó el área de amplificación para β -actina, se prosiguió con “Analyze – Gels-Select First Line”, seguido de “Analyze-Gels-Plot Lanes”
6. Se realizó la unión de las curvas presentadas
7. Se obtuvo el área de dicha amplificación
8. Se realizó el mismo procedimiento con cada muestra de β -actina y *pAMT*. El valor final del área de amplificación se obtuvo dividiendo el valor para *pAMT* sobre el valor obtenido de β -actina.

5.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de abundancia de transcritos se sometieron a un análisis estadístico de varianza con ANOVA con un valor $\alpha=0.05$. Además, se determinó la diferencia entre las medias mediante una prueba de Tukey-Kramer ($P\leq 0.05$) utilizando el programa JMP Pro-18. El análisis estadístico se realizó con 3 frutos por tratamiento, obteniendo cada fruto de una planta distinta.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Monitoreo del desarrollo de frutos de chile habanero pre y post-antesis

Se realizó el seguimiento del desarrollo de botón floral hasta fruto maduro en 12 plantas (Figura 5).



Figura 5 Monitoreo de desarrollo desde botón floral hasta fruto maduro de chile habanero
a) botón floral, b) antesis, c) cuajado de fruto d – h) fruto maduro

Se detectó que los botones florales presentaron abortos, especialmente durante el período lluvioso de julio-agosto. Esto probablemente se debió a que la alta humedad afecta la transpiración de las plantas, reduciendo la apertura de las estomas y generando acumulación

de agua en los tejidos, lo cual posiblemente altera el equilibrio térmico y debilita los botones, favoreciendo su aborto, como señala Chen et al. (2023).

Las dimensiones promedio del fruto a 20 DPA fueron de 2.5 cm de longitud y con un diámetro de 2.9 cm, como se observa en la Figura 6.

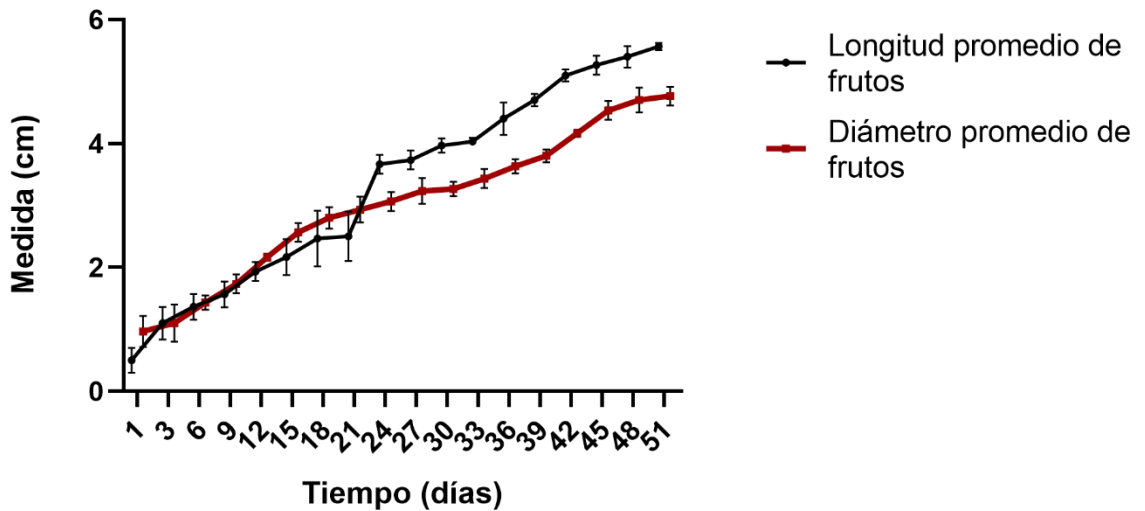


Figura 6 Promedio de a) longitud, b) diámetro de chiles habanero durante 51 días (n=12).

6.2 Análisis computacional de la interacción del RNA de doble cadena con potencial interferente al gen *pAMT*, con su transcrito objetivo.

Se realizó el diseño computacional de una molécula de RNAi a *pAMT*. Se obtuvo la secuencia de *pAMT* reportada por Tsurumaki y Sasanuma en 2019 (NCBI Reference Sequence: NM001324706.1). Seguido de ello se realizó la predicción y selección de miRNAs complementarios en antisentido al transcrito *pAMT*, eligiendo a sly-miR9472-3p que complementa en 1133 a 1151, se realizó un ajuste de diseño para que el complemento de nucleótidos con *pAMT* resultara total (siR*pAMT*) como se muestra en la Figura 7.

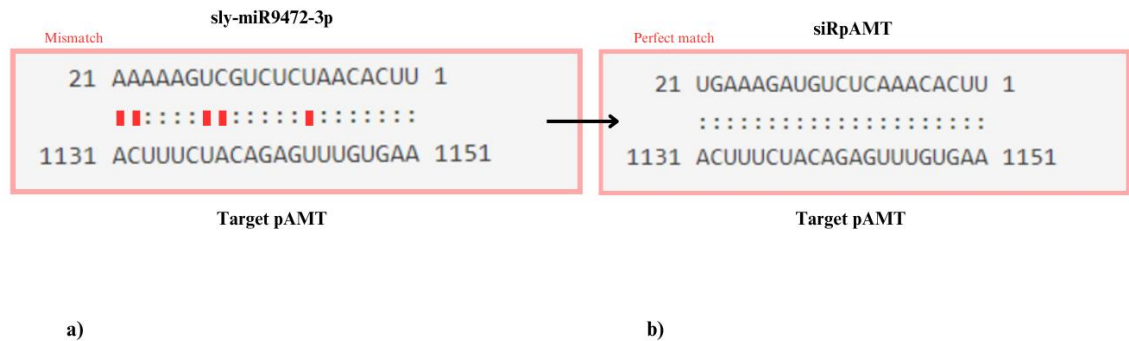


Figura 7 Posiciones 1131 a 1151 entre sly-miR9472-3p y pAMT

a) en los que se encuentran sitios no coincidentes (mismatches) en la complementariedad con nucleótidos (se presentan en color rojo dichos sitios), b) se realizan ajustes para presentar complementariedad al 100%

Encontramos que *pAMT* tiene una baja energía libre para poner disponible la zona de interacción con siRpAMT (1.42 kcal/mol) y una muy favorable para el apareamiento de bases pAMT-MiRpAMT (-25.32 kcal/mol), indicando que es una región accesible para nuestro siRpAMT (Mathews et al., 2004; Gruber et al., 2008; Mueckstein et al., 2008)

Desde el punto de vista termodinámico, la energía libre de Gibbs (ΔG_i), determina la espontaneidad de una reacción o interacción molecular. Un ΔG_i negativo nos indica un proceso termodinámicamente favorable, lo que en nuestro caso significa que la unión de siRpAMT a *pAMT* ocurre de manera espontánea y con alta estabilidad. Por otro lado, el hecho de que la energía de apertura de la estructura secundaria de *pAMT* sea baja implica que la región es accesible para la interacción siRpAMT, sin que esto genere un gasto de energía significativo para desestabilizar la estructura del mRNA. Lo que nos sugiere que el silenciamiento de *pAMT* mediante el uso de RNAi es viable y eficiente (Figura 8 y 9).

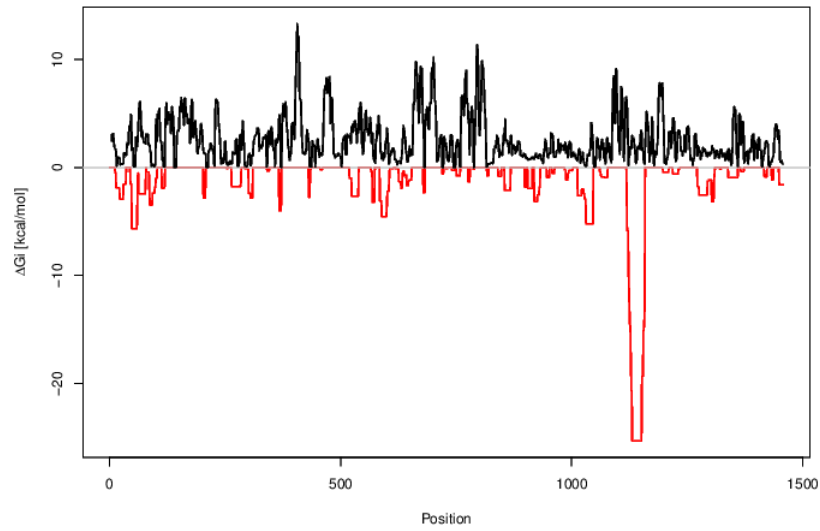


Figura 8 Secuencia completa de la energía libre de interacción entre el transcrito pAMT-siRpAMT (rojo) y energía necesaria para abrir estructuras existentes en la secuencia más larga.

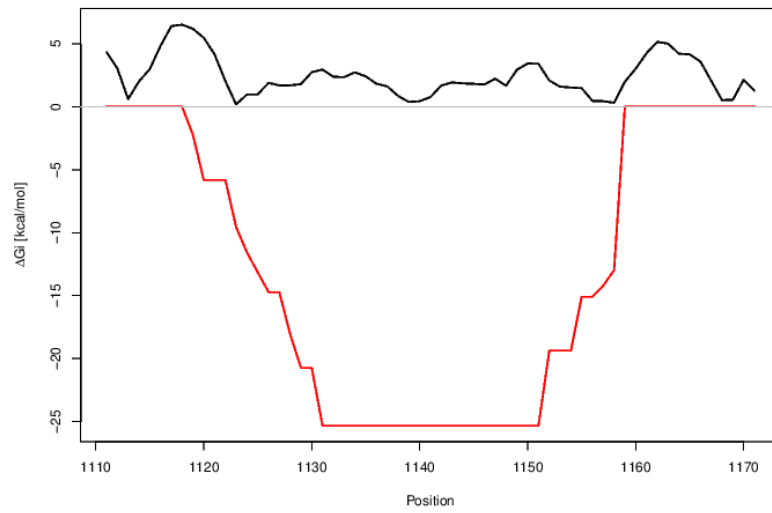


Figura 9 Secuencia particular de la energía libre de interacción entre el transcrito pAMT-siRpAMT (rojo) y energía necesaria para abrir estructuras existentes en la secuencia más larga pAMT (negro).

6.3 Estimación del tamaño del producto de PCR de *pAMT* y β -actina

Se realizó la estimación de tamaños de los productos de PCR o amplicones esperados para *pAMT* y β -actina y se obtuvo que un amplicón para *pAMT* de 210 pb mientras que para β -actina fue de 198 pb.

1. *pAMT-LC423555.1 Capsicum annuum* Takanotsume *pAMT* mRNA for putative aminotransferase

ATGGCCAATATTACTAATGAATTTATGGGACATGATATGTTGGCACCCCTTTACTGCGGGATGGCAGAGTGATATGGAACCTTTA
GTTATAGAAAAGTCGGAGGGCTCTTATGTCTATGACATAAATGGGAAGAAGTATCTTGACACTTTATCTGGTTTATGGTGCAC
AACATTAGGGGGAAGTGAGACTCGACTTGTGAAGCTGCAAATAACAACCTCAATACATTGCCATTTTATCATTCAATTTGGA
ATCGAACACAAAACCTTCTTTGGATCTTGCAAAGGAGCTCCTAAATATGTTTACTGCAAATAAAATGGCCAAAGTTTTTTC
ACTAATAGCGGATCAGAAGCCAATGACACTCAGGTGAAGCTGGTGTGGTATTACAATAATGCCCTTGGGAGGCCACAGAAA
AAGAAAATTATTGCTCGAGCAAAGCATATCACGGTTCCACTTACATTTCTGCTGGTCTCTCTGGGCTTCTCCAATGCATCA
AAAATTTGATTTGCCACCTCCATTTGTCTGCACACTGAGTGCCTCATTATTGGGCCTATCACTTGCAGGTGAAACCGAAG
AGGAATTCTCTACTAGGTTGGCAAATAATTTGGAAAGTCTTATACTCAAAGAGGGGCCTGAAACAGTAGCTGCTTTCATTGC
CGAACCAAGTCCTAGGAGCAGCAGGTGTAATACTTCTCCCGCAACATATTTTGATAAGGTTCAAGCTATTTAAGGAAACAT
GACATTCCTTTTATCGCGGATGAGGTGGTATGTGGATTTGGAAGACTTGGGACAATGTTTGGCAGTGATAAATAACAACATTA
ACCTGATCTTGTCTGTAGCAAAGGCACCTTCTTCTGGATATATGCCAATTGCCGCTGTCTTGTAAAGCCAGAAAATTTCTA
GTGTCATACTTCTGAAAGCAATAAAATTTGGTGCCTTTGCCATGGATTTACTTATCCGGACACCCTGTTGCGTGCGCAGTT
GCATTGGAAGCATTGAAGATCTATAAGGAAAGAAATATTACTGAGGTGGTGAACAAAATATCACAAAAGTTTCAAGAAGGT
TTGAAAAGCATTGCCGACAGTCCCATAATTGGGGAGATAAGGGGAACTGGTTTGACACTTCTACAGAGTTGTAGACAATA
AATCTCCTAATGATCCCTTCCATATGAATGGGCTGTGGTACATATTTGGAGCACAATGTGCTAAGTACGGGATGTTGGTAA
GTTCCACTGGTGATCATGTAATATGGCTCCACCAATTACCTTGAGTCTTGAAGAAGTTGATGAGTTGATACGCATAATGGGA
AAGCATTGAAGGATACTGAAAAGAGAGTTGAAGAAGTCAAGTCTCAGAAGAAGTAA

Con los primers forward y reverse-complement delimitamos dentro del FASTA (Tabla 7)

Tabla 7 Primers para *pAMT*

Forward	CCACTTACATTTCTGCTGGTCTCTC
Reverse-complement	CCTGAAACAGTAGCTGCTTTCATTG

Por lo tanto, el tamaño de amplicón esperado es de 210 pb

2. AY572427.1 *Capsicum annuum* actin mRNA

ACTCTTAATCAATCCCTCCACCTCTTCACTCTCTGCTCTCTCCTCAGCTTCTCCACTAATCATCAAACAGGTTTTAAAAGATG
GCAGATGAAGATATTCAACCCCTTGTCTGTGATAATGGAACAGGAATGGTTAAGGCTGGATTTGCTGGTGATGATGCACCAA
GGGCTGTTTTTCTAGTATTGTCGGTCGACCTAGACACACCGGTGTTATGGTAGGGATGGGTCAAAGGATGCATATGTAGGT
GATGAAGCTCAGTCAAAAAGGGGTATTCTCACCTTGAAGTATCCCATTGAGCATGGAATAGTTAGCAACTGGGACGATATGG
AGAAGATTGGCATCATACCTTTTACAATGAGTTGCGTGTTTCTCCTGAAGAGCACCCCTGTGCTTCTCACTGAAGCACCCCTT
GAACCCCAAGGCAAATAGAGAGAAAAATGACACAAATCATGTTTGAGACTTCAATGTCCTGCCATGTATGTTGCTATTCAG
GCGGTGTGTCCTTTATGCCAGTGGCCGTACAACAGGTATTGTAAGTCCGGTGATGGTGTGTCAGTCATACAGTGC

Con los primers forward y reverse-complement delimitamos dentro del FASTA (Tabla 8)

Tabla 8 Primers para β -actina

Forward	AGCAACTGGGACGATATGGAGAAG
Reverse-complement	GCTATTCAGGCGGTGTTGTCTCTT

Por lo tanto, el tamaño de amplicón esperado es de 198 pb

6.4 Análisis de la abundancia de transcritos del gen *pAMT* en la placenta de frutos de chile habanero inyectados con RNA de doble cadena 10 días posteriores a su aplicación.

6.4.1 Abundancia de transcritos de *pAMT* durante el desarrollo de fruto

Se obtuvo la curva de abundancia de transcritos de *pAMT* durante el desarrollo de fruto en 0, 3, 5, 10, 20, 30 y 40 DPA. Las concentraciones y los valores de absorbancia obtenidos se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9 Datos de absorbancia y concentración de las extracciones de RNA

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	260/230	260/280	Media 260/230	Media 260/280
0 DPA	217	1.8	2.28	1.91 \pm 0.15	2.26 \pm 0.04
	241	2.07	2.29		
	172	1.85	2.21		
3 DPA	210	1.86	2.29	2.02 \pm 0.17	2.21 \pm 0.10
	189	2.2	2.22		
	281	2	2.1		
5 DPA	505	1.85	1.74	1.97 \pm 0.11	1.88 \pm 0.19
	376	2.07	2.1		
	249	1.97	1.8		
10 DPA	574	1.7	2	1.92 \pm 0.26	1.88 \pm 0.19
	407	1.86	2.29		
	480	2.2	2.22		
20 DPA	289	1.8	2.25	1.80 \pm 0.10	2.23 \pm 0.04
	170	1.9	2.25		
	483	1.7	2.19		
30 DPA	242	1.8	2.23	1.91 \pm 0.19	2.14 \pm 0.10
	932	2.13	2.16		
	795	1.8	2.03		
40 DPA	1650	1.84	2.24	1.94 \pm 0.22	2.21 \pm 0.03
	379	1.78	2.2		
	1170	2.19	2.18		

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para visualizar las bandas ribosomales 28 y 18 s, en cada uno de los estadios como se muestra en la Figura 10.

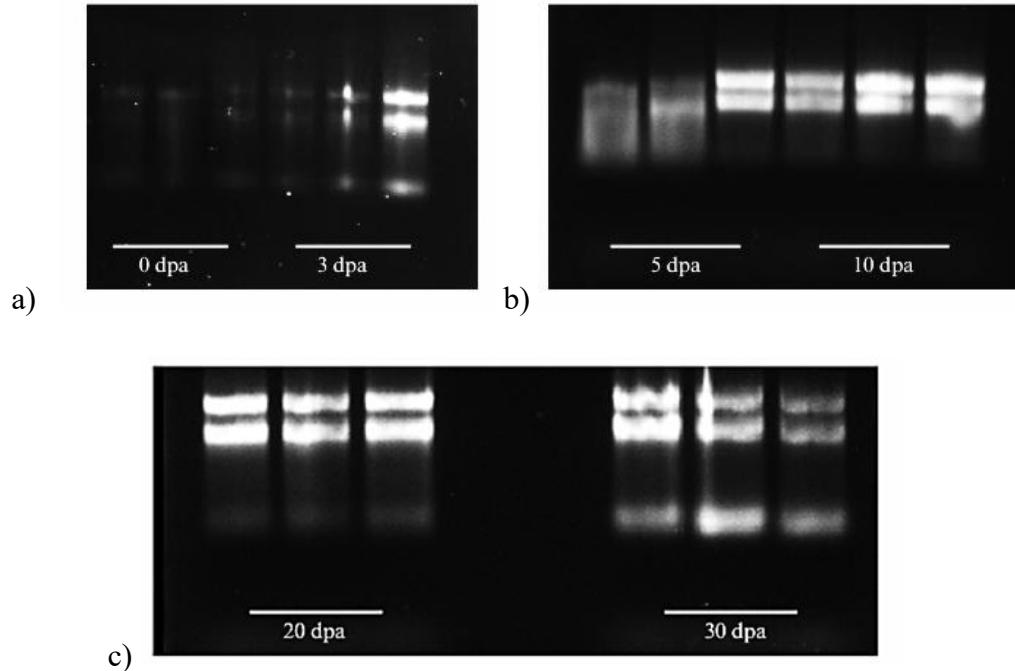


Figura 10 Geles de electroforesis de RNA total extraído de frutos de chile habanero en diferentes días de muestreo

a) 0 y 3 DPA, b) 5 y 10 DPA, c) 20 y 30 DPA. Se observan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (rRNA) 18S (banda inferior) y 28S (banda superior), evidenciando la integridad del RNA. Además, se visualiza una banda difusa de RNA de menor tamaño

Se ajustó la cantidad de RNA a 500 ng/ μ L para la retrotranscripción. Se obtuvo amplificación para β -actina y *pAMT* en las muestras con excepción de 0 DPA, las cuales se detallan a continuación, siendo el primer carril del marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), seguido de los productos de PCR para β -actina y *pAMT* de cada estadio (Figura 11, 12, 13 y 14).

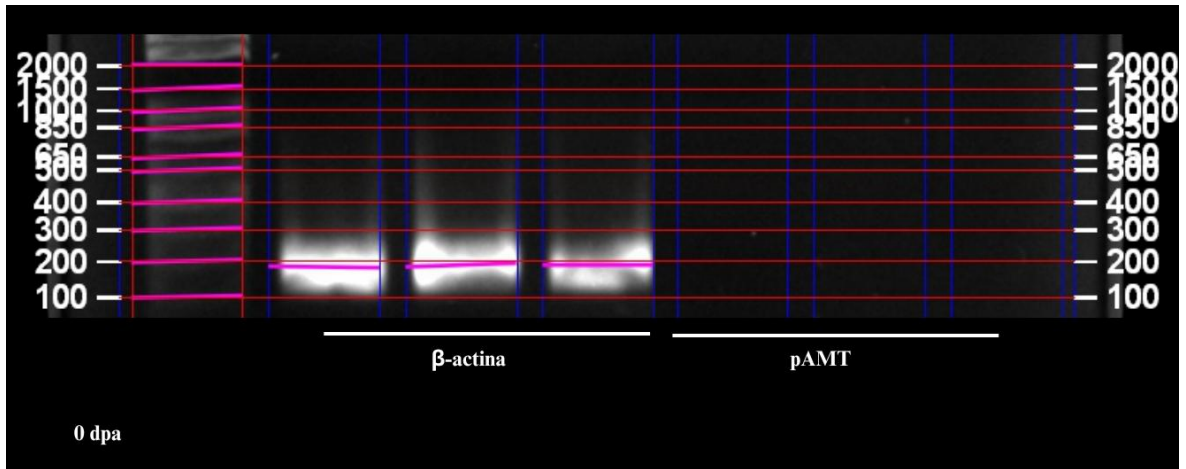


Figura 11 Amplificación β -actina
 con un tamaño aproximado de 298 pb y pAMT con un peso aproximado de 210 pb para 0 DPA

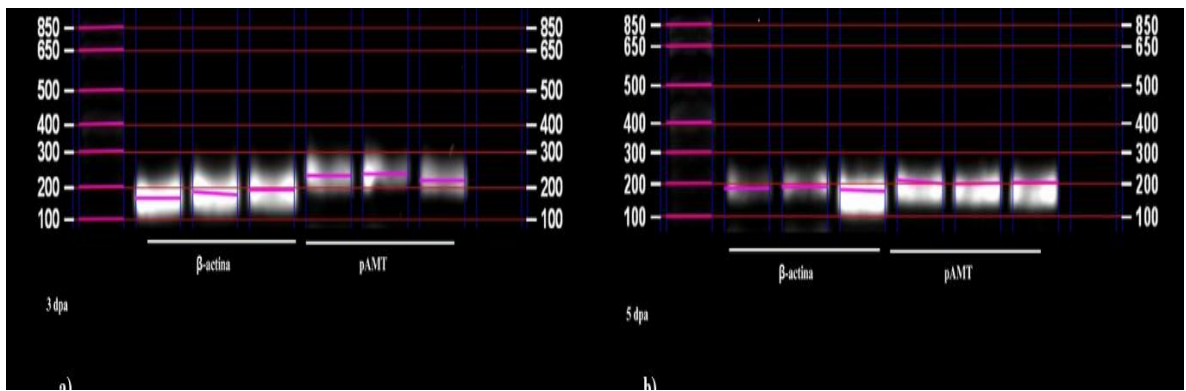


Figura 12 Amplificación β -actina
 con un tamaño aproximado de 298 pb y pAMT con un peso aproximado de 210 pb para a) 3 y b) 5 DPA

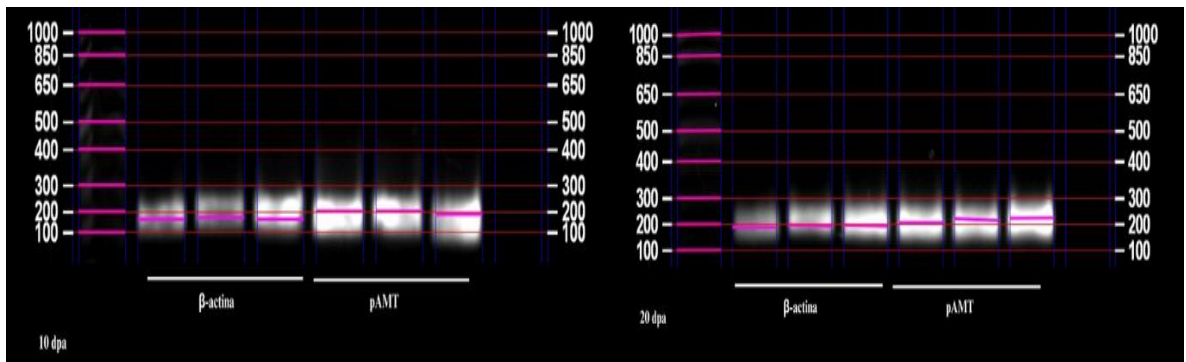


Figura 13 Amplificación β -actina
con un tamaño aproximado de 298 pb y pAMT con un peso aproximado de 210 pb para a) 10 y b) 20 DPA

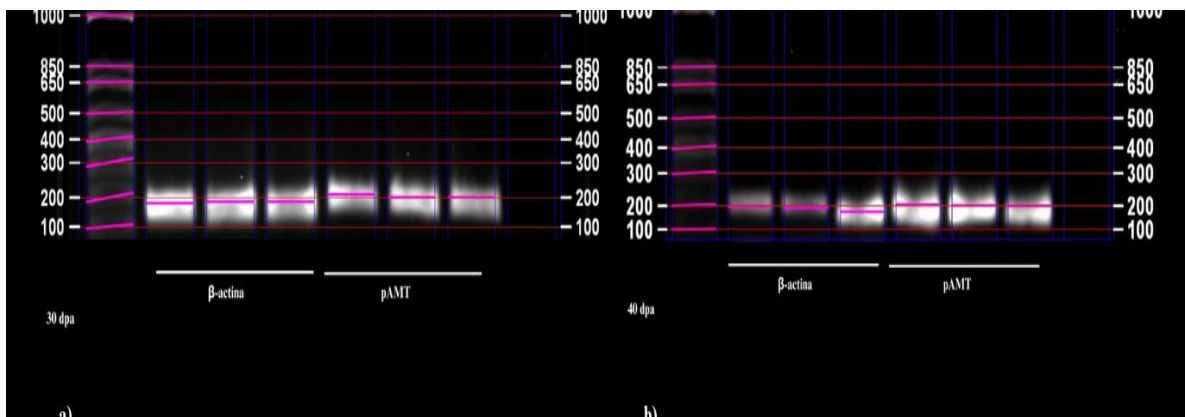


Figura 14 Amplificación β -actina
con un tamaño aproximado de 298 pb y pAMT con un peso aproximado de 210 pb para a) 30 y b) 40 DPA

Se realizó la densitometría para obtener la abundancia de transcritos de *pAMT* (Tabla 15 presente en anexos y Figura 13). Se realizó un ANOVA con un $\alpha=0.05$ y prueba de Tukey-Kramer con un obteniendo un valor $p=0.0182$ y los siguientes resultados (Tabla 10).

Tabla 10 Resultados estadísticos para abundancia de transcritos de *pAMT*.

DPA	Letras de significancia	Media**
0	ND*	ND
3	C	0.3833±0.0788
5	C	0.4604±0.0470
10	B	0.6645±0.0421
20	A	0.9591±0.0349
30	A	0.8953±0.0501
40	A	0.93008±0.0513

*ND es No Detectable debido a que *pAMT* no amplificó en 0 DPA

**La dispersión de los datos se indica por la desviación estándar.

En 0 DPA no amplificó *pAMT*, mientras que, en 3, 5, 10, 20, 30, 40 DPA se presentó amplificación (Figura 15), lo que coincide con Barbero 2016; Arce et al., 2017; Arce et al., 2019 quienes reportan que el inicio de la biosíntesis de capsaicina sucede alrededor de 10 DPA.

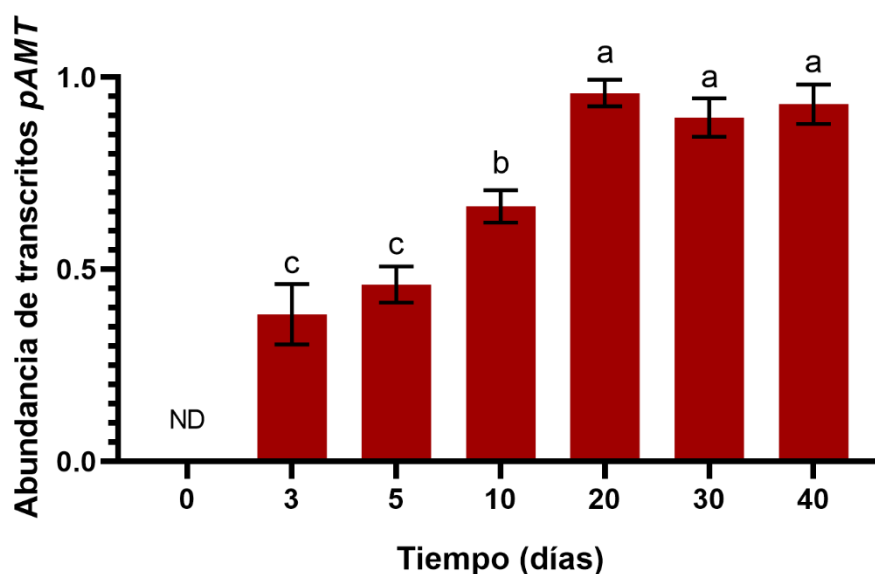


Figura 15 Abundancia de transcritos de *pAMT* de 0 a 40 DPA.

Las barras representan la media de tres réplicas biológicas \pm desviación estándar. Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con una prueba post hoc de Tukey para $p < 0.05$.

Nuestros resultados indican que *pAMT* se expresa a partir del 3 DPA, lo que sugiere una activación temprana de la biosíntesis de capsaicinoides. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han demostrado que la biosíntesis y acumulación de capsaicinoides es altamente sensible a factores ambientales y hormonales (Lindsey & Bosland, 1996; Suresh & Ravishankar, 2005; Gutiérrez-Carbajal et al., 2010). En particular, se ha reportado que CaMYB31, regulador transcripcional clave en la vía de los capsaicinoides, modula la expresión de genes como *Kas* y *pAMT*, lo que sugiere que la activación de esta vía metabólica puede ocurrir en las primeras fases del desarrollo del fruto.

Estudios precedentes han marcado una correlación positiva entre la expresión de *pAMT* y la acumulación de capsaicina en frutos de chile. Esta asociación ha consolidado la hipótesis de que *pAMT* desempeña un papel esencial en la biosíntesis de capsaicinoides (Sano et al., 2022). No obstante, el presente hallazgo de abundancia de *pAMT* con frutos de 3 DPA plantea la activación de la ruta biosintética en etapas más tempranas. Esto sugiere que dicha ruta

podría estar modulada por factores genéticos y ambientales, así como por diferencias entre cultivares y especies que presentan variaciones en la regulación de genes metabólicos. Por lo tanto, resulta importante realizar estudios comparativos entre genotipos para dilucidar los mecanismos específicos que regulan esta expresión en etapas tempranas.

Además, los resultados obtenidos en cuanto a la nula expresión de *pAMT* en hojas (Figura 16) concuerdan con lo reportado por Arce et al (2017), donde se menciona que raíces, tallo y hojas no son productores de capsaicina. Esto refuerza la idea de que *pAMT* es un gen clave en la biosíntesis de capsaicinoides, específicamente en los tejidos placentarios del fruto. Considerando que no se detectó la expresión de *pAMT* en hojas ni en flores que no han sido polinizadas, se sugiere que la polinización podría ser necesaria para la expresión de *pAMT*. Esto concuerda con investigaciones previas en otras especies como el trabajo de Boavida et al. (2011), que demostró cómo las interacciones entre polen y pistilo activan rutas metabólicas y de señalización específicas (señalización de calcio, rutas relacionadas con especies reactivas de oxígeno ROS, regulación hormonal por ácido abscísico ABA, ácido jasmónico JA, auxinas y síntesis de proteínas de señalización extracelular). Es posible que dichos mecanismos disparen genes como *pAMT* tras la polinización, para el caso variedades picantes de *Capsicum*.

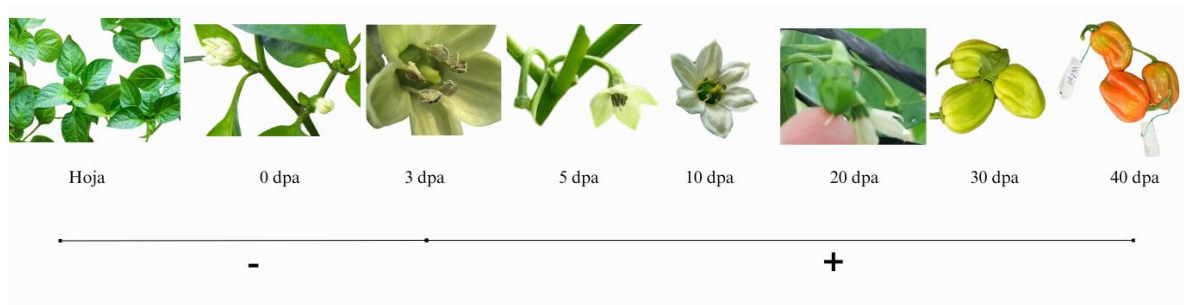


Figura 16 Desarrollo fenológico del chile habanero y su relación con la acumulación de transcritos de *pAMT*

El patrón de abundancia de transcritos de *pAMT* en frutos de chile habanero sugieren que 10 DPA es candidato para el momento de aplicación de tratamiento de dsRpAMT para tener mayor posibilidad que el siRNA se encuentre activo en el periodo de mayor abundancia de

transcritos de *pAMT*. Esto por lo observado en nuestro monitoreo de abundancia de transcritos de *pAMT* y lo reportado por la literatura.

6.4.2 Análisis la abundancia de transcritos del gen *pAMT* en frutos tratados con *dsRpAMT*

La aplicación de *dsRpAMT* se realizó el día 21 de noviembre a las 8 am al pedúnculo en 10 DPA, uno por planta (unidad biológica), en la Figura 17 se muestra la aplicación de los tratamientos.

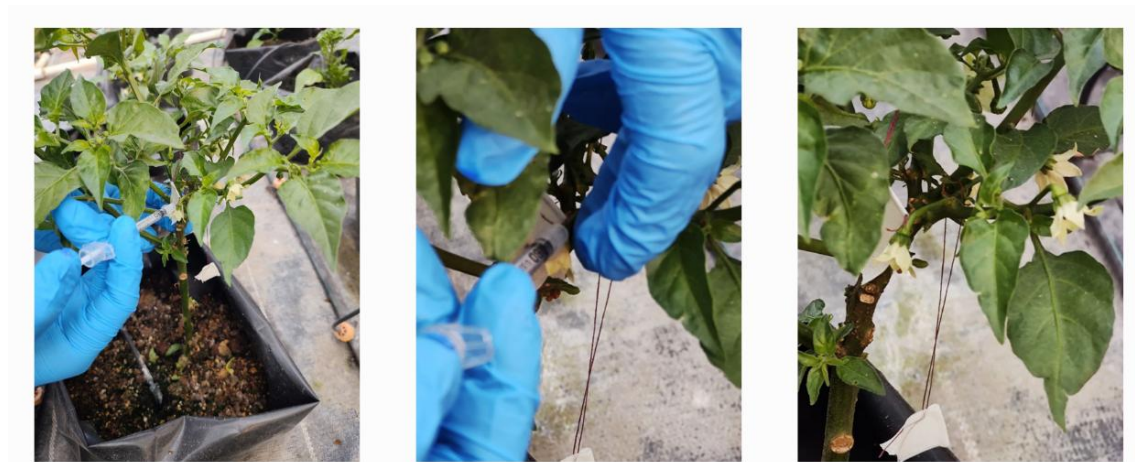


Figura 17 Evidencia fotográfica del momento de inyección en pedúnculos de fruto en 10 DPA.

Los frutos fueron colectados para análisis 10 días post tratamiento, es decir 20 DPA, a las 9 am. Los frutos no presentaron los tamaños esperados con el análisis de la Figura 6 donde en 20 DPA se tienen los promedios de 2.5 cm de longitud y 2.9 de diámetro, mientras que en este tratamiento se tuvieron las medias de 0.3 cm de longitud y 0.3 de diámetro promedio (Tabla 11). La disminución del tamaño de frutos podría estar relacionado a las condiciones ambientales presentadas (Hernández et al., 2012). Debido a que se presentó una baja temperatura por las madrugadas, mientras que las tardes fueron cálidas a finales de noviembre y principios del mes de diciembre y el invernadero no cuenta con calefactor, se colocó un calefactor convencional. Otra posible explicación es que las plantas hayan estado sometidas a estrés por sequía, condición que reduce el tamaño de frutos, pero incrementa la

acumulación de capsaicinoides (Sung et al., 2005; Agyemang Duah et al., 2021). Finalmente, se propone que otro punto de variación en los tamaños de los frutos podría ser daño mecánico generado al inyectar y manipular las flores. La velocidad con la que se inyecta el dsRNA e incluso la profundidad, son factores determinantes en el desarrollo de los frutos como lo sugiere Cedillo-Jiménez (2021) para el uso de dsRNA exógeno en tomate.

Tabla 11 Medidas de frutos post-tratamiento

Tratamiento	Réplica	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Media longitud (cm)*	Media diámetro (cm)*
T1	1	0.3	0.3	0.2±0.03	0.3±0.02
	2	0.2	0.2		
	3	0.3	0.3		
T2	1	0.5	0.4	0.5±0.2	0.4±0.1
	2	0.4	0.3		
	3	0.7	0.5		
T3	1	0.3	0.3	0.3±0.3	0.4±0.1
	2	0.4	0.5		
	3	0.2	0.3		
Control	1	0.3	0.4	0.3±0.06	0.4±0.06
	2	0.2	0.3		
	3	0.3	0.4		

*La dispersión de los datos se indica por la desviación estándar.

En la Figura 18 se muestra la dimensión de los frutos del triplicado biológico para cada uno de los tratamientos y el control. Se realizó ANOVA con un valor $\alpha=0.05$ y Tukey & Kramer con un valor $p<0.05$ para los datos de longitud y diámetro promedio de las muestras postratamiento. Obteniendo un valor $p = 0.0310$ para la longitud de los frutos con 20 DPA, mientras que para el diámetro el valor $p = 0.2683$. Por lo cual, podemos resaltar que el T2 100 pmol presentó diferencias estadísticamente significativas en la longitud con respecto a los demás tratamientos y los frutos control.



Figura 18 Tamaño de frutos de cada uno de los tratamientos y control en la parte inferior del triplicado biológico se muestra una banda de 1 cm para escalar el tamaño presentado.

Se extrajo RNA de los frutos y se obtuvieron los resultados de absorbancia y concentración de ácidos nucleicos en la Tabla 12.

Tabla 12 Concentraciones de RNA relaciones de absorbancia a 260/230 y 260/280 nm

Tratamiento	Replica	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	260/230	260/280	Media 260/230*	Media 260/280*
T1	1	76.3	1.54	2.07	1.57 \pm 0.03	2.08 \pm 0.06
	2	69.1	1.58	2.03		
	3	206	1.59	2.15		
T2	1	64.1	1.41	2.13	1.90 \pm 0.43	1.90 \pm 0.43
	2	282	2.2	2.22		
	3	1.5	2.08	2.1		
T3	1	21.5	1.8	2.01	1.58 \pm 2.01	2.01 \pm 0.02
	2	30.9	1.4	1.99		
	3	66.5	1.53	2.02		
Control	1	64.2	1.69	2.02	1.79 \pm 0.16	1.99 \pm 0.06
	2	99.4	1.98	2.04		
	3	26.5	1.7	1.92		

*La dispersión de los datos se indica por la desviación estándar.

Aunque los valores de concentración y calidad de la extracción fueron inferiores a lo esperado tras las extracciones previas (0 a 40 DPA) para análisis de PCR, no se realizó

limpieza para no reducir la concentración de RNA presente. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para visualizar la integridad del RNA (Figura 19).

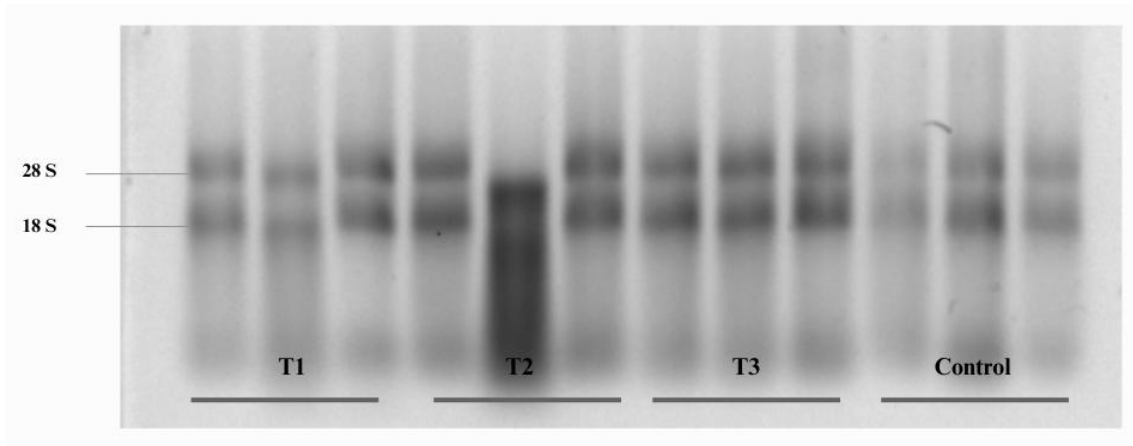


Figura 19 Gel de electroforesis de las muestras de RNA experimentales. Se observan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (rRNA) 18S (banda inferior) y 28S (banda superior), evidenciando la integridad del RNA. Además, se visualiza una banda difusa de RNA de menor tamaño. Se muestra triplicado biológico.

Se ajustó la concentración de RNA a 230 ng/ μ L para la retrotranscripción y se realizó PCR para β -actina y *pAMT* en los tratamientos y control (Figura 20).

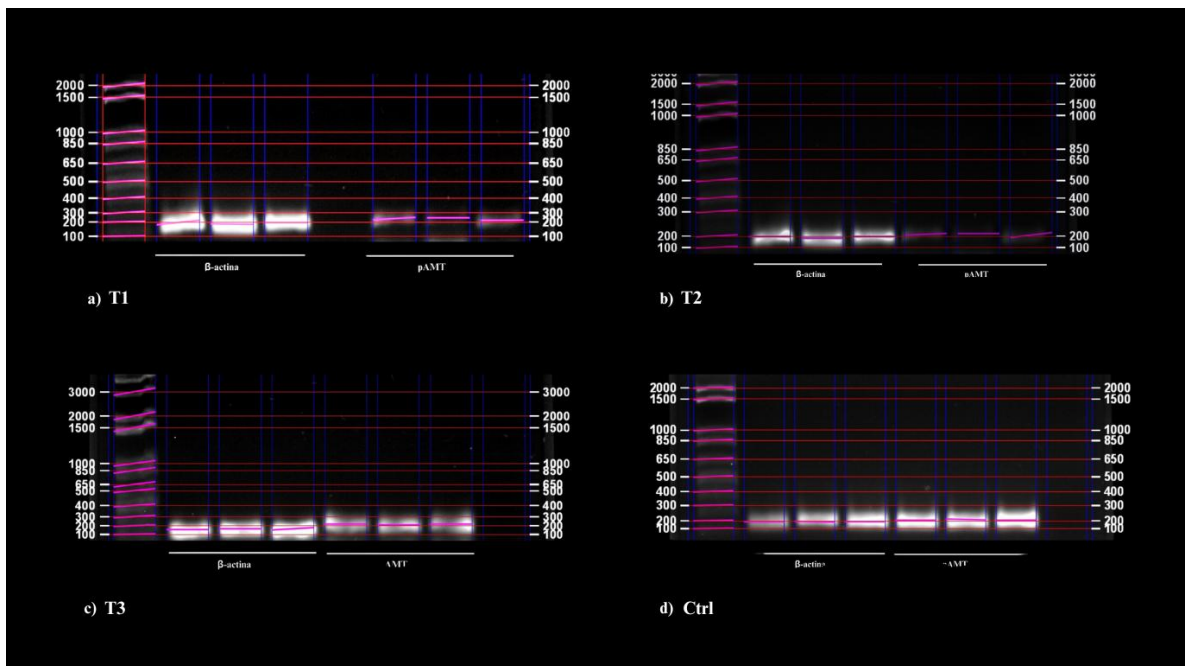


Figura 20 Amplificación β -actina con un tamaño aproximado de 298 pb y *pAMT* con un peso aproximado de 210 pb a) T1, b) T2 c) T3 y d) control.

Se realizó la densitometría para el análisis de abundancia del transcrito de pAMT (Figura21).

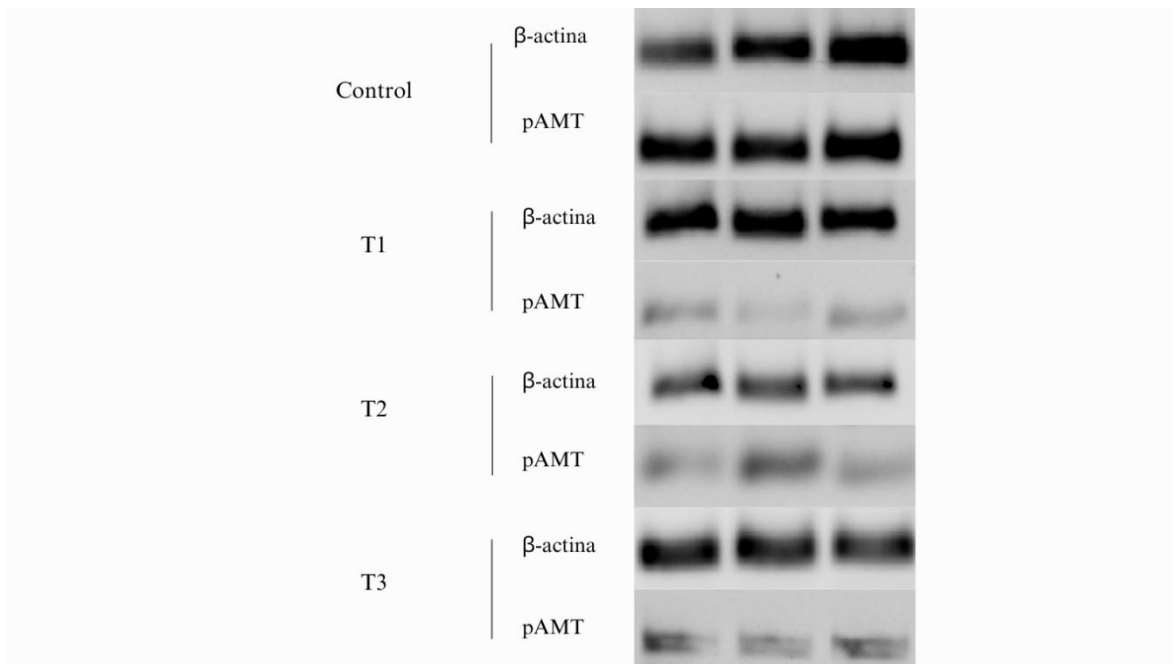


Figura 21 Análisis molecular post-aplicación de dsRNA para amplicón de pAMT y β -actina. Se muestra control y los tratamientos.

Los valores obtenidos para la densitometría se presentan en la sección de anexos (Tabla 14), se realizó análisis estadístico ANOVA $\alpha=0.05$ y prueba de Tukey-Kramer con un $p<0.05$ y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento T1 y el control con un valor de $p= 0.0247$ (Tabla 13).

Tabla 13 Resultados del análisis estadístico para abundancia de pAMT.

Tratamiento	Letras de significancia	Media*
T1	C	0.0775 \pm 0.0120
T2	B	0.4373 \pm 0.0582
T3	B	0.5006 \pm 0.0535
Control	A	0.7046 \pm 0.0748

*La dispersión de los datos se indica por la desviación estándar.

El grupo control fue estadísticamente diferente del tratamiento T1, mientras que los tratamientos T2 y T3 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos,

pero si con respecto al grupo control y T1. Se observó una reducción de abundancia de transcritos de *pAMT* del 88.99% (T1), 37.93% (T2) y 28.94% (T3) comparados con el grupo control. (Figura 22).

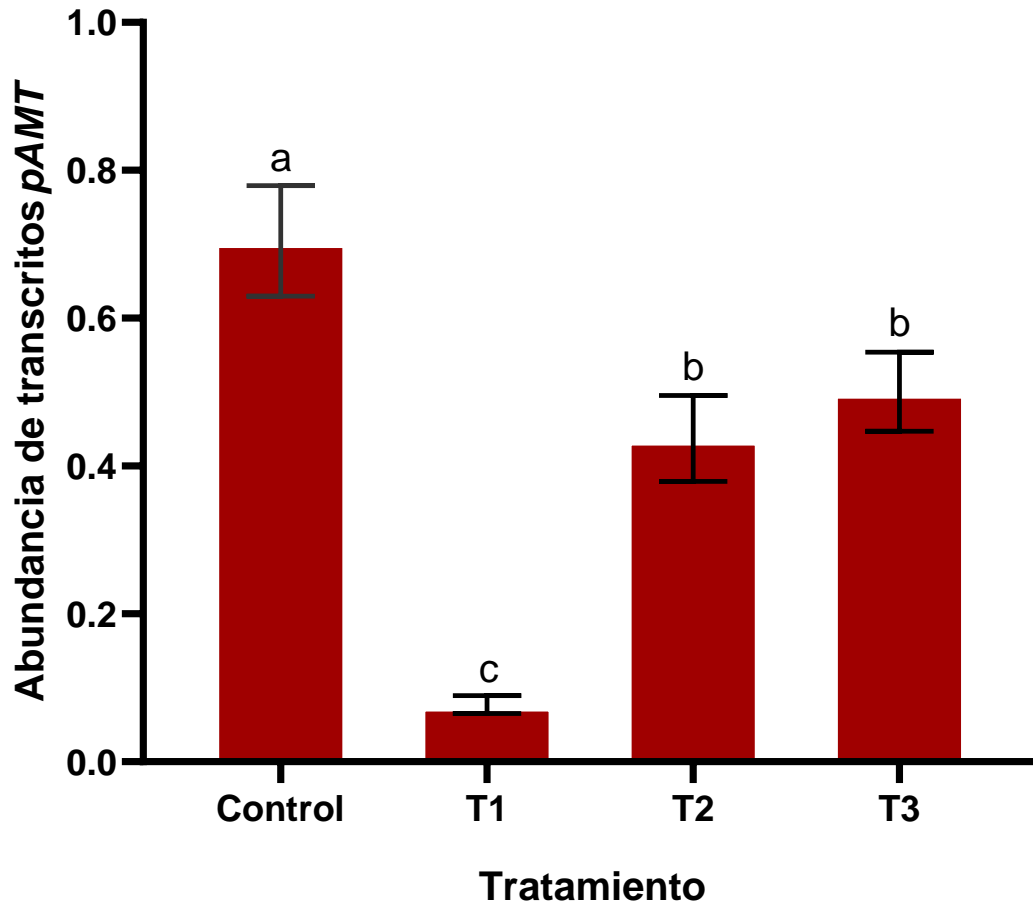


Figura 22 Análisis del nivel de abundancia de transcritos de *pAMT* en tratamientos y grupo control. Las barras representan la media de tres réplicas biológicas \pm desviación estándar. Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con una prueba post hoc de Tukey para $p < 0.05$

Los resultados muestran que el tratamiento con mayor concentración de dsRpAMT T1:1000 pmol presentó una reducción significativa en la expresión de *pAMT*, mientras que T2 y T3 no presentaron diferencias significativas entre ellos, sugiriendo que la concentración es suficiente para inducir la reducción de transcritos, mostrando así un comportamiento dosis-dependiente, siendo consistentes con la literatura sobre la aplicación de RNAi en plantas (Cedillo 2021), resaltando así la importancia de optimizar la concentración de dsRNA.

Estos hallazgos también refuerzan la viabilidad del uso de dsRNA desnudo para el silenciamiento de genes endógenos en plantas. A pesar de que el dsRNA no se combinó con ningún agente protector, la inyección de *dsRpAMT* logró reducir los niveles de transcritos de manera efectiva. Esto resulta relevante, ya que demuestra que la aplicación directa de dsRNA puede inducir silenciamiento génico sin la necesidad de vectores virales o nanopartículas como se ha sugerido en estudios previos (Li et al., 2015; Warnock et al., 2016; Kiselev et al., 2019).

Trabajos anteriores han reportado efectos similares con dsRNA en otras especies. Por ejemplo, Warnock et al. (2016) demostraron que el silenciamiento de *STP1* y *STP2*, genes responsables del transporte de azúcar hacia los exudados radiculares en tomate, redujo significativamente los niveles de glucosa y fructosa. Esta disminución afectó la interacción con *Meloidogyne incógnita*, reduciendo la infectividad del nematodo y la actividad de su estilete.

Asimismo, Li et al. (2015) evidenciaron que la inmersión de raíces en una solución con *dsMob1A* en *Arabidopsis thaliana*, provocó una disminución significativa en la longitud y número de raíces, confirmando la absorción del dsRNA y la efectividad del silenciamiento. En arroz, un procedimiento similar con *dsActin* también afectó el crecimiento de las plantas, reforzando la idea de que el dsRNA desnudo puede ser absorbido y ejercer su función sin necesidad de métodos de entrega adicionales.

Otro estudio clave en este campo es el de Kiselev et al. (2021), quienes lograron el silenciamiento de genes involucrado en la biosíntesis de antocianinas, como la chalcona sintasa y los factores de transcripción *MYBL2* y *ANAC032*. La aplicación de dsRNA dirigido a *AtMYBL2* en *A. thaliana* aumentó la producción de antocianinas, mientras que el rastreo con microscopía de escaneo láser demostró la absorción y movimiento de *dsRNA-AtCHS* marcado con Cy3 a través de los vasos foliares, el parénquima foliar y los estomas, evidenciando su diseminación a lo largo de la hoja y células individuales.

En conjunto, estos estudios y nuestros resultados destacan que el dsRNA desnudo puede ser una estrategia viable para el silenciamiento de genes en plantas sin necesidad de

transportadores adicionales. Sin embargo, para mejorar la consistencia de los efectos observados, es fundamental optimizar variables como la concentración de dsRNA, el método de aplicación y las condiciones experimentales, con el fin de reducir la variabilidad en los tratamientos y obtener resultados más homogéneos.

Por su parte, la concentración de dsRNA aplicado ha sido evaluado con anterioridad como Cedillo-Jiménez (2021)

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo de investigación se evaluó la aplicación de una solución de dsRNA diseñada antisentido a una región del transcrito del gen *pAMT* lo que resultó en la reducción de la abundancia de transcritos de *pAMT* en frutos de chile habanero. Se encontró que el tratamiento T1 1000, T2 100 y T3 10 pmol de dsRNA redujeron significativamente la expresión del gen *pAMT* en comparación con las plantas control.

Estos resultados confirman que el dsRNA diseñado tuvo un efecto inhibición efectiva sobre la abundancia de transcritos de *pAMT*, por lo cual se acepta la hipótesis planteada. Además, estos hallazgos subrayan el potencial de silenciamiento génico mediado por RNAi como una herramienta viable para modificar la producción de metabolitos secundarios en plantas, lo cual es un primer paso para desarrollar estrategias biotecnológicas orientadas al manejo de la biosíntesis de capsaicinoides y capsinoides lo cual tiene importancia económica, farmacéutica y agroindustrial.

Futuras investigaciones son necesarias para conocer el potencial off-target del dsRNA aplicado a nivel ambiental, es decir, que no haya silenciamiento en genes homólogos en otras especies presentes en el ecosistema (plantas, animales, microorganismos), mejorar la aplicación de dsRNA y el análisis de la acumulación de metabolitos objetivo que son capsaicina, capsiato y dihidrocapsaicina mediante postratamiento.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amador-Ramírez, M. D., Ramírez-Luna, J. L., & Medina-Lara, F. (2014). Efecto de productos con reguladores de crecimiento sobre la floración y amarre de fruto en chile 'Habanero'. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(2), 191-202. Recuperado de [Revista Chapingo Serie Horticultura](#)
- Arce-Rodríguez ML, Ochoa-Alejo N (2017) An R2R3-MYB transcription factor regulates capsaicinoid biosynthesis. *Plant Physiol* 174(3):1359–1370. DOI: [10.1104/pp.17.00506](https://doi.org/10.1104/pp.17.00506)
- Arce-Rodríguez ML, Ochoa-Alejo N (2019) Biochemistry and molecular biology of capsaicinoid biosynthesis: recent advances and perspectives. *Plant Cell Rep* 38:1017–1030. DOI: [10.1007/s00299-019-02406-0](https://doi.org/10.1007/s00299-019-02406-0)
- Arellano-Ordoñez, Cedillo-Jiménez. (2023). Diseño de RNA interferente a *pAMT* en chile habanero para reducir la biosíntesis de capsaicina. XVII Coloquio de Posgrado de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Querétaro, Santiago de Querétaro, México.
- Aza-González C, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2011) Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Rep* 30:695–706. DOI: [10.1007/s00299-010-0968-8](https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8)
- Aza-González C, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2011) Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Rep* 30(5):695–706. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>
- Balbaa SI, Karawya MS, Girgis AN (1968) The capsaicin alkaloid content of *Capsicum* fruits at different stages of maturity. *Lloydia* 31:272–274
- Barbero, G.F., de Aguiar, A.C., Carrera, C., Olachea, Á., Ferreiro-González, M., Martínez, J., & Barroso, C.G. (2016). Evolution of capsaicinoids in pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) during fruit ripening. *Chemistry & biodiversity*, 13(8), 1068-1075. DOI: 10.1002/cbdv.201500503
- Baulcombe, D. (2004): «RNA silencing in plants», *Nature*, vol. 431, pp. 356-363. DOI: [10.1038/nature02874](https://doi.org/10.1038/nature02874)

- Boavida, L. C., Borges, F., Becker, J. D., & Feijo, J. A. (2011). Whole Genome Analysis of Gene Expression Reveals Coordinated Activation of Signaling and Metabolic Pathways during Pollen-Pistil Interactions in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 155(4), 2066–2080. DOI: [10.1104/pp.110.169813](https://doi.org/10.1104/pp.110.169813)
- Burke Miller. (2013). Tratamiento de la disfagia faríngea oral. (Patente Europea 2 430 043). OEPM. Oficina Española de Patentes y Marcas. Recuperado de [ES2430043T3 - Tratamiento de la disfagia faríngea oral - Google Patents](https://www.google.com/patents/ES2430043T3)
- Cedillo-Jiménez, C. (2021). Silenciamiento génico en el desarrollo de fruto por aplicación de RNA bicatenario exógeno en plantas de tomate. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional DGSBDI-UAQ. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/3316>
- Chapa-Oliver A, Mejía-Teniente L (2016) Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules* 21:931–945. <https://doi.org/10.3390/molecules21080931>
- Chávez, D. V. G. (2023). Determinación de la actividad promotora de crecimiento del chile *Capsicum annum* L. productor de capsiato. [Tesis maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional DGSBDI-UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/7826>
- Cong, B., Barrero, L. S. Y Tanksley, S. D. 2008. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nat Genet.* 40(6): 800-804. DOI: [10.1038/ng.144](https://doi.org/10.1038/ng.144)
- Contreras-Padilla M, E M Yahia (1998) Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 46:2075-2079. DOI: [10.1021/jf970972z](https://doi.org/10.1021/jf970972z)
- Csorba, T., Pantaleo, V., & Burgyán, J. (2009). RNA silencing: an antiviral mechanism. *Advances in Virus Research*, 75, 35-71. DOI: [10.1016/S0065-3527\(09\)07502-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07502-1). Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)07502-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07502-2)
- Dadami, E.; Dalakouras, A.; Zwiebel, M.; Krczal, G.; Wassenegger, M. An endogene-resembling transgene is resistant to DNA methylation and systemic silencing. *RNA Biol.* 2014, 11, 934–941. DOI: [10.4161/rna.29623](https://doi.org/10.4161/rna.29623)
- Dadami, E.; Moser, M.; Zwiebel, M.; Krczal, G.; Wassenegger, M.; Dalakouras, A. An endogene-resembling transgene delays the onset of silencing and limits siRNA accumulation. *FEBS Lett.* 2013, 18, 706–710. DOI: [10.1016/j.febslet.2013.01.045](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.045)
- Dalakouras, A.; Wassenegger, M.; McMillan, J.N.; Cardoza, V.; Maegele, I.; Dadami, E.; Runne, M.; Krczal, G.; Wassenegger, M. Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of in vitro-synthesized small RNAs. Recuperado de <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01327>

- defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: an emerging application in sustainable agriculture. *J Biotechnol* 361:12–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.11.009>
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 2006;313:68-71. DOI: [10.1126/science.1128214](https://doi.org/10.1126/science.1128214)
- Ding, S. W., & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3), 413-426. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039>
- Dubrovina, A.S.; Aleynova, O.A.; Kalachev, A.V.; Suprun, A.R.; Ogneva, Z.V.; Kiselev, K.V. Induction of transgene suppression in plants via external application of synthetic dsRNA. *PubMed* 2019, 20, 1585. DOI: [10.3390/ijms20071585](https://doi.org/10.3390/ijms20071585)
- Dubrovina, A.S.; Aleynova, O.A.; Suprun, A.R.; Ogneva, Z.V.; Kiselev, K.V. Transgene suppression in plants by foliar application of in vitro-synthesized small interfering RNAs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 104, 2125–2135. DOI: [10.1007/s00253-020-10355-y](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10355-y)
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat Genet* 2006;38: 258-263. DOI: [10.1038/ng1722](https://doi.org/10.1038/ng1722)
- Endress, R.; Jager, A. y Kreis, R. W Dunoyer. 1984. Catecholamine biosynthesis dependent on the dark in betacyanin *Portulaca* callus. *J. Plant Physiol.* 115:291- 295. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(84\)80101-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(84)80101-7)
- Fiallo Olivé, E. (2012). *revista cubana de ciencias biológicas silenciamiento génico postranscripcional: Mecanismo de defensa antiviral en plantas. 1*, 19–28. <http://ojs.uh.cu/RCCB/>
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391: 806-811. DOI: [10.1038/35888](https://doi.org/10.1038/35888)
- García, N. (2018). *Actividad biológica de los principales compuestos bioactivos presentes en Capsicum sp* [Universitat de les Illes Balears]. <http://hdl.handle.net/11201/147267>
- García-Galindo H, J Ortega-Martínez, M García-Rosales, C Martí-nez, C Beristáin(1995) La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológico. *Ciencia* 46:84-102.
- Gebremichael, D.E.; Haile, Z.M.; Negrini, F.; Sabbadini, S.; Capriotti, L.; Mezzetti, B.; Baraldi, E. RNA Interference Strategies for Future Management of Plant Pathogenic Fungi: Prospects and Challenges. *Plants* 2021, 10, 650.
- Ghosh, P., R. Dullea, J. E. Fischer, T. G. Turi, R. W. Sarver, C. Zhang, K. Basu, S. K. Das, and B. W. Poland. 2009. Comparing 2-nt 3' overhangs against blunt-ended siRNAs: A

- systems biology based study. *BMC Genomics*. 10:1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-S1-S17>
- Goldbach, R.; E. Bucher y M. Prins (2003): «Resistance mechanisms to plant viruses: an overview», *Virus Research*, vol. 92, pp. 207-212. DOI: [10.1016/s0168-1702\(02\)00353-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00353-2)
- González, E., Casanova, C., Gutiérrez, P., Torres, T., Contreras, M., Peraza, S, S. (2010). Chiles cultivados en Yucatán. CICY, CONABIO, SEDUMA:342-344.
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Res*. 2008
- Gu X, Liu L and Zhang H (2021) Transgene-free Genome Editing in Plants. *Front. Genome Ed*. 3:805317. doi: 10.3389/fgeed.2021.805317. DOI [10.3389/fgeed.2021.805317](https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.805317)
- Gurung T, Techawongstien S, Suriharn B, Techawongstien S (2011) Impact of environments on the accumulation of Capsaicinoids in *Capsicum* spp. *HortScience* 46(12):1576–1581. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.12.1576>
- Gutiérrez-Carbajal MG, Monforte-González M, Miranda-Ham ML, Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota F (2010) Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyljasmonate. *Biol Plant* 54: 430–434. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0078-z>
- Hagimori, M.; Takashi, M. y Obi, R. Y. 1982. Studies on the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture; 2: Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiol*. 69:653-656. DOI: [10.1104/pp.69.3.653](https://doi.org/10.1104/pp.69.3.653)
- Hamed M, Kalita D, Bartolo ME, Jayanty SS (2019) Capsaicinoids, polyphenols and antioxidant activities of *Capsicum annuum*: comparative study of the effect of ripening stage and cooking methods. *Antioxidants* 8(9):364. <https://doi.org/10.3390/antiox8090364>
- Hamilton, A.J. y D.C. Baulcombe (1999): «A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants», *Science*, vol. 286, pp. 950-952. Hayman M, Kam P (2008) Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. *Curr Anaesth Crit Care* 19:338–343. DOI: [10.1126/science.286.5441.950](https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950)
- Jaskiewicz L, Filipowicz W. Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;320: 77-97. DOI: [10.1007/978-3-540-75157-1_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75157-1_4)
- Jones, L.; F. Ratcliff y D.C. Baulcombe (2001): «RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance», *Current Biology*, vol. 11, pp. 747-757. DOI: [10.1016/s0960-9822\(01\)00226-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00226-3)

- Kaur S, Tiwari V, Kumari A, Chaudhary E, Sharma A, Ali U, Garg M (2023) Protective and Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: an emerging application in sustainable agriculture. *J Biotechnol* 361:12–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.11.009>
- Kiselev, K. V., Suprun, A. R., Aleynova, O. A., Ogneva, Z. V., & Dubrovina, A. S. (2024). Simultaneous Application of Several Exogenous dsRNAs for the Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 13(4), 541. DOI: [10.3390/plants13040541](https://doi.org/10.3390/plants13040541)
- Kiselev, K.V.; Suprun, A.R.; Aleynova, O.A.; Ogneva, Z.V.; Kalachev, A.V.; Dubrovina, A. S. External dsRNA Down-Regulates Anthocyanin Biosynthesis-Related Genes and Affects Anthocyanin Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6749. <https://doi.org/10.3390/ijms22136749>
- Koch, A.; Wassenegger, M. Host-induced gene silencing-mechanisms and applications. *New Phytol.* 202. DOI: [10.1111/nph.17364](https://doi.org/10.1111/nph.17364)
- Lindsey K, M Yeoman(1984) The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum* immobilised in reticulate polyurethane. *J. Exp. Bot.* 35:1684-1696 . DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/35.11.1684>
- Lipskii, A. Kh. y Chernyak, N. D. 1983. Effect of temperature on a cell culture of *Dioscorea deltoidea* wall during submerged cultivation. *Sov. Plant Physiol.* 30:329-337.
- Lorkovic Z.J., U. Naumann, A. J.M. Matzke, M. Matzke. (2012). Involvement of a GHKL ATPase in RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 22: 933–938. DOI: [10.1016/j.cub.2012.03.061](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.061)
- Loyola-Vargas, V. M. 1984. Obtención de productos secundarios de interés farmacológico en cultivo de tejidos; 1: Consideraciones generales y proposición de un modelo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 14:26-36. Recuperado de <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1658>
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY: Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25:1307-1313. DOI: [10.1038/nbt1352](https://doi.org/10.1038/nbt1352)
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A. y López-Gúzman, G.G. (2017). Postharvest fruits: maturation and biochemical changes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(19), 4075-4087. DOI: [10.17660/j.scienta.2006.12.029](https://doi.org/10.17660/j.scienta.2006.12.029).
- Mathews DH, Disney MD, Childs JL, Schroeder SJ, Zuker M, Turner DH. (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19):7287-92

- Mejía-Teniente L, Durán-Flores FDD, Chapa-Oliver AM, Torres-Pacheco I, Cruz-Hernández A, González-Chavira MM, Ocampo-Velázquez RV, Guevara-González RG (2013) Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *Int J Mol Sci* 14:10178–10196. <https://doi.org/10.3390/ijms140510178>
- Mette, M.F. et al. (2000): «Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA», *EMBO Journal*, vol. 19, pp. 5194-5201.
- Mitter, N.; Worrall, E.A.; Robinson, K.E.; Li, P.; Jain, R.G.; Taochy, C.; Fletcher, S.J.; Carroll, B.J.; Lu, G.Q.; Xu, Z.P. (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat. Plants*, 3, 16207. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Morozov, S.Y.; Solovyev, A.G.; Kalinina, N.O.; Taliansky, M.E. Double-stranded RNAs in plant protection against pathogenic organisms and viruses in agriculture. *Acta Nat.* 2019, 11, 13–21.
- Mueckstein, U, H. Tafer, J. Hackermueller, S.H. Bernhart, P.F. Stadler, and I.L. Hofacker "Thermodynamics of RNA-RNA Binding." *Bioinformatics*, 22(10), pp 1177-1182, 2006
- Nakaniwa, R., Misawa, Y., Nakasato, S., Sano, K., Tanaka, Y., Nakatani, S., & Kobata, K. (2023). Biochemical Aspects of Putative Aminotransferase Responsible for Converting Vanillin to Vanillylamine in the Capsaicinoid Biosynthesis Pathway in Capsicum Plants.. *Journal of agricultural and food chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c07369>.
- Noh-Medina, J., Borges-Gómez, L. y M. Soria-Fregoso. (2010). Composición nutrimental de biomasa y tejidos conductores en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 12, 219-228. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93913070003>
- Numata, K.; Ohtani, M.; Yoshizumi, T.; Demura, T.; Kodama, Y. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. *Plant Biotechnol. J.* 2014, 12, 1027–1034. DOI: [10.1111/pbi.12208](https://doi.org/10.1111/pbi.12208)
- Ochoa-Alejo N, R Ramírez-Malagón (2001) In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:701-729 Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0121-z>
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745-760. DOI: [10.1038/nrmicro3120](https://doi.org/10.1038/nrmicro3120)
- Ramegowda, V.; Mysore, K.S.; Senthil-Kumar, M. Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unraveling the functional relevance of multiple abiotic-stress-responsive genes in crop plants. *Front. Plant Sci.* 2014, 5, 323. DOI: [10.3389/fpls.2014.00323](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00323)

- Ramírez, J. G., B. W, Avilés., E. R. Dzip. 2006. Áreas con Potencial Productivo para Chile Habanero (*Capsicum chinense*, Jacq) en el Estado de Yucatán. En: Primera Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. INIFAP, COFUPRO, CICY, AMEAS y OTRAS INSTITUCIONES. Mérida, Yucatán, Mexico. 66 pag.
- Reyes, J.; Oropeza, C.; Robert, M. L.; Ríos, P.; Alpízar, L.; Robles, M. L. y Lo yola Vargas, V. M. 1985. Alkaloids in *Catharantus roseus* cultures. *Plant Cell Reports* 3:262-265
- Salomon W, Bullock K, Lapierre J, Pavco P, Woolf T, Kamens J. Modified dsRNAs that are not processed by Dicer maintain potency and are incorporated into the RISC. *Nucleic Acids Res* 2010;38: 3771-3779. DOI: [10.1093/nar/gkq055](https://doi.org/10.1093/nar/gkq055)
- Sano, K., Uzawa, Y., Kaneshima, I. *et al.* Vanillin reduction in the biosynthetic pathway of capsiate, a non-pungent component of *Capsicum* fruits, is catalyzed by cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Sci Rep* 12, 12384 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16150-1>
- Sharma, S. K., Vij, A. S., & Sharma, M. (2013). Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European journal of pharmacology*, 720(1-3), 55-62. DOI: [10.1016/j.ejphar.2013.10.053](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.053)
- Snitker, S., Fujishima, Y., Shen, H., Ott, S., Pi-Sunyer, X., Furuhata, Y., ... & Takahashi, M. (2008). Effects of novel capsinoid treatment on fatness and energy metabolism in humans: possible pharmacogenetic implications-. *The American journal of clinical nutrition*, 89(1), 45- 50. DOI: [10.3945/ajcn.2008.26561](https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26561)
- Srivastava, A., KN, P., Baliyan, N., & Mangal, M. (2024). Capsaicin: Its Sources, Isolation, Quantitative Analysis and Applications. In *Capsaicinoids: From Natural Sources to Biosynthesis and their Clinical Applications* (pp. 25-53). Singapore: Springer Nature Singapore. Recuperado de https://doi.org/10.1007/978-981-99-7779-6_2
- Stewart Jr C, M Mazourek, G M Stellari, M O'Connell, M Jahn(2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* Jacq via the Pun1locus. *J. Exp. Bot.* 58:979- 991. DOI: [10.1093/jxb/erl243](https://doi.org/10.1093/jxb/erl243)
- Suprun, A.R.; Kiselev, K.V.; Dubrovina, A.S. Exogenously Induced Silencing of Four MYB Transcription Repressor Genes and Activation of Anthocyanin Accumulation in *Solanum lycopersicum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 9344. <https://doi.org/10.3390/ijms24119344>
- Suresh B, Ravishankar GA (2005) Methyl jasmonate modulated biotransformation of phenylpropanoids to vanillin related metabolites using *Capsicum frutescens* root cultures. *Plant Physiol Biochem* 43: 125–131. DOI: [10.1016/j.plaphy.2005.01.006](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.006)
- Sutoh K, K Kobata, S Yazawa, T Watanabe(2006) Capsaicinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annum* L. cv. CH-19 sweet. *Biosci. Biotech-nol. Biochem.* 70:1513-1516 Recuperado de <https://doi.org/10.1271/bbb.50665>

- Szabat M, Kierzek R. Parallel-stranded DNA and RNA duplexes - structural features and potential applications. *FEBS J.* 2017 Dec;284(23):3986-3998. doi: 10.1111/febs.14187. Epub 2017 Aug 22. PMID: 28771935. DOI: [10.1111/febs.14187](https://doi.org/10.1111/febs.14187)
- Tewksbury, J. J., Reagan, K. M., Machnicki, N. J., Carlo, T. A., Haak, D. C., Peñaloza, A. L. C., & Levey, D. J. (2008). Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11808-11811. DOI: [10.1073/pnas.0802691105](https://doi.org/10.1073/pnas.0802691105)
- Tsurumaki, K., & Sasanuma, T. (2019). Discovery of novel unfunctional *pAMT* allele *pAMT10* causing loss of pungency in sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Breeding Science*, 69(1), 133-142. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.18150>
- Vázquez-Flota, F., de Lourdes Miranda-Ham, M., Monforte-González, M., Gutiérrez Carbajal, G., & Velázquez-García Yuriana Nieto-Pelayo, C. (2007). LA BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES, EL PRINCIPIO PICANTE DEL CHILE BIOSYNTHESIS OF CAPSAICINOIDS, THE PUNGENT PRINCIPLE OF PEPPERS. In Artículo de Revisión *Rev. Fitotec. Mex* (Vol. 30, Issue 4)
- Veloso, J., Prego, C., Vagorela, M. M., Carballeira, R., Bernal, A., Merino, F., & Díaz, J. (2014). Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology*, 16(1), 177-185. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10261/316419>
- Vermeersch, L.; De Winne, N.; Depicker, A. Introns reduce transitivity proportionally to their length, suggesting that silencing spreads along the pre-mRNA. *Plant J.* 2010, 64, 392–401. DOI: [10.1111/j.1365-313x.2010.04335.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04335.x)
- Villa C. M., E. A. Catalán V., M. A. Inzunza I. A. Román L. y H. Macías R. 2013. Podas y bioestimulantes en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo condiciones de invernadero. *Memorias del XXXVIII Congreso de la SMCS, A.C.* pp. 336-340. 45
- Wang J, Liu Y, Tang B, Dai X, Xie L, Liu F and Zou X (2020) Genome-Wide Identification and Capsaicinoid Biosynthesis-Related Expression Analysis of the *R2R3-MYB* Gene Family in *Capsicum annuum* L. *Front. Genet.* 11:598183. Recuperado de <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.598183>
- Wang, M., and H Jin 2017. Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends Microbiol.* 25:4-6. DOI: 10.1016/j.tim.2016.11.011. Available from: <https://DOI.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
- Wang, M., N. Thomas, and H. Jin 2017. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post- harvest plant protection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38:133-141 DOI:10.1016/j.pbi.2017.05.003 Available form: <https://DOI.org/10.1016/j.pbi.2017.05.003>
- Warnock, N.D.; Wilson, L.; CanetwaPerez, J.V.; Fleming, T.; Fleming, C.C.; Maule, A.G.; Dalzell, J.J. Exogenous RNA interference exposes contrasting roles for sugar exudation

- in host-finding by plant pathogens. *Int. J. Parasitol.* 2016, 46, 473–477 DOI: [10.1016/j.ijpara.2016.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.02.005)
- Waterhouse PM, Fusaro AF. Plant science. Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Science* 2006; 313: 54-55. DOI: [10.1126/science.1130818](https://doi.org/10.1126/science.1130818)
- Waterhouse PM, Helliwell CA. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 2003;4: 29-38. DOI: [10.1038/nrg982](https://doi.org/10.1038/nrg982)
- Xinbin Dai and Patrick X. Zhao (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* 39(Web Server issue):W155-9. DOI: [10.1093/nar/gkr319](https://doi.org/10.1093/nar/gkr319)
- Xinbin Dai, Zhaohong Zhuang and Patrick X. Zhao (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*. DOI: [10.1093/nar/gky316](https://doi.org/10.1093/nar/gky316)
- Yumiko, T., Tatsuo, W., M, Kamei, M., M., Kato., K., Yanae. (2013). Uso de capsicinoides para el tratamiento de la arteriosclerosis. (Patente Europea 2 441 570). OEPM. Oficina Española de Patentes y Marcas. Recuperado de [ES2441570T3 - Uso de capsinoides para el tratamiento de la arteriosclerosis - Google Patents](https://patents.google.com/patent/ES2441570T3)
- Zhu Z, Sun B, Cai W, Zhou X, Mao Y, Chen C et al (2019) Natural variations in the MYB transcription factor MYB31 determine the evolution of extremely pungent peppers. *New Phytol*223(2):922–938. <https://doi.org/10.1111/nph.15853>

9. ANEXOS

Tabla 14 Datos de densitometría de las muestras (0-40 DPA) de RNA en gel de electroforesis

Gen	Tiempo	Réplica	Área	Normalización	Media
<i>pAMT</i>	3	1	6810.782	0.298	0.383±0.078
		2	8989.167	0.397	
		3	9247.874	0.454	
β-actina	3	1	22818.995		
		2	22636.560		
		3	20351.217		
<i>pAMT</i>	5	1	10071.518	0.440	0.460±0.047
		2	9893.518	0.426	
		3	10689.125	0.514	
β-actina	5	1	22862.510		
		2	23192.439		
		3	20787.924		
<i>pAMT</i>	10	1	15258.175	0.675	0.664±0.042
		2	13920.933	0.618	
		3	14174.368	0.700	
β-actina	10	1	22592.995		
		2	22525.560		
		3	20245.217		
<i>pAMT</i>	20	1	19099.296	0.998	0.959±0.034
		2	17563.125	0.931	
		3	20019.660	0.946	
β-actina	20	1	19126.045		
		2	18846.045		
		3	21141.874		
<i>pAMT</i>	30	1	17945.803	0.850	0.895±0.050

		2	18714.610	0.885	
		3	18038.116	0.949	
β-actina	30	1	21092.640		
		2	21131.660		
		3	18994.731		
<i>pAMT</i>	40	1	23057.581	0.980	
		2	22168.945	0.931	
		3	18034.752	0.878	0.930±0.051
β-actina	40	1	23506.803		
		2	23808.731		
		3	20535.288		

Tabla 15 Datos de densitometría de RNA en electroforesis de los tratamientos

Gen	Tiempo	Réplica	Área	Normalización	Media
<i>pAMT</i>		1	3065.714	0.069	
	T1	2	3185.350	0.071	0.077±0.012
		3	3843.250	0.091	
β-actina		1	43999.643		
	T1	2	44565.116		
		3	42054.229		
<i>pAMT</i>		1	29248.785	0.755	
	T2	2	20585.350	0.051	0.484±0.379
		3	21001.593	0.646	
β-actina		1	35376.664		
	T2	2	38698.078		
		3	401440.35		
<i>pAMT</i>		1	22596.095	0.531	
	T3	2	23261.146	0.531	0.500±0.0535
		3	20801.459	0.438	

β-actina	T3	1	42501.279		
		2	43765.673		
		3	47394.551		
<hr/>					
<i>pAMT</i>	Ctrl	1	32505.300	0.746	
		2	32766.057	0.749	0.704±0.074
		3	31469.614	0.618	
β-actina	Ctrl	1	43542.522		
		2	43734.693		
		3	50907.865		
<hr/>					