



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**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 que presenta

FRAY MARTIN BAAS ESPINOLA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y

Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



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 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.” 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, dentro de la Opción Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

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 dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Intelectual, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México a 23 de marzo de 2011.



Q.B.B. Fray Martín Baas Espinosa

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto (No. 50879Z) 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" bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham.

AGRADECIMIENTOS

Brindo un reconocimiento especial:

- Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por haber sido una pieza clave dentro de mi formación académica, especialmente a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por haberme permitido el uso de sus instalaciones en la realización de este trabajo.
- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca No. 228278 con la cual realicé mis estudios de maestría.
- A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, primero por permitir que fuera su estudiante, por su apoyo, por todas las cosas buenas que aprendí de ella como investigador y como persona, pero sobre todo, le agradezco por haberme ayudado a encontrar las cosas buenas que hay en mí.
- A la M. C. Lizbeth Arianelly Castro Concha, por haber estado siempre disponible y dispuesta a ayudar en todo lo académico, pero además, también quiero agradecerle por todo el apoyo moral y sus consejos a lo largo de los años que llevo de conocerle. Maestra Liz: nunca olvide que cinco líneas no serán suficientes para expresar todas las palabras de gratitud que siento por todo lo que usted me ha ofrecido.
- Al Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por haber cumplido cabalmente con su deber como revisor de esta tesis.
- A la Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto, por sus cuestionamientos, comentarios y observaciones que me fueron de mucho provecho durante la realización de esta tesis, pero también, por haberme demostrado que las enzimas son más que unas simples proteínas.
- A la Dra. Virginia Herrera por haber sido revisora de esta tesis.
- Al Dr. Manuel Martínez Estévez por haber sido revisor de esta tesis.
- A la M. C. Wendy del Rosario Ancona Escalante, por haber estado siempre dispuesta a discutir y opinar sobre mis experimentos, cosa que me sirvió para aclarar mis ideas. También le agradezco por el permiso otorgado para revisar todos los artículos de su biblioteca personal; sin ellos, muy probablemente esta tesis no hubiese tenido igual éxito.
- A la QBB Carolina Roca Mézquita, por su apoyo técnico en los experimentos, por su amistad, así como por haber contribuido a mantener hasta cierto punto organizadas mis cosas.
- Al M. C. Javier Francisco García Villalobos, por su accesibilidad y disponibilidad para apoyarme técnicamente en la utilización del HPLC.

- A los Ingenieros Eduardo Balam, Miguel Canché y Fernando Contreras, por haber tomado parte de sus respectivos tiempos para proporcionarme el material biológico con el que se realizó este trabajo.
- A mis amigos (Abraham, Miqueas, Jemina, Wendita y Carito) del laboratorio 08 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por demostrarme que se puede hacer un buen trabajo de laboratorio y divertirse al mismo tiempo.
- A la QBB Martha Josefa Burgos Tan, por su apoyo y amistad a lo largo de este tiempo.
- A mis amigos y compañeros de los diversos laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por sus consejos, confianza y amistad, pero principalmente por haber hecho que la maestría haya sido una de las mejores experiencias que la vida me ha dado.

DEDICATORIAS

A mis padres,

Principalmente a mi madre, Teresa de Jesús Espínola Novelo, por ser para mí un ejemplo de perseverancia, entrega, responsabilidad y fortaleza, por enseñarme con acciones, y no con palabras, que aunque la vida tenga sus momentos difíciles, siempre hay maneras y razones para mantenerse a flote y continuar en este camino.

A ti pa' (Pedro Pablo Baas Uicab), porque, a pesar de que por un capricho del destino no sigamos juntos, nunca has dejado de estar pendiente de las cosas que hago, por toda la confianza que depositas en mí y ¿por qué no?... también por tus regaños que me han hecho una persona de bien, supongo.

A mis hermanos,

A ti Javier, el eterno comerciante, Lupita y Liliana, mis adoradas hermanas del carácter explosivo, por todos los momentos agradables que hemos pasado, por su comprensión, cariño y apoyo.

A mis amigos,

A todos mis amigos: los QBB's, los del laboratorio, los de Kanasín, pero principalmente a ti, Jon, porque siempre has tenido tiempo para escucharme, y también una palabra de aliento cuando más lo he necesitado, por todas tus atenciones y por muchas otras razones en las que no quiero extenderme... ¡Gracias!

LISTADO DE FIGURAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	11
1.1 METABOLISMO NITROGENADO	12
1.1.1 ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO	13
1.1.1.1 GLUTAMINO SINTETASA (GS; EC 6.3.1.2)	14
1.1.1.2 GLUTAMATO 2-OXOGLUTARATO AMINOTRANFERASA O GLUTAMATO SINTASA (GOGAT-NADH; EC 1.4.1.14)	15
1.1.1.3 GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH-NADH; EC 1.4.1.2)	16
1.1.2 REGULACIÓN DE ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO	17
1.2 EL CHILE	18
1.2.1 CHILE HABANERO (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	19
1.2.1.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA	19
1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS	20
1.4 SÍNTESIS DE FENILALANINA: UNIÓN DEL METABOLISMO PRIMARIO CON EL SECUNDARIO EN <i>CAPSICUM</i>	21
1.5 CAPSAICINOIDES	21
1.5.1 PROPIEDADES Y USOS DE LOS CAPSAICINOIDES	23
1.5.2 LOCALIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS CAPSAICINOIDES	23
1.5.3 SÍNTESIS DE CAPSAICINA	25
1.5.3.1 SÍNTESIS DEL GRUPO FENÓLICO	25
1.5.3.2 SÍNTESIS DE LA CADENA LATERAL ACILO	26
1.5.4 CATABOLISMO DE LOS CAPSAICINOIDES	26
1.5.5 INFLUENCIA DEL GRADO DE DESARROLLO Y DEL AMBIENTE EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES	27
1.6 CONDICIONES DE INDUCCIÓN Y METABOLISMO SECUNDARIO	29

1.6.1 SALICILATOS Y JASMONATOS	30
1.6.2 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	31
1.7 HIPÓTESIS	36
1.8 OBJETIVO	36
1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
1.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
REFERENCIAS	38
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE PLACENTAS	47
2.1.1 DESINFESTACIÓN DEL CHILE HABANERO	47
2.1.2 INMOVILIZACIÓN DE LAS PLACENTAS DE CHILE HABANERO	47
2.2 INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CAPSAICINOIDES	48
2.2.1 CONDICIONES DE INDUCCIÓN QUÍMICA DE LA SÍNTESIS DE LOS CAPSAICINOIDES	48
2.2.2 VARIACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE NITRÓGENO	48
2.2.3 ANÁLISIS ENZIMÁTICOS	49
2.2.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GS	49
2.2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GOGAT-NADH	50
2.2.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GDH-NADH	51
2.2.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GDH-NAD ⁺	51
2.2.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	52
2.2.9 CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS	52
2.2.10 CUANTIFICACIÓN DE AMONIO	53
2.2.11 CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES	53
REFERENCIAS	54
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1. EL ÁCIDO SALICÍLICO Y EL JASMONATO DE METILO INDUJERON CAMBIOS EN LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES	57

3.2. LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE NITRÓGENO INDUJO CAMBIOS SOBRE LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES	61
3.3. EL ÁCIDO SALICÍLICO Y EL JASMONATO DE METILO NO PRODUJERON CAMBIOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO	63
3.4. LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL EN EL MEDIO DE CULTIVO MODIFICÓ LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO	66
3.5. LAS POZAS DE AMONIO Y AMINOÁCIDOS SE MANTUVIERON CONSTANTES CUANDO EL TEJIDO PLACENTARIO FUE TRATADO CON EL ÁCIDO SALICÍLICO O EL JASMONATO DE METILO	70
3.6. LAS POZAS DE AMONIO Y AMINOÁCIDOS EN EL TEJIDO PLACENTARIO SE VIERON AFECTADAS CUANDO SE MODIFICÓ LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE N EN EL MEDIO DE CULTIVO	72
3.7. DISCUSIÓN GENERAL	74
REFERENCIAS	77
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
4.1 CONCLUSIONES	81
4.2 PERSPECTIVAS	82

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. El suelo y las plantas.	11
Figura 1.2. Ciclo GS/GOGAT. El amonio incorporado es tomado por la glutamino sintetasa para la formación de glutamina, que posteriormente recibe la glutamato sintasa formando dos moléculas de glutamato.	13
Figura 1.3. Importancia económica del cultivo de chile habanero en Yucatán.	19
Figura 1.4. Planta y fruto de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).	20
Figura 1.5. Diversidad estructural de los capsaicinoides.	22
Figura 1.6. Visión general de la síntesis de los capsaicinoides en un contexto celular. A) Células productoras de capsaicinoides de la epidermis del tejido placentario. B) Modelo de la ruta biosintética de los capsaicinoides en la célula. Producción de fenilalanina en los plástidos (1 y 2), producción de la cadena acilgraso en plástidos y mitocondria (5, 6 y 7), producción de vanillilamina en el retículo endoplásmico (3 y 4) y condensación de la vanillilamina y la cadena acilgraso en el citosol (8).	24
Figura 1.7. Tejido placentario y estructuras de almacenamiento de capsaicinoides en frutos de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.). La imagen de la derecha es una micrografía electrónica de barrido, con acercamiento de 100 μ m, proporcionada por: M.C. L.A. Castro-Concha.	25
Figura 1.8. Esquema actual de la ruta biosintética de los capsaicinoides. Las enzimas se encuentran adyacentes a la reacción que catalizan. Pal, Fenilalanina amonio liasa; Ca4H, Ácido cinámico 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato CoA ligasa; HCT, hidroxicinamoil transferasa; C3H, cumaroil quinato 3-hidroxilasa; COMT, Ácido caféico O-metiltransferasa; pAMT, aminotransferasa; BCAT, transferasa de los aminoácidos ramificados; Kas, 3-ceto-acil ACP sintasa; ACL, proteína acarreadora de los grupos acilo; Fat, acil-ACP tioesterasa; ACS, acil-CoA sintetasa; CS, capsaicina sintasa.	28
Figura 1.9. Modelo de transducción de señales en la expresión del gen de la	33

estrctosidina sintasa durante la inducción de la síntesis de alcaloides indol terpénicos en *Catharanthus roseus*.

Figura 1.10. Modelo esquemático propuesto que ilustra el rol central de NPR1 en la expresión de genes que responden al ácido salicílico. 33

Figura 1.11. Visión general de la biosíntesis del ácido jasmónico y su señalización, durante un estrés biótico o abiótico, incluyendo sus interacciones con el ácido salicílico y auxinas en *Arabidopsis* (Kazan y Manners, 2008). 34

Figura 1.12. Diagrama de la estrategia experimental. DPA, días posteriores a la antesis; MS, medio Murashige y Skoog; AS, ácido salicílico; MeJa, jasmonato de metilo. 37

CAPÍTULO 3.

Figura 3.1. Efecto del tratamiento con ácido salicílico sobre el contenido de capsaicinoides totales por matraz en cultivos *in vitro* de placentas. A) Se muestra el efecto de los tres tratamientos (5, 50 y 500 μM) y B) Se muestra solamente al testigo y el tratamiento con 500 μM en el que se observó el mayor efecto sobre la acumulación de los capsaicinoides. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. 58

Figura 3.2. Efecto del tratamiento con jasmonato de metilo sobre el contenido de capsaicinoides totales por matraz en cultivos *in vitro* de placentas de *Capsicum chinense* Jacq. A) Se muestra el efecto de los tres tratamientos (5, 50 y 500 μM) y B) Se muestra solamente al testigo y el tratamiento en donde se observó el mayor efecto sobre la acumulación de dihidrocapsaicina. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. 60

Figura 3.3. Efecto de la variación de la concentración total de N sobre la 63

acumulación de capsaicinoides totales por matraz en cultivos *in vitro* de placentas de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.4. Efecto del AS sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. A) GS, B) GOGAT-NADH, C) GDH-NADH y D) GDH-NAD⁺. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. **64**

Figura 3.5. Efecto del MeJa sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. A) GS, B) GOGAT-NADH, C) GDH-NADH y D) GDH-NAD⁺. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. **65**

Figura 3.6. Efecto de la variación de la cantidad total de nitrógeno sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. A) GS, B) GOGAT-NADH, C) GDH-NADH y D) GDH-NAD⁺. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. **69**

Figura 3.7. Efecto del A) ácido salicílico y del B) jasmonato de metilo sobre la poza de amonio en placentas cultivadas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. **71**

Figura 3.8. Efecto del A) ácido salicílico y del B) jasmonato de metilo sobre la poza de aminoácidos en placentas cultivadas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar. **71**

Figura 3.9. Efecto de la variación de la concentración total de N sobre las pozas de A) amonio y B) aminoácidos en placentas cultivadas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL **73**

de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

RESUMEN

La placenta es el tejido donde se sintetizan y acumulan los capsaicinoides en los chiles picantes. Estos compuestos son los causantes del gran picor característico de los chiles habaneros (*Capsicum chinense* Jacq.) Además, los capsaicinoides tienen un alto valor comercial debido a su amplio espectro de aplicaciones industriales. Para la síntesis de estas arilamidas, se requieren moléculas que contienen nitrógeno (fenilalanina, valina y leucina), por lo tanto la disponibilidad de este elemento puede afectar el picor a través de su contenido en los tejidos del fruto. Adicionalmente, se ha reportado que la síntesis y acumulación de los capsaicinoides también puede ser modificada por la adición de ciertos inductores como el ácido salicílico y el jasmonato de metilo.

Dado que en el tejido placentario se encuentran funcionales las enzimas de asimilación de amonio [GS, GOGAT-NADH y GDH-NAD(H)], y que las placentas son capaces de seguir sintetizando capsaicinoides cuando se les mantiene aisladas en un cultivo *in vitro*, el objetivo de este trabajo fue establecer la posible relación entre la capacidad de asimilación de amonio y la capacidad de síntesis de capsaicinoides en placentas de chile habanero cultivadas *in vitro* (*Capsicum chinense* Jacq.). Para esto, se cuantificó la actividad de las enzimas de asimilación de amonio bajo diferentes condiciones que promueven la acumulación de los capsaicinoides como la adición de inductores de la síntesis de los capsaicinoides o con diferentes contenidos de N en el medio de cultivo.

Los resultados mostraron que aún cuando se provocó un aumento en la producción de los capsaicinoides mediante la adición del ácido salicílico y el jasmonato de metilo, no hubieron variaciones notables en las actividades de las enzimas de asimilación de amonio. Incluso este tejido fue capaz de mantener la síntesis de los capsaicinoides sin modificar la poza de aminoácidos o amonio. Más aún, al someter las placentas a una concentración limitada de N total, se apreció un aumento en la síntesis de capsaicinoides, pero una disminución en las actividades de las enzimas de asimilación de amonio. Estos resultados sugieren que no existe una relación directa entre el proceso de asimilación de amonio y la síntesis de capsaicinoides.

ABSTRACT

Capsaicinoids are synthesized and accumulated in the placental tissue of hot peppers. These compounds are the cause of the pungency or hotness in chili peppers. Moreover, capsaicinoids have a high commercial value, given their plethora of industrial applications. For their synthesis, molecules containing nitrogen are required, namely phenylalanine, valine and leucine, hence the availability of this element can affect the pungency level in fruits. It has been reported that the synthesis and accumulation of capsaicinoids can be modified by the addition of certain inducers of secondary metabolism, such as salicylic acid and methyl jasmonate.

Since enzymes involved in ammonia assimilation (GS, NADH-GOGAT and GDH-NAD (H)) are functional in the placenta, and this isolated tissue is able to maintain the synthesis of capsaicinoids when cultivated *in vitro*, the objective of this study was to establish the possible relationship between the ability to assimilate ammonia and the synthesis of capsaicinoids in *in vitro* cultures of placental tissue from habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). To this end, the activity of ammonia assimilation enzymes under different culture conditions, such as the addition of inducers of capsaicinoid synthesis or with different total nitrogen contents, which promote the synthesis of capsaicinoids were quantified.

Results demonstrated that even though there was an increase in capsaicinoid content when applying salicylic acid or methyl jasmonate to the placentas, there was no notable change in the activities of ammonia assimilation enzymes. This tissue was able to maintain the synthesis of capsaicinoids, without modifying the ammonia or total amino acid pools. Moreover, when the placental tissue was cultured in a media where the total nitrogen concentration had been lowered, there was an increase in capsaicinoid content, but a decrease in the activity of ammonia assimilation enzymes. These results suggest that there is no direct relation between the activities of ammonia assimilation enzymes and the synthesis of capsaicinoids in placentas from *C. chinense* Jacq.

INTRODUCCIÓN

Sin duda alguna, las plantas son los más eficientes laboratorios de síntesis química conocidos hasta ahora por el hombre. Se obtienen de ellas una gran parte de los productos que se utilizan en la vida cotidiana, como alimentos, medicinas, fibras para ropas, colorantes, etc. (Bourgaud *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2001).

Algunos compuestos utilizados en la medicina y en diferentes procesos industriales, se producen en muy bajas concentraciones en las plantas y se les han denominado metabolitos secundarios (Ganget y Memelink, 2002). Éstos metabolitos llegan a alcanzar un alto valor en el mercado, por lo que existe un gran interés en aumentar su rendimiento a partir de las fuentes naturales (Effendi *et al.*, 2009; Paek *et al.*, 2005). En este escenario, no es de sorprender que, en las últimas décadas, gran parte del quehacer científico tenga como objetivo el comprender a fondo las vías metabólicas que utilizan las plantas para sintetizarlos (Sirkantaramas *et al.*, 2008).

El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado tener un gran potencial en este sentido (Arias Zabala *et al.*, 2009). Desafortunadamente, la síntesis de estos compuestos se lleva a un nivel muy bajo en los cultivos *in vitro*, o no son producidos (Facchini y St-Pierre, 2005). Un factor determinante es la diferenciación de los tejidos, misma que en los sistemas de cultivo no siempre es lograda o mantenida, y que es determinante en los mecanismos de regulación de su producción (Samanani *et al.*, 2005; Bird *et al.*, 2003).

Se han utilizado diferentes estrategias para manipular el metabolismo secundario en cultivos *in vitro*, como la inmovilización, la elicitación y la ingeniería metabólica, entre las más importantes (Arias Zabala *et al.*, 2009).

Las plantas del género *Capsicum* producen un tipo de metabolitos secundarios llamados capsaicinoides, mismos que le dan su carácter picante característico (Cázares *et al.*, 2005). Si bien no todas las plantas de este género los producen, existen otras, como *Capsicum chinense* Jacq., que se caracterizan por su alto contenido (Stewart Jr. *et al.*, 2007).

Actualmente, el metabolismo de los capsaicinoides está bajo un fuerte escrutinio (Mazourek *et al.*, 2009; Vázquez-Flota *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2004), pues a pesar de los avances que se han logrado en la determinación de la vía de síntesis y su regulación, aún no se sabe de qué manera influye el metabolismo primario, o la manera en qué ambos se

coordinan (Miranda-Ham *et al.*, 2007). Es por esto, que el tejido placentario de los chiles habaneros provee de un excelente modelo para abordar el estudio de la síntesis de los capsaicinoides desde un enfoque diferente del que hasta ahora se ha tenido. En la literatura, hoy día, hay pocos trabajos que intentan relacionar el metabolismo primario con el secundario (Tzin *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2006).

El metabolismo del nitrógeno es fundamental para la síntesis de los capsaicinoides (Monforte-González *et al.*, 2010; Johnson y Decoteau, 1996), y las placentas son capaces de sintetizarlos al disponer de fuentes inorgánicas cuando son mantenidas *in vitro* (Johnson *et al.*, 1990). Recientemente se demostró la funcionalidad de las enzimas de asimilación de amonio en placentas de chile habanero (Ancona-Escalante, 2009). Por esta razón, en este trabajo se planteó determinar las actividades de las enzimas de asimilación de NH_4^+ (GS/GOGAT y GDH), así como el contenido de capsaicinoides en placentas inmovilizadas en un cultivo *in vitro* bajo condiciones de inducción que promueven la acumulación de capsaicinoides tales como la adición de ácido salicílico y jasmonato de metilo, y diferentes contenidos de nitrógeno, con el fin de entender cómo este tejido coordina los eventos de síntesis de precursores y, finalmente, la síntesis de los capsaicinoides.

REFERENCIAS

- 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.
- 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 de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 62(1), 4881-4895.
- Bird, D. A., V. R. Franceschi y P. J. Facchini (2003). A tale of three cell types: Alkaloids biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. The Plant Cell, 15, 2626-2635.
- Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi y E. Gonteir (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161, 839-851.
- Cázares, E., P. L. Sánchez, F. Ramírez-Vallejo, M. Castillo-González, M. Soto-Hernández, T. Rodríguez-González y J. L. Chávez-Servia (2005). Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*Capsicum annuum*) of east-central Yucatán. Agrobiencia, 39, 627-638.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. Phytochemistry Reviews, 3(1-2), 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(5), 292-300.
- Facchini, P. y B. St-Pierre (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Current Opinion in Plant Biology, 8(6), 657-666.
- 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(4), 533-548.
- Ganget, P. y J. Memelink (2002). Transcription factor: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. Trends in Pharmacological Sciences, 23(12), 563-569.

- 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., G. A. Ravishankar y L. V. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. *Plant Science*, 70(2), 223-229.
- 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.
- 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.
- Paek, K., D. Chakrabarty y E. Hahn (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287-300.
- Samanani, N., S. U. Park y P. Facchini (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *The Plant Cell*, 17, 915-926.
- 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(1), 367-372.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki y K. Saito (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 467-477.
- Stewart Jr., 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(5), 979-991.
- 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*. *The Plant Journal*, 60(1), 156-167.

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(4), 353-360.

ANTECEDENTES

El suelo suministra soporte físico y anclaje para las plantas, así como nutrimentos de diversas clases. Sin embargo, es mucho más que un soporte pasivo o un simple reservorio de agua y sales nutritivas. Resulta ser un medio complejo que influye en la vida de la planta de muchas maneras (Figura 1.1). En el suelo, los nutrimentos y otros compuestos presentan un estado dinámico, es decir, se movilizan de manera continua mediante diversas vías, por lo que la fertilidad del suelo depende, entre otras cosas, de las tasas relativas de adición y remoción de los nutrimentos.



Figura 1.1. *El suelo y las plantas.*

Las plantas necesitan carbono, nitrógeno y oxígeno, que en la mayoría de los casos están presentes en los ambientes donde éstas se desarrollan, salvo algunas excepciones. Ciertos elementos, como el nitrógeno, el calcio, el magnesio, el potasio, el fósforo y el azufre, se requieren en grandes cantidades, por lo que se les denominan nutrimentos mayores o macronutrimentos. En contraste, otros, como el boro, el cobre, el molibdeno y el cloro, se necesitan en proporciones menores y son conocidos como micronutrimentos (Bidwell, 1983).

De estos nutrimentos, algunos se consideran esenciales, como en el caso del nitrógeno, que es un factor limitante e importante durante el crecimiento de las plantas. Este elemento tiene un lugar especial en la nutrición, no sólo debido a su elevado requerimiento, sino porque está casi completamente ausente en la roca madre de la cual

se forman los suelos. Su metabolismo es un proceso esencial para la vida, necesario para la biosíntesis de moléculas como los aminoácidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, las clorofilas y algunos metabolitos secundarios, como, por ejemplo, los capsaicinoides en las plantas del género *Capsicum* (Ruíz-Oronoz y Nieto-Roaro, 1985; Bidwell, 1983).

1.1 METABOLISMO NITROGENADO

La forma de nitrógeno suministrado a la planta es importante, pues influye sobre su crecimiento y morfología de distintas maneras (Tabatabaei *et al.*, 2008). Por esta razón, se ha llevado a cabo una exhaustiva investigación sobre el metabolismo nitrogenado, principalmente en plantas de interés comercial (Hongmei *et al.*, 2009). Sin embargo, con frecuencia los resultados obtenidos son contradictorios. Estas discrepancias probablemente se deben a diferencias en las condiciones en las cuales se llevaron a cabo los experimentos, o incluso, al material genético utilizado (Cruz *et al.*, 2006).

Los principales órganos de asimilación de nitrógeno son las hojas y la raíz, por lo que la mayoría de los trabajos realizados hasta ahora se han centrado en estos órganos. El nitrógeno es tomado en forma de NO_3^- y NH_4^+ ; sin embargo, el amonio, en altas concentraciones, puede ser tóxico para las plantas. Las causas de esta toxicidad no están claras, pero se le ha relacionado con una deficiencia en la nutrición mineral, provocada por el desajuste en la toma de cationes, la acidificación de la rizósfera, las alteraciones en el balance osmótico y las modificaciones del metabolismo hormonal (Cruz *et al.*, 2006).

En cuanto al NO_3^- , las plantas lo absorben por medio de las células de la epidermis y la corteza de la raíz. Una vez en el citoplasma, éste se almacena para su uso posterior. El NO_3^- puede seguir una de dos vías: la primera, es reducirlo a nitrito (NO_2^-) para su uso inmediato, o la segunda, donde éste es devuelto a la rizósfera (Zabalza *et al.*, 2006).

Después de haberse reducido el NO_3^- a NO_2^- , vía la nitrato reductasa (NR; EC 1.6.6.1), el NO_2^- se reduce a amonio (NH_4^+) por medio de la nitrito reductasa (NiR; EC 1.7.7.1). El NH_4^+ es entonces incorporado a ciertos aminoácidos que constituyen la poza de nitrógeno.

1.1.1 ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO

El amonio producido por la acción concertada de la NR y la NiR, el tomado del medio exterior y el de la reasimilación proveniente de la fotorespiración, fluye a través del ciclo glutamino sintetasa/glutamato sintasa (ciclo GS/GOGAT; Figura 1.2), que junto con la glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2), convierten este nitrógeno reducido a su forma orgánica. Este ciclo provee de glutamina (Gln) y glutamato (Glu), que son transportados vía vascular, desde la fuente hacia la poza, manteniendo así el estatus de N necesario para el crecimiento y el desarrollo de la planta (Feraud *et al.*, 2005). La primera enzima, que es la glutamino sintetasa (GS; EC 6.3.1.2), cataliza la formación de Gln a partir de NH_4^+ y Glu, dependiente de ATP. La Gln sirve como uno de los donadores de grupos amino para la biosíntesis de compuestos nitrogenados, como aminoácidos, nucleótidos y clorofilas. Por otro lado, la glutamino 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT; EC 1.4.1.14) cataliza la transferencia del N de la amida Gln, formada anteriormente por la GS, al α -cetoglutarato (2-OG), obteniéndose de esta manera dos moléculas de Glu. La GDH es capaz de incorporar directamente el NH_4^+ al 2-OG para producir Glu (Masclaux-Dausbresse *et al.*, 2006).

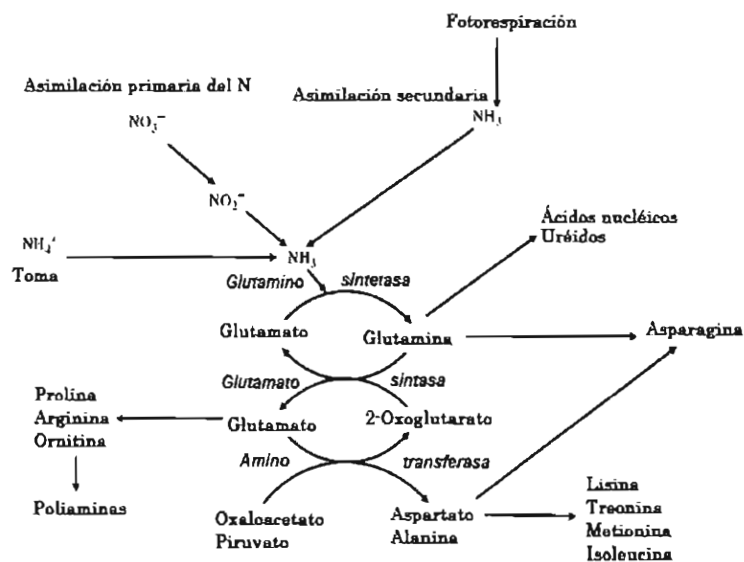


Figura 1.2. Ciclo GS/GOGAT. El amonio incorporado es tomado por la glutamino sintetasa para la formación de glutamina, que posteriormente recibe la glutamato sintasa formando dos moléculas de glutamato.

El papel de cada una de estas enzimas en la asimilación del NH_4^+ ha sido elucidado con base en el conocimiento previo de su distribución en los órganos a lo largo de varios estados de desarrollo de la planta, así como de la comprensión de sus propiedades, la regulación de su síntesis y las actividades de cada una de ellas (Lan *et al.*, 2006).

1.1.1.1 GLUTAMINO SINTETASA (GS; EC 6.3.1.2)

Se ha propuesto a la GS como un punto limitante en el ciclo GS-GOGAT, por lo que representa una enzima clave que controla la asimilación y la reasimilación del N (Kichey *et al.*, 2005). Una característica importante de la GS es su alta afinidad por el NH_4^+ , y además, su capacidad para incorporarlo eficientemente a compuestos orgánicos (Cruz *et al.*, 2006).

Las GS, que poseen una estructura decamérica, se clasifican en dos grupos dependiendo de su localización dentro de la célula: la GS_1 se encuentra en el citosol y la GS_2 en los cloroplastos (plástidos). Se ha reportado la existencia de una GS_2 y de hasta 5 GS_1 en plantas (Occhipinti *et al.*, 2010). La GS_1 y la GS_2 tienen distintas funciones en las plantas: la GS_1 participa en la asimilación primaria de NH_4^+ en raíces, y genera glutamina para ser transportada, vía floema, a través del tallo, mientras que la GS_2 se desempeña principalmente en la reasimilación del NH_4^+ formado durante la fotorespiración (Hongmei *et al.*, 2009; Masclaux-Dausbresse *et al.*, 2006).

En la mayoría de las plantas superiores existe un único gen nuclear para la GS_2 (cloroplástica); sin embargo, se han encontrado excepciones en *Glycine max* y *Medicago sativa*. En contraste, para la GS_1 (citosólica), se han descrito múltiples genes; por ejemplo, en *Oryza sativa*, se encontraron tres: OsGS1:1, OsGS1:2, OsGS1:3. La primera se expresó en todos los órganos, pero la expresión más alta fue en hojas durante el estado vegetativo. Los transcritos de la segunda, de igual manera, se encontraron en todos los órganos, aunque la expresión más alta se halló en las raíces de plántulas, mientras que la última se expresó específicamente en la espiguilla del arroz (Hongmei *et al.*, 2009). Esto demuestra que cada una de las isoenzimas posee un papel diferente dentro del metabolismo nitrogenado.

1.1.1.2 GLUTAMATO 2-OXOGLUTARATO AMINOTRANFERASA O GLUTAMATO SINTASA (GOGAT-NADH; EC 1.4.1.14)

Existen dos formas de GOGAT, una dependiente del poder reductor proporcionado por la ferredoxina (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1), y otra, del NADH (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) Ambas enzimas se localizan en los cloroplastos o plástidos. La Fd-GOGAT se encuentra predominantemente en las hojas, por lo que su desempeño es fundamental en la reasimilación del NH_4^+ durante la fotorespiración, mientras que la GOGAT dependiente de NADH, se encuentra en las semillas en germinación, las raíces y los brotes etiolados (Feraud *et al.*, 2005; Keiki *et al.*, 2003).

La Fd-GOGAT puede llegar a representar hasta el 1% de las proteínas de las hojas. La purificación de esta enzima en arroz reveló una estructura compuesta de dos subunidades de 115 KDa cada una (Hayakawa *et al.*, 1993). No obstante, en otras plantas, sólo se ha logrado detectar la presencia de una glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, con una masa molecular que oscila entre los 145 y los 185 KDa (Commere *et al.*, 1986). Esta enzima posee un grupo de flavin mononucleótido (FMN) y un centro sirohemo [3Fe-4S] por molécula. La actividad catalítica, por holoenzima, está dividida en cuatro dominios distintos: dos dominios amidotransferasa (GAT), que llevan a cabo la hidrólisis de la glutamina, y dos dominios sintasa (Lea y Mifflin, 2003).

El dominio GAT lleva a cabo la hidrólisis de la glutamina, liberándose así la primera molécula de glutamato. Posteriormente, el NH_4^+ generado es conducido a través de un canal situado dentro de la molécula hacia el dominio sintasa. En este dominio reacciona el 2-OG con el NH_4^+ para formar el 2-iminoglutarato (2-IG), que finalmente es convertido en la segunda molécula de Glu por la acción reductiva del FMN presente en este mismo dominio (Lea y Mifflin, 2003).

Por su parte, la NADH-GOGAT es un monómero de 196-200 KDa (Esposito *et al.*, 2005). También se han detectado formas de esta enzima dependientes de NADPH. Sorprendentemente, esta enzima es similar a la encontrada en bacterias. En *Azospirillum brasilense*, la estructura y la función de la NADH-GOGAT se ha estudiado a detalle, encontrándose que esta proteína está compuesta por dos subunidades, α y β , de 142 y 52.3 KDa, respectivamente. Se ha propuesto que la subunidad α funciona de manera semejante a la Fd-GOGAT, salvo que los electrones necesarios para la reducción son proporcionados por la subunidad β . Esta última subunidad funciona como una flavin

adeninucleótido (FAD) dependiente de una NAD(P)H oxidoreductasa, la cual transfiere finalmente los electrones a la subunidad α . Se ha propuesto que en plantas superiores, estas dos subunidades están combinadas en un solo polipéptido, por una región conectora de 60 aminoácidos (Lea y Mifflin, 2003).

1.1.1.3 GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH-NADH; EC 1.4.1.2)

Una ruta alternativa para la asimilación de NH_4^+ es la aminación reductiva del 2-oxoglutarato, catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Esta enzima lleva a cabo una reacción reversible, que consiste en la desaminación oxidativa del Glu con la participación del NAD(P)H. La GDH está presente en todos los organismos vivos (Aubert *et al.*, 2001). En las plantas, a nivel subcelular, la GDH se encuentra en las mitocondrias, asociada con las membranas, pero además, también se ha reportado la existencia de una NADPH-GDH en los cloroplastos, fuertemente unida a las membranas de los tilacoides (Kwinta y Bielawski, 1998).

La GDH es una enzima que consta de 4-6 subunidades con una masa molecular de entre 208 y 310 KDa, y sus isoformas están determinadas por el número y tipo de estas subunidades. Las funciones fisiológicas de cada una de estas GDH se relacionan estrechamente con la existencia de una isoforma en un tejido en particular. En avena, se han reportado 1 ó 2 isoformas (Barash *et al.*, 1975), siete en *Arabidopsis thaliana* (Cammaerts y Jacobs, 1983) y uvas (Loulakakis y Roubelakis-Angelakis, 1996), y catorce en alfalfa (Kwinta y Bielawski, 1998). Se ha revelado que la cantidad de isoformas de la GDH puede cambiar durante el desarrollo y la maduración de la planta, así como durante el estrés causado por deficiencia de luz y la nutrición con varias formas de N (Dubois *et al.*, 2003).

La GDH cataliza una reacción reversible y el sentido en el que actúa esta enzima está dado por la proporción relativa de las diferentes subunidades presentes. Mientras que las subunidades α le dan a la enzima un carácter anabólico, las β le otorgan uno catabólico. Por tanto, la prevalencia de las subunidades α confiere a la GDH un sentido hacia la formación de glutamato a partir de 2-OG (Kwinta y Bielawski, 1998).

1.1.2 REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO

En plantas, la actividad de la GS se regula a nivel de la transcripción y por recambio de la enzima, y los factores que afectan de manera positiva o negativa su actividad son la luz, y el tipo y la disponibilidad de la fuente nitrogenada, principalmente, al igual que para la GOGAT (Gómez-Maldonado *et al.*, 2004). La GS₁ está codificada por una familia de genes que dan lugar a varias isoenzimas, por lo que su funcionamiento y regulación son más complejos que para la GS₂. Las isoenzimas están reguladas diferencialmente por el estadio de desarrollo y las condiciones ambientales (El Omari *et al.*, 2010). Por ejemplo, en pino se han encontrado dos GS₁, denominadas GS1a y GS1b, que se expresan diferencialmente durante la germinación y el desarrollo temprano de la plántula (Rana *et al.*, 2008). Por otro lado, también en pino, la GS citosólica está bajo la regulación del ácido giberélico, y el promotor del gen correspondiente interactúa con un factor de transcripción tipo MYB (Gómez-Maldonado *et al.*, 2004). Sin embargo, los niveles de expresión de la GS citosólica de *Camellia sinensis* no se modificaron por acción del ácido giberélico (GA₃), empero, el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (AS) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sí estimularon la expresión de este gen (Rana *et al.*, 2008). Sobre este mismo tema, el jasmonato de metilo (MeJa), otro fitorregulador, influye en la asimilación de NH₄⁺ en hojas de arroz, aunque de un modo diferente. La disminución de la actividad de la GS correspondió con el aumento de la actividad de las proteasas, por lo cual le fue adjudicada a estas últimas la disminución de esta actividad (Hung y Kao, 2007).

Como se ha determinado para la GS, cada una de las GOGAT posee un papel diferente en la planta. Por lo tanto, se podría esperar que la regulación fuera también diferencial. En este sentido, mientras que la luz y la sacarosa regulan positivamente la expresión del gen *Glu1*, que codifica para la Fd-GOGAT en *Nicotiana tabacum* (Feraud *et al.*, 2005), el NH₄⁺ induce la acumulación de los transcritos, así como de la proteína, de la NADH-GOGAT en diferentes tipos de células en las raíces de arroz. Los transcritos de la NADH-GOGAT se acumularon en las células del esclerénquima, mientras que la proteína se localizó principalmente en las células de la epidermis y la exodermis. De este modo, es probable que la traducción de los mRNA de la NADH-GOGAT se lleve a cabo en las células del esclerénquima, y posteriormente, esta proteína sea transportada a las células de la epidermis y la exodermis de la raíz (Keiki *et al.*, 2003).

Por su parte, la actividad de la GDH se modifica en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico. Por ejemplo, la oscuridad, el exceso de NH_4^+ o la deficiencia de sacarosa. La actividad de la GDH se incrementa cuando hay un exceso de amonio, así como una deficiencia en la síntesis de carbohidratos. Durante el almacenamiento de carbono, la actividad de la GDH se incrementa para que la desaminación del glutamato provea de 2-oxoglutarato al ciclo de Krebs (Stitt *et al.*, 2002). Muy a pesar del avance que se ha tenido en la comprensión de la GDH, aún existen discrepancias entre la actividad de la enzima medida *in vitro*, y su posible papel *in vivo* (Watanabe *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 2003).

La actividad de la GDH también se regula por acción de MeJa, el AS y el etileno. La transcripción de la subunidad α de la GDH se incrementó cuando hojas de *Brassica napus* fueron sometidas a estrés por daño mecánico, y este aumento pudo ocurrir de modo dependiente o independiente de la acción de los compuestos mencionados (Watanabe *et al.*, 2007).

1.2 EL CHILE

Se conocen como chiles a los frutos de las plantas del género *Capsicum*. Estos son apreciados por su picor, su sabor y su aroma característico, mismos atributos por lo que son muy utilizados en la gastronomía de nuestro país. El chile es un producto que distingue a la gastronomía mexicana de las demás, siendo una hortaliza que nos confiere identidad cultural. El chile tiene su origen en las regiones tropicales y subtropicales de América. México es uno de los principales centros de origen y domesticación del género *Capsicum*, en particular de la especie *C. annum*, como lo indican vestigios arqueológicos de semillas encontradas en el valle de Tehuacán, Puebla, con una antigüedad de 8,500 años. Actualmente, se reconocen cinco especies domesticadas del género *Capsicum*: *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens*, y más de veinte silvestres (Cázares *et al.*, 2005).

En el país, existen variantes poco conocidas, pero de gran importancia regional: los tipos habanero (*C. chinense* Jacq.), Ya'x ik (chile verde), Xcat ik, Dulce, Chowak, Picopaloma, Sukurre (*C. annum* L.), que se cultivan en las milpas y huertos familiares de traspatio en Yucatán, así como el tipo Ma'x ik (*C. annum* var. *aviculare*), que se

encuentra como planta protegida en los solares en forma semi-silvestre (Cázares *et al.*, 2005).

1.2.1 CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

El cultivo del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es muy importante económica y culturalmente en el estado de Yucatán (Figura 1.3). Tan sólo de 2000 a 2009, el volumen de producción de chile habanero se incrementó de 94 a 2,904 toneladas, sumando los cultivos de riego y temporal (SAGARPA, 2010). Este aumento en la producción radica en la demanda que tiene principalmente por su picor, producto de los capsaicinoides.



Figura 1.3. Importancia económica del cultivo de chile habanero en Yucatán.

1.2.1.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

El chile habanero posee una raíz principal de tipo pivotante, la cual profundiza de 0.40 a 1.20 m, con raíces secundarias extendidas en el suelo. Su tallo es erecto, de color verde, con o sin coloración violeta de los nudos. Posee 4 ramas primarias y 4 secundarias, carece de pubescencia, aunque a veces puede estar cubierto de pelos o tricomas. Las plantas de *C. chinense* crecen de 0.3 a 1.2 m, dependiendo de la variedad (Figura 1.4). La planta tiene de dos a cinco flores por nódulo, con pedicelos generalmente declinantes, pero los hay erectos también. El cáliz carece de dientes, es liso pero presenta una indentación marcada entre la base y el pedúnculo. El color más común de la

corola es amarillo verdoso o blanco verdoso, y las anteras son azules (Alpizar *et al.*, 2003). El fruto puede ser de forma esférica o alargada, con pericarpio liso o arrugado. Ciertos cultivares tienen forma de trompo, con áreas hundidas. El color del fruto puede ser blanco, naranja, amarillo, salmón, rojo o café. En la base del fruto es característico que el cáliz presente una constricción anular. Las semillas son arrugadas, color paja, irregularmente con bordes salientes y ondulados (González-Salan y Orellana-Polanco, 2005).



Figura 1.4. Planta y fruto de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios pueden definirse como aquellos compuestos que no tienen un papel vital en el proceso de desarrollo del organismo que los produce, pero que sí proporcionan una ventaja adaptativa. Su distribución está más restringida que la de los productos del metabolismo primario, puesto que sólo pueden encontrarse en unas cuantas especies, o incluso, dentro de unas pocas variedades de una misma especie. Con frecuencia, su producción es baja, y esto depende principalmente de la especie que los sintetiza, así como del estado fisiológico de la planta. Estos compuestos poseen comúnmente un patrón de acumulación tejido-específico (Verpoorte *et al.*, 2002).

1.4 SÍNTESIS DE FENILALANINA: UNIÓN DEL METABOLISMO PRIMARIO CON EL SECUNDARIO EN *CAPSICUM*

Las placentas de los chiles son capaces de sintetizar capsaicinoides a partir de N inorgánico como única fuente de este elemento, cuando son aisladas en un cultivo *in vitro* (Johnson *et al.*, 1990). Este hecho hace suponer que poseen todas las enzimas necesarias para convertir NO_3^- y NH_4^+ en fenilalanina, y posteriormente, en capsaicina.

La fenilalanina sólo se sintetiza en plantas, hongos y microorganismos, sirve como constituyente de proteínas y como intermediario metabólico de un amplio rango de compuestos aromáticos (Cho *et al.*, 2007; Lancien *et al.*, 2007). En plantas vasculares, algunos de los metabolitos secundarios fisiológicamente importantes, derivados de este aminoácido, incluyen pigmentos y moléculas de defensa (flavonoides, proantocianinas, lignanos oligoméricos, cianidinas, etc.), fitoalexinas (isoflavonas), protectores de UV, así como ligninas estructurales y biopolímeros de suberina (Eckart, 2008). Considerando todo lo anterior, el metabolismo de la fenilalanina *in planta* puede abarcar alrededor del 30 al 40% del carbono orgánico, dependiendo de la especie (Cho *et al.*, 2007).

En el género *Capsicum*, la síntesis de fenilalanina es un proceso muy importante, porque es el punto de partida de la ruta de los fenilpropanoides, del cual derivan los capsaicinoides (Miranda-Ham *et al.*, 2007).

1.5 CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides son amidas ácidas formadas por la condensación de ácidos grasos de 9 a 11 carbonos y vanillilamina; éstos también son conocidos como arilamidas o amidas aromáticas. En este punto es importante mencionar, dado que se hará referencia muchas veces a este concepto, que la acumulación de estos metabolitos es un proceso dinámico que depende de su síntesis, conjugación y catabolismo (Díaz *et al.*, 2004).

El picor es heredado como un carácter dominante, debido a la acción del alelo *C*. El *locus C* fue recientemente localizado en el cromosoma 2 del chile (Blum *et al.*, 2002). Aunque es esencial para la acumulación de los capsaicinoides, el *locus C* sólo determina la ausencia o la presencia de picor. El grado de picor es cuantitativamente heredado y se ve afectado de manera significativa por el ambiente (Aluru *et al.*, 2003).

La capsaicina y la dihidrocapsaicina son los principales capsaicinoides en la mayoría de las variedades de chiles, pues juntos llegan a representar más del 90% del total de estos compuestos (Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Se sintetizan en el tejido placentario (García-Galindo *et al.*, 1995).

Las principales diferencias entre los capsaicinoides son: la longitud de la cadena acil graso, la presencia o ausencia de dobles enlaces, el punto de ramificación y su picor relativo. La mayoría de ellos son picantes, pero también hay los que no lo son, como la ω -hidroxycapsaicina (Díaz *et al.*, 2004).

La capsaicina (vanillilamida del ácido 8-metil-trans-6-enoico), la dihidrocapsaicina (vanillilamida del ácido 8-metilnonanoico), la nordihidrocapsaicina I (vanillilamida del ácido del ácido 9-metildec-trans-7-enoico), la homodihidrocapsaicina I (vanillilamida del ácido 9-metildecanoico) y la homocapsaicina son los capsaicinoides más frecuentemente encontrados en los chiles (Cázares *et al.*, 2005). No obstante, existen otros menos conocidos como: la homodihidrocapsaicina II, la homocapsaicina II, las vanillilamidas de los ácidos octanoico, nonanoico y decanoico, la bishomocapsaicina, la trishomocapsaicina, la zucapsaicina (civamida), la nonivamida y la ω -hidroxycapsaicina (Figura 1.5).

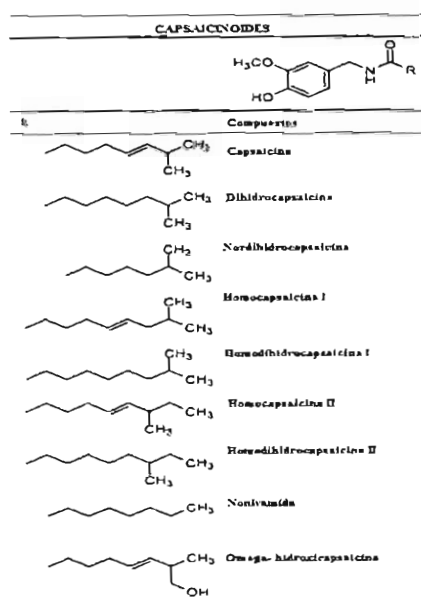


Figura 1.5. Diversidad estructural de los capsaicinoides.

1.5.1 PROPIEDADES Y USOS DE LOS CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides tienen ciertas propiedades que los hacen útiles en las industrias farmacológica, alimentaria y de pesticidas (Johnson Jr., 2007). Los mamíferos pueden percibir el picor de los capsaicinoides debido a los receptores para vainilloides (Lang *et al.*, 2009).

Se ha identificado y clonado un receptor vainilloide subtipo 1 (VR1) que percibe a la capsaicina. VR1 es un canal catión no-selectivo, localizado en la membrana plasmática, activado por calor y capsaicinoides, que incrementan su permeabilidad a sodio y calcio (Caterina *et al.*, 1987). La respuesta al picor en mamíferos provoca inflamación neurogénica, por lo que los capsaicinoides tienen efectos analgésicos y antiinflamatorios, mismos que han sido explotados en el uso tópico de cremas y geles (Suhr, 2002). Un aspecto controversial es la relación de la capsaicina con los procesos de tumoración, pues algunos estudios sugieren que tiene efectos carcinogénicos, y otros, que tiene propiedades antitumorales. Las propiedades anticarcinogénicas parecen estar relacionadas con su capacidad para inducir apoptosis, la cual está mediada a través de las especies reactivas de oxígeno, generadas principalmente en la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias (Ochi *et al.*, 2003). Los capsaicinoides han sido señalados como potentes antioxidantes, y muestran actividades antimicrobiales y antifúngicas. También se ha reportado su uso en la industria agroquímica (Díaz *et al.*, 2004).

1.5.2 LOCALIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS CAPSAICINOIDES

La ruta de biosíntesis de los capsaicinoides fue revisada recientemente (Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Se encuentra localizada en ciertas células del tejido placentario de los chiles, relacionadas al tejido epidérmico (Suzuki e Iwai, 1984; Susuki *et al.*, 1980). Estos capsaicinoides, una vez sintetizados en un proceso que involucra a la mitocondria, los plástidos, el retículo endoplásmico (ER) y el citosol, son excretados al espacio intercelular, entre la cutícula y la epidermis, formando unas vesículas que miden entre 0.15 y 0.1 μm de diámetro. Estas vesículas migran a través del citoplasma hasta llegar a la membrana citoplasmática con la cual se fusionan, excretando así a los capsaicinoides en ellas contenidos. La presión ejercida por los capsaicinoides depositados en este espacio, crea

una serie de estructuras denominadas ampollas, causadas por el desajuste de la pared celular y la cutícula (Zamsky *et al.*, 1987; Figura 1.6).

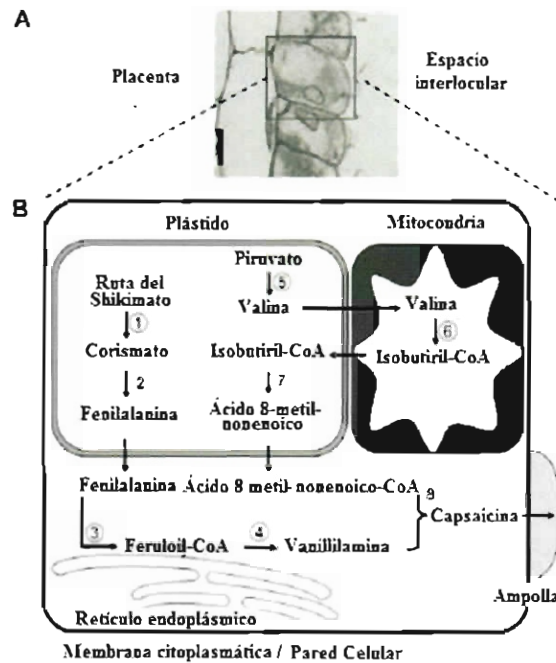


Figura 1.6. Visión general de la síntesis de los capsaicinoides en un contexto celular. **A)** Células de la epidermis del tejido placentario productoras de capsaicinoides. **B)** Modelo de la ruta biosintética de los capsaicinoides en la célula. Producción de fenilalanina en los plástidos (1 y 2), producción de la cadena acilgraso en plástidos y mitocondria (5, 6 y 7), Producción de vanillilamina en el retículo endoplásmico (3 y 4) y condensación de la vanillilamina y la cadena acilgraso en el citosol (8).

El tejido placentario es el lugar de síntesis de los capsaicinoides (Lindsey y Yeoman, 1984). Placentas aisladas, mantenidas *in vitro*, fueron capaces de mantener la síntesis de capsaicina al agregárseles fenilalanina y valina marcadas con ^{14}C (Lindsey y Yeoman, 1984). Por otro lado, se han identificado y aislado 13 genes involucrados en el proceso de síntesis de capsaicina, logrando establecer que su expresión es específica para la placenta de las variedades picantes (Stewart *et al.*, 2005). Además, parte de las

enzimas que llevan a cabo la síntesis de la cadena lateral acilo de la capsaicina se encuentran en las células epidérmicas de la placenta (Figura 1.7; Suzuki *et al.*, 1980).

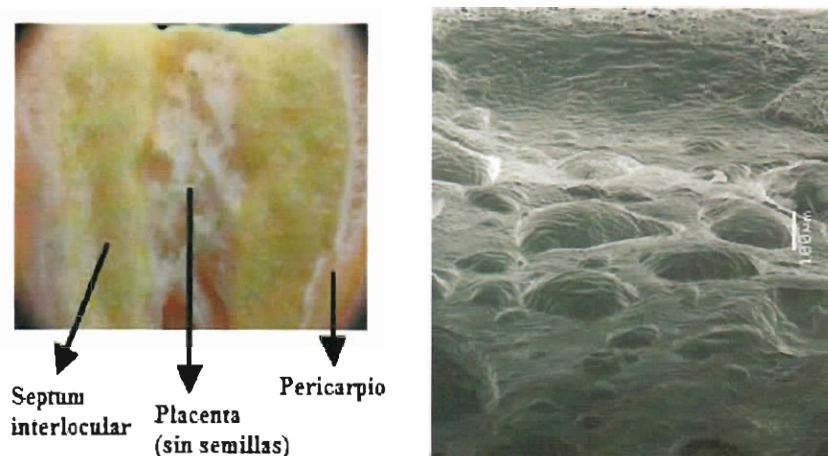


Figura 1.7. Tejido placentario y estructuras de almacenamiento de capsaicinoides en frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). La imagen de la derecha es una micrografía electrónica de barrido, con acercamiento de 100 μm , proporcionada por M.C. L.A. Castro-Concha.

1.5.3 SÍNTESIS DE CAPSAICINA

1.5.3.1 SÍNTESIS DEL GRUPO FENÓLICO

El grupo fenólico de la capsaicina es la vainillilamina, y es sintetizado a partir de la fenilalanina, que se convierte de manera secuencial en los ácidos *trans* cinámico, cumárico, caféico y ferúlico. Las enzimas que intervienen, son en el mismo orden: fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.24), cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H, EC 1.14.13.11), cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H), y ácido caféico metiltransferasa (COMT, EC 2.1.1.6; Figura 1.8).

1.5.3.2 SÍNTESIS DE LA CADENA LATERAL ACILO

Se propone que la cadena lateral acilo (ácido 8-metil 6 nonenoico) de la capsaicina se forma a partir de valina (Aluru *et al.*, 2003). Este aminoácido es inicialmente desaminado por acción de la transferasa de los aminoácidos ramificados (BCAT, EC 2.6.1.42). Esta catálisis produce el α -cetoisovalerato, que 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 la 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 la 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 el ácido acil-graso es liberado después del tercer ciclo de condensación (Aluru *et al.*, 2003; Figura 1.8).

Finalmente, la unión de esta ruta convergente da lugar a la capsaicina, por acción de una aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (Figura 1.8; Stewart *et al.*, 2007).

1.5.4 CATABOLISMO DE LOS CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides se consideran productos finales de una vía metabólica y se pensó durante años, que una vez sintetizados, se mantenían sin recambio. No obstante, cada vez hay más evidencia de que los capsaicinoides puedan sufrir modificaciones, e incluso se degradan, a lo largo del desarrollo del fruto (Díaz *et al.*, 2004).

Se sugiere que la disminución de los capsaicinoides, al final del desarrollo de los frutos, se debe a su conjugación con azúcares y otros compuestos, ya que constituye una estrategia eficiente de almacenamiento de otros compuestos fenólicos hasta el momento en que son requeridos. El único reporte publicado a este respecto es el de Calva-Calva *et al.* (1995), quienes observaron la formación de un glucósido de capsaicina incompletamente caracterizado y otros glucósidos putativos de capsaicina en células en suspensión de *C. chinense*.

Otra posibilidad para la disminución en el contenido de capsaicinoides es la oxidación dependiente de peroxidasas (Díaz *et al.*, 2004). Se propone que la degradación

de la capsaicina y la dihidrocapsaicina se lleva a cabo con la participación de peroxidases (EC 1.11.1.7), dado que el grupo vainillil de la capsaicina puede ser fácilmente oxidado por estas enzimas (Zapata *et al.*, 1992). El primer reporte de oxidación de capsaicina por una peroxidasa fue publicado por Boersch *et al.* (1991), y poco tiempo después, Bernal *et al.* (1993a, b) reportaron la oxidación de capsaicina y dihidrocapsaicina por una peroxidasa de Chile. No obstante, todos estos reportes se basan en datos *in vitro* y los presuntos productos obtenidos de la oxidación de la capsaicina no se han aislado de tejidos (Díaz *et al.*, 2004).

1.5.5 INFLUENCIA DEL GRADO DE DESARROLLO Y DEL AMBIENTE EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES

En los chiles, la cantidad de capsaicinoides es muy variable, lo que puede ser consecuencia del grado de desarrollo, o incluso, por la localización de los frutos en la planta (Lee *et al.*, 2006). De igual manera, los factores ambientales también influyen. Es notable el hecho de que plantas con un mismo fondo genético, bajo condiciones ambientales variables, pueden presentar una acumulación diferente de estos metabolitos (Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Algunos de los factores ambientales a los que antes se hace referencia son: la limitación de agua, la disponibilidad de N y K en el suelo (Johnson y Decoteau, 1996), las heridas causadas a los frutos, etc. Vale la pena mencionar también que muchos de los productos finales de la ruta de los fenilpropanoides, de la cual se desprenden los intermediarios biosintéticos de los capsaicinoides, se acumulan en respuesta a diferentes condiciones ambientales adversas (Xiao *et al.*, 2009; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

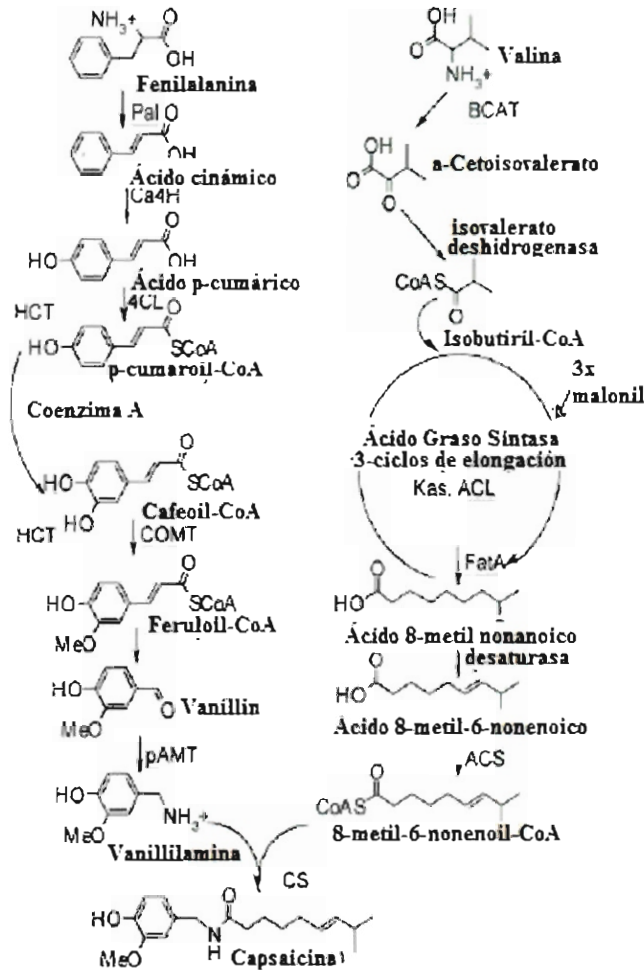


Figura 1.8. Esquema actual de la ruta biosintética de los capsaicinoides. Las enzimas se encuentran adyacentes a la reacción que catalizan. Pal, Fenilalanina amonio liasa; Ca4H, Ácido cinámico 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato CoA ligasa; HCT, hidroxicinamoil transferasa; C3H, cumaroil quinato 3-hidroxilasa; COMT, Ácido caféico O-metiltransferasa; pAMT, aminotransferasa; BCAT, transferasa de los aminoácidos ramificados; Kas, 3-ceto-acil ACP sintasa; ACL, proteína acarreadora de los grupos acilo; Fat, acil-ACP tioesterasa; ACS, acil-CoA sintetasa; CS, capsaicina sintasa.

1.6 CONDICIONES DE INDUCCIÓN Y METABOLISMO SECUNDARIO

En la naturaleza las plantas están expuestas a un gran número de condiciones adversas, como son las interacciones con insectos o patógenos (hongos, bacterias y virus), el frío, la sequía, la contaminación, etc. A pesar de no poseer movilidad, ni un sistema inmune, son capaces de responder a estas condiciones al activar mecanismos de defensa para detener o contrarrestar sus consecuencias deletéreas (Smith *et al.*, 2009).

Los mecanismos de defensa operan de forma constante en la planta y se basan en el uso de herramientas de dos tipos: 1) Las estructurales, que constituyen una cubierta protectora en la superficie de todos los tejidos (Smith *et al.*, 2009) y 2) las químicas que están basadas en la producción de una gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos, derivadas del metabolismo secundario; por ejemplo: alcaloides, fenoles simples o polifenoles (taninos), aceites esenciales y terpenos en general (Smith *et al.*, 2009). Ambos tipos de herramientas proporcionan a las plantas la capacidad de detener la entrada de la gran mayoría de los patógenos a los que se ven expuestas. Sin embargo, en algunas ocasiones se ven superadas.

Las plantas pueden activar sus mecanismos de defensa una vez que el patógeno ha sido reconocido. Uno de los primeros eventos que ocurren, a los pocos minutos, es la producción de especies reactivas de oxígeno en la pared celular, lo que se ha denominado como explosión oxidativa. El H_2O_2 y otras especies oxidantes se difunden al interior de la célula y activan una vía de transducción de señales que se propaga hasta el núcleo, en donde se induce la expresión de genes de defensa (Zhao *et al.*, 2005).

También se acumulan el etileno, los jasmonatos y el óxido nítrico. Estas moléculas, en conjunto con las especies reactivas de oxígeno, activan otras vías de transducción de señales que llevan a la expresión de genes involucrados en la síntesis de compuestos fenólicos (precursores de lignina y ácido salicílico) y de fitoalexinas. El ácido salicílico (AS) actúa, por una parte potenciando la expresión de genes que protegen del daño oxidativo, y por otra, activando vías de transducción que llevan a la expresión de genes que codifican para enzimas que degradan la pared celular de bacterias y hongos (α -1,3-glucanasas y quitinasas) (Zhao *et al.*, 2005).

Por lo tanto, ya que una de las funciones de los metabolitos secundarios es la de proteger a las plantas del ataque de múltiples agresores, algunas de las estrategias

biotecnológicas para aumentar la producción de éstos se basan precisamente en este principio: en la adición de inductores, o compuestos señales intermediarios, a diversas formas de cultivo de tejidos, o directamente sobre la planta, para estimular positivamente el metabolismo secundario. A pesar de que la productividad obtenida mediante esta técnica en cultivos *in vitro* es raramente competitiva como para aplicarla a una escala comercial, para los fines de la investigación básica es una herramienta muy importante (Zhao *et al.*, 2005).

En general, se considera como un inductor a una especie química o un biofactor, proveniente de diversas fuentes, que es capaz de iniciar una respuesta fisiológica, morfológica y la acumulación de fitoalexinas en un organismo vivo dado (Arias-Zabala *et al.*, 2009).

Los mecanismos activos de inducción se consideran como específicos y complejos. El efecto de los inductores depende de muchos factores, como su concentración, la edad del explante y el tiempo de inducción. Los inductores se clasifican en dos grupos, desde el punto de vista de su origen: endógenos, los cuales provienen de compuestos estructurales de la planta, como son los ácidos oligourónicos, los ácidos oligogalacturónicos y los compuestos unidos a lignina; y los exógenos, derivados de microorganismos, como el quitosano y sus oligómeros (componente de la pared celular del micelio), los β -glucanos y las glucoproteínas (Zhao *et al.*, 2005).

Algunos de los metabolitos secundarios de importancia comercial son: la capsaicina, la dihidrocapsaicina, la atropina, la hiosciamina, la escopolamina, la vinblastina, la vincristina, la nicotina, la codeína, la morfina, la quinina, la quinidina, y el ácido rosmarínico, entre otros (Xiao *et al.*, 2009; Raskin *et al.*, 2002; García-Galindo *et al.*, 1995). Por lo tanto, dada la importancia económica de la capsaicina, en *Capsicum* se han descrito ensayos exitosos al utilizar homogeneizados fúngicos (*Gliocladium deliquescens*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus oligosporus*) en células inmovilizadas y tejidos de *C. frutescens* (Sudha y Ravishankar, 2003; Holden y Yeoman, 1994; Johnson *et al.*, 1991).

1.6.1 SALICILATOS Y JASMONATOS

Algunas moléculas químicas que son útiles para el crecimiento y el desarrollo de la planta tienen un papel importante en la integración de varias señales de estrés. Como se

mencionó anteriormente, pueden controlar la respuesta de defensa bajo una condición adversa, modulando la maquinaria de expresión génica. Estos mediadores incluyen al calcio (Ca^{2+}), los nucleótidos cíclicos, los polifosfoinosítidos, el óxido nítrico (NO), los azúcares, el ácido abscísico (ABA), las poliaminas, el ácido salicílico (AS) y los jasmonatos (JA). Moléculas, como AS y JA, son piezas claves durante la inducción del metabolismo secundario, por lo que se ha reportado que la adición de estos compuestos, *in vivo* o *in vitro*, mejoran los rendimientos de los metabolitos secundarios obtenidos en las plantas (Zhao *et al.*, 2005).

El término salicilato se ha utilizado para la descripción de un grupo de compuestos químicos que presentan el radical 2-hidroxibenzoico. Dentro de éstos, se encuentran el salicilato de sodio, el éster metilo del ácido salicílico, así como el ácido acetilsalicílico. Mientras que los jasmonatos (el ácido jasmónico y su derivado volátil, el jasmonato de metilo) son moléculas provenientes de intermediarios de 12 carbonos de la ruta del ácido octadecanoico (ODA; Kazan y Manners, 2008; Beckers y Spoel, 2006).

1.6.2 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Uno de los primeros eventos bioquímicos durante la internalización de la señal que estimula la síntesis de los metabolitos secundarios es la percepción del inductor. Esta percepción se debe a una interacción receptor-ligando entre la célula y el microorganismo, lo que indica un reconocimiento específico entre el inductor y el receptor. Además, algunos componentes, como el quitosano, los β -glucanos y los oligogalacturonidos, pueden poseer la misma actividad en diferentes plantas, sugiriendo que éstas poseen receptores comunes. Una vez que los receptores se activan, éstos estimulan efectores, tales como canales iónicos, proteínas G y proteínas cinasas. Estos efectores activos transfieren las señales del inductor a los segundos mensajeros, los cuales amplifican esta señal (Zhao *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que la respuesta ante un inductor comprende una serie de eventos bioquímicos, los cuales inician con la percepción del inductor por el receptor, la fosforilación y desfosforilación reversible de proteínas en la membrana plasmática y el citosol, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citol}}$, la despolarización de la membrana plasmática, el

intercambio de iones Cl^- y K^+ por H^+ , la alcalinización extracelular y la acidificación del citoplasma, así como la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la activación de la NADPH oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno, la expresión de genes de defensa temprana, la producción de etileno y jasmonato, la expresión de genes de defensa tardíos y la acumulación de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005).

La producción de jasmonatos puede desencadenar la síntesis de metabolitos secundarios al promover la degradación de las proteínas JAZ (Jasmonate zim-domain proteins) que actúan como reguladores negativos del factor transcripcional JIN1/MYC2 en combinación con SCF^{COI1} Ubiquitin ligasa. JIN1/MYC2 posiblemente se une a elementos conservados en las cajas G de ciertos promotores, coordinando una cascada de señales, que involucra a otros activadores y represores transcripcionales con dominios AP2/ERF, WRKY y MYBS, que modulan distintas funciones dependientes del ácido jasmónico (Figura 1.9; Kazan y Manners, 2008). Por ejemplo, en *Catharanthus roseus*, el factor transcripcional ORCA 3, con un dominio AP2/ERF, se une a una región del promotor del gen de la estrictosidina sintasa, denominada como JERE (Jasmonate and Elicitor Responsive Element), acción que provoca la inducción de la síntesis de alcaloides indolterpénicos (Van der Fits y Memelink, 2001).

El ácido salicílico, por otro lado, está involucrado en un proceso que desencadena la resistencia sistémica adquirida (SAR) en la planta, que la protege de posteriores infecciones por patógenos. La proteína reguladora NRP1 es un regulador positivo central de SAR (Figura 1.10). NPR1, activada por AS, se localiza en el núcleo, donde interactúa con el factor de transcripción TGA que induce la expresión de un gran número de genes que dan lugar a proteínas relacionadas con la patogénesis, contribuyendo en el aumento de la resistencia (Beckers y Spoel, 2006).

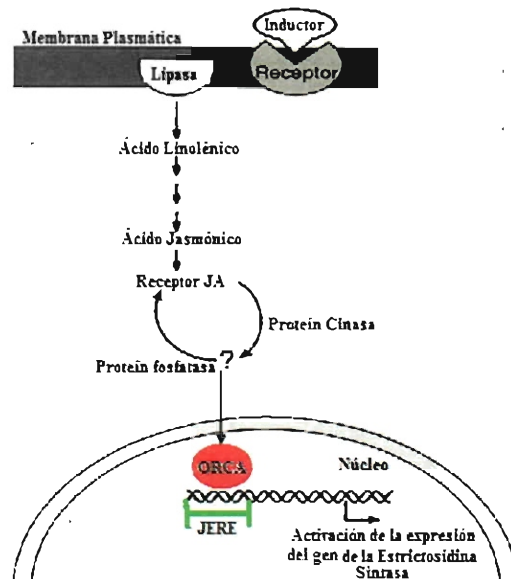


Figura 1.9. Modelo de transducción de señales en la expresión del gen de la estrictosidina sintasa durante la inducción de la síntesis de alcaloides indol terpénicos en *Catharanthus roseus*.

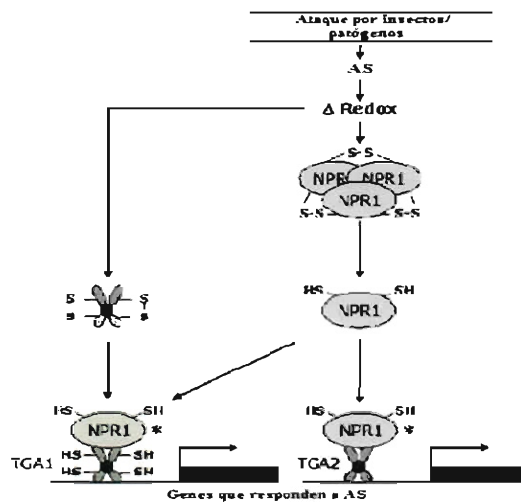


Figura 1.10. Modelo esquemático propuesto que ilustra el rol central de NPR1 en la expresión de genes que responden al ácido salicílico.

Se sabe que JA tiene un efecto antagonista sobre AS, y viceversa (Beckers y Spoel, 2006; Figura 1.11). Una mutación que interrumpa la señalización del JA (i.e. *coi1*) conduce a un aumento en la expresión basal e inducible del gen marcador *NPR1*, y una mutación que interrumpa la señalización del AS (i.e. *npr1*), lleva a un aumento en algunos genes importantes en la señalización del JA. No obstante, la aplicación exógena de bajas concentraciones de AS promueve la inducción de genes de defensa dependientes de JA, lo cual llevó a proponer que esta interacción puede ser dosis dependiente (Kazan y Manners, 2008; Beckers y Spoel, 2006).

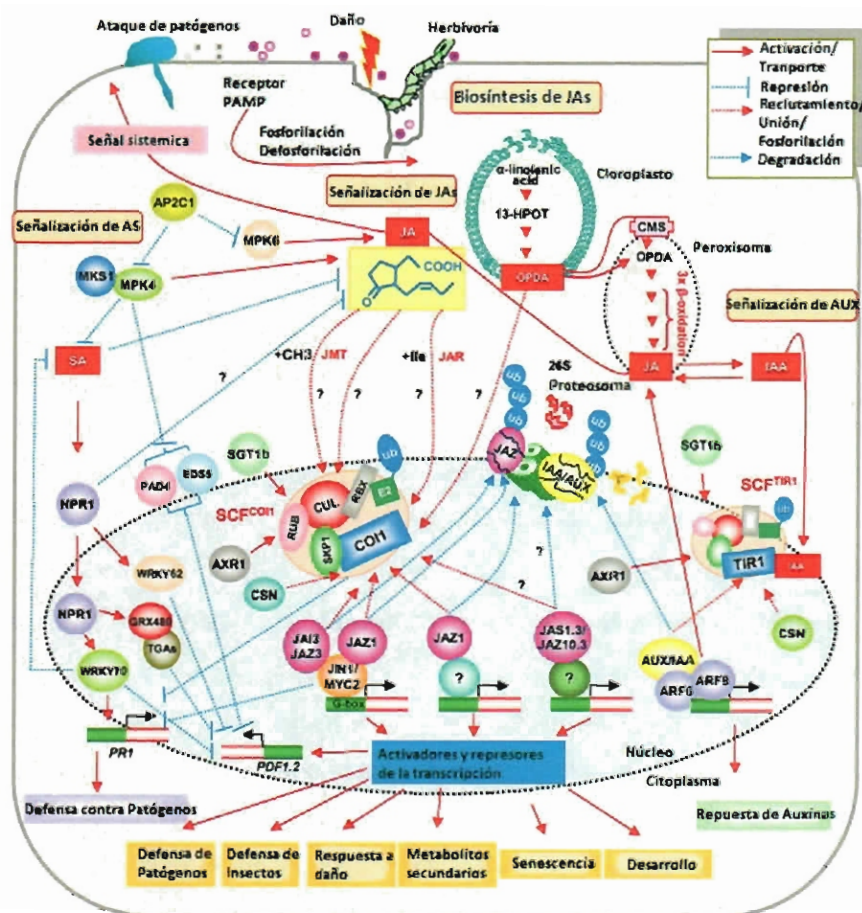


Figura 1.11. Visión general de la biosíntesis del ácido jasmónico y su señalización, durante un estrés biótico o abiótico, incluyendo sus interacciones con el ácido salicílico y auxinas en *Arabidopsis* (Kazan y Manners, 2008).

Los metabolitos secundarios pueden alcanzar un alto valor en el mercado, por lo que existe un gran interés en aumentar su rendimiento a partir de las fuentes naturales. Para lograr esto, es necesario comprender a fondo las vías metabólicas involucradas. El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado tener un gran potencial en este sentido; desafortunadamente, la síntesis de estos compuestos se lleva a cabo a un nivel muy bajo en estos sistemas, o no son producidos (Arias Zabala *et al.*, 2009).

Actualmente, el metabolismo de los capsaicinoides está bajo un fuerte escrutinio, pues a pesar de los avances que se han logrado en el estudio de la vía de síntesis y su regulación, aún no se sabe de qué manera influye el metabolismo primario, o la manera en que ambos se coordinan. Es por esto que el tejido placentario de los chiles habaneros, que es un tejido diferenciado, y que además es capaz de permanecer metabólicamente activo cuando es aislado en un cultivo *in vitro*, provee de un excelente modelo para abordar la síntesis de los capsaicinoides desde un enfoque diferente del que hasta ahora se ha hecho.

Existen pocos trabajos que intentan relacionar el metabolismo primario con el metabolismo secundario, como, por ejemplo, los relacionados con la contribución del nitrato, y el metabolismo del N en la regulación de la ruta de los fenilpropanoides y la síntesis de nicotina en *Nicotiana tabacum* (Fritz *et al.*, 2006), o la expresión de una enzima bifuncional (corismato mutasa/prefenato deshidratasa) para estudiar la interfase entre la síntesis de aminoácidos aromáticos y la síntesis de antocianinas en *Arabidopsis thaliana* (Tzin *et al.*, 2009).

Además, no existen reportes sobre los precursores metabólicos para la síntesis de los capsaicinoides.

Dado que los capsaicinoides se sintetizan a partir de dos aminoácidos (fenilalanina y valina o leucina, según sea el caso), las enzimas de asimilación de amonio podrían ser muy importantes en el proceso. Por esta razón, en este trabajo se planteó analizar si la acumulación de capsaicinoides requiere la asimilación primaria de nitrógeno. Para ello, se determinaron la actividad de las enzimas de asimilación de NH_4^+ (GS/GOGAT y GDH), así como el contenido de capsaicinoides en placentas inmovilizadas en un cultivo *in vitro* expuesto a condiciones que promueven la acumulación de capsaicinoides como son la inducción y la exposición a diferentes contenidos de nitrógeno.

1.7 HIPÓTESIS

Si las placentas de chile habanero son capaces de sintetizar capsaicinoides cuando son aisladas en un cultivo *in vitro* con N inorgánico como única fuente de este elemento y además este tejido posee las enzimas necesarias para la asimilación de NH_4^+ ; entonces, es posible que al aumentar la síntesis de los capsaicinoides se requiera una mayor asimilación de amonio.

1.8 OBJETIVO

Establecer la posible relación entre la capacidad de asimilación de amonio y la capacidad de síntesis de capsaicinoides en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto del AS y MeJa sobre la acumulación de los capsaicinoides y las actividades de las enzimas de asimilación de amonio.
2. Determinar el efecto del cambio en el contenido de nitrógeno sobre la producción de capsaicinoides y las actividades de las enzimas de asimilación de amonio.

1.10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para evaluar la posible relación entre la capacidad de asimilación de amonio y la capacidad de síntesis de capsaicinoides en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) se diseñó una estrategia experimental (Figura 1.9), que involucró el aislamiento del tejido placentario de chiles de 20-25 días posteriores a la antesis. Estas placentas fueron inmovilizadas, y posteriormente, se estableció un sistema de cultivo *in vitro* en medio MS. El sistema de placentas inmovilizadas fue sometido a diferentes tratamientos con AS, MeJa y diferentes concentraciones de N total con el fin de promover la acumulación de capsaicinoides. Se cuantificó el contenido de capsaicinoides, así como las actividades de las enzimas de asimilación de amonio en las placentas. También se

cuantificaron los capsaicinoides y las actividades de estas enzimas en placentas sin ningún tratamiento que se utilizaron como testigo.

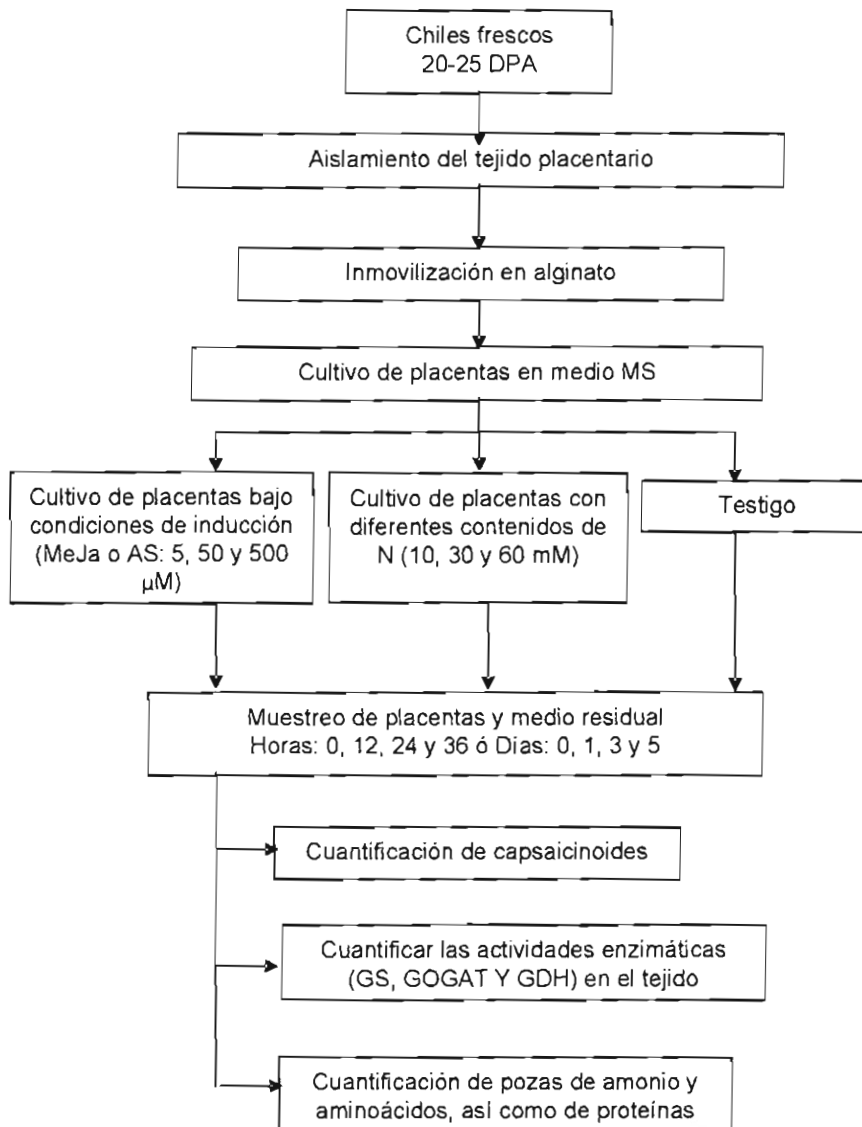


Figura 1.12. Diagrama de la estrategia experimental. DPA, días posteriores a la antesis; MS, medio Murashige y Skoog; AS, ácido salicílico; MeJa, jasmonato de metilo.

REFERENCIAS

- Alpízar, E., A. Trujillo y F. Herrera (2003). Determinación de capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) colectados en Yucatán. (En línea). Disponible en:
[http://www.pepperconference.org/proceedings/determination de capsaicinoides.pdf](http://www.pepperconference.org/proceedings/determination_de_capsaicinoides.pdf) [Acceso 23 de febrero de 2011].
- Aluru, M. R., M. Mazourek, L. G. Landry, J. Curry, M. M. Jahn y M. A. O'Connell (2003). Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1655-1664.
- Ancona-Escalante, W. 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.
- 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 de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4881-4895.
- Aubert, S., R. Bligny, R. Couce, E. Gout, R. G. Ratcliffe y J. M. K. Roberts (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ¹³P nuclear magnetic resonance. *Journal of Experimental Botany*, 52, 37-45.
- Barash, I., H. Mor y T. Sadon (1975). Evidence for ammonium-dependent *de novo* synthesis of glutamate dehydrogenase in detached oat leaves. *Plant Physiology*, 56(6), 856-858.
- Beckers, G. J. M. y S. H. Spoel (2006). Fine-tuning plant defence signaling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8, 1-10.
- Bernal, M. A., A. A. Calderón, M. A. Pedreño, R. Muñoz, A. R. Barceló y F. Merino (1993a). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (var. *annuum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1041-1044.
- Bernal, M. A., A. A. Calderón, M. A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló y F. Merino de Cáceres (1993b). Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase. *Journal of Food Science*, 58(3), 611-613.
- Bidwell, R. G. S. (1983). *Fisiología Vegetal*. AGT Editov, México, D.F. 214 p.

- 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.
- Boersch, A., B. A. Callingham, F. Lembeck y D. F. Sharman (1991). Enzymatic oxidation of capsaicin. *Biochemical Pharmacology*, 41, 1863-1869.
- Calva-Calva, G., A. Narvard, J. Eagles, A. J. Parr, M. J. C. Rhodes, N. J. Walton, M. J. Amiot y R. J. Robins (1995). Phenolic transformations by *Capsicum* spp., en: *Current Trends in Fruit and Vegetables Phytochemistry*, García-Viguera, C., M. Castañer, M. I. Gil, F. Fereres y F. A. Tomás-Barberán (eds). CSIC. Madrid. pp. 205-209.
- Cammaerts, D. y M. Jacobs (1983). A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science Letters*, 31(1), 65-73.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine y D. Julius (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- Cázares, E., P. L. Sánchez, F. Ramírez-Vallejo, M. Castillo-González, M. Soto-Hernández, T. Rodríguez-González y J. L. Chávez-Servia (2005). Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*Capsicum annuum*) of east-central Yucatán. *Agrociencia*, 39, 627-638.
- Cho, M., R. A. Corea, H. Yang, D. D. Bedgar, A. M. Laskar, A. Moog-Anterola, R. L. Hood, S. E. Kohalmi, M. A. Bernards y L. B. Chu-Hee (2007). Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Identification and characterization of arogenate dehydratases. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 30827-30835.
- Commere, B., J. Vidal, A. Suzuki, P. Gadal y M. Caboche (1986). Detection of the messenger RNA encoding for the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *Plant Physiology*, 80(4), 859-862.
- Cruz, C., A. F. M. Bio, M. D. Domínguez, P. M. Aparicio, C. Lamsfus y M. A. Martins-Loução (2006). How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta*, 223, 1068-1080.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 141-157.

- Dubois, F., T. Terce-Laforgue, M. B. González, J. M. Estavillo, R. Sangwan, A. Gallais y B. Hirel (2003). Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 565-576.
- Eckart, E. (2008). *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Phenylalanine derived Metabolites/ Phenylpropanoids*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 271-342.
- El Omari, R., M. Rueda, C. Ávila, R. Crespillo, M. Nhiri y F. M. Cánovas (2010). Ammonium tolerance and the regulation of two cytosolic glutamine synthetases in the roots of sorghum. *Functional Plant Biology*, 37, 55-63.
- Esposito, S., G. Guerriero, V. Vona, V. Di Martino-Rigano, S. Carfagna y C. Rigano (2005). Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 55-64.
- Feraud, M., C. Masclaux-Daubresse, S. Ferrario-Méry, K. Pageau, M. Lelandais, C. Ziegler, E. Leboeuf, T. Jougllet, L. Viret, A. Spampinato, V. Paganelli, M. B. Hammouda y A. Suzuki (2005). Expression of a ferredoxin-dependent glutamate synthase gene in mesophyll and vascular cells and functions of the enzyme in ammonium assimilation in *Nicotiana tabacum* (L.). *Planta*, 222, 667-677.
- 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(4), 533-548.
- García-Galindo, H. S., J. Ortega, M. E. Galindo y C. Martínez (1995). La capsaicina, el principio pungente del chile: su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia*, 46, 84-102.
- Gómez-Maldonado, J., C. Avila, F. de la Torre, R. Cañas, F. M. Cánovas y M. M. Campbell (2004). Functional interactions between a glutamine synthetase promoter and MYB proteins. *The Plant Journal*, 39, 513-526.
- González-Salan, M. M. y A. D. Orellana-Polanco (2005). Informe de colecta de habanero 190105. (En línea). Disponible en: http://www.icta.gob.gt/pdf/recom/rec_nat/abstract/resINFORME%20COLECTA%20ODE%20HABANERO%20190105.pdf [Acceso 23 de febrero de 2011].

- Hayakawa, T., T. Yamaya, T. Mae y K. Ojima (1993). Changes in the content of two glutamate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening. *Plant Physiology*, 101(4), 1257-1262.
- Holden, P. y M. Yeoman (1994). Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell cultures of *Capsicum frutescens* and their responses to an exogenously supplied elicitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 31-37.
- Hongmei, C., Z. Ying, X. Jinghua, L. Xianghua, Z. Qifa y L. Xingming (2009). Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell*, 28, 527-537.
- Hung, K. T. y C. H. Kao (2007). The participation of hydrogen peroxide in methyl jasmonate-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1469-1479.
- 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., G. A. Ravishankar y L. V. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Science*, 70(2), 223-229.
- Johnson, T. S., G. A. Ravishankar y L. V. Venkataraman (1991). Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cells cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Food Biotechnology*, 5(2), 197-205.
- Johnson Jr., W. (2007). Final report on the safety assessment of *Capsicum annuum* extract, *Capsicum annuum* fruit extract, *Capsicum annuum* resin, *Capsicum annuum* fruit powder, *Capsicum frutescens* fruit, *Capsicum frutescens* fruit extract, *Capsicum frutescens* resin, and capsaicin. *International Journal of Toxicology*, 26(Suppl.1), 3-106.
- Kazan, K. y J. M. Manners (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiology*, 146, 1459-1468.
- Keiki, I., K. Soichi, T. Hideki, H. Toshihiko e Y. Tomoyuki (2003). Cell type distinct accumulation of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6-7), 643-647.
- Kichey, T., J. Le Gouis, B. Sangwan, B. Hirel y F. Dubois (2005). Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase

- during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiology*, 46(6), 964-974.
- Kwinta, J. y W. Bielawski (1998). Glutamate dehydrogenase in higher plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 20(4), 453-463.
- Lan, H. M., Y. A. Chiao, M. W. Li, Y. K. Yung y S. Ji (2006). Putative nitrogen sensing systems in higher plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(8), 873-888.
- Lancien, M., R. A. Azevedo y P. J. Lea (2007). Amino acid synthesis in plastids, en: *The Structure and Function of Plastids*, Wise, R. R. y J. K. Hooper (eds). Springer. New York. pp. 355-377.
- Lang, Y., H. Kisaka, R. Sugiyama, K. Nomura, A. Morita, T. Watanabe, Y. Tanaka, S. Yazawa y T. Miwa (2009). Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *The Plant Journal*, 59(6), 953-961.
- Lea, P. J. y B.J. Mifflin (2003). Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6-7), 555-564.
- 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(19), 5248-5259.
- Lindsey, K. y M. M. Yeoman (1984). The synthetic potential of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*. *Planta*, 162(6), 495-501.
- Loulakakis, K. A., K. A. Roubelakis-Angelakis (1996). The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzyme exhibit similar anabolic and catabolic activities. *Physiologia Plantarum*, 96, 1, 29-35.
- Masclaux-Dausbresse, C., M. Reisdorf-Cren, K. Pageau, M. Lelandais, y O. Grandjean (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology*, 140(2), 444-456.
- 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*.
- 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.
- Occhipinti, A., L. Berlicki, S. Giberti, G. Dzedziola, P. Kafarski y G. Forlani (2010). Effectiveness and mode of action of phosphonate inhibitors of plant glutamine synthetase. Pest Management Science, 66(1), 51-58.
- Ochi, T., Y. Takaishi, K. Kogure e I. Yamauti (2003). Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annum*. Journal of Natural Products 66(8), 1094-1096.
- Rana, N., P. Mohanpuria y S. Yadav (2008). Cloning and characterization of a cytosolic glutamine synthetase from *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze that is up regulated by ABA, SA, and H₂O₂. Molecular Biotechnology, 39(1), 49-56.
- Raskin, I., D. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic y A. Poulev (2002). Plants and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology, 20(12), 522-531.
- Ruíz-Oronoz, M. y J. Nieto-Roaro (1985). Botánica. Edit. Eclalsa, México. 323-333 p.
- SAGARPA, 2010. Chile habanero de la Península de Yucatán. [Online] (Actualizado el 21 de Octubre de 2010).
- Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=306:chile-habanero-de-la-peninsula-de-yucatan&catid=72:infogramas&Itemid=422 [Acceso 13 de enero de 2011].
- Smith, J. L., C. M. De Morales y M. C. Mescher (2009). Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. Pest Management Science, 65(5), 497-503.
- 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. The Plant Journal, 42(5), 675-688.
- Stewart Jr., 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(5), 979-991.
- 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(370), 959-970.

- 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(8), 1212-1217.
- Surh, Y. J. (2002). More than spice: Capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(17), 1263-1265.
- 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(5), 839-853.
- Suzuki, T. y K. Iwai (1984). Constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of *Capsicum* species, en: *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*, Vol. 23, Manske, R. H. F., A. Brossi y H. L. Holmes (eds). Academic Press, New York. pp. 227-299.
- Tabatabaei, S. J., M. Yusefi y J. Hajiloo (2008). Effects of shading and NO₃:NH₄ ratio on the yield, quality and N metabolism in strawberry. *Scientia Horticulturae*, 116(3), 264-272.
- 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*. *The Plant Journal*, 60(1), 156-167.
- 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. *The Plant Journal*, 25(1), 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(4), 353-360.
- Verpoorte, R, A. Cotin y J. Memelink (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemical Reviews*, 1(1), 13-25.
- 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), 1-9.

- Watanabe, M., Y. Itho, Y. Jo, K. Yasuda, K. Kamachi e Y. Watanabe (2007). Redox and translational regulation of glutamate dehydrogenase α -subunits in *Brassica napus* under wounding stress. *Plant Science*, 172(6), 1182-1192.
- Zabalza, A., S. Gaston, M. Ribas-Carbó, L. Orcaray, M. Igal y M. Royuela (2006). Nitrogen assimilation studies using ^{15}N in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8818-8823.
- Zamsky, E., O. Shoham, D. Palevitch y A. Levy (1987). Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Botanical Gazette*, 148(1), 1-6.
- Zapata, J., A. A. Calderón, R. Muñoz y A. Ros-Barceló (1992). Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetics characteristics and substrate specificity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(2), 134-138.
- Zhao, J., L. C. Davis y R. Veerporte (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE PLACENTAS

Se utilizaron plantas de chile de variedad de frutos naranja. Las actividades enzimáticas de la GS, la GOGAT y la GDH, así como los contenidos de amonio, aminoácidos, capsaicinoides y proteínas, fueron determinadas en extractos de tejido placentario fresco de 20 a 25 días después de la antesis.

2.1.1 DESINFESTACIÓN DEL CHILE HABANERO

Los chiles se lavaron individualmente con una esponja y detergente líquido para trastes (marca comercial), con el suficiente cuidado para evitar dañarlos. Se enjuagaron con agua de la llave y posteriormente, se lavaron con Extrán al 5% durante 10 min, enjuagando de nuevo con agua de la llave.

Una vez lavados, los chiles se trasladaron a una campana de flujo laminar, donde se desinfestaron 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 1.5% (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.

2.1.2 INMOVILIZACIÓN DE LAS PLACENTAS DE CHILE HABANERO

Con ayuda de pinzas y bisturí, se aislaron las placentas de cada uno de los chiles, se les retiraron las semillas, y se depositaron en cajas Petri, sobre una toalla humedecida con agua destilada estéril, para evitar su deshidratación.

Las placentas se depositaron en una solución de alginato 2.5%; se agitaron y después, se transfirieron a una solución fría de cloruro de calcio 1%, donde permanecieron durante 2 h en agitación. Transcurrido este tiempo, las placentas se lavaron con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de Ca^{2+} .

Se inocularon tres placentas por matraz Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin fitorreguladores y con 3% de sacarosa. Estos matraces fueron sellados con aluminio y ligas, y trasladados a un cuarto

de cultivo donde permanecieron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz continua ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 70% de humedad relativa, y en agitación orbital constante de 60 rpm.

2.2 INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CAPSAICINOIDES

Con base en la literatura se ensayaron dos formas para aumentar la producción de capsaicinoides: la inducción química con AS y MeJa (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010), y la manipulación del contenido de N del medio (Arias-Zabala *et al.*, 2009).

2.2.1 CONDICIONES DE INDUCCIÓN QUÍMICA DE LA SÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES

El AS fue disuelto en agua destilada, mientras que el MeJa lo fue en etanol, y ambos se esterilizaron por filtración. Se realizaron curvas dosis-respuesta de 5 a 500 μM para ambos inductores. De estos ensayos, se eligieron tres concentraciones: 5, 50 y 500 μM para los dos compuestos (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010). Los inductores se agregaron a las placentas 24 h después del establecimiento del cultivo, y los muestreos se realizaron a las 0, 12, 24 y 36 h después de iniciados los tratamientos. Los tejidos fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de ser analizados. Los testigos se trataron de la misma manera, pero no se expusieron a los inductores.

Se monitoreó tanto el medio de cultivo, como el tejido, para detectar algún cambio en la acumulación de capsaicinoides a lo largo del tiempo de tratamiento.

2.2.2 VARIACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE NITRÓGENO

Se evaluaron tres concentraciones de N total en el medio, conservándose la proporción 2:1 de NO_3^- : NH_4^+ , 60 mM, que representa la dosis que se encuentra en la composición original del medio MS, 30 mM, una dosis media y 10 mM, dosis limitante. Cada matraz contenía 3 placentas y 40 mL de medio MS. Los tratamientos fueron evaluados por un periodo de 5 días, tomando muestras al inicio del mismo, así como durante los días 1, 3 y 5 siguientes.

2.2.3 ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

El tejido congelado se pulverizó en un mortero hasta obtener un material muy fino, que se homogeneizó con un politrón durante 2 min con el amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, que contenía 2 mM CaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol), en una relación 1:2.5 p/v y PVPP al 5%. El homogeneizado se centrifugó a 20,400 x g durante 30 min. Todas las manipulaciones se hicieron a 4°C. El sobrenadante, conteniendo el extracto total, se utilizó para las determinaciones enzimáticas y la cuantificación de las pozas.

2.2.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GS

Se utilizó el método de Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1986).

La mezcla de reacción contenía:

Componentes	Concentración final [mM]	Volumen (mL)	
Tris-HCl	100	1.3-1.8	pH 7.5
ATP	8	0.2	pH 7.0
Glutamato de sodio	83.3	0.5	pH 7.0
Sulfato de magnesio	33.3	0.1	
Hidroxilamina	10	0.3	pH 7.0
Cisteína	3.33	0.1	
Extracto		0.1-0.5	
Volumen total		3.0	

Las molaridades se refieren a la concentración final en la mezcla de reacción, excepto para el Tris.

Para tener la certeza de que se estaba midiendo la actividad de la GS, se comprobó la dependencia de la reacción en función del tiempo y de la cantidad de proteínas (enzima).

Cuando se midió la actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas, se utilizaron diferentes volúmenes de extracto. La mezcla de reacción se preincubó durante 2 min a 38°C. Posteriormente, la reacción se inició al añadir el glutamato de sodio, se incubó durante 15 min, y ésta se detuvo al añadir 1 mL del reactivo de FeCl₃ (volúmenes iguales de: FeCl₃·6H₂O al 10% en 0.2 N HCl, ácido tricloroacético al 24% y HCl al 50%).

Se centrifugaron los tubos durante 15 min a $2,561 \times g$, y se leyeron las absorbancias a 540 nm para determinar la cantidad de γ -glutamil hidroxamato formado.

Paralelamente, se preparó un blanco de reactivos, al cual no se le agregó el extracto proteico, y cuyo volumen se compensó con el amortiguador.

Cuando se midió la actividad en función del tiempo, se utilizó un volumen fijo del extracto. La reacción se detuvo a los 0, 5, 10, 15, y 20 min de incubación. Posteriormente, se realizó el centrifugado y la lectura de las absorbancias. Se incluyó un blanco de tiempo cero que contenía el extracto proteico, por lo que se detuvo la reacción con la mezcla de FeCl_3 antes de la activación con glutamato de sodio.

El ATP, la cisteína y la hidroxilamina se prepararon inmediatamente antes de usarse. La actividad específica se reporta como μmoles de γ -glutamil hidroxamato formado por minuto por mg de proteína ($\mu\text{moles } \gamma\text{-glutamil hidroxamato min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína).

2.2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GOGAT-NADH

Se siguió el método de Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1986).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Componentes	Concentración final [mM]	Volumen (mL)	
Tris-HCl	100	1.5-1.8	pH 7.5
α -cetoglutarato	10	0.5	pH 7.0
Glutamina	30	0.5	
NADH	0.16	0.2	
Extracto		0.1, 0.2 y 0.3	
Volumen total		3.0	

Las molaridades se refieren a la concentración final en la mezcla de reacción, excepto para el Tris.

La mezcla de reacción se preincubó durante 2 min a 30°C y la reacción se inició al añadir el NADH (recién preparado). Se midió el cambio de absorbancia a intervalos de 1 min a 340 nm durante 5 min totales. La actividad se reporta como nmoles de NADH consumidos en la reacción por minuto por mg de proteína ($\text{nmoles NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína).

2.2.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GDH-NADH

Para realizar esta determinación, se siguió el método de Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1984).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Componentes	Concentración final [mM]	Volumen (mL)	
Tris-HCL	100	1.6-1.9	pH 8.2
α -cetoglutarato	10	0.5	pH 7.0
Cloruro de amonio	100	0.5	
NADH	0.16	0.1	
Extracto		0.01, 0.02 y 0.03	
Volumen total		3.0	

Las molaridades se refieren a la concentración final en la mezcla de reacción, excepto para el Tris.

La mezcla de reacción se preincubó durante 2 min a 30°C y la reacción se inició al añadir el NADH (recién preparado). Se midió el cambio de absorbancia en intervalos de 1 min a 340 nm durante 5 min totales. La actividad enzimática se reporta como nmoles de NADH consumidos en la reacción por minuto por mg de proteína (nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína).

2.2.7. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GDH-NAD⁺

La determinación se realizó siguiente el protocolo reportado por Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1984).

La mezcla de reacción empleada se compuso de la siguiente manera:

Componentes	Concentración final [mM]	Volumen (mL)	
Tris-HCl	100	2.15-2.3	pH 9.4
Glutamato de sodio	10	0.5	pH 7.0
NAD ⁺	0.6	0.2	pH 8.0
Extracto		0.05, 0.1 y 0.15	
Volumen total		3.0	

Las molaridades se refieren a la concentración final de la mezcla de reacción, excepto para el Tris. La mezcla de reacción se preincubó durante 2 min a 30°C y la reacción se inició al añadir el NAD⁺ (recién preparado). Se midió el cambio de absorbancia a intervalos de 1 min a 340 nm durante 5 min totales. La actividad enzimática se definió como nmoles de NAD⁺ utilizados por minuto por mg de proteína (nmoles NAD⁺ min⁻¹ mg⁻¹ proteína).

2.2.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El contenido de proteínas se determinó por el método de Peterson *et al.* (1977). Se elaboró una curva patrón (0-100 µg) con albúmina sérica bovina.

El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras fue el siguiente: se completó el volumen de la muestra a 1 mL con agua destilada, se le adicionó 0.1 mL de desoxicolato de sodio al 0.15%, se agitó e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, se añadió 0.1 mL de ácido tricloroacético al 72 % (frío). Se incubó 20 min en hielo, para posteriormente centrifugar a 2 561 x g durante 15 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de agua y se le añadió 1 mL del reactivo A, recién preparado. Se incubó 10 min a temperatura ambiente, y posteriormente, se le adicionó 0.5 mL del reactivo B, incubándose 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la absorbancia a 750 nm.

Reactivo A, se preparó con volúmenes iguales de los reactivos del 1 al 4.

1) Cobre-tartrato-carbonato (CTC). Se preparó a partir de Na₂CO₃ al 10% (p/v), se añadió CuSO₄ a una concentración de 0.1% (p/v) y tartrato de sodio y potasio a 0.2% (p/v).

2) Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % (p/v)

3) NaOH 0.8 N

4) Agua destilada

Reactivo B: Reactivo de Folin-Ciocalteu (1:6 v/v)

2.2.9 CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Se utilizó el método de Cocking y Yemm (1954), en el cual un volumen de muestra (20-40 µL) se completó con agua destilada hasta 1 mL, se le agregó 1 mL del reactivo de ninhidrina (B) recién preparado y se colocó en un baño María a ebullición durante 30 min.

Al término del tiempo, 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: amortiguador de citratos 0.2 M pH 5.0 (recién preparado). Se agregaron por cada 50 mL del amortiguador, 0.08 g de cloruro de estaño.

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

2.2.10 CUANTIFICACIÓN DE AMONIO

Se determinó por la técnica de Nessler (Strelly y Averell, 1970), en donde se tomó un volumen de muestra (20-40 μ L) y se llevó a un volumen final de 5 mL con agua destilada, se le agregaron 0.5 mL del reactivo de Nessler (solución madre diluida), dejándolos reposar durante 30 min en oscuridad y finalmente, se leyó la absorbancia a 385 nm.

El reactivo de Nessler está compuesto de los siguientes reactivos:

10 g de yoduro de mercurio + 7 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua fría.

16 g de hidróxido de sodio disueltos en 70 mL de agua fría.

Para prepararlo, se mezclaron las dos soluciones anteriores lentamente, evitando el calentamiento, y se aforó a 100 mL con agua destilada. El reactivo se preparó en condiciones de oscuridad (solución madre). Después, se tomó 1 mL de esta solución, y se diluyó con agua a 10 mL (solución madre diluida).

2.2.11 CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES

Se tomaron tres placentas, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se molieron en un mortero. De ahí se pesó 0.2 g, se le agregó acetonitrilo (40 mL/g de peso fresco) y se incubó a baño María a 80°C durante 4 h. Finalizado este tiempo, se filtró al vacío (papel filtro Whatman N° 1) y el extracto se guardó en oscuridad a -20°C. La separación de los capsaicinoides se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Collins *et al.*, 1995).

Para la inyección de las muestras en el equipo, se utilizó una alícuota de 2 mL, misma que fue filtrada a través de unidades Millex LCR (Millipore) de 0.45 μ m. Se utilizó un HPLC Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Germany) con detector de arreglo de diodos. La separación de los capsaicinoides se llevó a cabo en una columna de fase

reversa Zorbax Octadecil Silano (ODS) C18 (tamaño de partícula: 5 µm, 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 µL y a una longitud de onda de 280 nm.

Para la determinación de los capsaicinoides en el medio de cultivo, se liofilizó una alícuota de 10 mL y posteriormente se realizó la extracción con 1.25 mL de agua + 2.5 mL de acetonitrilo. Los tubos se mantuvieron a baño María durante un periodo de 4 h. Finalmente se tomó la fase orgánica y se midieron los capsaicinoides de la misma manera como se midieron en la placenta.

Tanto la capsaicina como la dihidrocapsaicina fueron identificadas y cuantificadas usando estándares de ambos compuestos.

REFERENCIAS

- 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 de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4881-4895.
- Cocking, E. C. y E. Yemm (1954). Estimation of aminoacids 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(1), 137-139.
- 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(3), 430-434.
- Loyola-Vargas, V.M. y E. Sánchez de Jiménez (1984). Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in maize tissue. *Plant Physiology*, 76, 536-540.

- Loyola Vargas, V. M. y E. Sánchez de Jiménez (1986). Regulation of glutamine synthetase / glutamate synthase in maize tissues. Effect of the nitrogen source. *Journal of Plant Physiology*, 124, 147-154.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.
- Streli, R. y P. R. Averell, (1970). *Analytical chemistry of N and its compounds. Part I.* Willey-Interscience, New York. 55 p.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EL ÁCIDO SALICÍLICO Y EL JASMONATO DE METILO INDUJERON CAMBIOS EN LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES

Para los tratamientos de inducción con ácido salicílico (AS) y jasmonato de metilo (MeJa), se utilizaron tres concentraciones: 5, 50 y 500 μM , y se cuantificaron los capsaicinoides acumulados en el tejido placentario y los liberados al medio de cultivo, al inicio del tratamiento y después de 12, 24 y 36 h de incubación. Los testigos no fueron expuestos al inductor.

En comparación con los testigos, el tratamiento con AS estimuló la acumulación de capsaicinoides (Figura 3.1A). El nivel máximo de acumulación de capsaicinoides se detectó a las 24 h con el tratamiento de 500 μM de AS (Figura 3.1B).

En las primeras 12 h del tratamiento con AS, hubo un aumento en la cantidad de capsaicinoides, que fue más pronunciado que el observado durante las siguientes 12 h. Posteriormente, la acumulación de estos compuestos permaneció constante (Figura 3.1B). El contenido total de capsaicinoides en el testigo fue entre 16.49 y 28.38 μmoles . En comparación, el tratamiento con 500 μM de AS produjo un incremento de 17.32 a 44.24 μmoles en el mismo periodo; es decir, en el testigo hubo un aumento de 72% a lo largo del experimento, mientras que en el tratamiento con AS fue de 155%.

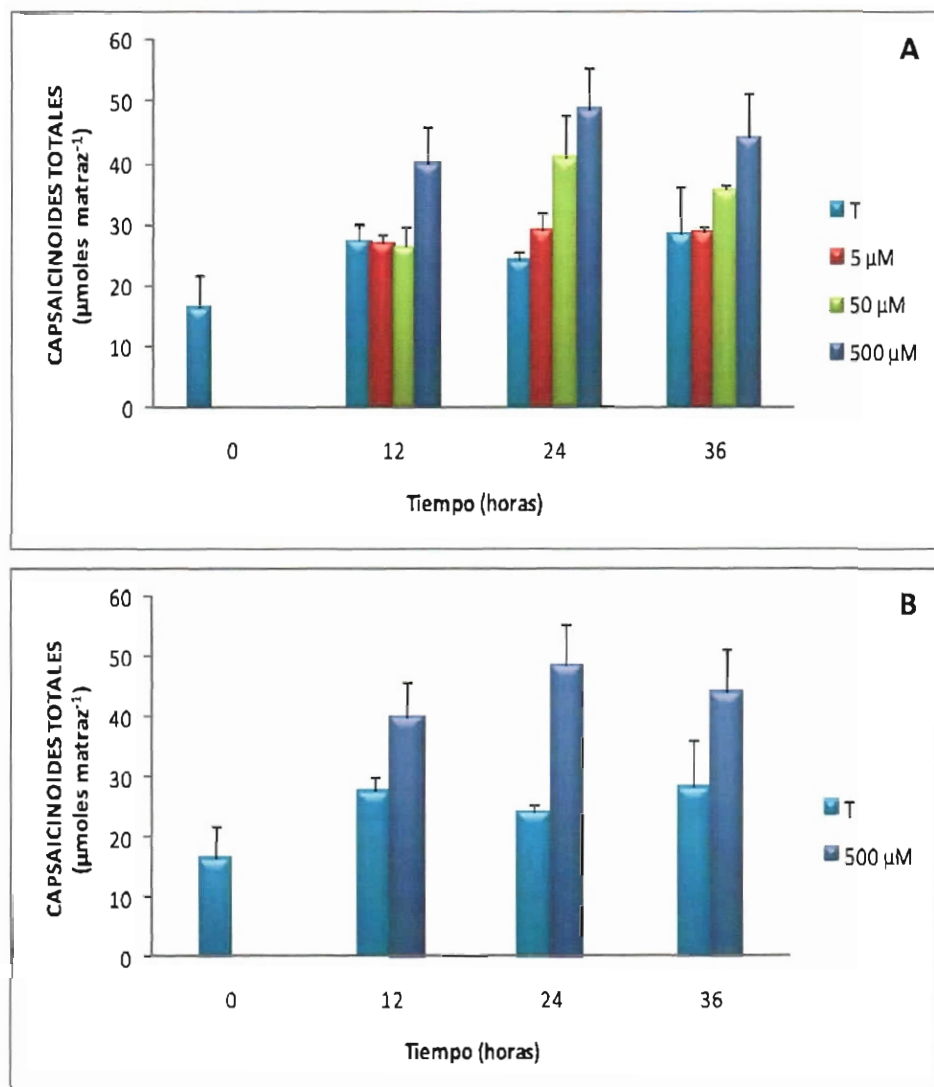


Figura 3.1. Efecto del tratamiento con ácido salicílico sobre el contenido de capsaicinoides totales por matraz en cultivos *in vitro* de placentas. A) Efecto de la concentración de AS (5, 50 y 500 µM) y B) Testigo y el tratamiento con 500 µM en el que se observó el mayor efecto sobre la acumulación de los capsaicinoides. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Por otro lado, el tratamiento con MeJa, al igual que con el AS, estimuló la acumulación de capsaicinoides (Figura 3.2A). De igual manera, el nivel máximo de acumulación de capsaicinoides por matraz se detectó a las 12 h, siendo el tratamiento con 500 μM el que produjo la mayor respuesta (Figura 3.2B). En las primeras 12 h, después del tratamiento con MeJa, hubo un aumento en la cantidad de capsaicinoides. Posteriormente, ésta disminuyó durante las siguientes 12 h (correspondiente a 24 h). El valor del contenido total de capsaicinoides por matraz en el testigo fue de 19.4 hasta 25.7 μmoles entre las 0 y las 24 h, mientras que en el tratamiento con 500 μM de MeJa lo hizo hasta 36.1 μmoles en el mismo periodo; esto es, mientras que en el testigo hubo un aumento de 32% en el contenido de capsaicinoides, el tratamiento con MeJa lo indujo en un 70%.

Bajo las condiciones experimentales, el cultivo *in vitro* fue capaz de llevar a cabo la síntesis de capsaicinoides y el tratamiento con 500 μM de AS o de MeJa indujeron una acumulación de capsaicinoides desde las 12 h de exposición. La cantidad de capsaicinoides encontrados en el cultivo de placentas inmovilizadas fue mayor que la reportada para los cultivos celulares de *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense* (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010; Lindsey y Yeoman, 1984), lo que sugiere que el estado de diferenciación del tejido tiene gran influencia sobre la capacidad de acumulación, como se ha reportado para otros metabolitos secundarios. Hasta ahora, éste es el primer reporte en utilizar las herramientas de inducción (i.e. utilización de AS y MeJa) para el estudio del metabolismo de los capsaicinoides en esta variante del cultivo de tejidos.

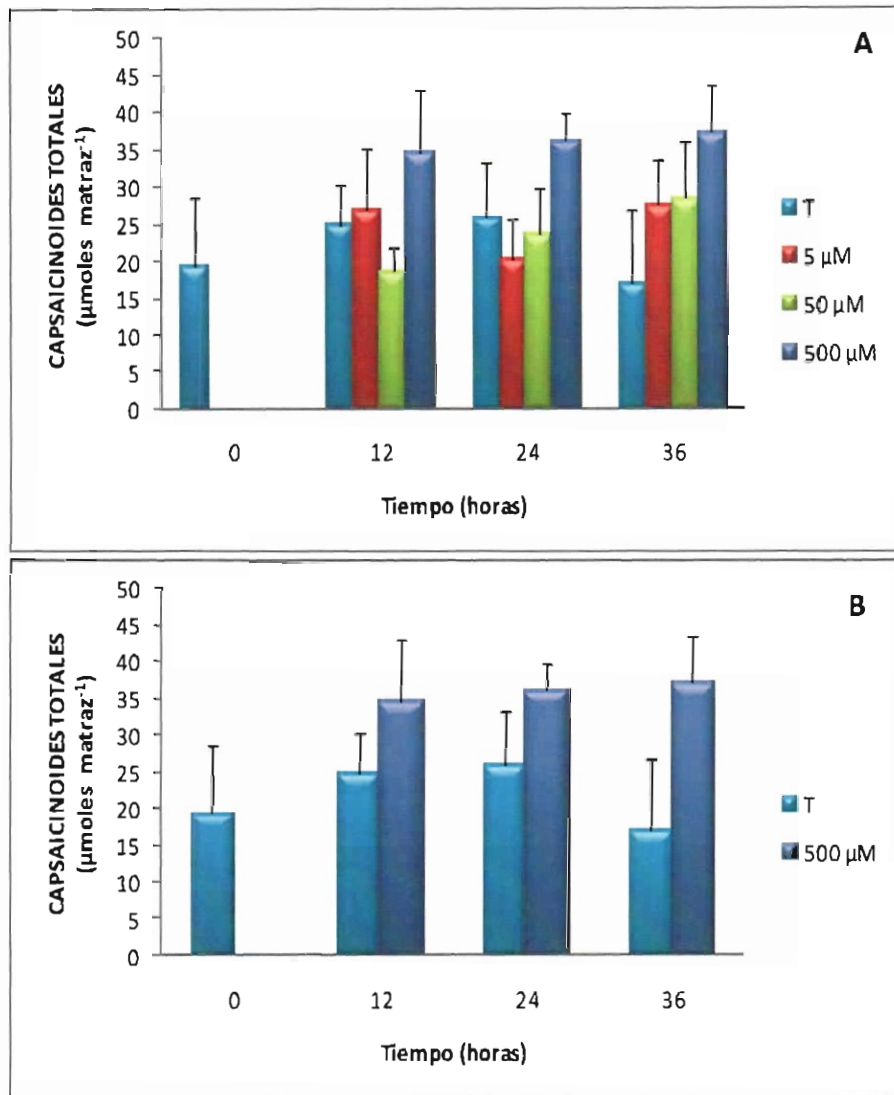


Figura 3.2. Efecto del tratamiento con jasmonato de metilo sobre el contenido de capsaicinoides totales por matraz en cultivos *in vitro* de placentas de *Capsicum chinense* Jacq. A) Efecto de la concentración de MeJa (5, 50 y 500 µM) y B) Se muestra solamente al testigo y el tratamiento en donde se observó el mayor efecto sobre la acumulación de dihidrocapsaicina. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

La capacidad del MeJa para estimular la síntesis de metabolitos secundarios ha sido bien documentada; no obstante, en el caso del AS, este tópico aún no está suficientemente claro, pues mientras que en el caso de ciertos metabolitos, hay un aumento en la acumulación, en otros ésta disminuye (Kazan y Manners, 2008; Beckers y Spoel, 2006). En este trabajo, se probó el efecto de estos dos mediadores sobre el metabolismo de los capsaicinoides. Los resultados de inducción obtenidos concuerdan con lo reportado por Gutiérrez-Carbajal *et al.* (2010), así como por Sudha y Ravishankar (2003). Tanto el AS como el MeJa tienen un efecto positivo sobre la acumulación de estas arilamidas.

Adicionalmente, se sabe que la inducción tiene un efecto positivo sobre la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL; Holden y Yeoman, 1994) y capsaicinoide sintasa (CS; Suresh y Ravishankar, 2005), reacciones que han sido señaladas como puntos limitantes durante la biosíntesis de los capsaicinoides en cultivos mantenidos *in vitro* (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993). De igual manera, en este trabajo se logró establecer una metodología para la inducción de la acumulación de los capsaicinoides en placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq., misma que puede ser utilizada para posteriores estudios sobre regulación de su metabolismo.

3.2 LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE NITRÓGENO INDUJÓ CAMBIOS SOBRE LA ACUMULACIÓN DE CAPSAICINOIDES

La disponibilidad del N es un factor importante durante la síntesis y acumulación de los capsaicinoides, tanto a nivel de la planta como bajo condiciones *in vitro* (Monforte-González *et al.*, 2010; Johnson y Decoteau, 1996). En el sistema *in vitro* las variables que pueden manipularse con respecto a este macronutriente son su concentración total y la relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Ambos factores afectan tanto el crecimiento como la producción de metabolitos secundarios (Arias Zabala *et al.*, 2009; Yeoman y Yeoman, 1996). Por lo tanto, en este trabajo, se consideró evaluar el efecto de la variación en el contenido total de N.

El medio MS presenta una concentración total de 60 mM de N y en vista de que a concentraciones de 10 mM puede ser limitante, mientras que a concentraciones cercanas a los 80 mM puede resultar inhibitorio para la producción de metabolitos secundarios, se

decidió evaluar tres concentraciones de N total: 10 (limitante), 30 (mediana) y 60 mM (completa).

El contenido total de capsaicinoides con 60 mM se mantuvo a lo largo del ciclo y sólo se pudo apreciar un ligero incremento hacia el día 5. Sin embargo, cuando se aplicaron las dosis media y limitante, se detectaron cambios en la dinámica de acumulación de estos metabolitos (Figura 3.3). Mientras que con 30 mM de N se vio una mayor diferencia en el día 3, en comparación con la dosis completa de N; con 10 mM se apreció un ligero incremento en el primer día después de haber establecido el cultivo. Estos datos en su conjunto sugieren que el N tuvo efectos inhibitorios sobre la acumulación de los capsaicinoides. Las dosis con menor N resultaron en una mayor acumulación de estas arilamidas. Este fenómeno, en el que bajas concentraciones de N estimularon la producción de ciertos metabolitos secundarios se ha observado en *F. ananassa*, donde 10 mM de N estimuló la producción de antocianinas (Sato *et al.*, 1996). Esto probablemente se debe a que los precursores generados en el metabolismo primario son desviados hacia la producción de metabolitos secundarios (Raval *et al.*, 2003). Por otro lado, una concentración alta de N, alrededor de 80 mM, con sus respectivas variaciones entre especies y tipos de cultivos *in vitro*, inhibió la producción de ciertos metabolitos secundarios (Zhong y Wang, 1998). Además, en *N. tabacum* concentraciones elevadas de NO_3^- inhibieron una gran parte del metabolismo de los fenilpropanoides, ruta que da lugar a los capsaicinoides (Fritz *et al.*, 2006). En este caso, al modificar la cantidad de N de 60 a 10 mM de N total, se redujo la concentración de NO_3^- de 40 a 6.66 mM, lo que podría estar disparando el metabolismo de los fenilpropanoides. Con estos resultados, se puede concluir que una variación en la concentración de N total en el medio de cultivo afecta la acumulación de capsaicinoides en tejido placentario inmovilizado de chile habanero.

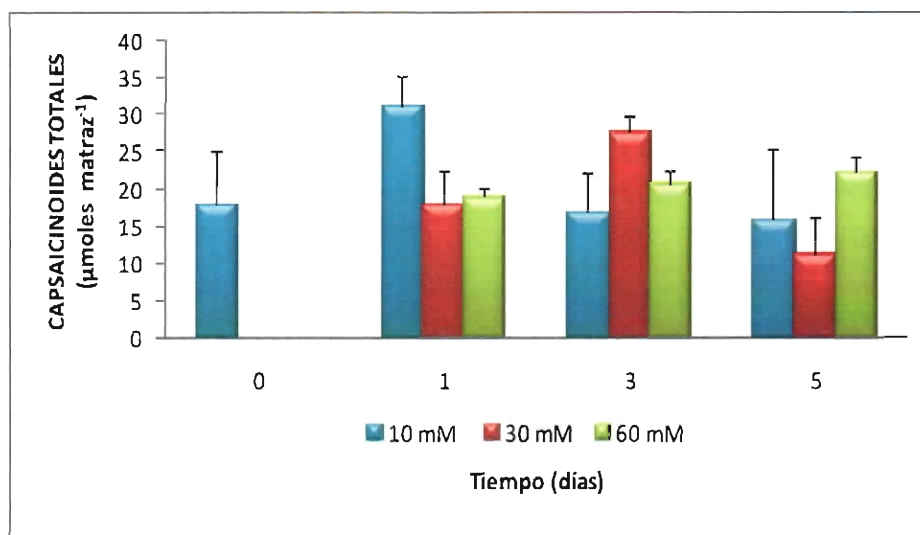


Figura 3.3. Efecto de la variación de la concentración total de N sobre la acumulación de capsaicinoides totales por matraz en cultivos *in vitro* de placentas de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

3.3 EL ÁCIDO SALICÍLICO Y EL JASMONATO DE METILO NO PRODUJERON CAMBIOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO

Una vez establecidos los parámetros de inducción con AS y MeJa (i.e. concentración única: 500 μM y tiempo de exposición: 24 y 36 h, respectivamente) sobre el cultivo *in vitro* de placentas, se procedió a determinar las actividades de las enzimas encargadas de la asimilación de amonio. Se observó un aumento en la actividad específica de la GS entre las 0 y las 24 h, tanto en el tratamiento con AS como en el testigo; pero sin diferencia entre éstos (Figura 3.4A). Algo similar se observó con la GS en placentas sometidas al MeJa (Figura 3.5A), así como para la GOGAT en las placentas expuestas a AS (Figura 3.4B) y MeJa (Figura 3.5B).

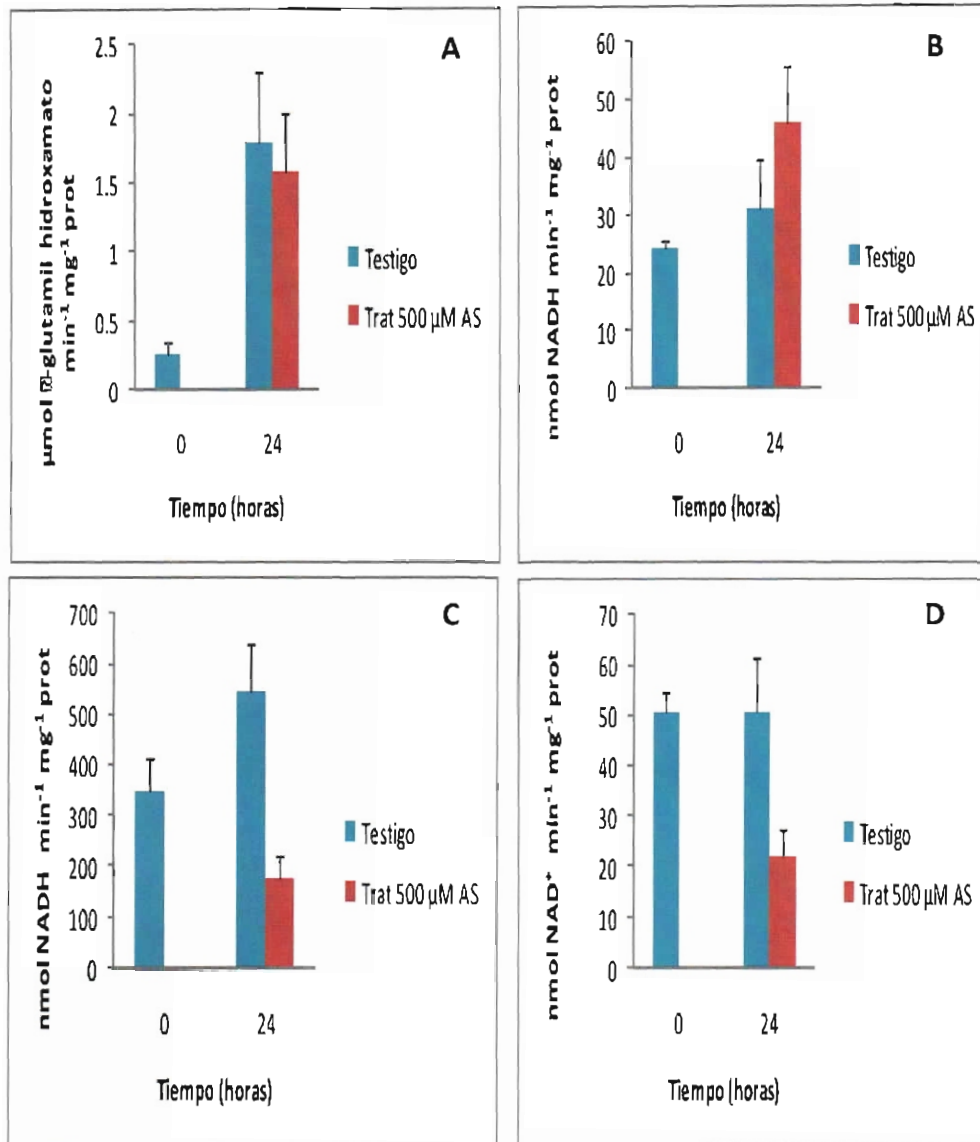


Figura 3.4. Efecto del AS sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. A) GS, B) GOGAT-NADH, C) GDH-NADH y D) GDH-NAD⁺. Los matracos contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

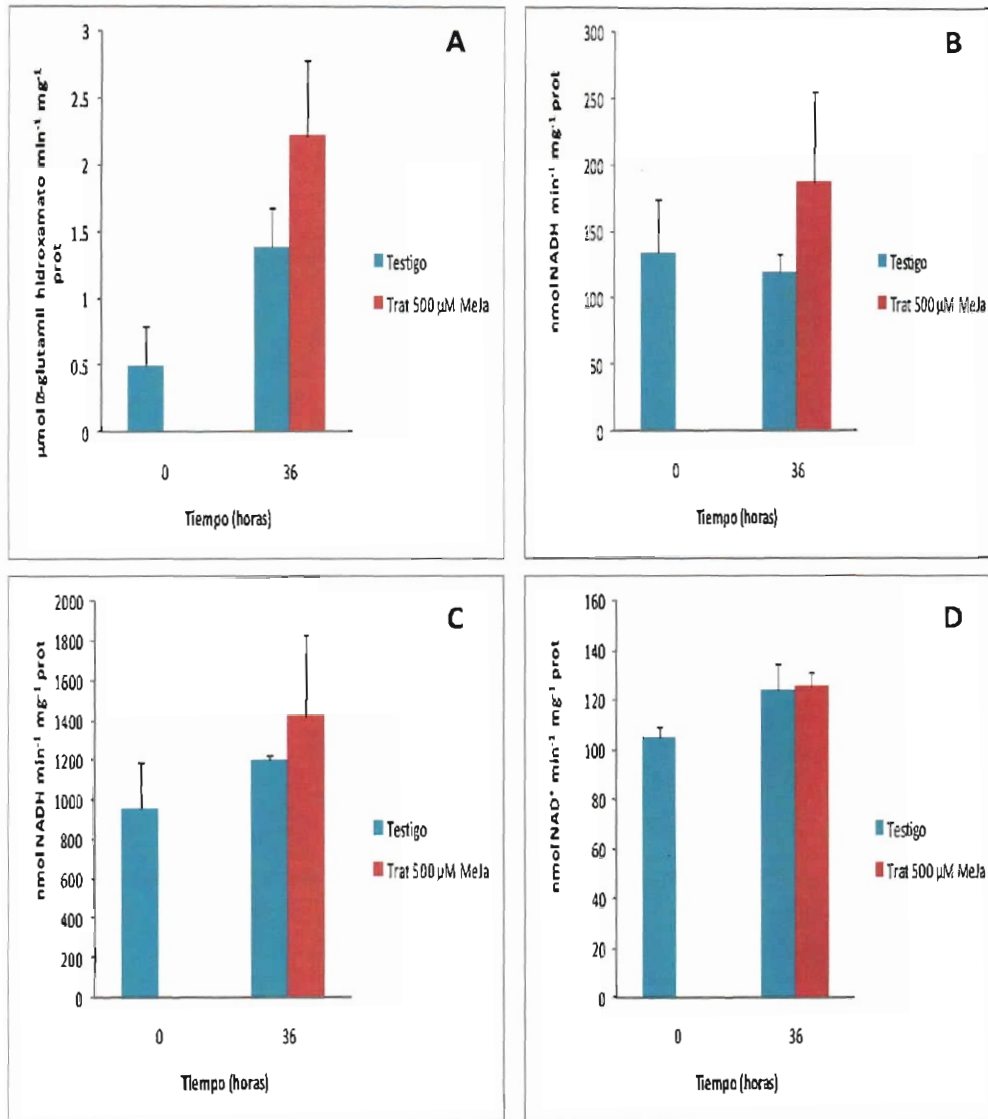


Figura 3.5. Efecto del MeJa sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. A) GS, B) GOGAT-NADH, C) GDH-NADH y D) GDH-NAD⁺. Los matracas contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Respecto a la GDH tanto en el sentido aminativo (dependiente de NADH) como en el sentido desaminativo (dependiente de NAD), los tratamientos tampoco produjeron cambios en la actividad, respecto al testigo (Figura 3.4C y D) y solamente en el tratamiento con AS, se observó una disminución a las 24 horas de exposición (Figura 3.5C y D).

Por otro lado, al observar las actividades de la GDH obtenidas en tejido placentario sometidas a tratamiento con MeJa (Figura 3.5C y D), se aprecia que, tanto en el sentido aminativo como el desaminativo, no hubieron diferencias con respecto al testigo. Al comparar los tratamientos con AS y MeJa se observa una respuesta diferente solamente en el caso de la actividad de la GDH, lo cual podría explicarse con base en el hecho de que cada uno de estos inductores activa rutas de transducción diferentes (Repka, 2001; Maleck y Dietrich, 1999), aún cuando ambos condujeron a la acumulación de capsaicinoides en el tejido placentario.

Si bien es cierto que existen reportes de que el tratamiento con AS aumenta la actividad de la GS (Rana *et al.*, 2008), así como MeJa hace lo propio para la GDH (Watanabe *et al.*, 2007), en este sistema experimental esto no pudo ser observado. Esto podría tener dos explicaciones: la primera sería que en *Capsicum chinense* esto no ocurre, pues este aumento en la expresión sólo se circunscribe a ciertas especies y/o tejidos, y la segunda podría ser que el sistema experimental no reúne las condiciones ideales para poder observar este efecto. Aún cuando podría presentarse diferencias en la actividad de las enzimas evaluadas en los tejidos que han sido tratados con AS o MeJa, estos cambios no pudieron observarse, posiblemente debido a un enmascaramiento provocado por el exceso de N en el medio MS completo (60 mM) que fue utilizado.

3.4 LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL EN EL MEDIO DE CULTIVO MODIFICÓ LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACIÓN DE AMONIO

Una vez que se encontró que la disminución en la cantidad de N total aumentó la acumulación de los capsaicinoides, se determinaron los efectos sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. En este experimento se evaluó una concentración total de 10 mM de N, por ser aquella en la que se encontró el mayor contenido de

capsaicinoides. A la par se hizo lo mismo con el medio que contenía 60 mM (dosis completa de N). Las actividades de las enzimas NR (Baas-Espinola, 2009), NiR (Roca-Mézquita, 2009), GS y GDH-NADH (Ancona-Escalante, 2009), alcanzaron los máximos de actividad específica a los tres días de haberse establecido el cultivo de placentas. Por lo tanto, las enzimas fueron evaluadas a ese tiempo. En los cultivos mantenidos con la dosis completa de N total, se observó un aumento en función del tiempo en la actividad de todas las enzimas evaluadas (GS, GOGAT-NADH, GDH-NADH y GDH-NAD; Figura 3.6).

Por otro lado, cuando las placentas se mantuvieron con 10 mM de N, si bien hubo un ligero aumento en la actividad de GS a lo largo del tiempo, éste siempre se mantuvo por debajo del tratamiento con la dosis completa (Figura 3.6A). La actividad de la GOGAT-NADH se mantiene igual que en el tiempo cero con 10 mM de N; sin embargo, con la dosis completa, la actividad de esta enzima aumenta (Figura 3.6B). Las actividades de la GDH-NADH y la GDH-NAD disminuyeron incluso a niveles inferiores a los detectados al inicio del experimento. Esto sugiere un papel preponderante del ciclo GS/GOGAT en condiciones de baja disponibilidad de N. De los resultados obtenidos se podría concluir que la disponibilidad del N tuvo un efecto positivo sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio.

El N es un macronutriente esencial, cuyas fuentes orgánicas e inorgánicas funcionan como señales claves que gobiernan la expresión de un gran número de genes relacionados directa o indirectamente con su metabolismo en plantas (Vidal y Gutiérrez, 2008). La disponibilidad de nitrógeno en cantidad suficiente se torna fundamental para la productividad en la agricultura, por lo que existe actualmente una cantidad apabullante de artículos relacionados en este tópico en plantas de interés agronómico. No obstante, también es una de las razones por las que se han visto escasamente explorados aspectos del metabolismo nitrogenado, relacionados con la producción de metabolitos secundarios, como lo es, en este caso, durante la producción de capsaicinoides en *Capsicum chinense* Jacq.

Uno de los aspectos importantes del metabolismo nitrogenado que se evaluó en este trabajo fue la respuesta de las enzimas de asimilación de amonio en placentas productoras de capsaicinoides ante diferentes regímenes de disponibilidad de N total (NO_3^- : NH_4^+ ; relación 2:1, respectivamente). Los resultados muestran que bajo las condiciones en las que las placentas son mantenidas con 60 mM de N, la actividad de las enzimas evaluadas aumentó considerablemente en un periodo de tres días. Estos datos

corroboraron lo descrito con anterioridad (Ancona-Escalante, 2009; Baas-Espinola, 2009; Roca-Mézquita, 2009). Los resultados implicarían que el NO_3^- , que estaba siendo reducido a NH_4^+ , se utiliza por las enzimas del ciclo GS/GOGAT y por la GDH-NAD(H). Sin embargo, en bajas cantidades de N (10 mM), la actividad de estas enzimas se mantiene igual que en el tiempo cero (GS y GOGAT) e incluso tienden a mantenerse por debajo de este valor (GDH-NAD(H)).

La disminución en la actividad de las enzimas de asimilación de amonio encontrado en este trabajo podría explicarse con base en el hecho de que el NO_3^- controla la expresión de cientos de genes involucrados en un amplio rango de procesos en la planta, y que por lo tanto, al disminuir la cantidad de este compuesto en el medio (de 60 a 10 mM), de igual manera esta acción se ve reflejada en una disminución en la actividad de estas enzimas. Por ejemplo, el nitrato regula su propia toma y asimilación a través de la regulación de transportadores de NO_3^- , o la nitrato reductasa mediante la producción de poder reductor (modificando la ruta pentosa fosfato). El NO_3^- así mismo regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo del carbono, y de esta manera, coordina la producción de ácidos orgánicos, necesarios para la conversión del N de una forma inorgánica a otra orgánica como los aminoácidos glutamato y glutamina (Vidal y Gutiérrez, 2008).

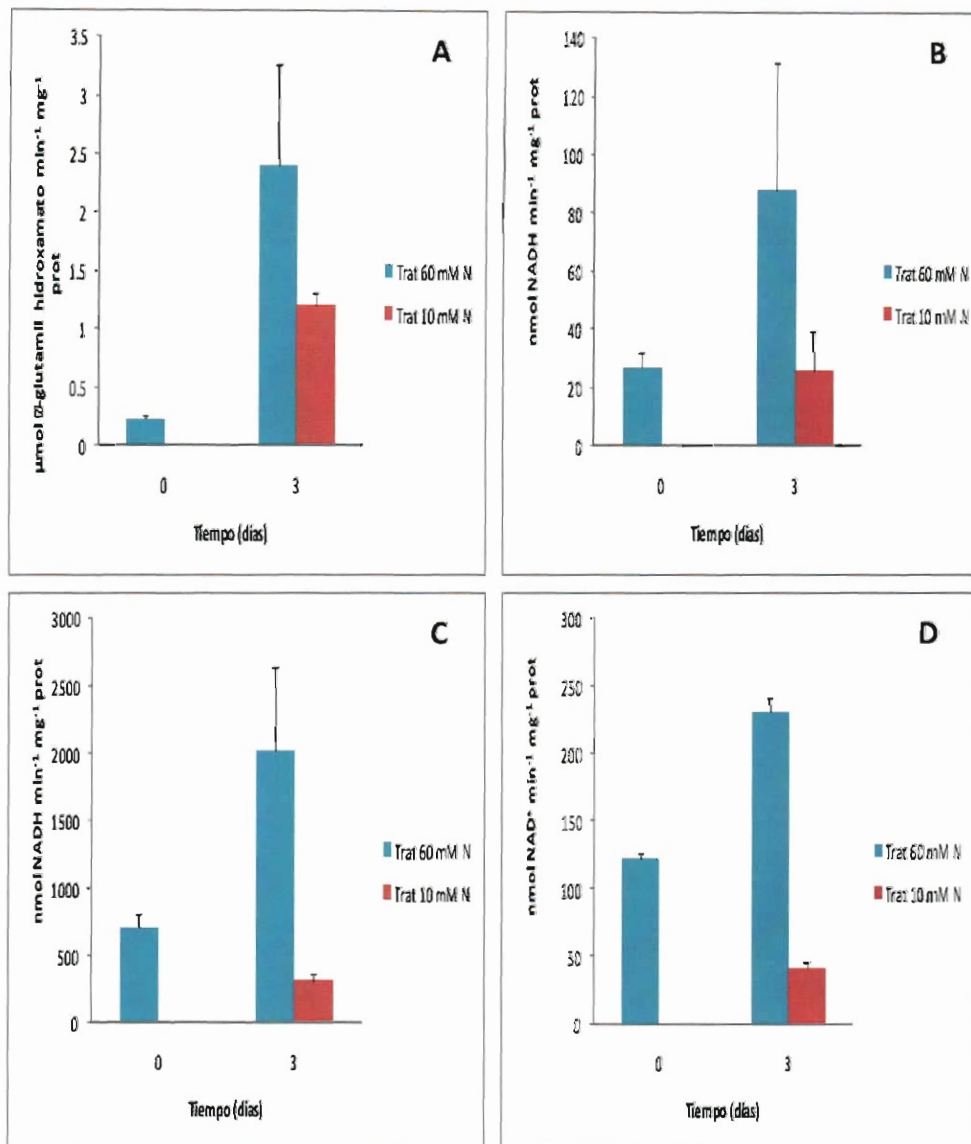


Figura 3.6. Efecto de la variación de la cantidad total de nitrógeno sobre la actividad de las enzimas de asimilación de amonio. A) GS, B) GOGAT-NADH, C) GDH-NADH y D) GDH-NAD⁺. Los matracos contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

3.5 LAS POZAS DE AMONIO Y AMINOÁCIDOS SE MANTUVIERON CONSTANTES CUANDO EL TEJIDO PLACENTARIO FUE TRATADO CON EL ÁCIDO SALICÍLICO O EL JASMONATO DE METILO

Con la finalidad de complementar los datos obtenidos sobre las actividades enzimáticas del metabolismo primario del nitrógeno en las placentas bajo las diferentes condiciones evaluadas, se cuantificó la poza endógena de amonio, sustrato de las enzimas analizadas, así como la cantidad de aminoácidos totales como una estimación del N que está siendo incorporado a su forma orgánica.

Cuando el cultivo se sometió a condiciones de inducción, tanto con AS como con MeJa, el contenido de amonio se mantuvo en un nivel similar al del testigo (alrededor de los 40 μ moles por gramo de peso fresco; Figura 3.7).

La poza endógena de aminoácidos, como equivalentes de glutamato, en placentas sometidas al proceso de inducción se mantuvo sin cambios a lo largo del periodo de tratamiento (Figura 3.8). Los valores se mantuvieron alrededor de 25 μ moles por gramo de peso fresco. De estos datos, se podría sugerir que a pesar de que los tratamientos con AS o MeJa podrían incrementar la demanda de N (en forma de amonio y aminoácidos) para producir capsaicinoides en placentas mantenidas en un cultivo *in vitro*, este tejido es capaz de suministrarlos sin alterar la poza endógena, posiblemente debido a que se encuentran en un medio rico en nitrógeno (60 mM).

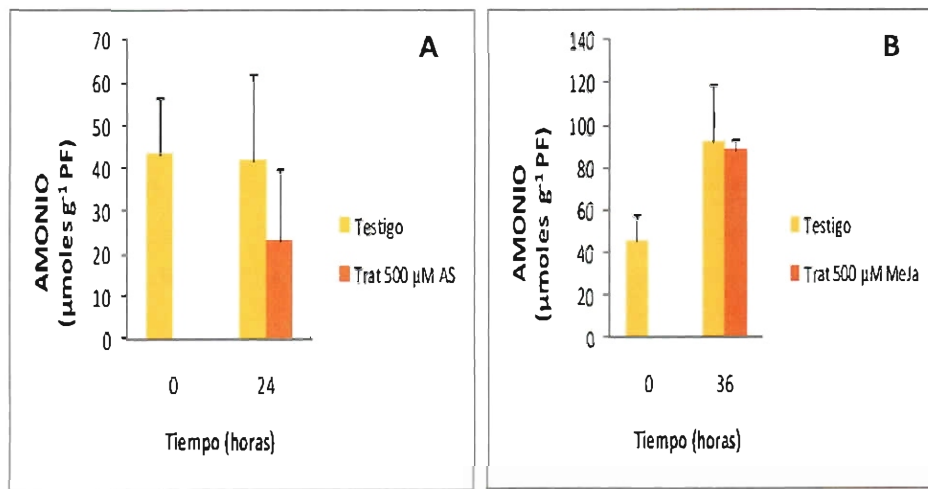


Figura 3.7. Efecto del A) ácido salicílico y del B) jasmonato de metilo sobre la poza de amonio en placentas cultivadas in vitro de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

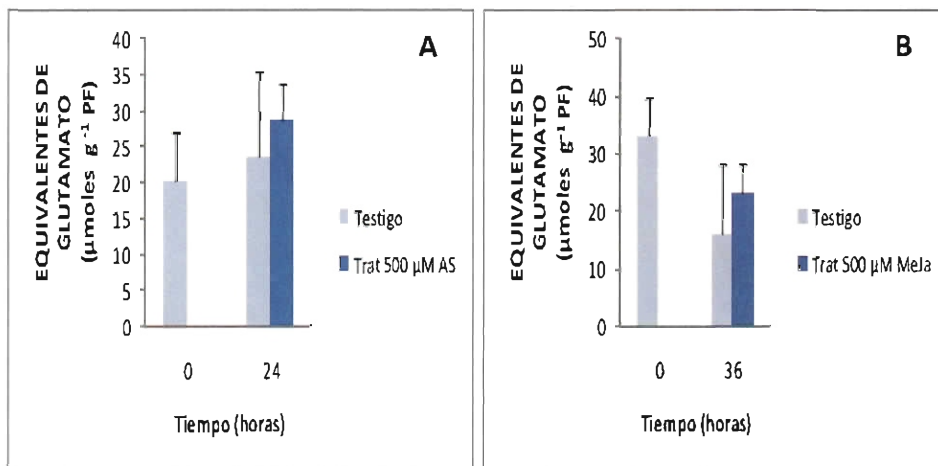


Figura 3.8. Efecto del A) ácido salicílico y del B) jasmonato de metilo sobre la poza de aminoácidos en placentas cultivadas in vitro de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

3.6 LAS POZAS DE AMONIO Y AMINOÁCIDOS EN EL TEJIDO PLACENTARIO SE VIERON AFECTADAS CUANDO SE MODIFICÓ LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE N EN EL MEDIO DE CULTIVO

El contenido de amonio en las placentas mantenidas en la dosis completa de N aumentó con respecto al tiempo, iniciando con un contenido de alrededor de 30 μ moles para alcanzar en el día 3 un valor cercano a los 70 (Figura 3.9). Esta misma tendencia se observó en las placentas tratadas con MeJa, i.e. un aumento en la concentración de amonio debido al tiempo de cultivo. Cuando se redujo la cantidad total de N, de 60 a 10 mM, el contenido de amonio se mantuvo sin cambio.

Por otro lado, con la dosis completa de N el contenido de aminoácidos en las placentas se mantuvo constante desde el inicio del tratamiento hasta el día 3 (Figura 3.10). Cuando este tejido se mantuvo con 10 mM de N, el contenido de aminoácidos disminuyó. Esto probablemente se explicaría debido a que al disminuir la cantidad de nitrato y amonio, disminuyó la actividad de las enzimas de asimilación de amonio (Figura 3.6), y concomitantemente el suministro de Glu y Gln, necesario para la síntesis de otros aminoácidos. Esto estaría entonces ligado a que una disminución en la cantidad de nitrato dispara la síntesis de capsaicinoides (Figura 3.3), y con ello aumentó la demanda de precursores, necesidad que sería amortiguada por las pozas endógenas de amonio y aminoácidos.

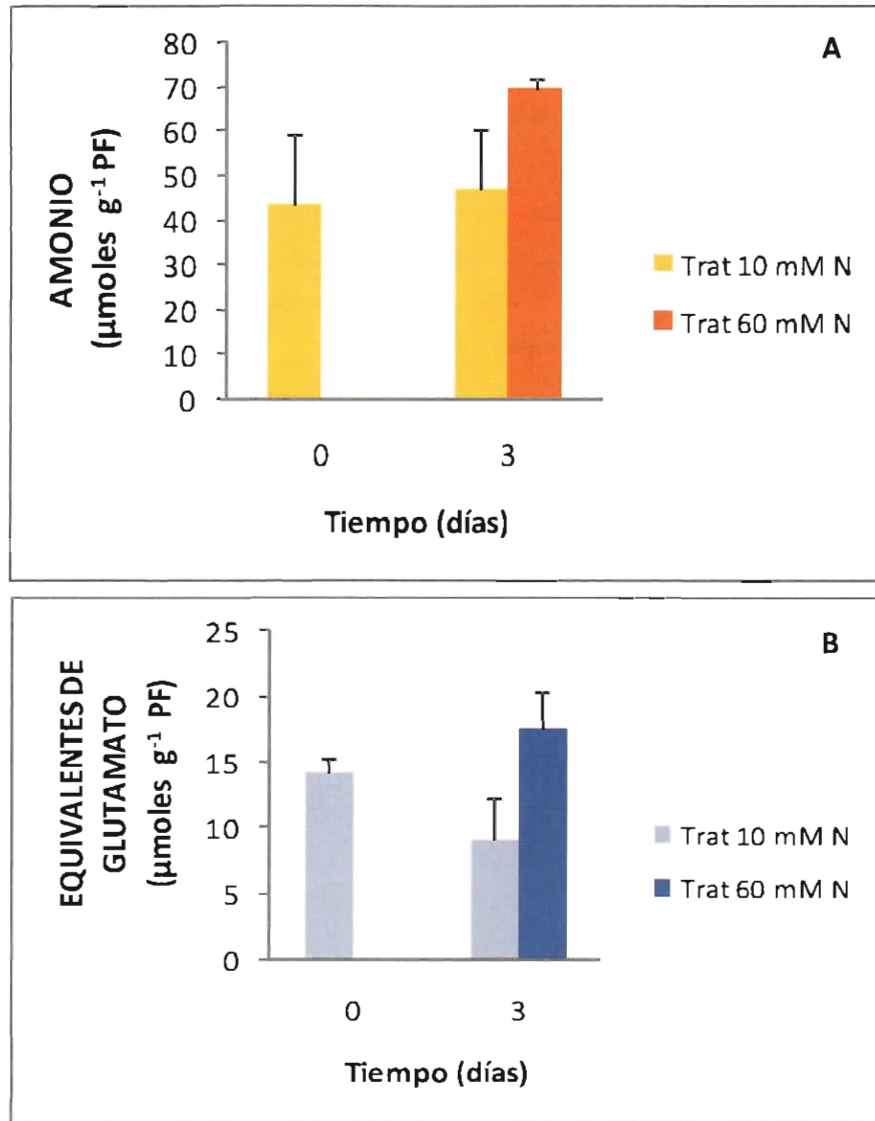


Figura 3.9. Efecto de la variación de la concentración total de N sobre las poza de A) amonio y B) aminoácidos en placentas cultivadas in vitro de *Capsicum chinense* Jacq. Los matraces contenían 3 g de peso fresco y 40 mL de medio. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

3.7 DISCUSIÓN GENERAL

El N es un elemento necesario para la síntesis de los capsaicinoides, ya que su disponibilidad afecta la capacidad de acumulación de sus precursores (Monforte-González *et al.*, 2010; Johnson y Decoteau, 1996). El tejido placentario de *Capsicum annuum* es capaz de mantener la síntesis de capsaicinoides cuando se cultiva *in vitro* con N inorgánico (nitrato y amonio) como única fuente (Johnson *et al.*, 1990). Esto llevó a plantear la hipótesis de que las placentas tienen la maquinaria enzimática necesaria para convertir el N inorgánico a una forma orgánica, y con ello, proveer los precursores para la síntesis de capsaicinoides (Miranda-Ham *et al.*, 2007). A pesar de que la evidencia sugiere que el tejido placentario es capaz de conseguir los precursores necesarios para la síntesis de capsaicinoides (valina, leucina y fenilalanina), hasta ahora, el origen de éstos permanecía desconocido (Miranda-Ham *et al.*, 2007; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

La placenta es capaz de reducir el nitrato a amonio (Baas-Espinola, 2009; Roca-Mézquita, 2009), para incorporarse a una forma orgánica como glutamato y glutamina (Ancona-Escalante, 2009). Además, el amonio es la principal fuente de nitrógeno para este tipo de tejido, al menos bajo condiciones *in vitro*.

Sin embargo, la relación que pudiera existir entre las enzimas de asimilación primaria y la síntesis de capsaicinoides aún no era clara, por lo que en el presente trabajo, se buscó establecer la relación potencial entre el metabolismo primario y el secundario en un cultivo de placentas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. Para ello, se desarrolló una estrategia para activar la síntesis de capsaicinoides de dos formas diferentes: primero, con la inducción del metabolismo secundario, y segundo, con la modificación de la cantidad total de N que repercutiría sobre las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno. Esto se hizo con el fin de poder analizar el metabolismo nitrogenado en estas condiciones. El AS y el MeJa son capaces de provocar un aumento en la acumulación de los capsaicinoides, tanto en células en suspensión de *C. chinense* (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010) como en placentas de *C. annuum* (Sudha y Ravishankar, 2003). Por otro lado, el uso de diferentes cantidades de N afecta la síntesis de capsaicinoides (Monforte-González *et al.*, 2010).

Para alcanzar los objetivos propuestos, se utilizó como sistema experimental el cultivo *in vitro* de placentas recubiertas con una película de alginato. Este proceso de recubrimiento, por el cual el tejido es aislado físicamente por medio de una barrera

semipermeable, permitió que las placentas se mantuvieran viables y metabólicamente activas hasta un periodo de hasta cinco días después de su establecimiento (Ancona-Escalante, 2009). Este sistema experimental, por un lado posee las ventajas del sistema *in vitro*, es decir, condiciones controladas, permitiendo conservar cierto grado de organización, que es muy importante para la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Verpoorte *et al.*, 1999).

Los resultados muestran que a pesar de que el AS y el MeJa indujeron un aumento en la acumulación de los capsaicinoides (Figura 3.1 y 3.2), las actividades de la GS y la GOGAT (Figura 3.4A y B; 3.5A y B) no se vieron afectadas por los tratamientos de inducción. De este modo, en las condiciones ensayadas la activación del metabolismo secundario no requiere una activación del metabolismo básico.

Además, al parecer la actividad de la GDH, tanto en el sentido aminativo como desaminativo, es tan sólo marginal, pues el ciclo GS-GOGAT tiene un papel central en la producción de los precursores para la síntesis de los capsaicinoides cuando se inducen los cultivos con AS (Figuras 3.4C y D). El papel principal de este ciclo durante la asimilación de amonio en tejido placentario también ha sido señalado por Ancona-Escalante (2009).

Es posible que los efectos, tanto del AS como del MeJa, ocurran sobre la actividad de las enzimas que se encuentren cercanas a la síntesis de los precursores (fenilalanina), como la corismato mutasa o la arogenato deshidratasa, o bien, solo sobre aquellas enzimas directamente involucradas con la síntesis de los capsaicinoides.

Posteriormente se evaluó el efecto de la variación en la cantidad total de N en el medio de cultivo. La disminución en la cantidad de este elemento tuvo un efecto directo sobre la acumulación de capsaicinoides. Durante las primeras 24 h, con 10 mM se detectó un aumento considerable de estos compuestos, mientras con 30 mM, el aumento se presentó hasta las 72 h (Figura 3.3).

Estos resultados nos muestran, en su conjunto, que el contenido de N total en el medio desempeñó un papel importante, ya que se observó un aumento en la producción de los capsaicinoides mediante la adición del AS y MeJa (Figura 3.1 y 3.2), sin que hubieran cambios importantes en las actividades de las enzimas de asimilación de amonio (Figura 3.4 y 3.5). Este aumento se dio incluso sin la modificación en los niveles de las pozas de aminoácidos o amonio (Figura 3.7 y 3.8). Esto fue más notable cuando el tejido

placentario se mantuvo en un medio pobre en N, pues aún cuando hubo un aumento en la acumulación de capsaicinoides (Figura 3.3), tanto la poza de amonio como la de aminoácidos fueron capaces de cubrir la demanda de precursores (Figura 3.9). Se podría sugerir que para observar un aumento en las actividades de las enzimas de asimilación de amonio [GS, GOGAT y GDH-NAD(H)] que conlleve un incremento concomitante en la acumulación de capsaicinoides, deberán aplicarse los inductores a un cultivo *in vitro* de placentas en un medio con una cantidad limitante de N. De esta manera, se podría separar el efecto de los inductores sobre estas enzimas, si lo hubiera, del ocasionado por el exceso de N en el medio.

De este modo, los datos sugieren que bajo las condiciones evaluadas no existe una relación directa entre los dos procesos, pues aunque hay una disminución de las actividades de las enzimas de asimilación de amonio, las placentas fueron capaces de acumular una elevada cantidad de capsaicinoides. Más aún, la aplicación de AS o MeJa no tuvo un efecto directo sobre las actividades de las enzimas de asimilación de amonio, a pesar de promover la acumulación de capsaicinoides.

Hasta ahora, este es el primer reporte de un trabajo de esta naturaleza en *Capsicum chinense*, en donde se describe el papel de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio en relación con la síntesis de los capsaicinoides.

REFERENCIAS

- 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.
- 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 de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 62(1), 4881-4895.
- 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.
- Beckers, G. J. M. y S. H. Spoel (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. Plant Biology, 8(1), 1-10.
- 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(4), 533-548.
- 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.
- Holden, P. R. y M. M. Yeoman (1994). Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell cultures of *Capsicum frutescens* and their responses to an exogenously supplied elicitor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38(1), 31-37.
- 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., G. A. Ravishankar y L. V. Venkataraman (1990). *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. Plant Science, 70(2), 223-229.
- Kazan, K. y J. M. Manners (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. Plant Physiology, 146, 1459-1468.
- Lindsey, K. y M. M. Yeoman (1984). The synthetic potential of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*. Planta, 162(6), 1495-501.

- Maleck, K. y R. A. Dietrich (1999). Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science*, 4(6), 215-219.
- 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.
- 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.
- 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 annum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141(2), 147-152.
- Rana, N., P. Mohanpuria y S. K. Yadav (2008). Cloning and characterization of a cytosolic glutamine synthetase from *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze that is up regulated by ABA, SA, and H₂O₂. *Molecular Biotechnology*, 39(1), 49-56.
- Raval, K. N., S. Hellwing, G. Prakash, A. Ramos-Plasencia, A. Srivastava y J. Buchs (2003). Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(1), 16-22.
- Repka, V. (2001). Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 44(4), 555-565.
- 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. 45 p.
- Sato, K., M. Nakayama y J.-I. Shigeta (1996). Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science*, 113(1), 91-98.
- 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.

- Suresh, B. y G. A. Ravishankar (2005). Methyl jasmonate modulated biotransformation of phenylpropanoids to vanillin related metabolites using *Capsicum frutescens* root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2), 125-131.
- 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.
- Verpoorte, R., R. Van Der Heijden, H. J. Ten Hoopen y J. Memelink (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathway for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21(6), 467-479.
- Vidal, E. A. y R. A. Gutiérrez (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 521-529.
- Watanabe, M., Y. Itho, Y. Jo, K. Yasuda, K. Kamachi y Y. Watanabe (2007). Redox and translational regulation of glutamate dehydrogenase α -subunits in *Brassica napus* under wounding stress. *Plant Science*, 172(6), 1182-1192.
- Yeoman, M. M. y C. L. Yeoman (1996). Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, 134(4), 553-569.
- Zhong, J.-J. y S.-J. Wang (1998). Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*, 33(6), 671-675.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

El jasmonato de metilo y el ácido salicílico indujeron un aumento en la acumulación de los capsaicinoides (tanto capsaicina como dihidrocapsaicina) en un cultivo *in vitro* de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq.; sin embargo, estos dos inductores no demostraron tener un efecto directo sobre las actividades de las enzimas de asimilación de amonio [GS, GOGAT-NADH, GDH-NAD(H)].

Una disminución en la concentración de N total del medio de cultivo repercute en una disminución de la actividad de las enzimas de asimilación de amonio; no obstante, la cantidad de capsaicinoides encontrada en el tejido placentario se ve aumentada.

Los tratamientos con jasmonato de metilo y ácido salicílico sobre las placentas no modificaron las pozas endógenas de aminoácidos y amonio, ocurriendo lo contrario cuando hubo una disminución en la concentración de N en el medio de cultivo.

De este modo, el aumento en la síntesis de capsaicinoides no requiere, al menos en las condiciones ensayadas, la asimilación primaria de N, probablemente porque los inductores promueven la transformación de intermediarios tardíos.

4.2 PERSPECTIVAS

Las placentas inmovilizadas de chile habanero han demostrado ser un buen modelo para el estudio del metabolismo primario de N. Hasta ahora, en nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que este tejido es capaz de incorporar N de una forma inorgánica a una orgánica, es decir, que en las placentas se encuentran funcionales las enzimas NR, NiR, GS/GOGAT-NADH y GDH-NAD(H) (Ancona-Escalante, 2009; Baas-Espinola, 2009; Roca-Mézquita, 2009). Además, recientemente también se reportó la funcionalidad de una enzima más que participa de manera importante en la síntesis del precursor fenilalanina: la corismato mutasa (Cough-Nic, 2011). Falta ahora determinar si la arogenato deshidratasa, otra enzima clave en la síntesis de fenilalanina, cuyo origen hasta ahora se mantiene desconocido, está presente en las placentas de chile habanero.

Con este trabajo se amplía la visión integral del metabolismo nitrogenado que se encuentra asociado a la síntesis de los capsaicinoides, y que de alguna manera, provee de los precursores necesarios para que ésta ocurra. Además, estos resultados nos permiten reconsiderar y plantear nuevas preguntas asociadas al metabolismo del N en el tejido placentario, al momento de plantear experimentos futuros. Aún quedan por resolver preguntas como: ¿Qué pasaría con las actividades de las enzimas de asimilación de amonio si se disminuye la cantidad de N en el medio de cultivo y se aplican los inductores?, ¿Qué sucedería con estas enzimas y la síntesis de capsaicinoides cuando la relación nitrato:amonio del medio original se modifica?, ¿Tendrán el mismo comportamiento con respecto a la inducción con AS y MeJa aquellas enzimas que se encuentren más cercanas a la síntesis de fenilalanina?, ¿Qué sucedería con la expresión de los genes que codifican para cada una de estas enzimas?, ¿Los patrones de expresión de los transcritos se correlacionan con la síntesis de los capsaicinoides?

Los capsaicinoides son metabolitos secundarios de importancia comercial y en la medida en que se vayan comprendiendo los detalles que gobiernan su síntesis, tanto mejor se podrán implementar estrategias biotecnológicas que permitan aumentar su producción en un futuro no muy lejano.

REFERENCIAS

- 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.
- 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. 50 p.
- 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.
- 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. 45 p.