



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio de la relación entre la síntesis de valina y
fenilalanina y la síntesis de capsaicinoides en
tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq.**

Tesis que presenta

FRAY MARTIN BAAS ESPINOLA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2015

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 titulado “**Estudio de la relación entre la síntesis de valina y fenilalanina y la síntesis de capsaicinoides en tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq.** fue realizado en los laboratorios de 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 y el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, 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

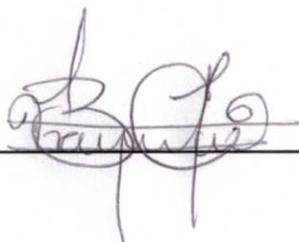
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Noviembre de 2015.

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: _____



M.C. FRAY MARTIN BAAS ESPINOLA

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 000000000168545) bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham y el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota. FMBE recibió el apoyo de una beca para estudios doctorales del CONACYT (326014).

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a:

La Dra. María de Lourdes Miranda Ham, por la confianza que depositó en mí al aceptarme como su estudiante de doctorado, y por todo lo que de ella aprendí.

Al Dr. Felipe Vázquez Flota, por haber sido un fuerte punto de apoyo para llevar este proyecto a buen término; es decir, por haber aceptado ser mi asesor de tesis, y por sus valiosas y, en ocasiones, ríspidas críticas.

A la Dra. Elisa, por lo que sabe y, más importante aún, por el generoso acto de compartirlo, pero sobre todo por su calidad humana: por esa exquisita y reconfortante mezcla de calidez, tranquilidad y optimismo que invade a quien tiene la dicha de deleitarse en su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial (a los doctores Elisa Miriam Valenzuela Soto y Enrique Castaño de la Serna), porque, sin duda alguna, sus observaciones y consejos contribuyeron sustancialmente a la mejora de este trabajo.

A los miembros del jurado de mi examen predoctoral (a los doctores Ileana Echevarría Machado, Virginia Aurora Herrera Valencia, Enrique Castaño de la Serna, Elisa Miriam Valenzuela Soto y Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez), primero, por la cortesía de haber aceptado formar parte de mi jurado examinador y, segundo, por el valioso tiempo que le dedicaron a este proyecto.

A los revisores de esta tesis (a los doctores Virginia Aurora Herrera Valencia, Elisa Miriam Valenzuela Soto, Teresa del Rosario Ayora Talavera, María de Lourdes Miranda Ham, Gregorio del Carmen Godoy Hernández, Enrique Castaño de la Serna y Felipe Augusto Vázquez Flota), por la gentileza de haber destinado parte de su valioso tiempo a la revisión de un documento importante para mí, ya que representa la culminación de una etapa de mi formación profesional.

A la M. en C. Lizbeth Castro Concha, por sus consejos y ayuda profesional durante la realización de los experimentos, por su apoyo moral y por la agradable calidez de su amistad.

Al M. en C. Javier Francisco García Villalobos por su apoyo profesional en el uso del PCR en tiempo real y el HPLC.

Al QFB Raúl Manzanilla Rivas, por el bondadoso gesto de compartir sus conocimientos y su tiempo para el establecimiento y mantenimiento óptimo del cultivo de plantas de chile habanero en los invernaderos del CICY.

A mis compañeros de laboratorio (QFB Raúl Manzanilla, IBQ Sergio Pech y QFB David Góngora), por haber contribuido a crear un sano ambiente laboral, que es importante para amortiguar los tirones del estrés de la vida académica de un estudiante de posgrado.

A mis amigos de la Unidad de Bioquímica y del resto del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por haber estado siempre en la mejor disposición para ayudarme, para escucharme; por los consejos, por las críticas, por ofrecerme algún reactivo cuando este faltó y hasta por aquella sonrisa o saludo sincero, en los días en los que más falta hizo.

Y a todos aquellos a los que por alguna razón olvidé incluir en esta lista.

DEDICATORIA

Al lector despistado o avisado que, sin querer o queriéndolo, tiene entre sus manos esta tesis, en donde he plasmado, desde mi particular visión de este mundo, algunos humildes secretos que de la vida he arrancado.

"Porque lo que la alta ciencia se esmera en suprimir es lo que el arte elevado se afana en provocar: el misterio, letal para aquella y vital para este."

—John Fowles

| ÍNDICE | PÁGINA |
|---|---------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| BIBLIOGRAFÍA | 3 |
| | |
| CAPÍTULO I | 5 |
| | |
| ANTECEDENTES | 5 |
| 1.1 CAPSAICINOIDES..... | 5 |
| 1.1.1 BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINA..... | 7 |
| 1.2 TEJIDO PLACENTARIO..... | 9 |
| 1.3 VARIACIÓN EN LA CANTIDAD DE CAPSAICINOIDES ACUMULADOS: HERENCIA E INTERACCIÓN CON EL AMBIENTE..... | 9 |
| 1.4 REGULACIÓN GENÉTICA DEL METABOLISMO DE LOS CAPSAICINOIDES..... | 12 |
| 1.5 COORDINACIÓN ENTRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y EL SECUNDARIO..... | 14 |
| 1.6 BIOSÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS FENILALANINA, VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA..... | 16 |
| 1.6.1 BIOSÍNTESIS DE FENILALANINA..... | 16 |
| 1.6.2 BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA: VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA..... | 17 |
| HIPÓTESIS..... | 20 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 20 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 20 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 21 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 23 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 24 |
| | |
| CAPÍTULO II | 33 |
| | |
| ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO BAJO CONDICIONES DE INDUCCIÓN Y DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO | 33 |
| 2.1 ANTECEDENTES..... | 33 |
| 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1 MATERIALES..... | 35 |
| 2.2.2 MÉTODOS..... | 35 |
| 2.2.2.1 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS..... | 35 |
| 2.2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE NITRATOS..... | 36 |
| 2.2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS..... | 36 |
| 2.2.2.4 CUANTIFICACIÓN DE FENILALANINA Y VALINA | 37 |
| 2.2.2.5 CUANTIFICACIÓN DE VAINILLINA Y CAPSAICINOIDES..... | 37 |
| 2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 38 |
| 2.4 RESULTADOS..... | 38 |
| 2.4.1 CONTENIDO DE VAINILLINA Y CAPSAICINOIDES DEN TEJIDOS DE CHILE HABANERO..... | 38 |
| 2.4.2 CONTENIDO DE NITRATO Y AMONIO EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO..... | 40 |
| 2.4.3 CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS SOLUBLES TOTALES EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO..... | 44 |
| 2.4.3.1 CONTENIDO DE FENILALANINA Y VALINA EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO..... | 44 |
| 2.5 DISCUSIÓN | 48 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 53 |

CAPÍTULO III **57**

| | |
|---|-----------|
| LA INDUCCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LOS CAPSAICINOIDES <i>IN VITRO</i>, REVELA UNA EXPRESIÓN COORDINADA DEL GEN <i>AT3</i> CON LOS GENES RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE VALINA Y FENILALANINA EN PLACENTA..... | 57 |
| 3.1 ANTECEDENTES..... | 55 |
| 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 58 |
| 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO..... | 58 |
| 3.2.1.1 DESINFESTACIÓN DEL CHILE HABANERO..... | 58 |
| 3.2.2 MÉTODOS..... | 58 |
| 3.2.2.1 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON AS Y MeJa | 58 |
| 3.2.2.2 EVALUACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO | 59 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2.3 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN | 59 |
| 3.2.2.4 ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN..... | 60 |
| 3.2.2.5 DISEÑO DE LOS CEBADORES (“PRIMERS”)..... | 60 |
| 3.2.2.6 PCR- TRANSCRIPTASA REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL..... | 61 |
| 3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 61 |
| 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 62 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |

CAPÍTULO IV **71**

| | |
|--|-----------|
| LA SÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES REQUIERE DE LA FORMACIÓN <i>in situ</i> DE VALINA Y FENILALANINA EN EL SISTEMA <i>in vitro</i> DE PLACENTAS | 71 |
| 4.1 ANTECEDENTES..... | 71 |
| 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 72 |
| 4.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO | 72 |
| 4.2.1.1 DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO | 72 |
| 4.2.2 MÉTODOS..... | 73 |
| 4.2.2.1 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON p-FF Y CLN | 73 |
| 4.2.2.2 EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ALS | 73 |
| 4.2.2.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADT | 74 |
| 4.2.2.4 MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD POR EL MÉTODO DEL AZUL DE EVANS..... | 76 |
| 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 76 |
| 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 77 |
| 4.4.1 BIOSÍNTESIS DE VALINA Y FENILALANINA EN DIFERENTES TEJIDOS DE <i>C. chinense</i> Jacq. | 77 |
| 4.4.2 INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE VALINA O FENILALANINA EN PLACENTAS TRATADAS CON CLN O p-FF | 79 |
| 4.4.3 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ALS O LA ADT SOBRE LOS NIVELES DE NITRATO Y AMINOÁCIDOS SOLUBLES TOTALES..... | 81 |
| 4.4.4 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ALS O LA ADT SOBRE EL CONTENIDO DE VALINA Y FENILALANINA..... | 82 |
| 4.4.5 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE VALINA O FENILALANINA SOBRE EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES..... | 85 |

| | |
|--|------------|
| BIBLIOGRAFÍA..... | 92 |
| CAPÍTULO V | 97 |
| METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN PLACENTA DE <i>Capsicum</i>: SITUACIÓN ACTUAL | 97 |
| 5.1 DISCUSIÓN GENERAL | 97 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 103 |
| CAPÍTULO VI | 107 |
| CONCLUSIONES..... | 107 |
| CAPÍTULO VII | 109 |
| SISTEMA <i>in vitro</i> DE TEJIDO PLACENTARIO: UN MODELO PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS CAPSAICINOIDES..... | 109 |
| 6.1 PERSPECTIVAS..... | 109 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 112 |
| ANEXO 1..... | 117 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 <i>Capsicum chinense</i> Jacq. A) Planta de chile habanero, B) corte transversal del fruto y C) ampollas que contienen a los capsaicinoides en la superficie de la placenta | 6 |
| Figura 1.2 Esquema actual de la ruta biosintética de los capsaicinoides..... | 8 |
| Figura 1.3 Interacción con el ambiente: factor importante en el desarrollo de las plantas..... | 11 |
| Figura 1.4 Modelo de la inhibición de la expresión de los genes <i>AMT</i> , <i>PAL</i> y <i>CS</i> por efecto de la adición exógena de capsaicina (Kim <i>et al.</i> , 2009)..... | 13 |
| Figura 1.5 Ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos: Phe, Tyr (vía del arogenato) y Trp | 17 |
| Figura 1.6 Ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada: Val, Leu e Ile | 19 |
| Figura 1.7 Estrategia experimental..... | 23 |
| Figura 2.1 Contenido de capsaicinoides y vainillina en tejidos de chile habanero de 25 y 40 DPA. A y C, placenta; B y D, pericarpio..... | 39 |
| Figura 2.2 Contenido de capsaicinoides y vainillina en placentas de chile habanero de 25 DPA bajo inducción con AS (A y C) y MeJa (B y D)..... | 41 |
| Figura 2.3 Contenido de nitrato y amonio en tejidos de chile habanero de 25 y 40 DPA. A y C, placenta; B y D, pericarpio..... | 42 |
| Figura 2.4 Contenido de nitrato y amonio en placentas de chile habanero de 25 DPA bajo inducción con AS (A y C) y MeJa (B y D)..... | 43 |
| Figura 2.5 Contenido de aminoácidos solubles totales en tejidos de chile habanero (Placenta, A; pericarpio, B) de dos estadios de desarrollo (25 y 40 DPA) y en placentas de 25 DPA bajo inducción con AS (C) y MeJa (D)..... | 45 |
| Figura 2.6 Contenido de Phe y Val en tejidos de chile habanero de 25 y 40 DPA. A y C, placenta; B y D, pericarpio..... | 46 |
| Figura 2.7 Contenido de Phe y Val en placentas de chile habanero de 25 DPA bajo inducción con AS (A y C) y MeJa (B y D)..... | 47 |
| Figura 3.1 Oligonucleótidos usados para el análisis de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.2 Detección de la expresión de genes involucrados en la síntesis de fenilalanina (CM y ADT), valina (ALS) y capsaicinoides (AT3) por RT-PCR de punto final en placentas de chile habanero de 25 DPA..... | 63 |
| Figura 3.3 A) Representación esquemática del gen de la acil transferasa 3 (AT3) y el tamaño del amplicón esperado, de acuerdo con la fuente del molde (ADN genómico ó ADNc). B) Detección de la expresión del gen AT3 en placentas de chile habanero de 25 DPA..... | 64 |
| Figura 3.4 Efecto del AS (barras blancas) o MeJa (barras negras) sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis de Phe (A y B), Val (C) y capsaicinoides (D) en un sistema <i>in vitro</i> de placentas..... | 65 |
| Figura 4.1 Actividades específicas de la ADT (A) y la ALS (B) en tejidos de <i>C. chinense</i> Jacq..... | 78 |
| Figura 4.2 Inhibición de la actividad de la ALS con Cln en placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA. A) 0-90 nM de Cln, 12 h y B) 90-120 nM, 18 h..... | 79 |
| Figura 4.3 Inhibición de la actividad de la ADT con p-FFen placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA | 80 |
| Figura 4.4 Inhibición de las actividades de la ALS, la ADT y la GDH-NADH en extractos de placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA | 82 |
| Figura 4.5 Contenido de nitrato y aminoácidos solubles totales en placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA sometidas a inhibición de la síntesis de Val (A y C) y Phe (B y D) | 83 |
| Figura 4.6 Contenido de Val y Phe en placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA sometidas a inhibición de la síntesis de Val (A y B) y Phe (C y D)..... | 84 |
| Figura 4.7 Contenido de capsaicinoides y vainillina en placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA sometidas a inhibición de la síntesis de Val (A y C) y Phe (B y D) | 86 |
| Figura 4.8 Viabilidad de las placentas de <i>C. chinense</i> Jacq. de 25 DPA sometidas a tratamientos de inhibición enzimática con Cln (A) y p-FF (B) | 87 |
| Figura 4.9 Efecto del Cln o p-FF sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis de Phe (A y B), Val (C) y capsaicinoides (D) en un sistema <i>in vitro</i> de placentas..... | 88 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| A | Absorbancia |
| ABA | Ácido abscísico |
| ADH | Arogenato deshidrogenasa |
| ADT | Arogenato deshidratasa |
| ACL | Proteína acarreadora de grupos acilo |
| ALS (AHAS) | Acetolactato sintasa (acetohidroxiácido sintasa) |
| AMT | Aminotransferasa |
| AS | Ácido salicílico |
| 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 |
| Cln | Clorsulfurón |
| CM | Corismato mutasa |
| CoA | Coenzima A |
| COMT | Ácido caféico O-metiltransferasa |
| CS | Capsaicinoide sintasa |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| DHAP | 3- desoxi D-arabino-heptulosonato 7-fosfato |
| DPA | Días posteriores a la antesis |
| FAS | Ácido graso sintasa (complejo multienzimático) |
| FAD ⁺ | Flavín adenín dinucleótido oxidado |
| FAT | Tioesterasa |
| g | Gramo |
| 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 | α -Cetoacil sintetasa |
| Leu | Leucina |
| M | Molar |
| MeJa | Jasmonato de metilo |
| mL | Mililitro |
| NADH | Nicotín adenín dinucleótido reducido |
| nm | Nanómetro |
| OPA | <i>o</i> -ftalaldehído |
| PAL | Fenilalanina amonio liasa |
| PAT | Prefenato aminotransferasa |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PF | Peso fresco |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PYL | Receptor de ácido abscísico |
| PVPP | Polivinilpolipirrolidona |
| p/v | Peso/volumen |
| p-FF | p-fluorofenilalanina |
| Phe | Fenilalanina |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Retro transcripción-PCR |
| TA | Temperatura de alineamiento |
| TD | Treonina deshidratasa |
| Tm | Temperatura media de fusión |
| Trp | Triptofano |
| Tyr | Tirosina |
| U | Unidad |
| Val | Valina |
| v/v | Volumen/ volumen |
| 4CL | Cumaroil CoA ligasa |

RESUMEN

Los capsaicinoides (CAP) son metabolitos secundarios exclusivos del género *Capsicum* y responsables del picor de los chiles. Se sintetizan y acumulan en la placenta y los septas interloculares. Se desconoce el origen de los precursores, fenilalanina (Phe) y valina (Val), necesarios para su síntesis; se ignora si se sintetizan en la placenta, si se transportan hacia ella desde diferentes tejidos u órganos de la planta o si es una combinación de ambas posibilidades. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que la síntesis de CAP en el tejido placentario depende fundamentalmente del metabolismo primario del nitrógeno presente en él. Por lo tanto, en este trabajo se analizó la relación entre el metabolismo primario y el secundario en placentas de *Capsicum chinense* Jacq., y sus implicaciones sobre el metabolismo de los CAP.

El ácido salicílico (AS) induce una mayor acumulación de CAP, en comparación con el jasmonato de metilo (MeJa), en el sistema *in vitro* de placentas y su producción en este sistema requiere de la síntesis *in situ* de Val y Phe. El gen de la aciltransferasa 3 (*AT3*) se expresó de manera coordinada con los de la corismato mutasa (*CM*), la arogenato deshidratasa (*ADT*) y la acetolactato sintasa (*ALS*), durante la inducción de la acumulación de los CAP. El aumento en la expresión de estos genes fue mayor con el AS, el inductor que más activó la acumulación de estos alcaloides.

La inhibición de la síntesis de Val disminuyó en mayor medida la acumulación de CAP [50% vs 35%, cuando se inhibió a la arogenato deshidratasa (*ADT*)]. Por lo tanto, la síntesis de Val en la placenta parece ser más limitante que la de Phe para la producción de CAP bajo condiciones *in vitro*. La inhibición de la síntesis de Phe disminuyó el contenido de Phe, mientras que el de Val permaneció constante; sin embargo, la inhibición de la síntesis de Val, disminuyó no sólo el contenido de ésta, sino también el de Phe. Esto sugiere que la síntesis de Phe en la placenta está subordinada a la síntesis o disponibilidad de Val durante la producción de CAP.

Los resultados sugieren que la disponibilidad de los aminoácidos precursores sintetizados *in situ* limita y regula la acumulación de CAP en los frutos de *Capsicum chinense* Jacq.

ABSTRACT

Capsaicinoids are secondary metabolites exclusively synthesized by the *Capsicum* genus, and are responsible for the hot sensation of peppers. They are synthesized and accumulated in the placenta and the interocular septa. Until now, the origin of the amino acidic precursors, Phe and Val, is unknown, since it has not been reported if they are synthesized in the placenta or if they are transported there from other tissues and organs, a combination of the two is also possible. Nevertheless, there is evidence that suggests that placentas fundamentally depend on its own primary N metabolism. Hence, in here it was analyzed the possible relationship between primary and secondary metabolisms in placental tissue from *C. chinense* Jacq. and its repercussion on capsaicinoids metabolism.

Salicylic acid induced a higher capsaicinoids accumulation, compared to methyl jasmonate in an *in vitro* system, and this accumulation was supported by the *in situ* synthesis of Val and Phe. Expression of *AT3*, which codes for acyl transferase 3, was coordinated with those of chorismate mutase (*CM*), arogenate dehydratase (*ADT*) and acetolactate synthase (*ALS*) during the induction of capsaicinoids accumulation. Higher expression of these genes was observed when salicylic acid was used, which coincidentally activated a higher capsaicinoids accumulation.

Inhibition of Val synthesis majorly affected capsaicinoids accumulation (50% vs. 35%, when arogenate dehydratase was inhibited). It is suggested that Val synthesis is a major limiting factor in capsaicinoids accumulation in the *in vitro* system compared to Phe synthesis.

When Phe synthesis was inhibited, there was a decrease in Phe content, while that of Val remained constant; in contrast, when Val synthesis was inhibited, it not only diminished Val content, but also that of Phe. This suggests that Phe synthesis in placentas seems to be finely coordinated with the synthesis or availability of Val during capsaicinoids accumulation.

Our results point out to the fact that the synthesis and availability of amino acidic precursors, Val and Phe, limits and regulates capsaicinoids accumulation in pods from *C. chinense* Jacq.

INTRODUCCIÓN

El metabolismo secundario es importante porque de él se derivan moléculas de importancia comercial. En pocos años los metabolitos secundarios (MS) pasaron de ser considerados productos residuales de la detoxificación del metabolismo de las plantas, a moléculas con interesantes aplicaciones agrícolas, industriales y farmacológicas (Ganget y Memelink, 2002), como el compuesto antimitótico vinblastina, que se usa en el tratamiento de ciertas clases de cáncer como el de pulmón, mama, testículos, cuello y el linfoma de Hodgkin.

Con el advenimiento del cultivo *in vitro*, uno de los primeros objetivos perseguidos fue el de producir compuestos químicos de interés comercial, como una alternativa a la síntesis química o a la extracción de las plantas en las que se sintetizan; sin embargo, pese a que en un principio se sobredimensionó el potencial de estas herramientas, pronto se observó que los cultivos celulares se comportan de manera diferente a los tejidos organizados, y que estas tecnologías son insuficientes para satisfacer la demanda en aumento de compuestos bioactivos o con aplicaciones industriales (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006).

Aunque se ha avanzado mucho en la materia (tenemos, como ejemplo la aplicación de la ingeniería metabólica recombinante), si se considera la vasta diversidad de estructuras químicas provenientes del metabolismo secundario, son muy pocos los MS que se han podido producir comercialmente usando estas tecnologías (Effendi *et al.*, 2009; Ganget y Memelink 2002).

Se ha sugerido que esto es consecuencia de que los MS se producen en tejidos altamente especializados en las plantas y que la compleja regulación metabólica que se encuentra detrás de la síntesis, acumulación y degradación, aún se ignora en su mayor parte.

Un tópico importante y actual en la regulación del metabolismo secundario es la influencia del metabolismo primario, como consecuencia de la variación en la disponibilidad de los nutrimentos en el ambiente, y concomitantemente su efecto sobre la síntesis de los

precursores (Aharoni y Galili, 2011; Lackman *et al.*, 2011). Además, se desconoce la forma y a qué nivel las partes de los engranajes del metabolismo primario y secundario se coordinan en los diferentes tejidos de las plantas para culminar con la producción de los MS (Zulak *et al.*, 2007).

En un intento por contribuir al entendimiento de la regulación del metabolismo en un tejido especializado, este trabajo se ocupa precisamente del estudio del metabolismo primario del nitrógeno, elemento cuya disponibilidad afecta la síntesis de capsaicinoides (Ancona-Escalante *et al.*, 2013), a través del uso de un sistema *in vitro* de tejido placentario.

Los capsaicinoides se acumulan exclusivamente en las células epidérmicas de la placenta y los septas interoculares, y le dan el picor característico a los frutos de las plantas del género *Capsicum*. Estos compuestos provienen de la convergencia de dos rutas metabólicas: la de los fenilpropanoides, que inicia con la Phe, y la ruta de síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada, que se origina de la Val o la Leu. Dado que se desconoce el metabolismo de estos aminoácidos en la placenta (Mazourek *et al.*, 2009; Miranda-Ham *et al.*, 2007) y la evidencia sugiere que es preponderante para el metabolismo de los capsaicinoides (Ancona-Escalante *et al.*, 2013), en este trabajo se estudió la síntesis y acumulación de estos aminoácidos bajo condiciones que activan la acumulación de los capsaicinoides (activación natural o mediante el uso de inductores como el AS o el MeJa), así como durante la producción de estos MS cuando se inhibe la síntesis de ambos aminoácidos [empleando p-fluorofenilalanina (p-FF) ó clorsulfurón (Cln)] en un sistema *in vitro* de placentas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A. y G. Galili (2011). Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 239-244.
- 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.
- Effendi, L., W. Runguphan, S. O'Connor y K. Jones-Prather (2009). Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology*, 5, 292-300.
- Ganget, P. y J. Memelink (2002). Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 563-569.
- Lackman, P., M. González-Guzmán, S. Tilleman, I. Carqueijeiro, A. Cuellar-Pérez, T. Moses, M. Seo, Y. Kanno, S.T. Häkkinen, M.C.E. Van-Montagu, J.M. Thevelein, H. Maaheimo, K. Oksman-Caldentey, P.L. Rodriguez, H. Rischer y A. Goossens (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 5891-5896.
- Loyola-Vargas, V.M. y F.A. Vázquez-Flota (2006). Back to the future: An introduction to plant cell cultures, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V.M. y F.A. Vázquez-Flota (eds). Segunda edición. Humana Press, Totowa. pp. 3-8.
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller y M.M. Jahn (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150, 1806-1821.
- Miranda-Ham, M.L., L. Castro Concha, C. Roca Mézquita y F.M. Baas Espinola (2007). Inmovilización de placentas de chile habanero para el estudio de la síntesis de

capsaicina, a partir de sus precursores nitrogenados, en: II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero de Yucatán, Mérida.

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.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides son moléculas exclusivas de las plantas del género *Capsicum* (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991), responsables del picor de los chiles (Nelson, 1919; Figura 1.1). Esta propiedad se asocia a la herencia de un gen dominante único, localizado en el locus *C (pun 1)* del cromosoma 2 en *C. annuum* y *C. chinense* (Stewart *et al.*, 2005; Deshpande, 1935). Químicamente, pueden definirse como amidas ácidas derivadas de la condensación de la vainillilamina y una cadena acil graso, de longitud entre 9 y 11 carbonos (Curry *et al.*, 1999; Nelson, 1919). La vainillilamina, núcleo aromático de la molécula, proviene de la Phe (Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992; Bennett y Kirby, 1968), mientras que la parte alifática, o cadena acil graso, de los aminoácidos Val o Leu (Curry *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1981).

Las diferencias entre los diferentes capsaicinoides, y los diferentes niveles de picor, radican en la longitud de la ramificación, la posición de los dobles enlaces en la parte alifática de la molécula y la naturaleza de los sustituyentes en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático (Wang *et al.*, 2011). La capsaicina y la dihidrocapsaicina se encuentran en mayor proporción en los frutos picantes (Choi *et al.*, 2006; Kozukue *et al.*, 2005). Se sintetizan en las células epidérmicas del tejido placentario, y finalmente, se depositan en estructuras de almacenamiento, denominadas ampollas (Zamski *et al.*, 1987; Fujiwake *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1980; Iwai *et al.*, 1979; Ohta, 1962). En la mayoría de las especies de *Capsicum*, los capsaicinoides empiezan a acumularse aproximadamente a los 20 días posteriores a la antesis (Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Iwai *et al.*, 1979).

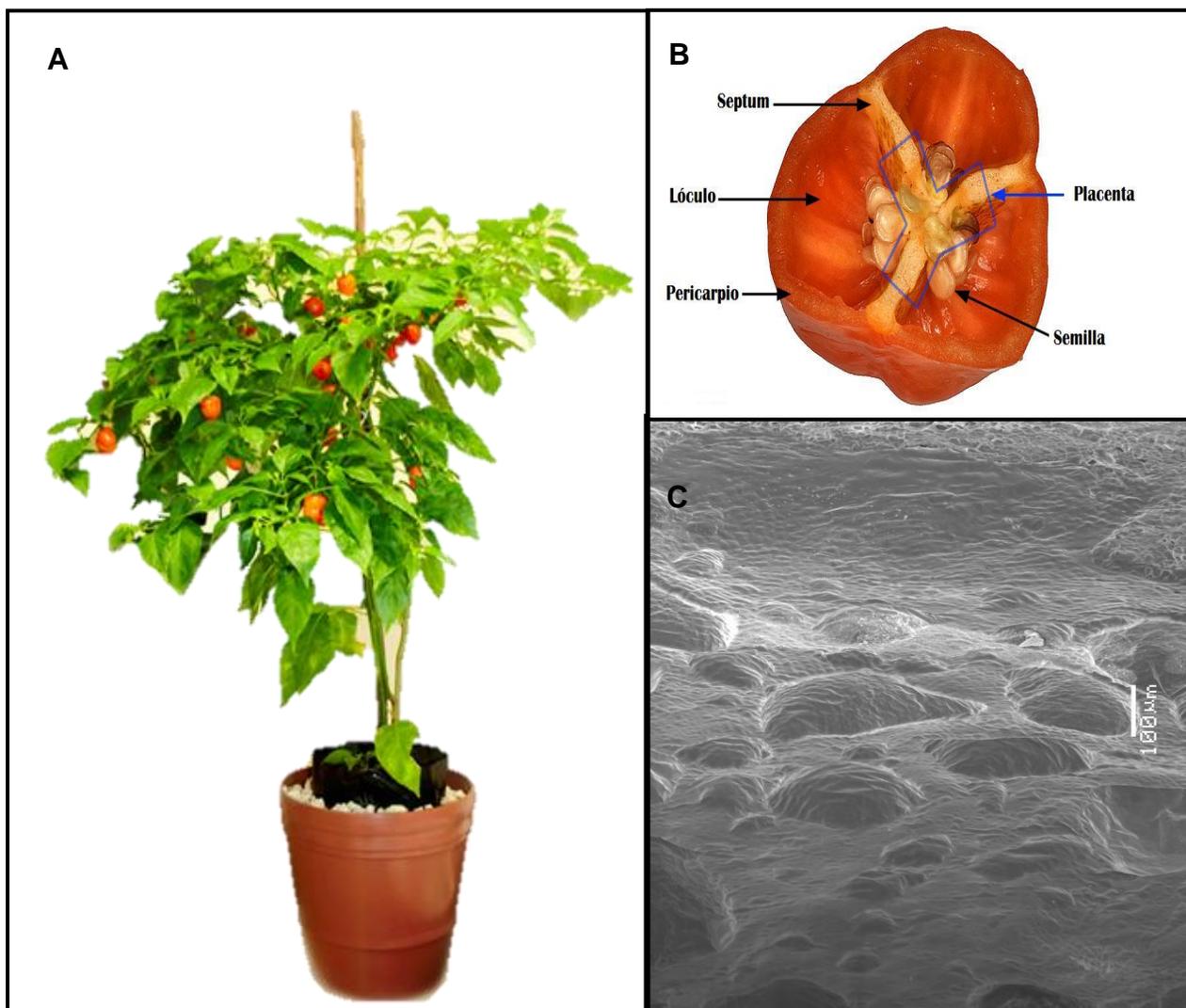


Figura 1.1 *Capsicum chinense* Jacq. A) Planta de chile habanero, B) corte transversal del fruto y C) ampollas que contienen a los capsaicinoides en la superficie de la placenta. Fotos: M.M.C.C. Miriam Monforte (A) y Lizbeth Castro (C).

1.1.1 BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINA

La Phe, que da lugar a la vainillilamina, se convierte de manera secuencial en cinamato, cumarato, cumaroil-CoA, cafeoil-CoA, feruloil-CoA, vainillina y, por último, en vainillilamina (Aza-González *et al.*, 2011; Bennett y Kirby, 1968). Las enzimas que se han propuesto para catalizar estas conversiones son, en el mismo orden: la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.24), la cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H, EC 1.14.13.11), la cumaroil-CoA ligasa (4CL), la hidroxicinamoil transferasa (HCT), la ácido caféico O-metiltransferasa (COMT, EC 2.1.1.6), la hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCHCL) y una aminotransferasa (AMT; EC 2.6.1.57) (Mazourek *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2005; Sukrasno y Yeoman, 1993; Fujikawe *et al.*, 1982a, b).

Por el otro lado, la cadena lateral acilo (ácido 8-metil-6-nonenoico) se forma a partir de Val; este aminoácido es inicialmente desaminado por la enzima transferasa de los aminoácidos ramificados (BCAT, EC 2.6.1.42), dando lugar al α -cetoisovalerato. Posteriormente, este último se convierte en isobutiril-CoA, por acción de la isovalerato deshidrogenasa (IVDH, EC 1.3.99.10); el isobutiril-CoA es procesado por el complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS, EC 2.3.1.85), que lo convierte en 8-metil-6-nonenoil-CoA. FAS está compuesto por tres proteínas: la α -cetoacil sintetasa (KAS, EC 2.3.1.41), que cataliza la condensación de grupos malonilo con isobutiril-CoA; una proteína acarreadora de grupos acilo (ACL, EC 2.3.1.39), que se encarga de transportar los grupos malonilo; y una tioesterasa (FAT, EC 3.1.2.1 y 3.1.2.2), que libera al ácido graso sintetizado.

En este proceso se pierde una molécula de CO₂ en cada ciclo de condensación de grupos malonilo y la cadena acil graso es liberada después del tercer ciclo de condensación. Inmediatamente, se sintetiza 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). Finalmente, de la convergencia de las dos rutas, se obtiene la capsaicina (Figura 1.2). El último paso es catalizado por una aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (CS; Stewart *et al.*, 2007).

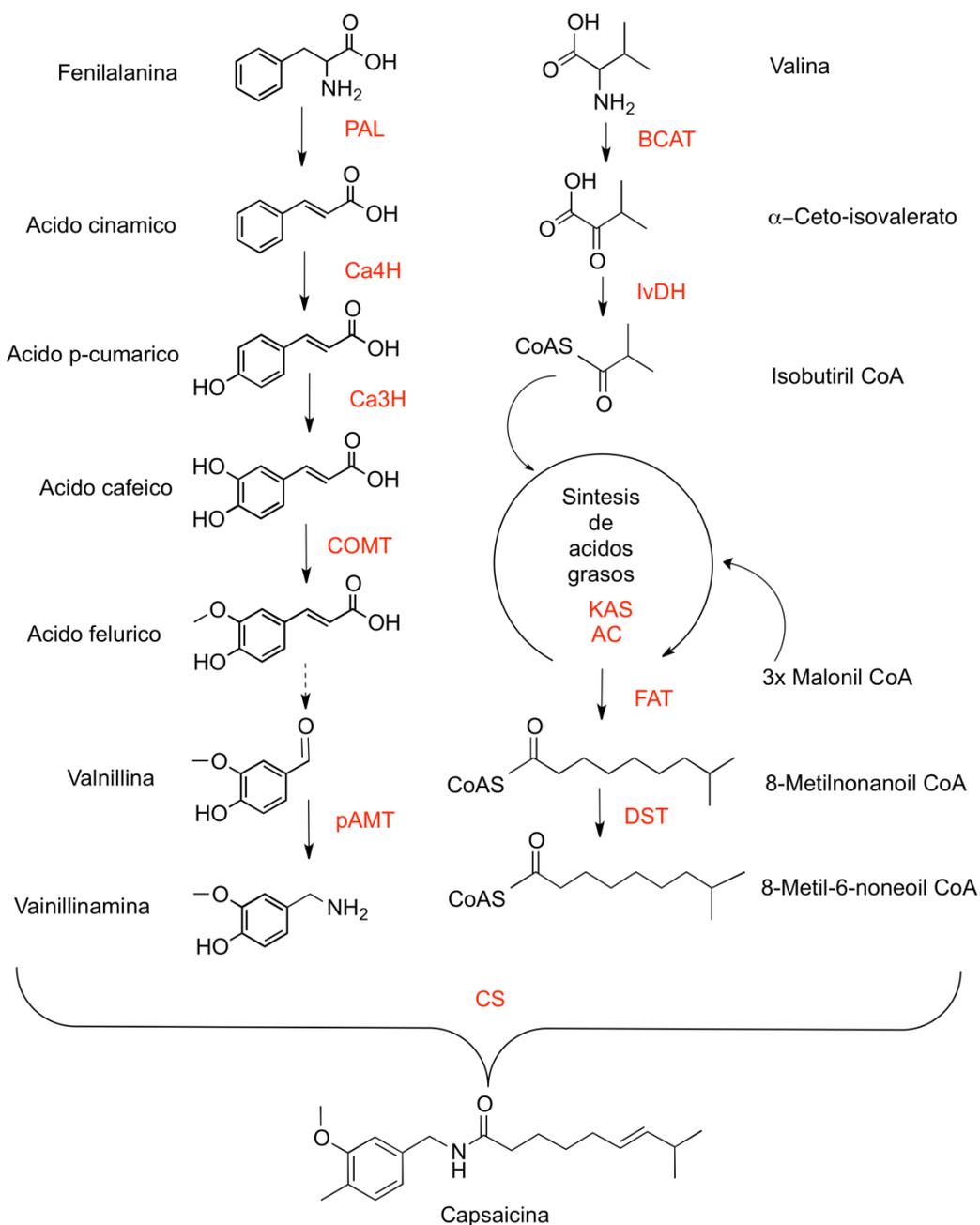


Figura 1.2 Esquema actual de la ruta biosintética de los capsaicinoides. PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-coumaroil-CoA ligasa; HCT, hidroxicinamoil transferasa; C3H, coumaroil shikimato/quinato 3-hidroxilasa; CCoAOMT, cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (COMT, ácido caféico O-metil transferasa); HCHL, hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa; AMT, aminotransferasa; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados; KAS, cetoacil-ACP sintasa; ACL, proteína acarreadora de los grupos acilo; FAT, acil-ACP tioesterasa; ACS, acil-CoA sintetasa; CS, capsaicinoide sintasa. COMT se encuentra entre paréntesis porque fue la enzima inicialmente propuesta para participar en la ruta de los fenilpropanoides (modificado a partir de Aza-González *et al.*, 2011).

1.2 TEJIDO PLACENTARIO

El término “placenta” ha sido tomado de la zoología, pero sus implicaciones exactas son diferentes en las plantas; mientras que en animales se refiere al lugar en la pared del oviducto a la que el feto o embrión está unido, en las plantas se refiere al lugar o estructura en la que los óvulos (o esporangios) están unidos (Puri, 1952). La placenta es un tejido vascular que se encuentra dentro del fruto que generalmente tiene forma de cresta o almohada; específicamente, es una región engrosada de la pared del carpelo. En él están localizados los óvulos, sobresaliendo como una derivación de éste. Más tarde, después de 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 disposición de la placenta, es decir, la forma en que se localicen los óvulos sobre ésta (placentación), puede variar. 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; pero por ejemplo, en el caso de *Sarracenia flava* la placentación es parietal (Gillaspay *et al.*, 1993; Puri, 1952).

1.3 VARIACIÓN EN LA CANTIDAD DE CAPSAICINOIDES ACUMULADOS: HERENCIA E INTERACCIÓN CON EL AMBIENTE

La herencia determina la presencia o ausencia y el umbral de picor entre las diferentes especies de chiles (Aza-González *et al.*, 2011). El chile habanero posee un grado de picor comprendido entre los 300 000 y 400 000 USP (Unidades Scoville de Picor), mientras que el jalapeño está entre los 3500 y 4500 USP (Cázares-Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, a la variación en la cantidad de capsaicinoides acumulados, se asocian factores como la especie, la variedad, el genotipo (Bosland y Baral, 2007; Estrada *et al.*, 1999; Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992) y las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolla la planta (Figura 1.3; Aza-González *et al.*, 2011;

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 (Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 1999); la disponibilidad de N, K 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. Muchos de los productos finales que provienen de la ruta de los fenilpropanoides, de donde se obtienen algunos de los intermediarios biosintéticos de los capsaicinoides, se acumulan en respuesta a condiciones ambientales adversas (Xiao *et al.*, 2009; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

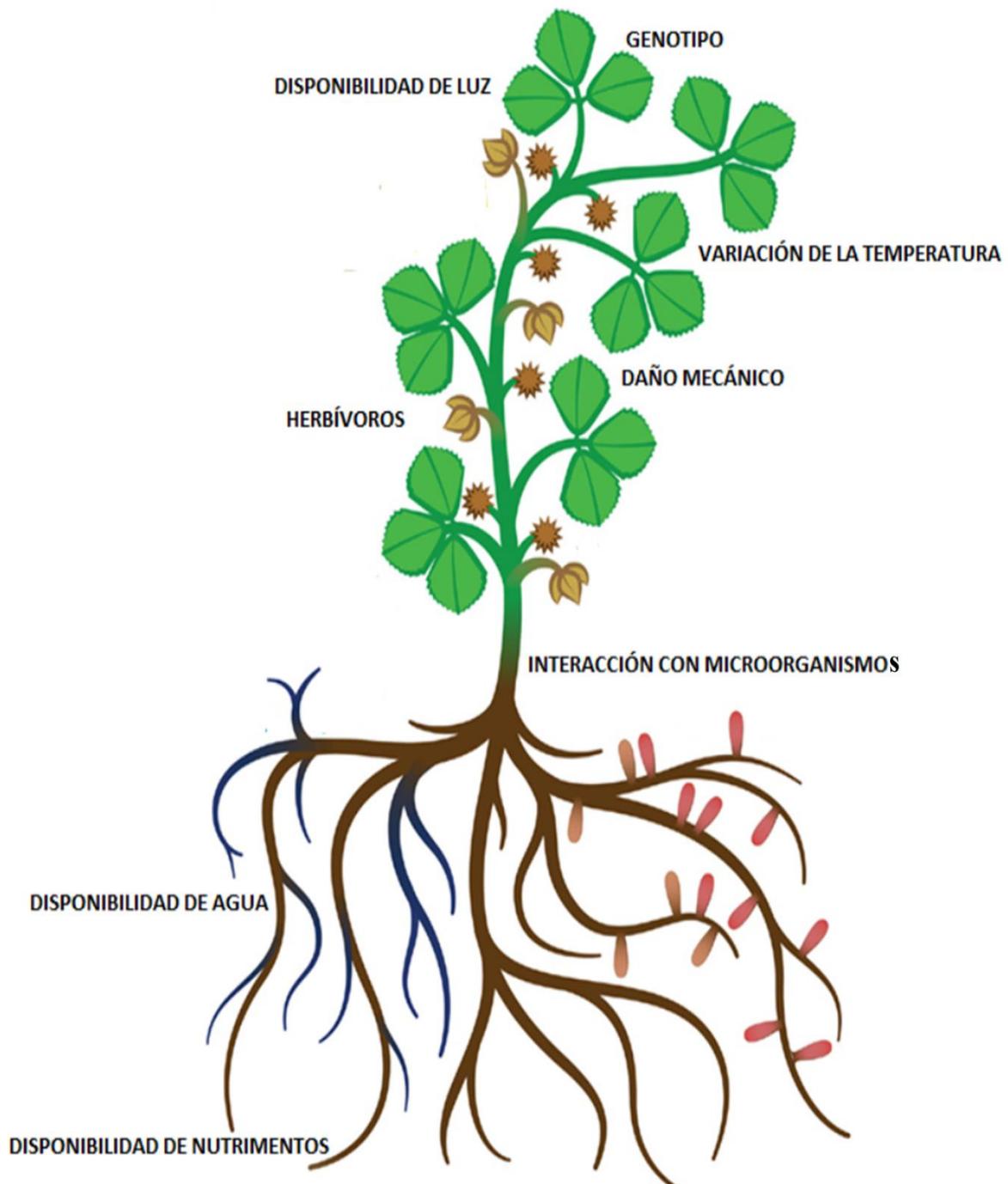


Figura 1.3 Interacción con el ambiente: factor importante en el desarrollo de las plantas.

1.4 REGULACIÓN GENÉTICA DEL METABOLISMO DE LOS CAPSAICINOIDES

El picor está asociado a la herencia de un gen dominante (Blum *et al.*, 2002) que se encuentra en el locus *C*, al cual posteriormente se le nombró *PUN1*, y finalmente, *AT3*. Este gen se localiza en el cromosoma 2 de *C. annuum* y *C. chinense* (Stewart *et al.*, 2005; Deshpande, 1935). En un principio, se pensó que codificaba a la enzima capsaicinoide sintasa (CS); sin embargo, tras el aislamiento de una supuesta capsaicina sintasa 1 (*CSY1*; Prasad *et al.*, 2006), se dudó *que AT3* fuera el gen de esta enzima. Finalmente, dado que *CSY1* codifica en realidad para una cinasa, *AT3* podría ser el gen sobre el que recae la codificación de la capsaicinoide sintasa. A pesar de lo anterior, se ha planteado la posibilidad de que *AT3* pueda estar implicado en la formación de vesículas necesarias para almacenar capsaicinoides, o incluso involucrado en la regulación de la ruta biosintética de los capsaicinoides (Stewart *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2005).

A pesar de que la ausencia o presencia de picor está asociado a la posesión de un gen, existe una pregunta fundamental en cuanto al metabolismo de los capsaicinoides: ¿cuál es el mecanismo metabólico que permite a los factores ambientales determinar una acumulación diferencial de capsaicinoides en plantas con un mismo fondo genético? Esta cuestión se ha abordado de diferentes maneras, por ejemplo, mediante cruces entre genotipos picantes y no picantes de *C. annuum* y *C. frutescens*, respectivamente. Se encontró un QTL (locus asociado a variaciones cuantitativas), que recibió el nombre de *cap*, y resultó ser responsable del 30% de la variación en el contenido de estos metabolitos. Debido a la falta de una correlación física entre *cap* y los genes involucrados en la síntesis de los capsaicinoides (*PUN1* y dos presuntos factores transcripcionales tipo b-ZIP-FT), se especula que éste podría relacionarse en el control de la disponibilidad o flujo de los intermediarios biosintéticos (Blum *et al.*, 2002). Adicionalmente, se han identificado tres QTL's más: *cap 4.1*, *cap 7.1* y *cap 7.2* (Ben-Chaim *et al.*, 2006), de los cuales *cap 4.1* corresponde al gen para la enzima BCAT.

Es de notarse que la aplicación exógena de capsaicina al tejido placentario sea capaz de suprimir la expresión del gen *AT3* (Kim *et al.*, 2009); este mismo efecto también se

observó sobre la expresión de *PAL* y *AMT*, que están involucrados en la misma vía (Figura 1.4). Esto podría explicar por qué el pico de máxima expresión de los transcritos de la CS y el contenido de capsaicinoides no coinciden durante el desarrollo del fruto (Kim *et al.*, 2001). Los datos anteriores sugieren que los capsaicinoides son un factor que desencadena todo un mecanismo de regulación genética que condiciona su síntesis. Es probable además que la cantidad umbral de capsaicina necesaria para desencadenar la inhibición por retroalimentación sea diferente en chiles con mayor o menor capacidad para acumular capsaicinoides.

Independientemente de lo anterior, la aplicación exógena de capsaicina podría ser una buena herramienta, al igual que el uso de los inductores, para estudiar la coordinación entre el metabolismo primario y secundario en chile habanero.

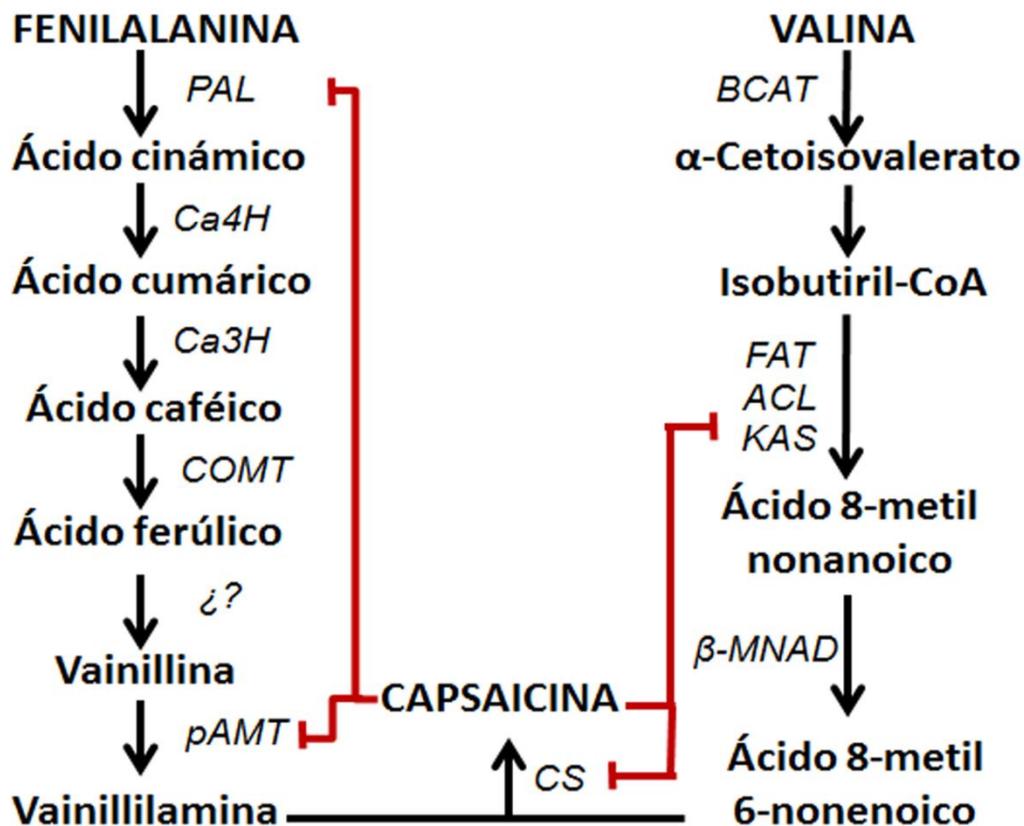


Figura 1.4 Modelo de la inhibición de la expresión de los genes *AMT*, *PAL* y *CS* por efecto de la adición exógena de capsaicina (Kim *et al.*, 2009).

1.5 COORDINACIÓN ENTRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y EL SECUNDARIO

La concepción actual del metabolismo de los diversos organismos resulta del éxito obtenido a partir del estudio de los aspectos bioquímicos y moleculares, principalmente con un enfoque reduccionista. Sin embargo, con respecto a la regulación del mismo, una vez que se conocen las partes que lo componen, no siempre es posible explicar el comportamiento de todo el sistema (Fell, 1997). Esto ha motivado a estudiar ciertos aspectos del metabolismo con un enfoque diferente (Del Rio *et al.*, 2009), esto es, desde una perspectiva más holística. Actualmente, están surgiendo trabajos encaminados a comprender la coordinación entre los metabolismos primario y secundario, con especial énfasis en la interfase (Aharoni y Galili, 2011; Tzin *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2006; Van der Fits y Memelink, 2001).

Es importante que durante la acumulación de metabolitos secundarios se encuentren disponibles los precursores, por lo que el metabolismo primario deberá suministrarlos cuando sean requeridos para su síntesis. Por lo tanto, debe existir una coordinación entre los metabolismos primario y secundario que culmine en una acumulación de los productos del último.

Las moléculas precursoras que tienen una influencia sobre la producción de estos metabolitos generalmente provienen del metabolismo del carbono, el nitrógeno y el azufre (Coley *et al.*, 1985). Por ejemplo, cuando se inhibe la tasa de fotosíntesis en las plantas de tabaco, que se traduce en una menor disponibilidad de carbono, los cambios en el metabolismo secundario reflejan de manera directa los cambios en las pozas internas de azúcares y aminoácidos (Matt *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha sugerido la posibilidad de manipular genéticamente la interface entre el metabolismo primario y el secundario de plantas como una alternativa para aumentar la producción de metabolitos secundarios, como se ha hecho en el caso de los glucosinolatos en *Arabidopsis thaliana* o en el de los alcaloides indolterpénicos en *Catharanthus roseus* (Aharoni y Galili, 2011).

Al evaluar la contribución del nitrato y el metabolismo primario del nitrógeno sobre la regulación de la síntesis de los fenilpropanoides y nicotina en *Nicotiana tabacum*, se concluye que las plantas sometidas a concentraciones limitantes de nitrógeno pasan de contener una cantidad mayor de nicotina (metabolito nitrogenado) a una mayor de fenilpropanoides (metabolitos ricos en carbono). Además, el metabolismo de los fenilpropanoides se activa como resultado de los cambios internos en el contenido de nitrato. Este cambio al parecer es provocado por la activación de enzimas que se encuentran al principio de esta vía (Fritz *et al.*, 2006).

De igual manera, al expresar una enzima bifuncional (corismato mutasa/ pfenato deshidratasa), de procedencia bacteriana, en *A. thaliana*, a pesar de haber encontrado un efecto menor en el metabolismo primario central, se observa un gran incremento en la producción de Phe. Como consecuencia del aumento en el contenido de este aminoácido, hay un incremento concomitante de bencilglucosinolato, coniferina y homogentisato (Tzin *et al.*, 2009).

En los casos anteriores se señala una fuerte correlación entre la poza interna de metabolitos primarios y la acumulación de metabolitos secundarios. Sin embargo, en el caso de *A. thaliana*, se observó que esta correlación se da sólo entre la síntesis de fenilalanina y la de antocianinas, dejando el metabolismo primario central sin mayores modificaciones (Tzin *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2006). Se sugiere que mecanismos de coordinación semejantes podrían estar involucrados en la regulación del metabolismo de los capsaicinoides, que de alguna manera relacionen una acumulación diferencial de estos compuestos en plantas con un mismo fondo genético, pero con una disponibilidad variable de nutrimentos (Monforte-González *et al.*, 2010; Miranda-Ham *et al.*, 2007).

Lackman y colaboradores (2011) demostraron que existe una interacción entre las vías de señalización de los jasmonatos y del ácido abscísico (ABA), pero además, los resultados también muestran que el metabolismo primario y el secundario son reprogramados al sobre-expresar PYL4, un receptor de ABA. Los datos sugieren que PYL4 es un control para redirigir los metabolitos primarios del carbón y el metabolismo de los carbohidratos hacia el metabolismo de los aminoácidos, y posteriormente, hacia el metabolismo secundario en *N. tabacum*.

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

1.6.1 BIOSÍNTESIS DE FENILALANINA

La ruta del shikimato se encuentra sólo en microorganismos y plantas. Da origen a los tres aminoácidos aromáticos Trp, Phe y Tyr, y además, todos los metabolitos intermediarios pueden servir como precursores para otras rutas metabólicas. Esta vía une el metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de compuestos aromáticos en una secuencia de siete pasos metabólicos: 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. En este punto, se encuentra la primera ramificación en la vía de síntesis (Figura 1.5): por un lado, la antranilato sintasa (EC 4.1.3.27) dirige al corismato hacia la síntesis de Trp, mientras que la corismato mutasa (CM; EC 5.4.99.5), que produce prefenato, a la síntesis de Tyr o Phe. La enzima directamente implicada en la síntesis de Tyr es la arogenato deshidrogenasa (ADH; EC 1.3.1.43), mientras que en el caso de Phe es la arogenato deshidratasa (ADT; EC 4.2.1.91).

La ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos está regulada por retroalimentación alostérica. Tyr y Phe inhiben a la CM1 (ubicada en los plástidos), mientras que Trp activa a la CM1 e inhibe a la antranilato sintasa. La CM2 (citoplasmática) no es afectada por los productos finales de esta vía. Por su parte, la ADT es inhibida por Phe y activada por Tyr (Voll *et al.*, 2004).

En *A. thaliana* la expresión del gen de la CM1 es inducida por elicitores e infecciones fúngicas, mientras que la CM2 no se ve afectada (Lancien y Lea, 2007). El daño mecánico y el ataque por patógenos modifican los patrones de expresión de CM1 y CM3 (también citoplasmática), por lo que se ha sugerido que las enzimas codificadas por estos genes tienen un papel importante bajo condiciones de estrés, quizás en la síntesis de compuestos de defensa (Mobley *et al.*, 1999). Con respecto a la ADT y la ADH, en *Papaver somniferum* la

expresión de los genes que codifican para las enzimas correspondientes puede ser inducida a través de la adición de homogeneizados fúngicos. Los cambios en la expresión, tanto temporal como en abundancia relativa de los transcritos, se correlacionan correctamente con los cambios en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides en suspensiones celulares de esta planta (Zulak *et al.*, 2007).

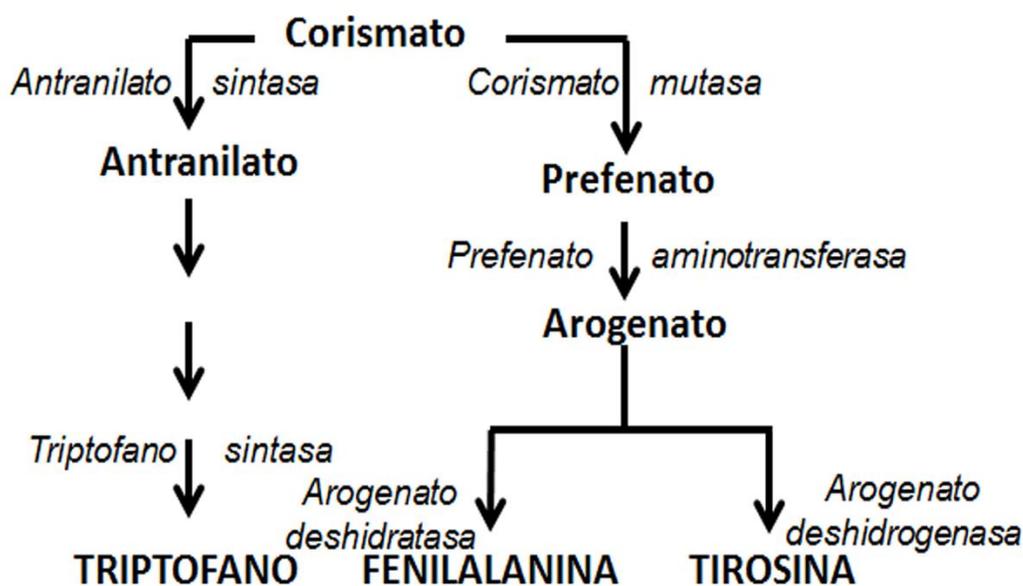


Figura 1.5 Ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina (vía del arogenato) y triptofano (Voll *et al.*, 2004).

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

Val, Leu e Ile son aminoácidos muy importantes por el hecho de determinar la estructura de las proteínas globulares, así como la interacción entre las proteínas y las membranas, gracias al carácter hidrofóbico de las moléculas. La ruta biosintética de la que provienen es única en el sentido de que un conjunto de cuatro enzimas es común a la síntesis de los tres aminoácidos (Figura 1.6): la acetolactato sintasa o acetohidroxiácido sintasa (ALS o AHAS; EC 2.2.1.6), la cetoácido reductoisomerasa (KARI; EC 1.1.1.89), la deshidroxiácido

deshidratasa (EC 4.2.1.9) y la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAT; EC 2.6.1.42).

En el caso de 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. Las enzimas responsables de esta conversión, en el mismo orden, son la treonina deshidratasa (TD; EC 4.3.1.19), la ALS, la KARI, la dihidroxiácido deshidratasa, y por último, la BCAT. La enzima TD interviene solamente en la síntesis de Ile, mientras que las cuatro restantes son comunes a la síntesis de Val y Leu.

Por otro lado, el piruvato es convertido en acetolactato, dihidroxiisovalerato, 2-oxoisovalerato y Val; mientras que, si 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 las cuatro enzimas cuya actividad es compartida: de 2-oxoisovalerato a Leu, intervienen las enzimas isopropilmalato sintasa (EC 2.3.3.13), isopropilmalato isomerasa (EC 4.2.1.33), isopropilmalato deshidrogenasa (EC 1.1.1.85), y por último, la BCAT (EC 2.6.1.42) (Singh y Shaner, 1995).

En plantas, son tres los mecanismos que parecen regular esta ruta: 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 evidente una mayor demanda de los productos finales de esta vía. No obstante, se ha sugerido que esa expresión también puede estar regulada en diferentes órganos, de acuerdo con las necesidades específicas de un tejido en particular, como la producción de un metabolito secundario (Singh y Shaner, 1995). Por ejemplo, los niveles de ARNm de la TD son 50 y 500 veces más altos en los sépalos y el resto de las flores, respectivamente, comparados con la expresión encontrada en raíces y hojas de tomate (Samach *et al.*, 1991).

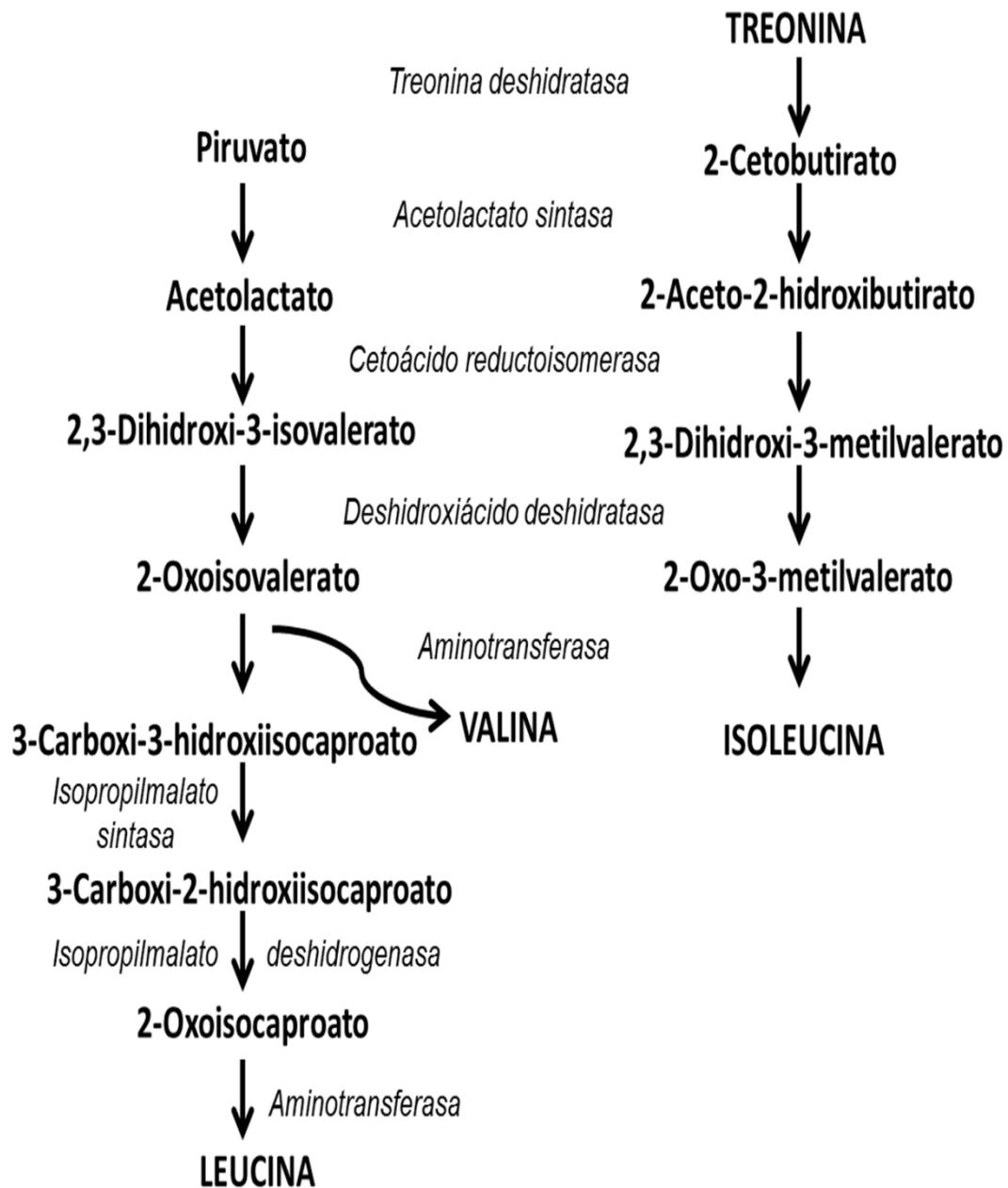


Figura 1.6 Ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina (Singh y Shaner, 1995).

HIPÓTESIS

Si la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la placenta afecta la acumulación de los capsaicinoides y este tejido es capaz de mantener la síntesis de estos alcaloides al ser aislado en un sistema *in vitro*, con sales minerales como única fuente de nutrimentos, entonces la síntesis de capsaicinoides en chile habanero requiere de la síntesis de los aminoácidos necesarios en la placenta.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la acumulación de capsaicinoides en placentas de chile habanero en función de la disponibilidad de Val y Phe.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar las pozas de nitratos, amonio, Val, Phe, vainillina, capsaicina y dihidrocapsaicina en placentas bajo condiciones que modifiquen la síntesis de capsaicinoides.

Evaluar cambios en la expresión, a nivel transcripcional, de genes involucrados en las rutas de síntesis de Phe (*CM* y *ADT*), Val (*ALS*) y capsaicinoides (*AT3*) en placentas bajo condiciones que modifiquen la síntesis de capsaicinoides.

Evaluar la síntesis de capsaicinoides bajo condiciones que inhiban la síntesis de Val y Phe en tejido placentario.

JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos derivados de precursores originados por el metabolismo primario y que tienen papeles especializados en la interacción de las plantas que los producen con su ambiente, como pueden ser la atracción de polinizadores o dispersadores de semillas, la defensa contra enemigos naturales o como aleloquímicos contra competidores. Por la diversidad de aplicaciones en las que se utilizan, alcanzan un valor alto en el mercado (Arias-Zabala *et al.*, 2009), de donde surge el interés por aumentar su producción a partir de fuentes naturales (Effendi *et al.*, 2009). Por lo tanto, no sorprende que, en las últimas décadas, gran parte del quehacer científico tenga por objetivo explorar a fondo las vías metabólicas que utilizan los organismos para sintetizarlos (Sirikantaramas *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2001).

Con el afán de explicar qué determina una acumulación diferencial de capsaicinoides en plantas con un mismo fondo genético, el metabolismo del que son derivados se encuentra bajo un fuerte escrutinio (Aza-González *et al.*, 2011; Mazourek *et al.*, 2009; Vázquez-Flota *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2004), y a pesar de los avances que se han logrado en la determinación de las vía de síntesis y degradación, aún no existe evidencia concluyente sobre los mecanismos que regulan su síntesis y sus diferentes patrones de acumulación (Aza-González *et al.*, 2011). Por ello, es evidente la necesidad de realizar estudios que lleven a comprender estos procesos regulatorios.

Las variaciones observadas en el contenido de capsaicinoides se podrían explicar en función de las diferencias en el flujo de los intermediarios a lo largo de la ruta de síntesis, derivada a su vez de niveles de expresión diferencial de los genes involucrados. De este modo, son necesarios los experimentos encaminados a evaluar la expresión y función de estos genes bajo condiciones que provoquen esas variaciones, ya que podrían coadyuvar a un mejor entendimiento de los procesos regulatorios que gobiernan los diferentes patrones de acumulación.

La ingeniería genética es una de las estrategias que se han implementado en el caso de algunos MS, como los alcaloides y los flavonoides (Ganget y Memelink, 2002; Sato *et al.*, 2001); sin embargo, es evidente que esos recursos no son suficientes, pues los

rendimientos obtenidos aún se encuentran lejos de satisfacer las expectativas planteadas. Los datos recientes sugieren que el metabolismo primario se encuentra más estrechamente vinculado al metabolismo secundario de lo que en un principio se pensó, por lo tanto, es necesario considerarlo al momento de plantear nuevas alternativas viables que permitan obtener una mayor cantidad de estos compuestos. Lo anterior justifica la necesidad de explorar y analizar los eventos moleculares del metabolismo primario que, de alguna manera, pudieran influir sobre la acumulación de capsaicinoides.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

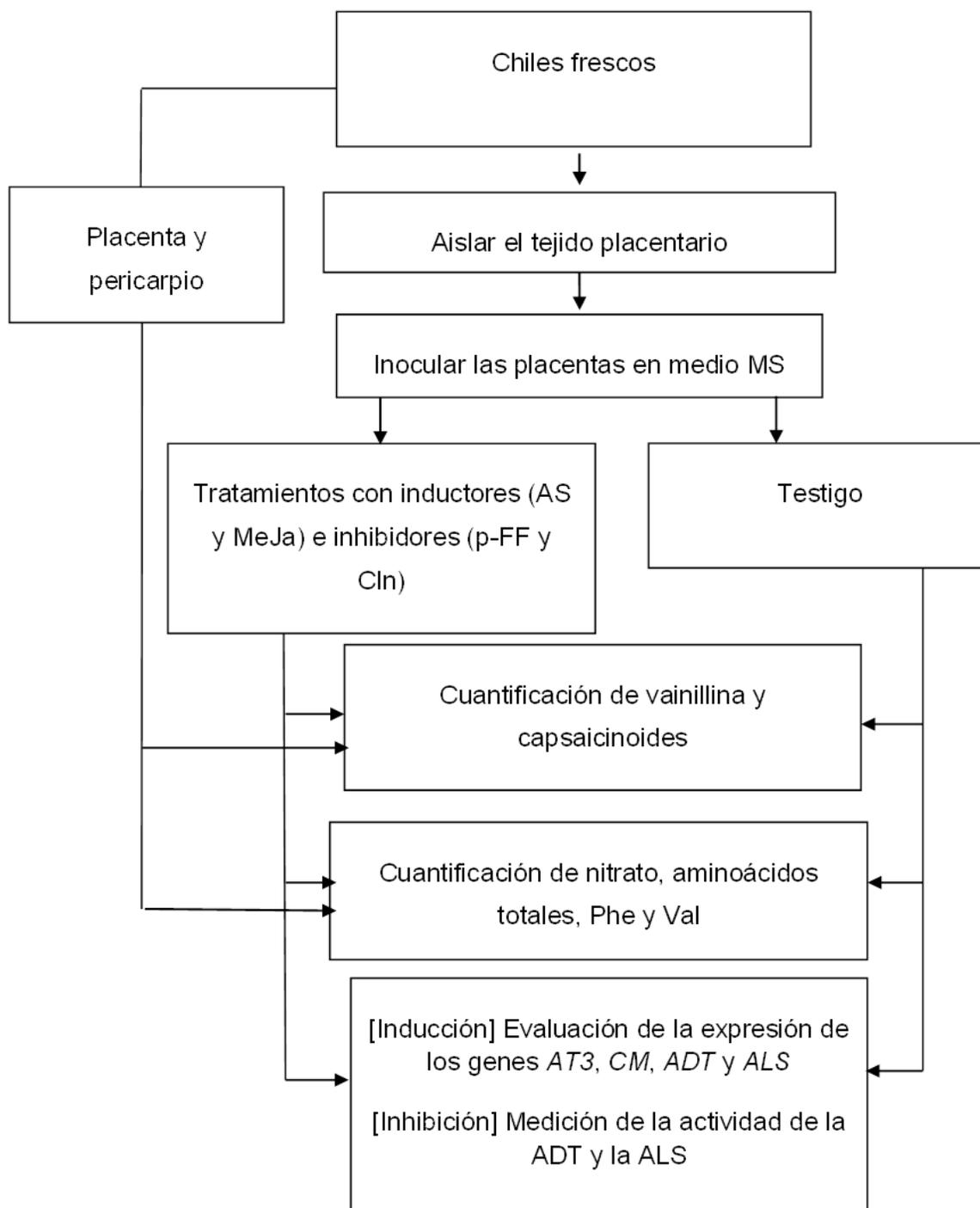


Figura 1.7 Estrategia experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A. y G. Galili (2011). Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 239-244.
- 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.
- Arias-Zabala, M., M.J. Angarita-Velásquez, A.M. Aguirre-Cardona, J.M. Restrepo-Flórez y C. Montoya-Vallejo (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 62, 4881-4895.
- Aza-González, C., H.G. Núñez-Paleniús y N. Ochoa-Alejo (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports*, 30, 695-706.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B.C. Kang, I. Paran y M. Jahn (2006). QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics Journal*, 113, 1481-1490.
- Bennett, D.J. y G.W. Kirby (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 442-446.
- Blum, E., K. Liu, M. Mazourek, E.Y. Yoo, M. Jahn e I. Paran (2002). Molecular mapping of the *C locus* for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome*, 45, 702-705.
- Bosland, P.W. y J.B. Baral (2007). 'Bhut Jolokia': the world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *HortScience*, 42, 222-224.
- Cázares-Sánchez, E., M.T. Rodríguez-González, R.M.S. Hernández, J.L. Chávez-Servia, F. Castillo-González y P. Ramírez-Vallejo (2005). Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) del centro-oriente

de Yucatán. *Agrociencia*, 39, 627-638.

- 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.
- Coley, P.D., J.P. Bryant, y R.S. Chapin (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230, 895-899.
- 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.
- 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.
- Del Rio, G., D. Koschützki y G. Coello (2009). How to identify essential genes from molecular networks? *BMC Systems Biology*, 3, 102.
- Deshpande, R.B. (1935). Studies in Indian chillies: 4. Inheritance of pungency in *Capsicum annuum* L. *Indian Journal of Agricultural Science*, 5, 513-516.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3, 141-157.
- Effendi, L., W. Runguphan, S. O'Connor y K. Jones-Prather (2009). Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology*, 5, 292-300.
- 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.

- Fell, D. (1997). Introduction: regulation and control, en: *Frontiers in Metabolism: Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press. pp. 1-21.
- Fritz, C., N. Palacios-Rojas, R. Feil y M. Stitt (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 46, 533-548.
- Fujiwake, H., T. Suzuki y K. Iwai (1980). Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiology*, 21, 1023-1030.
- Fujiwake, H., T. Suzuki y K. Iwai (1982a). Intracellular distribution of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 2685-2689.
- Fujiwake, H., T. Suzuki y K. Iwai (1982b). Capsaicinoid formation in the protoplast from placenta of *Capsicum* fruits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 2591-2592.
- Ganget, P. y J. Memelink (2002). Transcription factors: 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.
- Govindarajan, V.S. y M.N. Sathyanarayana (1991). *Capsicum* - production, technology, chemistry, and quality. V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 435-474.
- Herrmann, K.M. y L.M. Weaver (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 473-503.

- 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., 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.
- 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.
- Lackman, P., M. González-Guzmán, S. Tilleman, I. Carqueijeiro, A. Cuellar-Pérez, T. Moses, M. Seo, Y. Kanno, S.T. Häkkinen, M.C.E. Van-Montagu, J.M. Thevelein, H. Maaheimo, K. Oksman-Caldentey, P.L. Rodríguez, H. Rischer y A. Goossens (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 5891-5896.
- Lancien, M. y P. Lea (2007). Capítulo 18: Amino acid synthesis in plastids, en: *The Structure and Function of Plastids*. Wise, R.R. y J.K. Hooper (eds.). Springer, Netherlands. pp. 355-385.

- Lee, C.J., E.Y. Yoo, J.H. Shin, H.S. Hwang y B.D. Kim (2005). Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the capsaicinoid synthase gene, which allows early detection with SCAR markers. *Molecules and Cells*, 19, 262-267.
- Lee, M.L., S. Kim, J.Y. Lee, E.Y. Yoo, M.C. Cho, M.R. Cho, B. 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.
- Matt, P., A. Krapp, V. Haake, H. Mock y M. Stitt (2002). Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant Journal*, 30, 663-677.
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller y M.M. Jahn (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150, 1806-1821.
- Miranda-Ham, M.L., L. Castro Concha, C. Roca Mézquita y F.M. Baas Espinola (2007). Inmovilización de placentas de chile habanero para el estudio de la síntesis de capsaicina, a partir de sus precursores nitrogenados, en: II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero de Yucatán, Mérida.
- 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.
- Monforte-González, M., A. Guzmán, F. Uuh y F. 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 Society of High Technology in Agriculture*, 18, 284-289.

- Nelson, E.K. (1919). The constitution of capsaicin, the pungent principle of *Capsicum*. *Journal of the American Chemical Society*, 41, 1115-1121.
- 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.
- Ohta, Y. (1962). Physiological and genetical studies on the pungency of *Capsicum*. IV. Secretory organ, receptacles and distribution of capsaicin fruits. *Japanese Journal Breeding*, 12, 179-183.
- Prasad, N.B.C., V Cumar, H.B. Garuraj, R. Parimalan, P. Guiridar y G.A. Ravishankar (2006). Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum spp.*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 13315-13320.
- Puri, V. (1952). Placentation in angiosperms. *Botanical Review*, 18, 603-651.
- Ruiz-Lau, N., F. Medina-Lara, Y. Minero-García, E. Zamudio-Moreno, A. Guzmán-Antonio, I. Echevarría-Machado y M. Martínez-Estévez (2011). Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience*, 46, 487-492.
- Samach, A., D. Hareven, T. Gutfinger, S. Ken-Dror y E. Lifschitz (1991). Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and up regulation in floral organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 2678-2682.
- Sato, F., T. Hashimoto, A. Hachiya, K. Tamura, K. 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.
- Singh, B.K. y D.L. Shaner (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *The 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.
- Sukrasno, N. y M.M. Yeoman (1993). Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry*, 32, 839-844.
- Suzuki, T., H. Fujiwake y K. Iwai (1980). Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit. 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiology*, 21, 839-853.
- Suzuki, T., T. Kawada y K. Iwai (1981). Formation and metabolism of pungent principle of *Capsicum* fruits. 9. Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogs from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiology*, 22, 23-32.
- Tzin, V., S. Malitsky, A. Aharoni y G. Galili (2009). Expression of a bacterial bi-functional chorismate mutase/prephenate dehydratase modulates primary and secondary metabolism associated with aromatic amino acids in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 60, 156-167.
- 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.
- Van der Fits, M. y J. Memelink (2001). The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain

transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant Journal*, 25, 43-53.

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.

Voll, L.M., E.E. Allaire, G. Fiene y A.P.M. Weber (2004). The *Arabidopsis phenylalanine insensitive growth* mutant exhibits a deregulated amino acid metabolism. *Plant Physiology*, 136, 3058-3069.

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.

Zamski, 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.

CAPÍTULO II

¹ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO BAJO CONDICIONES DE INDUCCIÓN Y DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO

2.1 ANTECEDENTES

Los capsaicinoides son los compuestos responsables del picor de los chiles. Son metabolitos con importantes aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Aún cuando la determinación de la vía de síntesis de los capsaicinoides, así como su regulación, han recibido gran atención durante la última década, existen un escaso número de trabajos encaminados a estudiar el metabolismo primario tanto en pericarpio como en tejido placentario (Miranda-Ham *et al.*, 2007). En general, pocos trabajos hacen la distinción entre los tejidos que componen al fruto al investigar sobre el metabolismo de los capsaicinoides (Martínez-López *et al.*, 2014), aun cuando estos alcaloides se sintetizan exclusivamente en la placenta (Ruiz-Lau *et al.*, 2010).

El metabolismo de los capsaicinoides se encuentra sujeto a una regulación inherente al desarrollo del fruto (Contreras-Padilla y Yahia, 1998), así como por factores externos como la disponibilidad de agua y de nutrimentos (Zewdie y Bosland, 2000). Existe una relación positiva entre la disponibilidad de nitrógeno en la placenta y el contenido de capsaicinoides (Monforte-González *et al.*, 2010), además de una coordinación entre el metabolismo primario de este nutrimento y el metabolismo de los capsaicinoides en el tejido placentario (Ancona-Escalante *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 1990).

Los factores ambientales pueden modificar la síntesis de capsaicinoides, a través de la mediación de segundos mensajeros como el AS y el MeJa, por lo que la adición de estos

¹Castro-Concha L.A., Baas-Espinola F.M., Ancona-Escalante W.R., Vázquez-Flota F.A. y Miranda-Ham M.L. (2015). Phenylalanine biosynthesis and its relationship to capsaicinoids accumulation in placental tissue along fruit development of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). Aceptado para su publicación en *Biologia Plantarum*.

compuestos a sistemas *in vitro* de suspensiones celulares (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010) o tejido placentario (Ancona-Escalante *et al.*, 2013) estimula la producción de capsaicinoides.

Puesto que el contenido de capsaicinoides varía a lo largo de la ontogenia del fruto, de existir una relación entre el metabolismo primario y el secundario en la placenta, es probable que se dé, de igual manera, un cambio concomitante en el contenido de los precursores relacionados con la síntesis de estos alcaloides en este tejido, como una consecuencia directa de la dependencia entre ambos metabolismos.

La maduración del fruto, la diferenciación tisular y el metabolismo bajo condiciones adversas son tópicos importantes en el estudio de la fisiología de las plantas. Estos fenómenos biológicos están acompañados de alteraciones específicas en los sistemas biológicos, como diferencias en el tipo y concentración de metabolitos (Moco *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el análisis comparativo de perfiles metabólicos dirigidos provee de una herramienta rápida y sencilla para obtener una instantánea del fenotipo de una ruta metabólica particular en diferentes tejidos o bajo condiciones de estrés (mediante la adición de inductores). Este tipo de estudios pueden revelar enlaces o relaciones que ocurren principalmente a través de la regulación a nivel metabólico, como una estrategia de reconocimiento inicial que permita identificar puntos importantes en donde profundizar con estudios posteriores (Ratcliffe y Shachar-Hill, 2006). De este modo, a través del análisis de las diferencias significativas en la concentración de los precursores y productos de una ruta metabólica, se pueden plantear nuevas hipótesis acerca de mecanismos de regulación específica entre diferentes tejidos, o incluso, encontrar diferencias metabólicas que suscita el funcionamiento de un tejido bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Krishnan *et al.*, 2005).

Uno de los objetivos del cultivo *in vitro* en biotecnología vegetal es producir compuestos químicos de interés comercial; sin embargo, estas tecnologías son insuficientes para satisfacer la demanda de compuestos bioactivos o con aplicaciones industriales (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006). Se ha sugerido que esto es consecuencia de que los MS se producen en tejidos altamente especializados en las plantas y que la compleja

regulación metabólica que se encuentra detrás de la síntesis, acumulación y degradación, aún se ignora en su mayor parte.

Por lo tanto, el hecho de que la síntesis de capsaicinoides se lleve a cabo en la placenta y no en el pericarpio, y que el metabolismo de estos compuestos pueda activarse por el desarrollo, así como por la adición de inductores, nos provee de las condiciones diferenciales para usar estas estrategias en el estudio del metabolismo primario del nitrógeno en la placenta.

Dado que la finalidad de este trabajo es explorar la posibilidad de que la síntesis de capsaicinoides dependa de los precursores sintetizados en el tejido placentario, en esta primera parte, el objetivo fue describir el contenido de capsaicinoides y el de sus precursores, tanto en la placenta como en el pericarpio de chiles habaneros en diferentes estadios de desarrollo, así como en un sistema *in vitro* de placentas sometido a inducción con AS y MeJa.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIALES

Se utilizaron plantas de chile habanero de una variedad con frutos naranja, provenientes de los invernaderos del CICY. Se analizó el perfil metabólico dirigido de chiles de 25 y 40 DPA, es decir, de chiles que pertenecen a dos estadios contrastantes, en cuanto a acumulación de capsaicinoides. Así mismo, también se estableció el fenotipo metabólico dirigido de placentas en un sistema *in vitro* bajo condiciones de inducción (AS y MeJa; 500 μ M de ambos inductores, con un tiempo de exposición de 24 h).

2.2.2 MÉTODOS

2.2.2.1 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS

Para la medición de todos los analitos, se aislaron las placentas y los pericarpios de 9 chiles en diferentes estadios de desarrollo. Las muestras derivadas de los tratamientos de

inducción provinieron de tres experimentos independientes con tres réplicas. Cada matraz contenía 3 placentas.

De inmediato las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron. Para determinar el contenido de nitratos, aminoácidos solubles totales, Phe y Val se tomaron muestras de 1 g de tejido pulverizado, se les adicionaron 5 mL de metanol al 80% y se homogeneizaron con un politrón a velocidad máxima durante 2 min. Luego, se centrifugaron durante 20 min a 3,500 rpm a 4°C y se midieron los volúmenes de extracto recuperado. En el análisis de vainillina, capsaicina y dihidrocapsaicina, se tomó 0.2 g de tejido pulverizado, se 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.

2.2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE NITRATOS

Se determinó por el método de Nicholas y Nason (1957). La muestra (10 µL) se completó a 1.5 mL con agua destilada. Se adicionó 0.1 mL de ácido sulfámico al 10% y se dejó reposar durante 2 min. Después, se añadió 0.4 mL de ácido perclórico al 20%, se agitó y se midió la absorbancia a 210 nm. La curva estándar (a partir de una solución de KNO₃ de 1 mg/mL, en un rango de 0 a 20 µg) se procesó de la misma manera.

2.2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

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

Reactivo de ninhidrina:

Reactivo A: 0.2 M amortiguador de citratos, pH 5.0 (recién preparado). Se agregó por cada 50 mL del amortiguador, 0.08 g de cloruro de estaño.

Reactivo B: se tomó 10 mL de reactivo A y se le agregó 0.4 g de ninhidrina, previamente disuelta en 10 mL de metilcelosolve.

2.2.2.4 CUANTIFICACIÓN DE FENILALANINA Y VALINA

Ambos aminoácidos se determinaron como derivados del *o*-ftalaldehído (OPA). La separación de los aminoácidos se realizó mediante HPLC y se detectaron por fluorescencia.

Se adicionó 100 μ L de reactivo OPA (200 μ L de 2-mercaptoetanol en una mezcla de 54 mg de OPA disuelto en 1 mL de etanol, y diluido con 9 mL de 0.4 M borato de sodio, pH 9.4) a 500 μ L de extracto o estándar de Val y Phe. Se incubó 90 seg y se inyectó 20 μ L al HPLC (columna Ultrasphere ODS 3 μ m; 7.5 x 4.6 mm Altex, Berkeley, C. A.; flujo de 1 mL/min). Los OPA-derivados fueron eluidos y separados en metanol/ agua 55:45 (v/v). Los metabolitos fueron detectados por fluorescencia a 360 nm (excitación) y 455 nm (emisión). El tiempo de retención de la OPA-Phe fue de 9.85 min, mientras que en el caso de la OPA-Val fue 8.4 min.

2.2.2.5 CUANTIFICACIÓN DE VAINILLINA Y CAPSAICINOIDES

La separación de vainillina y capsaicinoides se hizo por 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, a temperatura ambiente, con un volumen de inyección de 20 μ L y a una longitud de onda de 280 nm.

La vainillina, capsaicina y dihidrocapsaicina fueron identificados y cuantificados usando estándares de los tres compuestos.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el software OrigenPro 8.5. 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.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 CONTENIDO DE VAINILLINA Y CAPSAICINOIDES EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO

Se realizó un perfil metabólico dirigido de chiles en dos estadios de desarrollo (25 y 40 DPA). En el primer estadio (25 DPA), el contenido de capsaicinoides (capsaicina + dihidrocapsaicina) en placenta fue de $10.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF, mientras que en el segundo (40 DPA) se determinó una cantidad de $34.01 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF; es decir, en ese periodo hubo un aumento de $23.61 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF (Figura 2.1). En comparación, en el pericarpio el contenido de capsaicinoides fue de 0.23 a $0.41 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF. La vainillina, un intermediario tardío en la ruta de síntesis de los capsaicinoides, disminuyó del primer al segundo estadio en placenta y se mantuvo constante ($0.50 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF) en pericarpio. Es importante señalar que el contenido de vainillina se presenta en niveles similares en ambos tejidos, pero inferior al contenido de capsaicinoides en placenta.

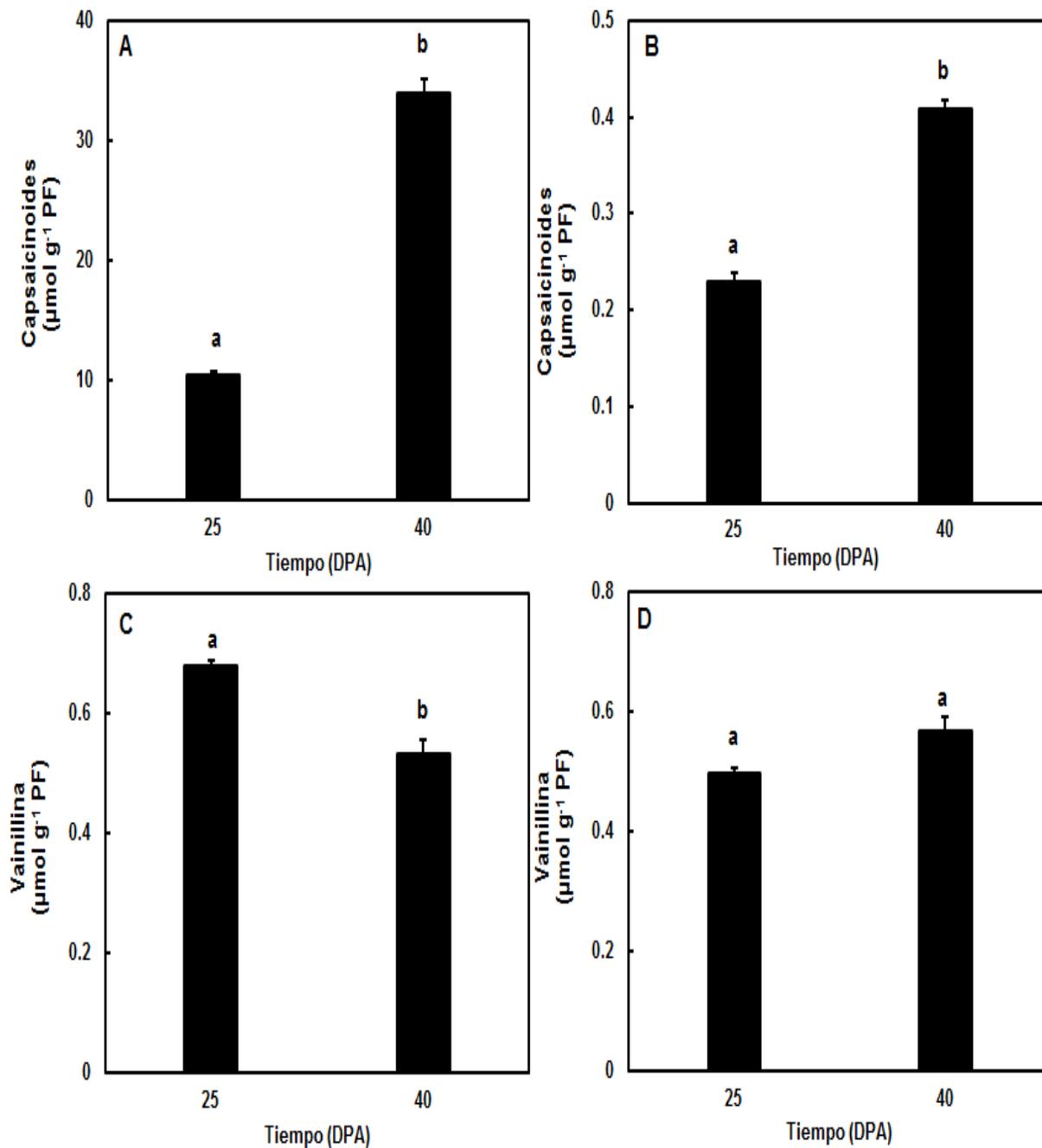


Figura 2.1 Contenido de capsaicinoides y vainillina en tejidos de chile habanero de 25 y 40 DPA. A y C, placenta; B y D, pericarpio. Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

También se caracterizó el perfil metabólico de placentas provenientes de frutos de 25 DPA, cultivadas *in vitro* y sometidas a inducción con AS y MeJa (Figura 2.2). Con ambos tratamientos se indujo la acumulación de capsaicinoides; no obstante, el efecto del AS fue mayor que el del MeJa (el AS lo aumentó en 19.82 μmol , mientras que el MeJa sólo en 11.79). Sin embargo, es importante señalar que sólo el AS provocó un aumento en la acumulación de vainillina (Figuras 2.2 C y D).

2.4.2 CONTENIDO DE NITRATO Y AMONIO EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO

Después de que se encontraron las condiciones en que aumenta el contenido de capsaicinoides (tanto por efecto del desarrollo del chile, como por la inducción), se establecieron las concentraciones de los precursores que intervienen en la síntesis de estos alcaloides, a diferentes niveles dentro de la ruta metabólica. Los resultados fueron los que se describen a continuación:

La concentración de nitrato aumentó en placentas de 40 DPA (con respecto a las de 25 DPA) y se mantuvo constante en ambos estadios en el pericarpio (Figuras 2.3 A y B). Tal como sucedió con los capsaicinoides, ambos inductores también aumentaron la concentración de nitrato (Figuras 2.4 A y B).

El amonio en la placenta se mantuvo constante en los dos estadios ($5 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF; Figura 2.3 C) y aumentó en el pericarpio (Figura 2.3 D). A diferencia de lo que sucedió con el amonio en la placenta, tanto el AS como el MeJa provocaron una disminución en la concentración de amonio en el tejido (Figuras 2.4 C y D).

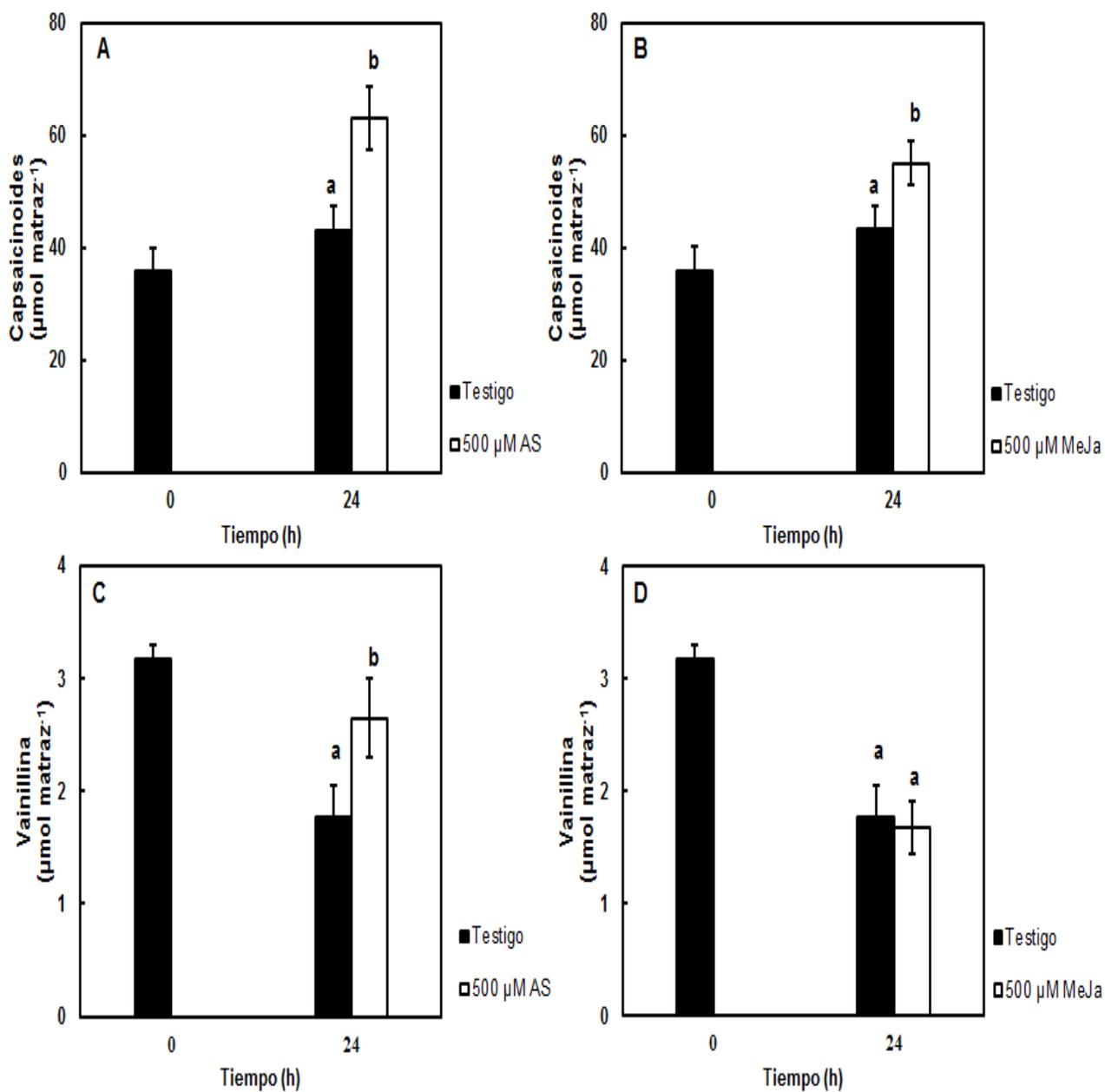


Figura 2.2 Contenido de capsaicinoides y vainillina en placentas de chile habanero de 25 DPA bajo inducción con AS (A y C) y MeJa (B y D). Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto al testigo a las 24 horas con una probabilidad de 95%.

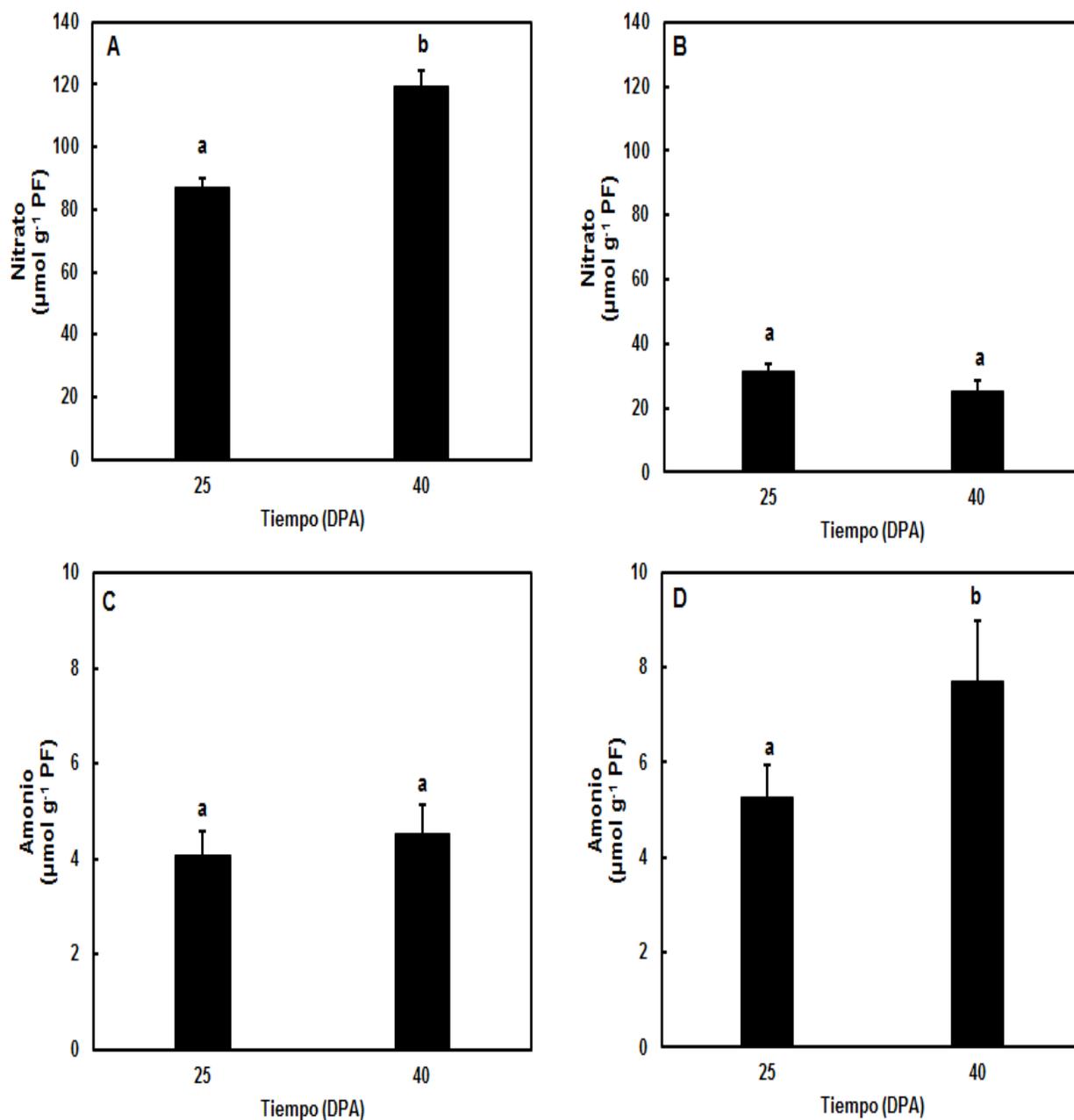


Figura 2.3 Contenido de nitrato y amonio en tejidos de chile habanero de 25 y 40 DPA. A y C, placenta; B y D, pericarpio. Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

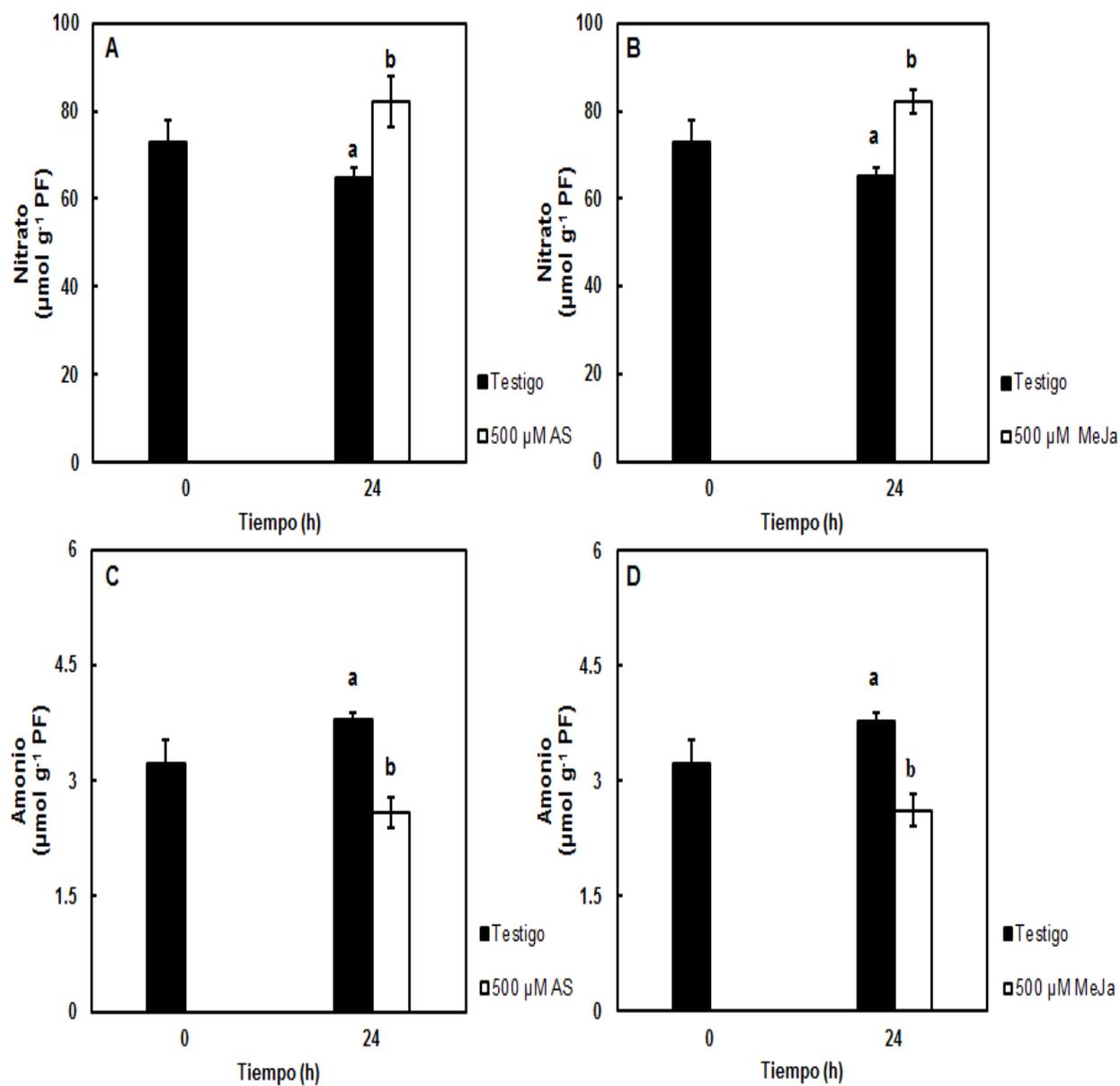


Figura 2.4 Contenido de nitrato y amonio en placentas de chile habanero de 25 DPA, bajo inducción con AS (A y C) y MeJa (B y D). Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto al testigo a las 24 horas con una probabilidad de 95%.

2.4.3 CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS SOLUBLES TOTALES EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO

El contenido de aminoácidos solubles totales (expresados como equivalentes de glutamato) en placentas fue de 113.6 y 170.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF para el primer y segundo estadio de desarrollo evaluados, respectivamente (Figura 2.5 A); es decir, hubo un aumento de estos metabolitos de 57.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en este periodo. En pericarpio se evidenció una disminución en el contenido de aminoácidos de 75.47 a 46.7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF (Figura 2.5 B). Por otro lado, el nivel de aminoácidos aumentó con los dos tratamientos de inducción (Figuras 2.5 C y D).

Desde otro punto de vista, el incremento en la disponibilidad de aminoácidos solubles totales coincide espacial y temporalmente con el aumento en la cantidad de capsaicinoides en la placenta, ya sea por la activación del metabolismo secundario, originado por el desarrollo del fruto, o como resultado de los tratamientos de inducción con AS o MeJa.

2.4.3.1 CONTENIDO DE FENILALANINA Y VALINA EN TEJIDOS DE CHILE HABANERO

Con respecto a los aminoácidos precursores, la cantidad de Phe en placenta disminuyó de 22.67 a 13.42 nmol g^{-1} PF en el segundo estadio (Figura 2.6 A). En el pericarpio, este aminoácido se incrementó, de 14.42 a 23.32 nmol g^{-1} PF (Figura 2.6 B). La Val también aumentó en la placenta en el segundo estadio (de 2.1 a 9.12 nmol g^{-1} PF; Figura 2.6 C), mientras que en pericarpio permaneció en un valor constante cercano a 1.0 nmol g^{-1} PF (Figura 2.6 D).

Es revelador que con los dos tratamientos de inducción *in vitro*, en donde la placenta está aislada y depende exclusivamente de la poza del tejido, o de la síntesis de *novo* de los aminoácidos, los contenidos de Phe y Val hayan disminuido en un cultivo que mantiene la producción de capsaicinoides (Figuras 2.7 A, B, C y D). Incluso esta disminución en

ambos aminoácidos puede observarse sin la activación adicional de la acumulación de capsaicinoides ocasionada por el AS o el MeJa.

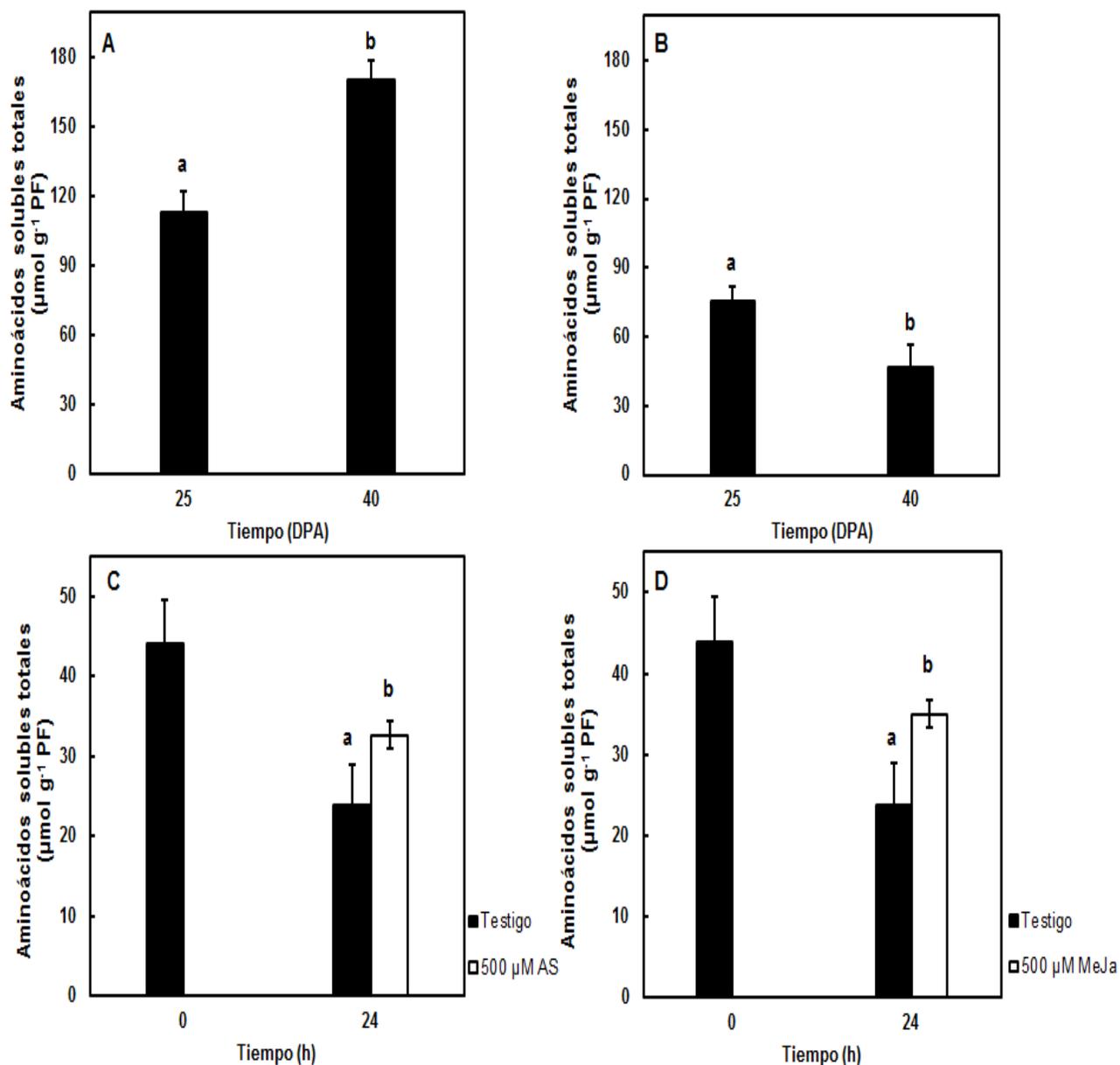


Figura 2.5 Contenido de aminoácidos solubles totales en tejidos de chile habanero (A, Placenta; B, pericarpio) de dos estadios de desarrollo (25 y 40 DPA) y en placentas de 25 DPA, bajo inducción con AS (C) y MeJa (D). Las letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos de inducción con respecto al testigo a las 24 horas con una probabilidad de 95%.

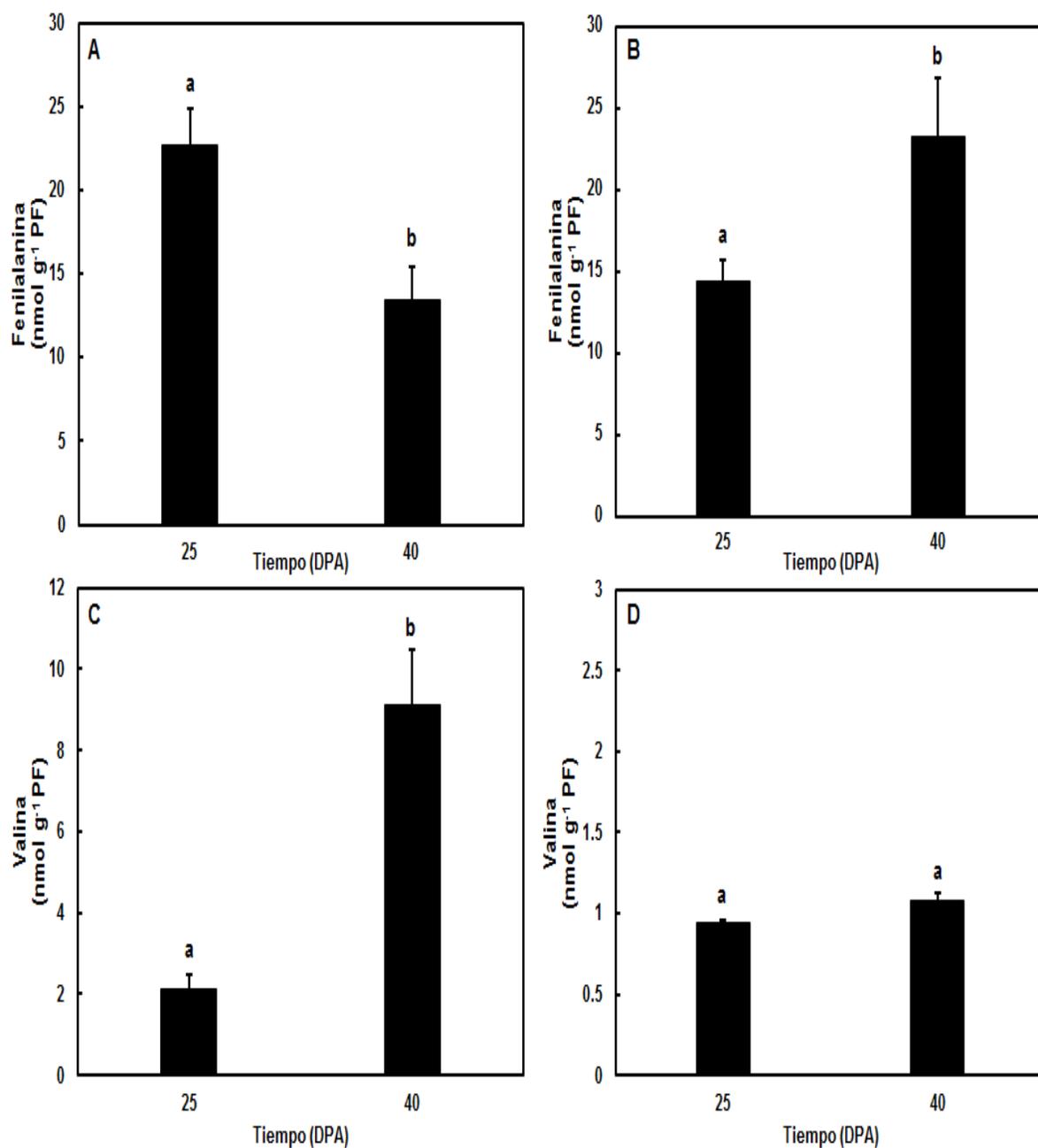


Figura 2.6 Contenido de Phe y Val en tejidos de chile habanero de 25 y 40 DPA. A y C, placenta; B y D, pericarpio. Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

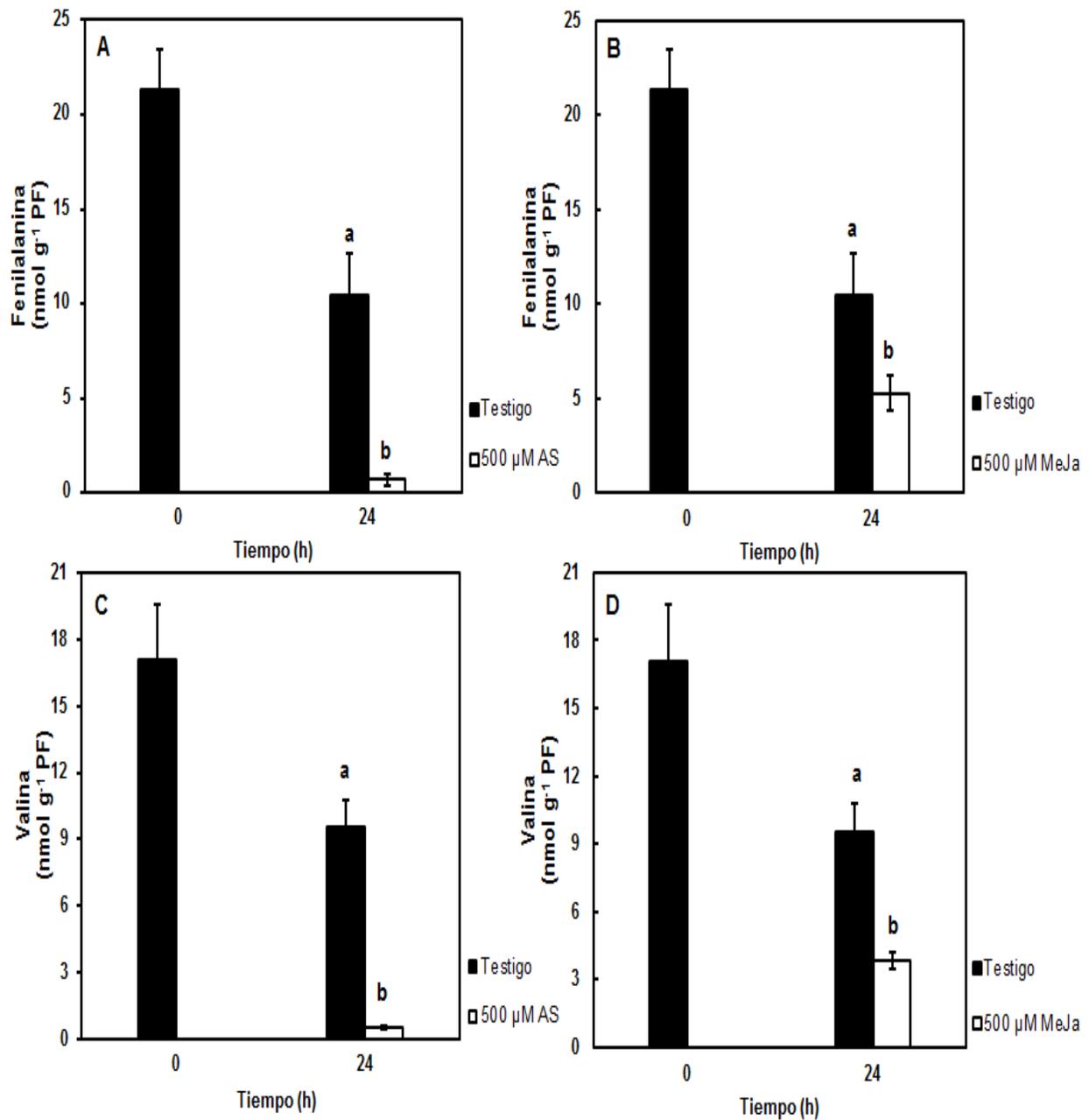


Figura 2.7 Contenido de Phe y Val en placentas de chile habanero de 25 DPA bajo inducción con AS (A y C) y MeJa (B y D). Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto al testigo a las 24 horas con una probabilidad de 95%.

2.5 DISCUSIÓN

Se ha descrito la dinámica de acumulación de capsaicinoides y se concluye que el inicio de la síntesis de los capsaicinoides ocurre generalmente alrededor de los 20 DPA, y se alcanza un máximo de acumulación entre los 45 y 50 días (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Este dinamismo en la síntesis y acumulación proveyó de la oportunidad para evaluar el contenido de capsaicinoides, y moléculas relacionadas a su síntesis, en dos estadios contrastantes del metabolismo.

La acumulación de capsaicinoides, además de estar regulada por el desarrollo del fruto, también lo está por factores ambientales, donde en algunos casos están involucrados mensajeros como el MeJa y el AS. Por lo tanto, se decidió realizar un análisis comparativo del perfil metabólico en dos condiciones diferentes: la primera, propiciada por la regulación propia del desarrollo del fruto, y la segunda, bajo condiciones de inducción, mediante la adición de moléculas como el AS y el MeJa.

Adicionalmente, en este trabajo se realizó un análisis comparativo del perfil metabólico de las placentas de los frutos de *C. chinense* en dos momentos contrastantes de la síntesis *in vivo* e *in vitro* de capsaicinoides. Los contenidos de estos compuestos tanto en placenta como en el pericarpio fueron mayores a los 45 DPA, con respecto a los 20 DPA (Figuras 2.1 A y B). Al comparar entre los tejidos, el contenido en placenta fue 41 veces mayor que en pericarpio (Figuras 2.1 A y B). En el caso de los capsaicinoides, al ser metabolitos tejido-específico, su síntesis sólo se circunscribe a la placenta y los septas interloculares (Stewart *et al.*, 2007); de modo que la mínima cantidad hallada en el pericarpio (Figura 2.1 B) fue probablemente resultado de la contaminación de los tejidos adyacentes.

Como previamente se señaló (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010), en este trabajo el AS y el MeJa indujeron la acumulación de los capsaicinoides y se observó un mayor efecto cuando se adicionó el primer inductor, como reportó Ancona-Escalante *et al.* (2013).

Debido quizás a que el aumento en la cantidad de capsaicinoides sugiere un flujo más activo en la ruta de los fenilpropanoides, el contenido de vainillina disminuyó en la placenta (Figura 2.1 C). Esto contrasta con lo que sucedió en pericarpio (Figura 2.1 D), en

donde se mantuvo constante en ambos estadios. Más que considerar la concentración de un intermediario en términos absolutos, se ha señalado que esta variación (aumentando o disminuyendo la concentración) puede ser el indicador de un aumento o una disminución del flujo en una ruta metabólica (Ratcliffe y Shachar-Hill, 2006). Por lo tanto, la diferencia en la concentración de vainillina, tanto en la placenta como en el pericarpio, probablemente resulte de la divergencia en la especialización metabólica de ambos tejidos.

Al analizar lo que sucede en la placenta durante el desarrollo del fruto y mediante la inducción de la acumulación de capsaicinoides *in vitro*, se observan patrones de regulación metabólica interesantes. Un ejemplo es lo que sucedió con la vainillilamina. Se observó una disminución de este metabolito de 25 a 40 DPA (Figura 2.1 C) y sucedió lo mismo en el sistema *in vitro* después de 24 h (Figuras 2.2 C y D). Quizás en ambos casos, esta disminución fue el reflejo del aumento en la demanda de los capsaicinoides, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, cuando se aplican los tratamientos de inducción, aquel con AS es el único en el que aumenta la concentración de vainillina (Figura 2.2 D). Esto probablemente se relaciona directamente con el hecho de que este inductor propició una mayor producción de capsaicinoides.

Llaman la atención los resultados de Gutiérrez-Carbajal *et al.* (2010), quienes reportaron que en suspensiones celulares de *Capsicum chinense*, la inducción del metabolismo secundario con AS o MeJa no tuvo efecto sobre la poza de vainillina, aún cuando sí lo tuvieron sobre la acumulación de capsaicinoides.

Lo anterior sugiere que el análisis del perfil metabólico puede ser insuficiente para entender por completo un fenotipo, y que la medición del flujo de precursores a través de las diferentes rutas metabólicas, puede ser un parámetro complementario útil para visualizar los mecanismos de regulación en las redes del metabolismo (Ratcliffe y Shachar-Hill, 2006).

Es importante mencionar que la vainillina ha sido señalada como un intermediario no limitante para la síntesis de capsaicinoides, dado que en suspensiones celulares se presentó en una cantidad superior (dos órdenes de magnitud) con relación a estos

metabolitos (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010). No obstante, en el presente trabajo, el contenido de vainillina en placenta fue un orden de magnitud menor al contenido de capsaicinoides (Figura 2.1). Una posible explicación radica en la baja capacidad biosintética de las suspensiones celulares (200 veces menor que la de la placenta; Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010), y que en este tipo de cultivo, la producción de vainillina exceda a la capacidad de utilizarla para la síntesis de capsaicinoides.

Esta diferencia en los patrones de acumulación sugiere que en la placenta un paso limitante en la formación de capsaicinoides puede estar relacionado con la producción y utilización de la vainillina (Núñez-Palenius y Ochoa-Alejo, 2005; Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993; Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992) y puede, por lo tanto, ser una pauta importante que establezca la diferencia detectada en el potencial biosintético de la placenta, con respecto a las suspensiones celulares.

El hecho de que las cantidades de aminoácidos totales (entre ellos, valina; Figuras 2.5 A y B, Figuras 2.6 C y D) y nitrato (Figuras 2.3 A y B) sean mayores en la placenta y se incrementen en un patrón similar al contenido de capsaicinoides (Figuras 2.1 A y B) durante el desarrollo, mientras que en pericarpio sucede lo contrario, sugiere que conforme aumenta el contenido de capsaicinoides en la placenta, hay una activación del metabolismo primario del nitrógeno que garantiza el suministro en la demanda de precursores. Además, existe la posibilidad de que, si bien el pericarpio no esté directamente involucrado en la síntesis de capsaicinoides, podría fungir como una fuente adicional para el abastecimiento de los precursores.

Algo interesante es que el contenido de Phe (Figura 2.6 A) varía de forma opuesta al contenido total de aminoácidos (Figura 2.5 A) y Val (Figura 2.6 C) en la placenta. Es decir, las placentas con mayor cantidad de capsaicinoides tienen un menor nivel de Phe. Dado que la acumulación de un metabolito está en función de la diferencia entre lo que se produce y lo que se consume (o transporta a otro tejido), es probable que la demanda de este aminoácido en la placenta sea tal que, aún cuando la vía de síntesis se active, todo lo que se produce esté siendo utilizado en la placenta.

La diferencia entre las cantidades determinadas de Phe y Val en la placenta puede ser el

resultado de la suma de las funciones que cada uno de los dos aminoácidos posee: mientras que la Val es utilizada sólo en la síntesis de proteínas y capsaicinoides en la placenta (Singh y Shaner, 1995; Leete y Loudon, 1968), la Phe, adicionalmente, interviene en la síntesis de otros metabolitos, cuyos precursores se derivan de la ruta de los fenilpropanoides, como es el caso de las moléculas constituyentes de la pared celular (Vogt, 2010).

Si bien el aumento en la acumulación de capsaicinoides (propiciada por el desarrollo o por la inducción) coincide con un descenso en el contenido de vainillina en la placenta, o con un incremento en la cantidad de nitrato en este tejido (lo que sugiere que la activación del metabolismo secundario estimula el transporte de nitrato a la placenta), las diferencias metabólicas entre la acumulación de capsaicinoides en el fruto, comparado con la inducción *in vitro*, comienzan a ser más evidentes en las pozas de los aminoácidos. Mientras que la disponibilidad de los aminoácidos solubles totales incrementa conforme aumenta la cantidad de capsaicinoides en la placenta de un fruto en desarrollo (Figura 2.5 A), en el sistema *in vitro* se observa una relación inversa, es decir, conforme aumenta el contenido de capsaicinoides, la cantidad de aminoácidos disminuye (Figuras 2.5 C y D), y esta disminución se acentúa cuando se induce la acumulación de capsaicinoides con AS o MeJa. Algo similar ocurre con los niveles de los aminoácidos Val y Phe en el sistema *in vitro* (Figura 2.7).

Esto sugiere que aún cuando la placenta puede mantener la síntesis de capsaicinoides, y probablemente, proveer la Val y la Phe necesarias, este tejido, al estar aislado en el sistema *in vitro*, satisface la demanda de los precursores que se requieren para mantener activo al MS, a costa del descenso de la poza de aminoácidos solubles totales. Ancona-Escalante *et al.* (2013) demostraron que la inducción de la acumulación de estos alcaloides en el mismo modelo *in vitro* requiere de la activación de la asimilación de amonio, a través del ciclo GS-GOGAT, quizás como un intento del tejido por restablecer la homeostasis del metabolismo del nitrógeno.

Además, esto parece indicar que la síntesis de capsaicinoides en los frutos depende, además de la asimilación *in situ* de nitrógeno, del transporte de aminoácidos proveniente de otras partes de la planta hacia la placenta, ya que aún cuando la síntesis de

capsaicinoides fue mayor en los frutos, la poza de aminoácidos solubles totales incluso incrementó su concentración.

Los datos, en su conjunto, apoyan la hipótesis de que hay una activación del metabolismo primario del nitrógeno en el tejido placentario, por lo que la síntesis de los capsaicinoides requiere de la asimilación *in situ* de este elemento.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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 chili peppers and relation with peroxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2075-2079.
- Gutiérrez-Carbajal, M.G., M. Monforte-González, M.L. Miranda-Ham, G. Godoy-Hernández y F. Vázquez-Flota (2010). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*, 54, 430-434.
- Johnson, T.S., J.A. Ravishankar y L. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. *Plant Science*, 70, 223-229.
- Krishnan, P., N.J. Kruger y R.G. Ratcliffe (2005). Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, 56, 255-265.
- Leete, E. y M.C. Louden (1968). Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *Journal of the American Chemical Society*, 90, 6837-6841.
- Loyola-Vargas, V.M. y F.A. Vázquez-Flota (2006). Back to the future: An introduction to plant cell cultures, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V.M. y F.A.

Vázquez-Flota (eds.). Segunda edición. Humana Press, Totowa. pp. 3-8.

Martínez-López, L.A., N. Ochoa-Alejo y O. Martínez (2014). Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. *BMC Genomics*, 15, 143.

Miranda-Ham, M.L., L. Castro Concha, C. Roca Mézquita y F.M. Baas Espinola (2007). Inmovilización de placentas de chile habanero para el estudio de la síntesis de capsaicina, a partir de sus precursores nitrogenados, en: II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero de Yucatán, Mérida.

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.

Monforte-González, M., A. Guzmán, F. Uuh y F. 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.

Nicholas, J.C. y A. Nason (1957). Determination of nitrate and nitrite. *Methods in Enzymology*, 3, 981-984.

Núñez-Palenius, H.G. y N. Ochoa-Alejo (2005). Effect of phenylalanine and phenylpropanoids on the accumulation of capsaicinoids and lignin in cell cultures of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 801-805.

Ochoa-Alejo, N. y J.E. Gómez-Peralta (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141, 147-152.

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.

Ratcliffe, R.G. e Y. Shachar-Hill (2006). Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. *Plant Journal*, 45, 490-511.

Ruiz-Lau, N., F. Medina-Lara, Y. Minero-García, L.W. Torres-Tapia, S.R. Peraza-Sánchez y M. Martínez-Estévez (2010). Capsaicinoids are absent in habanero pepper vegetative organs (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 45, 323-326.

Singh, B.K. y D.L. Shaner (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *Plant Cell*, 7, 935-944.

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.

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.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20.

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.

CAPÍTULO III

LA INDUCCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LOS CAPSAICINOIDES *in vitro*, REVELA UNA EXPRESIÓN COORDINADA DE AT3 CON LOS GENES RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE VALINA Y FENILALANINA EN PLACENTA

3.1 ANTECEDENTES

Existe evidencia que sugiere que el metabolismo primario en la placenta tiene un papel importante en la biosíntesis de capsaicinoides (ver sección 1.4 en el Capítulo I). Puesto que la activación de la acumulación de los capsaicinoides aumenta la demanda de precursores, es posible que la adición de inductores, que actúan de igual manera, induzca la expresión génica coordinada entre el metabolismo primario y el secundario en placentas de *Capsicum chinense* Jacq.

Tanto el AS como el MeJa inducen un aumento en la acumulación de los capsaicinoides en tejido placentario (Baas-Espinola, 2011); sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de señalización a través del cuál se da esta respuesta (Altúzar-Molina *et al.*, 2011). A pesar de que se ha documentado que ambos inductores incrementan la actividad de ciertas enzimas involucradas en el metabolismo de los capsaicinoides (PAL, COMT, CS; Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010; Sudha y Ravishankar, 2003), hasta ahora, se ignora el efecto que pudieran tener éstos sobre la expresión de AT3, uno de los genes responsable de la síntesis de los capsaicinoides (Ogawa *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2009).

En *Capsicum frutescens*, ambos inductores incrementan la acumulación de capsaicina; no obstante, sólo el AS aumentó la actividad de la CS, mientras que el MeJa no tiene efecto alguno sobre la actividad de esta enzima (Sudha y Ravishankar, 2003). Esto lleva a especular que probablemente el MeJa actúa disminuyendo el catabolismo o la conjugación de los capsaicinoides; sin embargo, es necesario contar con más evidencia para aclarar este punto.

Recientemente se demostró que la inducción de la acumulación de los capsaicinoides en un sistema *in vitro* de placentas, por medio del uso de AS o MeJa, requiere de la

activación de la asimilación de amonio, a través del ciclo GS-GOGAT (Ancona-Escalante *et al.*, 2013). Con este antecedente, el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la inducción del metabolismo de los capsaicinoides, a través del AS y el MeJa, sobre la expresión del gen *AT3*, así como sobre aquellos involucrados en la síntesis de fenilalanina (*CM* y *ADT*) y de valina (*ALS*).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron plantas de chile habanero de una variedad con frutos naranja, provenientes de los invernaderos del CICY. Se analizaron los cambios en el contenido de transcritos y el perfil metabólico de chiles de 25 DPA sometidos a diferentes tratamientos de inducción con AS y MeJa. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno, excepto para los análisis de expresión génica, los cuales fueron el promedio de dos experimentos con tres réplicas cada uno.

3.2.1.1 DESINFESTACIÓN DEL CHILE HABANERO

Se lavaron los chiles con detergente líquido, evitando dañarlos, y con Extrán al 5% durante 10 min. Se enjuagaron con agua de la llave después de cada lavado. Luego, se trasladaron a una campana de flujo laminar y se lavaron sucesivamente con Tween 80 (6 gotas por litro de agua) durante 10 min, etanol al 80% durante otros 10 min y una solución de hipoclorito de sodio al 3% (Cloralex 1:2, v/v) durante 30 min. Se procuró enjuagar con abundante agua destilada estéril entre cada lavado. En el último caso, hasta haber eliminado cualquier olor residual a cloro.

3.2.2 MÉTODOS

3.2.2.1 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON AS Y MeJa

Se aisló el tejido placentario de chiles previamente desinfestados, se les retiraron las semillas y se colocaron en cajas Petri sobre una toalla de papel húmeda para evitar su

deshidratación. Se depositaron ~3 g de placentas en matraces con 40 mL de medio MS. Inmediatamente, se aplicaron los tratamientos de AS y MeJa, y luego, los matraces fueron trasladados a un cuarto de cultivo, en donde permanecieron 24 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz continua ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 70% de humedad relativa y agitación orbital constante de 20 rpm. Posteriormente, se colectaron las muestras, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que fueran analizadas. El tejido que sirvió como testigo estuvo sujeto a las mismas manipulaciones, salvo que no fue expuesto a los diferentes tratamientos. Estos tejidos se usaron para extraer el ARN total para realizar las RT-PCR, y analizar los metabolitos: nitrato, amonio, aminoácidos solubles totales, Phe, Val, capsaicina y dihidrocapsaicina. El AS se disolvió en agua destilada, mientras que el MeJa lo fue en etanol. Los metabolitos utilizados en los tratamientos fueron esterilizados por filtración.

3.2.2.2 EVALUACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO

Para la extracción y medición de los diferentes metabolitos, ver la sección 2.2.2 del Capítulo II.

3.2.2.3 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN

Se pulverizó 1 g de tejido congelado con nitrógeno líquido y 250 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) hasta obtener un polvo fino. Se transfirió el polvo a tubos Eppendorf estériles y se añadieron 5 mL del amortiguador de extracción [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% (v/v) glicerol, 0.1% (p/v) rojo fenol]. Se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se eliminó el material insoluble del homogeneizado por centrifugación ($14,000 \times g$ durante 10 min a 25°C), se transfirió el sobrenadante resultante a nuevos tubos estériles y se agregó 1 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitó el tubo vigorosamente durante 15 seg e incubó a temperatura ambiente durante 2 min.

Después, se separaron las fases mediante centrifugación a $14,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo:

alcohol isoamílico. Posteriormente, se depositó la fase acuosa a un tubo nuevo y se mezcló con 0.625 volúmenes de 8 M LiCl. Se incubó a 4°C durante toda la noche. El ARN total fue separado por centrifugación a 17,000 $\times g$ durante 30 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, luego se lavó cuidadosamente el sedimento, en primer lugar con 3 mL de 3 M LiCl y luego, con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó la muestra a 17,000 $\times g$ a 4°C durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido en 300 μ L de agua tratada con 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% e 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% a -20°C. Se secó el sedimento a temperatura ambiente y se suspendió en 50-100 μ L de agua tratada con DEPC. Se realizó un tratamiento con ADNasa I (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2008).

3.2.2.4 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%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

3.2.2.5 DISEÑO DE LOS CEBADORES (“PRIMERS”)

Se obtuvieron las secuencias reportadas en la base de datos NCBI. Los números de acceso fueron: EU616556 (CM), EU616545 (ADT), EU616547 (ALS), AY819027 (AT3) y AY572427 (Actina). 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) para su validación.

3.2.2.6 PCR-TRANSCRIPTASA REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL

Se extrajo el ARN total de tejido placentario por el método reportado por Rubio-Piña y Vázquez-Flota (2008). La muestra fue tratada con ADNasa I (Kit Ambiom). El ADNc de cadena sencilla se preparó a partir de 2.5 µg de ARN, oligo (dT) y la transcriptasa reversa AMV (Applied Biosystems). 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 Qiagen OneStep RT-PCR. La reacción tuvo un volumen final de 50 µL, de los cuales 23.5 µL agua libre de RNAsas, 10 µL reactivo Q y 17 µL mezcla maestra: 10 µL Amortiguador 5x Qiagen OneStep RT-PCR (1x), 2µL dNTP Mix (400 µM de cada dNTP), 1.5 µL de cada primer (0.6 µM), 2 µL Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix y ~1 µL de ARN (1 µg). Las condiciones del termociclador fueron: transcripción reversa: 30 min, 50°C; paso inicial de activación de la PCR: 15 min, 95°C; 3 pasos cíclicos de: a) desnaturalización: 0.5 min, 94°C; b) alineamiento: 1 min, 55-60°C y c) extensión: 45 seg, 72°C. Número de ciclos: 30. Extensión final: 10 min, 72°C.

Para la síntesis del cDNA, se usó el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq, conforme las instrucciones del proveedor. Para la RT-PCR en tiempo real, el volumen final fue de 20 µL, del cual 10 µL 2x SYBR Green PCR Master Mix (1x), 600 nM forward primer (0.6 µL), 600 nM reverse primer (0.6 µL), 75 ng ARN (~2 µL) y 6.8 µL agua libre de ARNasa. Las condiciones de la RT-PCR fueron: 10 min, 95°C. 40 ciclos: a) desnaturalización: 15 seg, 95°C; b) alineamiento/extensión: 1 min, 60°C (para todos los genes, excepto para la actina donde se usó 55°C) y c) extensión: 72°C, 30 seg.

Las muestras de los testigos fueron usadas como calibradores para calcular la diferencia en los niveles de expresión genética. Los niveles de expresión relativa fueron determinados de acuerdo a la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron como se describe en la sección 2.3.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se establecieron las condiciones para detectar la expresión de los genes *CM*, *ADT*, *ALS* y *AT3* que codifican para las enzimas corismato mutasa, arogenato deshidratasa, acetolactato sintasa y aciltransferasa 3, respectivamente, en placentas de chile habanero de 25 DPA, mediante RT-PCR de punto final, usando como cebadores los oligonucleótidos descritos en la figura 3.1, y posteriormente, éstas se tomaron como base para estandarizar las RT-PCR cuantitativas.

| Gen | N° GenBank | Nombre de los oligos | Secuencia de los nucleótidos | Tm (°C) | TA (°C) | Tamaño del producto esperado |
|---------------------------------------|------------|--------------------------------|--|---------|---------|------------------------------|
| Corismato mutasa (<i>CM</i>) | EU616556 | F-CM-167: R-CM-167: | AAGCAAAATTTTCG AGCCTCAC CGGTCCATTCTG TTCAGTTC | 82 | 60 | 167 |
| Arogenato deshidratasa (<i>ADT</i>) | EU616545 | F-ADT-180: R-ADT-180: | AACCAATAATTCC ACGAACCG CATTGTCATCGTC CACTAGCC | 83.3 | 60 | 180 |
| Acetolactato sintasa (<i>ALS</i>) | EU616547 | F-ALS-202B: R-ALS-202B: | TGCCATCCCTCCA CAATATGCT TCTTCCAACAGCC GCACCT | 85 | 67 | 202 |
| Aciltransferasa 3 (<i>AT3</i>) | AY819027 | F-AT3-204: R-AT3-204: | ATTGGTCTAGCGT TACTCGT ATTCTTCTGCCAC CTTAGCTC | 81 | 61 | 204 |
| <i>Actina</i> | AY572427 | F-ACTINA-185: R-ACTINA-185: | AAGATTTGGCATC ATACCTT CTGGCATAAAGAG ACAACACC | 82.6 | 55 | 185 |

Figura 3.1 Oligonucleótidos usados para el análisis de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa.

En la figura 3.2 se muestra la electroforesis en un gel de agarosa teñido con Gel Red[®], en la que se observan los amplicones esperados para cada gen: actina (185 pb), *CM* (167 pb), *ADT* (180 pb), *ALS* (202 pb) y *AT3* (204 pb).

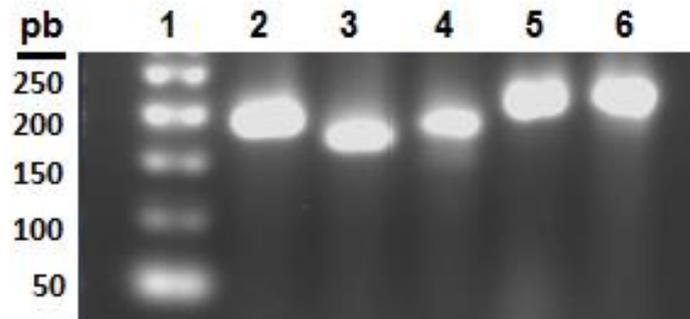


Figura 3.2 Detección de la expresión de genes involucrados en la síntesis de fenilalanina (*CM* y *ADT*), valina (*ALS*) y capsaicinoides (*AT3*) por RT-PCR de punto final en placentas de chile habanero de 25 DPA. Se amplificó el gen de la actina para usarlo posteriormente como testigo. Carriles: 1) Escalera de 50 pb, 2) actina, 3) *CM*, 4) *ADT*, 5) *ALS* y 6) *AT3*.

Para demostrar que el ADN complementario (ADNc) que se empleó en los ensayos de RT-PCR no estaba contaminado con ADN genómico, se utilizó como testigo al gen *AT3*, puesto que se emplearon cebadores que al amplificar pondrían en evidencia a un intrón de 349 pb (Figura 3.3 A). En el caso de la RT-PCR de punto final, el amplicón observado fue de 204 pb. Si el ADNc hubiese estado contaminado con ADN genómico, también se habría amplificado un segmento de 553 pb, el cual no se observó en estos ensayos (Figura 3.3 B). Por otro lado, en el caso de la RT-PCR cuantitativa, se corroboró este resultado mediante el análisis de la temperatura de fusión (Ver anexo 1).

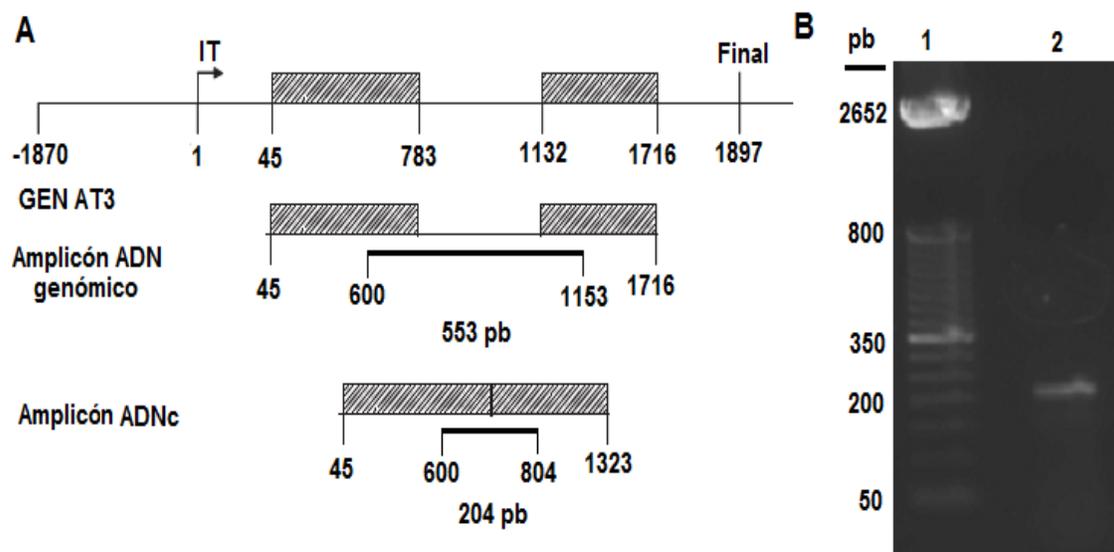


Figura 3.3 A) Representación esquemática del gen de la acil transferasa 3 (*AT3*) y el tamaño del amplicón esperado, de acuerdo con la fuente del molde (ADN genómico ó ADNc). B) Detección de la expresión del gen *AT3* en placentas de chile habanero de 25 DPA. Carril 1) Marcadores de longitud del fragmento y 2) *AT3* (204 pb). IT, sitio de inicio de la traducción.

Una vez que se demostró que la adición de AS y MeJa estimularon una mayor acumulación de capsaicinoides en el sistema *in vitro* de placentas (Figura 2.2), se evaluó el efecto de esta inducción sobre la expresión de los genes involucrados con la síntesis de los precursores y del gen *AT3*.

Ambos inductores incrementaron la expresión de los genes involucrados en la síntesis de Phe (*CM* y *ADT*; Figuras 3.4 A y B) y el de la Val (*ALS*; Figura 3.4 C). Lo mismo ocurrió con *AT3*: su expresión aumentó en presencia de AS o MeJa (Figura 3.4 D). El efecto sobre la expresión de todos los genes fue mayor cuando se usó al AS como inductor. Este resultado se correlaciona con los datos de la inducción del metabolismo de los capsaicinoides, donde este elicitador estimuló en mayor medida la acumulación de estos alcaloides.

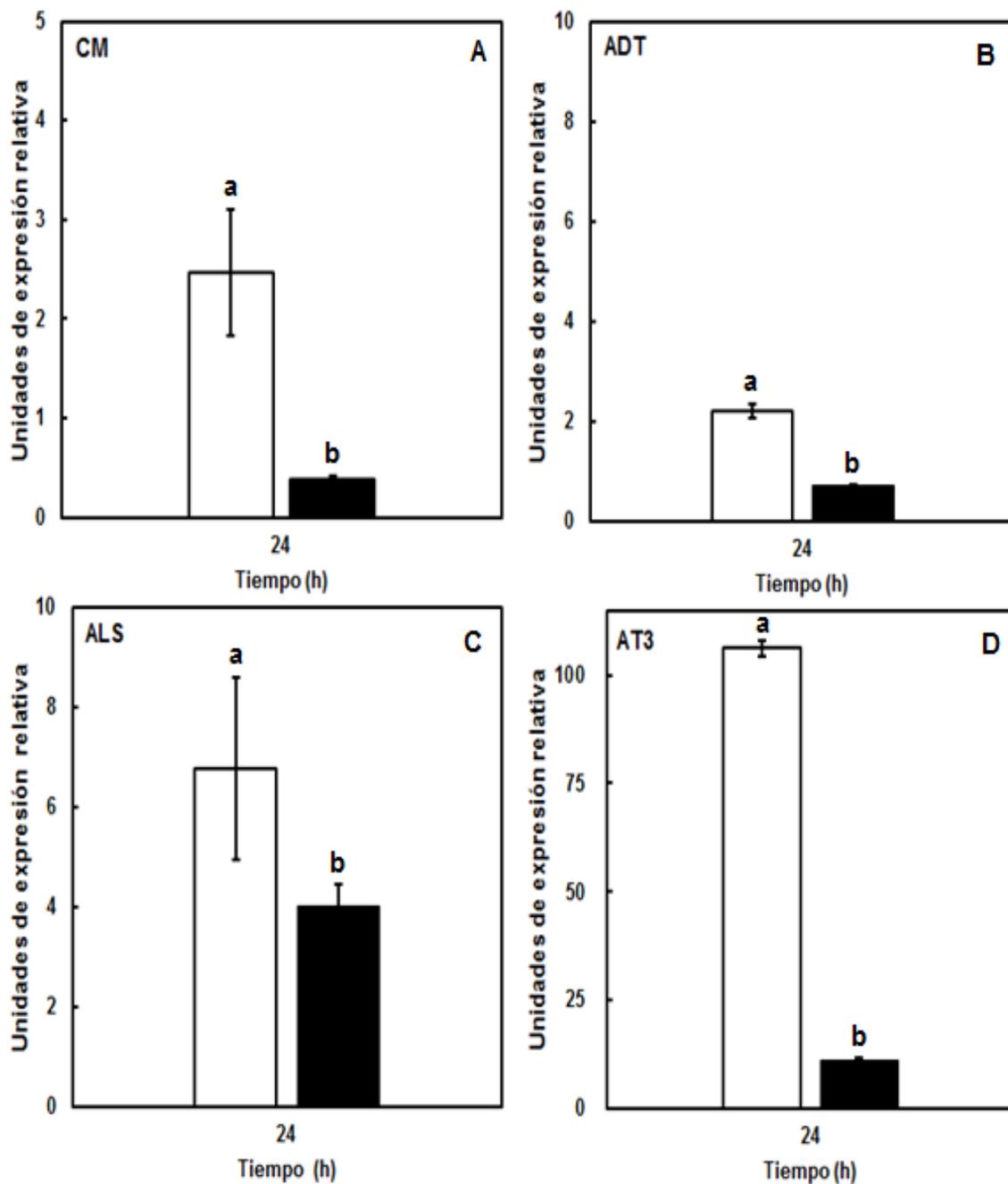


Figura 3.4 Efecto del AS (barras blancas) o MeJa (barras negras) sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis de Phe (A y B), Val (C) y capsaicinoides (D) en un sistema *in vitro* de placentas. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de inducción con respecto al testigo con una probabilidad de 95%.

Aunque los dos inductores revelaron una expresión coordinada entre los genes encargados de la síntesis de los precursores y el gen *AT3* cuando se incrementó la acumulación de los capsaicinoides, el efecto del AS sobre la expresión génica fue mayor en todos los casos. El AS aumentó 106 veces la expresión de *AT3*, mientras que con el MeJa sólo fue de 11 veces. No obstante, el efecto del AS sobre los genes de la síntesis de los dos aminoácidos precursores no fue tan dramático, quizás debido a que la regulación de la síntesis de estos aminoácidos se da principalmente por alosterismo (Panozzo *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2010).

Es interesante notar que los tratamientos de inducción aumentaron aproximadamente 7 y 4 veces la expresión de *ALS*, comparado con las 2 y 0.7 veces que aumentó la expresión de *ADT* con el AS y el MeJa, respectivamente. Esto podría indicar que la producción de capsaicinoides depende más de la síntesis de valina, que de la de fenilalanina en la placenta.

Al comparar lo que sucede en la placenta durante el desarrollo del fruto y la inducción de la acumulación de capsaicinoides *in vitro*, se pueden observar patrones de regulación metabólica que concuerdan con la literatura publicada. En el caso de la vainillilamina, hay una disminución de este metabolito de 25 a 40 DPA, así como en el sistema *in vitro* después de 24 h (Figuras 2.1 y 2.2), lo que podría apuntar a que esta disminución sea el reflejo del aumento en la demanda de intermediarios para la síntesis de los capsaicinoides. Sin embargo, cuando se aplican los tratamientos de inducción, el AS es el único que provoca un aumento en la concentración de vainillina (Figura 2.2 C). Esto se relaciona de manera directa con el hecho de que este inductor propició una mayor producción de capsaicinoides en el sistema (Figura 2.2 A).

Se ha señalado que el AS induce la actividad de PAL y por ende, la síntesis de vainillina, a través de la ruta de señalización fosfolipídica en *Capsicum chinense* (Rodas-Junco *et al.*, 2013). La producción de vainillilamina varía en función de la concentración del inductor utilizado, como demostró Altúzar-Molina *et al.* (2011), cuando al usar una concentración de AS por arriba de 100 μM , se acumuló mayor cantidad de vainillina. En contraste, MeJa puede actuar como inductor a una concentración de ~ 25 μM , pero inhibir su producción con una dosis por arriba de 50 μM . Adicionalmente, se ha demostrado que ambos

inductores modifican diferencialmente las actividades de las enzimas fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD), en una respuesta dosis dependiente (Altúzar-Molina *et al.*, 2011).

La adición de AS o MeJa aumentan la acumulación de capsaicinoides en *Capsicum frutescens*, pero sólo el AS aumentó la actividad de la CS (Sudha y Ravishankar, 2003). Esto ha llevado a plantear la hipótesis de que MeJa podría disminuir el catabolismo de los capsaicinoides, dando como resultado un aumento en su concentración.

Por otro lado, al evaluar el efecto del estrés hídrico en plantas de *Capsicum chinense*, Ruiz-Lau *et al.* (2011) encontraron que los contenidos de capsaicina y dihidrocapsaicina se incrementaron en los frutos de las plantas estresadas. Sorprendentemente, se observó una disminución de la actividad de la CS en estas plantas, y este efecto dependió de la severidad del estrés y de la edad del fruto. En 2014, Zamudio-Moreno y colaboradores demostraron que la actividad de las peroxidasas disminuye en el tejido placentario de los frutos de plantas sometidas a estrés hídrico. Esto demuestra que la concentración de capsaicinoides puede incrementarse, aún cuando la síntesis se vea disminuída, por un decremento en su catabolismo.

En resumen, los resultados presentados revelaron una expresión coordinada del gen *AT3* con los genes involucrados con la síntesis de Phe y Val durante la acumulación de los capsaicinoides. Así mismo, sugieren que la menor inducción de la acumulación de estos compuestos a través de MeJa se dé como resultado de una disminución del catabolismo de estos alcaloides, o provocando la modificación de su síntesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Altúzar-Molina A.R., J.A. Muñoz-Sánchez, F. Vázquez-Flota, M. Monforte-González, G. Racagni-DiPalma y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2011). Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* Jacq. cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 151-158.
- 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.
- Baas-Espinola, F.M. (2011). Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio bajo condiciones de inducción y diferentes contenidos de nitrógeno en placentas inmovilizadas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 83 p.
- Gutiérrez-Carbajal, M.G., M. Monforte-González, M.L. Miranda-Ham, G. Godoy-Hernández y F. Vázquez-Flota (2010). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*, 54, 430-434.
- Kim, J.S., M. Park, D. Ju y K. Nyung-Dong (2009). Characterization of putative capsaicin synthase promoter activity. *Molecules and Cells*, 28, 331-339.
- 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 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Maeda, H., A.K. Shasany, J. Schnepp, I. Orlova, G. Taguchi, B.R. Cooper, D. Rhodes, E. Pichersky y N. Dudareva (2010). RNAi suppression of arogenate dehydratase 1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate

- pathway in petunia petals. *Plant Cell*, 22, 832-849.
- 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.
- Panozzo, S., L. Scarabel, P.J. Tranel y M. Sattin (2013). Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105, 93-101.
- Rodas-Junco, B.A., Y. Cab-Guillén, J.A. Muñoz-Sánchez, F. Vázquez-Flota, M. Monforte-González y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2013). Salicylic acid induces vanillin synthesis through the phospholipid signaling pathway in *Capsicum chinense* cell cultures. *Plant Signaling and Behavior*, 8, 1-8.
- 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.
- Ruiz-Lau, N., F. Medina-Lara, Y. Minero-García, E. Zamudio-Moreno, A. Guzmán-Antonio, I. Echevarría-Machado y M. Martínez-Estévez (2011). Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience*, 46, 487-492.
- Sudha, G. y G.A. Ravishankar (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Current Science*, 85, 1212-1217.
- Zamudio-Moreno, E., I. Echevarría-Machado, F. Medina-Lara, G. Calva-Calva, M.L. Miranda-Ham y M. Martínez-Estévez (2014). Role of peroxidases in capsaicinoids

degradation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) plants grown under water deficit conditions. Australian Journal of Crop Science, 8, 448-454.

CAPÍTULO IV

LA SÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES REQUIERE DE LA FORMACIÓN *in situ* DE VALINA Y FENILALANINA EN EL SISTEMA *in vitro* DE PLACENTAS

4.1 ANTECEDENTES

Los capsaicinoides son el principio picante de los chiles, que se producen y se acumulan exclusivamente en las placentas de los cultivares picantes de *Capsicum*. La capacidad de sintetizar capsaicinoides está relacionada con la presencia de al menos un alelo *ACT* funcional en el locus *Pun1* (Stewart *et al.*, 2005). Los chiles no picantes llevan un alelo no funcional, que carece de una región de 2.5 Kb en el extremo 5' de la secuencia, que abarca parte del promotor y 735 nucleótidos del marco de lectura abierto (Stewart *et al.*, 2007). Aunque el componente cualitativo del picor está controlado por *Pun1* (anteriormente conocido como *C*; Stewart *et al.*, 2005; 2007), se desconoce la base bioquímica para el componente cuantitativo de este carácter. Se sabe que la cantidad de capsaicinoides producidos en los diferentes cultivares varía ampliamente (González-Zamora *et al.*, 2013), e incluso entre líneas altamente isogénicas surgen variaciones importantes, dependiendo de las condiciones ambientales y la posición del fruto en el tallo (Gurung *et al.*, 2011). Esto sugiere que la expresión de la maquinaria biosintética puede ser modulada por factores externos.

Al ser un metabolito nitrogenado, la disponibilidad de nitrógeno afecta la acumulación de los capsaicinoides en los chiles (Johnson y Decoteau, 1996). Además, estos efectos están relacionados con la disponibilidad de nitrógeno en la placenta, el tejido responsable de su biosíntesis (Monforte-González *et al.*, 2010). Recientemente, se demostró que en un sistema *in vitro* de placentas, la inducción de la acumulación de capsaicinoides, mediante la inducción con AS y MeJa, requiere la asimilación primaria de nitrógeno, a través de la activación del ciclo de GS-GOGAT (Ancona-Escalante *et al.*, 2013).

Con el fin de definir la participación del tejido placentario en la formación *in situ* de los aminoácidos precursores para la biosíntesis de los capsaicinoides, en este trabajo se analizó la funcionalidad de las vías de síntesis de Val y Phe, mediante el uso de

inhibidores enzimáticos específicos. Estos aminoácidos son los precursores de la cadena acil graso y del núcleo aromático de los capsaicinoides, respectivamente. El corismato es el intermediario central para la síntesis de los tres aminoácidos aromáticos: Trp, Tyr y Phe. Una rama conduce a la formación de Trp a través de la participación de la antranilato sintasa. Una segunda rama, con la participación de la corismato mutasa, produce pterinato, arogenato y después, Tyr o Phe. El paso final para la síntesis de Tyr es catalizada por la arogenato deshidrogenasa, mientras que para Phe, es la arogenato deshidratasa (Maeda *et al.*, 2010). Por otro lado, para la síntesis de Val, Leu e Ile, un bloque de cuatro enzimas es compartido por los primeros pasos (Singh y Shaner, 1995): acetolactato sintasa, cetoácido reductoisomerasa, deshidroxiácido deshidratasa y una aminotransferasa de los ácidos grasos de cadena ramificada.

Existe evidencia que señala que la adición de Phe y Val puede aumentar la síntesis de los capsaicinoides en cultivos de células no diferenciadas (Prasad *et al.*, 2006; Salgado Garciglia y Ochoa-Alejo 1990).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron plantas de chile habanero de una variedad con frutos naranja, provenientes de los invernaderos del CICY. Se midió la actividad enzimática de la ALS, la ADT y el contenido de Phe, Val y capsaicinoides en placentas provenientes de chiles de 25 DPA sometidas a los tratamientos de inhibición con p-fluorofenilalanina (p-FF; análogo de la fenilalanina) y clorsulfurón (CIn; inhibidor específico de la acetolactato sintasa).

4.2.1.1 DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Ver la sección 3.2.1.1 del Capítulo III.

4.2.2 MÉTODOS

4.2.2.1 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON p-FF Y CLN

Se aisló el tejido placentario de chiles previamente desinfestados, se les retiraron las semillas y se colocaron en cajas Petri sobre una toalla de papel húmeda para evitar su deshidratación. Se depositaron ~3 g de placenta en matraces con 40 mL de medio MS. Inmediatamente, se aplicaron los tratamientos con p-FF (250 y 500 μM ; 24 y 72 h) y Cln (30-120 nM; 12 y 18 h), y luego, los matraces fueron trasladados a un cuarto de cultivo, en donde permanecieron hasta el muestreo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz continua ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 70% de humedad relativa y agitación orbital constante de 80 rpm. Se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar el tiempo y la concentración en que cada inhibidor ejerce su efecto sobre la síntesis de los dos aminoácidos. Se colectaron las muestras a los tiempos determinados, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. El tejido testigo estuvo sujeto a las mismas manipulaciones, salvo que no fue expuesto a los diferentes tratamientos. Estos tejidos se utilizaron para determinar las actividades de las enzimas ADT y ALS, así como los contenidos de Phe, Val y capsaicinoides.

La solución madre de Cln se preparó a una concentración de 500 mg/L en tetrahidrofurano. Se tomaron alícuotas y se secaron con nitrógeno. Posteriormente, el Cln se disolvió en 5 mM K_2HPO_4 (pH 7.5), se diluyó en amortiguador de fosfatos y se esterilizó por filtración. Se prepararon 25 mL de una solución acuosa 20 mM p-FF, de la que se usaron alícuotas para obtener concentraciones finales de 250 y 500 μM en los matraces bajo este tratamiento.

4.2.2.2 EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ALS

Se utilizó el método reportado por Ray (1984). Las placentas se homogeneizaron con 2.5 volúmenes de amortiguador de extracción [100 mM K_2HPO_4 pH 7.5, 0.5 mM MgCl_2 , 10% (v/v) glicerol y 5% (p/v) PVPP]. El homogeneizado se filtró a través de gasa y se centrifugó a $27,000 \times g$ durante 30 min. El ensayo de la acetolactato sintasa se llevó a cabo en un volumen final de 0.5 mL a 37°C . La mezcla de reacción final contenía 20 mM K_2HPO_4 pH 7.0, 20 mM piruvato de sodio, 0.5 mM tiamina pirofosfato, 0.5 mM MgCl_2 y 10

$\mu\text{M FAD}^+$. El ensayo se inició al añadir el extracto proteico y se detuvo con 10 μL de 6 N H_2SO_4 . La mezcla de reacción acidificada se calentó durante 10 min a 60°C , y después, se le adicionó 0.5 mL de 0.5% (p/v) creatina. A continuación, se añadió 0.5 mL de 5% (p/v) α -naftol, recién preparado en 2.5 N NaOH, y se incubó a 60°C durante 10 min. La absorbancia se midió a 525 nm. Para elaborar la curva estándar, se preparó primero una solución madre de acetoína (20 mM), la cual se fraccionó en alícuotas de 600 μL , que se almacenaron a -20°C . El estándar se diluyó 100 veces. Con el estándar diluido, se realizó una curva estándar con un rango entre 0-100 nM.

4.2.2.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADT

Medir la actividad de esta enzima implicó purificar el sustrato (arogenato), que no está disponible comercialmente. Para ello, se partió de una reacción enzimática que lleva a la purificación parcial de la pefenato aminotransferasa (PAT; EC 2.6.1.78), por medio del método descrito por Rippert y Matringe (2002) con algunas modificaciones (Ancona-Escalante, 2013). Se molieron 10 g de hojas de chile habanero con nitrógeno líquido, se agregó el amortiguador de extracción [50 mM fosfatos pH 7.5, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 1 mM benzamida-HCl, 5 mM ácido aminocaproico, 2 mM PMSF, 0.1 mM piridoxal 5-fosfato, 20% (v/v) glicerol y 1% (p/v) PVPP] en una proporción 1:1. Esta mezcla se homogenizó con un politrón a 24,000 rpm durante 2 min, y luego, se centrifugó a 20,000 $\times g$ durante 30 min. El sobrenadante se sometió a un fraccionamiento con sulfato de amonio (45 a 75%) y se centrifugó a 30,000 $\times g$ durante 20 min. La pastilla se resuspendió en 10 mL del amortiguador de extracción, se calentó en baño María 10 min a 65°C e inmediatamente, se colocó en un baño de hielo durante 1 h. Se centrifugó a 30,000 $\times g$ durante 25 min y el sobrenadante se desaló a través de una columna de Sephadex G25, previamente equilibrada con amortiguador de extracción. Se colectaron fracciones de 1 mL, en las que se determinó la actividad de PAT mediante una reacción acoplada con la enzima malato deshidrogenasa. La mezcla de reacción se preparó con 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 300 μM pefenato, 3.5 mM aspartato, 1 mM NADH, 0.1 U enzima málica y 50 μL del extracto parcialmente purificado. La reacción se incubó durante 2 min a 30°C y se monitoreó el cambio de absorbancia del NADH a 340 nm. Cuando ya no hubo cambios en la absorbancia (~ 5 min), se dió por terminada la reacción. Posteriormente, la mezcla de reacción se pasó a través de una columna Sephadex G25, equilibrada con 50 mM

bicarbonato de amonio. Las alícuotas se colectaron y se liofilizaron para la posterior purificación del arogenato.

Para la purificación del arogenato, se utilizó el protocolo reportado por Connelly y Siehl (1987). Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 500 μ L de amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.2 y se filtraron a través de una columna Sep Pak C18. Las muestras colectadas se inyectaron al HPLC con una columna Partisil ODS-3 (9.5 x 500 mm). El flujo fue de 3 mL/min, la fase móvil: 5 mM amortiguador de fosfatos, pH 7.2. Las fracciones que contuvieron los picos de interés se juntaron y liofilizaron.

Del material liofilizado, se pesaron 4 mg y se resuspendieron en 500 μ L de una mezcla de 20 mM amortiguador de fosfatos, pH 7.2 y metanol. Esta solución se filtró (filtros Millipore 0.45 μ m) y analizó por HPLC, en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm). La fase móvil fue la mezcla amortiguador de fosfatos-metanol, en una proporción 9:1, con un flujo de 1 mL/min.

Para medir la actividad de la arogenato deshidratasa (ADT), se molió el tejido placentario y se homogeneizó con un politrón durante 2 min con el amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM β -mercaptoetanol y 5% (p/v) PVPP) en una proporción 1:2 (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 20,400 $\times g$ durante 30 min. Todas las manipulaciones se hicieron a 4°C. El sobrenadante (extracto proteico total) se utilizó para las determinaciones enzimáticas, siguiendo el protocolo (Fisher y Jensen, 1987), en donde se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Componentes

| | | | |
|-------------------|------|---------|--------|
| Tris-HCl | 50 | mM | pH 7.5 |
| Arogenato | 2.5 | mM | |
| Tirosina | 0.25 | mM | |
| Leupeptina | 1 | μ M | |
| Pepstatina | 1 | μ M | |
| Extracto (enzima) | | | |

En un tubo de ensayo, se colocaron los volúmenes apropiados de los componentes de la mezcla para tener un volumen total de reacción de 200 μ L. Se incubó 1 min a 32°C. Se le

adicionó el estándar interno (0.833 mM glicina) y 100 μ L OPA (54 mg de OPA en 1 mL de etanol, 9 mL 0.4 M borato de sodio, pH 9.4 y 200 μ L mercaptoetanol). Se mantuvo a temperatura ambiente durante 90 seg y se inyectó al HPLC, acoplado a un detector de fluorescencia. La fase móvil fue agua-metanol (2:3; v/v) y el flujo de 1 mL/min. El tiempo de corrida fue de 6 min. Se detectaron los metabolitos a una longitud de 360 nm (excitación) y 455 nm (emisión). La curva estándar de Phe se realizó en un rango de 0 - 100 nmol. La actividad se expresó como nmol de Phe por min por mg de proteína.

4.2.2.4 MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD POR EL MÉTODO DEL AZUL DE EVANS

Se usó el método de Castro-Concha *et al.* (2012), que se describe a continuación:

A un gramo de tejido vegetal se le agregaron 6 mL de agua y 250 μ L de 0.1% (p/v) azul de Evans. Se mantuvo en reposo con el colorante por 45 min a 25°C. Posteriormente, se lavaron las placentas con agua destilada, hasta eliminar el exceso del colorante. El tejido se colocó en 5 mL de metanol al 50% con SDS al 1%, y se incubó en baño María (65°C) durante 30 min. Se repitió la extracción dos veces más con el mismo volumen de disolvente, y finalmente, los extractos recuperados, se colectaron en un tubo y se llevaron a un volumen final de 20 mL. Se leyó la absorbancia a 600 nm. Se realizó un testigo negativo con placentas muertas (viabilidad cero). Para llegar a la viabilidad cero, el tejido se mantuvo en ebullición durante 1.5 h, previo a la adición del colorante.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron como se describe en la sección 2.3.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 BIOSÍNTESIS DE VALINA Y FENILALANINA EN DIFERENTES TEJIDOS DE *C. chinense*

Para evaluar si la síntesis de capsaicinoides depende de la Val y la Phe que se sintetizan en la placenta, primero se determinaron las actividades de la ADT y la ALS en hojas y tejidos de frutos de *Capsicum chinense* (Figura 4.1). La actividad específica de la ADT fue similar en hoja y placenta (Figura 4.1 A; ~ 4 nmol Phe min^{-1} mg^{-1} proteína); sin embargo, en placenta fue inferior en comparación con el pericarpio (3.8 vs 6.2 nmol Phe min^{-1} mg^{-1} proteína). La capacidad de síntesis de Phe es mayor en tejidos fotosintéticos (Lancien *et al.*, 2007).

Por otro lado, la actividad de la ALS fue cuatro veces mayor en los tejidos del fruto (Figura 4.1 B; 6 nmol acetoina min^{-1} mg^{-1} proteína), en comparación con la de hoja (1.3 nmol acetoina min^{-1} mg^{-1} proteína). La expresión de los genes que codifican a esta enzima está regulada en diferentes órganos, de acuerdo con las necesidades específicas de un tejido en particular, como la producción de un metabolito secundario (Singh y Shaner, 1995). Por ejemplo, los niveles de ARNm de la TD son 50 y 500 veces más altos en los sépalos y el resto de las flores, respectivamente, comparados con la expresión encontrada en raíces y hojas de tomate (Samach *et al.*, 1991).

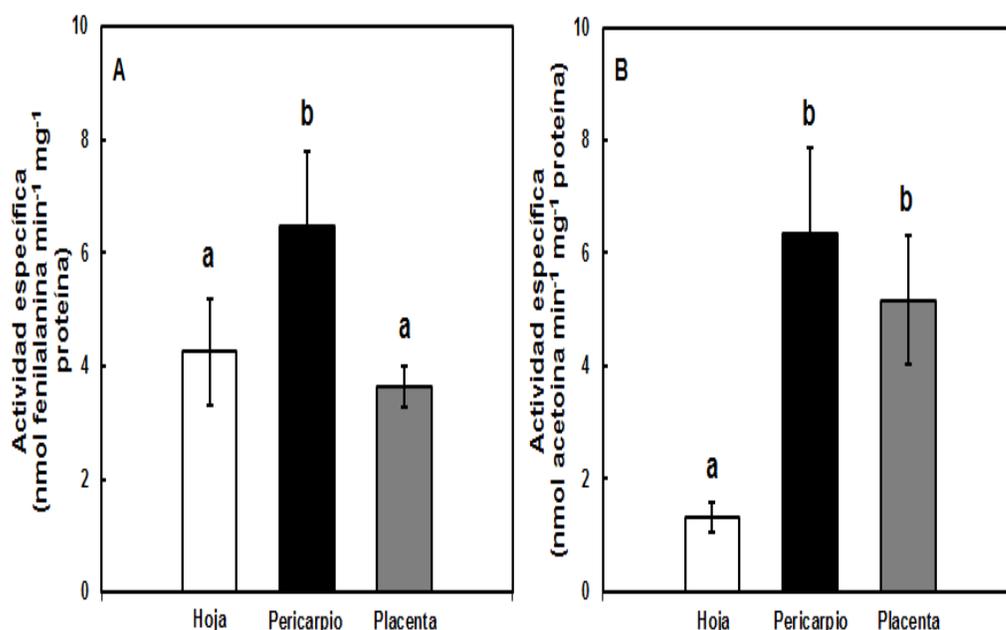


Figura 4.1 Actividades específicas de la ADT (A) y la ALS (B) en tejidos de *C. chinense* Jacq. Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

La actividad específica reportada para la ADT es de 1.46 y 5.17 nmol Phe min⁻¹ mg⁻¹ proteína en flores de petunia (Maeda *et al.*, 2010) y hojas de *Arabidopsis* (Cho *et al.*, 2007), respectivamente. Con respecto a la ALS, se reportó una actividad de 2.01 nmol acetoina min⁻¹ mg⁻¹ proteína en hojas jóvenes de plántulas de *Pisum sativum* (Ray, 1984). Por lo tanto, la actividad específica de ambas enzimas medidas en hojas de *Capsicum chinense* se encuentra en el rango de actividades reportadas previamente.

Es importante señalar que la síntesis de los capsaicinoides ocurre solamente en la placenta, que se encuentra en la cavidad central de los chiles, por lo que la capacidad de síntesis de Val y Phe en los tejidos del fruto puede estar en función de las necesidades fisiológicas que implica su especialización metabólica.

Este trabajo constituye el primer reporte en el que se documenta la actividad de estas enzimas en los tejidos de chile habanero, y establece a nivel de actividad enzimática una concordancia con los cambios observados en la expresión de los genes de la CM, la ADT y la ALS en placentas de *C. annum* (Mazourek *et al.*, 2009).

4.4.2 INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE VALINA O FENILALANINA EN PLACENTAS TRATADAS CON CLN O p-FF

Una vez que se demostró la funcionalidad de las enzimas de síntesis de Val y Phe en el tejido placentario, se realizaron los experimentos de inhibición en el sistema *in vitro* de placentas. Para realizar las curvas dosis-respuesta, se usó Cln, inhibidor de la ALS (Ray, 1984), inicialmente en un rango de 30 a 90 nM. La concentración del inhibidor se eligió con base en las dosis medias de inhibición (I_{50}) reportadas, cuyos valores oscilan entre 18 y 37 nM (Eberlein *et al.*, 1997). Para la inhibición de la ADT, se utilizaron las concentraciones de 250 y 500 μ M de p-FF (Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992). El grado máximo de inhibición de la ALS en tejido placentario fue de ~ 84% con una dosis de 90 nM a las 12 h (Figura 4.2 A). Para corroborar que se alcanzó el grado máximo de inhibición, se aumentó la dosis hasta 120 nM y el tiempo de exposición a 18 h (Figura 4.2 B), pero no hubo un incremento en la inhibición. En chícharo, se alcanzó un máximo de inhibición de la ALS de ~80% con una concentración 84 nM de Cln (Ray, 1984).

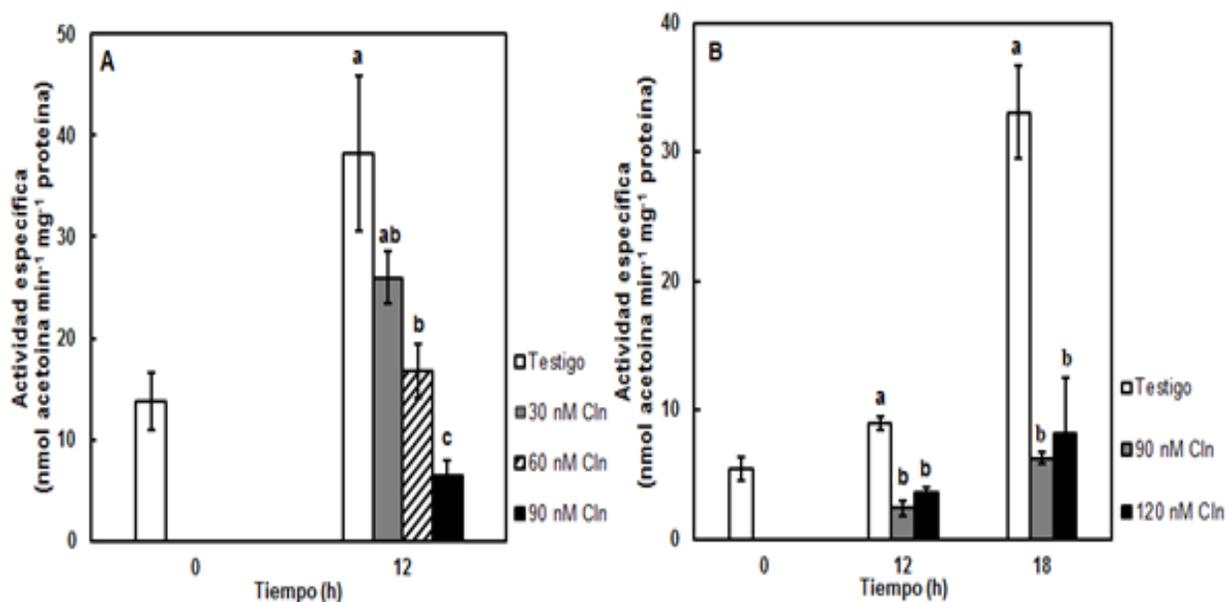


Figura 4.2 Inhibición de la actividad de la ALS con Cln en placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA. A) 0-90 nM de Cln, 12 h y B) 90-120 nM, 18 h. Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto a los testigos a las 12 o 18 horas, respectivamente, con una probabilidad de 95%.

Con p-FF se obtuvo una inhibición de ~16% y 70% en la actividad de la ADT con las dosis de 250 y 500 μM , respectivamente, a las 24 h (Figura 4.3). El grado máximo de inhibición de esta enzima (86%) se alcanza con ambas dosis (250 o 500 μM) a las 72 h de exposición.

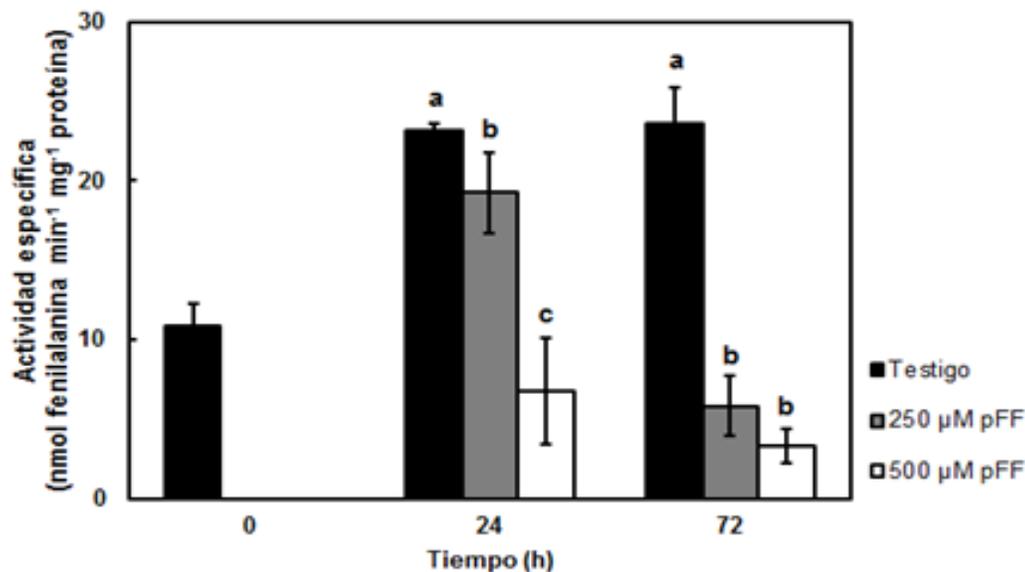


Figura 4.3 Inhibición de la actividad de la ADT con p-FF en placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA. Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto a los testigos a las 24 o 72 horas, respectivamente, con una probabilidad de 95%.

Es importante señalar que que las actividades determinadas de la ALS y la ADT fueron mayores en las placentas en el sistema *in vitro* en comparación con las halladas en placentas provenientes de frutos frescos (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3). Aunque hasta ahora se desconoce si el nitrato o el amonio tienen un efecto directo sobre estas actividades enzimáticas, se sabe que en plántulas de tabaco sometidas a déficit de nitrato, la concentración de fenilalanina o valina disminuyen aproximadamente 15 o 4 veces, respectivamente (Fritz *et al.*, 2006). Sin embargo, tanto el nitrato como el amonio activan el metabolismo central del nitrógeno. En raíces y hojas de plántulas de *Zea mays*, la actividad de la GOGAT-NADH se incrementó en respuesta al suministro de nitrato o amonio bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Singh y Srivastava, 1986). Así mismo, la adición de nitrato a plántulas de girasol indujo la actividad de la NR, la NiR y la GS

(Cabello *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el nitrato, el glutamato y las citocininas pueden ser las señales sistémicas que comuniquen el estatus de nitrógeno, y así se coordine la síntesis de otros compuestos nitrogenados en la planta (Álvarez *et al.*, 2012). Por lo tanto, dado que la cantidad total de nitrógeno en el medio MS es 60 mM (20 mM de amonio y 40 mM de nitrato), los datos mencionados podrían sugerir una activación de la asimilación del nitrógeno en el tejido placentario, propiciado por el nitrógeno del sistema *in vitro* (Ancona-Escalante *et al.*, 2013).

Es posible que la discrepancia en las actividades de la ALS y la ADT entre las placentas del sistema *in vitro* y aquellas extraídas de los frutos se deban a la etapa metabólica en que se encontraban éstos últimos, justo al inicio de la fase de acumulación de los capsaicinoides.

Para demostrar que el CIn y el p-FF actúan sobre su blanco y que los tratamientos no afectan la actividad de otras enzimas, es decir actúan específicamente, se midieron las actividades de la ALS, la ADT y la glutamato deshidrogenasa (GDH-NADH) en presencia de ambos inhibidores, agregándolos directamente durante el ensayo enzimático (Figura 4.4). Como se observa, cada inhibidor actúa sólo sobre su enzima blanco y no afectó la actividad de la otra (Figura 4.4 A y B). En el caso de la GDH-NADH, que es clave en el metabolismo central del nitrógeno, no se detectó ninguna afectación sobre su actividad catalítica al añadirse los inhibidores en la mezcla de reacción (Figura 4.4 C).

4.4.3 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ALS O LA ADT SOBRE LOS NIVELES DE NITRATO Y AMINOÁCIDOS SOLUBLES TOTALES

La inhibición de la síntesis de Val no tiene efecto sobre la cantidad de nitrato en la placenta a las 12 h (Figura 4.5 A); sin embargo, la inhibición de la síntesis de Phe propicia una acumulación discreta de nitrato (Figura 4.5 B). En el testigo, entre las 0 y 12 h se observó un descenso en el contenido de aminoácidos (Figura 4.5 C); sin embargo, cuando las placentas reciben el tratamiento con CIn, éste se mantiene a niveles similares al testigo al inicio del experimento. La inhibición de la síntesis de Phe no produjo algún cambio en la poza de aminoácidos (Figura 4.5 D).

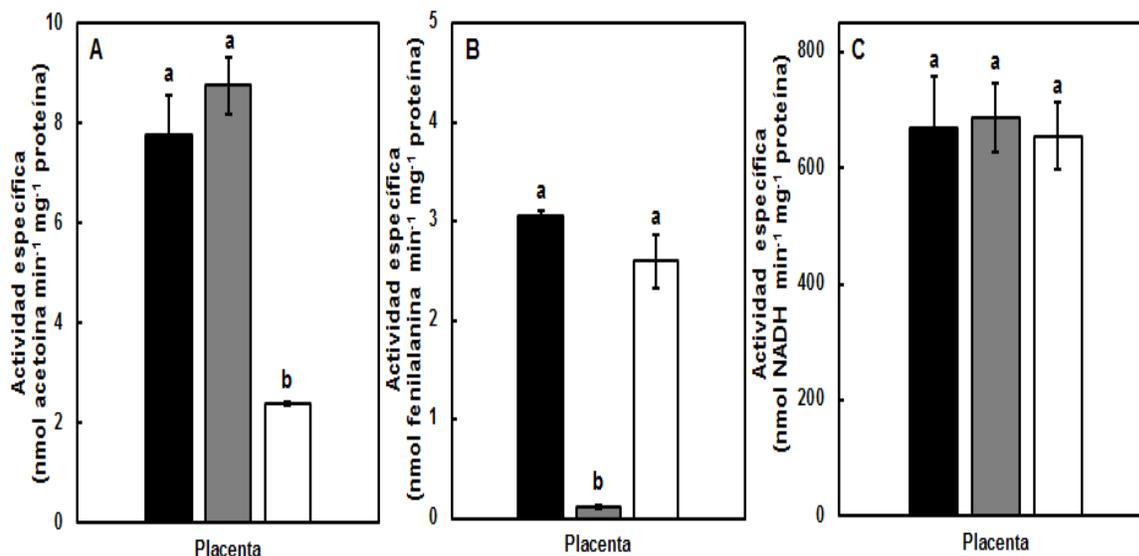


Figura 4.4 Inhibición de las actividades de la ALS, la ADT y la GDH-NADH en extractos de placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA. Testigo, barras negras; p-FF, barras grises; CIn, barras blancas. Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

4.4.4 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ALS O LA ADT SOBRE EL CONTENIDO DE VALINA Y FENILALANINA

La inhibición de la ALS provocó una disminución en el contenido de valina (Figura 4.6 A) e incluso en el de Phe en el tejido placentario (Figura 4.6 C). En contraste, la inhibición de la ADT disminuyó la cantidad de fenilalanina (Figura 4.6 D), pero no tuvo algún efecto sobre la concentración de valina (Figura 4.6 B).

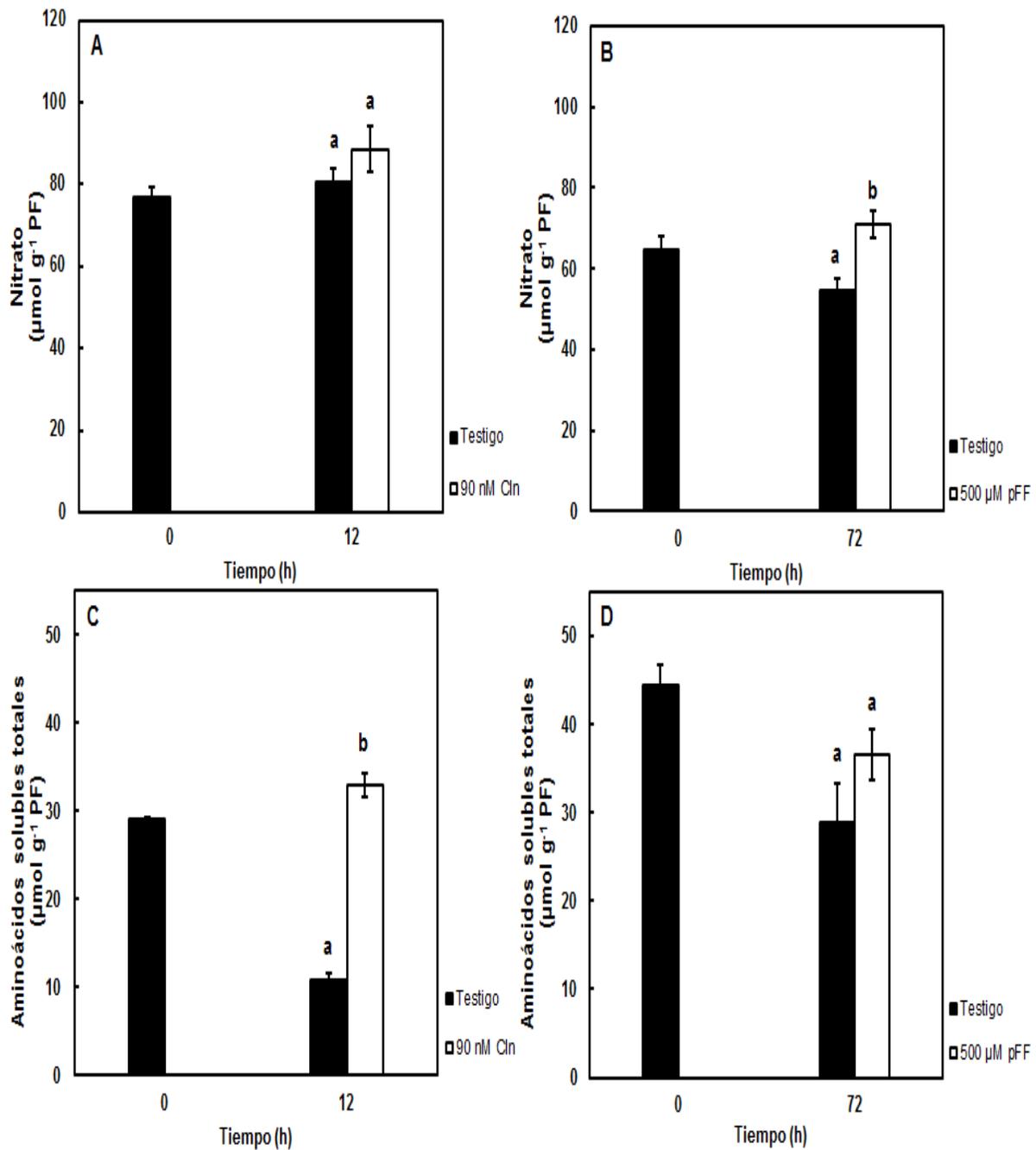


Figura 4.5 Contenido de nitrato y aminoácidos solubles totales en placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA sometidas a inhibición de la síntesis de Val (A y C) y Phe (B y D). Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto a los testigos a las 12 o 72 horas, respectivamente, con una probabilidad de 95%.

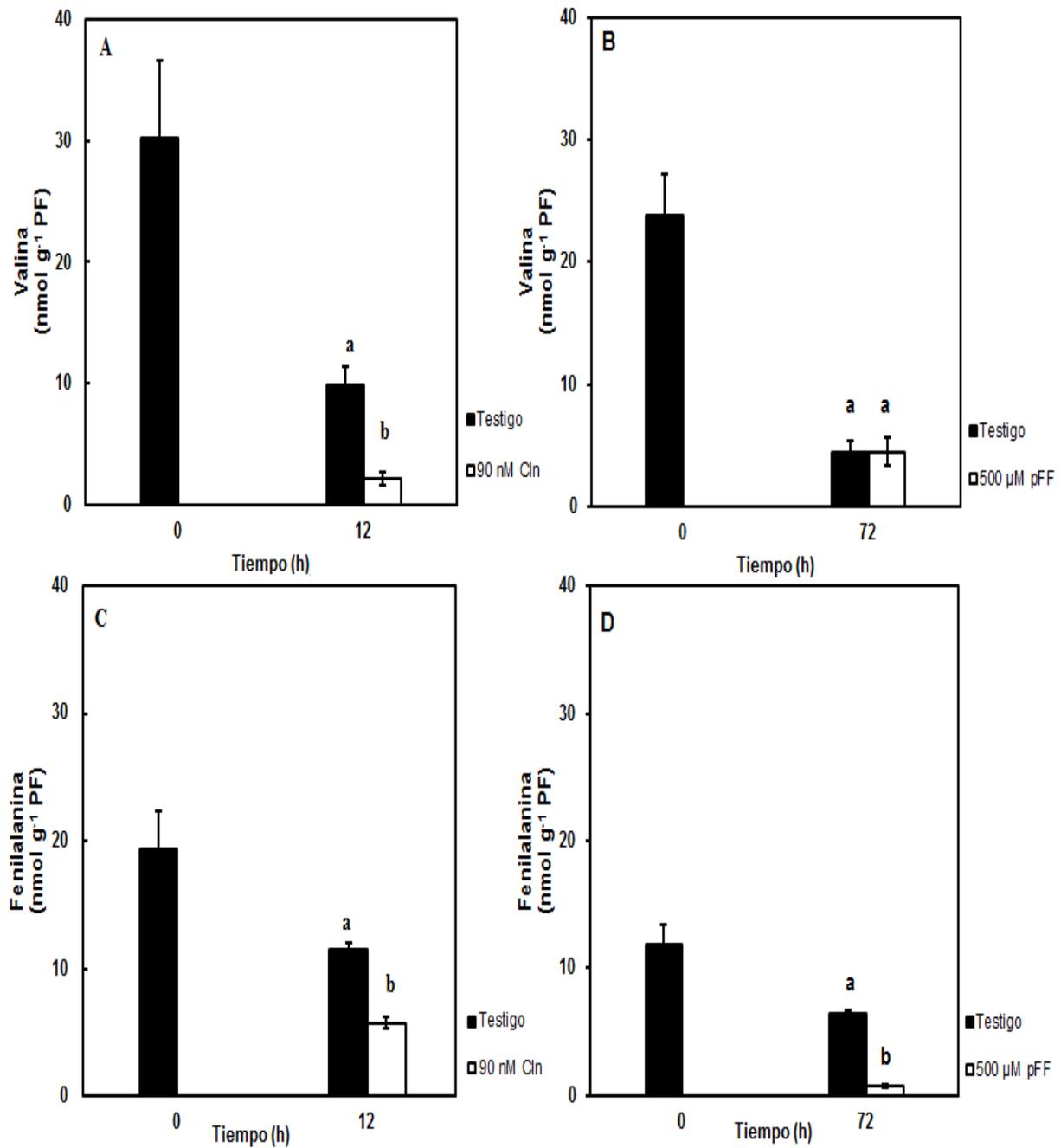


Figura 4.6 Contenido de Val y Phe en placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA sometidas a inhibición de la síntesis de Val (A y B) y Phe (C y D). Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto a los testigos a las 12 o 72 horas, respectivamente, con una probabilidad de 95%.

4.4.5 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE VALINA O FENILALANINA SOBRE EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES

Se evaluó el efecto de la inhibición de la síntesis de Val y Phe sobre la capacidad de acumulación de capsaicoides en el sistema *in vitro* de placentas (Figura 4.7). El contenido de capsaicoides (sumatoria de capsaicina y dihidrocapsaicina, tanto del tejido como del liberado al medio de cultivo) cuando se inhibió la síntesis de Val (con 120 nM de Cln; 18 h) fue 50% inferior al del testigo (Figura 4.7 A). Sin embargo, la inhibición de la síntesis de Phe, con 500 μ M de p-FF durante 72 h, sólo provoca una disminución de ~37% en el contenido de capsaicoides (Figura 4.7 B).

La inhibición de la síntesis de Val no afectó la acumulación de vainillina sino hasta las 12 h (0.42 μ mol g⁻¹ PF); sin embargo, 6 h después, la cantidad de este metabolito aumenta alrededor del 40% en el testigo, no así en las placentas tratadas con Cln (0.47 μ mol g⁻¹ PF; Figura 4.7 C). Por otro lado, cuando se inhibió la síntesis de Phe (Figura 4.7 D), a las 24 h hay una disminución de ~50% en el contenido de vainillina (1.32 μ mol g⁻¹ PF en el testigo comparado con 0.708 μ mol g⁻¹ PF en los tratamientos), que se mantiene hasta las 72 h de tratamiento con p-FF. El hecho de que la inhibición de la síntesis de Val también afecte la acumulación de vainillina va en línea con que la inhibición de la síntesis de este aminoácido también afecta el contenido de Phe.

Ancona-Escalante (2013) demostró que una dosis 500 μ M pFF durante 72 h no afectaba significativamente la viabilidad de las placentas en el sistema *in vitro*. Por lo que para demostrar que la disminución en el contenido de capsaicoides no se debió a la pérdida de viabilidad de las placentas por los tratamientos con los inhibidores, se midió este parámetro mediante el uso del azul de Evans. En la figura 4.8 se observa que el tejido placentario conserva su viabilidad cuando fue sometido a los tratamientos de inhibición enzimática con Cln o p-FF.

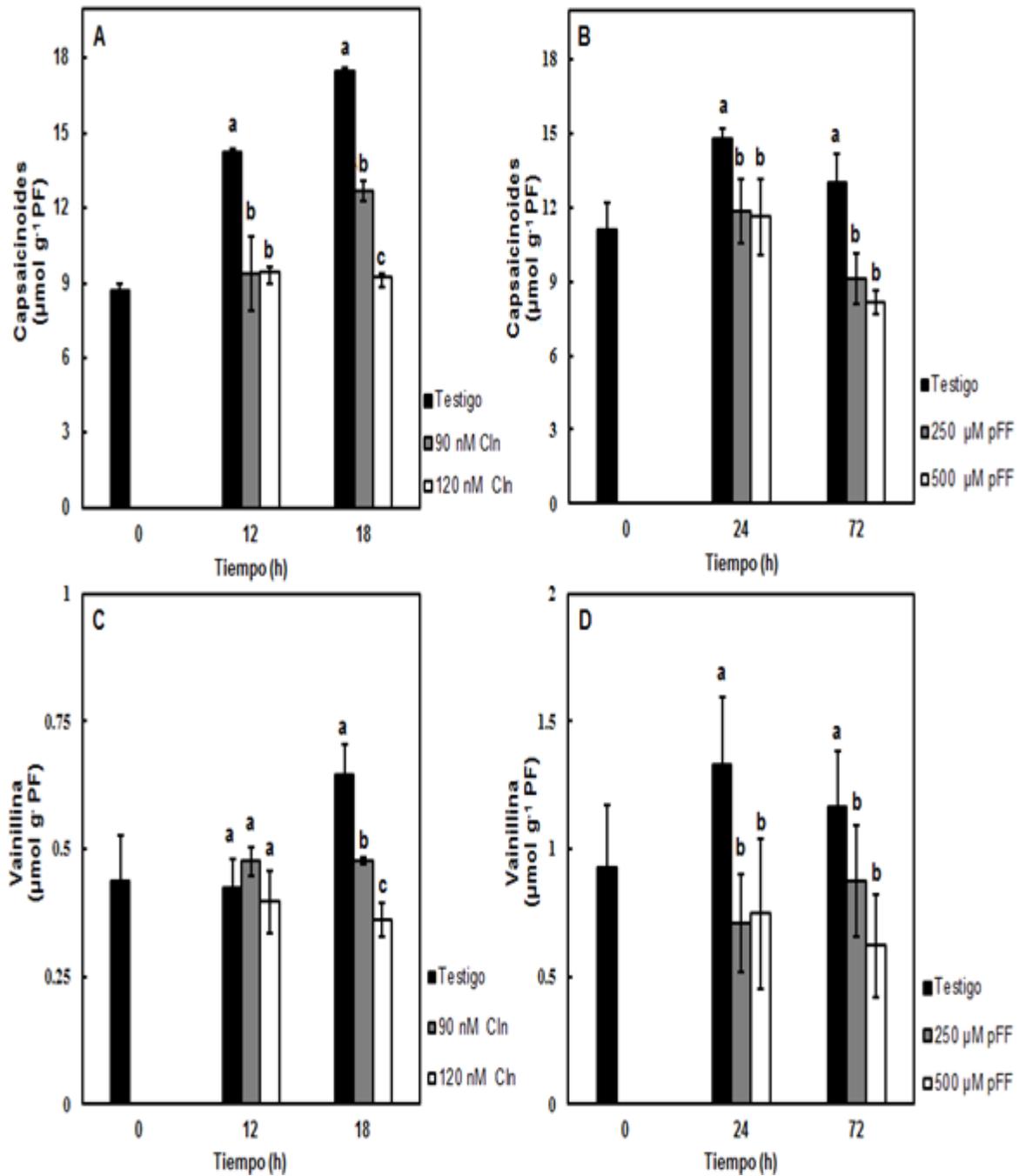


Figura 4.7 Contenido de capsaicinoides y vainillina en placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA sometidas a inhibición de la síntesis de Val (A y C) y Phe (B y D). Las letras diferentes representan diferencias significativas con respecto a los testigos a las 12, 18, 24 o 72 horas, respectivamente, con una probabilidad de 95%.

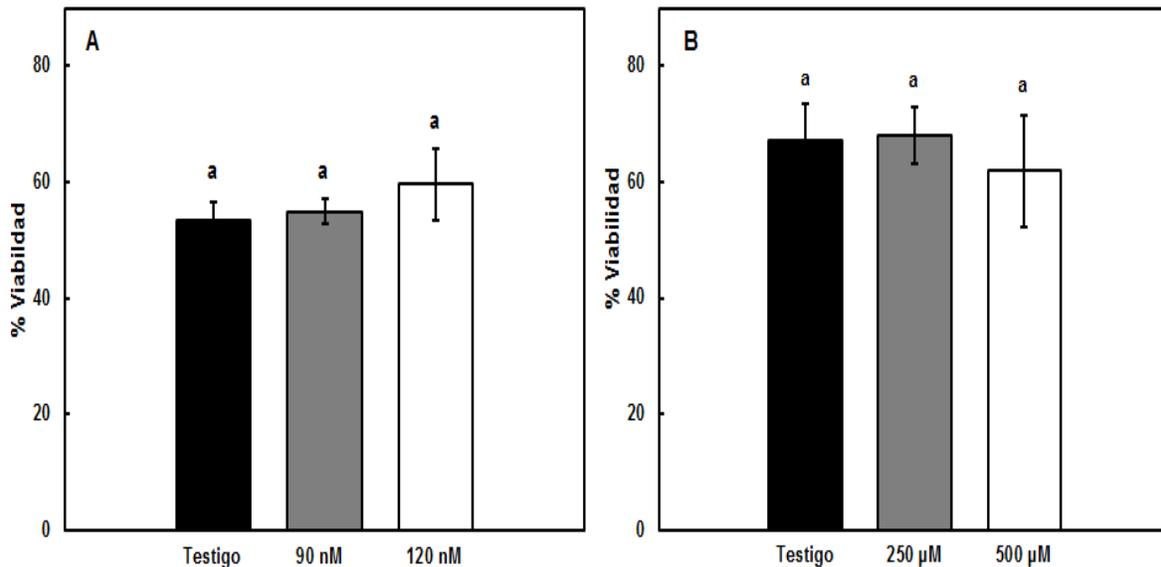


Figura 4.8 Viabilidad de las placentas de *C. chinense* Jacq. de 25 DPA sometidas a tratamientos de inhibición enzimática con Cln (A) y p-FF (B). Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

Una vez que se demostró que las placentas en el sistema *in vitro* requieren de la síntesis de Val y Phe en el mismo tejido donde se sintetizan los capsaicinoides, se evaluó el efecto de ambos inhibidores sobre la expresión de algunos de los genes involucrados en la síntesis de ambos aminoácidos y de los capsaicinoides (Figura 4.9). Lo más interesante fue detectar que la inhibición de la síntesis de valina fue el factor que provocó un aumento en la expresión de *CM* y *ADT* (Figuras 4.9 A y B). Los niveles de expresión de *ALS* y *AT3* aumentaron en proporciones similares cuando se inhibe la síntesis de ambos aminoácidos (Figura 4.9 C y D). Es notable, el hecho de que la expresión de *AT3* no alcanzó los niveles observados cuando se utilizaron AS y MeJa (106 y 11 veces, respectivamente).

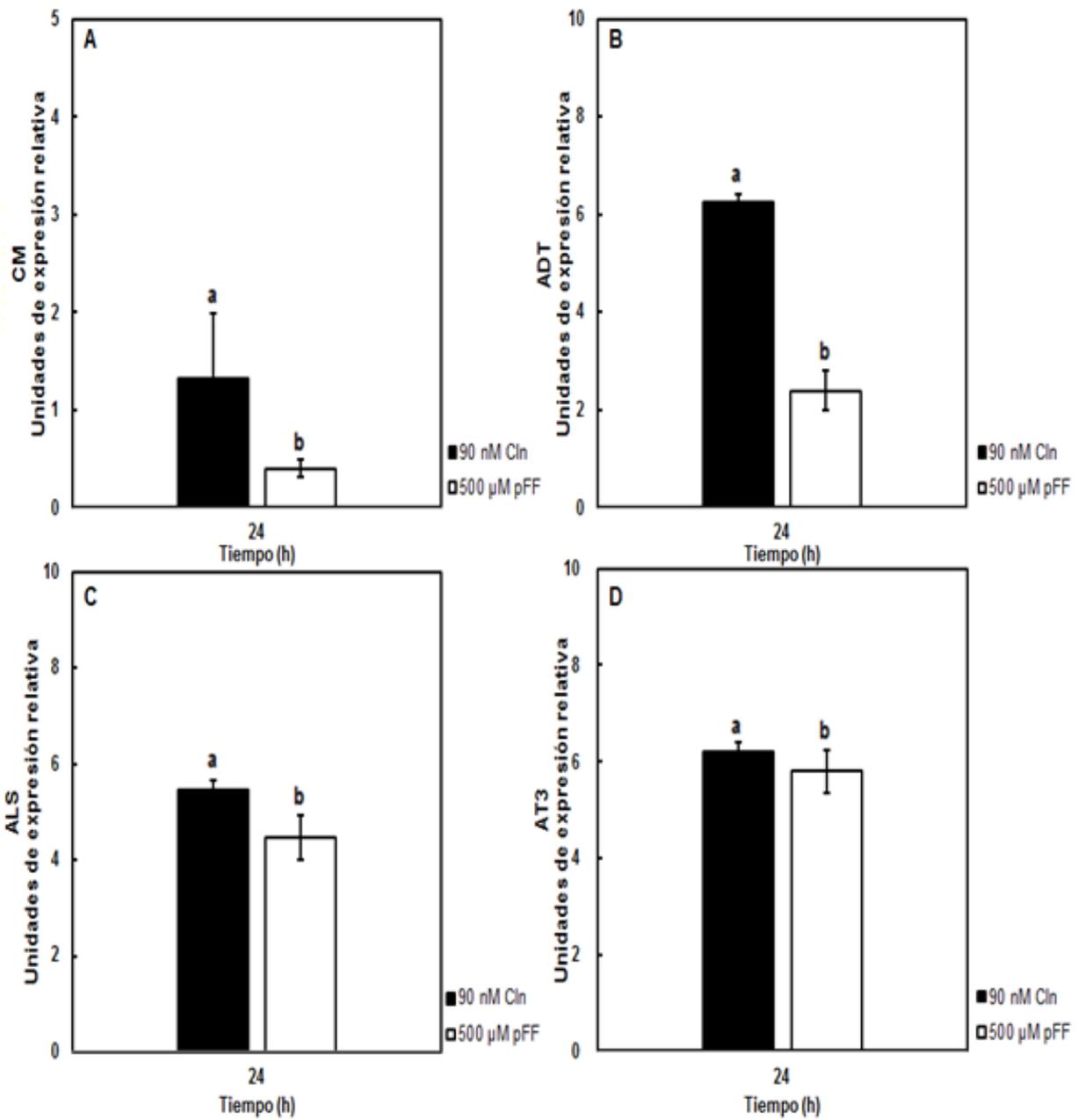


Figura 4.9 Efecto del Cln o p-FF sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis de Phe (A y B), Val (C) y capsaicinoides (D) en un sistema *in vitro* de placentas. Las letras diferentes representan diferencias significativas con una probabilidad de 95%.

La síntesis de capsaicinoides en los chiles se inicia alrededor de los 10 DPA y alcanza su máxima acumulación entre los 45 y 50 días (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Aún cuando el fruto alcanza su tamaño máximo (20 DPA; Sukrasno y Yeoman, 1993), continúa la acumulación de estos compuestos. En algunas especies de *Capsicum*, el contenido de capsaicinoides disminuye al llegar a estadios tardíos de maduración, probablemente por descomposición química, como resultado de la fotooxidación (Iwai *et al.*, 1979) o por la existencia de vías metabólicas aún no bien descritas. Estas vías involucran la oxidación enzimática, catalizada por peroxidasas (Zamudio-Moreno *et al.*, 2014), o la conjugación, mediada por glucosiltransferasas (Díaz *et al.*, 2004).

Además de la regulación de la acumulación de los capsaicinoides inherente al desarrollo del fruto, su contenido varía entre especies, entre diferentes plantas de una misma especie, e incluso, por la localización del fruto en la planta (Zewdie y Bosland, 2000). Estas variaciones están en función de la herencia y de la interacción de la planta con el ambiente. Un ejemplo de la respuesta del metabolismo de los capsaicinoides a diferentes condiciones ambientales es su sensibilidad a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno que ocurren frecuentemente en el suelo. Las placentas de los frutos de *Capsicum chinense* expuestas a concentraciones limitantes de nitrato, contienen menos nitrato y capsaicinoides (Monforte-González *et al.*, 2010).

El hecho de que las variaciones en la disponibilidad de nitrato en el suelo modifiquen el contenido de éste en la placenta, y que esto, a su vez, tenga un impacto directo sobre la acumulación de capsaicinoides, sugiere que la placenta posee el potencial biosintético para asimilar el nitrato y, posteriormente, convertirlo en los dos aminoácidos precursores de la síntesis de los capsaicinoides (Val y Phe). Se ha observado también que las placentas aisladas mantienen la capacidad de síntesis de capsaicinoides en un cultivo *in vitro*, con amonio y nitrato como fuentes únicas de nitrógeno (Johnson *et al.*, 1990).

Se ha señalado que la producción de capsaicinoides puede estar controlada por el suministro y la disponibilidad de Phe (Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992); sin embargo, este es el primer reporte que señala la importancia de la disponibilidad de Val para la producción de estos alcaloides en *Capsicum chinense*.

Aunque se requiere de la síntesis de ambos aminoácidos, con el máximo de inhibición de la síntesis de Val el contenido de capsaicinoides en el sistema fue ~50% inferior al del testigo. En contraste, la inhibición de la síntesis de Phe tan sólo resultó en un decremento del ~37%. Estos resultados sugieren que entre los dos aminoácidos, la síntesis de Val es un factor limitante.

En suspensiones celulares de *Capsicum* al inhibir la síntesis del ácido 8-metil-nonenoico con cerulenina (rama que da lugar a la cadena lateral acilo) disminuía el contenido de capsaicina; sin embargo, cuando se impedía la síntesis de vainillina con amino oxo acetato, no se presentaba este decremento (Prasad *et al.*, 2006). Estos datos discordantes sobre la disminución o no del contenido de capsaicinoides que se da en placentas al inhibir la síntesis de Phe, y en suspensiones celulares al impedir la síntesis de vainillilamina, podría tener dos explicaciones: la primera se refiere a la capacidad de síntesis de las placentas que es aprox. 200 veces mayor que la de los cultivos celulares (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010), lo que ocasiona que se agote la poza endógena de precursores y se active la síntesis *de novo* de Phe, o bien, que al inhibir la síntesis de Phe, la competencia por este aminoácido para producir otros metabolitos que se derivan de la ruta de los fenilpropanoides, la síntesis de proteínas y capsaicinoides (Núñez-Palenius y Ochoa-Alejo, 2005), será mayor que si sólo se inhibe la síntesis de la vainillilamina, que es un intermediario tardío.

El hecho de que la inhibición de la síntesis de Val también disminuya la síntesis de Phe, pero que cuando se inhibe la síntesis de Phe no sucede lo mismo con Val, sugiere que la síntesis de Phe puede estar subordinada a la síntesis o disponibilidad de Val en la placenta. Este hecho respalda la hipótesis de que la producción de la cadena acil graso puede ser un cuello de botella en la regulación de la síntesis de capsaicinoides (Prasad *et al.*, 2006).

Se ha determinado que la acumulación de capsaicina suprime la expresión de *PAL*, *pAMT* y *CS* (Kim *et al.*, 2009). Sin embargo, en este trabajo se observó que cuando se inhibió la síntesis de Val y Phe, hubo un descenso en la acumulación de los capsaicinoides, pero un aumento en la expresión de *AT3*. Es de notarse que la expresión de todos los genes cambió de manera coordinada con la expresión de *AT3* y que cuando se inhibió la síntesis

de Val, esto tuvo un efecto sobre la expresión de *ADT* y la acumulación de Phe.

Sería interesante esclarecer los mecanismos de regulación que coordinan la síntesis de Val, Phe y capsaicinoides, así como la naturaleza de la relación que parece coordinar la síntesis de Phe cuando la síntesis de Val cambia.

Recientemente, se ha sugerido la posibilidad de manipular genéticamente la interfase entre el metabolismo primario y el secundario de plantas como una alternativa para aumentar la producción de MS (Aharoni y Galili, 2011); no obstante, en el caso del metabolismo de los capsaicinoides, es poco lo que se sabe al respecto. Por lo tanto, con este trabajo se establece la importancia del metabolismo primario en la placenta al demostrar el papel fundamental que tiene el metabolismo del nitrógeno en este tejido durante la síntesis de los capsaicinoides.

BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A. y G. Galili (2011). Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 239-244.
- Álvarez, J.M., E.A. Vidal y R.A. Gutiérrez (2012). Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 185-191.
- Ancona-Escalante, W.R. (2013). Estudios sobre la regulación de las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno en placentas de chile habanero. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 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.
- Cabello, P., P. De La Haba, A. González-Fontes y J.M. Maldonado (1998). Induction of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamine synthetase isoforms in sunflower cotyledons as affected by nitrate, light, and plastid integrity. *Protoplasma*, 201, 1-7.
- Castro-Concha, L.A., R.M. Escobedo y M.L. Miranda-Ham (2012). Measurement of cell viability, en: *Plant Cell Culture Protocols*. Loyola-Vargas, V.M. y N. Ochoa-Alejo (eds). Humana Press, Totowa. pp. 49-56.
- Cho, M.H., O.R. Corea, H. Yang, D.L. Bedgar, D.D. Laskar, A.M. Anterola, F.A. Moog-Anterola, R.L. Hood, S.E. Kohalmi, M.A. Bernards, C. Kang, L.B. Davin y N.G. Lewis (2007). Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Identification and characterization of arogenate dehydratases. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 30827-30835.
- Connelly, J.A. y D.L. Siehl (1987). Purification of chorismate, prephenate and arogenate by HPLC. *Methods in Enzymology*, 142, 422-431.

- Contreras-Padilla, M. y E.M. Yahia (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chili peppers and relation with peroxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2075-2079.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3, 141-157.
- Eberlein, C.V., M.J. Guttieri, C.A. Mallory-Smith, D.C. Thill y R.J. Baerg (1997). Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Science*, 45, 212-217.
- Fisher, R. y R. Jensen (1987). Arogenate dehydratase. *Methods in Enzymology*, 142, 495-502.
- Fritz, C., C. Mueller, P. Matt, R. Feil y M. Stitt (2006). Impact of the C–N status on the amino acid profile in tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment*, 29, 2055-2076.
- González-Zamora, A., E. Sierra-Campos, J.G. Luna-Ortega, R. Pérez-Morales, J.C.R. Ortiz y J.L. García-Hernández (2013). Characterization of different *Capsicum* varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography: Determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules*, 18, 13471-13486.
- Gurung, T., S. Techawongstien, B. Suriharn y S. Techawongstien (2011). Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum spp.* *HortScience* 46, 1576-1581.
- Gutiérrez-Carbajal, M.G., M. Monforte-González, M.L. Miranda-Ham, G. Godoy-Hernández y F. Vázquez-Flota (2010). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*, 54, 430-434.
- 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.
- Johnson, T.S., J.A. Ravishankar y L. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Science*, 70, 223-229.
- Kim, J.S., M. Park, D. Ju y K. Nyung-Dong (2009). Characterization of putative capsaicin synthase promoter activity. *Molecules and Cells*, 28, 331-339.
- Lancien, M., P.J. Lea y R.A. Azevedo (2007). Amino acid synthesis in plastids, en: *The Structure and Function of Plastids*. Wise, R.R. y J.K. Hooper (eds). Vol. 23. Springer, Netherlands. pp. 355-385.
- Maeda, H., A.K. Shasany, J. Schnepp, I. Orlova, G. Taguchi, B.R. Cooper, D. Rhodes, E. Pichersky y N. Dudareva (2010). RNAi suppression of arogenate dehydratase 1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in petunia petals. *Plant Cell*, 22, 832-849.
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller y M.M. Jahn (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150, 1806-1821.
- Monforte-González, M., A. Guzmán, F. Uuh 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.
- Núñez-Palenius, H.G. y N. Ochoa Alejo (2005). Effect of phenylalanine and phenylpropanoids on the accumulation of capsaicinoids and lignin in cell cultures of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41, 801-805.

-
- 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.
- Prasad, N.B.C., H.B. Gururaj, V. Kumar, P. Giridhar, R. Parimalan, A. Sharma y G.A. Ravishankar (2006). Influence of 8-methyl-nonenoic acid on capsaicin biosynthesis in *in vivo* and *in vitro* cell cultures of *Capsicum spp.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1854-1859.
- Ray, T.B. (1984). Site of action of chlorsulfuron inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, 75, 827-831.
- Rippert, P y P. Matringe (2002). Molecular and biochemical characterization of an *Arabidopsis thaliana* arogenate dehydrogenase with two highly similar and active protein domains. *Plant Molecular Biology*, 48, 361-368.
- Salgado-Garciglia, R. y N. Ochoa-Alejo (1990). Increased capsaicin content in PFP resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 8, 617-620.
- Samach, A., D. Harevent, T. Gutfinger, S. Ken-Dror y E. Lifschitz (1991). Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 2678-2682.
- Singh, B.K. y D.L. Shaner (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *Plant Cell*, 7, 935-944.
- Singh, R.P. y H.S. Srivastava (1986). Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiologia Plantarum*, 66, 413-416.
- 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.

Sukrasno, N. y M.M. Yeoman (1993). Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry*, 32, 839-844.

Zamudio-Moreno, E., I. Echevarría-Machado, M.F. Medina-Lara, G. Calva-Calva, M.L. Miranda-Ham y M. Martínez-Estévez (2014). Role of peroxidases in capsaicinoids degradation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) plants grown under water deficit conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 8, 448-54.

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.

CAPÍTULO V

METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN PLACENTAS DE *Capsicum*: SITUACIÓN ACTUAL

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

La síntesis de capsaicinoides en los chiles se inicia generalmente alrededor de los 10 DPA, alcanzando su máxima acumulación entre los 45 y 50 días (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Aún cuando el fruto ha alcanzado su tamaño máximo (20 DPA; Sukrasno y Yeoman, 1993), continúa la acumulación de estas amidas ácidas. En algunas especies de *Capsicum*, el contenido de capsaicinoides disminuye al llegar a estadios tardíos de maduración (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990; Iwai *et al.*, 1979); probablemente por descomposición química, como resultado de la fotooxidación (Iwai *et al.*, 1979) o por la existencia de vías metabólicas aún no bien descritas. Estas vías involucran la oxidación enzimática, catalizada por peroxidasas (Zamudio-Moreno *et al.*, 2014), o la conjugación, mediada por glucosiltransferasas (Díaz *et al.*, 2004).

Adicional a la regulación de la acumulación de los capsaicinoides inherente al desarrollo del fruto, su cantidad varía entre especies, entre diferentes plantas de una misma especie, e incluso, por la localización del fruto en la planta (Lee *et al.*, 2006; Zewdie y Bosland, 2000). Estas variaciones están en función de la herencia y de la interacción de la planta con el ambiente. Un ejemplo de la respuesta del metabolismo de los capsaicinoides a diferentes condiciones ambientales es su sensibilidad a cambios en la disponibilidad de nitrógeno, los cuales ocurren frecuentemente en el suelo (Monforte-González *et al.*, 2010). Las placentas de los frutos de *Capsicum chinense* expuestas a concentraciones limitantes de nitrato contienen menos nitrato y capsaicinoides (Monforte-González *et al.*, 2010). En contraste, un aumento en la disponibilidad de Phe promueve una mayor acumulación de capsaicina (Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992).

Con base en la cantidad de chiles producidos por cada planta (en promedio, aprox. 255) y la alta concentración de capsaicinoides en sus placentas (más del 5% en peso seco; Bosland y Baral, 2007), es poco probable que el suministro de ambos precursores Phe y Val dependa, al menos no totalmente, del transporte a través del floema desde otros

tejidos de la planta hacia la placenta, como sugiere el perfil metabólico realizado en el Capítulo II de esta tesis. No existen reportes de transporte masivo a través del floema de estos aminoácidos (Lea e Ireland, 1999).

Dado que las placentas son capaces de sintetizar capsaicinoides en un medio con amonio y nitrato como fuentes únicas de nitrógeno (Johnson *et al.*, 1990), se planteó que la placenta debería contar con la maquinaria enzimática necesaria para convertir el nitrato en amonio, y posteriormente, incorporarlo en la síntesis tanto de Val como de Phe, y que ambos aminoácidos sintetizados en este tejido fungen preponderantemente como precursores en la biosíntesis de capsaicinoides. El objetivo del proyecto fue determinar si la acumulación de capsaicinoides en la placenta requiere de la síntesis *in situ* de la Val y la Phe.

Es importante mencionar que hay pocos estudios sobre el metabolismo primario en la placenta, y ninguno sobre lo que ocurre con el metabolismo del nitrógeno. Por lo que además de ser este proyecto uno de los pioneros en este aspecto, aporta una perspectiva diferente para abordar la aportación del metabolismo primario a la luz de su importancia para el metabolismo secundario.

Para alcanzar el objetivo propuesto, se realizaron estudios a lo largo de la ontogenia del fruto y en placentas mantenidas en un sistema *in vitro* utilizando varias estrategias, como fueron la inducción del metabolismo secundario, usando el AS y el MeJa, y el uso de inhibidores de enzimas en puntos clave del metabolismo primario.

Los sistemas de cultivo *in vitro* son ventajosos para el estudio de diferentes procesos fisiológicos en las plantas, pues las condiciones pueden ser estrictamente controladas al grado de permitir monitorear el efecto de sólo un factor (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006). Por esta razón, se empleó un sistema de tejido placentario *in vitro* en el estudio del metabolismo nitrogenado de chile habanero.

La placenta es capaz de convertir el nitrato hasta Phe (Cough-Nic, 2011; Baas-Espinola, 2011, 2009; Roca-Mézquita, 2009), siendo la principal vía de asimilación de amonio el ciclo GS-GOGAT (Ancona-Escalante, 2009). Estos datos constituyen el primer estudio que establece la funcionalidad del metabolismo del nitrógeno en placentas de *Capsicum*.

La capacidad de asimilación de nitrato (NR: $6 \text{ nmol NO}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$; Baas-Espinola, 2009) es menor que la capacidad de asimilación de amonio (GS: $1.7 \text{ } \mu\text{mol } \gamma\text{-glutamil hidroxamato min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$; Baas-Espinola, 2011) en la placenta, lo que probablemente indica que la placenta depende principalmente del amonio como fuente inorgánica. Sin embargo, el cambio en la concentración de nitrato en la placenta es probablemente muy importante, no sólo en términos absolutos, sino como una molécula señal que activa el metabolismo del nitrógeno (Krouk *et al.*, 2010; Stitt *et al.*, 2002) y el metabolismo de los fenilpropanoides (Matt *et al.*, 2002).

En la placenta, la actividad de PAL (García-Molina *et al.*, 2010) fue mayor que la actividad de la CM y de la ADT en todos los estadios de desarrollo del fruto, lo que podría sugerir que parte de la fenilalanina que se incorpora a la ruta de los fenilpropanoides en la placenta se transporta desde un tejido diferente. Debido al estrecho vínculo entre la placenta y el pericarpio (Figura 1.1), se midió la concentración de metabolitos involucrados en el metabolismo nitrogenado en ambos tejidos en dos estadios de desarrollo del fruto (20 y 45 DPA). Se observó una disminución en la cantidad de nitrato y aminoácidos solubles totales en pericarpio a los 45 DPA, que coincidió con un aumento de los mismos metabolitos en las placentas, cuyo contenido de capsaicinoides fue mayor. El hecho de que la actividad de la ADT, determinada en este trabajo (Figura 4.2), fuera mayor en el pericarpio que en la placenta parecería apoyar la hipótesis de un transporte de fenilalanina del pericarpio hacia la placenta.

La síntesis de Phe es mayor en los tejidos fotosintéticos (Lancien y Lea, 2007) y se estima que alrededor del 30% del carbono fotosintéticamente asimilado en plantas fluye a través de la ruta del shikimato hasta convertirse en corismato. Las enzimas involucradas en esta vía metabólica se encuentran en los cloroplastos, lo que señala un estrecho vínculo entre la fotosíntesis y la síntesis de aminoácidos aromáticos. No obstante, aunque no hay datos que señalen la magnitud de la capacidad fotosintética del pericarpio en frutos de *Capsicum*, hay un reporte de que frutos de otras especies poseen la capacidad de llevar a cabo este proceso (Blanke y Lenz, 1989). Es probable que al separar a la placenta del pericarpio en un sistema *in vitro*, se separe a este tejido de los recursos que prodiga la fotosíntesis del pericarpio, como el ATP y el poder reductor. Sin embargo, aún cuando el medio de cultivo provee de cantidades abundantes de las fuentes de carbono y nitrógeno,

la acumulación de capsaicinoides parece estar limitada por la asimilación del nitrógeno que se da exclusivamente en la placenta.

La actividad de la GS en la placenta es mayor que la de la ADT (Ancona-Escalante, 2013), lo cual no es sorprendente, pues el ciclo GS-GOGAT tiene un papel central en el manejo del amonio en las células vegetales. Uno de los aspectos en que podría estar involucrado el ciclo es el reciclaje del amonio producido por la conversión de la Phe a cinamato (catalizada por PAL), así como el producido en la reacción que convierte a la Val en cetoisovalerato por medio de la BCAT. Además, parte del glutamato, que se origina de la acción concertada de la GS y la GOGAT, podría ser usado por la AMT para producir vainillilamina. La síntesis de este intermediario tardío en la síntesis de los capsaicinoides ha sido señalada como un punto limitante en la síntesis de los capsaicinoides (Núñez-Palenius y Ochoa-Alejo, 2005; Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993; Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992).

Al inducir una mayor acumulación de capsaicinoides como resultado de la adición de AS, la actividad de la GS aumentó seis veces (Ancona-Escalante *et al.*, 2013.), mientras que la actividad de la ADT permanece constante (Ancona-Escalante, 2013). Sin embargo, cuando se inhibe la actividad de la GS con metionina sulfoximina, la placenta conserva su capacidad de síntesis de capsaicinoides, probablemente porque bajo estas condiciones, la GDH es capaz de suplir la función del ciclo GS-GOGAT.

La actividad de PAL fue mayor durante los primeros 20 DPA (García-Molina *et al.*, 2010); *i. e.*, la actividad de la enzima disminuyó cuando se presentó el máximo de acumulación de capsaicinoides, lo que concuerda con la represión por retroalimentación de PAL como resultado de la adición exógena de capsaicina (Kim *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante señalar que PAL no se relaciona exclusivamente con la síntesis de capsaicinoides, sino que se asocia además con la producción de precursores para la formación de pared celular (Vogt, 2010), entre otros procesos. Así, cuando el fruto alcanza su tamaño máximo (~25 DPA), la demanda de moléculas originadas de la ruta de los fenilpropanoides disminuye, lo que probablemente provoca una disminución gradual de la actividad de PAL entre los 25 y 40 DPA.

En un patrón diferente al de la PAL, la actividad de la CM aumentó después de los 20 DPA y la de ADT se incrementó conforme aumentaba la acumulación de estos compuestos, lo que sugiere que la inhibición por retroalimentación de la capsaicina se podría extender hasta la síntesis de Phe, y quizás, hasta la de Val, como lo demuestran los análisis de la expresión de *CM*, *ADT* y *ALS* bajo los tratamientos con inductores o inhibidores (Capítulo III y IV).

No obstante, cuando las placentas recibieron una concentración limitante de nitrógeno total (10 mM), se observaron: 1) un aumento en la síntesis de capsaicinoides, 2) un menor contenido de nitrato (Ancona-Escalante, 2013), 3) decrementos en las actividades de las enzimas de asimilación de amonio (Baas-Espínola, 2009), y 4) un aumento en la síntesis de Phe (Ancona-Escalante, 2013). Por lo tanto, bajo condiciones limitantes de nitrógeno, la síntesis de capsaicinoides parecería requerir de la síntesis *de novo* de Phe a partir de nitrato y amonio.

Tanto la ADT como la ALS se encuentran funcionales en las placentas, de manera que se confirma la posibilidad de que las rutas de síntesis de Phe y Val puedan proveer *in situ* los precursores de los capsaicinoides. Estos datos dan evidencia a nivel de actividades enzimáticas de los niveles de transcritos reportados por Mazourek y colaboradores (2009).

Cuando se inhibió la síntesis de Val mediante el uso del Cln, el contenido de capsaicinoides en el sistema *in vitro* de placentas fue ~50% inferior al del testigo. En contraste, la inhibición de la ADT, por medio de la p-FF, tan sólo presentó una disminución del ~38% del contenido total. Este hecho va más allá de una coincidencia temporal y espacial en la expresión de un gen o la acumulación de un metabolito, ya que mediante un experimento diseñado para revelar una concatenación causal, se confirma que la síntesis de los capsaicinoides en la placenta depende, además de la conversión del amonio a su forma orgánica a través del ciclo GS-GOGAT (Ancona-Escalante *et al.*, 2013), de la síntesis de Val y Phe *in situ*, tal como se plantea en la hipótesis de este trabajo.

Es importante mencionar que además de existir una estrecha coordinación entre la

síntesis de Val y capsaicinoides, probablemente esta modulación se extienda a la síntesis de los dos aminoácidos precursores y los metabolitos secundarios en el tejido placentario.

Los resultados de inducción e inhibición revelaron una expresión coordinada del gen *AT3* con los genes involucrados con la síntesis de Phe y Val durante la acumulación de los capsaicinoides, así como que la síntesis de Val es un punto de regulación metabólica que limita la síntesis de los capsaicinoides.

Por otro lado, el hecho de que la inhibición de la actividad de la ALS o ADT se refleje en la disminución de la producción de capsaicinoides en la placenta, permite establecer un vínculo entre la síntesis de Val y/o Phe y la producción de estos alcaloides en este tejido, tal como previamente han sugerido los resultados obtenidos a través de experimentos durante el desarrollo del fruto. Además, dada la naturaleza del sistema de tejidos empleado, los datos fuertemente sugieren que bajo condiciones *in vivo*, el picor de los chiles depende de la asimilación del nitrógeno y de la síntesis de aminoácidos en el tejido placentario, tal como demuestran los resultados de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ancona-Escalante, W.R. (2009). Estudio de las enzimas de asimilación de amonio en un cultivo *in vitro* de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 76 p.
- Ancona-Escalante, W.R. (2013). Estudios sobre la regulación de las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno en placentas de chile habanero. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 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.
- Baas-Espinola, F.M. (2009). Cuantificación de la enzima nitrato reductasa en placentas inmovilizadas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 44 p.
- Baas-Espinola, F.M. (2011). Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio bajo condiciones de inducción y diferentes contenidos de nitrógeno en placentas inmovilizadas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 83 p.
- Blanke, M.M. y F. Lenz (1989). Fruit photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 12, 31-46.
- Bosland, P.W. y J.B. Baral (2007). 'Bhut Jolokia': the world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *HortScience*, 42, 222-224.
- 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.
- Couoh-Nic, J.A. (2011). Estudio de la corismato mutasa en placentas de *Capsicum*

chinense Jacq. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. México. p 52.

Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3, 141-157.

García-Molina, P., L. Castro-Concha y M.L. Miranda-Ham (2010). Determinación de la actividad específica de fenilalanina amonio liasa (PAL) en *Capsicum chinense* Jacq. Congreso del Verano de la Investigación Científica 2010, Mérida, Yucatán, México.

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, T.S., J.A. Ravishankar y L. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Science*, 70, 223-229.

Kim J.S., M. Park, D. Ju y K. Nyung-Dong (2009). Characterization of putative capsaicin synthase promoter activity. *Molecules and Cells*, 28, 331-339.

Krouk, G., N.M. Crawford, G.M. Coruzzi e Y.F. Tsay (2010). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 265-272.

Lancien, M. y P. Lea (2007). Amino acid synthesis in plastids, en: *The Structure and Function of Plastids*. Wise, R.R. y J.K. Hooper (eds). Springer, Netherlands. pp. 355-385.

Lea, P.J. y R.J. Ireland (1999). Nitrogen metabolism in higher plants, en: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, Singh, B.K. (ed). Marcel Dekker, New York. pp 1-48.

Lee, M.L., S. Kim, J.Y. Lee, E.Y. Yoo, M.C. Cho, M.R. Cho, B. 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.

Loyola-Vargas, V.M. y F.A. Vázquez-Flota (2006). Back to the future: An introduction to plant cell cultures, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V.M. and F.A. Vázquez-Flota (eds). Second edition. Humana Press, Totowa. pp. 3-8.

Matt, P., A. Krapp, V. Haake, H. Mock y M. Stitt (2002). Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant Journal*, 30, 663-677.

Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller y M.M. Jahn (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150, 1806-1821.

Monforte-González, M., A. Guzmán, F. Uuh y F. 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.

Núñez-Palenius, H.G. y N. Ochoa-Alejo (2005). Effect of phenylalanine and phenylpropanoids on the accumulation of capsaicinoids and lignin in cell cultures of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41, 801-805.

Ochoa-Alejo, N. y J.E. Gómez-Peralta (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141, 147-152.

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.

Roca Mézquita, C. (2009). Estudio de la enzima nitrito reductasa en un cultivo *in vitro* de

placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 47 p.

Salgado-Garciglia, R. y N. Ochoa-Alejo (1990). Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 8, 617-620.

Stitt, M., C. Müller, P. Matt, Y. Gibon, P. Carillo, R. Morcuende, W.R. Scheible y A. Krapp (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 53, 959-970.

Sukrasno, N. y M.M. Yeoman (1993). Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry*, 32, 839-844.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20.

Zamudio-Moreno, E., I. Echevarría-Machado, M.F. Medina-Lara, G. Calva-Calva, M.L. Miranda-Ham y M. Martínez-Estévez (2014). Role of peroxidases in capsaicinoids degradation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) plants grown under water deficit conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 8, 448-54.

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.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- La producción de capsaicinoides en el sistema *in vitro* de placentas requiere de la síntesis *in situ* de valina y fenilalanina.
- El uso del AS indujo una mayor acumulación de capsaicinoides, en comparación con el de MeJa, en el sistema *in vitro* de placentas.
- El gen *AT3* se expresa de manera coordinada con los de *CM*, *ADT* y *ALS* durante la acumulación de capsaicinoides, lo que indica que existe una red coordinada de expresión génica que conecta la síntesis de valina y fenilalanina con la de capsaicinoides en el tejido placentario de los chiles de *Capsicum chinense* Jacq.
- La disponibilidad de valina en la placenta parece ser un factor más limitante que la de fenilalanina para la acumulación de capsaicinoides bajo condiciones *in vitro*.
- La síntesis de fenilalanina en la placenta parece estar subordinada a la síntesis de valina durante la acumulación de capsaicinoides.

CAPÍTULO VII

SISTEMA *in vitro* DE TEJIDO PLACENTARIO: UN MODELO PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS CAPSAICINOIDES

6.1 PERSPECTIVAS

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos con una gran diversidad de estructuras químicas que, frecuentemente, son el producto de rutas metabólicas altamente complejas. Este es el caso de los MS, cuyas rutas biosintéticas son por definición el resultado de la especialización celular (Facchini y St-Pierre, 2005). Estos compuestos son económicamente importantes por su amplio espectro de aplicaciones industriales, como aditivos en la elaboración de alimentos (Rymbai *et al.*, 2011), nutracéuticos (Wahyuni *et al.*, 2011), pero principalmente por sus propiedades farmacológicas (Anand y Bley, 2011; Reyes-Escogido *et al.*, 2011; Meghvansi *et al.*, 2010; Mózsik *et al.*, 2009). Por esta razón, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se considera una estrategia con amplio potencial para cubrir la demanda de MS, que excede la capacidad de síntesis de las plantas, pero también, como un aliado importante para el estudio de la regulación del metabolismo secundario, que puede incidir, en un futuro no muy lejano, aumentando las posibilidades de éxito en la manipulación de las rutas metabólicas de las que se originan (Arias *et al.*, 2009). Los logros obtenidos hasta ahora han sido modestos, pues aún se sabe poco sobre los mecanismos que regulan el metabolismo secundario, como es el caso del metabolismo de los capsaicinoides (Aza-González *et al.*, 2011).

Las suspensiones celulares están compuestas de células desdiferenciadas y por lo tanto, no se forman estructuras o tejidos de almacenamiento (en comparación con las plantas), lo que ocasiona que parte de los productos sintetizados se mantengan dentro de la célula y/o sean liberados al medio de cultivo (Cai *et al.*, 2012; Wink, 1994). Si se mantiene dentro de la célula, ésta puede desencadenar mecanismos que inhiban su síntesis (Kim *et al.*, 2009; McFarlane *et al.*, 1975) para contrarrestar los efectos tóxicos que frecuentemente producen los MS a altas concentraciones (Sirikantaramas *et al.*, 2008). En contraste, los productos liberados al medio de cultivo están propensos a degradación por

enzimas que, de igual manera, son liberadas al mismo ambiente (Díaz *et al.*, 2004; Wink, 1994).

Existen ejemplos donde la ruta anabólica de ciertos fitoquímicos requiere de la intervención, no sólo de diferentes compartimentos celulares, sino de diferentes tipos de células en el tejido (Roepke *et al.*, 2010; Facchini y St-Pierre, 2005). Esto pone de manifiesto la importancia del grado de organización y especialización celular que limita la producción de los MS en los sistemas *in vitro*. Hoy por hoy, dos tipos de órganos son los más frecuentemente utilizados para la producción de MS: las raíces y los brotes. Éstos se caracterizan por tener un patrón metabólico muy similar al de los órganos en la planta (Bais *et al.*, 2001). Pueden o no estar transformados genéticamente. En el caso de células no transformadas, el tejido se obtiene a partir de un explante, y la diferenciación se logra mediante el uso de una combinación apropiada de fitorreguladores. En contraste, los órganos transformados se obtienen utilizando *Agrobacterium rhizogenes*, en el caso de raíces, o *Agrobacterium tumefaciens* en el de brotes (Arias *et al.*, 2009). Dado que el metabolismo secundario no está restringido únicamente a estos dos órganos, se hace evidente la necesidad de contar con otros sistemas de cultivo *in vitro* para estudiar los mecanismos de regulación metabólica que gobiernan la síntesis, acumulación y degradación de MS y establecer una relación entre diferenciación celular y metabolismo secundario (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006).

A pesar de que se sabe que la placenta es una parte del fruto con amplio potencial para el cultivo *in vitro* (Tukey, 1937) y que tiene una elevada actividad biosintética (Zamski *et al.*, 1987; Fujiwake *et al.*, 1982a,b; Suzuki *et al.*, 1980; Iwai *et al.*, 1979), aún el conocimiento sobre su fisiología es muy limitado (Liu *et al.*, 2006). Las placentas no han sido empleadas con frecuencia como un modelo experimental en estudios sobre metabolismo secundario. Se pueden citar algunos en el género *Capsicum* (Johnson *et al.*, 1991,1990; Lindsey, 1986); sin embargo, en otras especies que también producen MS como *Theobroma cacao* (Zheng *et al.*, 2004), *Coffea arabica*, *C. canefora* (Koshiro *et al.*, 2006), *Solanum lycopersicum* (Moco *et al.*, 2007) y *Daphniphyllum oldhamii* (Gan *et al.*, 2007), los estudios también son incipientes. Por esta razón, es necesario ampliar el análisis del potencial biosintético del tejido placentario, no sólo en *Capsicum*, y hacer análisis comparativo entre el cultivo *in vitro* de este tejido y las suspensiones celulares, así como explorar la

posibilidad de que este tejido en otras plantas pueda servir como un sistema modelo *in vitro* para estudiar los eventos que gobiernan al metabolismo secundario.

Conocer la regulación del metabolismo secundario sentará las bases para tener mejores oportunidades de éxito en los programas de manipulación genética, cuyo fin es aumentar la producción de MS de importancia comercial. En este sentido, el tejido placentario constituye un depósito de organización y especialización celular subutilizado en el estudio del metabolismo secundario de plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anand, P. y K. Bley (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*, 107, 490-502.
- Arias, M., A. Aguirre, M. Angarita, C. Montoya y J. Restrepo (2009). Engineering aspects of the *in vitro* plant cell culture for the production of secondary metabolites. *Dyna*, 76, 109-121.
- Aza-González, C., H.G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum spp.*). *Plant Cell Reports*, 30, 695-706.
- Bais, H.P., V.M. Loyola-Vargas, H.E. Flores y J.M. Vivanco (2001). Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37, 730-741.
- Cai, Z., A. Kastell, D. Knorr y I. Smetanska (2012). Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 31, 461-477.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3, 141-157.
- Facchini, P.J. y B. St-Pierre (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 657-666.
- Fujiwake, H., T. Suzuki y K. Iwai (1982a). Intracellular distribution of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 2685-2689.
- Fujiwake, H., T. Suzuki y K. Iwai (1982b). Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 2591-2592.
- Gan, L.S., X.N. Wang, C.Q. Fan, Y. Wu, y J.M. Yue (2007). Alkaloids from fruits of

Daphniphyllum oldhamii. Helvetica Chimica Acta, 90, 2395-2400.

Iwai, K., T. Suzuki y H. Fujiwake (1979). Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. Agricultural and Biological Chemistry, 43, 2493-2498.

Johnson, T.S., J.A. Ravishankar y L. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. Plant Science, 70, 223-229.

Johnson, T.S., J.A. Ravishankar y L. Venkataraman (1991). Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* Mill. Food Biotechnology, 5, 197-205.

Kim, J.S., M. Park, D. J. Lee y D.B. Kim (2009). Characterization of putative capsaicin synthase promoter activity. Molecules and Cells, 28, 331-339.

Koshiro, Y., X.Q. Zheng, M.L. Wang, C. Nagai y H. Ashihara (2006). Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. Plant science, 171, 242-250.

Liu, K., H. Jiang, S.L. Moore, C.B. Watkins y M.M. Jahn (2006). Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. Planta, 223, 672-683.

Lindsey, K. (1986). Incorporation of [¹⁴C] phenylalanine and [¹⁴C] cinnamic acid into capsaicin in cultured cells of *Capsicum frutescens*. Phytochemistry, 25, 2793-2801.

Loyola-Vargas, V.M. y F.A. Vázquez-Flota (2006). Back to the future: An introduction to plant cell cultures, en: Plant Cell Culture Protocols, Loyola-Vargas, V.M. y F.A. Vázquez-Flota (eds). Second edition. Humana Press, Totowa. pp. 3-8.

McFarlane, J., K.M. Madyastha y C.J. Coscia (1975). Regulation of secondary metabolism

in higher plants. Effect of alkaloids on a cytochrome P-450 dependent monooxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 66, 1263-1269.

Meghvansi, M.K., S. Siddiqui, M.H. Khan, V.K. Gupta, M.G. Vairale, H.K. Gogoi y L. Singh (2010). Naga chilli: a potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 1-14.

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.

Mózsik, G., T. Past, O.M.A. Salam, M. Kuzma, y P. Perjési (2009). Interdisciplinary review for correlation between the plant origin capsaicinoids, non-steroidal antiinflammatory drugs, gastrointestinal mucosal damage and prevention in animals and human beings. *Inflammopharmacology*, 17, 113-150.

Reyes-Escogido, M.D.L., E.G. González-Mondragón y E. Vázquez-Tzompantzi (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 16, 1253-1270.

Roepke, J., V. Salim, M. Wu, A.M. Thamm, J. Murata, K. Ploss y V. De Luca (2010). Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 15287-15292.

Rymbai, H., R.R. Sharma y M. Srivasta (2011). Bio-colorants and its implications in health and food industry –a review. *International Journal of Pharmacological Research*, 3, 2228-2244.

Sirikantaramas, S., M. Yamazaki y K. Saito (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews*, 7, 467-477.

Suzuki, T., H. Fujiwake y K. Iwai (1980). Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit 1. Microscopic investigation of the

structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant and Cell Physiology*, 21, 839-853.

Tukey, H. B. (1937). Plant parts of deciduous fruits which give evidence of being favorable for tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 23, 577-580.

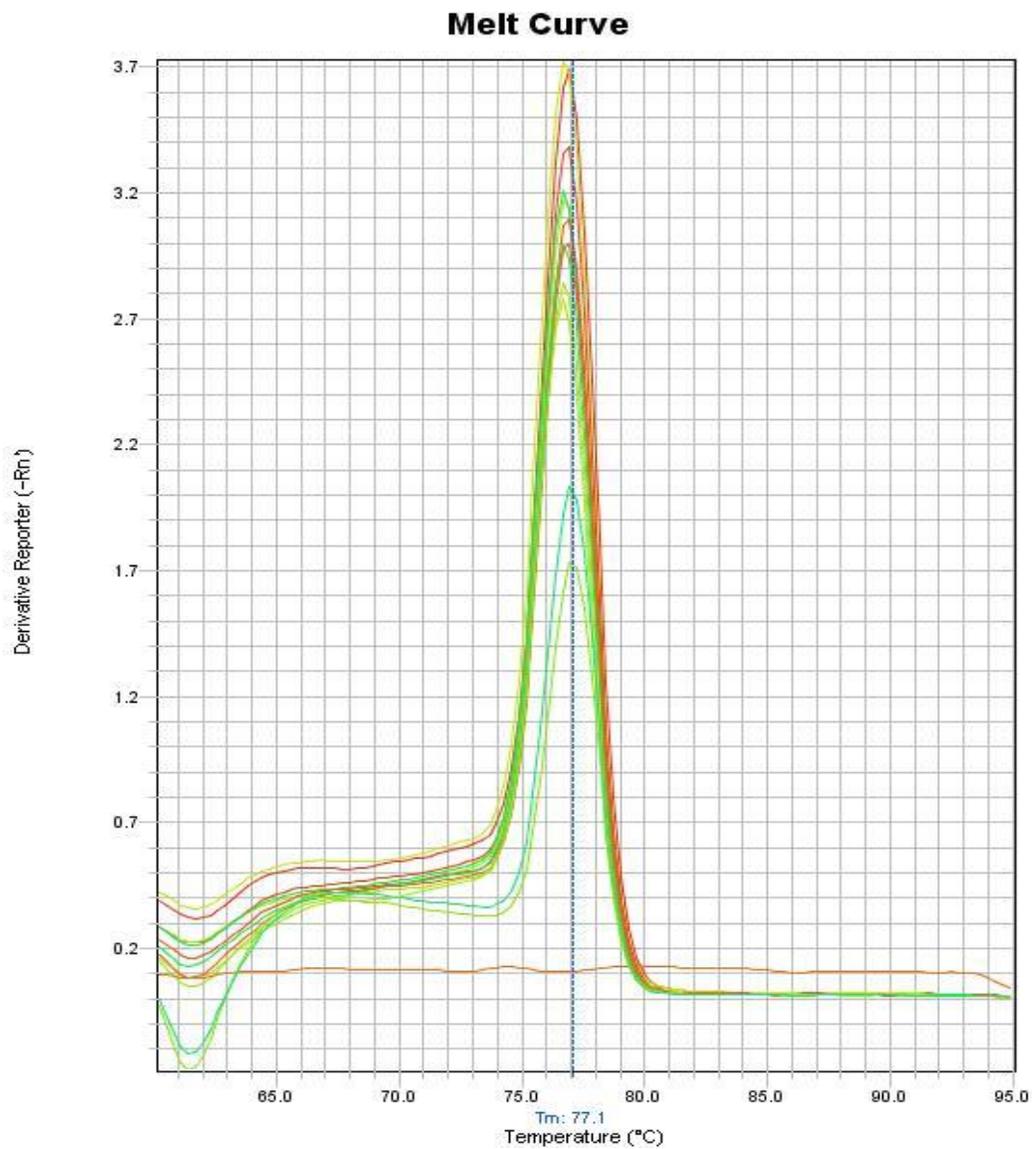
Wahyuni, Y., A.R. Ballester, E. Sudarmonowati, R.J. Bino y A.G. Bovy (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72, 1358-1370.

Wink, M. (1994). The cell-culture medium -a functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 307-319.

Zamski, 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.

Zheng, X.Q., Y. Koyama, C. Nagai y H. Ashihara (2004). Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. *Journal of Plant Physiology*, 161, 363-369.

ANEXO 1

ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN DEL AMPLICÓN DE LA
ACILTRANSFERASA 3 (AT3)

En la figura se observa el perfil de desnaturalización del amplicón de AT3, en la cual se aprecia un valor único de temperatura media de fusión ($T_m = 77.1^\circ\text{C}$), indicando la existencia de un solo producto de amplificación.