



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**VIAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA TOLERANCIA AL
ESTRÉS POR UV-B EN *Capsicum annuum* L.**

Por:

Estefanía Espinoza Bojórquez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Estefanía Espinoza Bojórquez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias



Dra. Josefina León Félix
Directora de Tesis



Dra. María Claudia Villicaña Torres
Integrante de comité de tesis



Dr. José Basilio Heredia
Integrante de comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Vías Moleculares Asociadas a la Tolerancia al Estrés por UV-B en *Capsicum annuum*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Estefanía Espinoza Bojórquez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradezco al CONACYT, por el apoyo económico brindado durante el posgrado.

Agradezco a CIAD por facilitarme sus instalaciones y todas las herramientas para llevar a cabo esta formación académica.

También quiero agradecer al proyecto 60317 “Estudio de las bases moleculares del sistema de transducción de señales activadas por proteínas G heterotriméricas en respuesta a condiciones de estrés abiótico en *Capsicum annuum* L.” el cual financió este trabajo.

Además, es de suma importancia agradecer a mi comité de Tesis: a la Dra. Josefina León Félix, por su toda de paciencia y persistentemente estar presente y al pendiente del proyecto a pesar de las adversidades; a la Dra. María Claudia Villicaña Torres, por sus comentarios siempre atinados sobre el trabajo de investigación; al Dr. Miguel Angel Angulo Escalante; y al Dr. José Basilio Heredia, quienes enriquecieron el trabajo bajo una perspectiva diferente a lo molecular. En general agradezco que en todo momento estuvieran en disposición de ayudarme a mejorar y reitero la gran admiración que les tengo como investigadores y por su calidez como personas.

Quiero agradecer a mis compañeros de maestría: Itzel, Cecilia, Kimberly, Hilary, Juan Ángel, César, Ramón, Ignacio, Juan Luis, Édgar y Víctor. Que a pesar de haber convivido poco por la situación global y por desempeñarnos a diferentes áreas, fueron compañeros formidables.

En este sentido, agradezco a todos los integrantes del laboratorio BIMOGEN, el cual está integrado por personas muy profesionales y amigables: al técnico del laboratorio Q.F.B. Héctor Carrillo Yáñez, por su valioso apoyo técnico y su paciencia, al M. C. Brandon Morales quien fue parte esencial para asesorías y prácticas sobre los análisis bioinformáticos; al M. C. Christian Grimaldi, quien no dudó en brindar todo su apoyo cuando también requerí asesorías; a la M.C. Daizha quien también estuvo dispuesta a apoyarme siempre que la contacté; al M.C. Richecarde, quien considero un ejemplo a seguir por su inteligencia y compromiso; a la M.C. Lucía Rubí a quien también

considero una persona muy profesional e inteligente; a la M.C. María José, a la cual igualmente admiro y considero una gran científica. Agradezco a los y las alumnas de licenciatura, como a: Yubel, Alejandra, Brianda, Karina, Valeria, quienes tienen un gran potencial para desempeñarse en la ciencia; a los ex integrantes del grupo de trabajo, M.C. Julián García, M.C. Miguel Guzmán, quienes siempre me trataron como su colega desde el servicio social; a la Dra. Talia Martínez y al Dr. Rubén León Chan, quienes sembraron las bases para este proyecto; y a todos los demás integrantes quienes me falta por mencionar, pero que todos y cada uno son pieza clave para llevar a cabo los diferentes proyectos y lograr la armonía del grupo de trabajo. Al personal del Sistema de Gestión de Calidad y Mantenimiento: M en I. Marco César de Jesús Martínez Montoya y José Marco Salcido López y al personal administrativo: LCPF. Mayra Lilia Ibarra, Xiomara Urrea, Karen Sosa, Marcela Carrillo, Patricia Hernández, Basilio Beltran y Víctor Arana, quienes en todo momento brindaron su apoyo para que esta investigación llegara a un buen fin,

Agradezco a las amistades que formé en otras áreas de CIAD, a la M. C. Ana María López, por siempre irradiar una actitud positiva, a la M.C. Dominique por las pláticas amenas y su fortaleza; a las empleadas Doña Francisca quien siempre está para escuchar y ser una mujer muy trabajadora; al Dr. Daniel Lira, por siempre compartir sus conocimientos y pláticas interesantes; y a todos los administrativos y colegas con quienes me tocó intercambiar conversaciones.

Además, agradezco a la M.C. Dulce Medina, con quien logré forjar una gran amistad y considero una mujer muy inteligente y capaz de lograr lo que se proponga.

Agradezco a mis amistades externas: a Kenia Melissa, Elizabeth y a Cecilia, con quienes tengo plena confianza y considero una red de apoyo en tiempos difíciles.

Agradezco a mi pareja, M.C. Mario Leyva, a quien admiro y siempre me ha brindado su apoyo y amistad incondicional, quien me ha ayudado a hacer mucho más soportables los tiempos más difíciles, y con quien a la vez comparto momentos muy felices.

Agradezco también a mi hermano Samuel, quien cuando se necesita siempre está dispuesto a ayudar. Y, en especial agradezco a mis padres: Teresa Bojórquez y Feliciano Espinoza, quienes

son mi mayor motivación para no rendirme, por brindarme siempre su amor, apoyo, y ser las personas que más quiero y admiro, no tengo palabras suficientes para agradecerles.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a todas las personas que a pesar de los tiempos complicados y las batallas internas que no platican con nadie, no se han rendido y siguen intentando un día más.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	7
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	19
2.1 <i>Capsicum annuum</i>	19
2.2. Estrés Ambiental en Plantas	20
2.3. Radiación Ultravioleta-B.....	23
2.4. Estrés por Radiación Ultravioleta-B.....	25
2.5 Respuesta al Estrés UV-B.....	27
2.6 Expresión Génica.....	30
2.7 ARN-Seq	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo General:	36
4.2 Objetivos Específicos:	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 Tipo de Estudio.....	37
5.2 Muestras de Estudio	37
5.3 Diseño del Estudio.....	37
5.4 Material Vegetal y Exposición Luz UV-B	39
5.4.1 Generación del Material Biológico para Secuenciación.....	39
5.5 Extracción de ARN para Secuenciación.....	39
5.6 Secuenciación	40
5.7 Análisis Bioinformático.....	41
5.7.1 Control de Calidad de las Lecturas	41
5.7.2. Mapeo de Secuencias al Genoma de Referencia	41
5.7.3 Cuantificación de la Expresión	42
5.7.4 Análisis de Expresión Diferencial	42
5.7.5 Anotación Funcional.....	42

CONTENIDO (Continuación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
6.1 Control de Calidad de las Lecturas.....	44
6.2 Alineamiento con Genoma de Referencia.....	49
6.3. Conteo de los Transcritos.....	50
6.4. Análisis de Expresión Diferencial.....	51
6.5 Anotación Funcional de los Genes.....	56
6.5.1. Anotación Funcional con Panther GO.....	56
6.5.2 Anotación Funcional Mediante KEGG.....	63
7. CONCLUSIONES	67
8. RECOMENDACIONES	68
9. REFERENCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Países con mayor producción de chile en el año 2018, según FAOSTAT (2018).	20
2. Factores que pueden determinar la respuesta de la planta ante el estrés ambiental, modificado de Buchanan et al. (2015).	21
3. Esquema general del reconocimiento del estrés en plantas, transducción de señales y su respuesta a través de la planta, modificado de Buchanan <i>et al.</i> (2015).	22
4. Espectro electromagnético de radiación ultravioleta, dividido en UV-C, UV-B y UV-A, modificado de Maverakis et al. (2010).	24
5. Capacidades de penetración de radiaciones UV-A, UV-B y UV-C en la atmósfera terrestre.	25
6. Estrategia metodológica general.	38
7. Ejemplo de una lectura pareada (Morales-Mérida, 2020).	41
9. Análisis de calidad de las secuencias por muestra después del recorte para control de calidad.	46
10. Distribución de la longitud de los fragmentos analizados antes del control de calidad.	47
11. Distribución de la longitud de los fragmentos después del control de calidad.	48
12. Análisis de componentes principales de las seis muestras. Réplicas biológicas del control, sin exposición a radiación UVB (CA y CB); réplicas biológicas expuestas a radiación UVB: 3 h (3A y 3B) y 25 h (25A y 25B).	51
13. Gráfico de volcán de genes diferencialmente expresados a 3 h (A) y 25 h (B) h de tratamiento con UVB.	54
14. Diagrama de genes expresados positivamente en los tratamientos 3 y 25 h con UV-B.	55
15. Diagrama de genes expresados negativamente en los tratamientos 3 y 25 h con UV-B.	55
16. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por función molecular. Color gris: unión; morado: actividad catalítica; azul: función de regulador molecular; verde: actividad transportadora.	57
17. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso biológico. Color verde: regulación biológica; azul claro: proceso biológico; gris: procesos metabólicos; azul intermedio: proceso rítmico; azul oscuro: señalización; amarillo: respuesta a estímulos.	57

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
18. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso componente celular. Color rosa claro: entidad anatómica celular; rosa oscuro: intracelular.....	58
19. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 25 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO. Color gris: unión; morado: actividad catalítica; azul: función de regulador molecular; verde: actividad transportadora.	59
20. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso biológico. Color azul: proceso biológico; gris: procesos metabólicos; amarillo: respuesta a estímulos.....	59
21. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 25 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso componente celular. Color rosa claro: entidad anatómica celular; rosa oscuro: intracelular.....	60
22. Análisis de expresión diferencial de genes mediante mapa de enriquecimiento de KEGG.....	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Genes diferencialmente expresados en plantas de pimiento irradiadas con UV-B, relacionadas con la respuesta a UV-B en otras plantas de Martínez-Bastidas (2017).....	27
2. Valores de extracción de ARN para secuenciación.....	40
3. Cantidad de secuencias antes y después del control de calidad	49
4. Tasa de secuencias mapeadas a genoma de referencia.....	50
5. Ejemplo de conteo de abundancia de algunos genes en cada tratamiento.....	50
6. Genes identificados por su función molecular	60
7. Genes identificados por proceso biológico.....	61
8. Genes identificados por componente celular.....	62
9. Genes identificados en mapa de enriquecimiento de KEGG en tratamiento 3 h inhibidos.....	65
10. Genes identificados en mapa de enriquecimiento de KEGG en tratamiento 3 h sobre-expresados.....	66
11. Genes identificados en mapa de enriquecimiento de KEGG en tratamiento 25 h sobre-expresados.....	66

RESUMEN

El pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) es considerado una solanácea de importancia económica y de gran valor nutricional. Sin embargo, su producción puede estar limitada por factores abióticos como la radiación UV-B, que genera daños y cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Los genomas de referencia con conjuntos de datos masivos de transcriptomas de varias condiciones ambientales nos dan información acerca de los eventos moleculares que pueden proveer pistas para inferir sobre procesos fisiológicos que podrían contribuir a la adaptación del cultivo. Los cambios moleculares se pueden medir con la técnica ARN-Seq, que permite identificar y medir cambios en la expresión génica, proporcionando información sobre los genes que participan en la respuesta al estrés.

Sin embargo, se han publicado pocos perfiles de expresión génica para examinar los mecanismos de respuesta a estrés ambiental en pimiento. Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el perfil de los genes que se expresan en el pimiento morrón (*C. annuum* L.) en respuesta al estrés por radiación UV-B, para ello, se obtuvieron datos de secuenciación masiva de ARN de muestras de tallo de plantas *C. annuum* cv. Cannon, a las 0, 3 y 25 h después de exposición a radiación UV-B. Los datos de secuenciación masiva obtenidas por ARN-seq se procesaron con los programas bioinformáticos: Fastq joiner, Fastq interlacer, FastQC, Trimmomatic, Hisat2, HTSeq-count, Deseq2, R Studio, las plataformas PantherGO y KEGG. Mediante dichos programas se verificó y filtró la calidad de las secuencias, se mapearon con un genoma de referencia, se cuantificaron e identificaron los genes diferencialmente expresados y se realizó la ontología de genes y anotación funcional.

Como resultado se obtuvieron un total de 141 y 118 genes expresados diferencialmente a las 3 y 25 h, según la metodología estadística de distribución binomial negativa y una corrección FDR ($\alpha = 0.05$ y LFC = ± 1.5). La anotación funcional se realizó con un análisis estadístico basado en la prueba de Fisher y ajuste FDR ($\alpha = 0.05$), indicando que los genes están asociados con el ritmo circadiano de la planta, metabolismo de tiamina, metabolismo de sulfuro, procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, fotosíntesis, endocitosis y espliceosoma. Se observó que los genes están relacionados con funciones como señalización del estrés, respuesta a estímulos y regulación de la función biológica. Se puede asumir que el tratamiento de 3 h tiene comportamiento

de respuesta temprana al estrés.

Palabras claves: *Capsicum annuum*, luz ultravioleta-B, transcriptoma, rutas metabólicas.

ABSTRACT

The bell pepper (*Capsicum annuum* L.) is considered a *solanacea* of economic importance and with great nutritional value. However, its production may be limited by abiotic factors such as UV-B radiation; which generates damage and morphological, physiological, biochemical and molecular changes. High-quality reference genomes with massive datasets of transcriptomes from various conditions give us information about molecular events that can provide clues to infer about physiological processes which could help to the adaptation of the crop. Molecular changes can be measured with the RNA-Seq technique, that allows to identify and measure changes in gene expression, providing information on the genes that participate in response to stress. However, few global gene expression profiling datasets have been published to examine the environmental stress-resistant mechanisms in peppers. Therefore, the aim of this work was to determine the functions of the genes that are expressed in bell pepper (*C. annuum* L.), in response to stress by UV-B radiation. Massive RNA sequences were obtained from stem samples of *Capsicum annuum* cv. Cannon, subjected to stress (UV-B radiation) at 0, 3 and 25 h. These sequences were worked with the following programs: Fastq joiner, Fastq interlacer, FastQC, Trimmomatic, Hisat2, HTSeq-count, Deseq2 and PantherGO platform and KEGG platforms. With these tools the quality of the sequences were verified and filtered, then mapped with a reference genome, then genes were quantified, differentially expressed genes were quantified, subsequently there were made gene ontology and functional annotation. In our study, we found 141 and 118 differentially expressed genes were obtained for 3 and 25 h, based on the statistical methodology of the negative binomial distribution and an FDR correction ($\alpha= 0.05$ and $LFC= \pm 1.5$). The functional annotation was performed with a statistical analysis based on the Fisher test and FDR adjustment ($\alpha=0.05$), indicated that most genes are associated with circadian rhythm, thiamine metabolism, sulfur metabolism, protein processing in endoplasmic reticulum, photosynthesis, endocytosis and spliceosome. It was observed that genes are related to functions such as stress signaling, response to environment and regulation of biological function. We can assume that the treatment from 3 h has early response behavior.

Key words: *Capsicum annuum*, ultraviolet-B light, transcriptome, metabolic pathways.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas están expuestas a diferentes tipos de alteraciones en su ambiente, que se conocen como estrés. El estrés en plantas puede disminuir la calidad de los cultivos, reducir la producción y amenazar la seguridad alimentaria. Las plantas responden al estrés abiótico a través de reacciones dinámicas y complejas que se acompañan de cambios moleculares, celulares y fisiológicos en los tejidos vegetales (Zhu, 2016).

En estos tipos de condiciones adversas, las plantas producen varios tipos de metabolitos primarios y secundarios para protegerse. El metabolismo primario se refiere al resultado de varias reacciones químicas catalizadas por enzimas y proporciona a las células la energía y las macromoléculas indispensables para la construcción de las células tales como las proteínas, los polímeros estructurales, azúcares o carbohidratos, que se producen como resultado de la fotosíntesis y el ADN. Estos metabolitos primarios se producen por lo general durante el crecimiento exponencial del micelio (Roussos & Perraud-Gaime, 1996). Por otra parte, los metabolitos secundarios, son los ya que no intervienen directamente en su metabolismo, o al menos, no se conoce con profundidad su función en la planta y se asume que se emplean como mecanismo de defensa. Entre estos, pertenecen a diferentes grupos como son: aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, entre otros (Paumier *et al.*, 2018; Pinnard *et al.*, 2019).

Tanto los metabolitos primarios como los secundarios juegan un papel importante durante las condiciones de estrés (calor, sequía, salinidad, genotóxicas, frío, radiación ultravioleta). Una respuesta multigénica se activa durante la progresión de estos estreses en las plantas lo que estimulan cambios en diversas moléculas de señalización, aminoácidos, proteínas, metabolitos primarios y secundarios. El metabolismo de las plantas, entre otros factores, se ve perturbado por la inhibición de las enzimas metabólicas, la escasez de sustratos, el exceso de demanda de compuestos específicos o una combinación de estos factores (Singh *et al.*, 2020)

Un estrés ambiental de gran importancia es la radiación ultravioleta tipo B (UV-B), la cual tiene un rango de longitud de onda de 280-315 nm. Las plantas perciben los rayos UV-B como una señal ambiental y un posible factor de estrés abiótico que afecta el desarrollo y la aclimatación, pudiendo ocasionar cambios en la expresión génica, la cual puede inducir cambios a niveles moleculares, metabólicos, morfológicos y fisiológicos en plantas; tal como la regulación de la fotomorfogénesis,

incluida la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la expansión del cotiledón y la acumulación de flavonoides. Por otra parte, la luz UV-B de alta intensidad también puede dañar las plantas al alterar el ADN, desencadenar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y la alteración la fotosíntesis, ocasionando daños en los fotosistemas I y II (Shi & Liu, 2021)

No obstante, también las plantas pueden encender o acelerar rutas metabólicas para producir compuestos de defensa contra el estrés oxidativo ante la producción excesiva de ERO's, tales como los flavonoides que se acumulan bajo el estrés de los rayos UV-B para prevenir o limitar dicho daño. Para promover la biosíntesis de compuestos flavonoides que mejoran la tolerancia al estrés por UV-B (Shi & Liu, 2021).

De esta manera, el estudio de los procesos moleculares y bioquímicos que ocurren en las plantas sometidas a estrés resulta de gran relevancia para descifrar los mecanismos de respuesta inducidos por condiciones poco favorables. Para comprender las respuestas de las plantas al estrés abiótico, se han aplicado diversos enfoques de mejoramiento de cultivos, desde métodos tradicionales de mejoramiento hasta diversos métodos ómicos, como la secuenciación de nueva generación (NGS) (Yang *et al.*, 2021).

Desde el desarrollo de NGS, el transcriptoma se ha estudiado ampliamente para comprender los mecanismos moleculares por los que las especies de plantas se adaptan a su entorno. Actualmente, los análisis de datos de transcriptomas de plantas se realizan en varios organismos en diversas condiciones, incluida la exposición a estreses abióticos. La mayoría de los estudios de transcriptomas que involucran estreses abióticos se han realizado en plantas modelo, con algunos estudios que examinan cultivos tratados con uno, dos o más estreses diferentes en una determinada etapa de desarrollo de la planta (Coolen *et al.*, 2016; Kang & Yeom, 2018). Por lo tanto, se han realizado análisis de transcriptomas comparativos limitados para plantas no modelo y de importancia económica que responden a diferentes estreses abióticos.

El pimiento (*Capsicum annuum* L.), perteneciente a la familia de las solanáceas, es uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial. Durante las últimas dos décadas, la producción y el cultivo de chiles ha aumentado constantemente en todo el mundo, alcanzando 3.8 millones de hectáreas de tierra para cultivo y 40.7 millones de toneladas de pimientos producidos en 2018 (FAO, 2018).

Recientemente, se han publicado múltiples genomas y transcriptomas de pimiento de referencia; estos conjuntos de datos pueden usarse para obtener abundante información sobre los rasgos de

mejoramiento de los pimientos (Kim *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2016). Los genomas de referencia de alta calidad con conjuntos de datos masivos de transcriptomas de diversas condiciones pueden proporcionar pistas sobre los rasgos agronómicos deseables de producción. Además, así como otros cultivos, los pimientos se ven amenazados por diversas condiciones ambientales debido a diferentes patógenos y estreses abióticos. Sin embargo, se han publicado pocos conjuntos de datos de perfiles de expresión génica global para examinar los mecanismos de resistencia al estrés ambiental en los pimientos. Se requieren análisis completos de transcriptomas en condiciones tan diversas para obtener una amplia variedad de perfiles de expresión génica e identificar las complejas redes de la expresión génica. Por lo que el objetivo de este estudio fue relacionar los genes de expresión diferencial de tallos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) con las vías moleculares que conducen a la aclimatación de *C. annuum* L. al estrés por radiación ultravioleta B (radiación UV-B).

En esta investigación, se reportan los análisis de secuenciación masiva del ARN (ARN-seq) de tallos de plantas de pimiento sin exposición (tiempo cero, control) y expuestos a dos periodos de radiación UV-B (3 h posteriores al inicio del tratamiento con UVB y 25 h después de iniciado el primer tratamiento y 1 h después de haber concluido un segundo tratamiento).

Se construyeron bibliotecas de ARN-seq de las tres muestras de ARN que contenían dos réplicas biológicas por tratamiento (0, 3 y 25 h) . Se encontraron genes expresados diferencialmente y se hizo un análisis de enriquecimiento de ontología génica. Los análisis de los datos del transcriptoma en estudio proporcionan información básica útil para identificar genes clave en respuesta a este estrés que en un futuro permitan un mejor manejo agronómico del cultivo de pimiento en condiciones de estrés por radiación UV-B

2. ANTECEDENTES

2.1 *Capsicum annuum*

Capsicum annuum es una especie perteneciente a la familia *Solanaceae*, en la cual se agrupan cultivos de gran interés alimenticio, como la papa y el tomate (Tiwari *et al.*, 2013; Martínez-Bastidas, 2017). Existen alrededor de 30 especies de *Capsicum* sp., y 5 de ellas son especies domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum* L., *C. chinese* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* Ruiz & Pav). (Pacheco-Olvera *et al.*, 2012; Chunthawodtiporn *et al.*, 2018). El fruto de *C. annuum* presenta una amplia variedad de tamaños y colores, como rojo, amarillo y naranja. Su uso es principalmente para alimentación en fresco y deshidratado, los frutos frescos del pimiento morrón son buena fuente de vitamina C, vitamina E y carotenoides. Los frutos de pimiento se caracterizan por su sabor agradable, con cierto dulzor y un picor muy ligero en comparación a otros chiles (Matsufuji *et al.*, 2007; Martínez-Bastidas, 2017). Los principales productores de *C. annuum* son China (18,214,018 ton), México (3,379,289 ton) y Turquía (2,554,974 ton) (Figura 1).

El consumo anual per cápita de chile en México es de 18.4 kg, y los estados de mayor producción son Sinaloa, con 858,544 ton, Chihuahua, con 676,463 ton y Zacatecas, con 423,757 ton (SIAP, 2018).

A pesar del control que se tiene sobre algunos factores del cultivo de pimiento, su rendimiento puede ser severamente reducido por estrés tanto biótico, como abiótico (Martínez-Bastidas, 2017; Aidoo *et al.*, 2018).

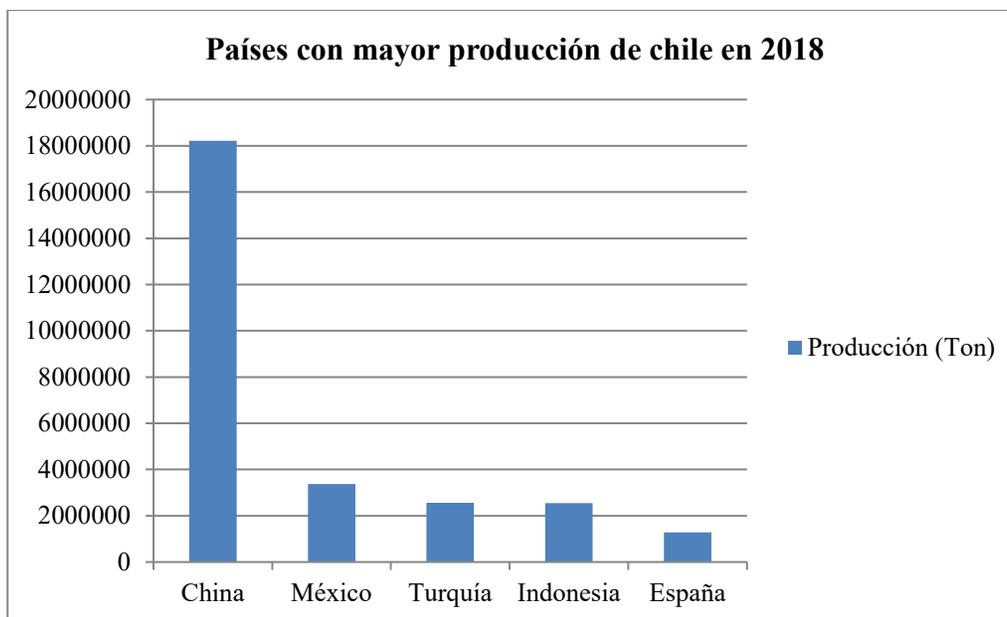


Figura 1. Países con mayor producción de chile en el año 2018, según FAOSTAT (2018).

2.2. Estrés Ambiental en Plantas

Las plantas son frecuentemente expuestas a condiciones externas a ellas que pueden afectar su crecimiento, desarrollo y producción. A estas condiciones se les conocen como estrés, el cuál se puede clasificar como biótico y abiótico (Bray *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 2015). El estrés biótico es el producido por otros organismos, tales como plantas parásitas, hongos, virus y bacterias. Por otro lado, el estrés abiótico es el que puede ser causado por factores físicos o químicos, como exceso de salinidad, metales pesados, altas o bajas temperaturas, inundación, sequía, radiación solar excesiva, daños mecánicos, entre otros (Kyoro *et al.*, 2012).

El estrés desencadena un amplio rango de respuestas en plantas, como alteraciones en la expresión génica y el metabolismo celular hasta cambios en tasa de crecimiento y rendimiento del cultivo. Los mecanismos de resistencia al estrés pueden ser agrupados en dos categorías generales: mecanismos de evasión, que previenen la exposición al estrés, y mecanismos de tolerancia para resistir el estrés (Buchanan *et al.*, 2015; León-Chan, 2017). Un ejemplo de ello son las plantas xerófitas, que toleran el déficit de agua gracias a sus características morfológicas que facilitan su supervivencia bajo condiciones áridas, o las plantas efímeras que evitan la sequía germinando y

completando su ciclo de vida sólo cuando hay agua disponible. Estos mecanismos constituyen adaptaciones, es decir, mejoramientos evolutivos que mantienen estables a las poblaciones de organismos. Otro mecanismo de resistencia es la aclimatación, que es el ajuste de cada organismo en respuesta a factores ambientales cambiantes, en donde el organismo altera su homeostasis, para adecuarse a los factores externos (Buchanan *et al.*, 2015).

La duración, severidad y el rango en el cual el estrés es impuesto influencia cómo va a ser la respuesta de la planta. Las plantas responden al estrés a través de una variedad de mecanismos, donde muchos factores determinan cómo van a responder las plantas ante el estrés ambiental, como el genotipo y las condiciones de desarrollo de la planta, la duración y severidad del estrés, el número de veces que la planta es sujeta al estrés y cualquier otro aditivo o efecto sinérgico de múltiples estreses (Buchanan *et al.*, 2015; León-Chan, 2017). La falla para compensar el estrés severo puede resultar en la muerte celular (Figura 2).

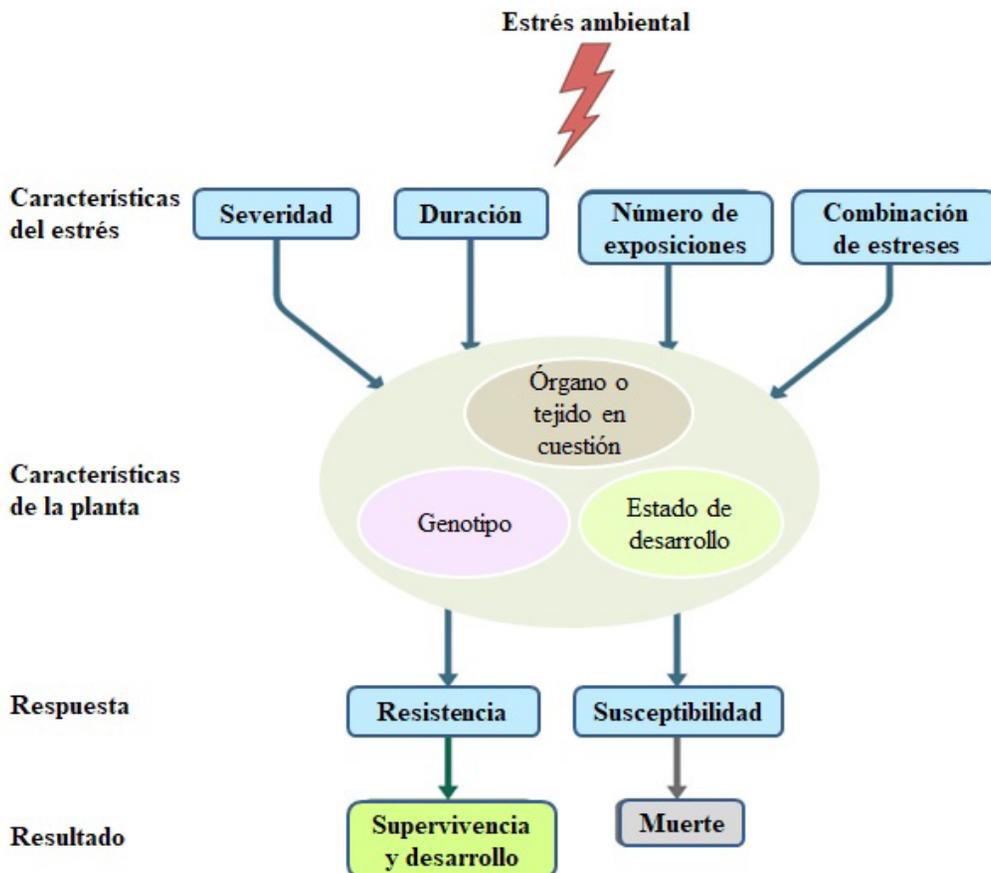


Figura 2. Factores que pueden determinar la respuesta de la planta ante el estrés ambiental, modificado de Buchanan *et al.* (2015).

Las plantas responden al estrés a nivel celular y a nivel de organismos completos. Una respuesta al estrés es iniciada cuando la planta reconoce el estrés a nivel celular. La planta recibe el estrés o conjunto estreses y son reconocidos por la planta. Después del reconocimiento, activa las rutas de transducción de señales que transmiten la información entre células individuales y a través de la planta. Por último, los cambios en la expresión génica son integrados en una respuesta para modificar su crecimiento y desarrollo. Por lo que la transducción de señales ambientales resulta típicamente en la alteración de la expresión de genes a nivel celular, el cual puede influenciar el metabolismo y el desarrollo de la planta completa (Figura 3). Estos cambios inducidos por el estrés en el metabolismo y desarrollo pueden ser atribuidos a los patrones alternados de la expresión génica (Buchanan *et al.*, 2015).

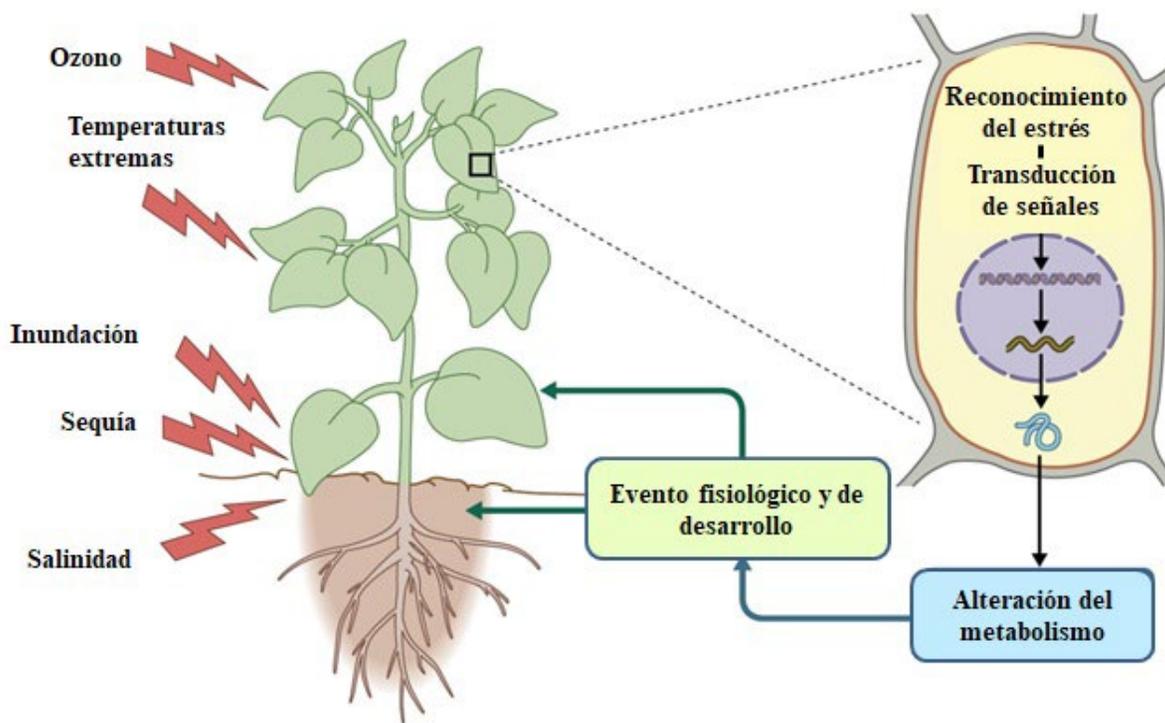


Figura 3. Esquema general del reconocimiento del estrés en plantas, transducción de señales y su respuesta a través de la planta, modificado de Buchanan *et al.* (2015).

En respuesta al estrés, algunos genes muestran incremento en la expresión, mientras otros son reprimidos. Las proteínas producto de los genes que responden al estrés se suelen acumular como

respuesta a condiciones desfavorables. La función de estas proteínas y los mecanismos que regulan su expresión son un tema central de investigación en la fisiología del estrés. Sin embargo, la mayoría de estudios se han enfocado en la activación transcriptómica de la expresión de genes (Buchanan *et al.*, 2015).

Dependiendo del cultivo, los estreses biótico y abiótico pueden reducir en promedio del 65-87% de la productividad. La aplicación de técnicas de mejoramiento y biotecnología pueden potenciar la tolerancia al estrés proveyendo beneficios económicos. Usando técnicas de biología molecular, los investigadores han descubierto respuestas de plantas al estrés asociadas con la exposición de un estrés abiótico específico. Muchos genes asociados a las cascadas de transducción de señales en mamíferos, como proteínas cinasas, enzimas relacionadas con fosfolípidos, receptores de kinasas y proteínas G, también están presentes en plantas. Sin embargo, muchas preguntas siguen sin contestarse, la mayoría de los mecanismos en los cuales las plantas perciben el estrés abiótico no han sido elucidados. El progreso en ésta área, mejorará conocimiento en la percepción del estrés y los eventos de transducción substanciales (Buchanan *et al.*, 2015).

2.3. Radiación Ultravioleta-B

El término ultravioleta (UV) significa “más allá del violeta” y se refiere a la radiación electromagnética con una longitud de onda más corta que la luz violeta visible, pero no mayor que los rayos X. La radiación entre el espectro UV puede ser dividida por su longitud de onda en UV-C (200-280 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320 -400 nm) (Figura 4). Una propiedad importante de la radiación UV que la separa del espectro de luz visible es que la luz UV puede ionizar moléculas e inducir reacciones químicas (Maverakis *et al.*, 2010).

Cuando la frecuencia de las ondas de luz incrementan, los fotones emitidos también aumentan, por lo que una longitud de onda más corta que UV-A, como UV-B posee mucha más energía que UV-A (Maverakis *et al.*, 2010).

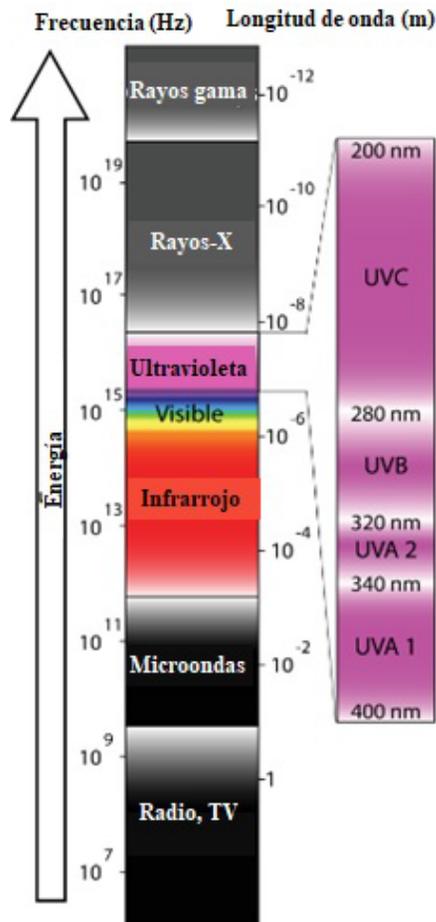


Figura 4. Espectro electromagnético de radiación ultravioleta, dividido en UV-C, UV-B y UV-A, modificado de Maverakis *et al.* (2010).

En la atmósfera terrestre, el ozono (O₃), dióxigeno (O₂) y el vapor de agua (H₂O) filtran selectivamente la radiación UV-C y UV-B. Debido a esto, la radiación UV-A es la que alcanza a llegar más a la Tierra (Figura 5). La radiación UV-C prácticamente no penetra la atmósfera y la radiación UV-B es absorbida por la capa de ozono ~90% dependiendo de la localización geográfica y hora del día, cerca de un 90% de UV-B y prácticamente nada de UV-C son absorbidas por O₃, O₂ y H₂O en la atmósfera terrestre. A pesar de que llega poca radiación UV-B a la superficie terrestre, esta tiene mayor energía que la UV-A, siendo suficiente para ocasionar daños a los organismos (Maverakis *et al.*, 2010).

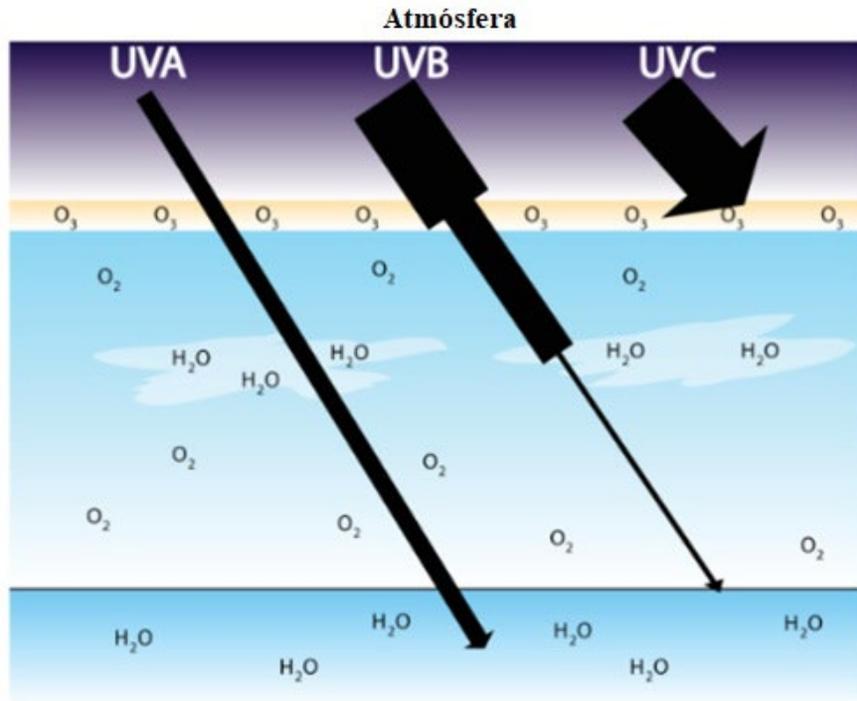


Figura 5. Capacidades de penetración de radiaciones UV-A, UV-B y UV-C en la atmósfera terrestre, modificado de Maverakis *et al.* (2010).

2.4. Estrés por Radiación Ultravioleta-B

Dentro de los factores abióticos ambientales que pueden ocasionar estrés en las plantas, se incluyen: las temperaturas extremas (frío/calor extremo), sequía o exceso de agua y la radiación ultravioleta B (UV-B). Las plantas son vulnerables a radiación UV-B debido a que la luz solar es indispensable para realizar la fotosíntesis, la cual es imprescindible para su supervivencia. Este tipo de estrés afecta aspectos de la biología vegetal, como la reducción del área foliar, retraso en el crecimiento de tallos y disminución de la biomasa total de la planta. A nivel celular, ocasiona la inhibición de la fotosíntesis (disrupción de los centros de reacción PSII), daño a los pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) y función estomática (intercambio gaseoso). A nivel molecular, daño a la estructura y función de los ácidos nucleicos (ruptura del ADN y formación de dímeros de timina), activación y foto-desactivación de moléculas de señalización, como hormonas y fotoreceptores, que ocasionan un efecto en el crecimiento y desarrollo en las plantas. La radiación UV-B también puede inducir la actividad de enzimas que regulan la síntesis de flavonoides

importantes en la tolerancia al estrés en las plantas; incluso, la luz UV-B puede intensificar los efectos adversos de algunos patógenos, como hongos sobre las plantas. Estos daños a nivel fisiológico se relacionan con cambios en la expresión de genes que son inducidos por la radiación UV-B. Las plantas pueden responder y adaptarse a este tipo de factores ambientales, activando diferentes rutas de señalización. La mayoría de las señales extracelulares se unen a receptores específicos en la superficie de la membrana celular, los cuales actúan como transductores de señales convirtiendo las señales extracelulares en señales intracelulares propiciando una respuesta por parte de la célula. Un mecanismo importante de transducción de señalización de las plantas es a través de proteínas G (Martínez-Bastidas, 2017).

Respecto al estrés por radiación UV-B en pimiento, se han realizado diversos estudios, como el de Lai et al. (2011), donde evaluaron mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de ADN complementario amplificado (siglas en inglés cDNA-AFLP) la expresión génica diferencial de *C. annuum* expuestos a irradiación UV-B, encontraron que algunos de los fragmentos derivados de los transcritos estaban en respuesta / relacionados con el estrés UV-B, incluida la anhidrasa carbónica, la proteína dependiente del calcio, la proteína similar a la tionina, la proteína bzip, entre otras. En particular, se clonó la proteína de unión a clorofila a / b (Capcab) que respondía al estrés UV-B. Se concluyó que Capcab podría desempeñar un papel protector en la planta anti-UV-B y mantener la tasa fotosintética bajo estrés UV-B.

Por otro lado, León-Chan et al. (2017) analizaron el contenido de clorofila, carotenoides y compuestos fenólicos en respuesta a bajas temperaturas, radiación UV-B, y la combinación de estos dos estreses. Obtuvieron que la mayor acumulación de daño en clorofila fue con la combinación de los dos estreses y que UV-B indujo mayor concentración de flavonoides totales que el estrés por bajas temperaturas. Consiguientemente, León-Chan et al. (2020) investigaron la expresión temporal de cinco genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas en tallos de pimiento sometidos también a bajas temperaturas, luz UV-B y su combinación. Sin embargo, sugieren que la expresión génica fue más influenciada por la temperatura baja que por la radiación UV-B.

Por otra parte, Martínez-Bastidas et al. (2018) analizaron estos genes en tallos y raíces de pimiento morrón también sometido a radiación UV-B. Encontraron que los genes que codifican para las subunidades que conforman las proteínas G heterotriméricas que se sobreexpresaron en tallos de *Capsicum annuum* L. fueron CaG α 1 y CaG β 1.

Otro trabajo donde utilizaron la radiación UV-B en Chile fue el llevado a cabo por Rodríguez-

Calzada et al. (2019), en el que notaron que la producción de flavonoides aumentaron bajo el tratamiento UV-B, aumentó niveles de ácido clorogénico, apigenina y luteolina en hojas, y también expresó genes de fenilalanina amonio liasa (PAL) y de chalcona sintasa (CHS).

En un estudio llevado a cabo por Martínez-Bastidas (2017), realizaron un análisis transcriptómico de pimiento bajo estrés por UV-B, donde encontraron expresión de genes asociados a la respuesta al estrés oxidativo, fotosíntesis, regulación de la transcripción y que algunos de los genes están relacionados a moléculas de transducción de señales como proteínas G. Algunos genes que reportan como diferencialmente expresados en pimiento y en otras plantas en respuesta a UV-B se muestran en el Cuadro 1. Sin embargo, recomiendan que es necesaria una evaluación de los genes mediante RT-qPCR para validar sus resultados.

Cuadro 1 Genes diferencialmente expresados en plantas de pimiento irradiadas con UV-B, relacionadas con la respuesta a UV-B en otras plantas de Martínez-Bastidas (2017).

ID del Gen	Función	Valor P	Log₂ Fold Change	Anotación GO
LOC107863844	Proteína de respuesta a auxinas	0,001348	1,91	Respuesta a auxinas
LOC107866851	Ubiquitina E3 ligasa A TL23	0,000428	1,86	Actividad ligasa
LOC107860006	ABA y proteína de estrés ambiental inducible tipo TAS14	0,000079	1,7	Respuesta a estrés
LOC107860501	Probable factor de transcripción 3 WRKY	0,002236	1,5	Actividad como factor de transcripción
LOC107864929	Glutación peroxidasa	0,024915	1,21	Respuesta a estrés oxidativo
LOC107864568	Proteína tipo isoflavona-reductasa	0,049803	-1,56	Respuesta a estrés oxidativo

2.5 Respuesta al Estrés UV-B

La percepción de la radiación ultravioleta-B (UV-B), un componente de la luz solar, regula la

fotomorfogénesis, incluida la inhibición de la elongación del hipocotilo, la expansión del cotiledón y la acumulación de flavonoides (Kim *et al.*, 1998; Kliebenstein *et al.*, 2002; Favory *et al.*, 2009; Wargent *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2020). Sin embargo, los rayos UV-B continuos de alta intensidad y longitud de onda completa dañan las plantas y provocan un crecimiento y desarrollo anormal, lo que se denomina estrés UV-B. El estrés UV-B afecta la síntesis y replicación del ADN al formar dímeros de pirimidina, lo que resulta en una variación hereditaria (Britt, 1995).

Además de causar daño directo al ADN, la radiación UV-B forma especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en estrés oxidativo y oxidación de lípidos y proteínas. Demasiada UV-B causa la muerte celular, lo que resulta en marchitez, coloración amarillenta y crecimiento anormal. El estrés UV-B también afecta la fotosíntesis (Kliebenstein *et al.*, 2002; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Favory *et al.*, 2009; Hideg *et al.*, 2013). Con una exposición más prolongada a la irradiación UV-B, el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv / Fm) disminuye continuamente (Sztatelman *et al.*, 2015). Para limitar y reparar el daño inducido por los rayos UV-B y promover la aclimatación a dicho estímulo, las plantas perciben los rayos UV-B e inducen respuestas protectoras para reparar el daño del ADN, desintoxicar las especies reactivas del oxígeno y reducir la exposición celular a los rayos UV-B. Estudios en mutantes de *A. thaliana* defectuosas en las vías de reparación del ADN, tales como las de resistencia a uv 1 (*uvr-1*), *uvr2*, *uvr3* y de hipersensibilidad a uv 1 (*uvh1*), han identificado muchos factores que participan en la respuesta UV-B de la planta. Las plantas previenen o limitan el daño inducido por los rayos UV-B mediante el despliegue de defensas antioxidantes y la acumulación de flavonoides "protectores solares", incluidos el flavanol, las antocianinas y las proantocianidinas. De hecho, los tamizajes de mutantes también identificaron mutantes defectuosos en la biosíntesis de ácido ascórbico (vitamina C defectuosa 1, *vtc1*), o en la biosíntesis de flavonoides y ácido hidroxicinámico (testa transparente 4 y 5, *tt4* y *tt5*), que son defectuosos en la síntesis de flavonoides; UV- sensible, UVS, que es deficiente en la síntesis de kaempferol; ácido ferúlico hidroxilasa 1, *fah1*, que es deficiente en la síntesis de ésteres de sinapato; y tolerante a UV 1, UVTL1, que tiene un ARNm elevado de chalcona sintasa (CHS) (Kliebenstein *et al.*, 2002).

Se requiere un fotorreceptor UV-B para las respuestas a UV-B, incluida la fotomorfogénesis a UV-B y la tolerancia al estrés al UV-B (Rizzini *et al.*, 2011; Tilbrook *et al.*, 2013; Jenkins, 2014). Los tamizajes con mutantes identificaron diversos fotorreceptores de UV-B en *Arabidopsis*, tales como UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8), y UVR8 (Kliebenstein *et al.*, 2002; Rizzini *et al.*, 2011).

UVR8 se compone de 440 aminoácidos, con siete dominios de hélice beta con palas dispuestos para formar una estructura de anillo. En ausencia de UV-B, el monómero UVR8 puede formar un puente salino a través de interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados en la superficie para formar un homodímero. Hay 13 triptófanos en el dominio central de UVR8, 7 de los cuales se encuentran en la interfaz homodimérica, mientras que el Trp 285 y Trp 233 funcionan como cromóforos para la percepción de UV-B (Christie *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

La irradiación UV-B no afecta la abundancia de proteínas UVR8; más bien, después de la exposición a UV-B, Trp 233 y Trp 285 de UVR8 producirán transferencia de electrones y destruirán el puente salino del dímero de UVR8, haciendo que UVR8 se convierta en la forma de monómero activo, que se enriquece en el núcleo donde activa las respuestas de UV-B (Kaiserli y Jenkins, 2007; Rizzini *et al.*, 2011; Christie *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). La redimerización de UVR8 es promovida por proteínas REPRESORAS DE FOTOMORFOGÉNESIS UV-B (RUP) con repeticiones WD40 (Gruber *et al.*, 2010; Heijde y Ulm, 2013). Los transcritos de RUP son inducidos por UV-B y las proteínas de RUP pueden interactuar físicamente con UVR8 y mediar la re-dimerización de UVR8, a fin de regular negativamente la transducción de señales de UV-B (Gruber *et al.*, 2010; Heijde & Ulm, 2013). FOTOMORFOGÉNICO CONSTITUTIVO1 (COP1) es una ubiquitina ligasa E3 y es fundamental para muchas de las vías fotomorfogénicas reguladas por varios fotorreceptores. La interacción dependiente de UV-B entre UVR8 y COP1 no solo es un mecanismo clave para la señalización de UV-B, sino que también es esencial para la acumulación nuclear de UVR8 en respuesta a UV-B (Favory *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2016). UVR8 también regula los factores de transcripción MYB DOMAIN PROTEIN 73/77 (MYB73 / MYB77), MYB DOMAIN PROTEIN 13 (MYB13), WRKY DNA-BINDING PROTEIN 36 (WRKY36), BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1), BES1-INTERACTING MYCLIKE 1 (BIM1) y FACTOR DE INTERACCIÓN FITOCROMO 4 (PIF4) y PIF5 para regular directamente la transcripción y la fotomorfogénesis (Liang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2020; Tavridou *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

Muchos reportes han revelado los mecanismos de cómo las plantas toleran el estrés UV-B. Estas respuestas moleculares incluyen la regulación directa de la biosíntesis de flavonoides por factores de transcripción como HIPOCOTILO 5 ELONGADO (HY5), BES1 y MYB DOMAIN PROTEIN 11/12/13/111 (MYB11 / 12/13/111) (Liang *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2020), la regulación de la transcripción HY5 y la estabilidad de la proteína HY5 (Ulm *et al.*, 2004; Oravec *et al.*, 2006; Jiang

et al., 2012; Binkert *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019) y la regulación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y ATM- y RAD3-RELATED (ATR) independientes de UVR8 (González *et al.*, 2011; González & Ulm, 2013). Mejorar la redacción de estos últimos párrafos, hay información pero está desconectada y hay que enfatizar mejor el papel de lo que se sabe.

2.6 Expresión Génica

Las respuestas de las plantas al estrés están mediadas por cambios profundos en la expresión génica que resultan en cambios en la composición del transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de la planta (Narad & Kirthanashri, 2018).

La expresión génica es la manifestación de la información contenida en el ADN, la cual es transcrita (generación de ARNm y no codificante) y traducida (generación de proteínas) con base a la información contenida en el ARNm. De manera continua, los organismos eucariotes se enfrentan a condiciones ambientales variadas y adversas, por lo que han desarrollado mecanismos moleculares que les permiten tener patrones de expresión génica complejos. Esto les permite responder a los estímulos que perciben, si es que poseen los elementos necesarios para realizarlo (Alberts *et al.*, 2015).

El análisis de la expresión génica se basa en la cuantificación de los transcritos (ARN) del gen o genes de interés bajo una condición dada. Para ello, se hace uso de técnicas que permiten la amplificación exponencial del gen de interés de manera específica, lográndose las concentraciones necesarias de transcritos para ser detectados por las tecnologías existentes (Heid *et al.*, 1996).

La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación de la secuenciación de ADNc, o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como ARN-seq (Wang *et al.*, 2009; Garber *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2012).

El ARN-seq es una herramienta transcriptómica actual que está fundamentada en la secuenciación de ADNc. En esta tecnología se captura el ARN total o ARNm, el cual se fragmenta y convierte en

una librería de ADNc. Uno de los pasos fundamentales es la obtención de un ARN de buena calidad que represente todos los transcritos que se producen en la condición y tejido de estudio. Para el aislamiento del ARN con frecuencia se emplean kits de extracción de ARNm, que aplican la captura a partir de la cola poly(A) (Ward *et al.*, 2012). La fragmentación del ARN o del cDNA se realiza o bien por nebulización, por digestión con enzimas de restricción o a través del uso de cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas (Wang *et al.*, 2009). Generalmente el fraccionamiento se realiza posteriormente a la síntesis de ADNc. Esta síntesis se realiza con procedimientos estándares bien establecidos para la mayoría de organismos que hacen uso de la enzima transcriptasa reversa (Soto & López., 2012).

Para la secuenciación masiva, la tecnología de Solexa/Illumina se basa en el principio de amplificación en puente y el uso de marcaje por fluorescencia de nucleótidos modificados como terminadores (Metzker, 2010). En esta tecnología, uno de los adaptadores de los extremos de los fragmentos de ADN o ADNc se liga complementariamente a oligonucleótidos adheridos a una superficie sólida o flow cell. Estos oligonucleótidos harán las veces de primers o cebadores sentido o antisentido, y crean puentes que favorecen la amplificación. Los amplicones permanecerán adheridos y luego de una desnaturalización formarán otro puente para permitir la amplificación. El número de millones de lecturas deseables dependerá de varios factores. Uno de ellos es la disponibilidad de un genoma de referencia que facilitará el ensamblaje de las lecturas. Otro factor importante es la información sobre el número de genes de la especie, pues lo que se busca es tener representado en miles de lecturas cerca de la totalidad de genes expresados (Soto & López, 2012). Una técnica que permite la complementación del análisis bioinformático llevado a cabo por ARN-seq, es la PCR en tiempo real, debido a que ésta técnica posee mayor selectividad (debido a la especificidad de los oligonucleótidos por moléculas de interés) (Hirsch *et al.*, 2015).

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10^{17} equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl et al. 2001) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Para la amplificación por PCR en tiempo real además de los reactivos que se emplean en la PCR punto final, es necesario emplear un fluoróforo. En algunos ensayos cuantitativos se requiere determinar el número de moléculas ARNm, por lo que es necesario llevar a cabo una reacción de

transcripción reversa (RT) del ARNm a ADNc antes de que se aplique la PCR en tiempo real. En este caso, el ensayo se conoce como retrotranscripción o RT acoplada a la PCR (RT-PCR), la que puede realizarse en uno o dos pasos. Finalmente, se realiza la amplificación (síntesis) del ADN o ADNc en un termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado. Debido a que la fluorescencia de éstos aumenta conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa (Aguilera *et al.*, 2014).

Durante la amplificación por la PCR-TR, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4) estacionaria. Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Sin embargo, esta fase sirve para delimitar la línea base. En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es 2^n , es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto obtenida es constante aunque se incremente el número de ciclos. Existen dos componentes importantes de la cinética de amplificación: la línea base, la cual sirve para corregir las curvas que se obtienen de un experimento, restándose a las curvas de amplificación, y el Ct. El Ct, del inglés cycle threshold, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación de los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN (Aguilera *et al.*, 2014).

En la PCR en tiempo real existen dos tipos de cuantificación, la absoluta y la relativa. En ambos

tipos se utiliza el valor de Ct para determinar la cantidad del ADN o ARN. La cuantificación absoluta se utiliza para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos y transgénicos; mientras que la cuantificación relativa se utiliza en ensayos de expresión génica, principalmente. En este caso se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control. La diferencia con la cuantificación absoluta radica en que no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno. Es necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen blanco y el del gen endógeno, de tal manera que los valores resultantes sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida. Para normalizar la expresión génica, a partir de ensayos de cuantificación relativa, existen algunos métodos y modelos que consideran la eficiencia de la amplificación para determinar la cantidad del ADN, por ejemplo el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno. Se lleva a cabo un ensayo de validación usando diluciones seriadas tanto para el gen problema como para el gen endógeno. Se obtienen los valores de ΔCt ($Ct_{gen} - Ct_{endógeno}$). Éstos se grafican en el eje y versus el logaritmo de la concentración en cada una de las diluciones en el eje x. La pendiente de la recta debe ser menor o igual a 0.1 para que el método sea válido. Este método requiere que la eficiencia de amplificación (E) sea la misma para el gen blanco y el gen endógeno, y productos de la PCR pequeños (150 pb aproximadamente) (Aguilera *et al.*, 2014).

En el caso de los ensayos de RT-PCR en tiempo real para medir expresión génica, es necesario corregir la variación entre muestras. En este proceso se compara la cantidad del ARNm en dos muestras diferentes. En cada una de las muestras se mide la cantidad del ARNm de interés en relación con la cantidad del ARNm de referencia, el cual teóricamente, es constante en las dos muestras. La proporción $ARNm_{blanco}/ARNm_{referencia}$ se usa para comparar la cantidad del ARNm blanco en las muestras. Los resultados obtenidos se normalizan con ayuda de un control, el ARNm referencia. Generalmente, este control es un gen que de manera ideal debe expresarse

constante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como en los diferentes tejidos o tipos celulares (Aguilera *et al.*, 2014).

2.7 ARN-Seq

El ARN-Seq es una herramienta que consta de la secuenciación masiva del ARN global de un organismo (Rollano & Mollinedo, 2017). Para su ejecución, esta técnica requiere de un diseño experimental, la extracción de ARN, enriquecimiento del ARNm, síntesis de ADNc, fragmentación, ligación de adaptadores, amplificación, librerías para secuenciación, posteriormente la plataforma de secuenciamiento, diseño para dicha corrida, secuenciamiento, los archivos de lectura, y un análisis bioinformático donde se realiza: un control de calidad, con la limpieza de las lecturas, alineamiento y mapeo con un genoma de referencia, conteo de los genes y análisis de los genes expresados diferencialmente (Jazayeri *et al.*, 2015; Morales-Mérida, 2020).

3. HIPÓTESIS

Los tallos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) sometidas a radiación UV-B modulan la expresión de genes de defensas antioxidantes y de acumulación de flavonoides

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Relacionar los genes de expresión diferencial de tallos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) con las vías moleculares que conducen a la aclimatación al estrés por UV-B.

4.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar la expresión génica diferencial en tallos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) expuestos a radiación UV-B.
2. Identificar los genes de expresión diferencial en tallos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) expuestos a radiación UV-B.
3. Asociar las posibles funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos de los genes de expresión diferencial de tallos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) expuestos a radiación UV-B.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo es parte del proyecto “Identificación Espacio-Temporal y Caracterización Molecular de Proteínas G de *Capsicum annuum* L.” No. 183180.

5.1 Tipo de Estudio

Este estudio comprende dos fases: una experimental que consiste en evaluar la expresión genética diferencial por efecto del estrés abiótico combinado (UV-B y frío) sobre plántulas de pimiento a diferentes tiempos de exposición y una fase descriptiva que incluye la asignación de una posible función a los genes que de expresión diferencial.

5.2 Muestras de Estudio

El material de estudio corresponde a archivos electrónicos que contienen las secuencias masivas del ARN de tallos de *Capsicum annuum* cv Cannon: un tratamiento control (0 h) y dos condiciones experimentales de interés (3 y 25 h) por duplicado, expuestas a radiación UV-B, en el invernadero de la empresa Bioteksa S.A. de C.V., ubicada en Cd. Jiménez, Chihuahua (León-Chan *et al.*, 2017).

5.3 Diseño del Estudio

El estudio se desarrolló bajo la estrategia metodológica general de la investigación mostrada en la Figura 6.

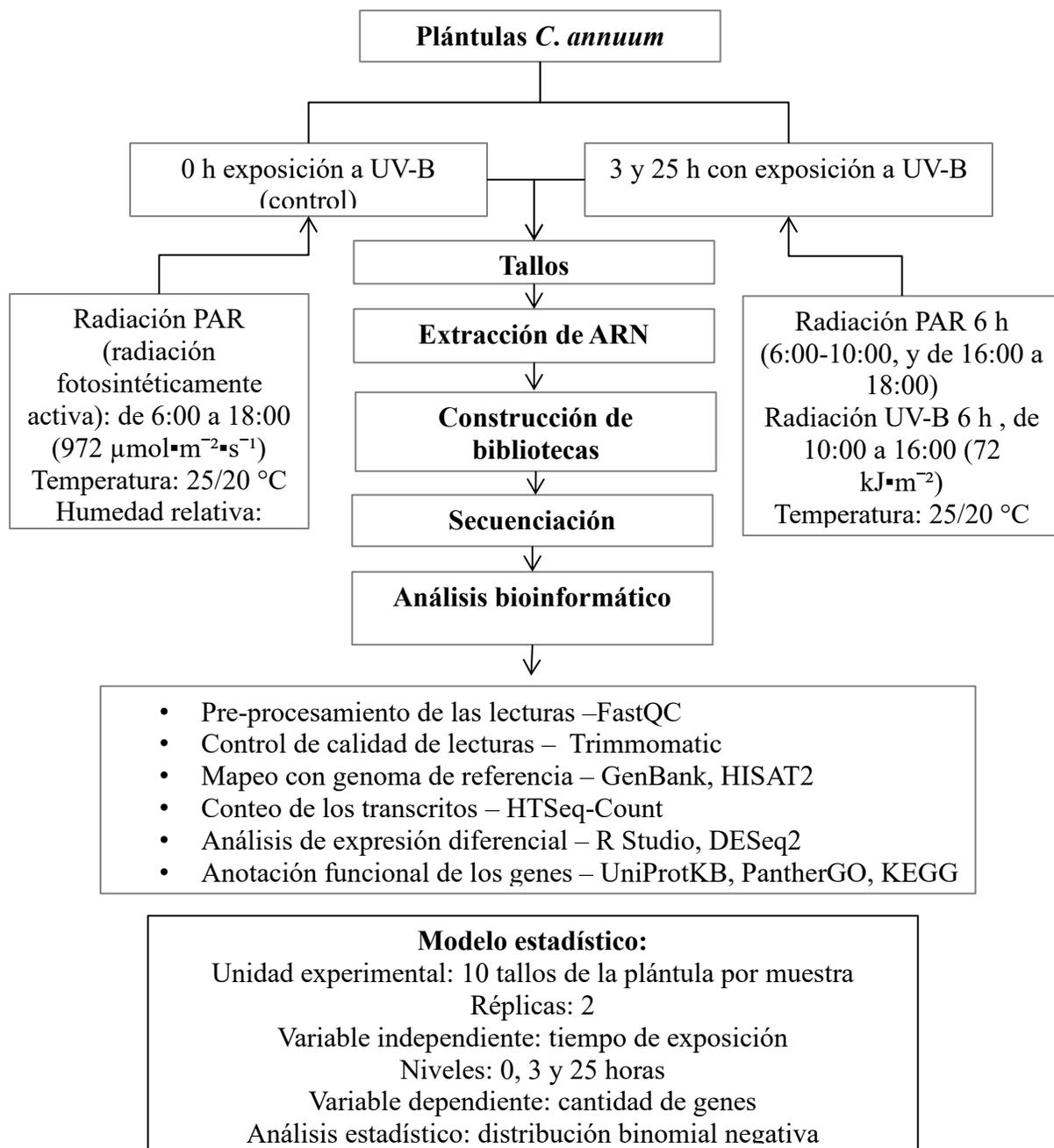


Figura 6. Estrategia metodológica general

5.4 Material Vegetal y Exposición Luz UV-B

5.4.1 Generación del Material Biológico para Secuenciación

La generación de las condiciones experimentales en el material vegetal, la extracción del ARN total para secuenciación y la secuenciación masiva, se realizó previamente por León-Chang *et al.* (2017) y Martínez-Bastidas (2017).

Plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar Cannon fueron producidas por León-Chan *et al.*, (2017). Veintiocho días después de la siembra (DAS), las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento controlado (GC-300TLH, JEIO TECH; Corea del Sur) por tres días, bajo las siguientes condiciones: 12 h de fotoperiodo (de 6:00 am a 18:00 pm) de radiación activa fotosintética (PAR) a 972 μm^2 , temperatura de 25 °C durante el día, 20 °C durante la noche y humedad relativa del 65%. Posteriormente las plantas se trataron por 6 h (6:00 a 10:00 h y 16:00 a 18:00 h) con PAR y 6 h (10:00 a 16:00 h) con UV-B (72 kJ/m²), utilizando lámparas Philips TL 100W/01 (Germany) por dos días consecutivos (días 31 y 32). Las lámparas alcanzaban una longitud de onda estrecha de entre 305 - 315 nm y picos de hasta 311 nm; la distancia de las lámparas y la planta fue de 50 cm y se validó la emisión de radiación UV-B, utilizando un medidor de luz UV A/B (SPER SCIENTIFIC, modelo 850009; Scottsdale, AZ, EUA). La toma de muestras de los tallos de las plantas de pimiento, se realizó el día 31 a las 10:00 h, justo antes del tratamiento (tiempo cero, control) y a las 13:00 h del día 31 (3 h, durante el tratamiento con UVB) y el día 32 a las 11:00 h (25 h después de iniciado el primer tratamiento y 1 h después de haber concluido el segundo tratamiento). El experimento se replicó dos veces. Dichas muestras fueron almacenadas en ultracongelador (Revco Uxf40086A, Thermo Scientific; USA) a -70°C hasta la extracción del ARN.

5.5 Extracción de ARN para Secuenciación

El ARN total de los tallos de pimiento de las plantas control (tiempo cero) e irradiadas con UV-B

(3 y 25 h) y la construcción de librerías se generaron por Martínez-Bastidas, et al (2017). Brevemente, a partir de macerados con nitrógeno líquido se utilizó el método TRIzol (Invitrogen Life Technologies, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Esperándose que las dos subunidades ribosomales se observaran íntegras y con el doble de intensidad la subunidad mayor respecto a la menor. La pureza y concentración se determinó por espectrofotometría (RNA 600 Nanosystem, Agilent Bioanalyzer, Alemania), esperándose muestras con pureza en el rango de relación 260/230 entre 1.8 y 2.0 y la relación A260/A280 de 2.0 +/- 0.2, así como concentraciones mínimas de 500 ng/μl (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de extracción de ARN para secuenciación

Nº de muestras	Nombre de muestra	Concentración n ng/ml	Relación 260/230	Relación 260/280
13	UB30T	1299	0.95	2.1
14	UB40T	780.3	0.72	2.11
17	UB33T	1164	0.87	2.07
18	UB43T	672.7	0.81	2.04
19	UB325T	835.6	0.75	2.07
20	UB425T	535.2	0.59	2.01

5.6 Secuenciación

La secuenciación masiva del ARN fue realizada por servicio en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) Unidad CINVESTAV- IPN; Irapuato, Gto., utilizando la plataforma *NextSeq® 550 Sequencing System* de *Illumina*, para secuencias pareadas (paired-end): R1 (*read 1*) y R2 (*read 2*), de 150 pb. Las secuencias van acomodadas en pares y presentan antisentidos (Figura 7), obteniéndose un total de 48 archivos (4 R1 y 4 R2) por cada muestra en formato *FASTQ*.

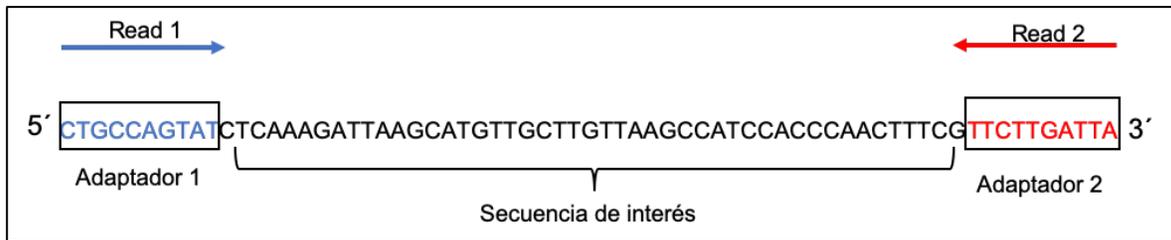


Figura 7. Ejemplo de una lectura pareada (Morales-Mérida, 2020).

5.7 Análisis Bioinformático

5.7.1 Control de Calidad de las Lecturas

Las lecturas de las secuencias obtenidas de la plataforma Illumina se cargaron en la plataforma de Galaxy (usegalaxy.org) para generar un archivo por réplica biológica, identificadas como: CA y CB, 0 h (control, antes de la irradiación con UVB); 3A y 3B, réplicas del tratamiento de 3 h, 25A y 25B, réplicas del tratamiento de 25h. Para el control de calidad se utilizó el programa FastQC. Después, se realizó un filtrado de las secuencias, donde se eliminaron aquellas secuencias que aparecieron contaminadas, oligonucleótidos y lecturas de baja calidad con el programa Trimmomatic, con los parámetros: recorte de adaptadores (*ILLUMINACLIP:Truseq2.SE.fa:2:30:10*), puntuación de calidad Phred de 25 (*SLIDINGWINDOW:4:30*) y una longitud mínima de lectura de 20 (*MINLEN:20*) (Morales-Mérida, 2020).

5.7.2. Mapeo de Secuencias al Genoma de Referencia

Para la anotación de las secuencias de tallos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en estudio, se utilizó como referencia el genoma del cultivar *Zunla* (Pepper Zunla 1 Ref_v1.0, GenBank número de acceso GCA_000710875.1), descargado de la plataforma NCBI, el cual

contiene las secuencias de los 12 cromosomas nucleares, el de la mitocondria y del cloroplasto (Qin *et al.*, 2014). El mapeo se realizó con el programa HISAT2, usando parámetros estándares (longitud mínima de intrones 20 y máxima 500000) (Morales-Mérida, 2020).

5.7.3 Cuantificación de la Expresión

La cuantificación de los transcritos se realizó con el programa *HTSeq-count* (Anders *et al.*, 2015) utilizando los seis archivos BAM obtenidos de HISAT2 como entrada, con código *htseq-count -S=no -i=Gene <ubicación del archivo BAM> <Anotación de referencia> <Archivo de salida txt>* (Morales-Mérida, 2020).

5.7.4 Análisis de Expresión Diferencial

Para la identificación de genes diferencialmente expresados (DEG), se utilizaron los archivos de entrada extensión txt del conteo de la expresión. A través del software estadístico R (www.rstudio.com) (RStudio, team 2015) y el paquete DESeq2, se hizo el análisis, de expresión diferencial, basado en metodología de distribución binomial negativa, con una tasa de descubrimiento falso (FDR) de $\alpha \leq 0.05$, y un \log_2 FoldChange (LFC) ± 1 (Morales-Mérida,2020).

5.7.5 Anotación Funcional

Los genes expresados diferencialmente que se identificaron, se anotaron en la plataforma de UNIPROTKB y posteriormente se analizaron en la plataforma Panther GO, la cual permite identificar el proceso biológico, función molecular y componente celular de cada gen.

Para inferir las rutas metabólicas en las que participan los genes expresados diferencialmente se

utilizó plataforma KOBAS con un análisis basado en prueba de Fisher y FDR de $\alpha \leq 0.05$ y para visualizar las rutas más significativas se utilizó la plataforma KEGG “convert” y “mapper”.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Control de Calidad de las Lecturas

A partir de seis corridas correspondientes a dos réplicas biológicas por cada tratamiento (0, 3 y 25 h), se obtuvieron 48 archivos de secuenciación (ocho archivos por cada muestra analizada).

El control de calidad se realizó para disminuir errores ocurridos durante el llamado de bases; el puntaje de calidad de Phred indica la probabilidad de que una base determinada sea nombrada incorrectamente, donde un valor de 10 indica que la probabilidad de que una base sea llamada incorrectamente es de 1 en 10 (90%); un valor de 20 es de 1 en cada 100 (99%); un valor de 30, 1 base en cada 1000 (99,9%) y así sucesivamente, por lo que puntuaciones menores de 20 indican una mala calidad, de 20-30 una calidad buena/razonable y superiores a 30 indican buena calidad del llamado de bases (Ewing & Green, 1998; Li et al, 2015; Bisbal, 2015). Por lo tanto, se recortaron parte de las secuencias correspondientes a las posiciones de los bloques naranjas y rojos, obteniéndose una calidad mayor de 25. En la figura 8 se muestran las lecturas antes del corte y en la Figura 9 se muestran las secuencias después del corte, quedándonos con las secuencias con calidad más aceptable.

Otro aspecto en la calidad de las secuencias, para evitar mapeos erróneos de las lecturas con un genoma de referencia también se requiere que la longitud de las secuencias no sea menor de 20 pares de bases (Williams *et al.*, 2016), así que en el mismo filtrado de las secuencias se tomó en cuenta este aspecto, en la Figura 10 se pueden observar los datos crudos y en la Figura 11 la longitud de las secuencias de cada tratamiento después del filtrado, obteniéndose mínimo 20 pb en cada muestra.

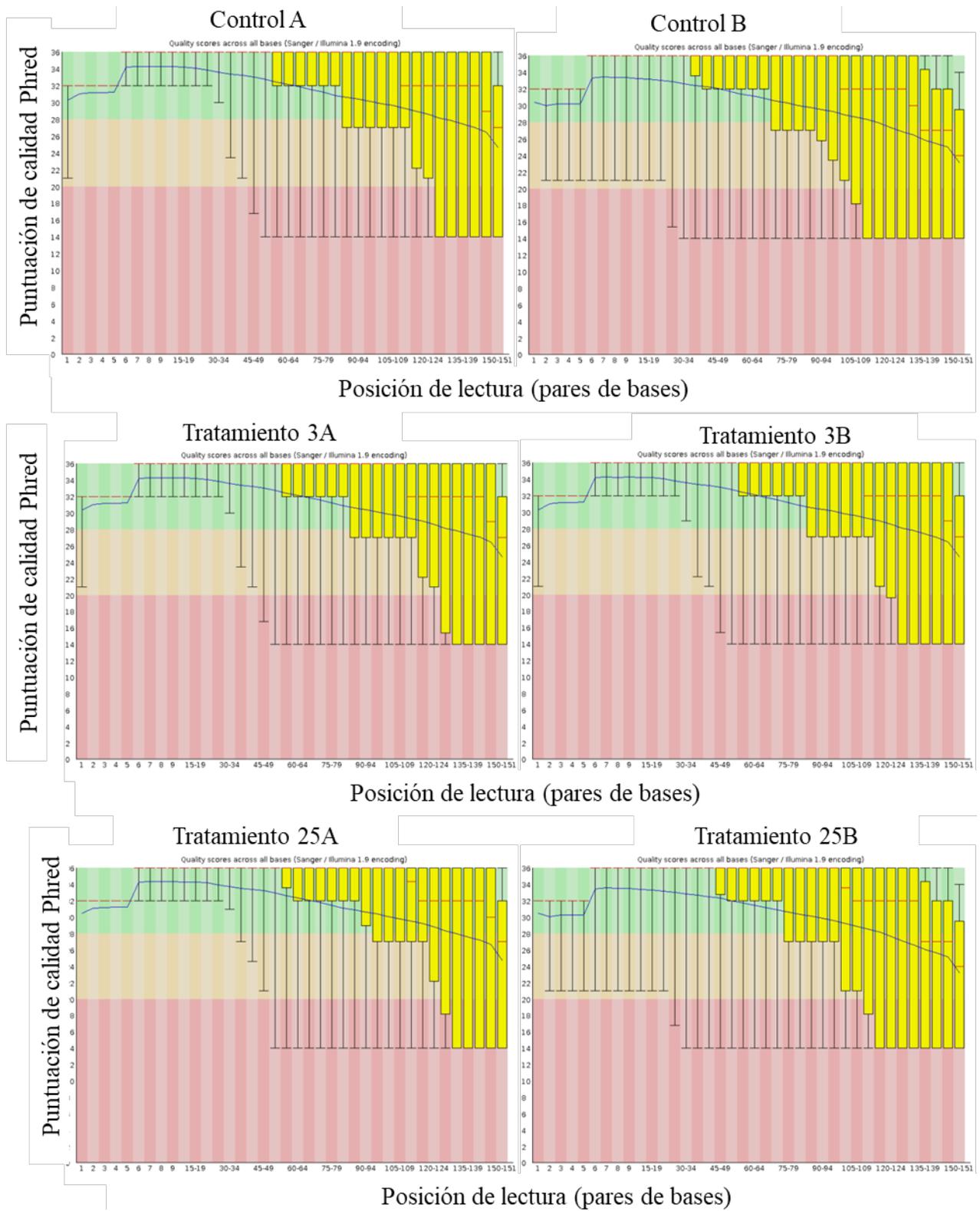


Figura 8. Análisis de calidad de las secuencias por muestra antes de recorte para control de calidad.

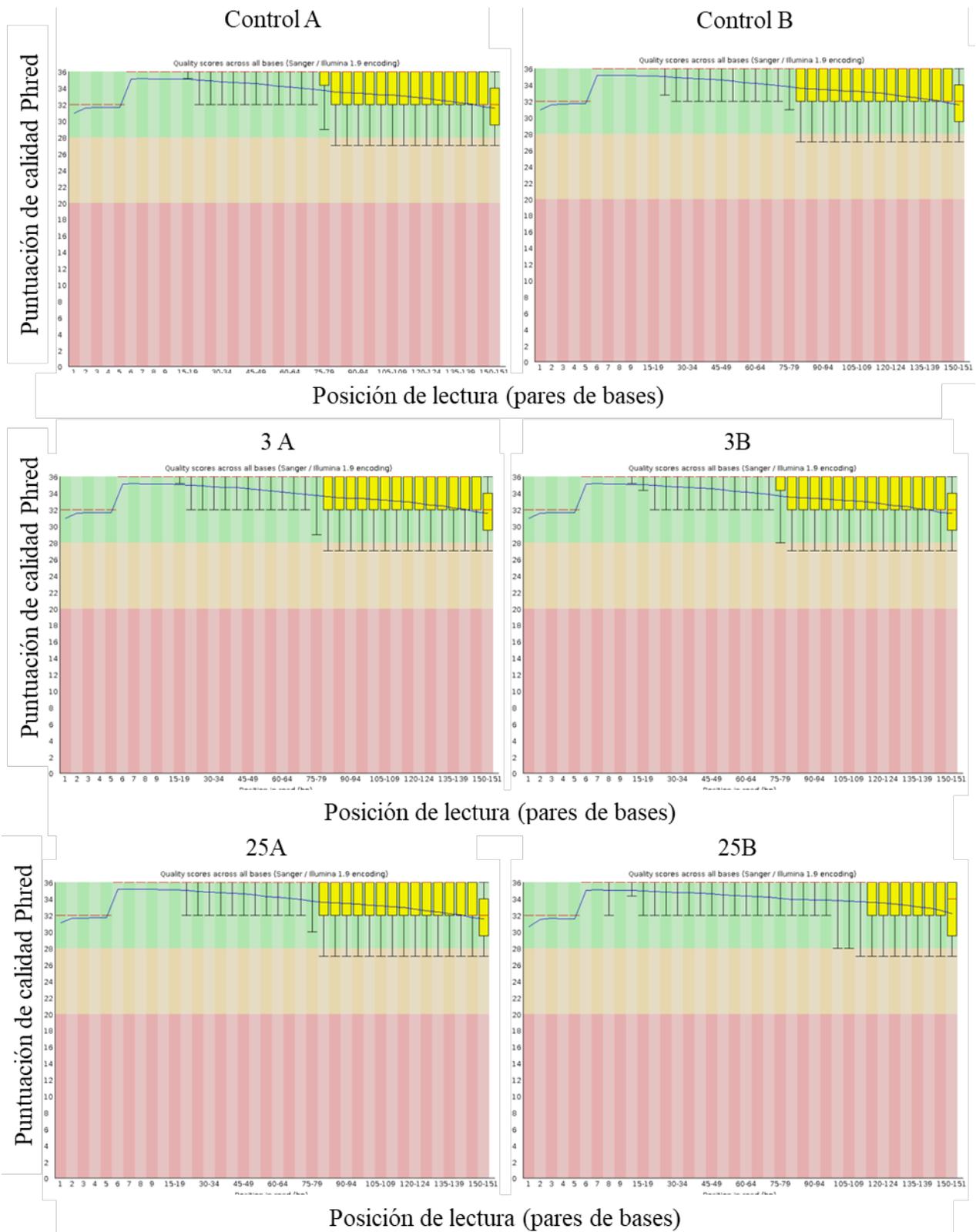


Figura 9. Análisis de calidad de las secuencias por muestra después del recorte para control de calidad.

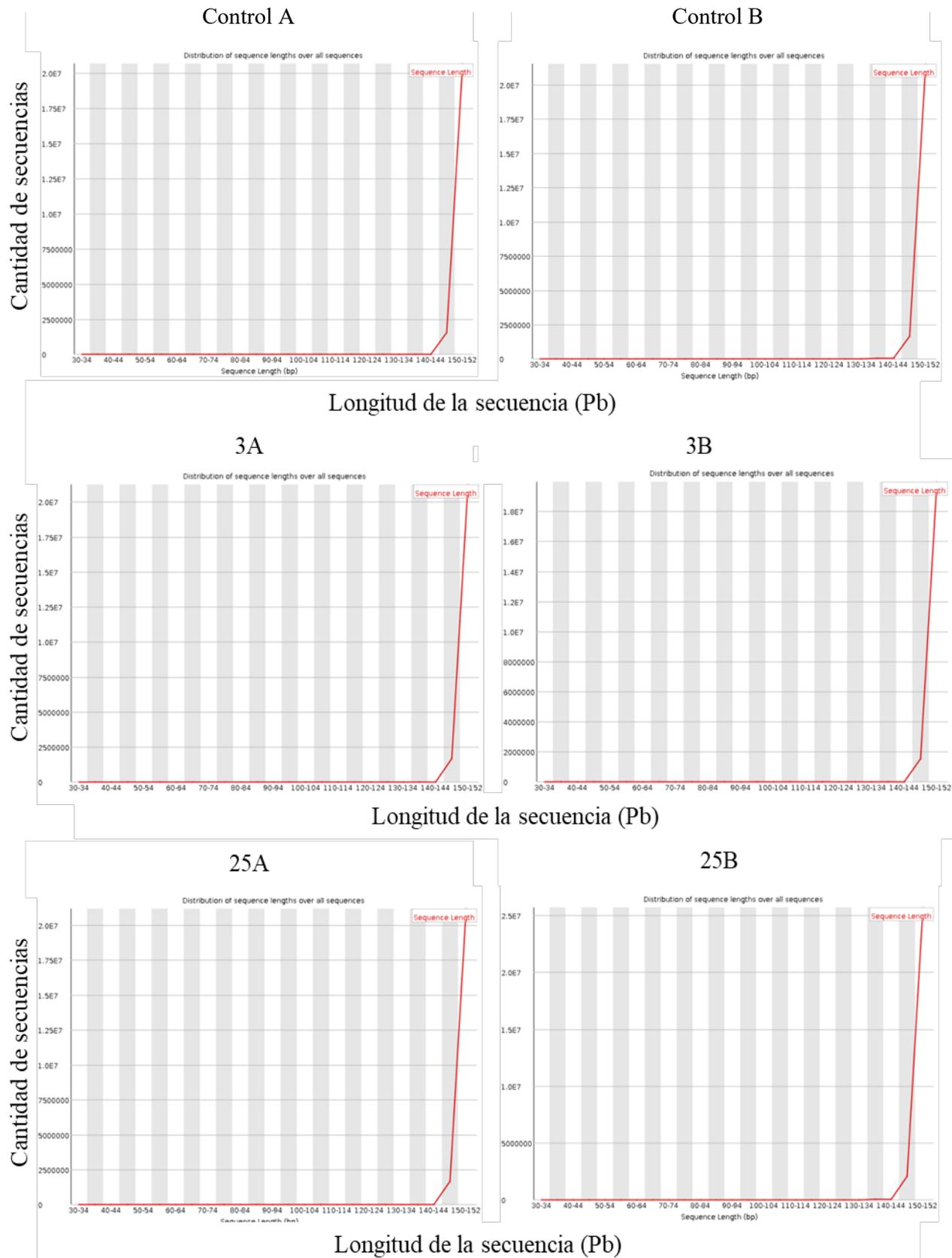


Figura 10. Distribución de la longitud de los fragmentos analizados antes del control de calidad.

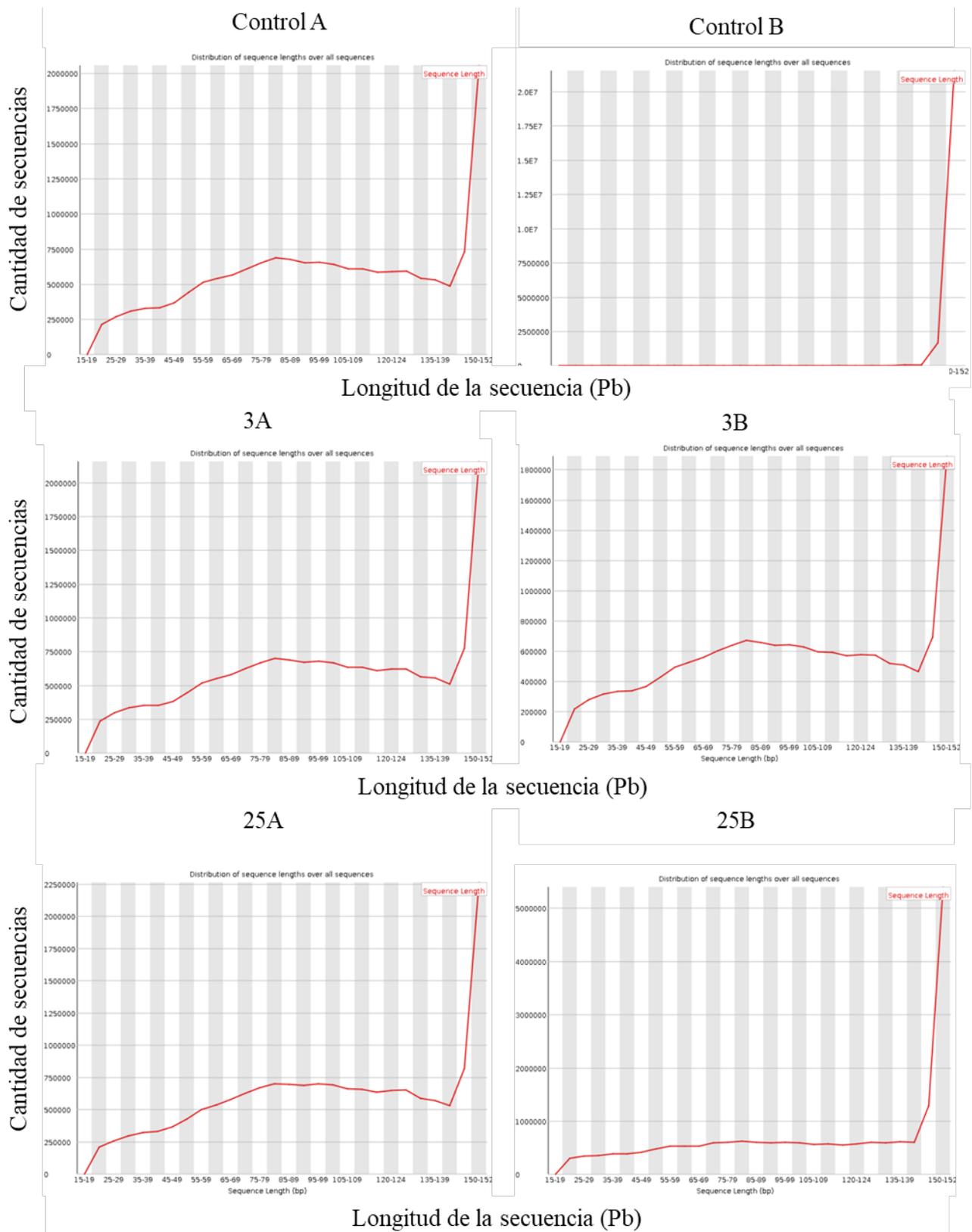


Figura 11. Distribución de la longitud de los fragmentos después del control de calidad.

En el Cuadro 3 se puede observar la cantidad de secuencias antes y después del control de calidad, donde se muestra que todos los tratamientos y el control obtuvieron más del 70% de las lecturas, las cuales están por arriba del umbral establecido que es de 30 (Schirmer *et al.*, 2016). Los tratamientos con mejor calidad fueron el control CB y el tratamiento 25A, con 72,43% y 72,34% de lecturas filtradas, respectivamente.

Cuadro 3 Cantidad de secuencias antes y después del control de calidad

ID de la Muestra	Tiempo de exposición a UV-B (h)	Réplica biológica	Secuencias totales (pb)		Lecturas filtradas (%)
			Antes del corte	Después del corte	
CA	0	1	22387045	15827597	70,70
CB	0	2	23517336	17034694	72,43
3A	3	1	23186991	16493555	71,13
3B	3	2	21719044	15361938	70,73
25A	25	1	23021773	16655002	72,34
25C	25	2	28169551	19891950	70,62

6.2 Alineamiento con Genoma de Referencia

Por consiguiente se hizo el mapeo de las lecturas provenientes del ARN-seq con el genoma de referencia de pimienta: *GCF_000710875.1_Pepper_Zunla_1_Ref_v1.0_genomic.fna* a través del programa HISAT2, en el cual se presentaron diferentes tasas de alineamiento, que se pueden observar en el Cuadro 4. El mayor porcentaje de alineamiento se mostró con el tratamiento 25A, con 54,67 % y el CA mostró el menor porcentaje de alineamiento, con 38,25%. Dobin & Gingeras (2015) mencionan que es deseable tener un porcentaje mayor al 50% de mapeo, sin embargo Morales-Mérida (2020), donde también se trabajó con secuencias de pimienta sometido a estrés abiótico, reportó algunos porcentajes de alineamiento similares a lo obtenido en este trabajo (14,09%, 32,59%, 31,13%, entre otros) y menciona que esto puede deberse a que al disminuir el número de lecturas después del recorte, también se reduce el número de lecturas mapeadas, observándose mayor diferencia en conjuntos de datos pequeños (menos de 20 millones de *reads*) (MacManes, 2014).

Cuadro 4. Tasa de secuencias mapeadas a genoma de referencia

Muestra	Alineamiento (%)
CA	38.25
CB	41.13
3 ^a	43.96
3B	45.66
25 ^a	54.67
25B	42.83

6.3. Conteo de los Transcritos

Mediante el programa Htseq-count se realizó el conteo de la abundancia de cada gen que fue mapeado con el genoma de referencia. Un ejemplo de lo resultado de este conteo se presenta en el Cuadro 5, donde se visualiza la ID de 10 genes, y el conteo de cada uno de ellos en cada tratamiento. Este conteo nos permite identificar cuántas secuencias se alinearon a una parte o al genoma completo, la cantidad de secuencias alineadas a un gen específico permite determinar su nivel de expresión génica (Rollano & Mollinedo, 2017).

Cuadro 5. Ejemplo de conteo de abundancia de algunos genes en cada tratamiento.

ID del gen	Abundancia en cada muestra					
	CA	CB	3A	3B	25A	25B
LOC107838705	215	223	384	352	577	331
LOC107838706	47	80	121	137	169	130
LOC107838707	36	35	72	54	83	55
LOC107838708	83	118	177	196	298	191
LOC107838709	15	28	32	38	27	29
LOC107838710	150	179	242	212	377	279
LOC107838711	268	321	413	477	736	500
LOC107838712	54	26	65	59	118	57
LOC107838713	58	45	87	114	144	120
LOC107838714	25	33	79	70	111	85

6.4. Análisis de Expresión Diferencial

Con la información obtenida del conteo se hizo el análisis de expresión diferencial, a través del programa Rstudio y la paquetería DESeq2. De esta manera, para analizar los conteos se realizó un análisis de componentes principales (ACP), en el que cada punto representa los conteos de cada muestra, el cual se muestra en la Figura 12. Se puede observar que hay similitud entre las réplicas biológicas de cada uno de los tratamientos, ubicándose cercanamente las dos muestras de controles, las dos muestras 3 h y las dos de 25 h. Liu et al. (2018) mencionan que se espera que las réplicas biológicas se agrupen juntas o cercanas, ya que deberían tener niveles de expresión similares, y las réplicas de diferentes tratamientos tendrían un valor distante entre sí. Si las réplicas biológicas del mismo tratamiento se posicionaran muy distanciadas entre sí, significaría que hay otra fuente o fuentes de varianza presentes en los datos, y habría que hacer otros análisis para eliminar o corregir los valores atípicos.

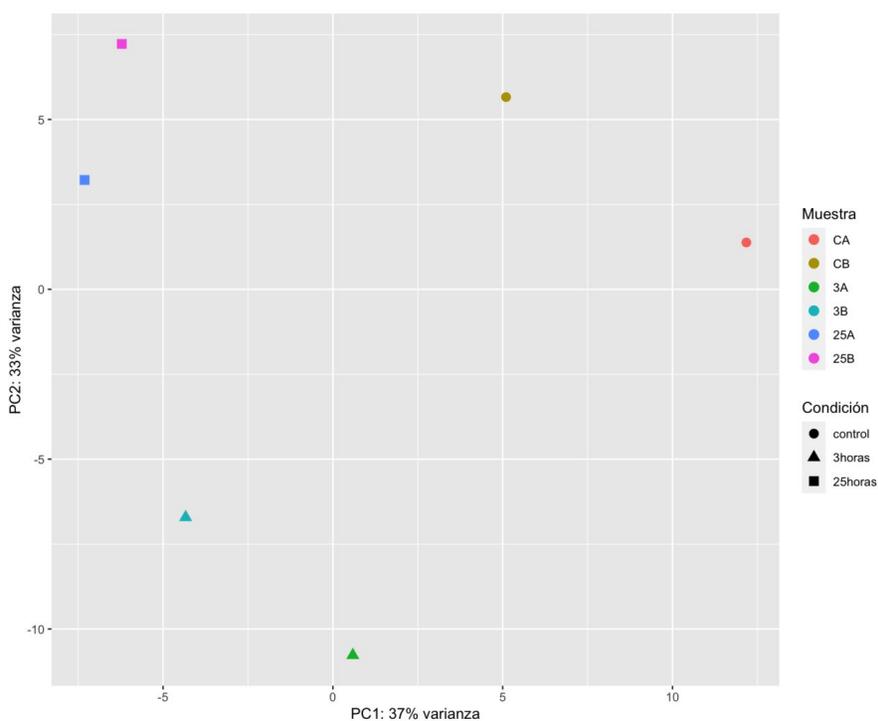


Figura 12. Análisis de componentes principales de las seis muestras. Réplicas biológicas del control, sin exposición a radiación UVB (CA y CB); réplicas biológicas expuestas a radiación UVB: 3 h (3A y 3B) y 25 h (25A y 25B).

Posteriormente se identificaron los genes de expresión diferencial, que se puede observar en los gráficos de volcán de las Figuras 13A y 13B para el tratamiento de 3 h y 25 h, respectivamente: Los iconos rojos indican los genes diferencialmente expresados; los azules son genes estadísticamente significativos ($P \leq 0,05$), pero por debajo de LFC (Log_2 Fold Change) establecido ($\pm 1,5$); los verdes representan los genes con un LFC representativo, pero estadísticamente no significativos y los grises son genes que no cumplen con ningunos de los parámetros establecidos. La gráfica de volcano permite visualizar de una manera sencilla, los genes diferencialmente expresados bajo los parámetros de significancia y LFC (Doyle, 2021)

Se encontró un total de 17782 genes expresados entre el control y los tratamientos del pimiento con UV-B. Martínez-Bastidas (2017) encontró un total de 21625 genes expresados en pimiento bajo 25 h de exposición a luz UV-B; mientras que Guzmán-Rodríguez (2018) obtuvo 14298 genes expresados en pimiento bajo 1 h de exposición de luz UV-B. Estas diferencias pueden deberse al procesamiento bioinformático de las secuencias que se siguió en cada investigación.

En el tratamiento de 3 h, 141 genes fueron expresados diferencialmente, 76 sobre-expresados y 65 inhibidos para el tratamiento (Figura 12A).

Por otro lado, en el tratamiento de 25 h se obtuvieron 118 genes diferencialmente expresados, de los cuales 45 fueron expresados positivamente y 73 expresados negativamente (Figura 12B).

Similar a estos resultados, Guzmán-Rodríguez (2018) obtuvo 133 genes expresados diferencialmente en el tratamiento de 1 h, de los cuales 100 fueron regulados positivamente y 33 regulados negativamente; y Martínez-Bastidas (2017) encontró 273 genes diferencialmente expresados en 25 h, 111 regulados positivamente y 162 regulados negativamente. Aquí es importante mencionar que el LFC que los autores anteriormente citados usaron un LFC de ± 1 , a diferencia del $\pm 1,5$ que se utilizó en este trabajo, por lo que se explica el por qué se obtuvieron menos genes diferencialmente expresados, además del procesamiento de las secuencias que utilizaron.

Se detectaron 100 genes diferencialmente expresados de manera positiva en los dos tratamientos, donde se encontró que 55 genes se sobre-expresaron exclusivamente en el tratamiento de 3 h y 24 genes en particular sólo se sobre expresaron en el tratamiento de 25 h; y 21 genes se mantuvieron expresados positivamente en ambos tratamientos (Figura 14).

Por otro lado, se encontraron 135 genes diferencialmente expresados de manera negativa en los dos tratamientos, de los cuales: 62 genes en específico se reprimieron en el tratamiento de 3 h; 70

genes en particular sólo se inhibieron en el tratamiento de 25 h; y tres genes se mantuvieron expresados negativamente en ambos tratamientos (Figura 15).

De acuerdo a Lee et al. (2005), los genes sobre-expresados juegan un papel importante en la respuesta temprana, mientras que los inhibidos participan en una respuesta tardía. En este sentido se puede observar que la mayoría de los genes sobre-expresados se detectaron a las 3 h, mientras que la mayor expresión de los genes inhibidos fue a las 25 h. Esta tendencia también se observa en los trabajos de: Guzmán-Rodríguez (2018), que a 1 h predominaron los genes sobre-expresados; Martínez-Bastidas (2017), donde en 25 h predominó la expresión de genes inhibidos; y con Morales-Mérida (2020), donde en una combinación de estrés UV-B y frío también encontró mayor cantidad de genes expresados positivamente a 3 h y mayoría de genes regulados negativamente a las 25 h.

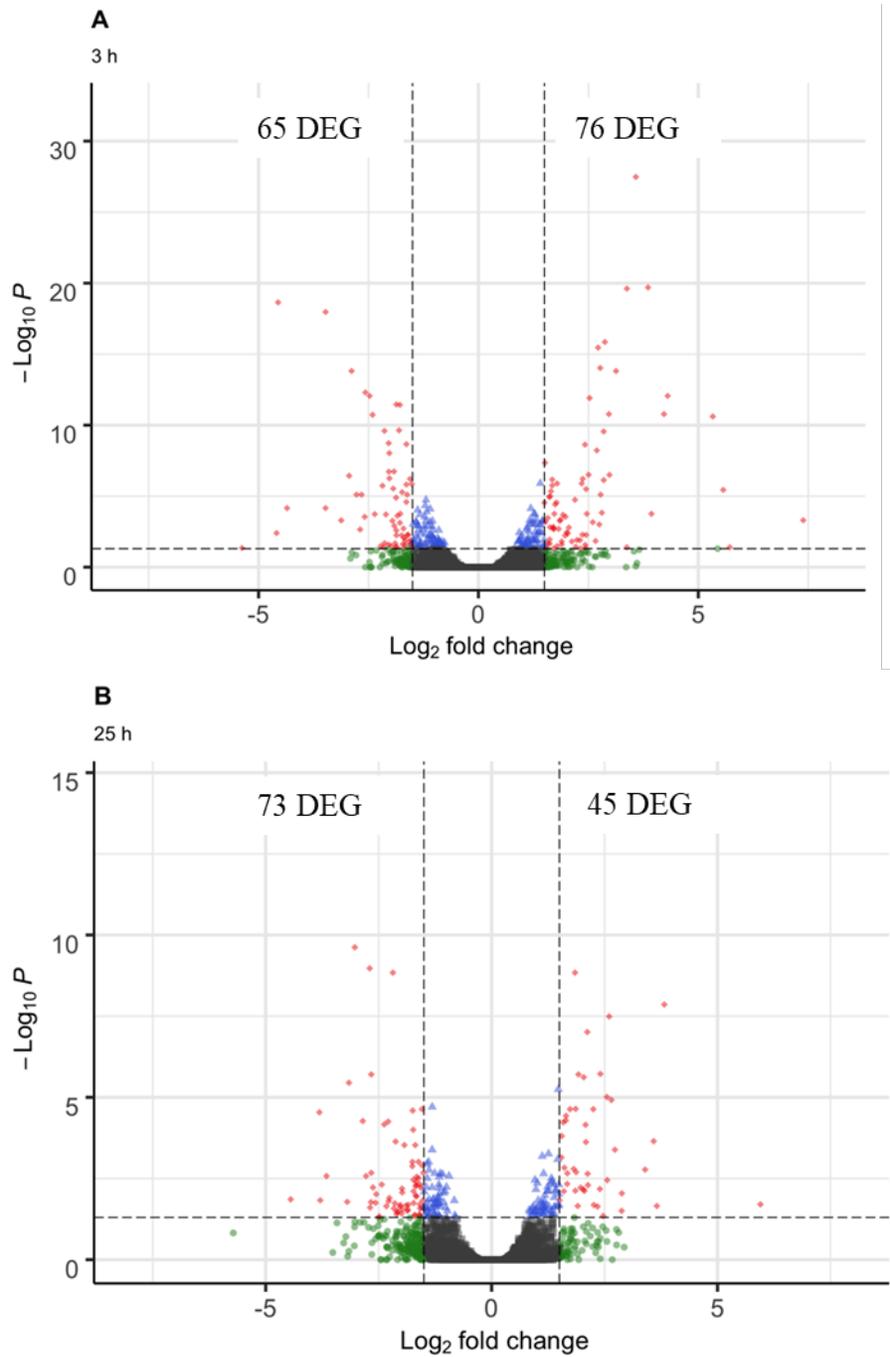


Figura 13. Gráfico de volcán de genes diferencialmente expresados a 3 h (A) y 25 h (B) h de tratamiento con UVB.

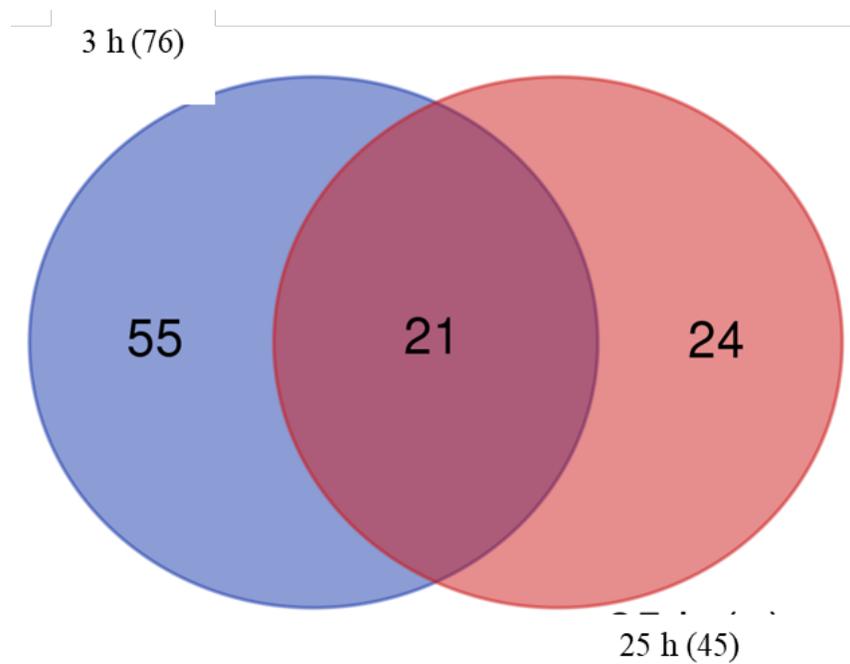


Figura 14. Diagrama de genes expresados positivamente en los tratamientos 3 y 25 h con UV-B.

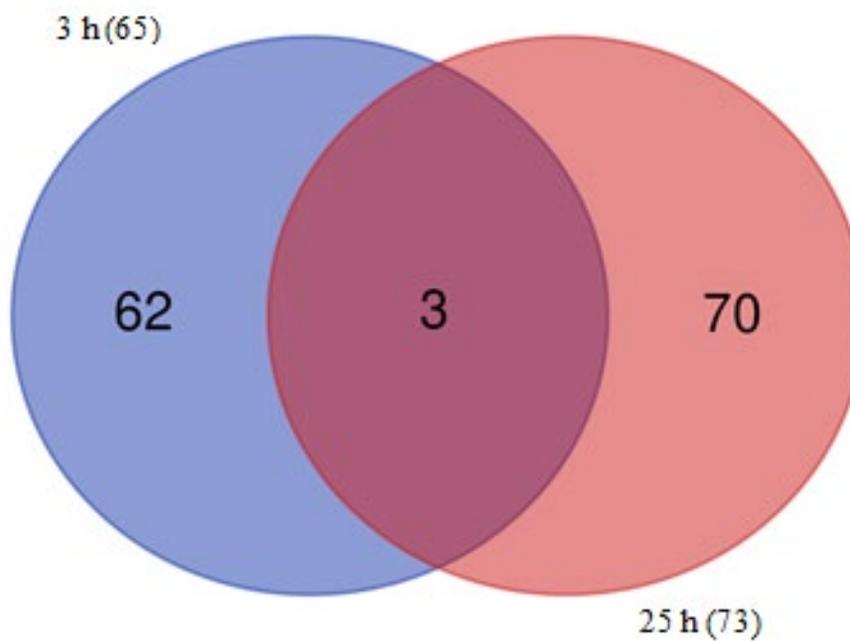


Figura 15. Diagrama de genes expresados negativamente en tratamientos 3 y 25 h con UVB.

6.5 Anotación Funcional de los Genes

6.5.1. Anotación Funcional con Panther GO

Respecto a la anotación funcional de los genes diferencialmente expresados, se realizó el análisis de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente con la plataforma UNIPROTK, relacionando el gen con la proteína que codifica. Posteriormente se visualizó la clasificación de dicho análisis respecto a las categorías de función molecular, componentes celulares y procesos biológicos mediante la plataforma de Panther GO.

Para el tratamiento de 3 h, respecto a la función molecular, se encontraron 11 genes sobre-expresados y 7 genes inhibidos en las categorías de: unión (GO:0005488), actividad catalítica (GO:0003824), regulador de la función molecular (GO:0098772) y actividad transportadora (GO:0005215) (Figura 16, Cuadro 6).

Para la clasificación de proceso biológico en el tratamiento de 3 h, se identificaron 21 genes sobre-expresados y 16 genes inhibidos, dentro de las categorías de: regulación biológica (GO:0065007), proceso celular (GO:0009987), procesos metabólicos (GO:0008152), respuesta a estímulos (GO:0050896) proceso rítmico (GO:0050896) y señalización (GO:0023052) (Figura 17, Cuadro 7). Para la ontología en componente celular, el tratamiento de 3 h mostró 12 genes sobre-expresados y 11 genes inhibidos en las categorías de: entidad anatómica celular (GO:0110165) e intracelular (GO:0005622) (Figura 18, Cuadro 8).

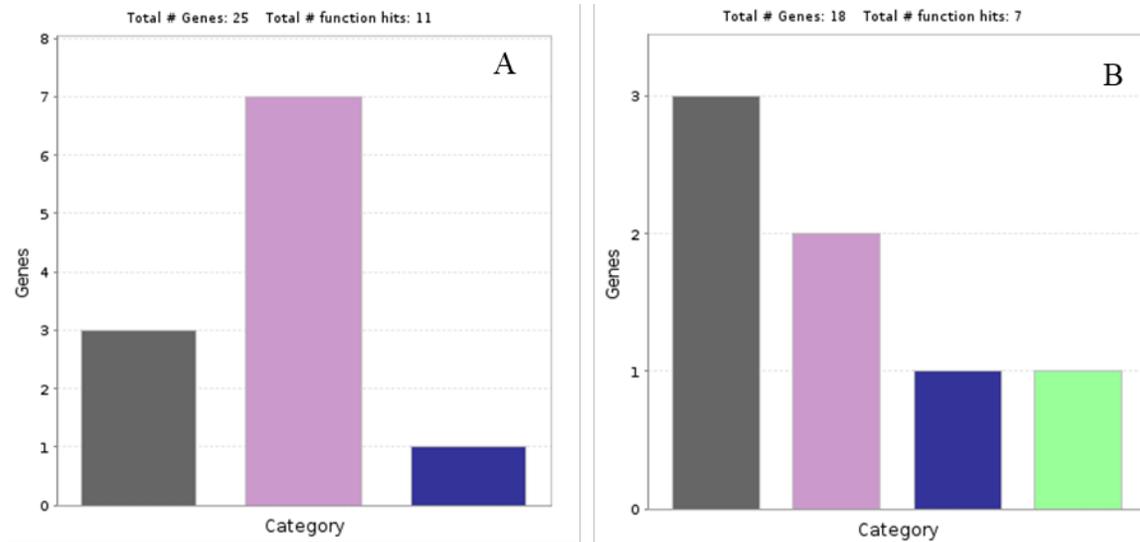


Figura 16. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por función molecular. Color gris: unión; morado: actividad catalítica; azul: función de regulador molecular; verde: actividad transportadora.

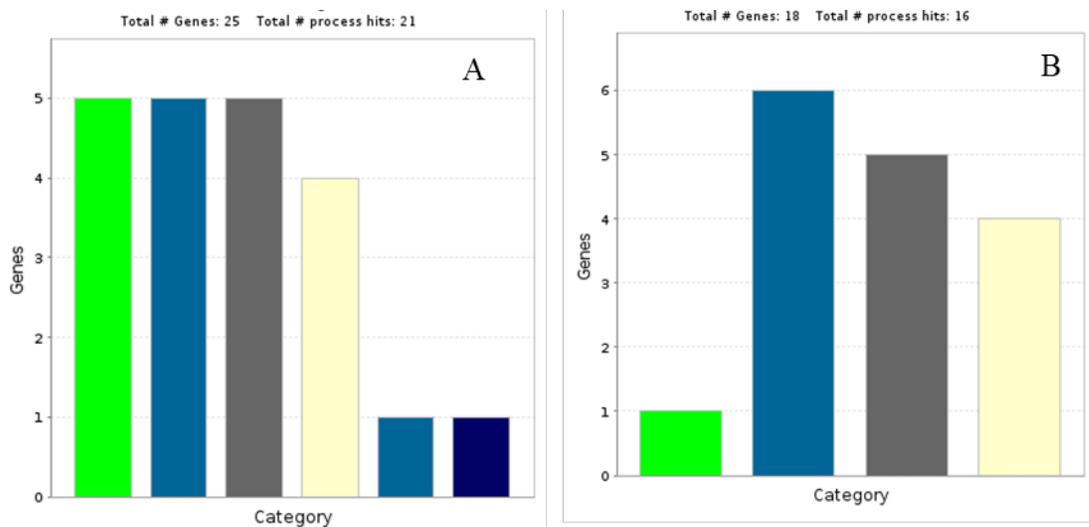


Figura 17. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso biológico. Color verde: regulación biológica; azul claro: proceso biológico; gris: procesos metabólicos; azul intermedio: proceso rítmico; azul oscuro: señalización; amarillo: respuesta a estímulos.

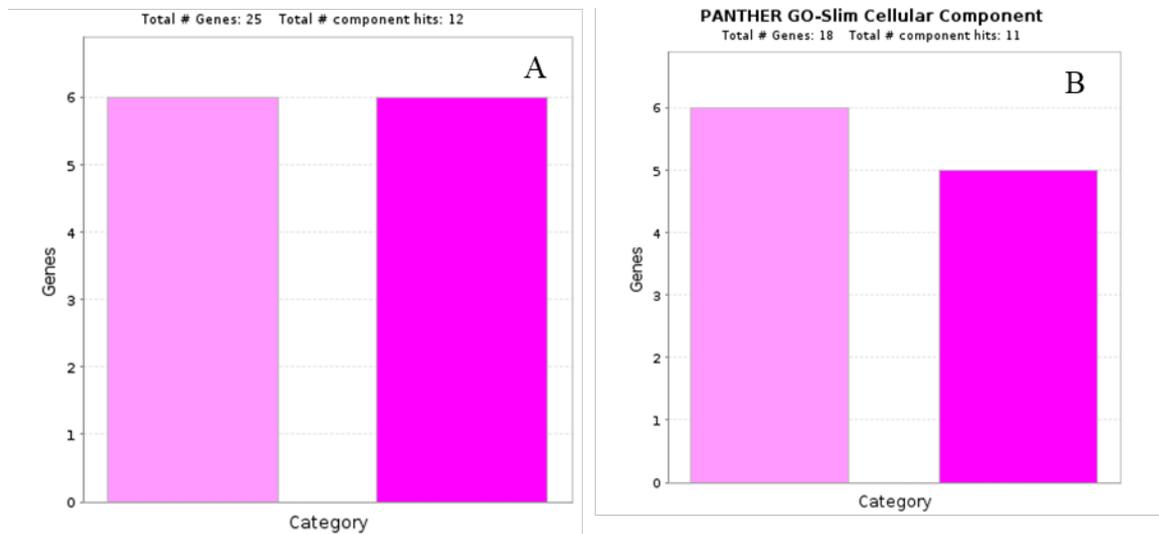


Figura 18. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso componente celular. Color rosa claro: entidad anatómica celular; rosa oscuro: intracelular.

En el tratamiento de 25 h, en la función molecular, se identificaron un gen sobre-expresado y 12 genes inhibidos en las categorías: de unión (GO:0005488), actividad catalítica (GO:0003824), regulador de la función molecular (GO:0098772) y actividad transportadora (GO:0005215) (Figura 19, Cuadro 6). Respecto a procesos biológicos, en el tratamiento de 25 h, se identificaron un gen sobre-expresados y 8 genes inhibidos en las categorías de: respuesta a estímulos (GO:0050896), procesos celulares (GO:0009987) y procesos metabólicos (GO:0008152) (Figura 20, Cuadro 7). Para la clasificación de procesos biológicos en el tratamiento de 25 h, se identificaron 7 genes sobre-expresados y 17 genes inhibidos en las categorías de: entidad celular anatómica (GO:0110165) e intracelular (GO:0005622) (Figura 21, Cuadro 8).

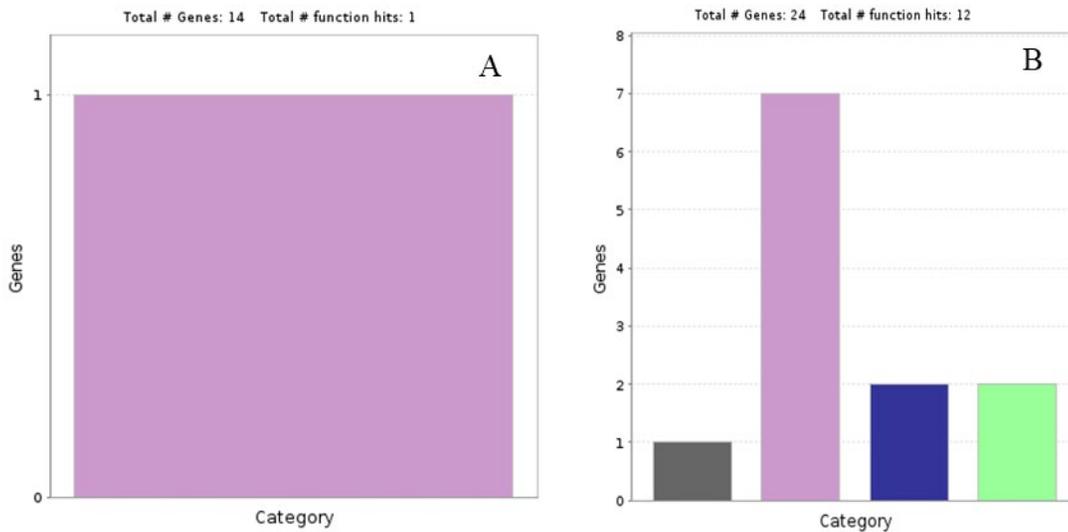


Figura 19. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 25 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO. Color gris: unión; morado: actividad catalítica; azul: función de regulador molecular; verde: actividad transportadora.

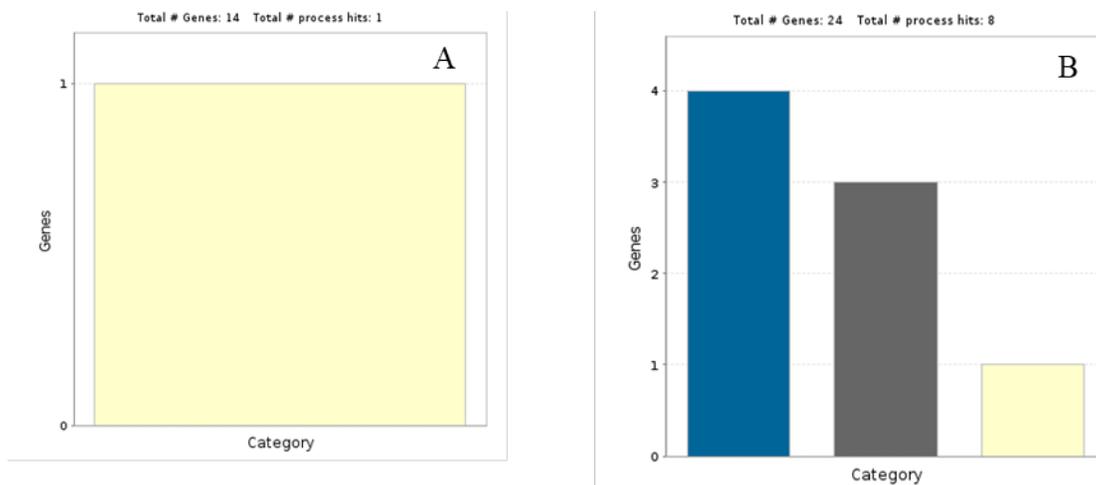


Figura 20. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 3 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso biológico. Color azul: proceso biológico; gris: procesos metabólicos; amarillo: respuesta a estímulos.

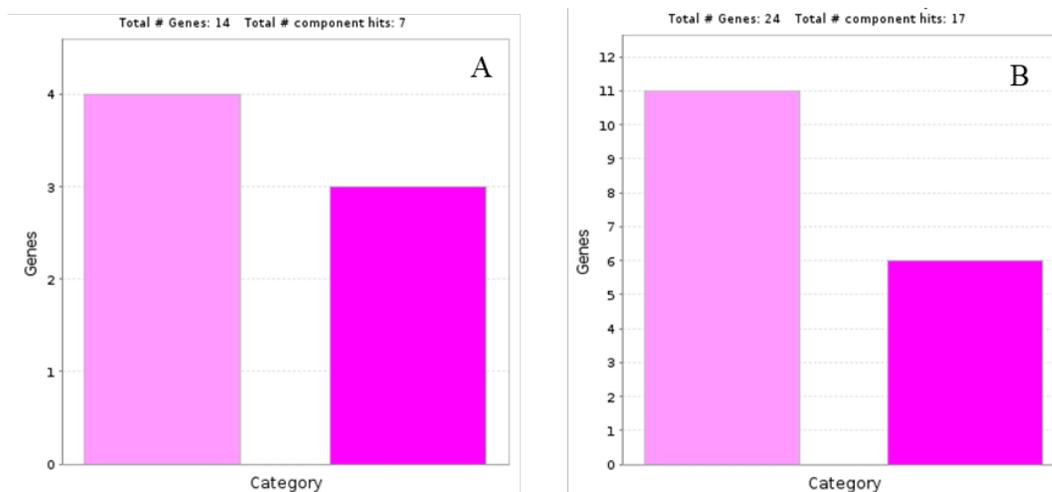


Figura 21. Análisis de enriquecimiento de genes sobre-expresados (A) e inhibidos (B) en tratamiento de 25 h de UV-B en pimiento en plataforma Panther GO, por proceso componente celular. Color rosa claro: entidad anatómica celular; rosa oscuro: intracelular.

No hay descripción para estos cuadros en el texto, describir algo o destacar algunos genes en particular

En los Cuadros 6, 7 y 8 se pueden observar los diferentes genes representados en las categorías de función molecular, proceso biológico y componente celular, mostrados anteriormente en gráficos de barras.

Cuadro 6. Genes identificados por su función molecular

Tratamiento	ID del Gen	Nombre del gen	log2FoldChange	FDR
3 h sobre-expresados	107875053	Uncharacterized protein	5,715	0,040
	107859548	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	2,979	0,000
	107847728	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	2,849	0,000
	107855506	3Beta_HSD domain-containing protein	2,806	0,000
	107838775	Cytochrome b561 domain-containing protein	2,240	0,012
	107840273	Protein DJ-1-like protein C	1,620	0,022
	107850859	Nudix hydrolase 8	1,619	0,011
	107839268	Common plant regulatory factor 1	2,372	0,000
	107850859	Nudix hydrolase 8	1,619	0,011
	107871130	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	2,600	0,001
3 h	107870215	Heat shock cognate 70 kDa protein	-3,476	0,000

inhibidos	107863805	Heat stress transcription factor A-2b (Heat stress transcription factor A-6b)	-3,120	0,001
	107839203	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	-2,026	0,000
	107843078	Aquaporin PIP2-1	-1,939	0,000
25 h sobre- expresados	107847728	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	2,124	0,002
25 h inhibidos	107872517	Laccase (EC 1.10.3.2) (Benzenediol:oxygen oxidoreductase) (Diphenol oxidase) (Urishiol oxidase)	-3,793	0,015
	107861303	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	-3,656	0,003
	107842777	Laccase (EC 1.10.3.2) (Benzenediol:oxygen oxidoreductase) (Diphenol oxidase) (Urishiol oxidase)	-2,665	0,000
	107873122	TPT domain-containing protein	-2,263	0,013
	107848513	TPT domain-containing protein	-1,977	0,028
	107877568	Cellulose synthase (EC 2.4.1.12)	-1,931	0,000
	107845684	Pectinesterase (EC 3.1.1.11)	-1,853	0,029
	107863469	Protein ESKIMO 1	-1,585	0,026

Cuadro 7. Genes identificados por proceso biológico

Tratamiento	ID del Gen	Nombre del gen	log2FoldChange	padj
3 h sobre- expresados	107840400	Protein EARLY FLOWERING 4	2,748	0,001
	107871130	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	2,600	0,001
	107839268	Common plant regulatory factor 1	2,372	0,000
	107856761	Calvin cycle protein CP12-2, chloroplastic	1,849	0,001
	107850859	Nudix hydrolase 8	1,619	0,011
	107871130	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	2,600	0,001
	107839268	Common plant regulatory factor 1	2,372	0,000
	107856761	Calvin cycle protein CP12-2, chloroplastic	1,849	0,001
	107840273	Protein DJ-1-like protein C	1,620	0,022
	107850859	Nudix hydrolase 8	1,619	0,011
	107875053	Uncharacterized protein	5,715	0,040
	107871130	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	2,600	0,001
	107839268	Common plant regulatory factor 1	2,372	0,000
	107856761	Calvin cycle protein CP12-2, chloroplastic	1,849	0,001
	107840273	Protein DJ-1-like protein C	1,620	0,022
	107840400	Protein EARLY FLOWERING 4	2,748	0,001
107850859	Nudix hydrolase 8	1,619	0,011	
3 h	107870215	Heat shock cognate 70 kDa protein	-3,476	0,000

inhibidos	107863805	Heat stress transcription factor A-2b (Heat stress transcription factor A-6b)	-3,120	0,001
	107839203	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	-2,026	0,000
	107867983	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	-1,920	0,000
	107855771	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	-1,868	0,000
	107855767	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	-1,516	0,000
25 h sobre-expresados	107860006	Abscisic acid and environmental stress-inducible protein TAS14	1,646	0,000
25 h inhibidos	107872265	TPX2 domain-containing protein	-4,448	0,014
	107861303	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	-3,656	0,003
	107842225	Fasciclin-like arabinogalactan protein 11	-3,159	0,000
	107839853	Glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 3	-2,554	0,010
	107839216	Ferric reduction oxidase 2	-2,377	0,000
	107877568	Cellulose synthase (EC 2.4.1.12)	-1,931	0,000

Cuadro 8. Genes identificados por componente celular

Tratamiento	ID del gen	Nombre del gen	log2FoldChange	FDR
3 h sobre-expresados	107847728	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	2,849	0,000
	107871130	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	2,600	0,001
	107839268	Common plant regulatory factor 1	2,372	0,000
	107856761	Calvin cycle protein CP12-2, chloroplastic	1,849	0,001
	107860006	Abscisic acid and environmental stress-inducible protein TAS14	1,789	0,000
	107840273	Protein DJ-1-like protein C	1,620	0,022
	107847728	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	2,849	0,000
	107871130	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	2,600	0,001
	107839268	Common plant regulatory factor 1	2,372	0,000
	107856761	Calvin cycle protein CP12-2, chloroplastic	1,849	0,001
	107860006	Abscisic acid and environmental stress-inducible protein TAS14	1,789	0,000
	107840273	Protein DJ-1-like protein C	1,620	0,022
3 h inhibidos	107870215	Heat shock cognate 70 kDa protein	-3,476	0,000
	107863805	Heat stress transcription factor A-2b (Heat stress transcription factor A-6b)	-3,120	0,001
	107839203	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	-2,026	0,000
	107843078	Aquaporin PIP2-1	-1,939	0,000
	107855771	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	-1,868	0,000
	107855767	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	-1,516	0,000

25 h sobre- expresados	107847728	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	2,124	0,002
	107855317	Putative GABA transporter 2	1,816	0,002
	107860006	Abscisic acid and environmental stress- inducible protein TAS14	1,646	0,000
	107875881	BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 2	1,610	0,001
25 h inhibidos	107872265	TPX2 domain-containing protein	-4,448	0,014
	107861303	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	-3,656	0,003
	107842225	Fasciclin-like arabinogalactan protein 11	-3,159	0,000
	107857302	Phycocyanin domain-containing protein	-2,670	0,017
	107839853	Glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 3	-2,554	0,010
	107839216	Ferric reduction oxidase 2	-2,377	0,000
	107873122	TPT domain-containing protein	-2,263	0,013
	107848513	TPT domain-containing protein	-1,977	0,028
	107877568	Cellulose synthase (EC 2.4.1.12)	-1,931	0,000
	107863469	Protein ESKIMO 1	-1,585	0,026

6.5.2 Anotación Funcional Mediante KEGG

Se analizaron los genes diferencialmente expresados mediante la plataforma de genes y genomas de Kyoto (KEGG), donde para el tratamiento de 3 h, los genes diferencialmente expresados mostraron estar participando en el ritmo circadiano de la planta ([cann04712](#)) y en el metabolismo de tiamina ([cann00730](#)), mientras que se muestra inhibición en los mecanismos de procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático ([cann04141](#)), en fotosíntesis (proteínas antena) ([cann00196](#)), endocitosis, espliceosoma ([cann03040](#)) y metabolismo del sulfuro ([cann00920](#)) (Figura 22, Cuadros 9 y 10).

Para el tratamiento de 25 h se encontró posible participación en el metabolismo de almidón y sacarosa, biosíntesis de diterpenoides, ritmo circadiano, metabolismo de clorofila y porfirina, metabolismo de pirimidina y biosíntesis de zeatina, sin embargo los valores no alcanzaron a ser significativos (Figura 22, Cuadro 11).

Las plantas regulan molecularmente su actividad biológica en respuesta a fluctuaciones ambientales, como temperatura, humedad y la luz. Estos ritmos se conectan en el reloj circadiano endógeno de las plantas, resultando en una red regulatoria que asegura que los compuestos fitoquímicos sean altamente adaptativos a las necesidades de la planta en el momento que se requieran (Liebelt *et al.*, 2019).

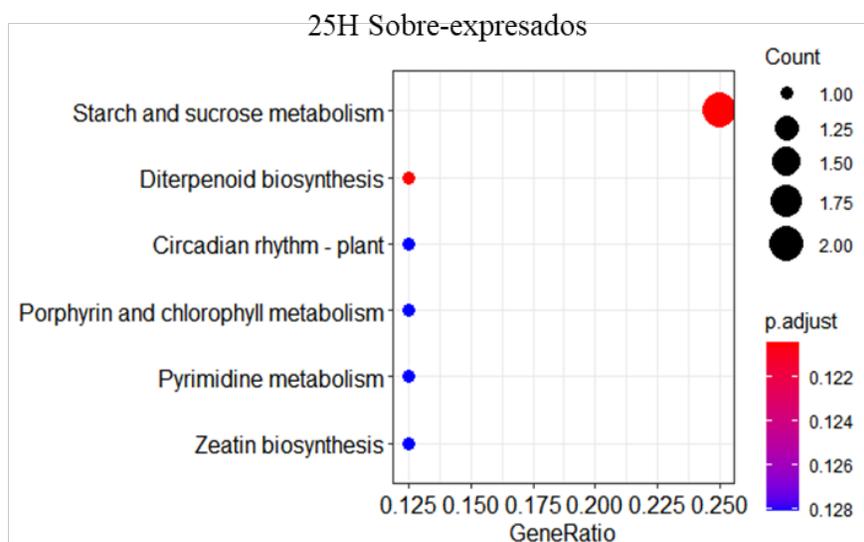
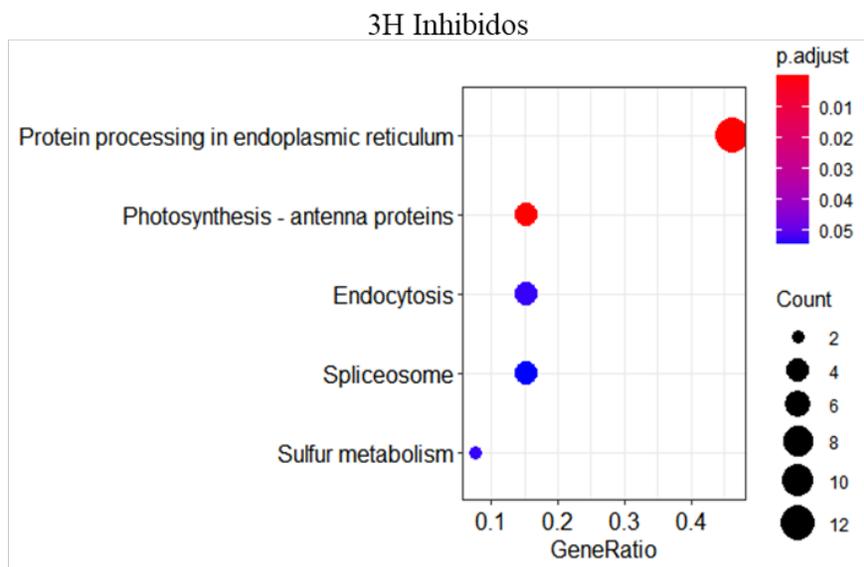
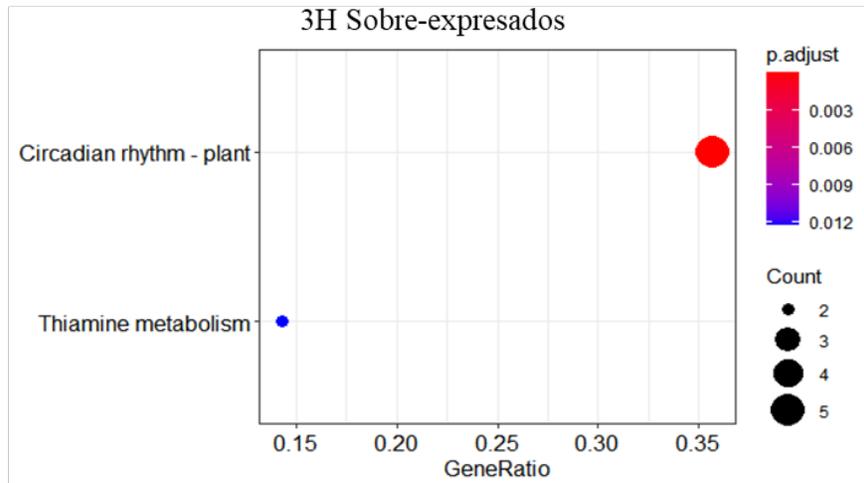


Figura 22. Análisis de expresión diferencial de genes mediante mapa de enriquecimiento de KEGG.

Cuadro 9. Genes identificados en mapa de enriquecimiento de KEGG en tratamiento 3 h inhibidos.

Tratamiento	Ruta KEGG	ID de Gen	Nombre del gen	P- ajustada de ruta	LFC	FDR	
3h inhibidos	Procesamiento de proteínas en retículo endoplasmático	107845249	heat shock cognate protein 80-like isoform X1	0.01	-1,735868	5,20E-06	
		107847347	heat shock cognate 70 kDa protein	0.01	-4,555617	2,27E-19	
		107848686	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like	0.01	-1,785442	0,000749	
		107862597	17.3 kDa class II heat shock protein	0.01	-2,408249	1,86E-11	
		107863044	small heat shock protein, chloroplastic	0.01	-1,542072	0,0235354	
		107863207	heat shock protein 83-like	0.01	-2,474477	8,72E-13	
		107867608	Mitochondrial small heat shock protein	0.01	-1,842222	0,0002389	
		107867615	small heat shock protein, chloroplastic-like	0.01	-1,849386	0,039511	
		107870215	Heat shock cognate 70 kDa protein	0.01	-3,47586	1,07E-18	
		107873403	heat shock protein 83	0.01	-2,941222	3,68E-07	
		107875505	17.7 kDa class I heat shock protein-like	0.01	-1,895176	0,0208338	
		107875543	heat shock cognate 70 kDa protein 1	0.01	-2,884921	1,53E-14	
		Espliceosoma	107847347	heat shock cognate 70 kDa protein	0.05	-4,555617	2,27E-19
			107848686	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like	0.05	-1,785442	0,000749
107870215	Heat shock cognate 70 kDa protein		0.05	-3,47586	1,07E-18		
107875543	heat shock cognate 70 kDa protein 1		0.05	-2,884921	1,53E-14		
Fotosíntesis - Proteínas antena	107855767	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	0.01	-1,515753	1,38E-06		
	107855771	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	0.01	-1,867817	3,47E-12		
	107855779	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	0.01	-1,556364	6,10E-07		
	107867983	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	0.01	-1,920244	1,84E-07		
Endocitosis	107847347	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like	0.05	-1,785442	0,000749		
	107848686	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like	0.05	-1,785442	0,000749		
	107870215	Heat shock cognate 70 kDa protein	0.05	-3,47586	1,07E-18		
	107875543	heat shock cognate 70 kDa protein 1	0.05	-2,884921	1,53E-14		
Metabolismo de sulfuro	107839203	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	0.05	-2,026404	9,33E-09		
	107859594	5'-adenylylsulfate reductase 3, chloroplastic	0.05	-2,137154	2,54E-10		

Cuadro 10. Genes identificados en mapa de enriquecimiento de KEGG en tratamiento 3 h sobre-expresados.

Tratamiento	Ruta KEGG	ID de Gen	Nombre del gen	P- ajustada de ruta	LFC	FDR
3h sobre-expresados		107838759	adagio protein 3	0.003	2,4236895	2,36E-09
		107850670	E3 ubiquitin-protein ligase COP1-like	0.003	1,5013237	2,85E-05
	Ritmo circadiano	107850996	Chalcone synthase (EC 2.3.1.74)	0.003	1,8939735	0,0248445
		107862265	two-component response regulator-like APRR1 isoform X2	0.003	2,6914017	6,00E-09
		107862999	Two-component response regulator-like APRR9	0.003	2,5280197	1,23E-12
	Metabolismo de tiamina	107850768	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (EC 2.2.1.7)	0.012	1,6086053	1,12E-05
		107873461	phosphomethylpyrimidine synthase, chloroplastic	0.012	3,5797049	3,33E-28

Cuadro 11. Genes identificados en mapa de enriquecimiento de KEGG en tratamiento 25 h sobre-expresados.

Tratamiento	Ruta KEGG	ID de Gen	Nombre del gen	P- ajustada de ruta	LFC	FDR
25h sobre-expresados	Biosíntesis de zeatina	107845158	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	0.128	2,031	0,00684
	Metabolismo de almidón y sacarosa	107845435	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (EC 1.3.1.33)	0.122	1,671	0,00466
		107877529	probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	0.122	1,735	2,31E-05
	Metabolismo de pirimidina	107852040	gibberellin 2-beta-dioxygenase 1-like	0.128	1,845	1,44E-09
	Metabolismo de porfirina y clorofila	107862999	Two-component response regulator-like APRR9	0.128	1,921	1,97E-06
	Biosíntesis de diterpenoides	107866467	MazG domain-containing protein	0.122	2,47	0,04517
	Ritmo circadiano	107869091	Beta-amylase (EC 3.2.1.2)	0.128	1,598	0,00782

7. CONCLUSIONES

Se realizó el análisis transcriptómico del efecto de la radiación UV-B en tallos de *C. annuum* expuestos a 3 y 25 h. La anotación funcional de los genes identificados indicó que los genes están asociados con el ritmo circadiano de la planta, metabolismo de tiamina, metabolismo de sulfuro, procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, fotosíntesis, endocitosis y espliceosoma. En estas categorías, se observó que los genes están relacionados con funciones como señalización del estrés, respuesta a estímulos y regulación de la función biológica. Se puede asumir que el tratamiento 3 h tiene comportamiento de respuesta temprana al estrés, ya que se observaron genes relacionados a la señalización de estrés.

8. RECOMENDACIONES

Las perspectivas a partir de este trabajo se orientan en corroborar los genes expresados diferencialmente que participan en la respuesta al estrés por UV-B.

Así como complementar los datos transcriptómicos con estudios donde se caractericen proteínas y metabolitos presentes en la respuesta al estrés por UV-B.

Otra recomendación es realizar investigaciones con mayores tiempos de exposición al estrés, para observar la respuesta tardía y comprender mejor cómo se genera la respuesta al estrés UV-B en *C. annuum*.

9. REFERENCIAS

- Aguilera P., Ruiz T. M., Rocha M. M. G., Pineda O. B. & Chánez C. M. E. 2014. PCR en Tiempo Real. En: Cornejo R. A., Serrato D. A., Rendón A. B. & Rocha M. M. G. (eds.). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT), CDMX, México, 175-201 pp.
- Aidoo M. K., Sherman T., Ephrath J. E., Fait A., Rachmilevitch S., & Lazarovitch N. 2018. Grafting as a Method to Increase the Tolerance Response of Bell Pepper to Extreme Temperatures. *Vadose Zone Journal*, 17(1), 170006. doi:10.2136/vzj2017.01.0006.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., & Walter P. (2015). *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group. Sexta edición. Estados Unidos. 1342 pp.
- Binkert M., Kozma-Bognar L., Tereskei K., De Veyler L., Nagy F. & Ulm R. 2014. UV-B-Responsive Association of the *Arabidopsis* bZIP Transcription Factor ELONGATED HYPOCOTYL5 with Target Genes, Including Its Own Promoter. *The Plant Cell*. 26:4200-4213.
- Bray E. A., Baiey-Serres J. & Weretilnyk E. 2000. Responses to Abiotic Stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Grissem, W. y Jones, R. American Society of Plant Physiologists.
- Brechtbuehl K., Whalley S. A., Dusheiko G. M. & Saunders N. A. 2001. A rapid realtime quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods*. 93:105-113.
- Britt A. B. 1995. Repair of DNA Damage Induced by Ultraviolet Radiation. *Plant Physiology*. 108:891-896.
- Buchanan B. Bob, Grisse W. & Jones L. R. 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Ltd. Segunda edición. Reino Unido. 1099 pp.
- Christie J. M., Arvai A. S., Baxter K. J., Heilmann M., Pratt A. J., O'Hara A., Kelly S. M., Hothorn M., Smith B. O., Hitomi K., Jenkins G. & Getzoff E. D. 2012. Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science*. 23:335.
- Chunthawodtiporn J., Hill T., Stoffel K., & Van Deynze A. 2018. Quantitative Trait Loci Controlling Fruit Size and Other Horticultural Traits in Bell Pepper (*Capsicum annuum*). *The Plant Genome*. 11(1):160125. doi:10.3835/plantgenome2016.12.0125.
- Coolen, S., Proietti, S., Hickman R., Davila O. N. H., Ping-Ping H., VanVerk M. C., Van Pelt J. A., Wittenberg A. H. J., De Vos M., Prins M., Van Loon J. J. A., Aarts M. G. M., Dicke M., Pieterse C. M. J. & Van Wees S. C. M. 2016. Transcriptome dynamics of *Arabidopsis* during sequential biotic and abiotic stresses. *The Plant Journal*. 86:249-267.
- Dobin A. & Gingeras T. R. 2015. Mapping RNA-seq reads with STAR. *Current Protocols in Bioinformatics*. 15:1-23.

- Doyle M. 2021. Visualization of RNA-Seq results with Volcano Plot (Galaxy Training Materials). Recuperado de: <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/transcriptomics/tutorials/rna-seq-viz-with-volcanoplot/tutorial.html>.
- Egan A., & Schlueter D. J. 2012. Spooner: Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *American Journal of Botany*. 99(2):175-185.
- FAOSTAT. 2018. Datos de cultivos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estados Unidos. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Favory J. J., Stec A., Gruber H., Rizzini L., Oravec A., Funk M., Albert A., Cloix C., Jenkins G. I., Oakeley E., Seidlitz H. K., Nagy F. & Ulm R. 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*. 28:591-601.
- Frohnmeier H. & Staiger D. 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology*. 133:1420-1428.
- Garber M., Grabherr M. G., Guttman M., & Trapnell C. 2011. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*. 8(6):469-477. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1613>.
- González B. M. A. & Ulm R. 2013. ATR and MKP1 play distinct roles in response to UV-B stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 73:1034-1043.
- González B. M. A., Bartels S., Albert A. & Ulm R. 2011. *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. 68:727-737.
- Gruber H., Heijde M., Heller W., Albert A., Seidlitz H. K. & Ulm R. 2010. Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(46):20132-20137.
- Guzmán-Rodríguez M. E. 2018. Estudio transcriptómico de la respuesta temprana del pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones de estrés por radiación UV-B (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico de Culiacán, Sinaloa, México.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K. J. & Williams P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10):986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986. PMID: 8908518.
- Heijde M. & Ulm R. 2013. Reversion of the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(3):1113-1118.
- Hideg E., Jansen M. A. & Strid A. 2013. UV-B exposure, ROS and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*. *Trends Plant Sci*. 18(2):107-138.
- Hirsch C. D., Springer, N. M. & Hirsch C. N. 2015. Genomic limitations to RNA sequencing expression profiling. *Plant Journal*. 84:491-503. <https://doi.org/10.1111/tpj.13014>.
- Jazayeri S. M., Melgarejo M. L. M. & Romero H. M. 2015. RNA-Seq: a glance at technologies and methodologies. *Acta biol.* 20(2):23-35. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.43639>.

- Jenkins G. I. 2014. The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *The Plant Cell*. 26: 21-37.
- Jiang L., Wang L., Björn L. O., He J. X. & Li. 2012. Sensing of UV-B radiation by plants. *Plant Signaling & Behavior*. 7(8):999-1003. DOI: 10.4161/psb.20815.
- Kaiserli E. & Jenkins G. I. 2007. UV-B Promotes Rapid Nuclear Translocation of the Arabidopsis UV-B-Specific Signaling Component UVR8 and Activates Its Function in the Nucleus. *The Plant Cell*. 19:2662-273.
- Kang W. H. & Yeom S. I. 2018. Genome-wide Identification, Classification, and Expression Analysis of the Receptor-Like Protein Family in Tomato. *The Plant Pathology Journal*. 34(5):435-444.
- Kang W. H., Kim S., Lee H. A. Choi D. & Yeom S. I. 2016. Genome-wide analysis of Dof transcription factors reveals functional characteristics during development and response to biotic stresses in pepper. *Scientific Reports*. 6:1-12.
- Kim B.C., Tennessen D. J. & Last R. L. 1998. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 15(5):667-674.
- Kim S., Park J., Yeom S. I., Kim Y. M., Seo E., Kim K. T., Kim M. S., Lee J. M., Cheong K., Shin H. S., Kim S. B., Han K., Lee J., Park M., Lee H. A., Lee H. Y., Lee Y., Oh S., Lee J. H., Choi E., Choi-Enubi, Lee S. E., Jeon J., Kim H., Choi G., Song H., Lee J., Lee S. C., Kwon J. K., Lee H. Y., Koo, Hong Y., Kim R. W., Kang W. H., Huh J. H., Kang B. C., Yang T. J., Lee Y. W., Bennetzen J. L. & Choi D. 2017. New reference genome sequences of hot pepper reveal the massive evolution of plant disease-resistance genes by retroduplication. *Genome Biology*. 210(18):1-11.
- Kliebenstein D. J., Lim J. E., Landry L. G. & Last R. L. 2002. *Arabidopsis* UVR8 Regulates Ultraviolet-B Signal Transduction and Tolerance and Contains Sequence Similarity to Human Regulator of Chromatin Condensation 1. *Plant Physiology*. 130:234-243.
- Kyoro H. W., Ahmad P. & Geissler N. 2012. Abiotic Stress Response in Plants: An Overview. In: *Environmental Adaptation and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Ahmad P. & Prasad M. N. V. 531.
- Lai Y., Xu B., He L., Lin M., Cao L., Mou S. L., Wu Y. & He, S. L. 2011. Differential gene expression in pepper (*Capsicum annuum*) exposed to UV-B. *Indian Journal of Experimental Biology*. 49(6):429-437.
- Lee B., Henderson D. A. & Zhu J. 2005. The *Arabidopsis* Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *The Plant Cell*, 17(1):3155-3175. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035568.1>
- León-Chan G. R., Lightbourn-Rojas A. L., López-Meyer M., Amarillas L., Heredia B., J., Martínez-Bastidas T. F., Villicaña C. & León-Felix, J. 2020. Differential Gene Expression of Anthocyanin Biosynthetic Genes under Low Temperature and Ultraviolet-B Radiation in Bell Pepper (*Capsicum annuum*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 23(3):501-508. doi:10.17957/ijab/15.1315.
- Liebelt D. J., Jordan J. T. & Doherty C. J. 2019. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 18(6), 1409-1433.

doi:10.1007/s11101-019-09617-z.

- León-Chan R. G. 2017. Efecto del frío y radiación UV-B en la expresión génica y el metabolismo secundario de plantas de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) (Tesis de doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., México.
- León-Chan R. G., López-Meyer M., Osuna-Enciso T., Sañudo-Barajas J. A., Heredia J. B. & León-Felix, J. 2017. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany* 139:143-151. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.05.006.
- Liang T., Yang, Y. & Liu H. T. 2019. Signal transduction mediated by the plant UV-B photoreceptor UVR8. *New Phytologist*. 221(3):1247-1252. doi:10.1111/nph.15469.
- Liu J., Khetani R., Mistry M. & Piper M. (2018). Introduction to DGE. Harvard Chan Bioinformatics Core (HBC). Estados Unidos. Recuperado de: https://hbctraining.github.io/DGE_workshop/lessons/03_DGE_QC_analysis.html
- Livak K. & Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25(4):402-408.
- Liu J., Khetani R., Mistry M. & Piper M. (2018). Introduction to DGE. Harvard Chan Bioinformatics Core (HBC). Estados Unidos. Recuperado de: https://hbctraining.github.io/DGE_workshop/lessons/03_DGE_QC_analysis.html
- MacManes M. D. 2014. On the optimal trimming of high-throughput mRNA sequence data. *Frontiers in Genetics* 5: 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00013>
- Martínez-Bastidas T. F. (2017). Estudio transcripcional del sistema de transducción de señales mediado por proteínas G en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) bajo estrés por radiación UV-B (Tesis de doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., México.
- Matsufuji H., Ishikawa K., Nunomura O., Chino M., & Takeda, M. 2007. Anti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 42(12), 1482-1488. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01368.x.
- Metzker, M.. 2010. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 11:31-46.
- Morales-Mérida B. E. 2020. Análisis transcriptómico de pimiento (*Capsicum annuum* L) en respuesta al estrés combinado por radiación UV-B y frío (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, México.
- Narad, P., & Kirthanashri, S. V. 2018. Introduction to Omics. *Omics Approaches, Technologies And Applications: Integrative Approaches For Understanding OMICS Data*. Arivaradarajan P. & Misra G. (Eds.), 1–10. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2925-8>.
- Oravecz A., Baumann A., Mate Z., Brzezinska A., Molinier J., Oakeley E. j., Adam E., Schafer E., Nagy F. & Ulm R. 2006. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 Is Required for the UV-B Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 18:1975-1990.
- Pacheco-Olvera A., Hernández-Verdugo S., Rocha-Ramírez V., González-Rodríguez A., &

- Oyama, K. 2012. Genetic Diversity and Structure of Pepper (*Capsicum Annuum* L.) from Northwestern Mexico Analyzed by Microsatellite Markers. *Crop Science*, 52(1):231-241. doi:10.2135/cropsci2011.06.0319.
- Paumier M., Méndez-Martínez Y., Torres E., Sánchez A.R., Ramírez J.L., Herrera R.S., Santana A. & Verdecia, D.M. 2020. "Indicators of Yield of *Tithonia diversifolia* in the Zone of Granma Province, Cuba". *Modern Concepts & Developments in Agronomy*, 6(4). <https://doi.org/10.31031/MCDA.2020.06.000645>.
- Pinard D., Fierro A.C., Marchal, K. Myburg A.A. & Mizrahi E. 2019. "Organellar carbon metabolism is coordinated with distinct developmental phases of secondary xylem". *New Phytologist*, 222. <https://doi.org/10.1111/nph.15739>.
- Qian C., Chen Z., Liu Q., Mao W., Chen Y., Tian W., Liu Y., Han J., Ouyang X. & Huang X. 2020. Coordinated Transcriptional Regulation by the UV-B Photoreceptor and Multiple Transcription Factors for Plant UV-B Responses. *Molecular Plant*. 13:777-792.
- Qian C., Mao W., Liu Y., Ren H., Lau O. S., Ouyang X. & Huang X. 2016. Dual-Source Nuclear Monomers of UV-B Light Receptor Direct Photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 9:1671-1674.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Ling-Hu, C., Wu, H., ... Xiong, Z. 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14):5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400975111>.
- Ren H., Han J., Yuang P., Mao W., Liu X., Qiu L., Qian C., Liu Y., Chen Z., Ouyang X., Chen X., Deng X. W. & Huang X. 2019. Two E3 ligases antagonistically regulate the UV-B response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116(10):4722-4731.
- Rizzini L., Favory J. J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Kaiserli E., Baumeister R., Schafer E., Nagy F., Jenkins G. I. & Ulm R. 2015. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science*. 332(6025): 103-106.
- Rodriguez-Calzada T., Qian M. J., Strid A., Neugart S., Schreiner M., Torres-Pacheco I. & Guevara-Gonzalez, R. G. 2019. Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 134:94-102. doi:10.1016/j.plaphy.2018.06.025.
- Rollano P. O. M. & Mollinedo P. P. 2017. Análisis Bioinformático de ARN-Seq con una Perspectiva para Bolivia. *Revista Boliviana de Química*. 34(2):50-55.
- Roussos S. & Perraud-Gaime I. 1996. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. En: Galindo E. (ed.). *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A. C., Cuernavaca, Morelos, México, 341-348 pp.
- RStudio team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Recuperado de: <http://www.rstudio.com/>.
- Schirmer, M., D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Hall, N., & Quince, C. 2016. Illumina error profiles:

Resolving fine-scale variation in metagenomic sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 17(1):1–15. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0976-y>.

- Sharma A., Sharma B., Hayes B., Kerner K., Hoecker U., Jenkins G. & Franklin K. A. 2019. UVR8 disrupts stabilisation of PIF5 by COP1 to inhibit plant stem elongation in sunlight. *Nature Communications*. 10:4417.
- Shi C. & Liu H. 2021. How plants protect themselves from ultraviolet-B radiation stress. *Plant Physiology*. 3187(3):1096-1103. doi: 10.1093/plphys/kiab245
- SIAP. (2018). Infografía Agroalimentaria. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. Recuperado de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Sinaloa-Infografia-Agroalimentaria-2018.
- Soto S. & López C. 2012. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno Fitosanidad. 16(2):101-113.
- Sztatelman O., Grzyb J., Gabrys H. & Banas A. K. 2015. The effect of UV-B on *Arabidopsis* leaves depends on light conditions after treatment. *BMC Plant Biology*. 15:281.
- Tavidou E., Pireyre M. & Ulm R. 2020. Degradation of the transcription factors PIF4 and PIF5 under UV-B promotes UVR8-mediated inhibition of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 101:507-517.
- Tilbrook K., Arongaus A. B., Binkert M., Heijde M. & Yin R. 2013. The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *The Arabidopsis Book*. 11:1-22.
- Ulm R., Baumann A., Oravec A., Mate Z., Adam E., Oakeley E. J., Schafer E. & Nagy F. 2004. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(5):1397-1402.
- Wang Z., Gerstein M., & Snyder M. 2009. RNA-Seq- a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* volume, 10(1):57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.
- Ward J. & Ponnala L. C. 2012. Weber: Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany*, 99(2):267-276.
- Wargent J. J., Gegas V. C., Jenkins G. I., Doonan J. H. & Paul N. D. 2009. UVR8 in *Arabidopsis thaliana* regulates multiple aspects of cellular differentiation during leaf development in response to ultraviolet B radiation. *New Phytologist*. 183:315-326.
- Williams C. R., Baccarella A., Parrish J. Z., & Kim, C. C. 2016. Trimming of sequence reads alters RNA-Seq gene expression estimates. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0956-2>
- Wu D., Hu Q., Yan Z., Chen W., Yan C., Huang X., Zhang J., Yang P., Deng H., Wang J., Deng X. W. & Shi Y. 2012. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8 *Nature*. 484:214-220.
- Yadav A., Singht D., Lingwan M., Yadukrishnan P., Masakapalli S. K. & Datta S. 2020. Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 62(9):1270-1292.

- Yang Y., Liang T., Zhang L., Shao K., Gu X., Shang R., Shi N., Li X., Zhang P. & Liu H. 2018. UVR8 interacts with WRKY36 to regulate HY5 transcription and hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 4:98–107.
- Yang Y., Saand M. A., Huang L., Abdelaal W. B., Zhang J., Wu Y., Sirohi M. H. & Wang F. 2021. Application of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*. 12:1-22.
- Yin R. H., Skvortsova M. Y., Loubery S., & Ulm R. 2016. COP1 is required for UV-B-induced nuclear accumulation of the UVR8 photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30):4415-4422. doi:10.1073/pnas.1607074113.
- Zhu J. K. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. 167:313-324.