



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de la expresión de genes involucrados en
la síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides
en placentas de chile habanero durante el
desarrollo del fruto y ante diferentes suministros
de fertilización nitrogenada**

Tesis que presenta

JOSÉ DAVID GÓNGORA ESPÍNOLA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de José David Góngora Espínola, titulado “Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides en placentas de chile habanero durante el desarrollo del fruto y ante diferentes suministros de fertilización nitrogenada” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 14 de octubre de 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Q.F.B. JOSÉ DAVID GÓNGORA ESPÍNOLA

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en placentas de chile habanero y su relación con la síntesis de fenilalanina y capsaicina. Análisis de su regulación” (CONACYT, proyecto 168545) bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (394666), así como por el financiamiento del proyecto del cual se derivó este trabajo (proyecto CONACYT 168545).

A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, por aportar su tiempo, recursos, enseñanzas, pero sobre todo por depositar su confianza en mí y guiar mis esfuerzos hacia objetivos concretos.

A la M. en C. Lizbeth A. Castro Concha, por su alegre espíritu e infinita disposición en resolver los nunca ausentes, pero siempre inoportunos, problemas técnicos (y de otros tipos), que a lo largo de este trabajo se presentaron.

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna, por enseñarme que el camino más difícil no siempre es el mejor, y que el fácil no siempre genera los mejores resultados.

A la Dra. Elisa Valenzuela Soto, por obligarme a pensar más allá de los límites autoimpuestos, y a su compromiso por guiar este trabajo en aras de mejorarlo.

A la Dra. Ileana Echevarría Machado, por su paciencia, y por su excelente y bien ejercida tarea docente.

Al Dr. Fray Baas Espinola, Raúl Manzanilla Rivas y Sergio A. Pech Chable, por su apoyo en el trabajo del día a día, por su amistad y camaradería, que hicieron más agradable y nutrido el tiempo invertido en el laboratorio.

ÍNDICE	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO	
ANTECEDENTES	3
1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	3
1.1.1 LOS FENILPROPANOIDES	4
1.1.2 CAPSAICINOIDES	4
1.1.3 BIOSÍNTESIS DE LA CAPSAICINA	6
1.2 TEJIDO PLACENTARIO	8
1.3 LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES ESTÁ DETERMINADA POR LA HERENCIA Y LA INTERACCIÓN DE LA PLANTA CON EL AMBIENTE.....	9
1.4 FUENTES NATURALES DE NITRÓGENO Y SU DISPONIBILIDAD PARA LAS PLANTAS	10
1.5 ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN PLANTAS.....	12
1.6 TOMA DE NITRATO EN PLANTAS.....	13
1.7 ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO.....	15
1.8 BIOSÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS FENILALANINA, VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA	17
1.8.1 BIOSÍNTESIS DE FENILALANINA	17
1.8.2 BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA: VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
JUSTIFICACIÓN	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23

CAPÍTULO II

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA HIDROPÓNICO PARA EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CHILE HABANERO	25
2.1 ANTECEDENTES	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.2.1 MATERIALES	27
2.2.2 MÉTODOS	29
2.2.2.1 CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA HIDROPÓNICO	29
2.2.2.2 USO DEL SISTEMA HIDROPÓNICO CON RIEGO CONTINUO CON RECIRCULACIÓN	29
2.2.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
2.2.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE VALINA, FENILALANINA Y CAPSAICINOIDES EN PLACENTAS DE CHILE HABANERO DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO Y ANTE DIFERENTES SUMINISTROS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA	33
3.1 ANTECEDENTES.....	33
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.2.1 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS.....	34
3.2.2 MEDICIÓN DE NITRATO	34
3.2.3 MEDICIÓN DE AMINOÁCIDOS SOLUBLES TOTALES	34
3.2.4 MEDICIÓN DE VALINA Y FENILALANINA	35
3.2.5 MEDICIÓN DE CAPSAICINOIDES.....	35
3.2.6 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN.....	36
3.2.6.1 ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN.....	37
3.2.6.2 TRATAMIENTO CON ADNasa.....	37
3.2.7 DISEÑO DE LOS CEBADORES (“PRIMERS”).....	38

3.2.8 PCR PUNTO FINAL Y PCR EN TIEMPO REAL.....	39
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
3.3.1 LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA NO OCASIONAN CAMBIOS SOBRE LA ACUMULACIÓN DE NITRATO EN PLACENTAS DE CHILE HABANERO	40
3.3.2 LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES AUMENTA CONFORME SE DESARROLLA EL RUTO DE CHILE HABANERO.....	42
3.3.3 ACUMULACIÓN DE VALINA Y FENILALANINA BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA.....	44
3.3.4 ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA qPCR.....	46
3.3.5 RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>CM</i> , <i>ADT</i> , <i>ALS</i> y <i>AT3</i> EVALUADOS MEDIANTE qPCR.....	49

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL.....	51
------------------------	----

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	55
----------------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA.....	57
--------------------------	-----------

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química básica de los fenilpropanoides (C6C3).....	4
Figura 1.2 Ruta biosintética de la capsaicina.....	7
Figura 1.3 Ruta y sitio de biosíntesis de los capsaicinoides.....	8
Figura 1.4 Factores que afectan la síntesis o acumulación de los capsaicinoides en <i>Capsicum spp.</i>	10
Figura 1.5 Representación esquemática del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	12
Figura 1.6 Toma, transporte y asimilación de nitrato en <i>A. thaliana</i>	16
Figura 1.7 Ruta del shikimato	17
Figura 1.8 Ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.....	18
Figura 1.9 Ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada: Val, Leu e Ile.....	19
Figura 1.10 Estrategia experimental.....	23
Figura 2.1 Esquema del sistema hidropónico de riego continuo por goteo con recirculación.....	26
Figura 2.2 Construcción del sistema hidropónico de cajas.....	28
Figura 2.3 Frutos de chile habanero de 10, 25 y 45 DPA.....	30
Figura 2.4 Desarrollo de plantas de chile habanero en hidroponía.....	31
Figura 3.1 Contenido de nitrato en las placentas de chiles de 10, 25 y 45 DPA a partir de plantas creciendo en diferentes concentraciones de NO_3^-	42
Figura 3.2 Efecto del NO_3^- sobre la acumulación de los capsaicinoides totales en placentas de chile de 10, 25 y 45 DPA.....	43

Figura 3.3 Efecto del NO_3^- sobre la acumulación de valina en placentas de chile habanero durante el desarrollo del fruto.....	44
Figura 3.4 Efecto del NO_3^- sobre la acumulación de fenilalanina en placentas de chile habanero durante el desarrollo del fruto	45
Figura 3.5 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de <i>ALS</i> por PCR de punto final.....	46
Figura 3.6 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de <i>ADT</i> por PCR de punto final	47
Figura 3.7 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de <i>CM</i> por PCR de punto final	47
Figura 3.8 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de <i>AT3</i> por PCR de punto final	48
Figura 3.9 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de <i>ACTINA</i> por PCR de punto final	48
Figura 3.10 Expresión de <i>CM</i> , <i>ADT</i> , <i>ALS</i> y <i>AT3</i> en placentas de chile habanero de tres etapas de madurez, crecidos bajo concentraciones diferentes de nitrato.....	50

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Capsaicinoides más importantes identificados en *Capsicum spp.*..... 5

Cuadro 3.1 Pares de cebadores diseñados para la amplificación por PCR..... 38

ABREVIATURAS

4CL	Cumaroil CoA ligasa
Abs	Absorbancia
ACL	Proteína acarreadora de grupos acilo
ADH	Arogenato deshidrogenasa
ADT	Arogenato deshidratasa
ALS (AHAS)	Acetolactato sintasa (acetohidroxiácido sintasa)
AMT	Aminotransferasa
AT3	Aciltransferasa 3 (capsaicinoide sintasa putativa)
BCAT	Transferasa de los aminoácidos ramificados
<i>C (pun 1)</i>	Locus del cromosoma 2 en el género <i>Capsicum</i>
Ca4H	Cinamato 4-hidroxilasa
CM	Corismato mutasa
CoA	Coenzima A
COMT	Ácido caféico O-metiltransferasa
CS	Capsaicinoide sintasa
DEPC	Dietil pirocarbonato
DPA	Días posteriores a la antesis
FAD ⁺	Flavín adenín dinucleótido oxidado
FAS	Ácido graso sintasa (complejo multienzimático)
FAT	Tioesterasa
GOGAT	Glutamino oxoglutarato aminotransferasa
GS	Glutamino sintetasa
h	Hora
HCHCL	Hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa
HCT	Hidroxicinamoil transferasa
Ile	Isoleucina
IVDH	Isovalerato deshidrogenasa
KARI	Cetoácido reductoisomerasa
KAS	-Cetoacil sintetasa
Leu	Leucina

M	Molar
MeJa	Jasmonato de metilo
mL	Mililitro
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
nm	Nanómetro
OPA	<i>o</i> -Ftalaldehído
p/v	Peso/volumen
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PAT	Prefenato aminotransferasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco
p-FF	p-fluorofenilalanina
Phe	Fenilalanina
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retro transcripción-PCR
TA	Temperatura de alineamiento
TD	Treonina deshidratasa
T _m	Temperatura media de fusión
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
U	Unidad
v/v	Volumen/ volumen
Val	Valina

RESUMEN

El fruto de chile habanero es conocido por poseer compuestos denominados capsaicinoides, responsables de conferir el picor que caracteriza a esta especie. Los capsaicinoides se sintetizan a partir de valina o leucina y fenilalanina, mediante transformaciones metabólicas que generan ácido 8-metil-6-nonenoico y vainillilamina, respectivamente. Estos intermediarios tardíos son condensados gracias a la capsaicinoide sintasa para formar una molécula de capsaicina. La placenta del chile habanero es el lugar exclusivo de síntesis de los capsaicinoides y es un sitio de nuestro particular interés debido a que conjunta al metabolismo primario y al secundario (o especializado).

El objetivo de este trabajo es analizar el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno sobre la expresión de la corismato mutasa (*CM*), arogenato deshidratasa (*ADT*), acetolactato sintasa (*ALS*) y aciltransferasa 3 (*AT3*), genes involucrados en la síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides en placentas de chile habanero, y conocer cómo es que esta expresión se correlaciona con los niveles de los metabolitos antes mencionados.

Para evaluar los efectos del nitrógeno sobre la expresión génica, se cultivaron plantas de chile habanero en cajas hidropónicas que permitieron la aplicación de concentraciones de 1, 7.5 y 15 mM de nitrato de potasio. Las muestras experimentales se tomaron de placentas de frutos de 10, 25 y 45 días postantesis (DPA). La expresión génica se evaluó mediante PCR de tiempo real, y los aminoácidos valina y fenilalanina, así como los capsaicinoides, se midieron mediante HPLC.

El contenido de capsaicinoides aumentó conforme al desarrollo del fruto y su acumulación se correlacionó negativamente con la concentración de nitrógeno utilizado en la solución nutritiva. La cantidad de nitrato presente en la placenta aumentó también conforme a la edad de los frutos. En los tres tratamientos, los frutos de 45 DPA presentaron los niveles máximos de nitrato.

En lo que se refiere a los contenidos de valina y fenilalanina, se encontró que el de valina fue mucho más alto que el de fenilalanina. En frutos de 25 y 45 DPA se encontraron bajos

niveles de fenilalanina, concordando con bajos niveles de capsaicinoides en el tratamiento con 15 mM de nitrato.

De los genes evaluados, solamente *AT3* presentó niveles altos de expresión. Si las diferentes concentraciones de nitrato utilizadas tuvieron algún efecto sobre la expresión genética, probablemente haya sido sobre genes que tienen relación directa con el metabolismo del nitrógeno, por lo que evaluar la expresión de genes como la nitrato reductasa (*NR*), la nitrito reductasa (*NiR*), glutamino sintetasa (*GS*) y glutamato sintasa (*GOGAT*), así como la medición de su actividad enzimática complementaría el trabajo realizado y ayudaría a elucidar la regulación de la síntesis de estos metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Habanero pepper fruit has been known for producing compounds known as capsaicinoids, responsible for its particular hotness. Capsaicinoids are synthesized from valine or leucine and phenylalanine, which are converted to 8-methyl-6-nonenic acid and vanillylamine, respectively through a series of metabolic transformations. Condensation of these late intermediaries catalyzed by capsaicinoid synthase generates capsaicin. Placentas are the exclusive tissues capable of synthesizing capsaicinoids, and hence, presenting both primary and secondary (specialized) metabolisms.

The objective of this study was to analyze the effect of various nitrate concentrations on the expression of genes coding for chorismate mutase (*CM*), arogenate dehydratase (*ADT*), acetolactate synthase (*ALS*) and acyl transferase 3 (*AT3*), involved in the synthesis of valine, phenylalanine and capsaicinoids in placentas from Habanero peppers and to determine how the expression of these genes correlates with the contents of the above mentioned metabolites.

In order to evaluate nitrogen effects on gene expression, plants were cultivated in a hydroponic system that allowed different nitrate concentrations to be applied (1, 7.5 and 15 mM potassium nitrate). Experimental samples were taken from placental tissues from fruits at 10, 25 and 45 days post-anthesis (DPA). Genetic expression was measured through real time PCR and metabolites (valine, phenylalanine and capsaicinoids) using HPLC methods.

Capsaicinoids contents increased along fruit development and their accumulation was negatively correlated to the amount of nitrogen used in the nutrient solution. Nitrate in placental tissues also increased according to fruits' age. In all three treatments, nitrate content reached maximal levels in 45 DPA fruits. Regarding phenylalanine and valine levels, valine's contents were always much higher than those from the aromatic amino acid. Low levels of phenylalanine were found in 25 and 45 DPA fruits in the 15 mM treatment, coinciding with the low capsaicinoids contents found in these cases. Of the studied genes, only *AT3* showed high expression levels.

If the different nitrate concentrations used had any effect on gene expression, it may have

occurred on genes directly related to primary nitrogen metabolism, thus measuring gene expression of nitrate reductase (*NR*), nitrite reductase (*NiR*), glutamine synthetase (*GS*) and glutamate synthase (*GOGAT*), as well as their corresponding enzymatic activities would complete this study and allow us to understand the complex regulation of capsaicinoid metabolism.

INTRODUCCIÓN

El metabolismo secundario de las plantas es hasta ahora la principal fuente viable de compuestos comercialmente importantes (Rymbai *et al.*, 2011). La acumulación de metabolitos secundarios (MS) se activa mayormente en plantas sujetas a estrés, a través de la mediación de inductores, que son moléculas que llevan una señal externa hasta el sitio donde la planta los sintetiza y acumula (Xiao *et al.*, 2009). Estos MS tienen un papel muy importante en la adaptación ante condiciones ambientales dinámicas, que muchas veces representan situaciones de estrés (Ruxton y Kennedy, 2006). Factores ambientales como la temperatura, intensidad de luz, disponibilidad de agua, CO₂ o minerales influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta, pero también en la producción de MS (Bednarek, 2012).

Dada la importancia comercial de los MS, es fundamental comprender las bases bioquímicas y moleculares que determinan su acumulación diferencial en plantas situadas en un ambiente dinámico, con el fin de entender cómo se regula el metabolismo secundario, e implementar estos nuevos conocimientos en el diseño de estrategias biotecnológicas que permitan satisfacer la demanda de estas moléculas, con interesantes aplicaciones en la industria alimentaria, química, farmacéutica y cosmética (Ganget y Memelink, 2002).

Los metabolitos conocidos colectivamente como capsaicinoides son un modelo actual para el estudio del metabolismo secundario; dicho modelo permite estudiar los eventos moleculares que regulan su síntesis, acumulación y degradación. Estos compuestos son los responsables del picor de los frutos de las plantas del género *Capsicum*. La síntesis de estos alcaloides se restringe únicamente a una parte del tejido dentro de los chiles: las capas más externas de la epidermis del tejido placentario y de los septos interloculares (Stewart *et al.*, 2007), por lo tanto, sería importante comprender cómo es que el efecto de los estímulos externos es finalmente ejercido en el lugar donde se lleva a cabo la síntesis, acumulación y degradación de los capsaicinoides y, si estos compuestos poseen un patrón de acumulación específico y heterogéneo dentro de una región definida del fruto.

Se ha señalado que los factores que estimulan o provocan cambios en el metabolismo

secundario, también provocan una reconfiguración del metabolismo primario (Zulak *et al.*, 2007), lo que sugiere que ambos metabolismos se encuentran más estrechamente vinculados que lo que se asume en la práctica.

Recientemente se demostró, en un cultivo *in vitro* de placentas de chile habanero, que la producción de capsaicinoides requiere de la activación del ciclo glutamino sintetasa-glutamino oxoglutarato aminotransferasa (GS-GOGAT; Ancona-Escalante *et al.*, 2013) y de la síntesis *in situ* de valina y fenilalanina (Baas-Espinola *et al.*, 2016). Sin embargo, aún se desconoce si la coordinación de estos dos sucesos acontece *in vivo*.

La maduración del fruto, la diferenciación tisular y su metabolismo bajo condiciones adversas, son tópicos importantes en el estudio de la fisiología de las plantas. Estos fenómenos están acompañados de alteraciones específicas en los sistemas biológicos, como diferencias en la síntesis de un tipo de metabolito particular (Moco *et al.*, 2007). Dado que el contenido de capsaicinoides varía a lo largo de la ontogenia del fruto (Contreras-Padilla y Yahia, 1998), de existir una relación entre el metabolismo primario y el secundario en la placenta, es probable que existan patrones de expresión distintivos en los genes encargados de la síntesis de capsaicinoides, así como de sus precursores.

El objetivo de este trabajo es analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de fenilalanina, valina y capsaicinoides durante el desarrollo del fruto bajo diferentes regímenes de fertilización nitrogenada, con el fin de comprender la regulación del metabolismo de los capsaicinoides.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas son gran medida la fuente de vitaminas, minerales, carbohidratos, proteínas y lípidos en nuestros alimentos, pero también de ellas se ha obtenido una gran diversidad de materiales que empleamos en nuestra vida diaria, desde la construcción de nuestras viviendas hasta la obtención de diferentes productos industriales. Adicionalmente, las plantas han sido, y seguirán siendo por largo tiempo, una fuente invaluable de una amplia variedad de metabolitos secundarios que se usan como principio activo en la industria farmacéutica, como agroquímicos, saborizantes, fragancias, colorantes, biopesticidas y aditivos para alimentos (Rao y Ravishankar, 2002). Estos compuestos provienen de una parte del metabolismo que se engloba bajo el término de: metabolismo secundario o especializado.

Un metabolito secundario es un compuesto orgánico de bajo peso molecular que no tiene un papel vital en el proceso de desarrollo del organismo que lo produce, pero que contribuye a aumentar su capacidad de supervivencia en un ambiente dinámico, y muchas veces, adverso. Su distribución está restringida en mayor medida a ciertos grupos taxonómicos comparado con los productos del metabolismo primario. Se producen en bajas cantidades y comúnmente poseen un patrón de acumulación tejido-específico (Matsuda *et al.*, 2015).

Basándose en su origen biosintético, los metabolitos secundarios pueden dividirse en tres grandes grupos: terpenoides, alcaloides y fenilpropanoides y compuestos derivados. Todos los terpenoides, incluyendo a los metabolitos primarios y más de 25,000 metabolitos secundarios, se derivan del precursor de cinco carbonos, el isopentenil difosfato. Los 12,000 o más alcaloides conocidos, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos. Los más de 8,000 compuestos fenólicos se forman a partir de cualquiera de dos rutas: la del ácido shikímico o la ruta del malonato/acetato (Croteau *et al.*, 2000).

1.1.1 LOS FENILPROPANOIDES

Los fenilpropanoides (compuestos tipo C₆C₃) poseen una estructura básica que consiste de un anillo aromático unido a una cadena de tres carbonos (Figura 1.1). Contribuyen en todos los aspectos a la respuesta hacia estímulos bióticos o abióticos. Ellos no son sólo indicadores de la respuesta al estrés infringido por la variación de la luz o por la disponibilidad de nutrimentos minerales en el ambiente, sino que también son mediadores claves de la resistencia de las plantas ante las plagas. Estos compuestos promovieron la invasión de las plantas a nuevos hábitats y les proveyeron de los recursos bioquímicos para una reproducción exitosa. Los polímeros basados en los fenilpropanoides, como las ligninas, suberina o taninos condensados, contribuyen sustancialmente a la estabilidad y fortaleza de las gimnospermas y angiospermas ante el daño mecánico o ambiental producido por la sequía o las heridas (Vogt, 2010).

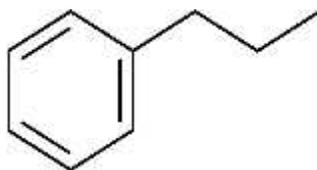


Figura 1.1 Estructura química básica de los fenilpropanoides (C₆C₃).

La diversificación de los compuestos derivados de la ruta de los fenilpropanoides se debe a la acción de oxigenasas, reductasas y transferasas, dando como resultado la complejidad y heterogeneidad que se observa en el perfil de los metabolitos encontrados en cierto grupo taxonómico de plantas (Ververidis *et al.*, 2007), como los capsaicinoides del género *Capsicum*, del que se ocupa el presente trabajo.

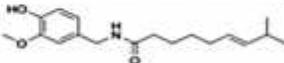
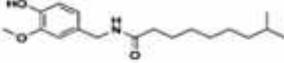
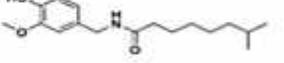
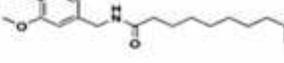
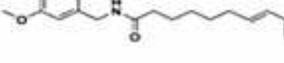
1.1.2 CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides son metabolitos secundarios que pertenecen a la familia de los

fenilpropanoides, que se encuentran sólo en el género *Capsicum*. Estos compuestos confieren la sensación de picor, característica de los chiles. Son compuestos amídicos derivados de la condensación de la vainillilamina y una cadena acil graso, de longitud entre 9 y 11 carbonos (Figura 1.2). La vainillilamina proviene de fenilalanina (Phe) y la cadena acil graso, de los aminoácidos valina (Val) o leucina (Leu). Las diferencias entre los capsaicinoides se encuentran en la longitud de la ramificación, la posición de los dobles enlaces en la cadena acil graso y en la naturaleza de los sustituyentes en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático (Wang *et al.*, 2011).

La capsaicina y la dihidrocapsaicina representan juntos más del 80% del total de los capsaicinoides (Cuadro 1.1; Choi *et al.*, 2006; Kozukue *et al.*, 2005). Se sintetizan en la epidermis del tejido placentario y se depositan en estructuras de almacenamiento denominadas ampollas (Zamsky *et al.*, 1987). En general, en los frutos picantes de la mayoría de las plantas del género *Capsicum*, la síntesis inicia alrededor de los 20 días posteriores a la antesis (DPA) y alcanza un máximo de acumulación entre los 45 y 55 DPA (Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Iwai *et al.*, 1979).

Cuadro 1.1 Capsaicinoides más importantes identificados en *Capsicum spp.* (Molina-Quijada, 2009).

Nombre		Cantidad relativa	Estructura
Capsaicina		69%	
Dihidrocapsaicina	DHC	22%	
Nordihidrocapsaicina	NDHC	7%	
Homodihidrocapsaicina	HDHC	1%	
Homocapsaicina	HC	1%	

1.1.3 BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINA

La capsaicina se sintetiza por la condensación de vainillilamina (un intermediario de la ruta de los fenilpropanoides) y un grupo acil graso derivado de, ya sea valina o leucina. La síntesis de vainillilamina parte de la síntesis de fenilalanina, que sufre una serie de transformaciones metabólicas, hasta convertirse en vainillina y posteriormente en vainillilamina (Aza-González *et al.*, 2010). Las enzimas que intervienen en esta ruta están listadas en la Figura 1.3, junto con el sustrato al que unen, y el producto de dicha reacción.

La valina da lugar a la formación de la cadena acil graso (ácido 8-metil-6-nonenoico). Para ello, este aminoácido se desamina por la enzima transferasa de los aminoácidos ramificados (BCAT), dando como producto α -cetoisovalerato. Después, este último se convierte en isobutiril-CoA, por la catálisis de la isovalerato deshidrogenasa (IVDH); el isobutiril-CoA es modificado por el complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS), que lo transmuta en 8-metil-6-nonenoil-CoA. FAS está constituido por tres proteínas: la α -cetoacil sintetasa (KAS), que cataliza la condensación de grupos malonilo con isobutiril-CoA; una proteína acarreadora de grupos acilo (ACL), que se encarga de transportar los grupos malonilo, y una tioesterasa (FAT), que libera al ácido graso sintetizado.

Por cada ciclo de condensación de grupos malonilo, se pierde una molécula de CO₂ y la cadena acil graso se desprende del complejo FAS después del tercer ciclo de condensación. Se sintetiza a continuación el ácido graso 8-metil-6-nonenoil-CoA, a través de la enzima acil-CoA sintasa, a partir del ácido 8-metil-6-nonenoico (Aluru *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001; Curry *et al.*, 1999).

Por último, estas dos rutas se unen para dar lugar a una molécula de capsaicina (Figura 1.3). El último paso es catalizado por una aciltransferasa, a la que se ha llamado putativamente capsaicinoide sintasa (CS; Stewart *et al.*, 2007).

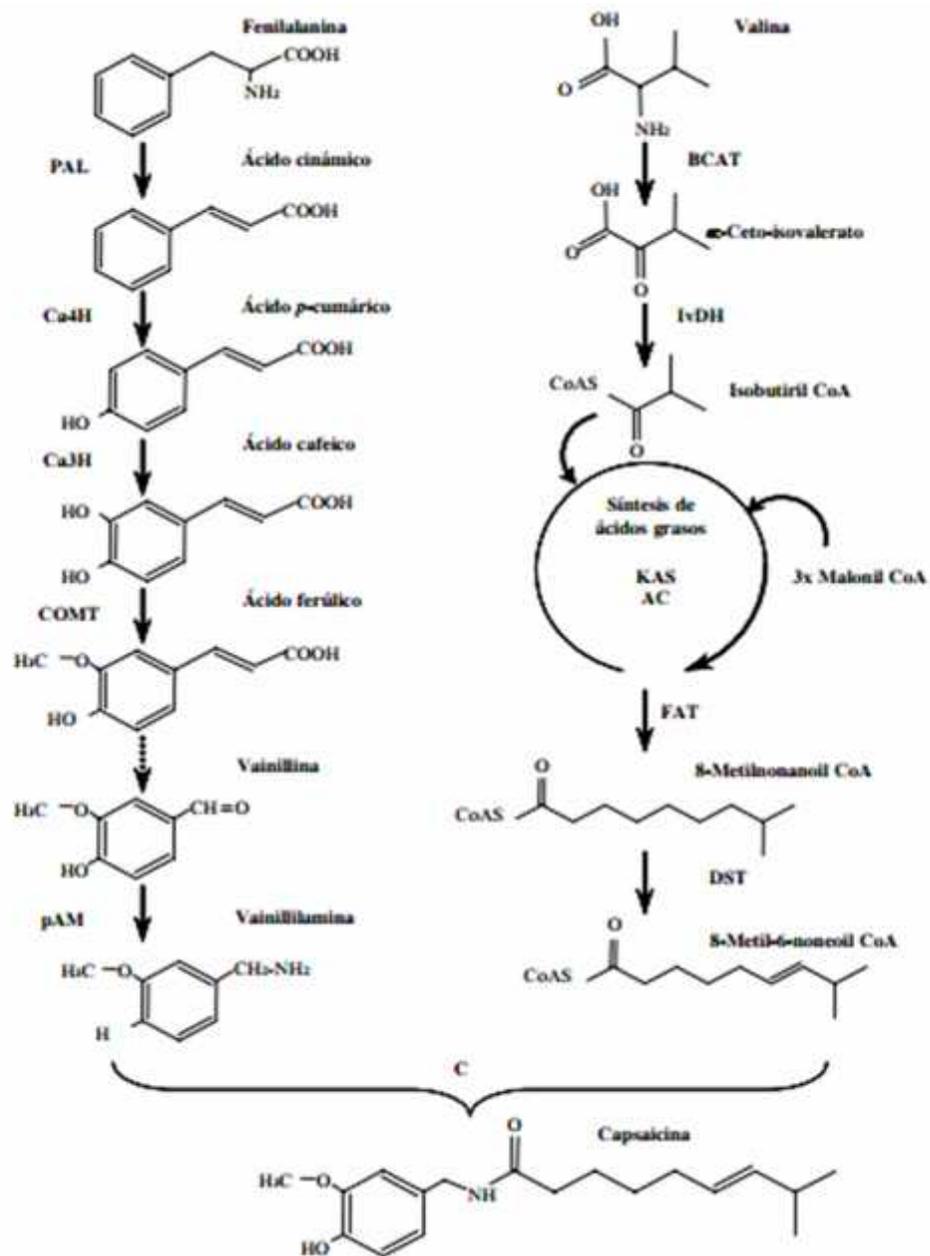


Figura 1.2 Ruta biosintética de la capsaicina.

1.2 TEJIDO PLACENTARIO

El fruto posee forma esférica o alargada, con un pericarpio liso o arrugado. Ciertos cultivares tienen forma de trompo, con áreas hundidas. El color del fruto varía en una gama de colores que van desde el blanco, naranja, amarillo, salmón, rojo o hasta el morado. Las semillas son arrugadas, de color paja, irregulares, con bordes salientes y ondulados (González *et al.*, 2006), que están unidas a una estructura central de color blanco amarillenta y de apariencia esponjosa denominada placenta (Figura 1.4).

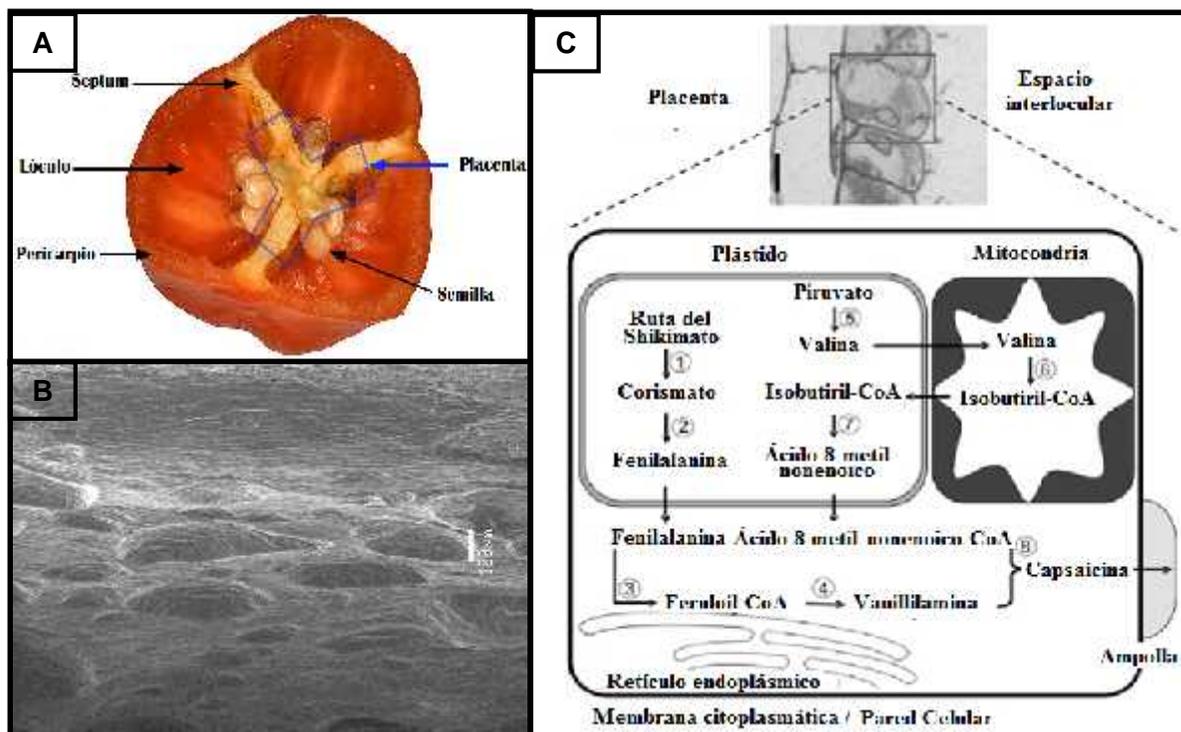


Figura 1.3 A: Corte transversal del fruto de chile habanero. B: Ampollas de capsaicina observadas usando un microscopio electrónico de barrido. C: Ruta y sitio de biosíntesis de los capsaicinoides.

La placenta es el tejido central dentro del fruto al que están unidos los óvulos o esporangios (Puri, 1952). Es un tejido vascular que se encuentra dentro del fruto, que en este caso tiene forma de cresta o almohada. Es una región engrosada de la pared del carpelo, al cual están adheridos los óvulos. Posterior a la fecundación, los óvulos se convierten en semillas y se establece una conexión vascular al réplum de la placenta,

donde permanecen unidas hasta completarse el proceso de desarrollo del fruto (Tiwari *et al.*, 2013; Gillaspay *et al.*, 1993). Histológicamente, la placenta está formada por células epiteliales. En los diferentes tipos de frutos, la placentación puede variar, es decir, la forma en que se localizan los óvulos sobre la placenta. En el chile habanero, la placentación es de tipo axilar, debido a que los óvulos o semillas están situados en el centro del ovario, entre los ángulos del septo (Gillaspay *et al.*, 1993; Puri, 1952). La presencia de ampollas en las placentas de los frutos picantes representa sitios de almacenamiento de capsaicinoides y están relacionadas con su acumulación (Stewart *et al.*, 2007).

1.3 LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES ESTÁ DETERMINADA POR LA HERENCIA Y LA INTERACCIÓN DE LA PLANTA CON EL AMBIENTE

El componente genético determina la presencia o ausencia y el límite de acumulación de los diferentes capsaicinoides entre las distintas especies de chiles (Aza-González *et al.*, 2010). El chile habanero posee un mayor picor, en comparación con el jalapeño [300 000-400 000 vs 3500 y 4500 USP (Unidades Scoville de Picor)] (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, factores como la especie, la variedad y el genotipo están asociados a la variación en la acumulación de capsaicinoides (Estrada *et al.*, 1999; Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992), así como las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolla la planta (Aza-González *et al.*, 2010; Vázquez-Flota *et al.*, 2007). El contenido de capsaicinoides cambia a lo largo de la ontogenia del fruto, o incluso, por su localización en la planta (Lee *et al.*, 2006; Zewdie y Bosland, 2000). Entre los factores ambientales, se pueden mencionar la luz y la temperatura (Murakami *et al.*, 2006), el estrés hídrico, tanto por falta como por exceso de agua (Ruíz-Lau *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 1999); la disponibilidad de nitrógeno, potasio y fotoasimilados (Monforte-González *et al.*, 2010; Zewdie y Bosland, 2000; Johnson y Decoteau, 1996), el daño mecánico infringido tanto a los frutos como al tejido placentario (Kim *et al.*, 2009; Krischbaum-Titze *et al.*, 2002), entre otros (Figura 1.4).



Figura 1.4 Factores que afectan la síntesis o acumulación de los capsaicinoides en *Capsicum spp.*

1.4 FUENTES NATURALES DE NITRÓGENO Y SU DISPONIBILIDAD PARA LAS PLANTAS

El nitrógeno es un nutrimento esencial para los seres vivos, ya que es uno de los constituyentes principales de compuestos vitales como aminoácidos, proteínas, enzimas, nucleoproteínas, ácidos nucleicos, así como también de las paredes celulares y clorofila en las plantas. Debido a la importancia que tiene este elemento en estos organismos, junto con el fósforo y el potasio se consideran como macronutrientes.

En la naturaleza existen dos fuentes principales de reserva de nitrógeno para las plantas. La mayor está en la atmósfera (78%), pero se encuentra en forma molecular (N_2), aunque también existen otras formas gaseosas de nitrógeno de mucha menor importancia cuantitativa: óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2) y amoníaco (NH_3) (Blaya y García, 2003).

El aire del suelo tiene normalmente una composición similar a la atmósfera, aunque ocasionalmente puede estar más enriquecido en alguna de las otras formas gaseosas, como N_2O o NH_3 , debido a la acción de procesos químicos o microbiológicos. La otra reserva importante de nitrógeno es la materia orgánica del suelo (MOS). Del total del nitrógeno que hay en el suelo, aproximadamente el 98% se encuentra formando

compuestos orgánicos. Dependiendo de su contenido de materia orgánica, los primeros 20 centímetros de profundidad de un suelo pueden contener entre 1,000 y 10,000 kg de este elemento por hectárea. Las formas orgánicas incluyen proteínas, aminoácidos y azúcares aminados. Sin embargo, las formas químicas identificadas representan sólo un 30-35% del total del nitrógeno orgánico del suelo. El resto, entre un 70 a 75%, está en estructuras químicas complejas aún no identificadas (Blaya y García, 2003).

A pesar de que el nitrógeno es uno de los elementos más comunes del planeta, es también el nutrimento que más frecuentemente limita la producción en los cultivos. Esto se debe a que la molécula de N_2 (N N) es inerte, con una gran estabilidad conferida por su triple enlace. En forma natural, el nitrógeno del aire puede llegar a la planta a través de dos mecanismos principales: ya sea transferido por las bacterias que previamente lo han fijado simbiótica o asimbióticamente, o disuelto en el agua de lluvia. La cantidad de nitrógeno transferido a las plantas que proviene de la fijación simbiótica es variable (50 a 70 kg ha⁻¹ año⁻¹), mientras que la cantidad aportada por la fijación no simbiótica y las lluvias oscilan entre 10 y 20 kg ha⁻¹ año⁻¹. El nitrógeno presente en el suelo bajo formas orgánicas, a excepción de los aminoácidos, tampoco está disponible como tal para las plantas, pues para ser absorbido tiene que pasar a formas inorgánicas (Courty *et al.*, 2015).

El nitrógeno inorgánico representa un 2% del nitrógeno total del suelo, encontrándose en formas de nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y nitrito (NO_2^-). Estas formas inorgánicas son transitorias en el suelo, por lo cual las cantidades de nitrógeno inorgánico del suelo son extremadamente variables y puede encontrarse desde unos pocos gramos hasta más de 100 kg ha⁻¹. Debido a que ésta es la forma en que es absorbido por las plantas, el nitrógeno inorgánico es muy importante para la nutrición vegetal (Bloom, 2015).

A diferencia del fósforo y potasio, la dinámica del nitrógeno en el suelo no está regulada por un equilibrio químico, sino principalmente por procesos biológicos, derivados de la actividad microbiana del suelo que afectan, sobre todo a las formas minerales y a las formas orgánicas de reserva (Courty *et al.*, 2015). Ejemplos de estos procesos son la mineralización, nitrificación, amonificación, desnitrificación, etc. (Figura 1.5).

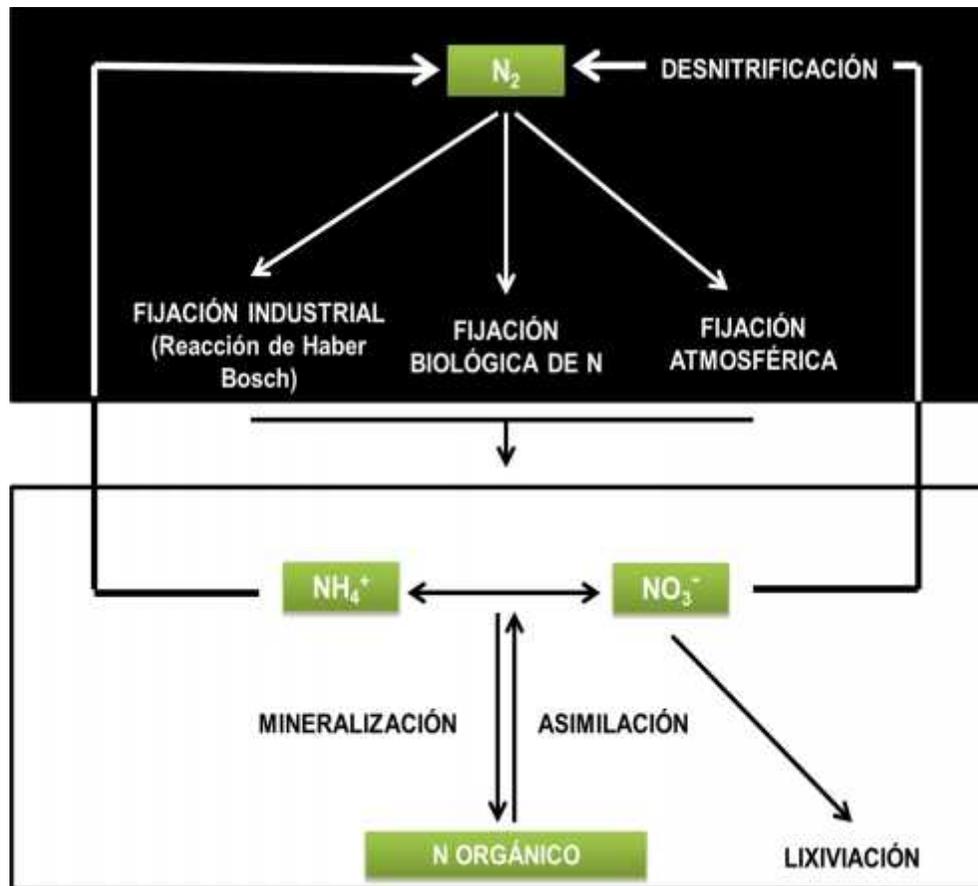


Figura 1.5 Representación esquemática del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

1.5 ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO EN PLANTAS

Se considera que el nitrato es usado en una ruta lineal que involucra la toma y el transporte del nitrato dentro de la planta, seguido de la asimilación del nitrato, la asimilación del amonio, la síntesis de aminoácidos y, por último, la síntesis de proteínas. Sin embargo, existen otras interacciones que incluyen el almacenamiento y removilización del nitrato a diferentes partes de la planta, la asimilación y reciclaje de amonio, la distribución del nitrógeno durante la biosíntesis de aminoácidos, así como los diferentes

destinos de estos, los cuales pueden ser almacenados en las vacuolas y ser usados en la síntesis de proteínas o dirigidos hacia el metabolismo secundario (Stitt *et al.*, 2002).

Existen también interacciones con el metabolismo del carbono que provee del malato como contra-ion, para prevenir la alcalinización, el 2-oxoglutarato como el primer aceptor de amonio en el ciclo GS-GOGAT y otros numerosos ácidos orgánicos e intermediarios fosforilados que son requeridos como precursores en la ruta de síntesis de varios aminoácidos; tal es el caso del piruvato en la síntesis de valina. Además, las reacciones de la fotosíntesis o la glucólisis son fundamentales para generar el poder reductor que es consumido durante la reducción del nitrato a amonio.

Por lo tanto, el nitrógeno se mueve a través de complejas ramificaciones metabólicas e interactúa en numerosos sitios con el metabolismo del carbono, interviene en la regulación del pH, en la estabilización de la fuerza iónica de las células, la tasa del flujo en la asimilación de otros nutrimentos, tanto a nivel celular como a nivel sistémico. Entonces, desde una perspectiva más amplia, el nitrato y amonio influyen en el desarrollo de la planta, incluyendo cambios en la arquitectura de sus raíces, la senescencia y el florecimiento (Krapp, 2015).

1.6 TOMA DE NITRATO EN PLANTAS

La entrada de nitrato a la célula es el primer paso de la vía de asimilación. Las características fisicoquímicas de este anión hacen que sólo pueda atravesar la membrana plasmática a través de proteínas transportadoras. En los organismos capaces de asimilar nitrato se han aislado numerosos tipos de transportadores, tanto exclusivos para el nitrato como capaces de transportar otros sustratos. La clasificación de estas proteínas transportadoras se realiza con base en varios criterios, como son características cinéticas, especificidad por sustrato o patrón de expresión. En la mayoría de los organismos, el transporte de nitrato se lleva a cabo por varios tipos de transportadores. Generalmente, los organismos cuentan con una amplia variedad de sistemas de transporte para asegurar el movimiento del nitrato en diferentes entornos celulares. Algunos casos representativos son los del alga verde *C. reinhardtii* con dos familias de sistemas de transporte de nitrato

o nitrito (NRT1 y NRT2), o *Arabidopsis thaliana* con diferentes sistemas de transporte de nitrato (Courty *et al.*, 2015).

La clasificación de estos transportadores se ha realizado con fundamento en sus características cinéticas, más concretamente en función de sus Km. Esto ha permitido agrupar a los sistemas de transporte acorde a la afinidad que presentan por su sustrato. Se han caracterizado sistemas de transporte con alta afinidad por el sustrato (HANTS) con una Km en el rango micromolar (inferior a 0.8 μM) y que se encuentran en plantas, algas, levaduras y hongos filamentosos. Por otro lado, se agrupan aquellos transportadores con baja afinidad por el nitrato (LANTS), en el rango milimolar ($\text{Km} > 1 \text{ mM}$), que se han encontrado en plantas, algas y levaduras. En la mayoría de los organismos existen ambos sistemas de transporte. Esto hace que la importancia de cada uno varíe en función de los niveles de nitrato en el medio (Daniel-Vedele *et al.*, 1998).

La toma de nitrato en la raíz de las plantas ocurre a través de dos sistemas de transporte, que actúan coordinadamente para tomar el nitrato del suelo y luego distribuirlo al interior de la planta. Se asume que la familia de genes NRT1 median el transporte de baja afinidad, con excepción de AtNRT1.1, que es un transportador con una afinidad dual y un sensor de nitrato al mismo tiempo (Forde, 2000). Son 53 los genes que pertenecen a la familia de los NRT1 en *Arabidopsis*. De todos éstos, 51 presentan diferentes patrones de expresión en toda la planta, lo que sugiere una función única y especializada al menos para alguno de ellos.

AtNRT1.1 es el más extensamente estudiado y fue el primero en ser aislado. Su gen se expresa en la epidermis de los ápices de las raíces, mientras que en la parte más madura de la raíz, se expresa mayormente en la corteza y a la endodermis de ésta. Aún no está del todo bien definido el papel de la proteína en estas partes, pero se sabe que es crucial para el sistema de regulación de la arquitectura de la raíz dependiente de nitrato; por lo tanto, tiene un papel importante en la respuesta adaptativa a la limitación de nitrógeno (Krouk *et al.*, 2010).

AtNRT1.2 se expresa constitutivamente sólo en la epidermis de la raíz y participa en el sistema constitutivo de transporte de nitrato de baja afinidad. Una vez que es tomado por

las células de la raíz, el nitrato puede transportarse a través de las membranas celulares y distribuirse a varios tejidos. AtNRT1.5 se localiza en la membrana plasmática de las células del periciclo que se encuentran contiguas al xilema y está, por lo tanto, involucrado en el transporte a larga distancia del nitrato, desde la raíz hasta la parte aérea de la planta. AtNRT1.4 sólo se expresa en los peciolos de las hojas. Algo importante desde el punto de vista de este trabajo, es que el transportador AtNRT1.6 se expresa en el tejido vascular de los frutos y se encarga del transporte de nitrato entre los tejidos maternos y el embrión en desarrollo (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006).

El sistema de transporte de alta afinidad de nitrato actúa cuando la concentración externa de nitrato es baja y se basa en la actividad de la también llamada familia de transportadores NRT2. La evidencia indica que estos transportadores contribuyen de manera específica en una respuesta inducible por el nitrato, mientras que la familia de transportadores NRT1 contribuye más ampliamente a la toma de nitrógeno y muestran una respuesta tanto inducible como constitutiva (Crawford y Glass, 1998).

1.7 ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO

El amonio producido por la acción de la NR y la NiR, el tomado del medio exterior y el reasimilado proveniente de la fotorespiración, fluye a través del ciclo glutamino sintetasa/glutamato sintasa (ciclo GS/GOGAT), que junto con la glutamato deshidrogenasa (GDH), convierten este nitrógeno reducido a su forma orgánica. Este ciclo provee de glutamina (Gln) y glutamato (Glu), que son transportados vía vascular, desde la fuente hacia la poza, manteniendo los niveles de nitrógeno necesarios para el crecimiento y el desarrollo de la planta. La primera enzima, la glutamino sintetasa (GS), cataliza la formación de Gln a partir de NH_4^+ y Glu, en una reacción dependiente de ATP. La Gln sirve como uno de los donadores de grupos amino para la biosíntesis de compuestos nitrogenados, como aminoácidos, nucleótidos y clorofilas.

Por otro lado, la glutamino 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) cataliza la transferencia del nitrógeno en la amida Gln, formada anteriormente por la GS, al -cetoglutarato (2-OG), obteniéndose de esta manera dos moléculas de Glu. La GDH es

capaz de incorporar directamente el NH_4^+ al 2-OG para producir Glu. El glutamato producido por la GDH o por el ciclo GS-GOGAT sirve como punto de partida, o como aminoácido donador del grupo amino para la síntesis de otros aminoácidos, como la valina y la fenilalanina (Ohashi *et al.*, 2015; Figura 1.6).

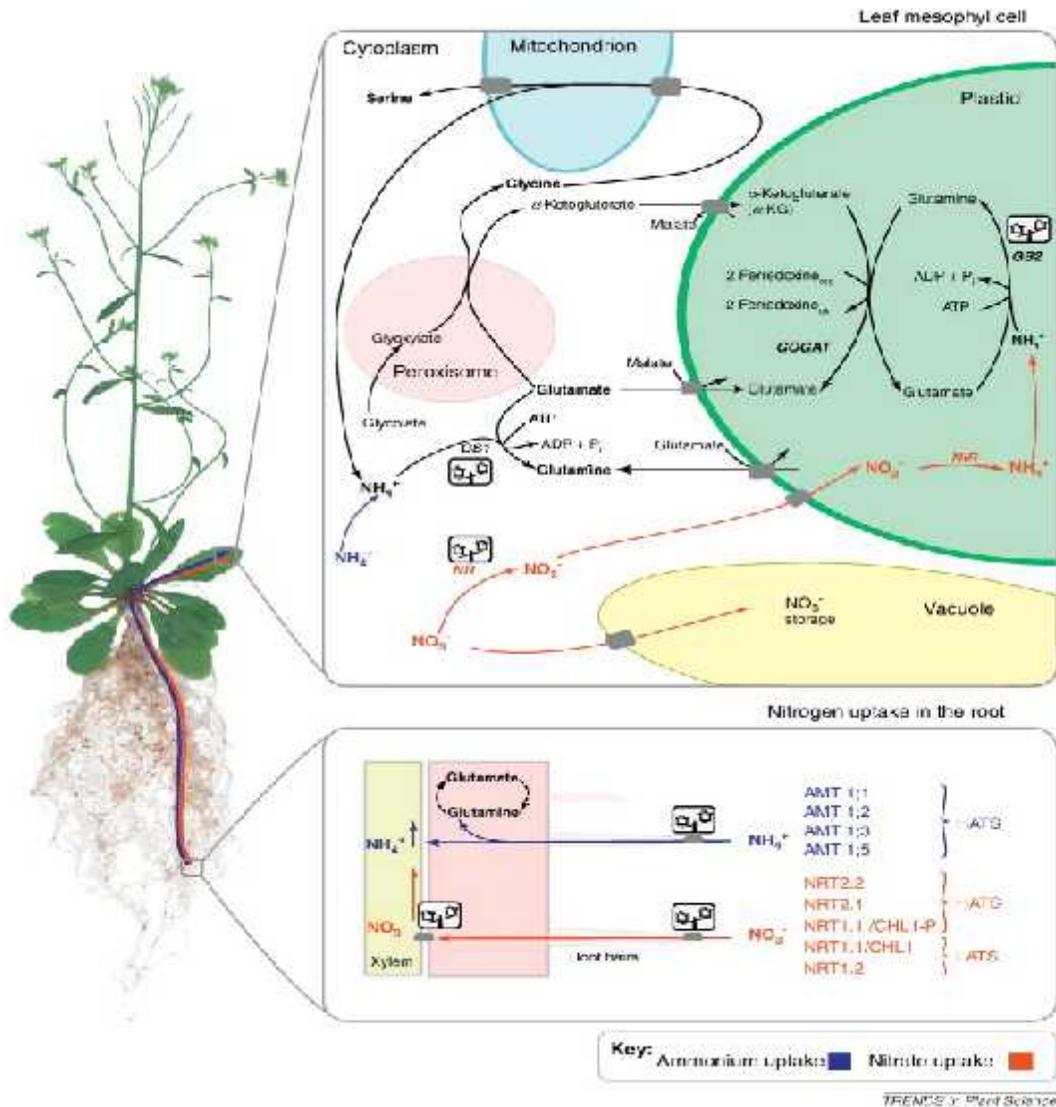


Figura 1.6 Toma, transporte y asimilación de nitrato en *A. thaliana* (tomado de Arsova *et al.*, 2012).

1.8 BIOSÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS FENILALANINA, VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA

1.8.1 BIOSÍNTESIS DE FENILALANINA

La ruta del shikimato da origen a los tres aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Todos los metabolitos intermediarios derivados de las siete enzimas que integran la ruta pueden servir como precursores para otras rutas metabólicas (Figura 1.7). Esta vía acopla al metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de compuestos aromáticos en una secuencia de siete pasos: el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato se condensan para dar origen al 3-desoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato, que posteriormente se convierte en corismato (Herrmann y Weaver, 1999). Este último es el precursor común en la síntesis de los aminoácidos aromáticos. Existen varios puntos de ramificación en la síntesis de estos tres aminoácidos (Figura 1.8): por un lado, la antranilato sintasa (AS) dirige al corismato hacia la síntesis de Trp, mientras que la corismato mutasa (CM), que produce prefenato, a la síntesis de Tyr o Phe. La enzima que cataliza el último paso en la síntesis de Tyr es la arogenato deshidrogenasa (ADH), mientras que en el de Phe es la arogenato deshidratasa (Dudareva, 2015).

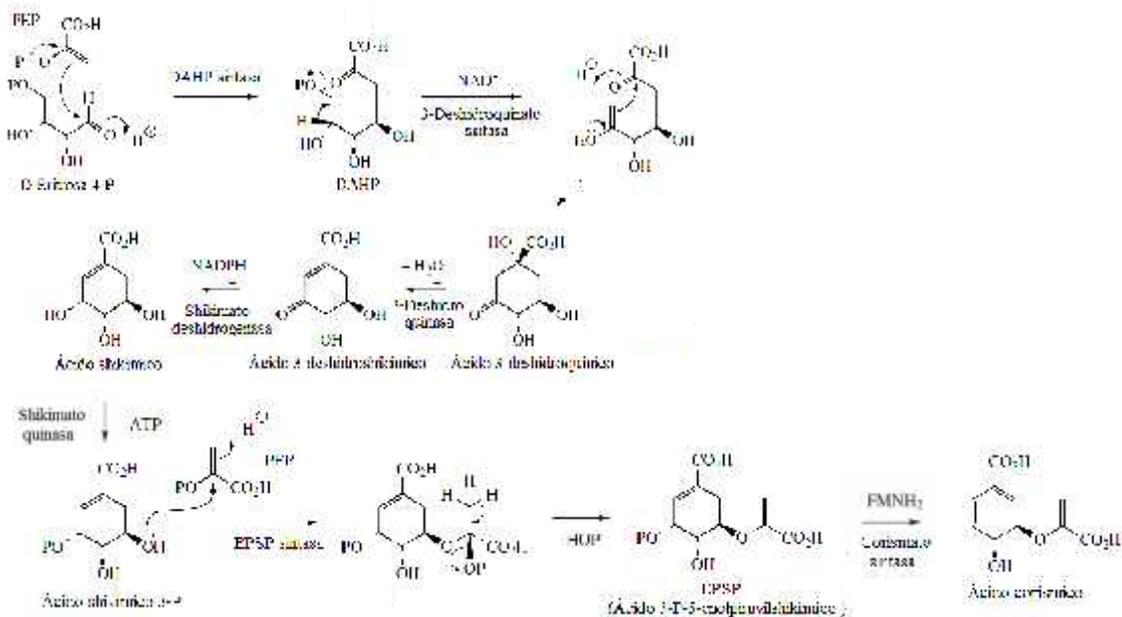


Figura 1.7 Ruta del shikimato.

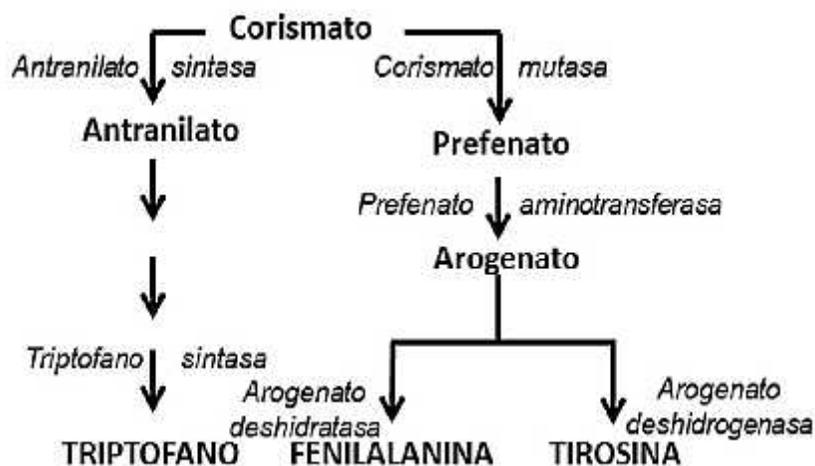


Figura 1.8 Ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

1.8.2 BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA: VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA

La ruta biosintética que da lugar a la síntesis de valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) consiste en un conjunto de cuatro enzimas (Figura 1.9): la acetolactato sintasa o acetohidroxiácido sintasa (ALS o AHAS), la cetoácido reductoisomerasa (KARI), la deshidroxiácido deshidratasa (EC) y la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAT). En la ruta biosintética que conduce a la obtención de Ile, la treonina se convierte en α -cetobutirato, α -acetohidroxibutirato, 2,3-dihidroxi-3-metil valerato, 2-oxo-3-metilvalerato y, finalmente, en Ile. En esta serie de cambios consecutivos intervienen las enzimas treonina deshidratasa (TD), la ALS, la KARI, la dihidroxiácido deshidratasa, y por último, la BCAT. La enzima TD interviene únicamente en la síntesis de Ile, mientras que las cuatro restantes son comunes a la síntesis de Val y Leu.

Por otro lado, el piruvato se convierte en acetolactato, dihidroxiisovalerato, 2-oxoisovalerato y Val; mientras que, cuando el destino final del piruvato es la síntesis de Leu, el 2-oxoisovalerato se convierte en 3-carboxi-3-hidroxiisocaproato, 3-carboxi-2-hidroxiisocaproato, 2-oxoisocaproato, y finalmente, Leu. De piruvato a Val, intervienen el bloque común de las cuatro enzimas; de 2-oxoisovalerato a Leu, intervienen las enzimas isopropilmalato sintasa, isopropilmalato isomerasa, isopropilmalato deshidrogenasa, y, por

último, la BCAT (Peng *et al.*, 2015).

Esta ruta biosintética se regula mediante tres mecanismos: a nivel de la expresión génica, a través de la especificidad de la enzima por su sustrato y la inhibición por retroalimentación de varias enzimas. La expresión de los genes involucrados en la ruta es mayor en los tejidos jóvenes de las plantas, donde es mayor la demanda de Val, Leu e Ile. Se ha sugerido que esa expresión está regulada en diferentes órganos, de acuerdo con las necesidades específicas de un tejido en particular, como la producción de metabolitos secundarios (Singh y Shaner, 1995).

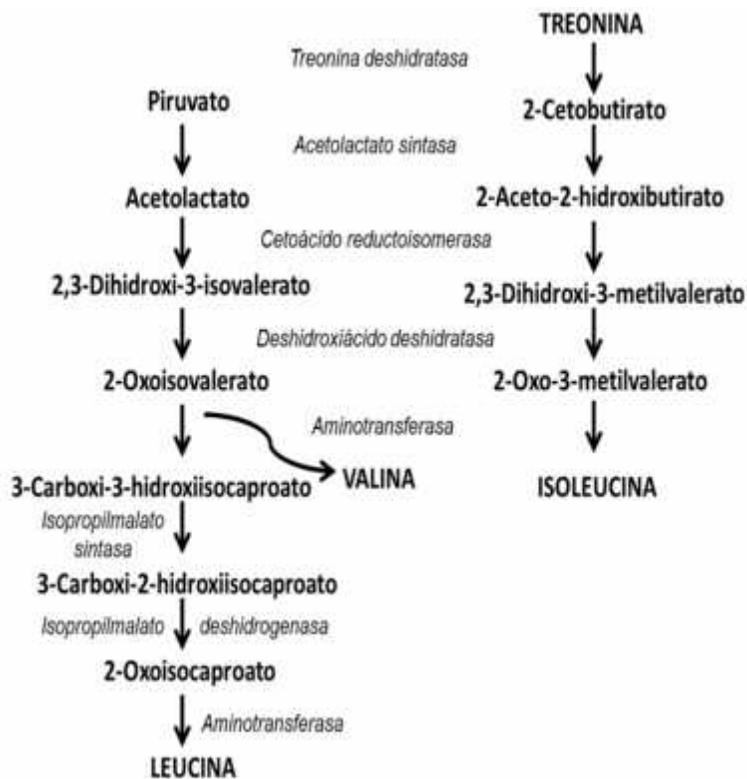


Figura 1.9 Ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada: Val, Leu e Ile.

HIPÓTESIS

La expresión de los genes involucrados en la síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides, variará en función de la concentración de nitrógeno con la que la planta es cultivada, y dicha expresión se correlacionará con el nivel de acumulación de estos metabolitos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides a través de los cambios en la expresión génica de la corismato mutasa (*CM*), arogenato deshidratasa (*ADT*), acetolactato sintasa (*ALS*) y acil transferasa 3 (*AT3*) en placentas de *Capsicum chinense* Jacq. durante el desarrollo del fruto bajo diferentes regímenes de fertilización nitrogenada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer un sistema hidropónico para la aplicación de los diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada (1, 7.5 y 15 mM nitrato).

Evaluar la acumulación de nitrato, aminoácidos totales, valina, fenilalanina, vainillina, capsaicina y dihidrocapsaicina en placentas de frutos de 10, 25 y 45 DPA de plantas que han estado bajo los diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada.

Analizar la expresión de los genes *CM*, *ADT*, *ALS* y *AT3* en placentas de chile habanero en las fases de desarrollo bajo los tratamientos de fertilización antes mencionados.

JUSTIFICACIÓN

Tres cosas son innegables en la biotecnología vegetal: 1) los metabolitos secundarios son muy importantes por la gran cantidad de aplicaciones que poseen, 2) las plantas son los laboratorios de síntesis química más eficientes hasta ahora conocidos y 3) los conocimientos sobre los complejos mecanismos que regulan el metabolismo secundario han limitado el desarrollo de estrategias que permitan producirlos a escala comercial.

Es por esto que hoy en día gran parte del esfuerzo científico se dedica a explorar a fondo y a arrojar luz sobre los complejos, y en muchos casos desconocidos, mecanismos de regulación de las vías metabólicas que utilizan los organismos para sintetizarlos (Sirikantaramas *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2001).

La investigación en el área del metabolismo secundario se centra en entender los mecanismos a través de los cuales el ambiente determina, condiciona o interviene en la síntesis, acumulación y degradación de los MS y, a su vez, comprender cuál es la función fisiológica o ecológica bajo las condiciones ambientales, muchas veces adversas, que dan origen a cambios en su concentración; sobre todo en aquellas plantas en las que la disposición de estas moléculas se da sólo sobre ciertos tejidos, o incluso sobre tipos específicos de células.

El metabolismo de los capsaicinoides es un interesante y complejo tema de investigación actual. Estos compuestos que le dan el picor a los chiles, se sintetizan y acumulan en ciertas zonas de la epidermis de la placenta (Stewart *et al.*, 2007), en función del desarrollo de los frutos (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Esta acumulación se ve afectada por la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. En los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación, usando un sistema *in vitro* que consiste en el aislamiento e inmersión por cortos periodos de tiempo del tejido placentario en medio MS con una fuente inorgánica de nitrógeno, se ha demostrado la dependencia y la coordinación entre la síntesis de valina y fenilalanina y la síntesis de capsaicinoides (Baas-Espinola *et al.*, 2016).

Dado que los experimentos que demuestran un vínculo entre el metabolismo primario y secundario en el tejido placentario fueron realizados con tejido aislado y bajo condiciones

in vitro, es evidente la necesidad de analizar la síntesis de estos aminoácidos precursores en este tejido durante el desarrollo del fruto y evaluando los posibles cambios que se pudieran presentar en función de las variaciones en la disponibilidad del nitrógeno en el ambiente durante la síntesis de los capsaicinoides.

Hasta ahora no existen modelos de regulación que expliquen la síntesis de los capsaicinoides, y sus diferentes patrones de acumulación como consecuencia de un cambio en el ambiente en el que se desarrolla la planta (Aza-González *et al.*, 2010). Lo anterior, justifica la necesidad de realizar estudios encaminados en comprender estos procesos regulatorios.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

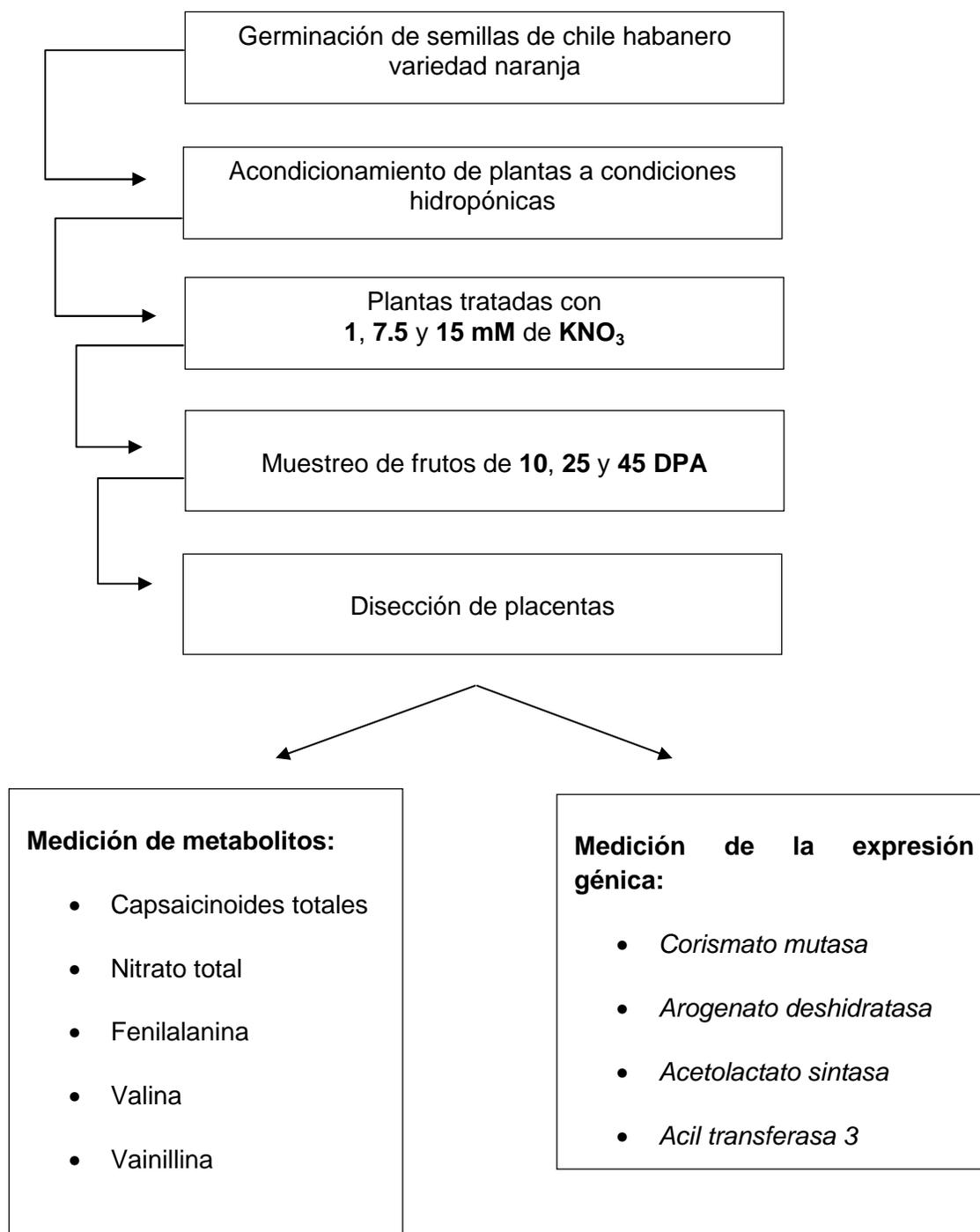


Figura 1.10 Estrategia experimental

CAPÍTULO II

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA HIDROPÓNICO PARA EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CHILE HABANERO

2.1 ANTECEDENTES

Los elementos esenciales que necesitan las plantas superiores para sobrevivir son casi exclusivamente de naturaleza inorgánica. Bajo condiciones ambientales favorables, una planta es capaz de desarrollarse y completar su ciclo vital si se le proporcionan elementos químicos como el carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), zinc (Zn) y níquel (Ni). A excepción de los nutrimentos no minerales C, H y O, que se incorporan al metabolismo vegetal por medio del agua, del gas carbónico (CO₂) y del oxígeno (O₂) de la atmósfera, los demás nutrimentos son absorbidos por las raíces, provenientes de los minerales o de la materia orgánica en descomposición.

La hidroponía ha resultado ser una alternativa para el campo, ya que la escasez de suelo apto para la agricultura se ha convertido en un factor limitante para la producción agrícola (Kratky, 2003). Estos sistemas también pueden ser utilizados en investigación, debido a que han demostrado ser importantes herramientas biotecnológicas para el estudio de los cambios metabólicos, la fisiología celular y las interacciones ecológicas de la planta, como consecuencia de los cambios en la composición de los nutrimentos en el medio ambiente, que son los que están disponibles para su crecimiento (Dengchao *et al.*, 2002).

Existen diferentes tipos de sistemas hidropónicos, pero una característica común y fundamental es la presencia de un sustrato sólido e inerte que sirva de soporte para la planta. Esta característica facilita la movilización y distribución del aire en el agua y la solución nutritiva, características deseables para el desarrollo del espacio radical. Las características más apropiadas del sustrato son: que sea relativamente liviano, presente cierto grado de porosidad y tamaño apropiado, ausencia de bordes cortantes y que sea químicamente inerte. Algunos de los sustratos sólidos más utilizados son la arena de río,

arena de mar, grava, vidrio molido, ladrillo triturado, fibra de coco, aserrín, vermiculita, perlita, lana de roca y materiales plásticos (Sheikh, 2006).

Una clase de sistema hidropónico es el sistema de riego continuo por goteo con recirculación (Figura 2.1). Esta es una buena técnica para el crecimiento de diferentes especies vegetales, porque permite tener control del volumen de agua y de la solución nutritiva (variación de los diferentes componentes de las sales, monitoreo de la conductividad iónica y el pH, etc.; Bugarín-Montoya *et al.*, 2002).

El bajo costo de producción, la facilidad en la construcción y el manejo de este sistema son otras de las características favorables de este sistema. Cada unidad del sistema hidropónico consiste en una caja de plástico con tapa, que sirve como reservorio para la solución nutritiva. En la tapa, se realizan orificios de un diámetro tal, que en estos puedan ser embonados maceteros de plástico. Dependiendo del tipo de planta que se quiera cultivar y del tamaño de la caja, puede contener entre cuatro y ocho maceteros. La distancia entre el fondo de los maceteros y el nivel de la solución nutritiva debe de ser considerada, de modo que cuando las plantas crezcan, las raíces puedan alcanzarla.

La solución nutritiva del reservorio es recirculada mediante una bomba (que puede estar inmersa en la solución nutritiva o fuera de ésta), que distribuye la solución nutritiva a las plantas a través de unos dispositivos de goteo continuo (Grusak y Pezeshgi, 1994).

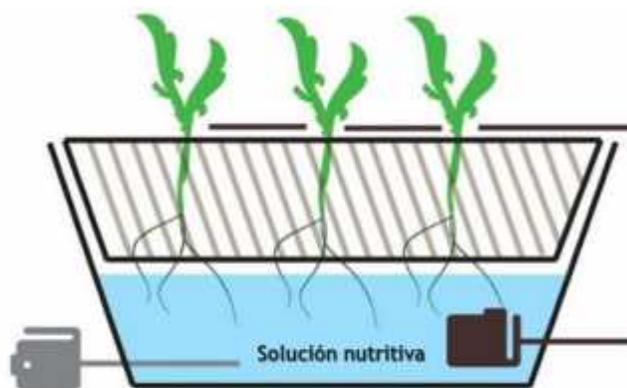


Figura 2.1 Esquema del sistema hidropónico de riego continuo por goteo con recirculación.

El objetivo fue construir un sistema hidropónico para el crecimiento, aplicación de los diferentes regímenes nutricionales y el mantenimiento de las plantas necesarias para evaluar la influencia de la disponibilidad del nitrato sobre el metabolismo primario y secundario en placentas de frutos de *Capsicum chinense* Jacq.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIALES

Se utilizaron plantas y frutos de chile habanero de una variedad de frutos naranja provenientes de los invernaderos del CICY.

2.2.2 MÉTODOS

2.2.2.1 CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA HIDROPÓNICO

El sistema hidropónico por recirculación se construyó utilizando cajas de plástico con tapa, con capacidad para diecinueve galones. A dichas tapas, se les realizaron cuatro orificios de 15 cm de diámetro, en donde se colocaron cuatro maceteros de plástico (Figura 2.3). Otro orificio más pequeño fue abierto para permitir la instalación de un distribuidor cuádruple (marca Orbit), el cual permitió hacer llegar la solución nutritiva a cada una de las cuatro plantas de cada caja. Para hacer recircular la solución nutritiva, se utilizó una bomba de agua sumergible con capacidad de bombeo de 1200 L/hora (modelo SPH-1500, marca SUNNY).

2.2.2.2 USO DEL SISTEMA HIDROPÓNICO CON RIEGO CONTINUO POR GOTEO CON RECIRCULACIÓN

El riego y fertilización realizados en pequeña cantidad y con frecuencia mediante goteo consiguen un grado de humedad constante y óptimo del sustrato para las plantas. Debido a esto, se obtienen plantas más saludables y un mayor rendimiento que con el riego a mano (Bugarín-Montoya *et al.*, 2002).

Las plantas de chile habanero se cultivaron en macetas de plástico, utilizando piedra volcánica (también conocida como tezontle) a manera de sustrato inerte, las cuales fueron colocadas en el sistema hidropónico de cajas. Se contruyeron nueve cajas, en las cuales se colocaron cuatro plantas de chile por cada una (Figura 2.2), dando lugar a tres réplicas. Antes de iniciar con los experimentos de evaluación del efecto de diferentes regímenes nutrimentales sobre la expresión génica, y con el fin de aminorar las variaciones entre los experimentos, fue necesario disponer de la mayor uniformidad posible en el crecimiento de las plantas, es decir, que todas contaran con un tamaño y vigor similares.

Para lograrlo, se utilizaron los fertilizantes MaxiGro™ (composición porcentual 10-5-14 de N, P y K, respectivamente) apropiado para la etapa de crecimiento vegetativo de las plantas, y MaxiBloom™, adecuado para la promoción de la floración y fructificación de una amplia variedad de cultivos (composición porcentual 5-15-14 de N, P y K, respectivamente).



Figura 2.2 Construcción del sistem hidropónico de cajas.

El riego por goteo resulta adecuado para cualquier sustrato, util para todo tipo de aplicaciones, desde el riego automatizado de compost, hasta un régimen plenamente hidropónico con medios inertes, como bolas de arcilla o lana de roca. Además, la recirculación evita que se pierdan valiosos nutrientes del agua excedente o de desecho. Cada gotero es regulable y puede adaptarse a cada planta (Mackowiak *et al.*, 1996).

La mayoría de las soluciones nutritivas no tienen capacidad amortiguadora y el pH varía

continuamente, sin mantenerse en un rango ideal. Distinto a lo que ocurre en el suelo, en este caso, el rango ideal de pH debe estar entre 5.0 y 6.0. Valores de pH diferentes a éstos provocan alteraciones en las formas libres y complejas de los nutrimentos en la solución. En lo que refiere a los macronutrimentos, sólo las formas disponibles de calcio y fósforo se ven afectadas negativamente por los aumentos de pH de la solución nutritiva (Arnon *et al.*, 1942). Para asegurar que el rango de pH se mantuviera entre los valores indicados durante el desarrollo de las plantas de chile habanero, se monitoreó este parámetro durante todo el proceso, con una frecuencia semanal, utilizando un potenciómetro portátil (marca Extech, modelo Exstik 2). El ajuste de pH de la solución hidropónica se hizo por adición de soluciones de NaOH y HCl, ambas a 1 M.

La conductividad eléctrica puede servir para estimar la concentración de sales en la solución nutritiva durante las primeras dos semanas. Una vez que se prepara una solución, ésta se debe cambiar completamente en un máximo de tres semanas después de su preparación (Cornish, 1992). En este caso, se monitoreó la conductividad eléctrica con conductímetro portátil (marca HANNA, modelo HI 8733), y se utilizó esta información para completar el volumen de agua perdida por evaporación o por la evapotranspiración de las plantas. Esto se hizo cada semana y la solución nutritiva se renovó cada quince días.

El uso del sistema hidropónico resultó ser viable y eficiente para el crecimiento y desarrollo de plantas de chile habanero (Figura 2.4), que sirvieron para el estudio del efecto de la nutrición nitrogenada y su efecto sobre la síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides en plantas de *Capsicum chinense* Jacq.

2.2.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se germinaron semillas de chile habanero de una variedad de frutos naranja en una mezcla de turba de musgo (Berger BM2) y fibra de coco. Las plántulas de dos semanas (de aproximadamente 12 cm de altura) fueron trasplantadas al sistema hidropónico descrito arriba.

Las plantas se cultivaron con MaxiGro™ hasta las nueve semanas, y con MaxiBloom™, de la semana diez a la semana doce. Una vez alcanzada la floración en todas las plantas,

este primer conjunto de flores fue podado e inmediatamente se desechó la solución nutritiva de las cajas, la cual se sustituyó con agua de la llave. Estas condiciones se mantuvieron durante una semana, podando toda flor nueva que emergiera en este período.

Transcurrida esta etapa, se inició la aplicación de los tratamientos de fertilización nitrogenada, que consistieron de tres dosis de KNO_3 , 1, 7.5 y 15 mM (tomando como referencia las concentraciones empleadas en Monforte *et al.*, 2010). La concentración total de K fue igualada a 18 mM en todos los tratamientos, utilizando KCl.

El diseño del experimento fue por bloques completamente al azar, consistiendo de tres tratamientos distribuidos en tres bloques, con tres repeticiones cada uno.

En la figura 2.3 se muestra la apariencia de los frutos de chile cosechados en las tres fases de desarrollo estudiadas.



Figura 2.3 Frutos de chile habanero de A) 10, B) 25 y C) 45 DPA.

2.2.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 17. Los datos obtenidos se evaluaron usando un análisis de varianza (ANOVA), de acuerdo con el modelo experimental planteado. Posteriormente se realizó una comparación de medias a través de una prueba de Tukey con 95% de confianza.



Figura 2.4 Desarrollo de plantas de chile habanero en hidroponía. A) plantas de 15 días postgerminación. B) plantas de 40 días postgerminación. C) plantas de cuatro meses postgerminación. D) plantas de seis meses postgerminación.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE VALINA, FENILALANINA Y CAPSAICINOIDES EN PLACENTAS DE CHILE HABANERO DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO BAJO DIFERENTES SUMINISTROS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA

3.1 ANTECEDENTES

La síntesis de capsaicinoides se da como resultado de un proceso que involucra cambios bioquímicos y moleculares bajo una regulación genética poco conocida (Aza-González *et al.*, 2010), y en respuesta a cambios en el ambiente. Se sabe que la síntesis de estos compuestos ocurre exclusivamente en la placenta y que bajo condiciones *in vitro*, la producción de estos alcaloides depende de la Val y la Phe que se sintetizan en el mismo tejido (Baas-Espinola *et al.*, 2016).

Un dato que revela la íntima coordinación entre el metabolismo primario y el secundario en la placenta es el hecho de que la adición de inductores, ácido salicílico (AS) y jasmonato de metilo (MeJa) activan la asimilación de amonio, a través del ciclo GS-GOGAT. Una vez activado este ciclo, bien podría ser el encargado de reciclar el amonio que se produce como resultado de la actividad de las enzimas PAL y BCAT, que posteriormente puede ser utilizado en la placenta misma a través de la pAMT, que cataliza la conversión de vainillina a vainillilamina (Ancona-Escalante *et al.*, 2013).

Un dato adicional que fortalece este vínculo entre la asimilación primaria de nitrógeno en placenta y la síntesis de alcaloides es que cuando se usan estos mismos inductores, la expresión de los genes de la *ADT* y la *ALS* cambian de manera coordinada con la de la *AT3* (Baas-Espinola, 2015), presunto gen que codifica la capsaicinoide sintasa (Ogawa *et al.*, 2015).

Para entender mejor el metabolismo de los capsaicinoides, es necesario realizar estudios diseñados para identificar los componentes bioquímicos y moleculares que exhiban cambios bajo diferentes escenarios, como por ejemplo variaciones en la disponibilidad de nitrógeno durante las diferentes etapas del desarrollo del fruto.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS

La extracción de metabolitos inició con el aislamiento de diez a quince placentas de Chile, en los estadios de desarrollo de 10, 25 y 45 DPA a partir de plantas creciendo en las tres diferentes concentraciones de nitrógeno (1, 7.5 y 15 mM de NO_3^-). Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por punto de medición.

Las placentas se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron para determinar el contenido de nitrato, aminoácidos solubles totales, fenilalanina y valina. Se tomaron muestras de 0.25 g de tejido pulverizado, se les adicionaron 1.25 mL de metanol al 80% (v/v) y se homogeneizaron con un politrón a velocidad máxima durante 2 min. Luego, se centrifugaron durante 20 min a 20,000 rpm a 4 °C y se midieron los volúmenes de extracto recuperado. Para el análisis de vainillina, capsaicina y dihidrocapsaicina, se tomaron 0.2 g de tejido pulverizado, se les adicionaron 8 mL de acetonitrilo y se incubó en baño María (80 °C) durante 4 h. Por último, se filtró al vacío y se midió el volumen del extracto recuperado. Los extractos se guardaron en oscuridad a -20 °C.

3.2.2 MEDICIÓN DE NITRATO

Se usó el método de Nicholas y Nason (1957). La muestra (20 μL) se completó a 1.5 mL con agua destilada. Se adicionó 0.1 mL de ácido sulfámico al 10% (v/v) y se dejó reposar durante 2 min. Después, se añadió 0.4 mL de ácido perclórico al 20% (v/v), se agitó y se midió la absorbancia a 210 nm. La curva estándar (a partir de una solución de KNO_3 de 1 mg/mL, en un rango de 0 a 20 μg) se procesó de la misma manera.

3.2.3 MEDICIÓN DE AMINOÁCIDOS SOLUBLES TOTALES

Se usó el método de Cocking y Yemm (1954). La muestra (20 μL) se completó con agua destilada a 1 mL, se le agregó 1 mL del reactivo de ninhidrina (solución A+B) preparado con una solución amortiguadora de citratos 0.2 M (recién preparada), pH 5.0, agregando 0.08 g de cloruro de estaño por cada 50 mL del amortiguador (Solución A). Se tomaron 10 mL de esta solución y se le agregó 0.4 g de ninhidrina, previamente disuelta en 10 mL de

metilselósolve (Solución B) y se colocó en baño María a ebullición durante 30 min. Se le agregaron 2.5 mL de isopropanol al 50% (v/v), se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 570 nm.

3.2.4 MEDICIÓN DE VALINA Y FENILALANINA

Ambos aminoácidos se determinaron como derivados del *o*-ftalaldehído (OPA). La separación y medición de las muestras se realizó mediante HPLC [Agilent series 1200 con detector de fluorescencia (FLD), columna Ultrasphere ODS 3 μ m; 7.5 x 4.6 mm Altex, Berkeley, C.A.], tomando 100 μ L de extracto y añadiendo 100 μ L de metanol al 80% (v/v) y 40 μ L de reactivo OPA preparado de la siguiente manera: 54 mg de OPA disueltos en una mezcla 1:9 de etanol y 0.4 M borato de sodio pH 9.4 y 200 μ L β -mercaptoetanol. Las muestras se incubaron 90 seg a temperatura ambiente antes de ser inyectadas en el equipo. La curva estándar de ambos aminoácidos se obtuvo preparando una solución madre 2 mM, de la cual se tomaron alícuotas para tener un rango de 0 a 100 nmol de ambos aminoácidos en la mezcla. La curva se trató de la misma manera que las muestras experimentales.

Los OPA-derivados fueron separados y eluidos utilizando una fase móvil isocrática compuesta por una mezcla de dos disolventes en una relación 45A:55B [A= metanol 100% y B= amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 6.5: metanol (90:10)]. El sistema empleado se filtró utilizando unidades Millex LCR (Millipore) de 0.22 μ m, y fue almacenado en refrigeración en recipientes ámbar para prevenir el crecimiento de algas.

Las condiciones de la corrida fueron: tiempo de 13.5 min, con un flujo de 1 mL/min, a 35 °C, con un volumen de inyección de 20 μ L. Los metabolitos fueron detectados por fluorescencia a 360 nm (excitación) y 455 nm (emisión). El tiempo de retención de OPA-Val fue de 10.3 min, mientras que en el caso de OPA-Phe fue de 12.6 min.

3.2.5 MEDICIÓN DE CAPSAICINOIDES

La concentración de capsaicinoides se midió mediante HPLC (Collins *et al.*, 1995). Para la inyección de las muestras en el equipo, se utilizó una alícuota de 2 mL, misma que se filtró a través de unidades Millex LCR (Millipore) de 0.45 μ m. Se empleó un HPLC Agilent

serie 1100 (Agilent Technologies, Germany) con detector de arreglo de diodos. Los capsaicinoides se separaron en una columna de fase reversa Zorbax Octadecil Silano (ODS) C18 (tamaño de partícula: 5 μ m, 4.6 mm x 150 mm). Las condiciones del ensayo fueron: temperatura ambiente, con una fase móvil isocrática: mezcla de dos disolventes en una relación 30A:70B (A= metanol:agua (10:90) y B= metanol 100%). El tiempo de corrida fue de 10 min con un flujo de 1 mL/min, un volumen de inyección de 20 μ L y a una longitud de onda de 280 nm.

La capsaicina y dihidrocapsaicina fueron identificados y cuantificados usando estándares de los dos compuestos.

3.2.6 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN inició con la pulverización en un mortero de 2 g de tejido, utilizando nitrógeno líquido y 500 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) hasta obtener un polvo fino. Se añadieron 5 mL del amortiguador de extracción (en el mismo mortero) [38% (v/v) fenol, 0.8 M tiocianato de guanidina, 0.4 M tiocianato de amonio, 0.1 M acetato de sodio pH 5, 5% glicerol (v/v), 0.1% rojo fenol (p/v)], y se homogenizó la mezcla utilizando una espátula estéril. Se transfirió 1 mL de la mezcla en tubos Eppendorf estériles y se agitaron vigorosamente en un vortex, posteriormente se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 10 min y se separó la fase acuosa (conteniendo los ácidos nucleicos) de la fase orgánica (precipitado, constituido mayormente por proteínas, tejidos y membranas) mediante centrifugación (14,000 x g durante 10 min a 25 °C).

Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a nuevos tubos estériles agregando 1 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitaron los tubos vigorosamente durante 15 seg en el vortex, e incubaron a temperatura ambiente durante 2 min. Después, se separaron las fases mediante centrifugación a 14,000 x g durante 10 min a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Este proceso se repitió una vez más para asegurar la eliminación de proteínas, lípidos y demás sustancias que pudieran interferir con la pureza de los ácidos nucleicos.

Posteriormente, se mezcló con 0.625 volúmenes de LiCl 8 M. El ARN se incubó a 4 °C durante toda la noche. Luego, éste fue separado por centrifugación a 17,000 x g durante

30 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó cuidadosamente el sedimento, en primer lugar, con 3 mL de 3 M LiCl y después, con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó la muestra a 17,000 $\times g$ a 4 °C durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente fue resuspendido en 300 μ L de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).

Una vez purificado el ARN por precipitación, se adicionó 0.1 volúmenes de 3 M acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol al 100% y se incubó a -80 °C durante 1 h. Se centrifugó la muestra a 17,000 $\times g$ a 4 °C durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con 1 mL de etanol al 70% (v/v) a -20 °C. Se secó el precipitado a temperatura ambiente y se suspendió en 50-100 μ L de agua tratada con DEPC (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2008).

3.2.6.1 ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN

El ARN recuperado fue cuantificado espectrofotométricamente (Lewinson *et al.*, 1994). La contaminación por fenol/carbohidratos o por proteínas se determinó calculando los cocientes de absorbancia: A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , respectivamente. Con el fin de verificar la integridad del ARN, los extractos fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 1% (p/v). Los geles fueron teñidos con Gel Red y visualizados con luz ultravioleta.

3.2.6.2 TRATAMIENTO CON ADNasa

EL ARN extraído se trató con ADNasa 1 (Thermo Scientific RapidOut DNA Removal Kit). Este proceso se realizó con el fin de eliminar todo rastro de ADN genómico que pudo permanecer en las extracciones del ARN. La reacción típica consta de un volumen final de 10 μ L, de los cuales pueden ser usados hasta 8.5 μ L (5 pg – 2 μ g) de ARN, a esto se le añadió 1 μ L del amortiguador ADNasa 10X con $MgCl_2$, 0.5 μ L (0.5 U) de ADNasa 1 y H_2O libre de nucleasas c.b.p. (esta reacción puede ser escalada hasta a 500 μ L, manteniendo constante la relación de los componentes). Posteriormente, se homogenizó con delicadeza la muestra con ayuda de un vortex y se dejó incubar a 37 °C durante 30 min, utilizando un baño seco, o en su defecto, un baño María.

Terminado el tiempo de incubación, se añadieron 2 μ L de DDR (DNase Removal

Reagent) por cada unidad de ADNasa utilizada (cuidando que el volumen de este reactivo no fuera inferior al 10% del volumen final de la reacción), dejando incubar durante 2 min a temperatura ambiente, agitando los tubos delicadamente cada 40 segundos. Para precipitar el DDR, se centrifugó la muestra a 800 x g durante 15 seg. Por último, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril, evitando transferir DDR en el proceso.

3.2.7 DISEÑO DE LOS CEBADORES (“PRIMERS”)

Las secuencias reportadas se obtuvieron en la base de datos NCBI. Los números de accesoión fueron: EU616556 (CM), EU616545 (ADT), EU616547 (ALS), AY819027 (AT3) y AY572427 (actina). Todos los cebadores fueron diseñados basados en el genoma reportado de *Capsicum annuum* (Cuadro 3.1). Se identificaron regiones conservadas en las secuencias con las herramientas GRAPHICS y BLAST. Posteriormente, se diseñaron los cebadores con el programa PRIMER3 (Rozen y Skaletsky, 2000; disponible en: <http://frodo.wi.mit.edu/>). Una vez obtenidos, se realizaron PCRs *in silico* con el programa OLIGO 7 (Primer Análisis - versión 7.40; Wojciech y Piotr) para su validación.

Cuadro 3.1 Pares de cebadores diseñados para la amplificación por PCR.

Gen	Primers en sentido y antisentido (5'-3')	T _m (°C)	Tamaño del producto (pb)
CM	F: AAG CAA AAT TTC GAG CCT CAC R: CGG TCC ATT CCT GTT CAG TTC	64.3 65.7	167
ADT	F: AAC CAA TAA TTC CAC GAA CCG R: CAT TTG CAT CGT CCA CTA GCC	64.7 66.5	180
ALS	F: CTA GCC GTG CGA AAA TTG TCC R: GGG TAC TTC ACT TTC TGC TCG TT	67.6 64.5	202
AT3	F: ATT GGT CTA GCG TTA CTC GT R: ATT CTT CTG CCA CCT TAG CTC	57.9 61.3	204
ACTINA	F: AAG ATT TGG CAT CAT ACC TT R: CTG CGA TAA AGA GAC AAC ACC	57.6 61.2	185

3.2.8 PCR PUNTO FINAL Y PCR EN TIEMPO REAL

Para la síntesis de ADNc, se usó el kit H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), conforme a las instrucciones del proveedor.

Se estandarizaron las condiciones para la PCR en tiempo real, a partir de los resultados de la PCR de punto final.

Para llevar a cabo la PCR de punto final, se usó el kit de Taq PCR Master Mix (Qiagen). La reacción tuvo un volumen final de 50 μL , de los cuales 33 μL fueron agua libre de ARNasas, 5 μL de 10x PCR Buffer, 1.5 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de dNTP 10 mM, 2.5 μL de cada primer (20 pmol/ μL), 4 μL de templado de ADNc y 0.5 μL de Taq Polimerasa.

El programa de amplificación se diseñó de la siguiente manera:

Paso inicial de activación de la PCR: 3 min a 94 °C para la activación de la polimerasa; a) desnaturalización: 45 seg, 94 °C; b) alineamiento: 30 seg, 60 °C y c) extensión: 30 seg, 72 °C. Número de ciclos: 30. Extensión final: 10 min, 72 °C.

Para la qPCR, se usaron 12.5 μL SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x), 0.37 μL de cada primer (20 pmol/ μL), 1 μL ADNc y 10.75 μL agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 μL . Las condiciones de la qPCR fueron: desnaturalización inicial: 10 min, 95 °C. 40 ciclos: a) desnaturalización: 15 seg, 95 °C; b) alineamiento: 30 seg, utilizando la temperatura para cada gen encontrada por PCR punto final reportada en los resultados c) extensión: 72 °C, 30 seg.

Los resultados de qPCR se obtuvieron mediante cuantificación relativa o método de Ct (Livak y Schmittgen, 2001), el cual se basa en una comparación directa de los valores de Ct. Este método requiere de la preparación de curvas estándar para determinar las eficiencias de reacción, tanto del gen problema, como del gen de referencia o “normalizador”. Los valores de Ct se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\text{Ct (muestra)} = \text{Ct gen problema} - \text{Ct gen referencia}$$

$$\text{Ct (calibrador)} = \text{Ct gen problema} - \text{Ct gen referencia}$$

Posteriormente, se determinó el valor de C_t mediante la siguiente fórmula:

$$C_t = C_t (\text{problema}) - C_t (\text{referencia})$$

Una vez obtenido el C_t , se procedió al cálculo de la expresión relativa de la siguiente manera:

$$\text{Expresión normalizada del gen problema} = 2^{-C_t}$$

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA NO OCASIONAN CAMBIOS SOBRE LA ACUMULACIÓN DE NITRATO EN PLACENTAS DE CHILE HABANERO

Los diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada no ejercen efecto sobre la cantidad de nitrato presente en la placenta de los chiles. El nitrato encontrado en las placentas del mismo estadio de desarrollo no fue significativamente diferente, con excepción de las placentas de chile de 25 DPA creciendo con 1 mM de KNO_3 (Figura 3.1). La mayor acumulación de nitrato se dio a los 45 DPA en los tres tratamientos evaluados, aumentando conforme el desarrollo del fruto.

Estos resultados contradicen lo encontrado por Monforte-González *et al.* (2010), donde probaron las mismas concentraciones de nitrato, y hallando que la acumulación de nitrato en la placenta era proporcional a la concentración de nitrógeno en las que las plantas fueron cultivadas. Para el cultivo de sus plantas, utilizaron camas hidropónicas, técnica en la cual, se hace llegar la solución nutritiva a las plantas mediante inundación a intervalos de tiempo determinados.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden deberse a que el nitrato presente en los tratamientos de 1 y 7.5 mM fue suficiente para impedir alcanzar el umbral (o nivel mínimo necesario) de desnutrición que pudiera afectar el contenido de nitrato presente en los frutos de chile, y en especial, en las placentas. Lo anterior puede estar estrechamente

relacionado con las características de la técnica hidropónica utilizada para cultivar las plantas, ya que al ser éste un sistema cerrado de recirculación, tiene ventajas por sobre otros modelos, ya que evita la pérdida excesiva de agua y, por ende, de solución nutritiva por evaporación, proveyendo de una mejor oxigenación del medio, lo que ayuda al mejor desarrollo de las raíces, y permite el contacto directo de la solución nutritiva con éstas en todo momento que deriva en un uso más eficiente de los nutrientes en la solución.

Por otro lado, es indispensable que la planta de chile sea capaz de proveer cantidades suficientes de nitrato a las placentas de los frutos, ya que ésta, al ser un tejido de gran importancia y metabólicamente activo, requiere de un suministro constante de nitrato para poder llevar a cabo la síntesis de capsaicinoides. Ferrari *et al.* (1973) proponen la existencia de dos depósitos de nitrato que se utilizan diferencialmente en la célula vegetal, uno llamado “pool metabólico”, el cual se encuentra en el citosol, y el otro “pool de almacenamiento”, que correspondería al nitrato en vacuolas y que, por lo general, es mayor que el pool metabólico. La producción de nitrito cesa cuando el pool metabólico en citosol se agota.

La cantidad de nitrato en las placentas de chile habanero no parece depender de la disponibilidad de este ion en la solución nutritiva. En los tejidos de las plantas, los niveles de nitrato presentan un equilibrio dinámico, que refleja las velocidades de toma y reducción. Aquí, es donde la participación de la nitrato reductasa (NR) tiene un papel muy importante. Se ha demostrado que, a mayor actividad de la NR, mayor es la cantidad de nitrato reducido, que debe ser convertido inmediatamente en amonio, que será asimilado en la célula (Chen *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 1992). Dados los resultados obtenidos, el punto en el cual se presenta una diferencia en cuanto a la acumulación se dio en las placentas de frutos de 25 DPA con un tratamiento de 1 mM, lo que podría apuntar a una mayor actividad de la NR. Sin embargo, para poder dar sustento a esta afirmación deberán realizarse experimentos de expresión génica y actividad enzimática de la NR.

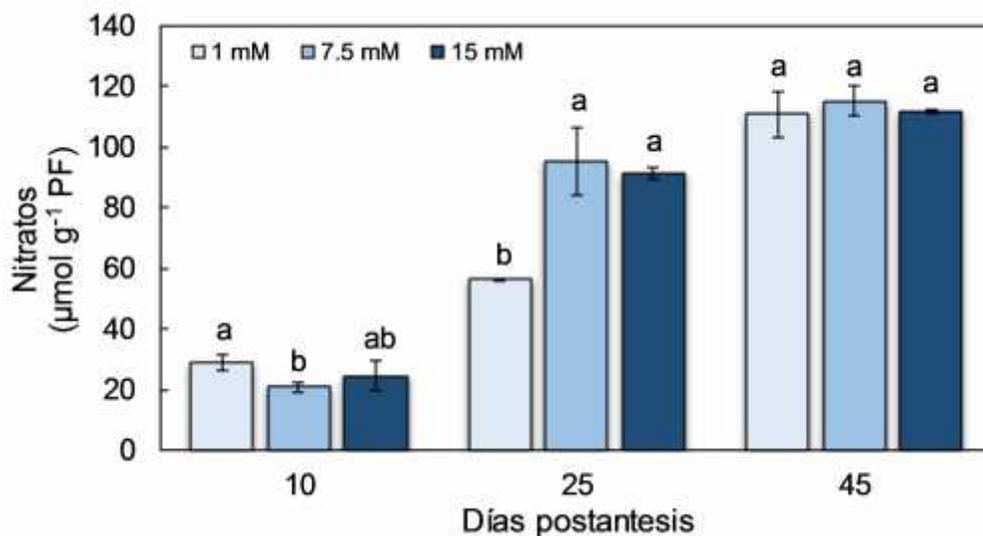


Figura 3.1 Contenido de nitrato en las placentas de chiles de 10, 25 y 45 DPA a partir de plantas creciendo en diferentes concentraciones de NO_3^- . Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

3.3.2 LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES AUMENTA CONFORME SE DESARROLLA EL FRUTO DE CHILE HABANERO

Los diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada indujeron cambios sobre la síntesis y acumulación de los capsaicinoides. La acumulación de capsaicinoides fue inversamente proporcional al nitrato utilizado para cultivar las plantas, es decir que, el tratamiento de 1 mM de KNO_3 indujo una mayor acumulación que el tratamiento de 7.5 mM y éste, a su vez, que el tratamiento de 15 mM (Figura 3.2). Estos resultados concuerdan con resultados anteriores obtenidos en el sistema *in vitro*, en los cuales se encontró que una cantidad limitante de nitrógeno total daba lugar a una acumulación de capsaicinoides en las placentas (Ancona-Escalante, 2013). Por otra parte, se corroboró que la acumulación de capsaicinoides está ligada íntimamente con el grado de desarrollo del fruto.

La forma y la disponibilidad del nitrógeno tiene efectos distintos sobre la acumulación de metabolitos secundarios, como por ejemplo ocurre en *Taxus yunnanensis*, donde la aplicación de amonio como única fuente de nitrógeno favoreció la acumulación de taxol (Chen *et al.*, 2003), mientras que en *Eleutherococcus koreanum* Nakai, la proporción 1:2 amonio:nitrato en baja concentración provocó la acumulación de ácido clorogénico, flavonoides y eleuterósidos B y E (Lee y Paek, 2012).

En *Capsicum chinense*, el uso de cantidades limitantes de nitrógeno total (un sexto de la concentración usual del medio Murashige-Skoog, 10 mM) provocó la acumulación de capsaicinoides en un sistema de placentas cultivadas *in vitro*, así como un aumento en las actividades de las enzimas NR y ADT, pero no así en la glutamino sintetasa (GS) (Ancona-Escalante, 2013). Es probable que, estos cambios en el metabolismo nitrogenado, vengán acompañados de otros provocados por el metabolismo del carbono, por lo que evaluar ambos procesos, de manera integral, sería una buena estrategia para aumentar el conocimiento, en lo que respecta al metabolismo especializado.

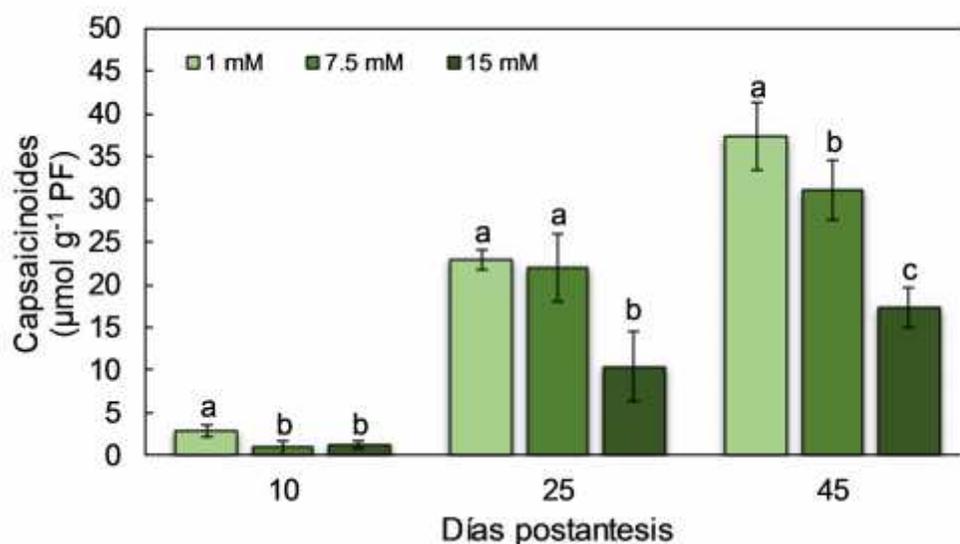


Figura 3.2 Efecto del NO_3^- sobre la acumulación de los capsaicinoides totales en placentas de chile de 10, 25 y 45 DPA. Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

3.3.3 ACUMULACIÓN DE VALINA Y FENILALANINA BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA

Los tres tratamientos de nitrato evaluados indujeron mayor acumulación de valina en las placentas de frutos de 25 DPA. Es probable que el nivel de valina observado en los tres tratamientos en chiles de 25 DPA se deba a que estos frutos, por ser jóvenes y estar en continuo crecimiento, presenten un metabolismo particularmente activo, por lo que requieren de valina para la síntesis de proteínas y demás compuestos. En la figura 3.3 se observa cómo es que fluctúan los niveles de valina conforme el desarrollo del fruto. Es importante destacar que se encontró una cantidad de 4 a 5 veces mayor de valina, comparada con las de fenilalanina.

En general, los aminoácidos aromáticos no se acumulan en las células vegetales, sino que se producen para satisfacer las demandas del momento; además, son piezas fundamentales de la síntesis de muchos otros compuestos, como los fenilpropanoides, que se sintetizan en relación a las necesidades fisiológicas celulares dependientes del medio ambiente y que, en su conjunto, responden a las necesidades adaptativas de los organismos.

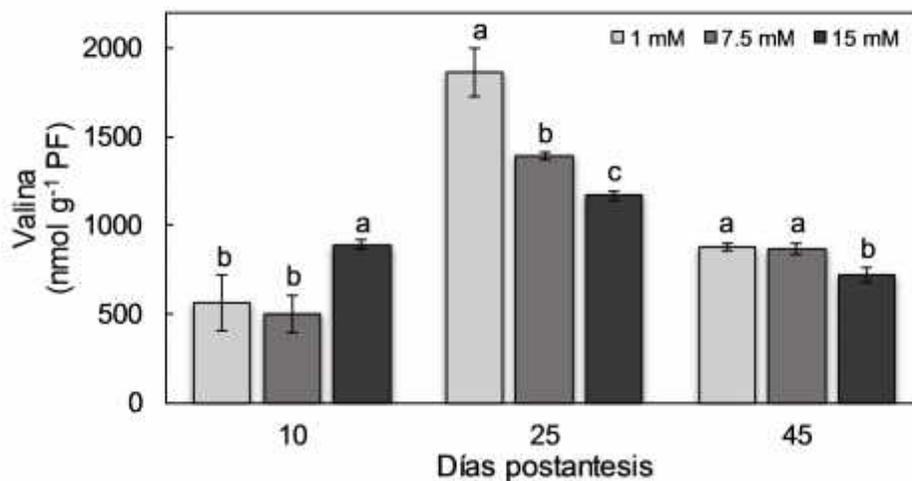


Figura 3.3 Efecto del NO_3^- sobre la acumulación de valina en placentas de chile habanero durante el desarrollo del fruto. Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$)

Como se observa en la figura 3.4, el efecto de los tratamientos de fertilización nitrogenada no provoca diferencias significativas sobre la acumulación de fenilalanina en frutos de 10 DPA, quizá porque en este estadio de madurez, la cantidad necesaria de este metabolito es suficiente, lo que implica una baja actividad en su proceso de biosíntesis. A medida que el fruto madura (25 DPA), se nota un aumento considerable en el contenido de fenilalanina, en particular en los tratamientos de 1 y 7.5 mM. La máxima acumulación se dio a 45 DPA en respuesta al tratamiento de 7.5 mM.

Sin importar el tratamiento de nitrato utilizado, la cantidad de fenilalanina hallada fue baja, lo que puede deberse a que este aminoácido es ampliamente requerido en la síntesis de proteínas y diversos compuestos como fenilpropanoides, lignanos, lignina, flavonoides y taninos, los cuales están implicados en diversas funciones como la defensa de plantas frente a patógenos, pigmentación, síntesis de pared celular, señales de atracción, etc.

Es importante hacer notar que la tendencia de acumulación de los capsaicinoides es muy parecida a la de acumulación de fenilalanina, en donde comparando estas dos figuras (Figura 3.2 y 3.4), se observa una correlación en los niveles de estos dos metabolitos a los 10 y 25 DPA, para luego perderse a los 45 DPA.

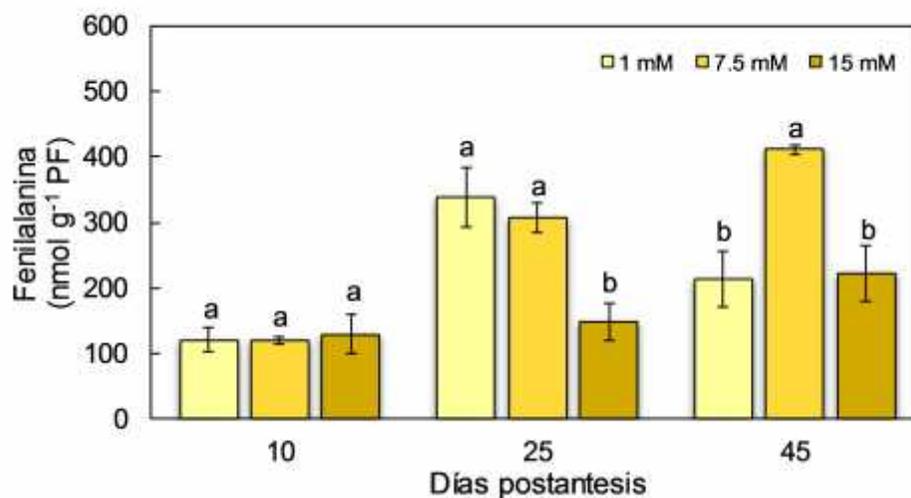


Figura 3.4 Efecto del NO_3^- sobre la acumulación de fenilalanina en placentas de chile habanero durante el desarrollo del fruto. Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

3.3.4 ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA qPCR

Con el fin de determinar la temperatura ideal de alineamiento para cada uno de los genes propuestos en este estudio, se realizaron reacciones de PCR de punto final utilizando un gradiente de temperatura. Una vez obtenido estos datos, dichas temperaturas fueron utilizadas en la reacción de PCR en tiempo real.

En las siguientes figuras (Figuras 3.5 a 3.9), se presentan los resultados obtenidos al emplear los cebadores descritos en la sección 3.2.2.7. y realizar las correspondientes reacciones de PCR de punto final.

Para la acetolactato sintasa (*ALS*), involucrada en la síntesis de valina, se eligió 55 °C como la temperatura óptima de alineamiento, como lo muestra la figura 3.5

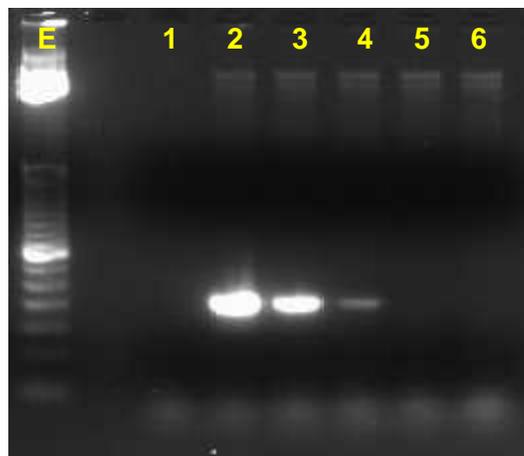


Figura 3.5 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de ALS por PCR de punto final. Carril 1: Testigo negativo, carril 2: amplicón generado a 55 °C, carril 3: amplicón generado a 58.1 °C, carril 4: amplicón generado a 60.6 °C, carril 5: amplicón generado a 63 °C, carril 6: amplicón generado a 65 °C, carril E: escalera de DNA de 50 pb.

En los casos de la arogenato deshidratasa (*ADT*) y la corismato mutasa (*CM*), ambas enzimas relacionadas con puntos de control en la síntesis de fenilalanina, se determinaron como las temperaturas ideales de alineamiento 53 °C y 55 °C, respectivamente (Figuras 3.6 y 3.7).

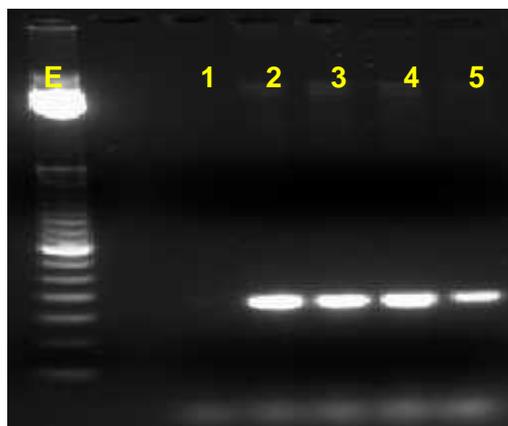


Figura 3.6 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de ADT por PCR de punto final. Carril 1: Testigo negativo, carril 2: amplicón generado a 53 °C, carril 3: amplicón generado a 54.8 °C, carril 4: amplicón generado a 57.4 °C, carril 5: amplicón generado a 59.9 °C, carril E: escalera de DNA de 50 pb.

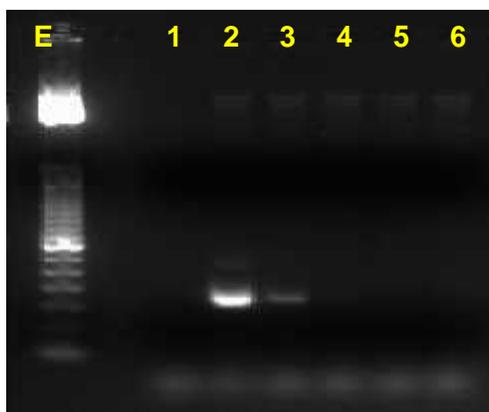


Figura 3.7 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de CM por PCR de punto final. Carril 1: Testigo negativo, carril 2: amplicón generado a 55 °C, carril 3: amplicón generado a 58.1 °C, carril 4: amplicón generado a 60.6 °C, carril 5: amplicón generado a 63 °C, carril 6: amplicón generado a 65 °C, carril E: escalera de DNA de 50 pb.

Para el gen de la *acil transferasa 3 (AT3)*, la temperatura óptima fue 54 °C como se muestra en la figura 3.8.

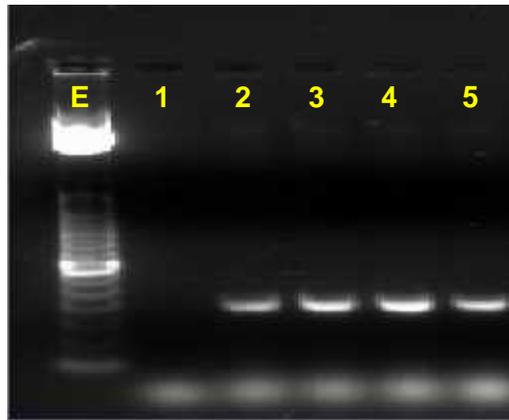


Figura 3.8 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de AT3 por PCR de punto final. Carril 1: Testigo negativo, carril 2: amplicón generado a 53 °C, carril 3: amplicón generado a 54.8 °C, carril 4: amplicón generado a 57.4 °C, carril 5: amplicón generado a 59.9 °C, carril E: escalera de DNA de 50 pb.

Por último, para actina, gen utilizado como normalizador en las reacciones de qPCR, la temperatura óptima fue 52 °C, como lo muestra la figura 3.9.

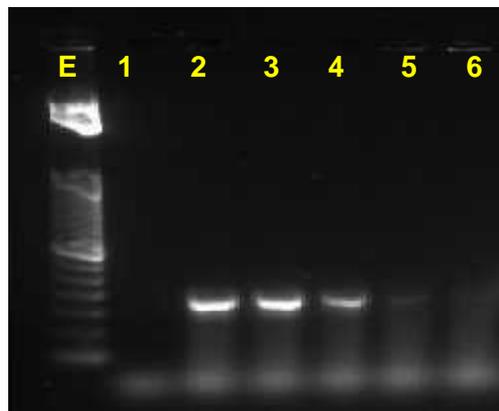


Figura 3.9 Determinación de la temperatura óptima para la amplificación de ACTINA por PCR de punto final. Carril 1: Testigo negativo, carril 2: amplicón generado a 51 °C, carril 3: amplicón generado a 51.5 °C, carril 4: amplicón generado a 53.6 °C, carril 5: amplicón generado a 55.1 °C, carril 6: amplicón generado a 56.5 °C, carril E: escalera de DNA de 50 pb.

3.3.5 RESULTADOS DE LA EXPRESION DE LOS GENES CM, ADT, ALS y AT3 EVALUADOS MEDIANTE qPCR

El tratamiento de 7.5 mM de KNO₃ ocasionó un aumento en la expresión de los cuatro genes evaluados. El desarrollo del fruto siguió muy de cerca los cambios en la expresión de *CM*, *ALS* y *AT3*. El gen de *ADT* mostró incremento sólo en el último estadio de desarrollo (Figura 3.10).

El gen *AT3* mostró la expresión más elevada en los frutos maduros (45 DPA), lo cual concuerda con la cinética de síntesis y acumulación de capsaicinoides reportada por Stewart *et al.* (2005), la cual comienza alrededor de los 20 DPA y llega a su máxima expresión entre los 40-50 DPA.

Stewart *et al.* (2005) demostraron mediante Northern blot que la expresión de *AT3* se localizaba específicamente en el tejido placentario de chile habanero; sin embargo, la máxima acumulación de capsaicinoides se dio alrededor de los 20 DPA. Dos años después, este mismo grupo de investigación (Stewart *et al.*, 2007) detectó expresión de la *AT3* localizada específicamente en los septos interloculares desde los 20 DPA. La expresión de este gen persistió durante casi todo el desarrollo del fruto, dejando de ser detectable a los 50 DPA. El patrón de su expresión siguió de cerca al del desarrollo del fruto.

Los tratamientos de 1 y 15 mM generaron una expresión disminuida con respecto a los chiles más jóvenes (10 DPA) en los cuatro genes evaluados, lo que indicaría que la cantidad de transcritos es mayor en los chiles más jóvenes, y a medida que el fruto se desarrolla disminuyen los niveles de ARNm de los genes estudiados. Estos resultados coinciden con los presentados por Aluru *et al.* (2003), quienes evaluaron los genes que codifican las enzimas de la ruta biosintética de los ácidos grasos utilizada en la síntesis de capsaicinoides, encontrando que su mayor acumulación se daba en la placenta verde e inmadura, y a medida que el fruto maduraba, la acumulación de transcritos disminuía.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se puede describir un comportamiento con un patrón reproducible, en lo que respecta a la expresión de los genes estudiados bajo las condiciones experimentales propuestas.

El tratamiento de 1 mM no generó inducción de ninguno de los genes evaluados, mientras que, por el contrario, los tratamientos de 7.5 y 15 mM generaron un aumento en la expresión de los cuatro genes en los estadios de 25 y 45 DPA. Sin embargo, los datos de expresión génica no se correlacionan con los de acumulación de metabolitos.

CM	[1 mM]	[7.5 mM]	[15 mM]	ADT	[1 mM]	[7.5 mM]	[15 mM]
10 DPA	1	1	1	10 DPA	1	1	1
25 DPA	0.35 ± 0.07	1.15 ± 0.21	0.7 ± 0.28	25 DPA	0.85 ± 0.21	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.28
45 DPA	0.25 ± 0.21	5.45 ± 0.35	1.4 ± 1.13	45 DPA	0.1 ± 0.0	1.6 ± 0.28	2.15 ± 2.6
ALS	[1 mM]	[7.5 mM]	[15 mM]	AT3	[1 mM]	[7.5 mM]	[15 mM]
10 DPA	1	1	1	10 DPA	1	1	1
25 DPA	0.5 ± 0.0	1.3 ± 0.28	0.7 ± 0.0	25 DPA	0.25 ± 0.21	4.35 ± 1.20	0.4 ± 0.14
45 DPA	0.1 ± 0.13	2.35 ± 0.21	1.25 ± 0.77	45 DPA	0.05 ± 0.06	19.25 ± 0.35	0.15 ± 0.7

Figura 3.10 Expresión de *CM*, *ADT*, *ALS* y *AT3* en placentas de chile habanero de tres etapas de madurez, crecidos bajo concentraciones diferentes de nitrato. Los resultados se presentan como expresión relativa (unidades arbitrarias) a la muestra de referencia (10 DPA) ± DE. El color rojo indica disminución en la expresión, mientras que el verde, aumento.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

La hidroponía se caracteriza por no necesitar de tierra para el cultivo de plantas; sin embargo, son imprescindibles el suministro de minerales y nutrientes normalmente presentes en la tierra de cultivo. Entre sus principales ventajas están las de eliminar aquellas enfermedades acarreadas por la tierra, controlar de forma precisa los requerimientos nutricionales de las plantas, y utilizar menos fertilizante del que generalmente es usado en la producción en el campo. Tanto la hidroponía, como la agricultura de ambiente controlado, se perfilan como una alternativa real para enfrentar las dificultades asociadas con la producción de cultivos difíciles en un entorno de erosión del suelo, pérdida de fertilidad, uso indiscriminado de herbicidas y constante falta de agua (Sheikh, 2006).

La construcción de cajas hidropónicas, a partir de materiales accesibles y de bajo coste, permitió el cultivo de plantas de chile habanero desde plántulas, hasta el mantenimiento de plantas totalmente desarrolladas. Así mismo, se estableció el uso de KNO_3 al 1 mM como concentración apropiada para la mayor producción de capsaicinoides y el mantenimiento satisfactorio de plantas adultas de chile habanero durante periodos que pueden ir de los 90 a los 120 días.

Este trabajo se realizó con la intención de entender y dilucidar el efecto del nitrógeno sobre la regulación genética involucrada en la síntesis de capsaicinoides. Es importante considerar que los experimentos se llevaron a cabo utilizando plantas provenientes de semillas seleccionadas, pero no de clonas; por lo tanto, se debe tomar en cuenta la variabilidad biológica propia de esta condición, a lo que también se le suman variaciones ambientales en las que cada conjunto de experimentos fue desarrollado.

La síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en las plantas son inducidos en respuesta a patógenos o al estrés abiótico; en otros casos, la regulación se da por el propio desarrollo de las plantas. Dicha regulación requiere de la expresión coordinada de múltiples enzimas. La transcripción de los genes de estas enzimas es la fuente probable

de al menos un nivel de regulación (Vom Endt *et al.*, 2002).

Muchos experimentos han demostrado que un aumento en la producción de metabolitos secundarios aromáticos en tejidos heridos, infectados o irradiados con luz UV se correlaciona con un aumento en la actividad de las enzimas, tanto en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, como en la vía de síntesis de metabolitos secundarios. Este incremento refleja la inducción de los genes que codifican estas enzimas, sugiriendo que la síntesis de los aminoácidos aromáticos y la producción de metabolitos secundarios se regulan coordinadamente a nivel génico para cubrir las necesidades particulares de cada planta (Mobley *et al.*, 1999).

En este estudio, no se encontró correlación entre el nivel de expresión génica y la acumulación de metabolitos, por lo que se sospecha que los eventos de regulación de síntesis de los capsaicinoides se encuentren a nivel de la actividad enzimática. Un ejemplo de regulación a nivel enzimático es el caso de la corismato mutasa, en donde, existen dos isoenzimas en la mayoría de las especies vegetales: CM-1 constituye la fracción mayoritaria en suspensiones celulares, y es muy sensible al control alostérico mediado por aminoácidos aromáticos, mientras que CM-2 es la fracción mayoritaria encontrada en hojas, y no es inhibida por aminoácidos aromáticos. Las propiedades regulatorias de cada una son consistentes con sus diferentes papeles: CM-1 controla la biosíntesis de fenilalanina y tirosina, y CM-2 controla la formación de metabolitos secundarios derivados de fenilpropanoides (Dewick, 1998). En este trabajo, sólo se evaluó la expresión de CM-1 obtenida de *Capsicum annuum*. Por las razones arriba mencionadas, hubiera sido conveniente evaluar también CM-2.

En lo que respecta a la enzima capsaicinoide sintasa (CS), el gen que codifica ésta no ha sido identificado en su totalidad, es decir, hasta el momento no se ha caracterizado funcionalmente. Para estudiar la regulación de la síntesis de los capsaicinoides, se requiere de la completa identificación de este gen. Trabajos como los de Kim *et al.* (2001) y Stewart *et al.* (2005) han recabado evidencia mediante mapeo génico, datos de secuenciación alélica, perfiles de expresión y análisis de silenciamiento que indican que, el locus *Pun1* en Chile codifica una acil transferasa putativa denominada AT3. Basados en estas evidencias, se decidió evaluar la expresión del gen *AT3*.

Aun cuando los genes involucrados en la síntesis de los precursores de fenilalanina y valina parecen no tener variaciones importantes en su expresión bajo los tratamientos empleados, el gen *AT3* presentó los valores más altos de expresión. Sería interesante indagar más profundamente sobre la regulación de este gen y el comportamiento de la capsaicinoide sintasa al medirla en condiciones diferentes de nutrición nitrogenada.

Se observó un incremento en la acumulación de capsaicinoides en el tratamiento con 1 mM NO_3^- que concuerda con experimentos realizados en un sistema *in vitro* de placentas, donde una cantidad limitante de nitrógeno total dio lugar a la acumulación de estos metabolitos en el tejido (Ancona-Escalante, 2013).

Es de notar el hecho de que, la cantidad de nitrato en las placentas de frutos provenientes de los diferentes tratamientos parece no guardar una relación directa con la disponibilidad de este ion en la solución nutritiva.

Debido a que la principal pregunta que se le hizo al sistema experimental fue cómo se afectaba la expresión de los genes involucrados en la síntesis de capsaicinoides en el tejido placentario cuando se varía el nitrógeno en el que se cultivan las plantas de chile, es muy probable que los cambios más importantes se lleven a cabo en los genes que codifican enzimas involucradas en la asimilación de este elemento, o en su defecto, genes que codifican para sus proteínas transportadoras.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se construyó con éxito un sistema para cultivar plantas de chile habanero en condiciones hidropónicas que permiten la aplicación de diferentes regímenes nutrimentales por períodos de tiempo prolongados.

Este sistema hizo posible evaluar el efecto del nitrógeno sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de los capsaicinoides.

Se concluyó que el tratamiento de 1 mM de nitrato no indujo la expresión de ninguno de los genes evaluados, mientras que los tratamientos de 7.5 y 15 mM de nitrato indujeron la expresión de todos los genes evaluados.

El gen *AT3* presentó la mayor expresión génica en las placentas de chile de 45 DPA, cultivadas con 7.5 mM de nitrato de potasio.

Los tratamientos con las diferentes concentraciones de nitrato utilizados son capaces de inducir diferencias en la expresión de *CM*, *ADT*, *ALS* y *AT3*.

Dicha expresión no se correlaciona con la acumulación de los metabolitos productos de estas mismas vías de síntesis.

No se ha podido encontrar una explicación para poder entender la razón de que se encuentren niveles menores a la unidad en las plantas bajo los tratamientos de 1 y 15 mM de nitrato. Aunque los datos de expresión génica no guardaron una relación lineal con los niveles de acumulación de los metabolitos correspondientes, se corroboró que hay un patrón distintivo entre los niveles de nitrato y capsaicinoides, en donde estos metabolitos se acumulan a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo del fruto.

Queda claro que el nitrógeno juega un papel crucial en los procesos biológicos de las plantas, teniendo una compleja regulación a varios niveles.

Para proseguir con este trabajo, se propone medir la expresión de genes involucrados en

el metabolismo primario del nitrógeno, así como la actividad enzimática producto de dichos genes, bajo las mismas condiciones experimentales, y así obtener información sobre los eventos que suceden en la planta, que resultan en la acumulación de algún metabolito en particular, pasando por puntos de regulación genética y enzimática, que, actuando de forma sincronizada, estén encargados de controlar la síntesis de aminoácidos, proteínas y moléculas precursoras que determinarán la capacidad de adaptación de los organismos vivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluru, M.R., M. Mazourek, L.G. Landry, J. Curry, M. Jahn y M.A. O'Connell (2003). Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1655-1664.
- Ancona-Escalante, W.D.R. (2013). Estudios sobre la regulación de las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno en placentas de chile habanero. Tesis de Doctorado. Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, Universidad Autónoma de Yucatán. 109 p.
- Ancona-Escalante, W.D.R., F.M. Baas-Espinola, L.A. Castro-Concha, F.A. Vázquez-Flota, M. Zamudio-Maya y M.L. Miranda-Ham (2013). Induction of capsaicinoid accumulation in placental tissues of *Capsicum chinense* Jacq. requires primary ammonia assimilation. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture*, 113, 565–570.
- Arnon, D.I., W.E. Fratzke y C. M. Johnson (1942). Hydrogen ion concentration in relation to absorption of inorganic nutrients by higher plants. *Plant Physiology*, 17, 515-524.
- Arsova, B., S. Kierszniowska y W.X. Schulze (2012). The use of heavy nitrogen in quantitative proteomics experiments in plants. *Trends in Plant Science*, 17, 102-112.
- Aza-González, C., H.G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo (2010). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports*, 30, 695-706.
- Baas-Espinola, F.M. (2015). Estudio de la relación entre la síntesis de valina y fenilalanina y la síntesis de capsaicínoides en tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 120 p.
- Baas-Espinola, F.M., L.A. Castro-Concha, F.A. Vázquez-Flota y M.L. Miranda-Ham

-
- (2016). Capsaicin synthesis requires *in situ* phenylalanine and valine formation in *in vitro* maintained placentas from *Capsicum chinense*. *Molecules*, 21, 799.
- Bednarek, P. (2012). Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 407-414.
- Blaya, S.N. y G.N. García (2003). El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal, en: Química Agrícola, Navarro, G. (ed). Mundi-Prensa Libros. Barcelona. pp. 135-143.
- Bloom, A.J. (2015). The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 10-16.
- Bugarín-Montoya, R., A. Glavis-Spinola, P. Sánchez García y D. García Paredes (2002). Acumulación diaria de materia seca y de potasio en la biomasa aérea total del tomate. *Terra*, 20, 401-409.
- Cázares-Sánchez, E., P. Ramírez-Vallejo, F. Castillo-González, M. Soto-Hernández, M.T. Rodríguez-González y J.L. Chávez-Servia (2005). Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*Capsicum annum* L.) of east-central Yucatán. *Agrociencia*, 39, 627-638.
- Chen Y.Q., F. Yi, M. Cai y J.X. Luo (2003). Effects of amino acids, nitrate and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*. *Plant Growth Regulation*, 41, 265-268.
- Chen, B.M., Z.H. Wang, S.X. Li, G.X. Wang, H. X. Song y X.N. Wang (2004). Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*, 167, 635-643.
- Choi, S.H., B.S. Suh, E. Kozukue, N. Kozukue, C.E. Levin y M. Friedman (2006). Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 9024-

9031.

- Cocking, E.C. y E. Yemm (1954). Estimation of amino acids by ninhydrin. *Biochemistry Journal*, 58, XII.
- Collins, D.M., L.M. Wasmund y P.W. Bosland (1995). Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high performance liquid chromatography. *Hortscience*, 30, 137-139.
- Contreras-Padilla, M. y E.M. Yahia (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2075-2079.
- Cornish, P.S. (1992). Use of high electrical conductivity of nutrient solution to improve the quality of salad tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) grown in hydroponic culture. *Animal Production Science*, 32, 513-520.
- Courty, P.E., P. Smith, S. Koegel, D. Redecker y D. Wipf (2015). Inorganic nitrogen uptake and transport in beneficial plant root-microbe interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 4-16.
- Crawford, N.M. y A.D. Glass (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3, 389-395.
- Croteau, R., T.M. Kutchan y N.G. Lewis (2000). Natural products (secondary metabolites), en: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B., W. Gruissem y R. Jones (eds). American Society of Plant Physiologists. Berkeley. pp. 1250-1319.
- Curry, J.M., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Melendrez y M.A. O'Connell (1999). Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp.* *Plant Science*, 148, 47-57.
- Daniel-Vedele, F., S. Filleur y M. Caboche (1998). Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 235-239.

-
- Dengchao, L., Z. Zhujun y X. Zhihao (2002). Effects of selenium on antioxidative system and H₂O₂ content in spinach. *Acta Horticulturae Sinica*, 29, 547-550.
- Dewick, P.M. (1998). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 15, 17-58.
- Dudareva, N. (2015). Aromatic amino acid network: Biosynthesis, regulation and transport. *FASEB Journal*, 29, 103.2.
- Estrada, B., F. Pomar, J. Díaz, F. Merino y M.A. Bernal (1999). Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae*, 81, 385-396.
- Ferrari, T.E., O.C. Yoder y P. Filner (1973). Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. *Plant Physiology*, 51, 423-431.
- Forde, B.G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465, 219-235.
- Ganget, P. y J. Memelink (2002). Transcription factor: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 563-569.
- Gillaspy, G., H. Ben-David y W. Gruissem (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell*, 5, 1439.
- González, T., L. Gutiérrez y F. Contreras (2006). El chile habanero de Yucatán. *Ciencia y Desarrollo*, 32, 8-15.
- Grusak, M.A. y S. Pezeshgi (1994). Uniformly ¹⁵N-labeled soybean seeds produced for use in human and animal nutrition studies: Description of a recirculating hydroponic growth system and whole plant nutrient and environmental requirements. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64, 223-230.
- Herrmann, K.M. y L.M. Weaver (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 473-503.

-
- Hu, C.X., Deng B. y T.C Liu (1992). Effects of nitrogen fertilizer on nitrate accumulation by the Chinese cabbage (*Brassica chinense*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 3, 006.
- Iwai, K., T. Suzuki y H. Fujiwake (1979). Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogs, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth-stages after flowering. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43, 2493-2498.
- Johnson, C.D. y D.R. Decoteau (1996). Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeño pepper plant growth, pod yield and pungency. *HortScience*, 31, 1119-1121.
- Kim, J.S., M. Park, D.J. Lee y B.D. Kim (2009). Characterization of putative capsaicin synthase promoter activity. *Molecules and Cells*, 28, 331-339.
- Kim, M., Kim, S., Kim, S., & Kim, B. D. (2001). Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Molecules*, 11, 213-219.
- Kim, M., S. Kim, S. Kim y B.D. Kim (2001). Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Molecules and Cells*, 11, 213-219.
- Kozukue, N., J.S. Han, E. Kozukue, J.J. Lee, J.A. Kim, K.R. Lee, C.E. Levin y M. Friedman (2005). Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9172-9181.
- Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115-122.
- Kratky, B.A. (2003). A suspended pot, non-circulating hydroponic method. *Acta Horticulturae*, 648, 83-89.
- Krischbaum-Titze, P., E. Mueller-Seitz y M. Petz (2002). Pungency in paprika (*Capsicum*

- annuum*). 1. Decrease in capsaicinoids content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1260-1263.
- Krouk, G., B. Lacombe, A. Bielach, F. Perrine-Walker, K. Malinska, E. Mounier, K. Hoyerova, P. Tillard, S. Leon, K. Ljung, E. Zazimalova, E. Benkova, P. Nacry y A. Gojon (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell*, 18, 927-937.
- Lee, E.J. y K.Y. Paek (2012). Effect of nitrogen source on biomass and bioactive compound production in submerged cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai adventitious roots. *Biotechnology Progress*, 28, 508-514.
- Lee, J.M., S. Kim, J.Y. Lee, E.Y. Yoo, M.C. Cho, M.R. Cho, B.D. Kim y Y.Y. Bahk (2006). A differentially expressed proteomic analysis in placental tissues in relation to pungency during the pepper fruit development. *Proteomics*, 6, 5248-5259.
- Lewinson, E., C.L. Steele y R. Croteau (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12, 20-25.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻CT method. *Methods*, 25, 402-408.
- Mackowiak, C.L., J.L. Garland y J.C. Sager (1996). Recycling crop residues for use in recirculating hydroponic crop production. *Acta Horticulturae*, 440, 19-24.
- Masclaux-Daubresse, C., M. Reisdorf-Cren, K. Pageau, M. Lelandais, O. Grandjean, J. Kronenberg, M.H. Valadier, M. Feraud, T. Jougllet y A. Suzuki (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology*, 140, 444-456.
- Matsuda, F., R. Nakabayashi, Z. Yang, Y. Okazaki, J. I. Yonemaru, K. Ebana, M. Yano y K. Saito (2015). Metabolome-genome-wide association study dissects genetic architecture for generating natural variation in rice secondary metabolism. *Plant Journal*, 81, 13-23.

- Mobley, E.M., B.N. Kunkel y B. Keith (1999). Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 240, 115-123.
- Moco, S., E. Capanoglu, Y. Tikunov, R.J. Bino, D. Boyacioglu, R.D. Hall y R.C. De Vos (2007). Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 58, 4131-4146.
- Molina-Quijada, D.M. (2009). Contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivados en el noreste de México. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Monforte-González, M., A. Guzmán-Antonio, F. Uuh-Chim y F.A. Vázquez-Flota (2010). Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 764-768.
- Murakami, K., M. Ido y M. Masuda (2006). Fruit pungency of 'Shishito' pepper as affected by a dark interval in continuous fluorescent illumination with temperature alteration. *Journal of Social High Technological Agriculture*, 18, 284-289.
- Nicholas, J.C. y A. Nason (1957). Determination of nitrate and nitrite. *Methods in Enzymology*, 3, 981-984.
- Ochoa-Alejo, N. y R. Salgado-Garciglia (1992). Phenylalanine ammonia-lyase activity and capsaicin-precursor compounds in p-fluorophenylalanine-resistant and sensitive variants cells of chili peppers (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, 85, 173-179.
- Ogawa, K., K. Murota, H. Shimura, M. Furuya, Y. Togawa, T. Matsumura y C. Masuta (2015). Evidence of capsaicin synthase activity of the *Pun1*-encoded protein and its role as a determinant of capsaicinoid accumulation in pepper. *BMC Plant Biology*, 15, 93.
- Ohashi, M., K. Ishiyama, M. Kusano, A. Fukushima, S. Kojima, A. Hanada, K. Kanno, T.

- Hayakawa, Y. Seto, J. Kyojuka, S. Yamaguchi y T. Yamaya (2015). Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds causes severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings. *Plant Journal*, 81, 347-356.
- Peng, C., S. Uygun, S.H. Shiu y R.L. Last (2015). The impact of the branched-chain ketoacid dehydrogenase complex on amino acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169, 1807-1820.
- Puri, V. (1952). Placentation in angiosperms. *Botanical Review*, 18, 603-651.
- Rao, S.R. y G.A. Ravishankar (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Rozen, S. y H.J. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, en: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz, S. y S. Misener (eds.). Humana Press, Totowa. pp. 365-386. Disponible en: <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.
- Rubio-Piña, J.A. y F.A. Vázquez-Flota (2008). Isolation of functional total RNA from *Argemone mexicana* tissues. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, 1-5.
- Ruxton, G. y M.W. Kennedy (2006). Peppers and poisons: the evolutionary ecology of bad taste. *Journal of Animal Ecology*, 75, 1224-1226.
- Rymbai, H., R.R. Sharma y M. Srivastava (2011). Bio-colorants and its implications in health and food industry - A review. *International Journal of PharmTech Research*, 3, 2228-2244.
- Sato, F., T. Hashimoto, A. Hachiya, K.I. Tamura, K.B. Choi, T. Morishige, H. Fujimoto y Y. Yamada (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 367-372.
- Seigler, D.S. (1998). *Plant Secondary Metabolism*. Chapman and Hall. Boston. pp. 711.
- Sheikh, B.A. (2006). *Hydroponics: Key to sustain agriculture in water stressed and urban*

- environment. Pakistan Journal of Agriculture, Agricultural Engineering and Veterinary Science, 22, 53-57.
- Singh, B.K. y D.L. Shaner (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. Plant Cell, 7, 935-944.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki y K. Saito (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. Phytochemistry Reviews, 7, 467-477.
- Stewart, C., B.C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S.L. Moore, E.Y. Yoo, B.D. Kim, I. Paran y M.M. Jahn (2005). The *pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. Plant Journal, 42, 675-688.
- Stewart, C., M. Mazourek, G.M. Stellari, M. O'Connell y M. Jahn (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. Journal of Experimental Botany, 58, 979-991.
- Stitt, M., C. Müller, P. Matt, Y. Gibon, P. Carillo, R. Morcuende y A. Krapp (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. Journal of Experimental Botany, 53, 959-970.
- Tiwari, A., A. Vivian-Smith, K. Ljung, R. Offringa y E. Heuvelink (2013). Physiological and morphological changes during early and later stages of fruit growth in *Capsicum annuum*. Physiologia Plantarum, 147, 396-406.
- Vázquez-Flota, F., M.L. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García y Y. Nieto-Pelayo (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. Revista Fitotecnia Mexicana, 30, 353-360.
- Ververidis, F., E. Trantas, C. Douglas, G. Vollmer, G. Kretschmar y N. Panopoulos (2007). Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. Biotechnology Journal, 2, 1214-1234.

- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20.
- Vom Endt, D., J.W. Kijne y J. Memelink (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 61, 107-114.
- Wang, J., Z. Peng, S. Zhou, J. Zhang, S. Shang, X. Zhou, X. Zhang y B. Peng (2011). A study of pungency of capsaicinoid as affected by their molecular structure alteration. *Pharmacology and Pharmacy*, 2, 109-115.
- Xiao, Y., S. Gao, P. Di, J. Chen, W. Chen y L. Zhang (2009). Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Physiologia Plantarum*, 137, 1-9.
- Zamsky, E., O. Shoham, D. Palevitch y A. Levy (1987). Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Botanical Gazette*, 148, 1-6.
- Zewdie, Y. y P.W. Bosland (2000). Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 111, 185-190.
- Zulak, K.G., A. Cornish, T.E. Daskalchuk, M.K. Deyholos, D.B. Goodenowe, P.M.K. Gordon, D. Klassen, L.E. Pelcher, C.W. Sensen y P.J. Facchini (2007). Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*, 225, 1085-1106.