

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Estudio de las enzimas de asimilación de amonio en un
cultivo de placentas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq.**

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias que presenta:

Q.B.B. WENDY DEL ROSARIO ANCONA ESCALANTE

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Mérida, Yucatán, México
2009



Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que me reservo ningún derecho sobre ello.



Q.B.B. Wendy del Rosario Ancona Escalante

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham y fue apoyado económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el proyecto 50879Z y la beca para estudios de Maestría de Wendy del Rosario Ancona Escalante (211995).

Dedicatorias

Con mucho amor y cariño para mi esposo e hijo, que me apoyaron y regalaron su tiempo para que yo pueda trabajar en lo que me gusta, sin ninguna queja.

A mis padres, por todo el apoyo que me han brindado hasta ahora y que incondicionalmente me dan.

A todos los del laboratorio número ocho, porque en este trabajo se ve reflejado parte de su esfuerzo y dedicación en la investigación.

A mis amigos de posgrado, que me acompañaron en el camino de la ciencia.

Agradecimientos

A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su supervisión, por su apoyo y paciencia.

A la M.C. Lizbeth Arianelly Castro Concha, por la ayuda técnica brindada, sus consejos, amistad y buenos deseos.

A la Dra. Elisa Valenzuela, por sus valiosos consejos.

Al Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por hacerme sufrir con sus cuestionamientos y de esta manera, obtener un buen trabajo de tesis.

A la Dra. Ileana Echeverría Machado, por las plántulas de chile habanero brindadas, así como también a sus comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rafael Rojas, por hacerme ver que un trabajo siempre puede dar más de lo que uno piensa.

A los Q.Q.B.B.B.B. Fray Martin Baas Espinola y Carolina Roca Mezquita, así como también al I.A. Ismael Canche, por facilitarme el trabajo experimental y también por distraerme de preocupaciones cuando el estrés estaba en su máxima expresión.

A la M.M.C.C. Rosy Galaz y Nancy Ruiz, por su ayuda con el HPLC.

Abreviaturas

ACL	Proteína acil acarreadora
ATP	adenosina trifosfato
C.	<i>Capsicum</i>
°C	Grados centígrados
¹⁴C	Carbono 14
CaCl₂	Cloruro de calcio
Ca₄H	Cinamato 4-hidroxilasa
Ca₃H	Cumarato 3-hidroxilasa
c.b.p.	Cuanto baste para
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
COMT	Ácido cáfeico metiltransferasa
CS	Capsaicinoide sintasa
CTC	Carbonato-Tartrato-Cobre
EC	Clasificación enzimática
FAS	Ácido graso sintasa
FAT	Tioesterasa
FeCl₃·6H₂O	Cloruro férrico hexahidratado
Fdx-GOGAT	Glutamato sintasa dependiente de ferredoxina
g	Gramos
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa (Glutamino oxoglutarato aminotransferasa)
GS	Glutamino sintetasa
GS1	Glutamino sintetasa citosólica
GS2	Glutamino sintetasa cloroplástica
H⁺	Ión hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
i.e.	En tanto ó por lo tanto
KAS	β-cetoacil sintasa
kDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis y Menten
m	Metro
mg	Miligramos
µg	Microgramos
min	Minutos
ml	Mililitros
µL	Microlitros

mm	Milímetro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
μm	Micrometros
MS	Murashige y Skoog
NAD(P)H-GOGAT	Glutamato sintasa dependiente de nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
NAD⁺	Dinucleótido de adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de adenina reducido
NaOH	Hidróxido de sodio
NiR	Nitrito reductasa
nm	Nanometros
NO₃⁻	Ión nitrato
NR	Nitrato reductasa
ODS	Octadecil silano
OH⁻	Ión hidroxilo
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PF	Peso fresco
ppm	Partes por millón
<i>Pun1</i>	Gen que codifica para la capsaicinoide sintasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
ton	Toneladas
Tris-HCl	Trizma base con ácido clorhídrico
uS	Unidades Scoville
VR1	Receptor vainilloide tipo 1
x g	unidades de fuerza gravitacional
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
10X	Concentrado 10 veces

Contenido

	Página
Lista de abreviaturas	iv
Lista de cuadros y figuras	ix
Resumen	xii
Abstract	xiv
Introducción	1
Capítulo I Antecedentes	
1.1. Nitrógeno	3
1.2. Asimilación de amonio	4
1.3. Asimilación de amonio en frutos	7
1.4. El chile	8
1.5. Chile habanero	9
1.5.1. Descripción morfológica	9
1.5.2. Picor	10
1.5.3. Industrialización y comercialización	11
1,5,4. Usos	12
1.5.5. Biosíntesis de los capsaicinoides	13
1.6. Metabolismo secundario y cultivo de tejidos	17
1.7. Justificación	18
1.8. Hipótesis	19
1.9. Objetivo	19
1.10. Objetivos particulares	20
1.11. Diseño experimental	21
Capítulo II Materiales y métodos	
2.1. Material biológico	29
2.2. Desinfestación de chile habanero	29
2.3. Inmovilización de las placentas de chile habanero	29
2.4. Métodos	31
2.4.1. Obtención del extracto enzimático	31
2.4.2. Determinación de la actividad de la GDH-NADH	31

2.4.3. Determinación de la actividad de la GDH-NAD ⁺	32
2.4.4. Determinación de la actividad de la GS	32
2.4.5. Determinación de la actividad de la GOGAT-NADH	33
2.5. Pozas de los sustratos involucrados en los análisis	34
2.5.1. Determinación de proteínas	34
2.5.2. Determinación de aminoácidos	35
2.5.3. Determinación de amonio	35
2.6. Determinación de capsaicinoides por HPLC	36
2.7. Determinación de viabilidad mediante azul de Evans	36
2.8. Medición del pH y la conductividad del medio de cultivo	37

Capítulo III Resultados y discusión

3.1. Cultivo de placentas inmovilizadas	39
3.1.1. pH del medio de cultivo	39
3.1.2. Conductividad del medio de cultivo	41
3.1.3. Viabilidad del tejido placentario	42
3.2. Contenido de capsaicinoides en las placentas y en los medios de cultivo	43
3.3. Actividad de las enzimas involucradas en la asimilación del amonio en las placentas inmovilizadas de chile habanero	48
3.3.1. Actividad de la glutamato deshidrogenasa aminativa (GDH-NADH)	48
3.3.2. Actividad de la glutamato deshidrogenasa desaminativa (GDH-NAD ⁺)	50
3.3.3. Análisis del cociente de las actividades de la glutamato deshidrogenasa (aminativa/desaminativa) en placentas inmovilizadas y en periodo post-cosecha.	52
3.3.4. Actividad de la glutamino sintetasa (GS)	54
3.3.5. Actividad de la glutamino 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT-NADH)	56
3.3.6. Actividades enzimáticas en hojas de plantas maduras e inmaduras y raíces	59
3.4. Contenido de proteínas, amonio y aminoácidos en placentas inmovilizadas, medios de cultivo y placentas durante el periodo post-cosecha	60
3.4.1. Contenido de proteínas	61
3.4.2. Contenido de amonio	63

3.4.3. Contenido de aminoácidos	65
3.5. Discusión general	68
Capítulo IV Conclusiones y perspectivas	75

Lista de Cuadros y Figuras

Cuadro 3.1. Contenido de capsaicinoides totales y análisis de los porcentajes correspondientes a las placentas y el medio de cultivo.

Figura 1.1. Rutas de asimilación de amonio. El amonio incorporado es tomado por la glutamino sintetasa para la formación de la molécula de glutamina, que posteriormente recibe la glutamato sintasa formando dos moléculas de glutamato. La glutamato deshidrogenasa, una amino transferasa, realiza la reacción de aminación o desaminación para obtener glutamato o un oxo-ácido perteneciente al metabolismo del carbono.

Figura 1.2. Diversidad de frutos del género *Capsicum*.

Figura 1.3. Microfotografías de células epidérmicas (C) de cultivares picantes (recuadros 1 y 2) y no picantes (recuadro 3) de *Capsicum annuum*. Se pueden observar abultamientos parecidos a ampollas en la superficie de placentas de un cultivar picante (recuadros 1, 2). Cavidades subcuticulares (Sc), así como grietas también pueden discernirse. En el caso del cultivar no picante, la placenta presenta una superficie lisa (recuadro 3). (Tomado de Zamski *et al.*, 1987).

Figura 1.4. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género *Capsicum*. PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H, cumarato-3-hidroxilasa; COMT, ácido caféico O-metiltransferasa; pAMT, presunta amino transferasa de la vainillilamina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados; IvDH, alfa isovalerato deshidrogenasa; Kas, beta-cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS, capsaicinoide sintasa. La flecha punteada representa reacciones por caracterizar (Tomado de Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Figura 1.5. Diagrama del diseño experimental para la realización del trabajo. DPA, días posteriores a la antesis; MS, medio de cultivo Murashige y Skoog.

Figura 2.1. Secuencia del proceso de inmovilización. A) Corte del pericarpio para realizar la extracción del tejido placentario. B) Placenta aislada. C) Placenta aislada sin semillas. D) Tejido placentario listo para inmovilizar. E) Placentas embebidas en la solución de alginato al 2.5%. F) Placentas

cubiertas de alginato colocadas en CaCl_2 al 1% frío. G) Matraz conteniendo las placentas inmovilizadas.

Figura 3.1. pH del medio de placentas inmovilizadas de chile habanero a lo largo de un ciclo de cultivo. Los datos que se presentan son el valor promedio de nueve muestras y las barras de verticales indican la desviación estándar.

Figura 3.2. Conductividad en el medio de placentas inmovilizadas de chile habanero durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al valor promedio de nueve muestras y las barras verticales indican la desviación estándar.

Figura 3.3. Viabilidad de las placentas inmovilizadas de chile habanero a lo largo de un ciclo de cultivo. Los datos representan el valor promedio de seis placentas y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Figura 3.4. Análisis cromatográfico de placentas cultivadas y el medio de cultivo residual. A) Estándares de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2); B) extracto de placenta en el día cero de cultivo; C) extracto de placenta en el día nueve del cultivo; D) medio de cultivo del día cero y E) medio de cultivo del día nueve.

Figura 3.5. Contenido de capsaicinoides totales (capsaicina + dihidrocapsaicina) en placentas inmovilizadas. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.6. Aspecto del tejido placentario de chile habanero a lo largo de un ciclo de cultivo. A) En el día cero y B) en el día nueve. Las imágenes representan micrografías electrónicas de barrido, con acercamientos de 50 y 100 μm , respectivamente (Fotos: Lizbeth Castro-Concha).

Figura 3.7. Contenido de capsaicinoides (capsaicina + dihidrocapsaicina) liberados al medio por placentas inmovilizadas a lo largo de un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.8. Actividad de la GDH-NADH en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.9. Aspecto de chiles habaneros durante el periodo post-cosecha. A) Día cero. B) Día uno. C) Día tres. D) Día cinco. E) Día siete. Las condiciones bajo las cuales se encontraron expuestos fueron de fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad a 25°C.

Figura 3.10. Actividad de la GDH-NADH en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.11. Actividad de la enzima GDH-NAD⁺ en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.12. Actividad de la GDH-NAD⁺ en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.13. Cociente entre las actividades de GDH-NADH/GDH-NAD⁺ en cultivo in vitro de placentas inmovilizadas.

Figura 3.14. Relación entre las actividades de GDH-NADH/GDH-NAD⁺ en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días.

Figura 3.15. Actividad de la GS en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Figura 3.16. Actividad de la GS en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden a tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.17. Actividad de la GOGAT-NADH en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.18. Actividad de la GOGAT-NADH en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Figura 3.19. Comparación de actividades enzimáticas en hojas maduras, hojas de plántulas y raíces de plántulas. Los datos corresponden a tres repeticiones.

Figura 3.20. Concentración de proteínas en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.21. Concentración de proteínas en los medios a lo largo de un ciclo de cultivo de placentas inmovilizadas. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Figura 3.22. Concentración de proteína en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.23. Contenido de amonio en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales a la desviación estándar.

Figura 3.24. Contenido de amonio en medio de placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.25. Contenido de amonio en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.26. Contenido de aminoácidos en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.27. Contenido de aminoácidos en los medios de placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Figura 3.28. Contenido de aminoácidos en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos

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

Figura 3.29. Modelo teórico que explica los eventos que se encontraron durante el análisis llevado a cabo. 1. Incremento intracelular de amonio, disminución de la actividad de GDH desaminativa. 2. Incremento de GS y GDH aminativa. 3. Disminución de GDH aminativa, baja concentración de amonio, se eleva la concentración de aminoácidos y capsaicinoides, así como la actividad de GOGAT. 4. GS y GOGAT se acoplan como ciclo.

Resumen

Entre los mecanismos que disponen las plantas para asimilar amonio, se encuentran el ciclo glutamino sintetasa/glutamato sintasa y la enzima glutamato deshidrogenasa. Pocos estudios se han realizado sobre estas enzimas y su relación con la síntesis de metabolitos secundarios que incluyen nitrógeno. El chile habanero constituye un modelo ideal, ya que sintetiza a los capsaicinoides a partir de aminoácidos, los cuales se acumulan en la placenta del fruto, dándole su sabor picante. Por ello, el objetivo del trabajo fue cuantificar la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la asimilación del amonio en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), inmovilizadas en alginato.

A largo del análisis, se pudo apreciar que el día de mayor actividad de la GDH fue el tercero, coincidiendo con el de mayor acumulación de amonio en el tejido. Mientras que el pico de actividad de la GS coincide con la mayor acumulación de amonio en el medio (día cinco), lo que indica que la GDH participa en la destoxificación del amonio intracelular, mientras que la GS participa principalmente en la asimilación del mismo. El hecho de encontrar una elevada actividad de la GS en comparación con la de GDH, apunta a concluir que la vía principal por la cual las placentas asimilan amonio es a través del ciclo GS-GOGAT.

Se determinó que la concentración de capsaicinoides fue baja en el tejido placentario, y además, que la cantidad de vesículas intactas que los almacenan disminuye a lo largo del ciclo de cultivo, lo que podría explicar su aumento en el medio de cultivo.

Los datos obtenidos apuntan a la conclusión de que las placentas podrían ser capaces de elaborar sus propios precursores, basados en la demostración de la funcionalidad de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio, siendo éste el primer reporte sobre estudios hechos en este tejido con respecto al manejo de nitrógeno para la síntesis de los precursores de los capsaicinoides en chile habanero.

Abstract

Plants incorporate ammonia into organic molecules, via two pathways: the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase. Few studies have been published on these enzymes and their relationship to the synthesis of secondary metabolites that include nitrogen in their structure. Habanero pepper is an ideal experimental model, since it synthesizes capsaicinoids from amino acids, and accumulates them in the placental tissue in the fruit. Capsaicinoids are responsible of pungency in peppers. Therefore, the objective of this work was to determine the activity of the enzymes involved in ammonia assimilation in placental tissues of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.).

In the course of analysis, a major peak of GDH activity was detected on the third day of culture, which coincided with the point of higher ammonia accumulation in the tissue. Furthermore, the peak of maximal GS activity occurred at the same time that ammonia concentration was the highest in the culture medium (day five). These results suggest that GDH may be involved in intracellular ammonia detoxification, whereas GS is the main ammonia assimilation pathway.

The capsaicinoids concentration was low in the placental tissue in *in vitro* cultures, as well as the number of intact vesicles where they are accumulated. These results could explain the high amounts of capsaicinoids found in the culture medium.

Finally, the data presented in this study suggest that in the placental tissue of habanero peppers, the enzymes involved in ammonia assimilation are functional, and thus, can provide precursors for the synthesis of amino acids and finally, capsaicinoids. To our knowledge, this is the first report on studies made in placental tissues regarding the nitrogen flux for the synthesis of the building blocks for capsaicinoids in habanero pepper.

Introducción

Los estudios encaminados a entender la regulación en la toma de nitrógeno inorgánico y su incorporación a moléculas orgánicas, recientemente se han incrementado, siendo la principal razón de este aumento el de permitir un mejor conocimiento a nivel molecular sobre el manejo del nitrógeno, que redundará en un manejo preciso y sin dispendios de los fertilizantes para incrementar el contenido de proteína en muchos cultivos. Avances en los estudios biotecnológicos y moleculares de plantas, combinados con los fisiológicos y bioquímicos, han permitido conocer a mayor profundidad los mecanismos regulatorios que controlan los primeros pasos en la asimilación de nitrógeno inorgánico, y las subsecuentes rutas bioquímicas involucradas en proveer de este elemento a las plantas.

Las plantas pueden utilizar al nitrato y el amonio como fuentes externas de nitrógeno, siendo el amonio la molécula necesaria para la síntesis de compuestos orgánicos. Este compuesto también puede producirse a través de reacciones metabólicas internas, tales como la fotorrespiración, la conversión de aminoácidos y la hidrólisis de compuestos que contienen nitrógeno.

Para poder incorporar el amonio a compuestos orgánicos, principalmente aminoácidos, las plantas disponen de dos mecanismos enzimáticos. Por un lado, se encuentra el ciclo glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT), identificado como la vía principal por la que las plantas asimilan el amonio proveniente de la toma y la reducción de nitrato, así como el liberado en los distintos procesos fisiológicos, y por el otro, se encuentra la vía de la glutamato deshidrogenasa (GDH), que aunque al principio era considerada la única vía de asimilación de amonio, después del descubrimiento de GOGAT, se ha cuestionado la importancia de su papel en este proceso. Sin embargo, se ha observado que bajo algunas circunstancias, como por ejemplo: condiciones de estrés y de altos niveles de amonio intracelular, la enzima puede realizar esta función asimilatoria, y en condiciones donde existe una deficiencia de esqueletos carbonados, la enzima realiza la reacción catabólica para poder proveer de éstos a las células.

El metabolismo del nitrógeno está estrechamente relacionado al metabolismo del carbono. El nitrógeno inorgánico es necesario en los tejidos fotosintéticos para permitir que los carbohidratos sean utilizados en el crecimiento y la fotosíntesis, mientras que en aquéllos no fotosintéticos, la ruptura de los carbohidratos provee de agentes reductores, ATP y

esqueletos carbonados que soportan la asimilación de nitrógeno inorgánico y la síntesis de metabolitos que contienen nitrógeno.

El metabolismo primario es una fuente importante de precursores para la síntesis de metabolitos secundarios, los cuales tienen un amplio rango de funciones en el metabolismo, la señalización y la defensa contra diversos tipos de estrés, tanto biótico como abiótico. Estos metabolitos generalmente son sintetizados y acumulados en diversos órganos de la planta (Fritz *et al.*, 2006).

Estudios realizados en tabaco han permitido resaltar la importancia de la relación entre la respuesta del metabolismo secundario con la disponibilidad de metabolitos primarios, ya que las deficiencias en el metabolismo de carbono trajeron consigo una disminución en el metabolismo nitrogenado, y por tanto, la acumulación de nicotina en esta planta fue menor en comparación con aquéllas que mantenían sus rutas metabólicas en buenas condiciones (Fritz *et al.*, 2006).

Los frutos de las plantas del género *Capsicum* tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios llamados capsaicinoides, los cuales se originan a partir de aminoácidos y se almacenan en el tejido placentario. Estudios donde se aplican fertilizantes nitrogenados a plantas de *Capsicum annuum* demostraron que existe una relación estrecha entre la cantidad de nitrógeno disponible y la acumulación de estos metabolitos (Johnson & Decoteau, 1996). Adicionalmente, en placentas inmovilizadas cultivadas *in vitro* de *Capsicum frutescens* se ha observado que el tejido placentario inmovilizado mantiene la capacidad de producción de los capsaicinoides, siempre y cuando se les provean de diferentes fuentes nitrogenadas (Sudhakar-Johnson *et al.*, 1990). Sin embargo, aún no se han realizado estudios en este tejido para evaluar si éstos tienen la capacidad de sintetizar y acumular los precursores provenientes del metabolismo primario.

Dada la necesidad de entender cómo el tejido placentario puede sintetizar capsaicinoides a partir de fuentes inorgánicas de nitrógeno, el objetivo del trabajo fue determinar la actividad de las enzimas involucradas en su metabolismo primario, haciendo uso de un cultivo *in vitro* de placentas inmovilizadas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), una planta muy importante para el Estado de Yucatán, y así demostrar que estas enzimas se encuentran funcionales para proveer de precursores al tejido placentario para su posterior conversión en capsaicinoides.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Nitrógeno

El nitrógeno es el cuarto elemento más abundante en los organismos vivos. Constituye menos del 0.1% de la corteza terrestre y el 80% en la atmósfera, mayormente en forma de dinitrógeno. Aunque existe una aparente disparidad en estos contenidos, la gran masa de la corteza terrestre tiene una mayor cantidad de átomos de nitrógeno, siendo aproximadamente 50 veces superior al encontrado en la atmósfera (Miller & Cramer, 2004).

Mucho del nitrógeno utilizado por los seres vivos es tomado de una poza de compuestos nitrogenados disponibles en el subsuelo, que han sido previamente usados por otros organismos. Esta poza se ve complementada por nuevos ingresos provenientes de reacciones químicas, resultado de eventos naturales, o de la actividad humana. La fijación del nitrógeno atmosférico es llevada a cabo por organismos procarióticos solamente. Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de establecer asociaciones simbióticas con las plantas, lo que les permite a éstas tener una mayor disponibilidad de nitrógeno (Schubert, 1986; Crawford, 1995; Lancien *et al.*, 2000).

Este elemento comprende alrededor del 7% del total de la materia seca de las plantas, y es un constituyente fundamental de los componentes celulares, como son ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas y pigmentos fotosintéticos. Consecuentemente, la disponibilidad del nitrógeno tiene una considerable influencia sobre el crecimiento de la planta (Bungard *et al.*, 1999; Inokuchi *et al.*, 2002).

Dado que el nitrato es la principal fuente de nitrógeno para las plantas, ellas destinan gran parte de sus reservas de carbono y energía para su toma y asimilación. El proceso inicia con la toma de nitrato hacia el interior celular por acción de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Dentro del citoplasma, el nitrato puede ser transportado a la vacuola, donde es almacenado a elevadas concentraciones, siendo la raíz, los tallos y las hojas, los órganos principales de almacenamiento (Lancien *et al.*, 2000; Inokuchi *et al.*, 2002). El nitrato también puede ser transportado a través del xilema a grandes distancias y al no poderse incorporar directamente a los compuestos orgánicos, requiere ser reducido a amonio (Crawford, 1995).

La asimilación de nitrato permite a las plantas obtener la mayoría del nitrógeno reducido que necesitan (Bungard *et al.*, 1999; Inokuchi *et al.*, 2002; Forde & Lea, 2007). Para hacerlo, combinan la acción de las enzimas nitrato reductasa (NR, EC 1.6.6.1) y nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.7.1), las cuales catalizan la reducción de nitrato a nitrito y de éste a amonio, respectivamente (Schubert, 1986).

Otra manera de obtener amonio es a través de los transportadores, que pueden llevar a cabo una absorción directa del amonio cuando este ión está disponible en el suelo, o bien bajo condiciones ambientales particulares, como en los arrozales o los suelos forestales ácidos. El amonio también puede ser generado dentro de la planta por una variedad de procesos metabólicos, como la fotorrespiración, el metabolismo de fenilpropanoides, la utilización de los compuestos nitrogenados de transporte, el catabolismo de aminoácidos, del nitrógeno fijado simbióticamente y de la digestión de insectos, en el caso de plantas carnívoras (Dubois *et al.*, 2003).

Independientemente de la forma en que se produce, el amonio es convertido a formas orgánicas por diferentes procesos enzimáticos. Así, la glutamino sintetasa (GS, EC 6.3.1.2) incorpora amonio en la glutamina, que después dará lugar al glutamato por acción de la glutamato sintasa (GOGAT, EC 1.4.1.13). Por su parte, la glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2) forma directamente glutamato. Estos aminoácidos sirven subsecuentemente como donadores de nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos (Bungard *et al.*, 1999; Inokuchi *et al.*, 2002; Forde & Lea, 2007).

1.2. Asimilación de amonio

Durante mucho tiempo se asumió que la asimilación de amonio en plantas era realizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), como se había descrito en bacterias. No obstante, la asignación de esta función en plantas empezó a ser cuestionada después del descubrimiento del ciclo de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Aubert *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2003).

El ciclo GS/GOGAT (Fig. 1.1) es la vía preferencial por la que se asimila al amonio, ya que la GS, a diferencia de la GDH, tiene una alta afinidad por este ión, con base en su constante de Michaelis y Menten. Esta constante indica la velocidad de la enzima en el reconocimiento de su sustrato, su unión a él, y de esta manera, formar el producto. La GS tiene

una constante de Michaelis y Menten de 3 - 5 μM , esto es mil veces mayor que la de la GDH ($K_m = 10$ a 80 mM), por lo que puede operar a concentraciones bajas de amonio en las células vivas (Cruz *et al.*, 2004; Lehninger, 2005; Kaur *et al.*, 2006).

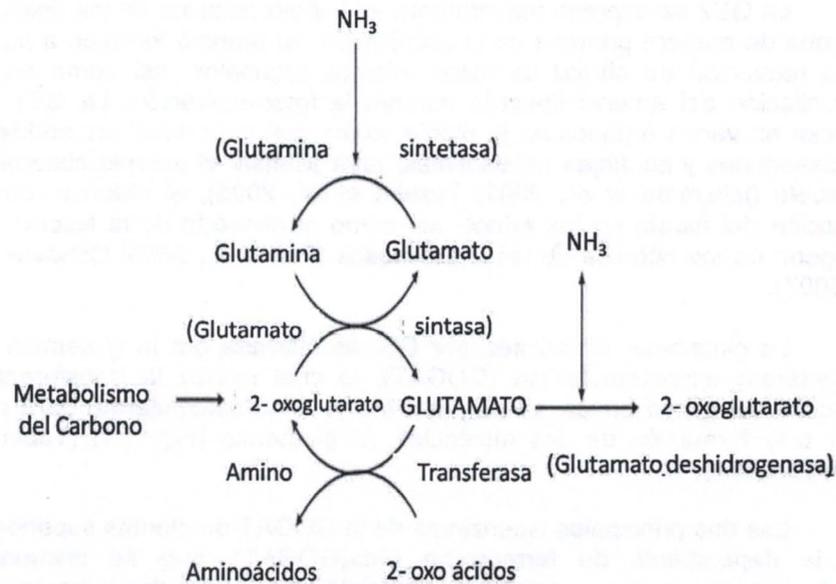


Figura 1.1. Rutas de asimilación de amonio. El amonio incorporado es tomado por la glutamino sintetasa para la formación de la molécula de glutamina, que posteriormente recibe la glutamato sintetasa formando dos moléculas de glutamato. La glutamato deshidrogenasa, una amino transferasa, realiza la reacción de aminación o desaminación para obtener glutamato o un oxo-ácido perteneciente al metabolismo del carbono.

En este ciclo, la GS cataliza la incorporación de amonio mediante el consumo de ATP para la formación de glutamina, usando glutamato como sustrato. En plantas existen dos isoenzimas, una presente en el citosol (GS1), y la otra, en el cloroplasto (GS2), que son productos homólogos de distintos genes nucleares (Paczek *et al.*, 2002; Dubois *et al.*, 2003; Forde & Lea, 2007).

Las proteínas de GS están compuestas por más de ocho subunidades, con masas moleculares entre 320 y 380 kDa, dependiendo de su composición oligomérica. En *Arabidopsis*, las subunidades de GS1 presentan una masa molecular de 40 kDa, mientras que las de GS2 de 44 kDa (Ishiyama *et al.*, 2004). En maíz, se ha caracterizado la isoenzima

GS1a, de 440 kDa, que cuando se le depleta de metales o sustratos, presenta una masa molecular de 398 kDa. Esta masa molecular corresponde a una estructura decamérica, formada por dos anillos de cinco pentámeros (Unno *et al.*, 2006).

La GS2 se expresa mayormente en los cloroplastos de las hojas, y funciona de manera primaria en la asimilación del amonio formado a partir de la reducción de nitrato en estos mismos organelos, así como en la reasimilación del amonio liberado durante la fotorrespiración. La GS1 se expresa en varios órganos de la planta, como son las raíces, los nódulos, los cotiledones y las hojas senescentes, para asimilar el amonio absorbido del suelo (Ishiyama *et al.*, 2004; Texeira *et al.*, 2005), el obtenido de la reducción del nitrato en las raíces, así como el derivado de la fijación de nitrógeno en los nódulos de las leguminosas (Fei *et al.*, 2006; Cánovas *et al.*, 2007).

La glutamina, sintetizada por GS, es utilizada por la glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), la cual realiza la transferencia reductiva del grupo amida de la glutamina al alfa-cetoglutarato para dar lugar a la formación de dos moléculas de glutamato (Fig. 1.1) (Tobin & Yamaya, 2001).

Las dos principales isoenzimas de la GOGAT en plantas superiores son la dependiente de ferredoxina (Fdx-GOGAT), que se encuentra principalmente en los organismos fotosintéticos, y la dependiente de NAD(P)H, que además se encuentra en bacterias. Ambas isoenzimas en plantas están localizadas en los plástidos (Tobin & Yamaya, 2001).

Lea y Mifflin reportaron que estas isoenzimas son dos proteínas diferentes. La Fd-GOGAT representa el 1% de la proteína total de la hoja, y en arroz, se ha observado que se compone de dos subunidades de 115 kDa cada una, mientras que en otras plantas la enzima es monomérica, con masas moleculares entre 145 y 180 kDa. Por otro lado, la NADH-GOGAT de raíces de arroz es un monómero con una masa molecular entre 196-200 kDa (Lea & Mifflin, 2003).

De manera adicional, el amonio puede ser incorporado directamente al alfa-cetoglutarato mediado por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Esta enzima también puede realizar la reacción catabólica para la obtención de amonio libre y esqueletos carbonados a partir de glutamato. La GDH tiene una Km para amonio muy alta (10 a 80 mM), lo que cuestiona su papel en la asimilación primaria de amonio, por lo que se le ha relacionado con la reasimilación de amonio proveniente de la fotorrespiración y el catabolismo de glutamato (Kaur *et al.*, 2006; Debouda *et al.*, 2007).

La GDH de plantas se encuentra en las mitocondrias, está compuesta de dos subunidades polipeptídicas alfa y beta, de 43 y 42.5 kDa, respectivamente. La enzima funcional está formada por la agrupación de estas subunidades formando un complejo hexamérico que da como resultado la existencia de 7 isoenzimas (Loulakakis & Roubelakis-Angelakis, 1996; Purnell & Botella, 2007).

1.3. Asimilación de amonio en frutos

El proceso de maduración de frutos involucra una serie de eventos metabólicos coordinados, que alteran su anatomía, bioquímica, fisiología y expresión genética (Paran & Van Der Knapp, 2007). Estas alteraciones afectan sus características organolépticas, como son el color, el sabor y la textura. La expresión de genes específicos y la subsecuente síntesis de enzimas son eventos fundamentales en el proceso de maduración (Loulakakis *et al.*, 1994; Paran & Van Der Knapp, 2007).

Al igual que en la senescencia foliar, además de la regulación de grupos de genes involucrados en sí en el proceso, se requiere de la activación de otro grupo de genes relacionados con la removilización de nitrógeno y otros nutrientes importantes a órganos de almacenamiento o partes más jóvenes de la planta. La principal fuente de nitrógeno en esta etapa proviene de la hidrólisis de proteínas, que es trasladado como el grupo amida de la glutamina o la asparagina (Brady, 1987; Loulakakis *et al.*, 1994).

Durante la maduración de frutos de aguacate, los perfiles de las actividades específicas de la GDH y la GS muestran que la primera se incrementa alrededor de cuatro veces en los 6 a 8 días posteriores a la colecta. A este incremento en la actividad de GDH-NADH, le sigue un aumento en la producción de etileno, así como en la respiración, alcanzando su máxima actividad cuando la firmeza de los frutos es casi nula (mayor a 7 días postcosecha). En contraste, la actividad específica de la GS disminuye, pero en una proporción menor al incremento observado para la GDH-NADH (Loulakakis *et al.*, 1994). La variación en la actividad específica de la GDH se reflejó en cambios en el contenido de esta proteína. Este incremento en la proteína de GDH está correlacionado con la acumulación de ARNm, como se observó mediante la inmunoprecipitación y los productos de traducción *in vitro* del transcrito. Por otro lado, hubo una ligera disminución en la detección de la proteína de GS; sin embargo, este cambio fue demasiado pequeño para justificar los cambios en la actividad enzimática (Loulakakis *et al.*, 1994).

Este estudio nos indica que existe una correlación entre la actividad de las enzimas con la cantidad de proteína sintetizada, y que durante el proceso de maduración, la enzima GDH juega un papel muy importante, ya que se sintetiza en mayor cantidad favoreciendo, a su vez, un incremento en la actividad de esta enzima.

Se ha demostrado que la acumulación de los transcritos de GS1 y GDH aumenta cuando el nitrógeno es removilizado en órganos senescentes en plantas de tabaco y arroz, sugiriendo que ambas rutas juegan un papel en el reciclaje de nitrógeno orgánico, liberado por la degradación de las proteínas (Masclaux *et al.*, 2001).

En tomate, al analizarse las actividades enzimáticas de la GS y la GDH en frutos inmaduros y maduros se observó que la actividad de GS estaba presente en los frutos verdes, más no así en los frutos maduros (Boggio *et al.*, 2000). En dicho estudio, la actividad de la GDH presentó un patrón opuesto. Al realizar los estudios de Western blot, se pudo constatar que no sólo las actividades presentaban tendencias contrarias, sino también los niveles de proteína, esto es que, la proteína de GS se encontró en frutos verdes, mientras que el nivel proteico de GDH se incrementaba considerablemente durante el proceso de maduración (Boggio *et al.*, 2000).

Las diferencias entre los patrones reportados en la actividad y niveles de expresión en aguacate y tomate, nos sugiere que los cambios observados son especie-específicos como reportó Masclaux en 2001.

El metabolismo primario de nitrógeno es muy importante para las plantas, ya que a partir de él, se sintetizan aminoácidos necesarios para la biosíntesis de moléculas de vital importancia, como son las proteínas y compuestos derivados del metabolismo secundario. La diversidad de compuestos nitrogenados en los organismos vivos y la diferencia entre la forma de regulación observada a través de los diferentes estudios que se han realizado, permiten resaltar la importancia de continuar el estudio del comportamiento de las enzimas involucradas en estas vías con el fin de tener un mejor control tanto de la producción de estos compuestos, como de los fertilizantes aplicados a cultivos de interés comercial.

1.4. El chile

El género *Capsicum* incluye un promedio de 25 especies (Fig. 1.2), y tiene su centro de origen en las regiones tropicales y subtropicales de América (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005).

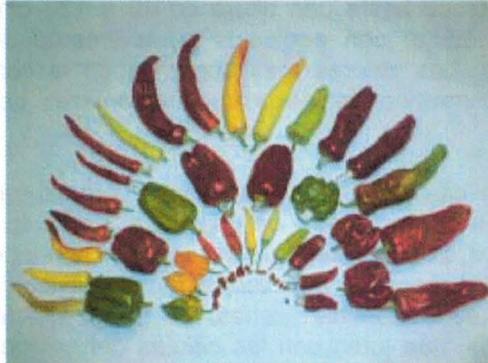


Figura 1.2. Diversidad de frutos del género *Capsicum*.

En México, el chile es una de las hortalizas de mayor tradición, al formar parte de la dieta alimentaria de miles de mexicanos. El chile habanero se produce casi exclusivamente en la península de Yucatán (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2007).

El cultivo del chile se remonta a miles de años y ha trascendiendo hasta nuestros días, de tal forma, que hoy se produce en todos los estados de la República, encontrándose presente en casi todos los mercados, e incluso ha traspasado las fronteras. Un ejemplo de esto es el consumo cada vez más frecuente de chile habanero en frituras entre los habitantes de Japón.

Las principales especies que son cultivadas incluyen a *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense*. Se ha propuesto que estas especies y sus más de 2000 cultivares se derivaron de entre tres y cinco cultivares primarios (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

1.5. Chile habanero

1.5.1. Descripción morfológica

La planta de 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, con una altura de 0.3 a 1.2 m dependiendo de la variedad, posee cuatro ramas primarias y cuatro secundarias, y carece de pubescencia, a veces puede estar cubierto de pelos o tricomas (Alpizar *et al.*, 2003).

La planta crece hasta una altura de 40 a 120 cm, tiene de dos a cinco flores por nódulo, con pedicelos generalmente declinantes, y en ocasiones, erectos. Los colores más comunes de la corola son amarillo verdoso o blanco verdoso, mientras que las anteras son azules (Cano, 2003).

El fruto se caracteriza por su sabor y aroma característicos, así como por su forma acampanada; es una baya hueca formada por dos o hasta ocho carpelos. Las paredes que los separan son incompletas, y en la parte apical del fruto, se unen para formar unas estructuras membranosas que comúnmente se denominan venas. La pared del fruto o pericarpio incluye la epidermis, que junto con las células del colénquima, forma una cáscara fina, pero resistente.

El mesocarpio es un tejido carnoso de parénquima con cristales o cromóforos amarillos, naranjas, rojos o morados. El endocarpio se forma de una o pocas capas de células, mucho más pequeñas que las del mesocarpio y de paredes más gruesas. La placenta es de color blanco amarillento y se inserta en la base del fruto, quedando suspendida libremente dentro de la cavidad interna. En la misma base, se une a las paredes membranosas que dividen parcialmente a los carpelos.

La placenta es de forma irregular y apariencia esponjosa con mucha variación en tamaño, el cual al parecer guarda poca relación con el tamaño del fruto. Este tejido es muy importante, porque en esta parte del fruto se sintetizan los capsaicinoides, alcaloides responsables del picor del chile habanero (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Las dimensiones de los frutos en promedio son: 3.5 cm de largo, 3.7 cm de ancho y 3 mm de grosor de pericarpio. El color de los frutos en estado inmaduro es verde, debido a la presencia predominante de clorofilas, mientras que el color del fruto maduro está determinado principalmente por la presencia de dos tipos de pigmentos: los carotenoides y las antocianinas, cuya combinación en diferentes proporciones da lugar a que en el fruto se aprecien las diferentes tonalidades que pueden variar de amarillo a rojo, pasando por distintas tonalidades de naranja (González-Salan & Orellana-Polanco, 2005).

1.5.2. Picor

El chile habanero se considera uno de los chiles más picantes del mundo por su alto contenido de capsaicinoides, cuyos valores pueden fluctuar de 150,000 a 350,000 unidades Scoville.

El picor es la sensación de calor que producen los chiles debido a la presencia de los capsaicinoides, cuya acumulación está influenciada por el genotipo, las prácticas de cultivo y el medio ambiente. Los dos capsaicinoides responsables del 90% del picor en el chile habanero son la capsaicina y la dihidrocapsaicina (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005; Núñez-Palenius y Ochoa-Alejo, 2005).

La capsaicina se encuentra principalmente en la placenta del fruto, tejido al que se encuentran adheridas las semillas (Kim *et al.*, 2001; Blum *et al.*, 2003). Además de la capsaicina, los chiles contienen otro producto de valor industrial, el pigmento rojo. Ambos productos se obtienen al extraer la oleoresina del fruto (Kim *et al.*, 2001).

El método tradicional para calcular el picor es determinando el valor recíproco de la dilución máxima que permita detectar picante organolépticamente por catadores humanos. El resultado se expresa en unidades Scoville (uS), en honor del inventor del método, Wilbur Scoville. En la actualidad, esta prueba organoléptica ha sido reemplazada por métodos instrumentales. El método más utilizado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este análisis provee seguridad y eficiencia en la determinación del contenido y tipo de capsaicinoides presentes en una muestra. Hoy día, se acepta que 15 unidades Scoville equivalen a una ppm de capsacinoides (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005).

Capsicum chinense se caracteriza por sus altos contenidos de capsaicina, típicamente del 2%, equivalente a 300,000 unidades Scoville. El cultivar Red Savina Habanero fue, durante mucho tiempo y sin discusión, el chile más picante, alcanzando un contenido de capsaicina del 3.7%, o 560,000 uS (Katzer, 2003).

1.5.3. Industrialización y comercialización

El chile habanero se puede comercializar en fresco; de hecho, en Yucatán existen tres emparadoras de este producto: La Hacienda Tropical Fruits, Kuman y Productos Agroindustriales (Hortimaya), desde donde se envía al mercado local y de exportación. Estas empresas también industrializan parte de la cosecha que reciben, produciendo salsas y pasta, que envían a diferentes plantas del extranjero o del territorio nacional, donde la emplean para la elaboración de salsas o para la extracción de capsaicina. Los principales centros de distribución de chile habanero en fresco en Yucatán son la Central de Abasto de Mérida, el tianguis de la Casa del Pueblo de Mérida y la Central de Abasto de Oxcutzcab. Entre las empresas que industrializan el chile habanero en el Estado se destacan tres: El Yucateco, La Anita, y Productos La Extra (AGRO, 2002).

Con base en la organización productiva de los agricultores, se ha registrado un aumento en el cultivo de chile habanero, ya que mientras en 2000 se tuvo una producción de 94 ton, en 2007 se produjeron 139.81 ton (OEIDRUS-YUCATÁN).

Por lo que toca a la exportación, los mercados de Estados Unidos, Inglaterra, Canadá, Belice, Japón, Irán y China han recibido más de 155 mil kilos de este producto en presentación fresca, polvo, hojuelas, entero deshidratado, pasta y ahumado, cantidad que pretenden elevar los productores una vez que obtengan la denominación de origen de su producción (AGRO, 2002).

1.5.4. Usos

El chile habanero es una hortaliza que comúnmente se consume en fresco. También se utiliza en la elaboración de salsas; conservas en vinagre, polvos y como repelente orgánico contra insectos o animales dañinos en cultivos, así como en la industria de armas de defensa personal.

En farmacia, extensas investigaciones sobre la capsaicina y la respuesta fisiológica de la activación química del receptor vainilloide tipo 1 (VR1) aseguran que es un agente efectivo en padecimientos de dolor crónico, sobre todo en aquellos asociados con la espina dorsal, la artritis y las neuropatologías diabéticas (Díaz *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que la capsaicina estimula selectivamente y destruye la sustancia P en ciertos nervios que terminan en la piel y las membranas mucosas. En este sentido, trabaja como un antisensibilizante. Este fenómeno ha sido observado en los sistemas cardiovascular y respiratorio, donde hay una relación entre el efecto que provoca la capsaicina y la sustancia P. El descubrimiento de la efectividad de las aplicaciones de la capsaicina al nervio dental para reducir la sustancia P como un transmisor del dolor de la pulpa dental justifica el remedio antiguo de emplear chiles picantes para el tratamiento de ese padecimiento (Caterina *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2004; Demirbilek *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005).

Actualmente, existen en el mercado cremas que contienen capsaicina, que ayudan a reducir el dolor causado por herpes, es decir, la capsaicina es utilizada como un analgésico auxiliar (Caterina *et al.*, 1997; McCleane, 2000; Díaz *et al.*, 2004).

Además, se aplican cremas directamente a la piel como una alternativa para aliviar el dolor en el tratamiento de reumas, artritis y

osteoartritis. Por ejemplo, la crema Menthacin Arthritic Pain Relief producida por la compañía Mentholatum de Canadá, combina la capsaicina y el mentol para combatir el dolor artrítico y al mismo tiempo, no presenta complicaciones por el uso simultáneo de medicinas anti-inflamatorias libres de esteroides (NSAIDS) (Caterina *et al.*, 1997; McCleane, 2000; Díaz *et al.*, 2004).

Por otra parte, los estudios del chile como agente terapéutico contra el cáncer no cesan, ya que los antioxidantes que contiene reducen los riesgos de esta enfermedad (Díaz *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006).

Además, la capsaicina es también un agente reductor de los niveles de colesterol. Estudios muestran que la capsaicina trabaja en dos puntos para reducir estos niveles: incrementando la actividad de las enzimas responsables del metabolismo graso y disminuyendo la cantidad de colesterol absorbida en el cuerpo. La dihidrocapsaicina eleva los niveles de lipoproteínas de alta densidad y disminuye las lipoproteínas de baja densidad, retardando la formación de depósitos en las arterias (arterioesclerosis) (Díaz *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006).

La capsaicina ayuda a la circulación por sus efectos vasodilatadores debido a que baja la presión sanguínea, reduciendo el riesgo de infartos cardíacos (Hudges & Brain, 1994).

1.5.5. Biosíntesis de capsaicinoides

Los capsaicinoides son responsables del picor en los chiles. Entre las características que los diferencian se encuentran: la longitud de la cadena alifática, la presencia o ausencia de dobles enlaces, el punto de ramificación y el nivel de picor. Todos se sintetizan a partir de la vanillilamina y del ácido 8-metil non-trans-6-enoico y se acumulan en una especie de vesículas localizadas en la epidermis (Fig. 1.3) (Zamski *et al.*, 1987; Alpízar *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2004).

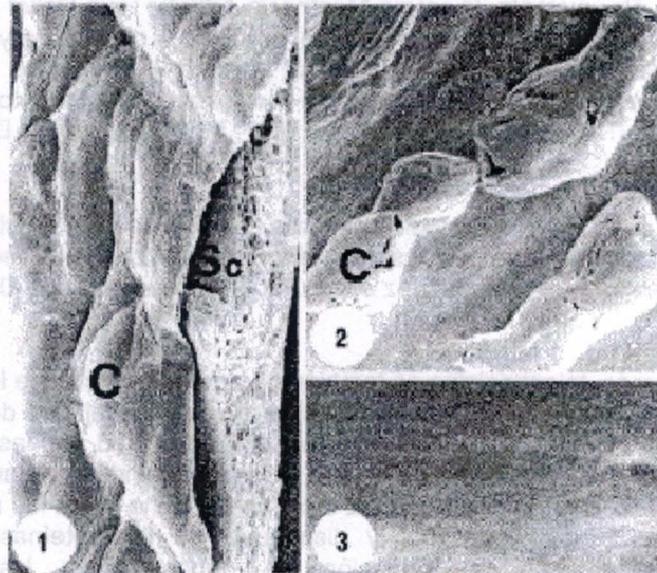


Figura 1.3. Microfotografías de células epidérmicas (C) de cultivares picantes (recuadros 1 y 2) y no picantes (recuadro 3) de *Capsicum annuum*. Se pueden observar abultamientos parecidos a ampollas en la superficie de placentas de un cultivar picante (recuadros 1, 2). Cavidades subcuticulares (Sc), así como grietas también pueden discernirse. En el caso del cultivar no picante, la placenta presenta una superficie lisa (recuadro 3). (Tomado de Zamski et al., 1987).

La molécula de vainillilamina es sintetizada en la vía de los fenilpropanoides, como propone Zenk (1965), con base en el trabajo realizado en *Vanilla planifolia* para la biosíntesis de vanillina. La vainillilamina se forma mediante conversiones sucesivas de la fenilalanina en los ácidos *trans*-cinámico, cumárico, caféico y ferúlico, por acción de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H), cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H) y ácido caféico metiltransferasa (COMT), respectivamente. La vainillina es un intermediario tardío que es aminado por acción de una transaminasa, dando lugar a la vainillilamina, la cual, por acción de una aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (CS), se condensa con el derivado acil-graso para dar lugar a los capsaicinoides. Se ha propuesto que el ácido graso se puede formar a partir de la leucina o la valina (Fig. 1.4) (Blum et al., 2003; Díaz et al., 2004; Cazares-Sánchez et al., 2005; Vázquez-Flota et al., 2007).

En el caso de *C. annuum*, los niveles de expresión en la placenta de varios genes de la ruta de los fenilpropanoides (*Pal*, *Ca4H* y *Comt*) están positivamente relacionados con la acumulación de capsaicina (Curry *et al.*, 1999). El gen codificante para la aminotransferasa que convierte la vainillina en vainillilamina ha sido recientemente clonado, y su expresión en la placenta se correlaciona con la acumulación de capsaicinoides (Curry *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001).

La molécula ramificada de ácidos grasos se deriva de la valina o la leucina y su biosíntesis fue descrita por Leete y Loudon (Blum *et al.*, 2003), quienes llevaron a cabo pruebas con diferentes precursores de capsaicina marcados, encontrando que la administración de valina marcada con ^{14}C a los chiles producía tanto capsaicina como dihidrocapsaicina radiactivas. Este resultado es consistente con la hipótesis de que la cadena lateral de diez carbonos de la capsaicina se forma por la adición de dos unidades de carbono al isobutiril CoA, catalizada por el complejo ácido graso sintasa (FAS). Hay tres genes candidatos que codifican para las subunidades de este complejo, que aún no han sido clonadas (Curry *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Aluru *et al.*, 2003). Ellos corresponden a la beta-cetoacil sintasa (KAS), una proteína acil acarreadora (ACL) y una tioesterasa (FAT). La expresión de estos genes es específica de la placenta y la abundancia de sus mensajeros está correlacionada con el grado de picor (Aluru *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que una clona de una acil transferasa (SB2-66) de Chile puede corresponder a la enzima capsaicinoide sintasa. SB2-66 se expresa en chiles picantes en el momento de máxima acumulación de capsaicina, pero no lo hace en los chiles dulces o en aquellos en los que aún no se acumula este compuesto (Kim *et al.*, 2001). Esta clona ha sido utilizada por Stewart y colaboradores para mapear la posición de *Pun1* en el genoma y se ha observado que los niveles de expresión, así como la presencia o ausencia de este gen, están relacionados con el nivel de picor en las diferentes variedades de Chile (Stewart *et al.*, 2005).

Prasad y colaboradores en 2006 reportaron haber identificado y caracterizado la actividad de la capsaicinoide sintasa, así como del gen que la codifica (*csy 1*) en diferentes variedades de Chile con niveles de picor variables. Este trabajo puso en evidencia la idea de que el gen *Pun1* fuera el responsable de controlar los niveles de picor era errónea (Stewart *et al.*, 2005). Sin embargo, los autores de este trabajo se retractaron en un comunicado en 2008, mencionando que la secuencia del gen aislado presentaba homología con una proteína cinasa que apareció en un reporte posterior a su publicación (Prasad *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2008). Por lo

que aún no se identificado a esta enzima y Pun1 sigue siendo la alternativa para identificar a la capsaicinoide sintasa (Stewart *et al.*, 2007).

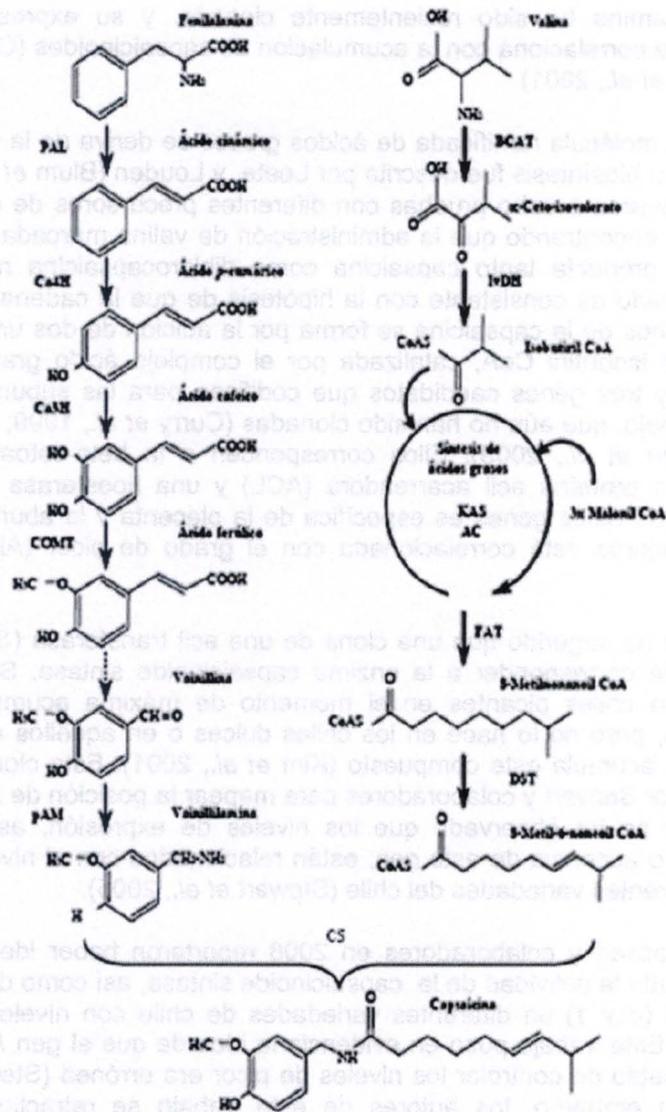


Figura 1.4. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género *Capsicum*. PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H, cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido caféico O-

metiltransferasa; pAMT, presunta amino transferasa de la vainillilamina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados; IvDH alfa isovalerato deshidrogenasa; Kas, beta-cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS, capsaicinoide sintasa. La flecha punteada representa reacciones por caracterizar (Tomado de Vázquez-Flota et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado que la variación en los niveles de picor puede ser atribuida a diferencias genotípicas o a condiciones medio ambientales (Zewdie & Bosland, 2000), entre las que se encuentran la disponibilidad de nutrientes, agua y temperatura (Johnson & Decoteau, 1996).

1.6. Metabolismo secundario y cultivo de tejidos

Por muchos años, las plantas han sido empleadas como fuente de proteínas, carbohidratos y grasas o lípidos para la elaboración de diversos productos. Actualmente, se utilizan para la extracción de otro tipo de compuestos especializados denominados metabolitos secundarios. Estos metabolitos pueden definirse como compuestos que no tienen un papel vital en el desarrollo de la planta, pero que sí tienen una importante actividad en la relación de la planta con su ambiente, ya que pueden ser empleados para la atracción de polinizadores, o como mecanismo de defensa contra los depredadores. Su distribución es más restringida que la de los productos del metabolismo primario, ya que pueden encontrarse en unas cuantas especies, o aún más, dentro de unas pocas variedades de la misma especie. Su producción es con frecuencia baja, y esto depende principalmente de la especie que los sintetiza, así como del estado fisiológico de la planta. Estos compuestos suelen ser acumulados en tejidos específicos (Smetanska, 2008).

Muchas plantas que producen metabolitos secundarios de elevado valor comercial son difíciles de cultivar, o la cantidad que se encuentra en los tejidos es muy pequeña, por ello, el cultivo de tejidos ofrece una alternativa para resolver este problema (Smetanska, 2008). Dentro de las técnicas empleadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios, se encuentran la clonación y la selección de líneas altamente productoras, así como la identificación de líneas mutantes que sobre-expresan un producto en particular. La adición de inductores bióticos y abióticos es también una técnica muy socorrida para la obtención de estos compuestos. Actualmente, las técnicas de inmovilización celular han sido empleadas para incrementar la producción de ciertos metabolitos secundarios (Thorpe, 2006).

Dentro del grupo de plantas que producen metabolitos secundarios, se encuentran las del género *Capsicum*, cuyos frutos son el sitio de síntesis y acumulación de los capsaicinoides. La capacidad biosintética de células y tejidos cultivados *in vitro* ha sido manipulada mediante la alteración de la organización de las suspensiones celulares a través de la inmovilización, la reducción de la velocidad de crecimiento como resultado de una baja disponibilidad de nutrimentos y reguladores de crecimiento, la adición de precursores, la selección de líneas celulares y el uso de elicitores (Holden *et al.*, 1987).

Las células inmovilizadas de chile producen más capsaicinoides en comparación con las suspensiones celulares típicas; en ambos casos, estos compuestos son liberados al medio de cultivo. El incremento en el contenido de capsaicinoides es superior en los cultivos inmovilizados cuando se les adicionan precursores, como la L-[U-¹⁴C] fenilalanina y el ácido isocáprico, o cuando se reducen las concentraciones de los reguladores de crecimiento, 2,4-D y cinetina (Lindsey & Yeoman, 1984; Lindsey, 1986). Adicionalmente, cuando se limita la disponibilidad de nutrimentos a los cultivos de células inmovilizadas de *Capsicum*, se incrementa el contenido de capsaicina, como se ilustra en aquellos experimentos donde las células fueron cultivadas en un medio que contenía concentraciones reducidas de nitratos y fosfatos, observándose la incorporación de [U-¹⁴C] fenilalanina en las proteínas, así como también en las moléculas de capsaicina. La toma de fenilalanina fue mucho más rápida en células desprovistas de nutrimentos, que en las células control que contenían un medio completo (Lindsey, 1985; 1986).

La adición de ácido ferúlico y vainillilamina, dos intermediarios en la ruta de los fenilpropanoides a cultivos de células inmovilizadas de *C. frutescens*, reveló que estos compuestos fueron convertidos en vanillina y capsaicina, respectivamente (Sudhakar-Johnson *et al.*, 1996).

Estudios realizados en cultivos de callos, y en comparación con frutos de *Capsicum*, demostraron que los pasos finales en la vía de síntesis requieren de la diferenciación en el tejido (Ochoa-Alejo & Gómez-Peralta, 1993). Además de los análisis realizados, se han llevado a cabo otros estudios que incluyen la comparación de placentas inmovilizadas con suspensiones celulares, en donde se ha reportado un mayor potencial del tejido placentario para sintetizar capsaicinoides con respecto a las suspensiones celulares (Sudhakar-Johnson *et al.*, 1990).

1.7. Justificación

Los chiles son populares como aditivos de alimentos en muchas partes del mundo, valorados por sus atributos sensoriales como son el color, el picor y el aroma. En México, los chiles picantes representan una identidad de tradición y cultura, siendo el elemento que mejor ha caracterizado a la cocina mexicana durante décadas. Su consumo está basado principalmente en su picor, que se debe a la presencia de un conjunto de moléculas conocidas como capsaicinoides (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005; Núñez-Palenius & Ochoa-Alejo, 2005).

La adición de nitrógeno a las plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) provoca un aumento en el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina en los frutos (Johnson & Decoteau, 1996). De igual forma, en cultivos *in vitro* se ha observado que la adición de diversos precursores al tejido placentario inmovilizado favorece una mayor producción de estos compuestos; sin embargo, pocos estudios se han realizado para evaluar su capacidad para proveer precursores primarios hacia la síntesis de compuestos secundarios.

En este sentido y dado que actualmente no existen reportes sobre el origen de los aminoácidos utilizados para la síntesis de los capsaicinoides, es decir, no se conoce si éstos son producidos en la placenta o si son transportados desde otros tejidos, así como tampoco se conoce el metabolismo de los aminoácidos en este tejido, se planteó estudiar el comportamiento de las enzimas y de las pozas de los sustratos involucrados en el metabolismo primario de nitrógeno en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con el fin de determinar su papel en la síntesis de aminoácidos, a partir de los cuales se formarán nuevos compuestos, como es el caso de los capsaicinoides en esta especie.

1.8. Hipótesis

Si la disponibilidad de nitrógeno en el suelo tiene una influencia directa sobre la producción de capsaicinoides en las plantas de *Capsicum chinense* Jacq., y dado que las placentas aisladas son capaces de sintetizar estos compuestos al adicionarles sus precursores *in vitro*, entonces las enzimas involucradas en el proceso de asimilación de amonio para la síntesis de sus precursores deben estar presentes y funcionales en este tejido.

1.9. Objetivo

Cuantificar la actividad enzimática de las enzimas involucradas en el metabolismo primario de nitrógeno en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

1.10. Objetivos particulares

1. Determinar las actividades enzimáticas de la glutamato deshidrogenasa aminativa (GDH-NADH) y desaminativa (GDH-NAD⁺), de la glutamino sintetasa (GS) y de la glutamato oxoglutarato amino transferasa (GOGAT), dependiente de NADH, en las placentas de chile habanero en cultivo.
2. Cuantificar las pozas de proteínas solubles totales, amonio y aminoácidos en las placentas inmovilizadas y medios de cultivo.
3. Determinar el contenido de capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) en las placentas de chile habanero en cultivo.

1.11. Diseño Experimental

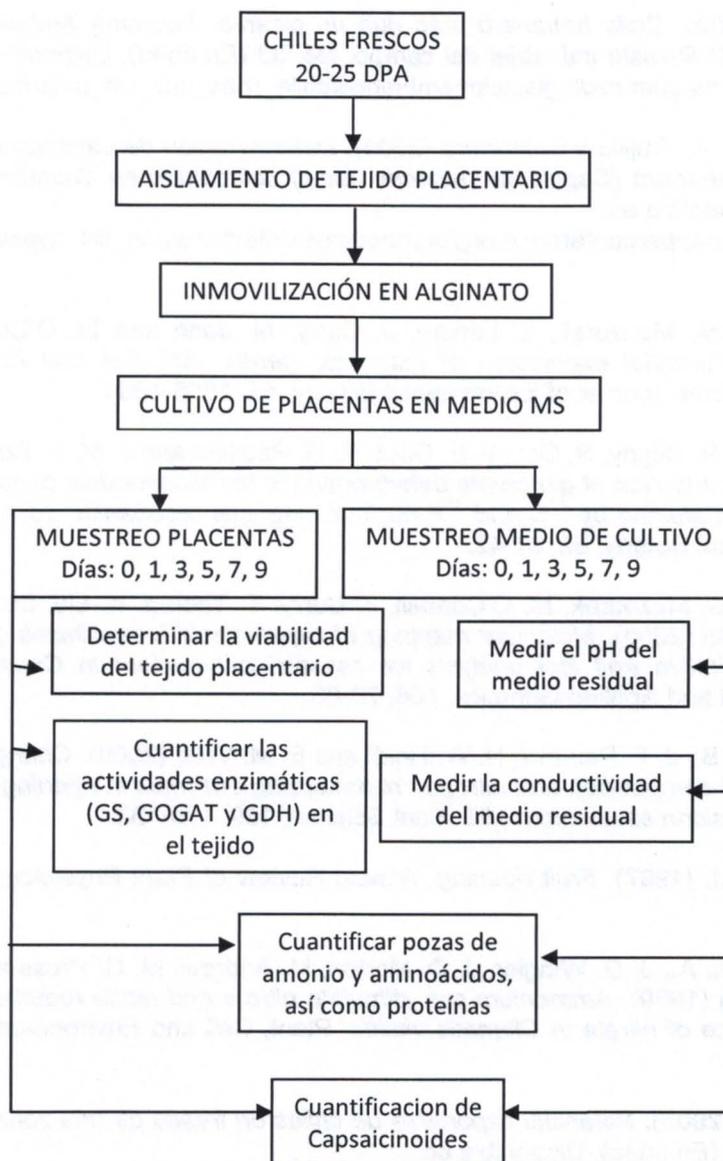


Figura 1.5. Diagrama del diseño experimental para la realización del trabajo. DPA, días posteriores a la antesis; MS, medio de cultivo Murashige y Skoog.

1.12. Bibliografía

AGRO (2002). *Chile habanero más que un picante*. Teorema Ambiental / 2000 AGRO-Revista industrial del campo, No. 33 (En línea). Disponible en: www.teorema.com.mx/legislacionambiental/chile_mas_que_un_picante/

Alpizar, 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/determinación_de_capsaicinoides.pdf

Aluru, M., M. Mazourek, L. Landry, J. Curry, M. Jahn and M. O'Connell (2003). *Differential expression of fatty acid genes, Acl, Fat and Kas, in Capsicum fruit*. Journal of Experimental Botany, 54, 1655-1664.

Aubert, S., R. Bligny, R. Couce, E. Gout, R. G. Ratcliffe and J. M. K. Roberts (2001). *Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³³P nuclear magnetic resonance*. Journal of Experimental Botany, 52, 37-45.

Blum, E., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran (2003). *Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics, 108, 79-86.

Boggio, S. B., J. F. Palatnik, H. W. Heldt and E. M. Valle (2000). *Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of Lycopersicon esculentum Mill.* Plant Science, 159, 125-133.

Brady, C. J. (1987). *Fruit ripening*. Annual Review of Plant Physiology, 38, 155-178.

Bungard, R. A., J. D. Wingler, J. D. Morton, M. Andrew, M. C. Press and J. D. Scholes (1999). *Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in Clematis vitalba*. Plant, Cell and Environment, 22, 859-866.

Cano, M. (2003). *Potencial exportable de chiles en fresco de una zona libre de plagas*. (En línea). Disponible en: <http://www.Monografías.com/trabajos/cultivochiles/cultivochiles.htm>

Cánovas, F. M., C. Avila, F. R. Cantó, R. A. Cañas and F. De La Torre (2007). *Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers*. Journal of Experimental Botany 58, 2307-2318.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature, 386, 816-824.

Cazares-Sánchez, E., P. Ramírez-Vallejo, F. Castillo-González, R. M. Soto-Hernández, M. T. Rodríguez-González and J. M. Chavas-Servia (2005). *Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (Capsicum annum L.) del centro-oriente de Yucatán*. Agrociencia, 39, 627-638.

Choi, S-H., B-S. Suh, E. Kozukue, N. Kozukue, C. E. Levin and M. Friedman (2006). *Analysis of contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 54, 9024-9031.

Crawford, N. M. (1995). *Nitrate: Nutrient and signal for plant growth*. Plant Cell, 7, 859-868.

Cruz, J. L., P. R. Mosquim, C. R. Pelacani, W. L. Araújo and F. M. DaMatta (2004). *Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava*. Biologia Plantarum, 48, 67-72.

Curry, J., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Melendez and M. A. O'Connell (1999). *Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent Capsicum spp.* Plant Science, 148, 47-57.

Debouda, M., H. Roufidghimi, A. Suzuki, M. H. Ghorbel and H. Gouia (2007). *Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress*. Annals of Botany, 99, 1143-1151.

Demirbilek, S., M. Ozcan-Ersoy, S. Demirbilek, A. Karaman, N. Gürbüz, N. Bayraktar and M. Bayraktar (2004). *Small-dose capsaicin reduces systemic inflammatory responses in septic rats*. Anesthesia and Analgesia, 99, 1501-1507.

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

Dubois, F., T. Tercé-Laforgue, M. B. González-Moro, J. M. Estavillo, R. Sangwan, A. Gallais and B. Hirel (2003). *Glutamate dehydrogenase in plants: Is there a new story for an old enzyme?* Plant Physiology and Biochemistry, 41, 565-576.

Fei, H., S. Chailloy, B. Hirel, P. Polowick, J.D. Mahon and J. K. Vessey (2006). *Effects of the overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene (GS15) linked to organ-specific promoters on growth and nitrogen accumulation of pea plants supplied with ammonium.* Plant Physiology and Biochemistry, 44, 543-550.

Forde, G. and P. J. Lea (2007). *Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signalling.* Journal of Experimental Botany, 58, 2339-2358.

Fritz, C., N. Palacios-Rojas, R. Feil and M. Stitt (2006). *Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism.* Plant Journal, 46, 533-548.

González-Salan, M. M. y A. D. Orellana-Polanco (2005). *Informe Colecta de Habanero 190105* (En línea). Disponible en:
http://www.icta.gob.gt/fpdf/recom/_rec_nat/abstract/resINFORME%20COLECTA%20DE%20HABANERO%20190105.pdf

Holden, M. A., R. D. Hall, K. Lindsey and M. M. Yeoman (1987). "Capsaicin biosynthesis in cell cultures of *Capsicum frutescens*", in *Plant and Animal Cells: Process Possibilities*, Webb, C. and F. Mavituna (eds). Horwood, Chichester. pp. 45-62.

Hudges, S. R. and S. D. Brain (1994). *Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin.* British Journal of Pharmacology, 111, 425-430.

Inokuchi, R., K-I. Kumab, T. Miyataba and M. Okada (2002). *Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives.* Physiologia Plantarum, 116, 1-11.

Ishiyama, K., E. Inoue, A. Watanabe-Takahashi, M. Obara, T. Yamaya and H. Takahashi (2004). *Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis.* Journal of Biological Chemistry, 279, 16598-16605.

Ishiyama, K., E. Inoue, M. Tabuchi, T. Yamaya and H. Takahashi (2004). *Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots*. Plant Cell Physiology, 45, 1640-1647.

Johnson, C. D. and D. R. Decoteau (1996). *Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeño pepper plant growth, pod yield and pungency*. HortScience, 31, 1119-1123.

Katzer, G. (2003). *Chile (Capsicum frutescens L. and others)*. (En línea). Disponible en:
http://www.Gernot%20Katzer's%20Spice%20Dictionary_archivos/Caps_fru.htm.

Kaur, S., E. Anil, K. Gupta and N. Kaur (2006). *Effect of hydro- and osmopriming of chickpea (Cicer arietinum L.) seeds on enzymes of sucrose and nitrogen metabolism in nodules*. Plant Growth Regulation, 49, 177-182.

Kim, M., S. Kim, S. Kim and B-D. Kim (2001). *Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization*. Molecules and Cells, 11, 213-219.

Lancien, M., P. Gadai and M. Hodges (2000). *Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation*. Plant Physiology, 123, 817-824.

Lea, P. J. and B. J. Miflin (2003). *Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants*. Plant Physiology and Biochemistry, 41, 555-564.

Lehninger, A. L. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. W.H. Freeman. 202 p.

Lindsey, K. (1985). *Manipulation, by nutrient limitation, of the biosynthetic activity of immobilized cells of Capsicum frutescens Mill. cv. annum*. Planta, 165, 126-133.

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

Lindsey, K. and M. Yeoman (1984). *The synthetic potential of immobilized cells of Capsicum frutescens Mill cv. annum*. Planta, 162, 495-501.

Loulakakis, K. A., K. A. Roubelakis-Angelakis and A. K. Kanellis (1994). *Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in avocado fruit during development and ripening*. Plant Physiology, 106, 217-222.

Loulakakis, K. A., and K. A. Roubelakis-Angelakis (1996). *The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities*. Physiologia Plantarum, 96, 29-35.

Masclaux, C., I. Quilleré, A. Gallais and B. Hirel (2001). *The challenge of remobilization in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches*. Annals of Applied Biology, 138, 69-81.

McCleane, G. (2000). *Topical application of doxepin hydrochloride, capsaicin and a combination of both produces analgesia in chronic human neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Journal of Clinical Pharmacology, 49, 574-579.

Miller, A. J. and M. D. Cramer (2004). *Root nitrogen acquisition and assimilation*. Plant Soil, 247, 1-36.

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

OEIDRUS-YUCATÁN (tiempo fértil). (En línea). Disponible en:
<http://www.oeidrus-yucatan.gob.mx/>

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

Paczek, V., F. Dubois, R. Sangwan, J. F. Morot-Gaudry, K. A. Roubelakis-Angelakis and B. Hirel (2002). *Cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in grapes gives new insights on the regulation of carbon and nitrogen metabolism*. Planta, 16, 245-254.

Paran, I. and E. Van Der Knapp (2007). *Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper*. Journal of Experimental Botany, 58, 3841-3852.

Pino, J., M. González, L. Ceballos, A. R. Centurión-Yah, J. Trujillo-Aguirre, L. Latournerie-Moreno and E. Sauri-Duch (2007). *Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (Capsicum chinense Jacq.) cultivars grown in Yucatan*. Food Chemistry, 104, 1682-1686.

Prasad, B. C., D. Kumar, H. B. Gururaj, M. Parimalan, P. Giridhar and G. A. Ravishankar (2006). *Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (csy1) for pungency factor capsaicin in pepper (Capsicum sp.)*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103, 13315–13320.

Prasad, B. C., D. Kumar, H. B. Gururaj, M. Parimalan, P. Giridhar and G.A. Ravishankar (2008). *Retraction: Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (csy1) for pungency factor capsaicin in pepper (Capsicum sp.)*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 105 (51).

Purnell, M. P. and J. R. Botella (2007). *Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo*. Plant Physiology, 143, 530-539.

Schubert, K. R. (1986). *Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport, and metabolism*. Annual Review of Plant Physiology, 37, 539-74.

Smetanska, I. (2008). *Production of secondary metabolites using plant cell cultures*. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 111, 187-228.

Stewart Jr., C., B-C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S. L. Moore, E. Y. Yoo, B-D. King, I. Paran and M. M. Jahn (2005). *The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase*. Plant Journal, 42, 675-688.

Stewart Jr., C., M. Mazourek, G. M. Stellar, M. O'Connell and M. Jahn (2007). *Genetic control of pungency in C. chinense via the Pun1 locus*. Journal of Experimental Botany, 58, 979-991.

Sudhakar-Johnson, T., G. A. Ravishankar and L. V. Venkataraman (1990). *In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of Capsicum annum L. grown in liquid medium*. Plant Science, 70, 223–229.

Sudhakar-Johnson, T., G. A. Ravishankar and L. V. Venkataraman (1996). *Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in*

immobilized cell cultures of Capsicum frutescens. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44, 117-121.

Texeira, J., S. Pereira, F. Canova and R. Salema (2005). *Glutamine synthetase of potato (Solanum tuberosus L. cv. Descree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization*. Journal of Experimental Botany, 56, 663-671.

Thorpe, T. A. (2006). "History of Plant Tissue Culture", in *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (eds). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 9-32.

Tobin, A. K. and T. Yamaya (2001). *Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley*. Journal of Experimental Botany, 52, 591-604.

Unno, H., T. Uchida, H. Sugawara, G. Kurisu, T. Sugiyama, T. Yamaya, H. Sakakibara, T. Hase and M. Kusunoki (2006). *Atomic structure of plant glutamine synthetase. A key enzyme for plant productivity*. Journal of Biological Chemistry, 281, 29287–29296.

Vázquez-Flota, F., M. L. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García and Y. Nieto-Pelayo (2007). *La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile*. Revista Fitotecnia Mexicana, 30, 353-360.

Zamski, E., O. Soham, D. Palevitch and A. Levy (1987). *Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (Capsicum annuum L.) cultivars*. Botanical Gazette, 148, 1-6.

Zewdie, Y. and P. Bosland (2000). *Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in Capsicum annuum L.* Euphytica, 111, 185-190.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Material biológico

Los estudios de este trabajo se llevaron a cabo utilizando placentas de chiles habaneros de 20 a 25 días post antesis de un cultivo establecido en invernadero, ubicado en el CICY variedad roja (SBR03). Las placentas fueron inmovilizadas en alginato y luego colocadas en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) para su mantenimiento *in vitro* durante un periodo de nueve días. Se realizaron las diferentes determinaciones con muestras tomadas los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9.

De todos los experimentos se llevaron a cabo tres repeticiones, con al menos tres réplicas en cada uno.

2.2. Desinfestación del chile habanero

Los chiles recién cosechados se lavaron con una esponja y detergente líquido, y se enjuagaron con suficiente agua corriente. Se hizo un segundo lavado con una solución de Extrán al 5% en agua destilada con agitación durante 10 minutos. Al término de este tiempo, se enjuagaron con abundante agua corriente y se les realizó un tercer lavado con una solución de Tween 80 en agua destilada estéril (6 gotas por litro), en agitación durante 10 minutos. Este lavado se realizó en la campana de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia. Se enjuagaron en esta ocasión con agua destilada estéril (2 veces) y se sumergieron en etanol al 80% en agitación durante otros 10 minutos, se enjuagaron con agua estéril 3 veces. Posteriormente, se sumergieron en cloro comercial diluído (Cloralex 1:2 en agua) durante 30 minutos en agitación constante. Finalmente, se enjuagaron con abundante agua estéril para eliminar completamente cualquier olor residual a cloro.

2.3. Inmovilización de las placentas de chile habanero

Una vez desinfectados los chiles, con ayuda de pinzas y bisturí, se procedió a extraer las placentas. Una vez extraído este tejido, se le eliminaron las semillas procurando hacer el menor daño posible.

Las placentas aisladas se colocaron en una nueva caja de Petri, en cuyo fondo se había colocado un papel absorbente húmedo para evitar la deshidratación del tejido. Una vez obtenida la cantidad requerida de tejido placentario, se transfirió a una solución de alginato al 2.5 % y se agitó suavemente, procurando que todas las placentas quedaran completamente embebidas en la solución. Posteriormente, las placentas se tomaron una por una, y se fueron colocando en una solución de cloruro de calcio al 1% frío, donde se mantuvieron en agitación constante durante 2 horas. Al término de este periodo, se enjuagaron las placentas ya inmovilizadas con suficiente agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloruro de calcio.

Finalmente, se depositaron 3 placentas inmovilizadas dentro de cada matraz Erlenmeyer, que contenía 40 ml de medio MS (Murashige & Skoog, 1962), sin fitoreguladores y 3% de sacarosa. Los matraces se sellaron con aluminio y ligas, y se colocaron en un orbitador a 60 rpm, en un cuarto de cultivo con luz continua (5000 lux) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 70% de humedad relativa, donde permanecieron hasta el momento del análisis.

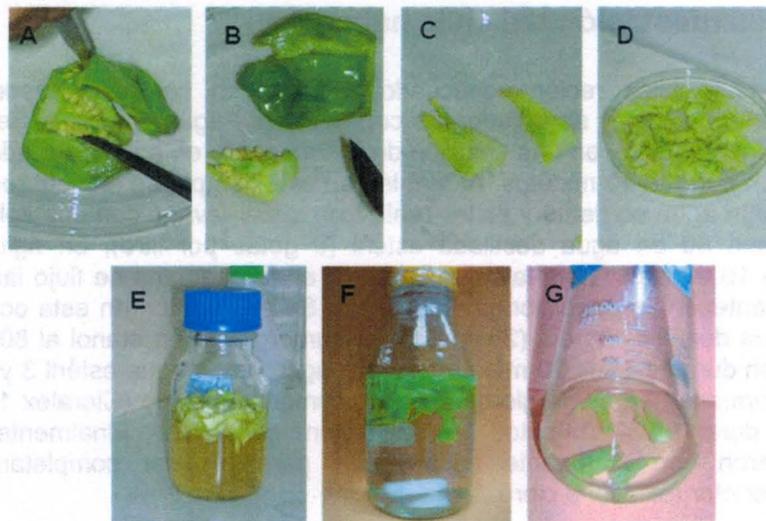


Figura 2.1. Secuencia del proceso de inmovilización. A) Corte del pericarpio para realizar la extracción del tejido placentario. B) Placenta aislada. C) Placenta aislada sin semillas. D) Tejido placentario listo para inmovilizar. E) Placentas embebidas en la solución de alginato al 2.5%. F) Placentas cubiertas de alginato colocadas en CaCl_2 al 1% frío. G) Matraz conteniendo las placentas inmovilizadas.

2.4. Métodos

2.4.1. Obtención del extracto enzimático

El tejido congelado se pulverizó en un mortero hasta obtener un material muy fino. Luego, se homogeneizó con un politrón durante 2 minutos con el amortiguador de extracción: 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM beta-mercaptoetanol, en una relación 1:2.5 (p/v). El homogeneizado se centrifugó a $20,400 \times g$ durante 30 minutos. Todas las manipulaciones se hicieron a 4°C . El sobrenadante, conteniendo el extracto proteico total, se utilizó para las determinaciones enzimáticas y las pozas.

2.4.2. Determinación de la actividad de la GDH-NADH

Para realizar esta determinación, se siguió el método de Joy (1969), modificado por Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1984).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción para la determinación:

Componentes	[mM] final	Volumen (ml)	
Tris-HCL	100	c.b.p 1.9	pH 8.2
Alfa-cetoglutarato	10	0.5	pH 7.0
Cloruro de amonio	100	0.5	
NADH	0.16	0.1	
Extracto proteico		0.01, 0.02 y 0.03	
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 dos minutos a 30°C y la reacción se inició al añadir el NADH (recién preparado). Se midió el cambio de absorbancia en intervalos de un minuto a 340 nm durante cinco minutos totales. La actividad enzimática se reporta como nmoles de NADH consumidos en la reacción por minuto por mg de proteína (nmoles $\text{NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína).

Paralelamente, se preparó un blanco que no contenía alfa-cetoglutarato, ni amonio, y cuyos volúmenes se compensaron con el amortiguador.

2.4.3. Determinación de la actividad de la 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	[mM] final	Volumen (ml)	
Tris-HCl	100	c.b.p 2.3	pH 9.4
Glutamato de sodio	10	0.5	pH 7.0
NAD ⁺	0.6	0.2	pH 8.0
Extracto proteico		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 dos minutos a 30°C y la reacción se inició al añadir el NAD⁺ (recién preparado). Se midió el cambio de absorbancia a intervalos de un minuto a 340 nm durante cinco minutos totales. La actividad enzimática se definió como nmoles de NAD⁺ utilizados por minuto por mg de proteína (nmoles NAD⁺ min⁻¹ mg⁻¹ proteína).

Paralelamente, se preparó un blanco, que no contenía glutamato de sodio, y cuyo volumen se compensó con el amortiguador.

2.4.4. Determinación de la actividad de la GS

Se utilizó el método de Kanamori y Matsumoto (1972), modificado por Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1986).

La mezcla de reacción contenía:

Componentes	[mM] final	Volumen (ml)	
Tris-HCl	100	c.b.p. 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 proteico		0.1- 0.5	
Volumen total		3.0	

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

Para tener la certeza de que en realidad se estaba midiendo la actividad de la GS, fue necesario comprobar que existía una dependencia de la velocidad de la reacción, tanto en función del tiempo como de la concentración de la enzima.

Cuando se midió la actividad enzimática en función de la concentración, se utilizaron diferentes volúmenes de extracto. La mezcla de reacción se preincubó durante dos minutos a 38°C. Posteriormente, se inició la reacción al añadir el glutamato de sodio, se incubó durante 15 minutos, y se detuvo la reacción 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 minutos a 2,561 x g, y se leyeron las absorbancias a 540 nm para determinar la cantidad de gamma-glutamil hidroxamato formado.

Paralelamente, se preparó un blanco de tiempo cero, 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 el mismo procedimiento, sólo que en este caso se utilizó un volumen fijo del extracto. La reacción se detuvo a los 5, 10, 15, y 20 minutos de incubación. Posteriormente, se continuó con el centrifugado y la lectura de las absorbancias.

El blanco que se midió en este ensayo contenía el extracto proteico, por lo que se detuvo la reacción con la mezcla de FeCl₃ antes de la activación con glutamato de sodio.

El ATP, la cisteína y la hidroxilamina se prepararon inmediatamente antes de usarse.

En ambos casos, la actividad se reporta como μmoles de gamma-glutamil hidroxamato formado por minuto por mg de proteína ($\mu\text{moles gamma-glutamil hidroxamato min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$).

2.4.5. Determinación de la actividad de la GOGAT-NADH

Se siguió el método de Beevers y Storey (1978), modificado por Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1986).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Componentes	[mM] final	Volumen (ml)	
Tris-HCl	100	c.b.p	1.8 pH 7.5
Alfa-cetoglutarato	10	0.5	pH 7.0
Glutamina	30	0.5	
NADH	0.16	0.1	
Extracto proteico		0.1, 0.2 y 0.3	
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 dos minutos a 30°C y la reacción se inició al añadir el NADH (recién preparado). Se midió el cambio de absorbancia a intervalos de un minuto a 340 nm durante cinco minutos totales.

La actividad se reporta como nmoles de NADH consumidos en la reacción por minuto por mg de proteína (nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína).

Paralelamente, se preparó un blanco que no contenía alfa-cetoglutarato, ni glutamina, y cuyos volúmenes se compensaron con el amortiguador.

2.5. Pozas de los sustratos involucrados en los análisis

Para la determinación de las pozas, se utilizó el mismo extracto proteico total que se obtuvo para realizar las determinaciones enzimáticas.

2.5.1. Determinación de proteínas

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Peterson (1977), el cual se describe a continuación: un volumen de muestra (entre 50 y 100 µl) se completó con agua destilada a 1 ml, y se le agregaron 100 µl de desoxicolato de sodio al 0.15%. Se mezcló en un vortex y se incubó durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 µl de ácido tricloroacético al 72% frío, se incubó durante 25 minutos en frío y se centrifugó la suspensión a 2,561 x g durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se limpiaron las paredes de los tubos para eliminar el exceso del líquido tratando de no dañar la pastilla formada. La pastilla se resuspendió con 1 ml de agua, después de resuspender, se le añadió 1 ml de reactivo A recién preparado. Se incubó durante 10 minutos, y finalmente, se le agregaron 500 µl de reactivo B. Se

incubó durante 30 minutos para el desarrollo de color y se leyó la absorbancia a 750 nm.

Al mismo tiempo, se elaboró una curva patrón con albúmina sérica bovina de 0-100 µg.

Para la preparación del reactivo A, se mezclaron volúmenes iguales de CTC (sulfato de cobre al 0.1 %, tartrato de sodio y potasio al 0.2% y carbonato de sodio al 10%), SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10%, NaOH 0.8 N, y agua destilada.

Para la preparación del reactivo B, se diluyó la solución de Folin-Ciocalteu 1:6 con agua destilada.

2.5.2. Determinación 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 minutos. Al término del tiempo, se le agregaron 2.5 ml de isopropanol al 50%, se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente, y se leyó la absorbancia a 570 nm.

Al mismo tiempo, se elaboró una curva estándar con glutamato como referencia, en un rango de 0-50 µg.

La preparación de los reactivos, previamente mencionados, se realizó como se describe a continuación:

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.

2.5.3. Determinación de amonio

Se determinó por la técnica de Nessler (Strelly y Averell, 1970), en donde se tomó un volumen de muestra (20-40 µL) 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 minutos en oscuridad y finalmente, se leyó la absorbancia a 385 nm.

Al mismo tiempo, se elaboró una curva patrón con cloruro de amonio como referencia, en un rango de 0-50 µg.

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).

2.6. Determinación de capsaicinoides por HPLC

Las placentas inmovilizadas se pesaron y se liofilizaron. Una vez liofilizado el tejido, se pulverizó y se pesó un gramo del polvo, al que se le agregaron 40 ml de acetonitrilo, incubándose en baño María a 80°C durante 4 horas. Finalizado este tiempo, se filtró al vacío y el extracto se guardó en oscuridad a -20°C hasta la determinación de capsaicinoides en el HPLC (Collins *et al.*, 1995).

Para la inyección de las muestras en el equipo, una alícuota (3 ml) se filtró a través de unidades Millex LCR (Millipore) de 0.45 µm. Una vez filtrado, se inyectó en el HPLC (Agilent serie 1100) con un detector de arreglo de diodos. La separación de los capsaicinoides se llevó a cabo en un columna Zorbax Octadecil Silano (ODS) C18 (tamaño de partícula: 5 µm, 4.6 mm x 150 mm). Las condiciones de la corrida 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 minutos con un flujo de 1 ml/min, con un volumen de inyección de 20 µl y a una longitud de onda de 280 nm.

En el caso de la determinación de estos metabolitos en los medios de cultivo, éstos se liofilizaron, y posteriormente se realizó la extracción mediante la adición de 5 ml de agua + 15 ml de acetonitrilo. Los tubos se colocaron en baño María a ebullición durante 4 horas, y finalmente, se tomó la fase orgánica para su filtración e inyección en el HPLC.

2.7. Determinación de viabilidad mediante azul de Evans

Este análisis se llevó a cabo con el fin de determinar el estado fisiológico de las placentas. Para ello, se utilizó el método propuesto por Castro-Concha *et al.* (2006).

A un gramo de placenta inmovilizada (0.5 g en caso de ser placenta fresca), se le agregaron 6 ml de agua y 250 µl de azul de Evans al 0.1%. Se dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placentas con agua destilada, hasta eliminar el

exceso de colorante. Se suspendieron en 5 ml de metanol al 50% con SDS al 1% y se incubaron en baño María a 65°C durante 30 minutos.

Se repitió la extracción dos veces más con el mismo volumen de disolvente, y finalmente, el extracto recuperado se llevó a un volumen final de 20 ml, el cual se leyó a una absorbancia de 600 nm.

El control negativo se realizó con placentas cuya viabilidad era cero, ya que previamente se habían colocado en baño María a ebullición durante una y media horas, previa a la adición del colorante.

Para preparar el azul de Evans 0.1%: se pesaron 100 mg y se disolvieron en 10 ml de agua destilada (solución 10X). De esta solución, se tomó 1 ml y se aforó a 10 ml (solución al 0.1%).

2.8. Medición del pH y la conductividad del medio de cultivo

Para realizar estas determinaciones, se tomó el medio de cultivo sin las placentas. Los medios evaluados se transfirieron a tubos Falcón de 50 ml, y posteriormente, mediante el uso de un potenciómetro marca Thermo Orion modelo 420A y un conductímetro marca HANNA modelo HI 8733, se midieron ambos parámetros directamente en el medio.

2.9. Bibliografía

Castro-Concha, L., R. M. Escobedo and M. L. Miranda-Ham (2006). "Measurement of cell viability in *in vitro* cultures" in *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (eds). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 71-76.

Cocking, E. C. and E. Yemm (1954). *Estimation of aminoacids by ninhydrin*. *Biochemistry Journal*, 58, XII.

Collins, M. D., L. M. Wasmund and P. W. Bosland (1995). *Improved method for quantifying capsaicinoids in Capsicum using high performance liquid chromatography*. *HortScience*, 30, 137-139.

Loyola-Vargas, V. M. and E. Sánchez de Jiménez (1984). *Differential role of glutamate deshydrogenase in nitrogen metabolism in maize tissue*. *Plant Physiology*, 76, 536-540.

Loyola-Vargas, V. M. and 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. and F. Skoog (1962). *A revised medium for 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.

Strel, R. and P. R. Averell (1970). *Analytical chemistry of N and its compounds*. Part I. Wiley-Interscience, New York. pp. 55.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Cultivo de placentas inmovilizadas

El cultivo de tejidos es una herramienta poderosa para estudios básicos y aplicados en condiciones asépticas de células, tejidos u órganos, y sus componentes bajo condiciones físicas y químicas definidas *in vitro* (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

En el caso del chile habanero, como en muchas de las especies que producen metabolitos secundarios, la conservación de cierto grado de diferenciación tisular es primordial (St-Pierre *et al.*, 1999).

Es por esto, que en este trabajo se utilizó un tipo de cultivo poco frecuente en el área de plantas, *i.e.* se empleó un cultivo primario que implica que el tejido no va a crecer, ni a dividirse como lo haría un cultivo *in vitro* tradicional de plantas, y en cambio, se comportará más a semejanza de aquellos utilizados en el caso de tejidos animales, por lo que las placentas, una vez escindidas del pericarpio, se recubrieron con una delgada capa de alginato de calcio, cuya función fue preservar la integridad de las mismas. Se sabe que al poner cualquier tejido vegetal en un medio líquido, éste tenderá a disgregarse y/o a liberar células individuales, por lo que la capa de alginato previno este fenómeno.

Dado que las placentas, aún estando en un medio de cultivo, no crecían, resultaba paradójico utilizar los métodos tradicionales de determinación del crecimiento. En este caso, el fin que se perseguía era mantenerlas vivas y metabólicamente activas por un período de siete días. Es por esto que se utilizaron parámetros como el pH, la conductividad y la viabilidad para monitorear su estado fisiológico.

3.1.1. pH del medio de cultivo residual

Algunos de los factores que afectan el crecimiento de plantas *in vitro* son similares a los que afectan a las plantas *in vivo*. El pH es uno de ellos, puesto que limita la disponibilidad de los nutrientes (Leifert *et al.*, 1992).

En el citoplasma de las células de las plantas, la asimilación de amonio produce al menos un ión H^+ por cada ión de amonio que es incorporado, mientras que la asimilación de un ión NO_3^- produce un ión OH^- . Estos iones son eliminados mediante su transporte a través de la membrana plasmática, lo que permite mantener el pH citoplásmico en equilibrio, puesto que por cada ión incorporado un ión de la misma carga es eliminado (Raven & Smith, 1976).

Se ha observado en plantas *in vivo* que la acidificación de la rizósfera ocurre por la liberación de ácidos orgánicos y protones durante la toma de amonio (Leifert *et al.*, 1992). En sistemas *in vitro*, se ha observado que el pH afecta la toma de nutrientes, así como los índices de crecimiento. En estudios realizados en suspensiones celulares de *Calluna vulgaris*, se presentó una disminución del pH (5.6 a 4) cuando el amonio fue la única fuente nitrogenada; en contraste, el pH se incrementó (pH 6.5) después de 20 días cuando el nitrato se utilizó como fuente (Leifert *et al.*, 1992). En cultivos de *Largestroemia indica*, se detectó una acidificación del medio, cuando los explantes tomaron el amonio del medio de cultivo, previo a la toma de nitrato (Eymar *et al.*, 2000).

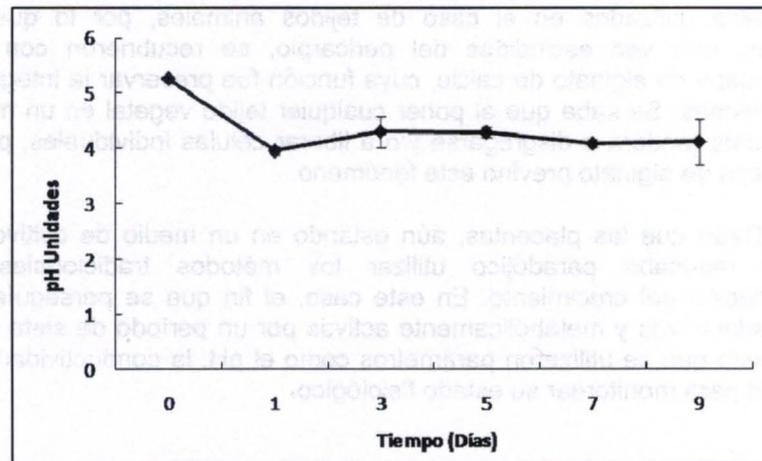


Figura 3.1. pH del medio de placentas inmovilizadas de chile habanero a lo largo de un ciclo de cultivo. Los datos que se presentan son el valor promedio de nueve muestras y las barras de verticales indican la desviación estándar.

Como se puede observar en la figura 3.1., el pH del medio de cultivo de las placentas inmovilizadas disminuyó al pasar de 5.6 a 4 durante las

primeras 24 horas, para luego mantenerse casi igual a lo largo del ciclo del cultivo. El cambio del pH puede atribuirse a la toma de iones amonio, como se ha observado en otros cultivos.

3.1.2. Conductividad del medio de cultivo residual

El parámetro de conductividad nos provee de un método rápido y no invasivo para monitorear el crecimiento en sistemas heterogéneos, como los pelos radiculares y las células inmovilizadas o agregadas (Kwok *et al.*, 1992).

Kwok y colaboradores (1992) reportaron que este parámetro puede ser útil para distinguir un cambio entre la fase de crecimiento lineal y el comienzo de la fase estacionaria en sistemas *in vitro*, ya que durante la fase de crecimiento del cultivo de células se observa una disminución en la conductividad, relacionada con el incremento del peso fresco, mientras que en la fase estacionaria, la conductividad no varía, así como la cantidad de biomasa acumulada, por lo que estos cambios permiten distinguir entre ambas fases de crecimiento.

En los estudios realizados por Eymar y colaboradores (2000), se observó que la adición de carbón activado aumentó la conductividad eléctrica del medio de cultivo, dado que se favorecía la toma de nitrato sobre la de amonio. Por otro lado, este parámetro aumentó en las raíces tratadas con 6-benciladenina, debido a la fuga electrolítica provocada por el daño causado por este compuesto al tejido.

En la figura 3.2, se observó un aumento discreto de la conductividad a lo largo del ciclo, posiblemente por la liberación de productos de desecho, o de electrolitos liberados a partir de las células dañadas durante el proceso de inmovilización, ya que normalmente este parámetro debería disminuir debido a la toma de nutrientes en los medios de cultivo.

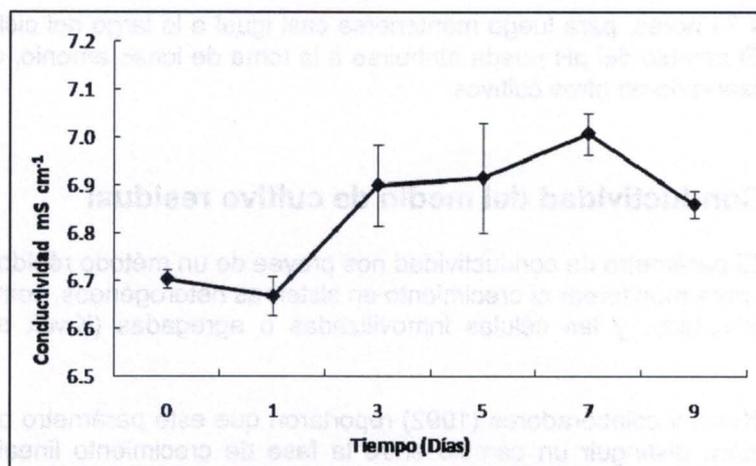


Figura 3.2. Conductividad en el medio de placentas inmovilizadas de chile habanero durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al valor promedio de nueve muestras y las barras verticales indican la desviación estándar.

3.1.3. Viabilidad del tejido placentario en cultivo

La viabilidad de una célula es un parámetro muy importante a considerar, ya que nos indica si ésta mantiene sus capacidades de crecimiento y desarrollo. Por lo general, los ensayos de viabilidad se basan en algunas propiedades físicas de las células, como son la integridad de sus membranas o el flujo citoplásmico, pero también en sus actividades metabólicas a través de la reducción de sales de tetrazolio o la hidrólisis de sustratos fluorogénicos (Castro-Concha *et al.*, 2006).

En las placentas inmovilizadas, se analizó la viabilidad por el método de azul de Evans con el fin de determinar si éstas se encontraban funcionales al mantener sus membranas íntegras. Dado que el tejido no se tiñó de azul, esto indicó que las placentas excluyen el colorante al mantener sus membranas intactas.

Lo que se pudo apreciar a lo largo del ciclo de cultivo en la figura 3.3, fue que las placentas presentaron una viabilidad superior a 60% durante los primeros cinco días en cultivo, en los cuales se observaron cambios tanto en la actividad de las enzimas, como en el contenido de las pozas, lo que parece indicar que las placentas se encontraban funcionales.

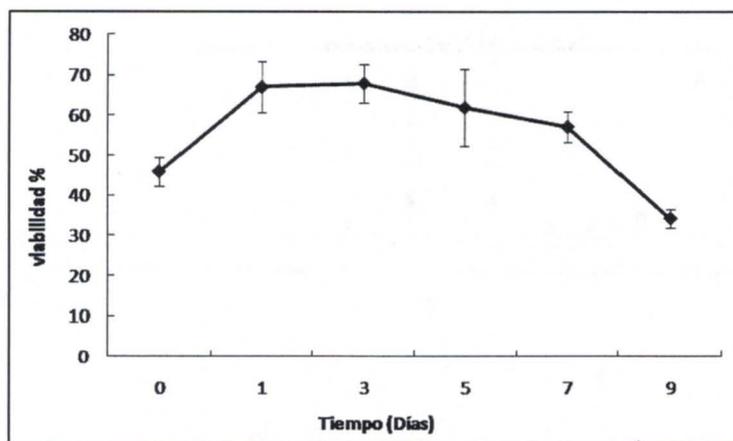


Figura 3.3. Viabilidad de las placentas inmovilizadas de chile habanero a lo largo de un ciclo de cultivo. Los datos representan el valor promedio de seis placentas y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

3.2. Contenido de capsaicinoides en las placentas y en los medios de cultivo

Con el fin de estudiar el proceso de asimilación de amonio, que resulta fundamental en la síntesis de los aminoácidos precursores de los capsaicinoides, era necesario que el modelo experimental tuviera ciertas características, como el mantener íntegro el tejido y que éste se mantuviera metabólicamente activo. Es por esto, que se determinaron los contenidos de capsaicinoides tanto en las placentas inmovilizadas, como en los medios a lo largo del ciclo de cultivo, ya que de haber cambios en la producción y la degradación de estos compuestos, éstos nos indicarían directamente que los tejidos permanecían activos.

En la figura 3.4, se observan los cromatogramas obtenidos de la determinación de estos metabolitos por medio del HPLC. En el panel A, se presenta un cromatograma representativo de la separación de la mezcla de estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina, cuyos tiempos de retención fueron 4.169 y 5.690 min, respectivamente. En los paneles B y C, se muestran los cromatogramas correspondientes a extractos de placentas de los días cero y siete del ciclo de cultivo, mientras que en los paneles D y E se observan los de los medios de cultivo de los mismos días. En el caso de las placentas de nueve días, hay una disminución de ambos metabolitos; sin embargo, en el medio de cultivo, hay un aumento en los niveles de ambos capsaicinoides.

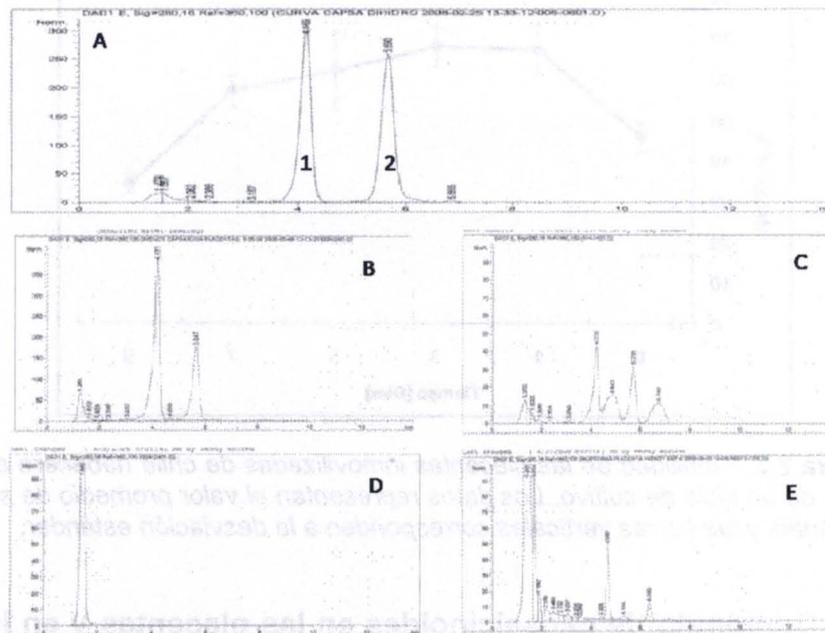


Figura 3.4. Análisis cromatográfico de placentas cultivadas y el medio de cultivo residual. A) Estándares de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2); B) extracto de placenta en el día cero de cultivo; C) extracto de placenta en el día nueve del cultivo; D) medio de cultivo del día cero y E) medio de cultivo del día nueve.

El contenido de capsaicinoides disminuyó a lo largo del ciclo de cultivo, presentándose el nivel más bajo en el día cinco (Fig. 3.5.). Sin embargo, hacia el día nueve hubo un ligero incremento en su contenido.

Durante el ciclo de cultivo, no se detectaron incrementos considerables en el contenido de estos compuestos; sin embargo, se debe considerar que los capsaicinoides son el producto final de una ruta metabólica muy especializada, y que los primeros pasos en esta vía son comunes a otras rutas que llevan a diferentes compuestos, como la lignina, las antocianinas, y los flavonoides, entre otros (Hall & Yeoman, 1991). Es por ello, que podría pensarse que la disminución del contenido de estos compuestos en las placentas se relacione con una disminución en los precursores o en la reasignación de los mismos hacia otras funciones tal vez prioritarias para el tejido.

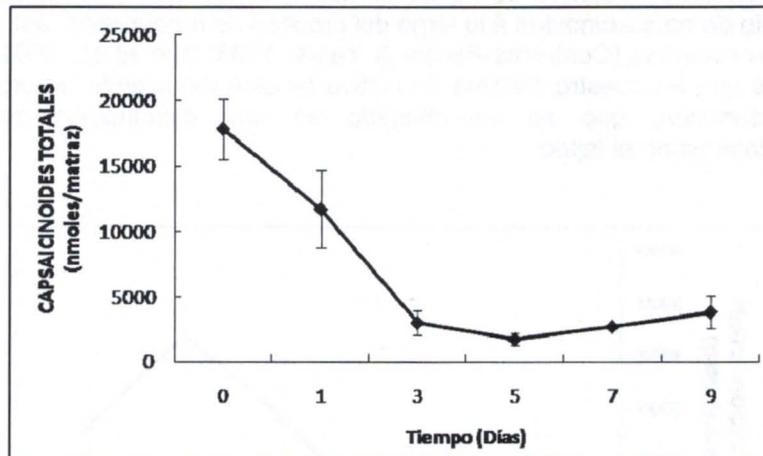


Figura 3.5. Contenido de capsaicinoides totales (capsaicina + dihidrocapsaicina) en placentas inmovilizadas. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

El contenido de los capsaicinoides también podría estar en función de la cantidad y calidad de las vesículas que los almacenan, ya que como se puede apreciar en las figuras 3.6 A y B, la cantidad de vesículas es menor después de varios días en cultivo (Susuki *et al.*, 1980; Zamski *et al.*, 1987).

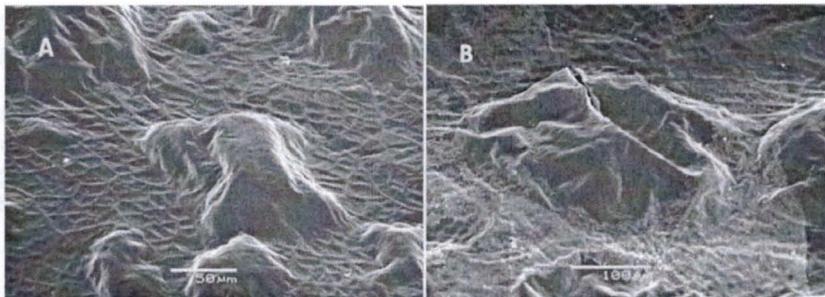


Figura 3.6. Aspecto del tejido placentario de chile habanero a lo largo de un ciclo de cultivo. A) En el día cero y B) en el día nueve. Las imágenes representan micrografías electrónicas de barrido, con acercamientos de 50 y 100 μm , respectivamente (Fotos: Lizbeth Castro-Concha).

En Chile habanero se ha observado que hay una disminución del contenido de capsaicinoides a lo largo del proceso de maduración, así como en la senescencia (Contreras-Padilla & Yahia, 1998; Kim *et al.*, 2001). Es probable que en nuestro sistema de cultivo se esté induciendo un proceso de maduración, que se ve reflejado en una disminución de los capsaicinoides en el tejido.

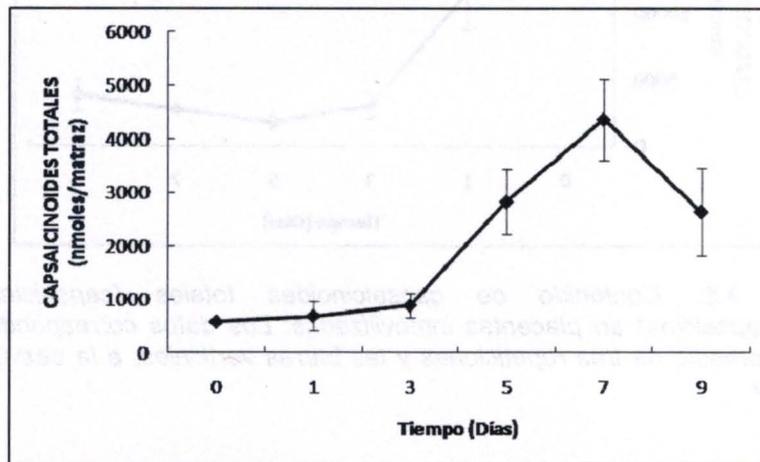


Figura 3.7. Contenido de capsaicinoides (capsaicina + dihidrocapsaicina) liberados al medio por placentas inmovilizadas a lo largo de un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

En el medio de cultivo (Fig. 3.7), el contenido de capsaicinoides aumentó de manera importante a partir del día tres hasta el día siete, pero hacia el final del periodo de cultivo, hubo una disminución importante en su nivel. El aumento observado en la parte media del ciclo podría deberse a la ruptura de las vesículas que almacenan estos compuestos (Fig. 3.6 B), y que por tanto, se liberen hacia el medio. Una explicación alternativa es que al no haber un sitio dónde se almacenen, después de ser sintetizados, éstos sean liberados al medio de cultivo.

Al comparar este comportamiento con lo reportado para cultivos en suspensión de células de Chile (Lindsey, 1986; Sudhakar-Johnson *et al.*, 1990), se encontró un patrón similar, con la diferencia de que hacia el final del ciclo de cultivo, en este caso, la cantidad de capsaicinoides tendió a disminuir.

En el cuadro 3.1, se detecta que el contenido de capsaicinoides totales por matraz sigue un patrón similar al observado en el tejido placentario (Fig. 3.5). Este análisis se realizó con el fin de determinar cuál era el porcentaje de pérdida de estos compuestos hacia el final del ciclo de cultivo.

Los análisis porcentuales por matraz indican que hacia el día tres, hay una disminución (79%) en los capsaicinoides en el tejido placentario; sin embargo, hacia el día 7 hay un repunte del 17% que podría indicar que las placentas pueden estar adquiriendo los sustratos necesarios para realizar la síntesis de estos compuestos.

Cuadro 3.1. *Contenido de capsaicinoides totales y análisis de los porcentajes correspondientes a las placentas y el medio de cultivo.*

Tiempo (Días)	Capsaicinoides en placenta (nmoles)	Capsaicinoides en medio (nmoles)	Total en Matraz (nmoles)	% total matraz	% placenta	% medio
0	17782.6733	576.4967	18359.17	100	96.86	3.14
1	11697.4286	683.6914	12381.12	67.44	94.48	5.52
3	2996.4639	884.7427	3881.20	21.14	77.20	22.80
5	1686.0404	2829.0044	4515.04	24.59	37.34	62.66
7	2679.7354	4368.0939	7047.82	38.39	38.02	61.98
9	3830.6671	2642.5027	6473.16	35.26	59.18	40.82

Es interesante hacer notar que los porcentajes que se obtienen de estos compuestos en las placentas sigue una tendencia inversa a lo que se muestra en la figura 3.5, ya que si bien hay una disminución del contenido de capsaicinoides durante los primeros tres días del ciclo, el porcentaje de capsaicinoides interno de la placenta se mantiene elevado. El análisis porcentual entre las placentas y los medios de cultivo también indica que si bien las placentas van liberando capsaicinoides al medio después de un periodo de tres días cuando están en el cultivo, éstas recuperan cierta capacidad de síntesis en los días posteriores. El porcentaje de estos metabolitos que liberan las placentas se encuentra en el medio de cultivo, aunque hay una porción (62 %) que podría explicarse ya sea por la degradación de los mismos, o en su conversión a otros capsaicinoides que no fueron cuantificados.

3.3. Actividad de las enzimas involucradas en la asimilación del amonio en las placentas inmovilizadas de chile habanero

3.3.1. Actividad de la glutamato deshidrogenasa aminativa (GDH-NADH)

Durante el ciclo de cultivo, la actividad de esta enzima (Fig. 3.8) alcanzó un pico de actividad (530.43 nmoles NADH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) en el día tres, lo cual coincidió con la máxima acumulación de amonio en el tejido (Fig. 3.23). Posteriormente, disminuyó de manera importante en los días sucesivos. Este comportamiento está acorde con estudios previos donde se presentó un alta actividad de la GDH en el sentido aminativo bajo niveles tóxicos de amonio (Dubois *et al.*, 2003; Lehmann & Ratajczak, 2008).

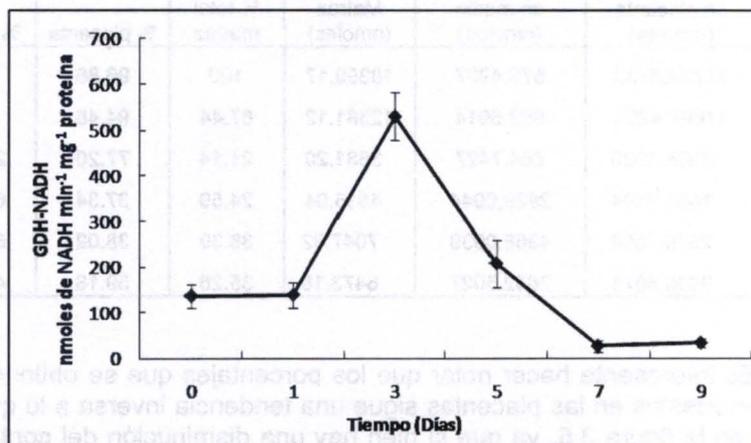


Figura 3.8. Actividad de la GDH-NADH en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Al contrastar las actividades detectadas para esta enzima en las placentas inmovilizadas con los análisis realizados por otros investigadores, se encontraron valores semejantes a los reportados para hojas jóvenes de tabaco (33.77 nmoles NADH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006) y granos de maíz (29.63 \pm 1.11 nmoles NADH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína; Garg *et al.*, 1984) hacia el final del ciclo de cultivo. Sin embargo, los niveles máximos alcanzados (530.43 nmoles NADH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) superan

varias veces el nivel reportado en hojas viejas de tabaco ($78.50 \text{ nmoles NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006), en donde se determinó una mayor actividad de la enzima debida a la removilización de nitrógeno (Paczek *et al.*, 2002; Bortolotti *et al.*, 2003). Esta elevada actividad de GDH-NADH indica que en las placentas esta enzima juega un papel muy importante en el proceso de asimilación de amonio durante la primera fase del ciclo de cultivo.

Dada la poca información sobre estas enzimas en tejidos similares a las placentas, se decidió evaluar el comportamiento de las enzimas de asimilación de amonio en un periodo post-cosecha de frutos de chile habanero. Para esto, se colectaron chiles de 25 días post-antesis, que se colocaron en cajas de Petri abiertas, a razón de 6 piezas por caja. Las cajas se mantuvieron en un cuarto con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 25°C . En la figura 3.9, se pueden observar los cambios de coloración que sufrieron los chiles durante un periodo de siete días.

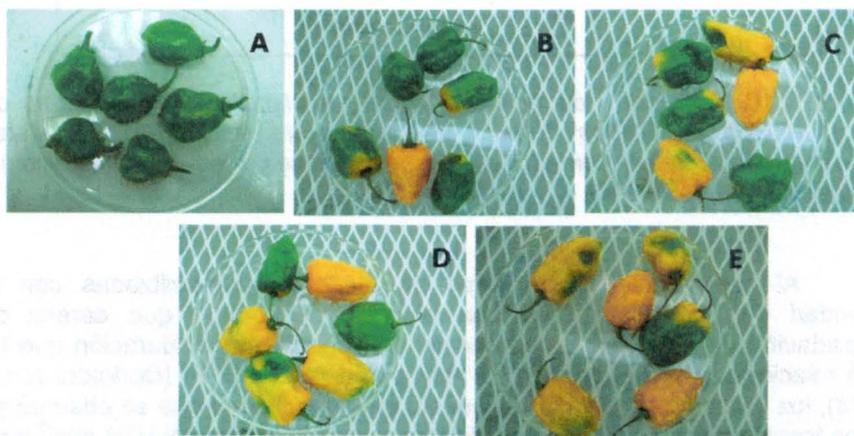


Figura 3.9. Aspecto de chiles habaneros durante el periodo post-cosecha. A) Día cero. B) Día uno. C) Día tres. D) Día cinco. E) Día siete. Las condiciones bajo las cuales se encontraron expuestos fueron de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 25°C .

A diferencia del incremento en la actividad de la GDH detectada a lo largo del curso temporal de post-cosecha en frutos frescos (Fig. 3.10; Boggio *et al.*, 2000; Scarpeci *et al.*, 2007), las placentas inmovilizadas (Fig. 3.8) presentaron un comportamiento marcadamente diferente, puesto que si bien la actividad se incrementa durante la primera parte del ciclo, hacia el

final, ésta disminuye de manera importante. Las diferencias observadas en ambos análisis pueden explicarse con base en los cambios que sufren en su metabolismo para adaptarse a las diferentes condiciones ambientales.

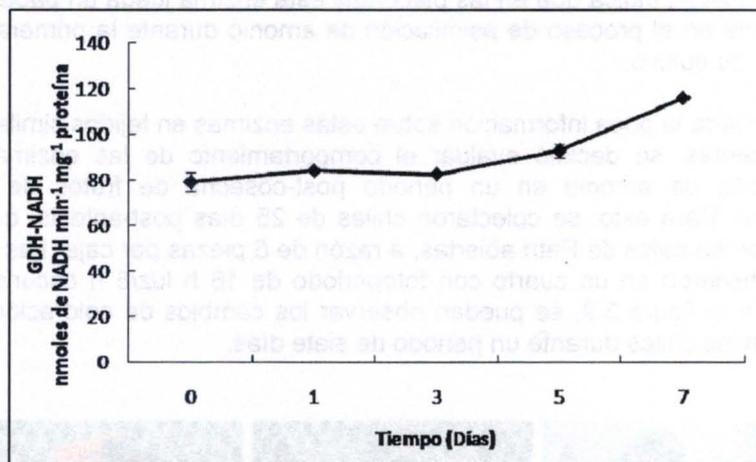


Figura 3.10. Actividad de la GDH-NADH en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al valor promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Al comparar los resultados de placentas inmovilizadas con la actividad que se detecta en una mutante de tomate que carece de degradación de clorofila, parte esencial del proceso de maduración que ha sido relacionada con el cambio de actividad de GS y GDH (Bortolotti *et al.*, 2003), los datos fueron similares, puesto que la actividad que se observó en estos tomates fue mayor en el tejido inmaduro (48 nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína) que en el maduro (31 nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína), aún cuando los valores en las placentas inmovilizadas fueron de 2 a 3 veces mayores. Esto sugiere que quizá las placentas inmovilizadas no estén pasando por un proceso de maduración normal.

3.3.2. Actividad de la glutamato deshidrogenasa desaminativa (GDH-NAD⁺)

La actividad de GDH-NAD⁺ (Fig. 3.11) siguió un patrón de constante disminución a lo largo del ciclo, por lo que se puede decir que hay una

menor tendencia hacia la vía de desaminación, o de la hidrólisis de glutamato.

Los datos reportados en hojas de tabaco, tanto jóvenes (14.17 nmoles NAD^+ min^{-1} mg^{-1} proteína) como viejas (21.33 nmoles NAD^+ min^{-1} mg^{-1} proteína; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006), fueron menores a los determinados en tejido placentario de chile habanero. Los resultados indican que las actividades determinadas de esta enzima son mayores en este tejido y muy diferentes a lo que se reporta en otros estudios.

Si se comparan los cursos temporales del cultivo de placentas inmovilizadas con la de frutos en periodo post-cosecha (Fig. 3.12), se puede constatar que los patrones de comportamiento son diferentes, ya que en las placentas en periodo de post-cosecha, hubo una ligera disminución de la actividad hacia el día tres que se logró compensar hacia el final del periodo de siete días, más no así en las placentas inmovilizadas, en donde la disminución de la actividad para esta enzima fue continua. Es de notar que la actividad detectada en las placentas en el periodo de post-cosecha fue alrededor de siete veces mayor que en las placentas inmovilizadas hacia el final del ciclo.

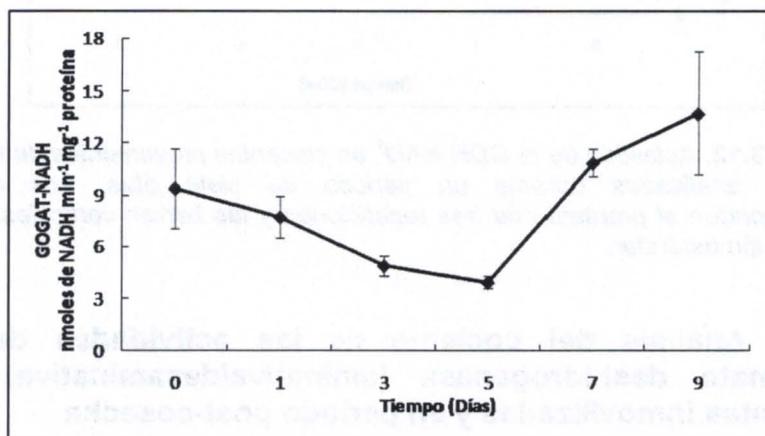


Figura 3.11. Actividad de la enzima GDH-NAD⁺ en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Comparando los resultados de la actividad encontrada en las placentas en un periodo post-cosecha con los de una mutante de tomate

deficiente del proceso de maduración (Bortolotti *et al.*, 2003), se observa que la actividad fue igual a la reportada para frutos verdes (83 nmoles NAD^+ min^{-1} mg^{-1} proteína) y que ésta, en ningún momento, alcanzó la actividad detectada en frutos maduros (20 nmoles NAD^+ min^{-1} mg^{-1} proteína), a pesar de la ligera disminución en el día tres. En el caso de las placentas inmovilizadas, el comportamiento es similar al de la mutante, ya que al inicio del cultivo se encontró una actividad de alrededor de 90 nmoles NAD^+ min^{-1} mg^{-1} proteína y después del día tres, estuvo por debajo de los 20 nmoles NAD^+ min^{-1} mg^{-1} proteína.

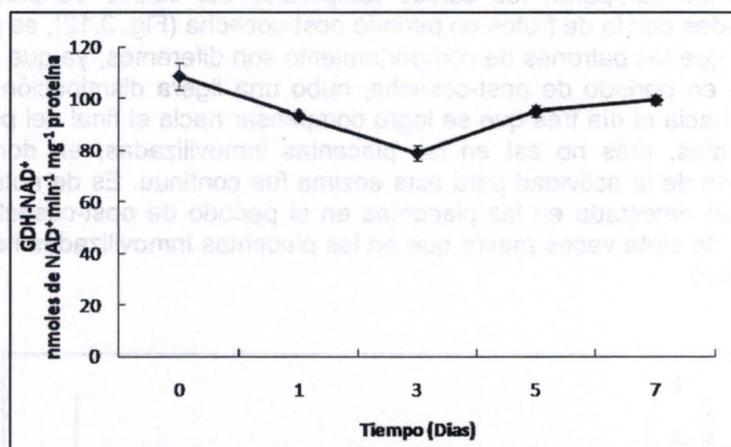


Figura 3.12. Actividad de la GDH- NAD^+ en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

3.3.3. Análisis del cociente de las actividades de la glutamato deshidrogenasa (aminativa/desaminativa) en placentas inmovilizadas y en periodo post-cosecha

El cociente de la actividad aminativa sobre la desaminativa es un parámetro indicativo de si la enzima tiene alguna preferencia en realizar una función sobre la otra. Si se obtiene un cociente igual a uno, la enzima presenta la misma disposición para llevar a cabo una reacción o la otra, en tanto que si el cociente es mayor a uno, la enzima estará principalmente direccionada en el sentido aminativo o si éste es inferior a uno, la enzima podrá tener una mayor actividad catabólica.

El cociente calculado para las actividades de GDH en placentas inmovilizadas se puede apreciar en la figura 3.13. Es clara una mayor tendencia de la enzima hacia la actividad de síntesis, ya que a partir del día cero hasta el día nueve se observa un cociente mayor a uno, en comparación con las placentas testigo, en donde al parecer se favorece el catabolismo.

También cabe señalar que el sentido aminativo se ve favorecido los días tres, cinco y nueve del ciclo de cultivo, siendo el quinto día cuando la diferencia es mayor (alrededor de 30 veces en comparación al sentido desaminativo).

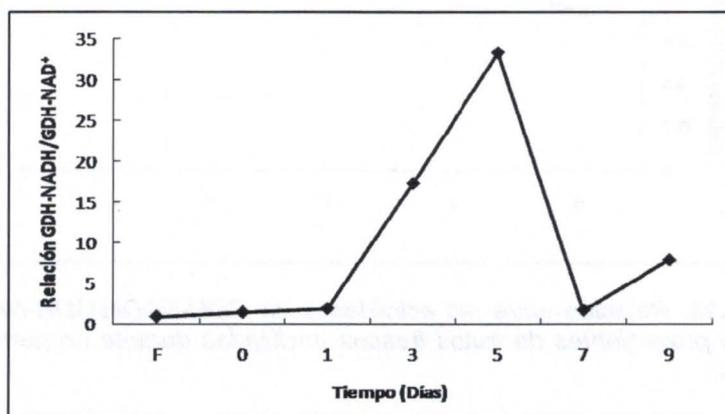


Figura 3.13. Cociente entre las actividades de GDH-NADH/GDH-NAD⁺ en cultivo in vitro de placentas inmovilizadas.

Al comparar estos resultados con la cantidad de amonio se pudo constatar que los incrementos en el sentido aminativo de la enzima coincidieron con el aumento en la poza de amonio, tanto en placentas (día 3, Fig. 3.23) como en el medio de cultivo (día 5, Fig. 3.24). Los resultados presentados apuntan al hecho que en los primeros días de cultivo de las placentas inmovilizadas, esta enzima funciona en la destoxificación de niveles altos de amonio (Dubois *et al.*, 2003; Lehmann & Ratajczak, 2008).

En las placentas durante el periodo de post-cosecha (Fig. 3.14), se observó que la GDH está involucrada en el catabolismo, y que únicamente en los días tres y siete, se observó una actividad favorecida en el sentido aminativo, que coincidió con los picos más altos de amonio (Fig. 3.23). El comportamiento en sentido catabólico está ampliamente documentado

durante la senescencia, pues constituye una respuesta a la posible deficiencia de esqueletos carbonados, y por tanto, se piensa que esta enzima juega un papel regulatorio en los metabolismos de carbono y nitrógeno (Robinson *et al.*, 1991, 1992; Becker *et al.*, 2000; Dubois *et al.*, 2003; Lehmann & Ratajczak, 2008).

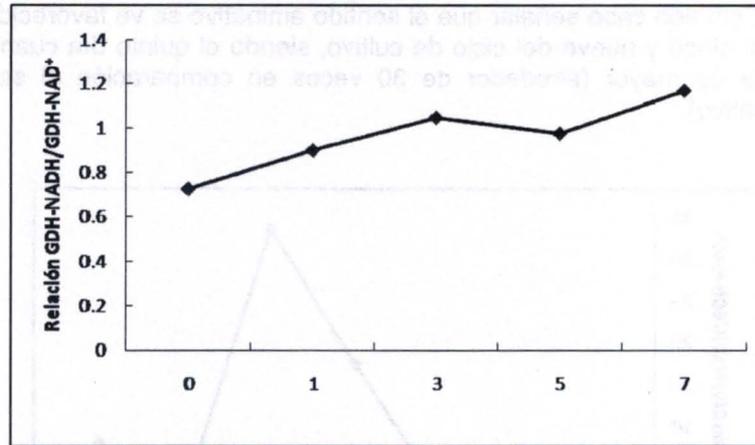


Figura 3.14. Relación entre las actividades de GDH-NADH/GDH-NAD⁺ en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días.

A pesar de los diversos estudios existentes sobre esta enzima, aún no se ha podido determinar cuál es su función real. En estudios *in vivo*, se ha observado que su función radica en el proceso de desaminación, mientras que en los estudios *in vitro*, el sentido es el contrario (aminación) (Dubois *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en placentas en cultivo *in vitro* parecen apoyar esta última función.

3.3.4. Actividad de la glutamino sintetasa (GS)

La actividad de la GS (Fig. 3.15) tendió a incrementarse, presentado un pico máximo de actividad en el día cinco, para posteriormente disminuir. En el día nueve alcanzó de nuevo el mismo nivel de actividad observada en el día cinco.

En el caso de la actividad de GS, Bauer y colaboradores (1997) detectaron una actividad de 48 ± 6 nmoles gamma-glutamihidroxamato min⁻¹

1 mg^{-1} proteína en extractos de hojas de tomate. En el caso de las placentas inmovilizadas, la actividad fue en promedio de 2 a 10 veces mayor, ya que el rango de actividad encontrado fue de 140.5 a 486.6 nmoles gamma-glutamihidroxamato $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

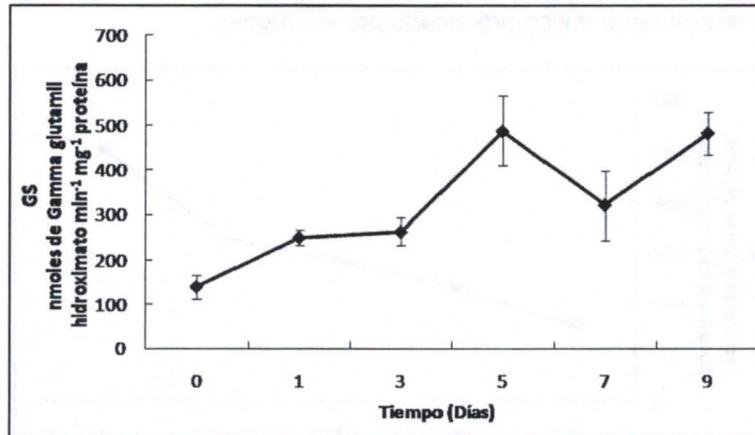


Figura 3.15. Actividad de la GS en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en las placentas inmovilizadas (Fig. 3.15) con los de las placentas durante el periodo post-cosecha (Fig. 3.16), se pudo notar que el comportamiento fue muy similar.

Durante el proceso de maduración en tomate (*S. lycopersicum* cv. Hellfrucht Frühstamm) (Gallardo *et al.*, 1988), se observó que cuando estos frutos tenían una coloración verde, la actividad detectada era mayor (248.4 pmoles $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ PF) que en estados posteriores (coloración rosada) cuando se presentaba el pico de menor actividad para esta enzima (2 pmoles $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ PF). No obstante, la actividad de GS se incrementaba en estados tardíos de maduración hasta alcanzar cerca del 30% de la actividad total encontrada en el estado verde (75 pmoles $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ PF).

En otro estudio sobre la maduración del tomate (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom), se detectaron bajos niveles de actividad de GS cuando los frutos se encontraban completamente maduros (coloración roja) (Scarpeci *et al.*, 2007).

De estos estudios, se desprende que entre plantas del mismo género, y aún entre variedades, se pueden obtener patrones diferentes de actividad de esta enzima. En el caso de las placentas de chile habanero, se observa un considerable aumento en la actividad de GS que está contribuyendo en la depuración del contenido de amonio liberado por la degradación de diversos compuestos nitrogenados, y de esta manera, controlar el ambiente tóxico provocado por el amonio.

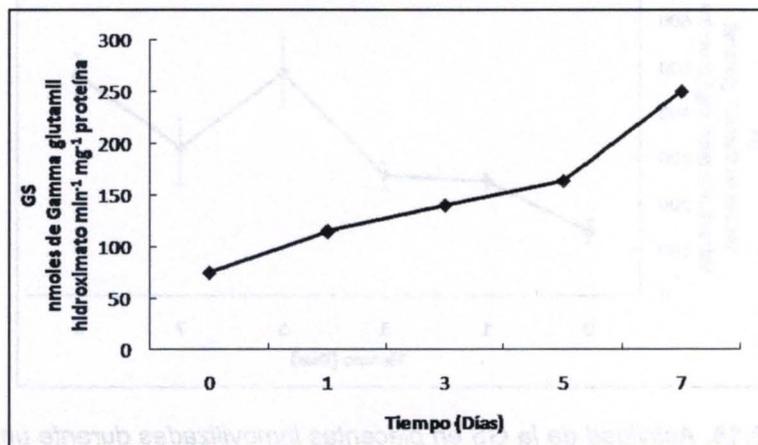


Figura 3.16. Actividad de la GS en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden a tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

3.3.5. Actividad de la glutamino 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT-NADH)

En el caso de la GOGAT-NADH (Fig. 3.17), la actividad disminuyó hasta en un 50% en el día cinco, para después incrementarse de manera notable hacia el día nueve.

La actividad de esta enzima en placentas inmovilizadas alcanzó un valor de 9.38-13.68 nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína, que es alrededor de 30 veces superior al nivel reportado para hojas jóvenes de tabaco (0.33-0.41 nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006).

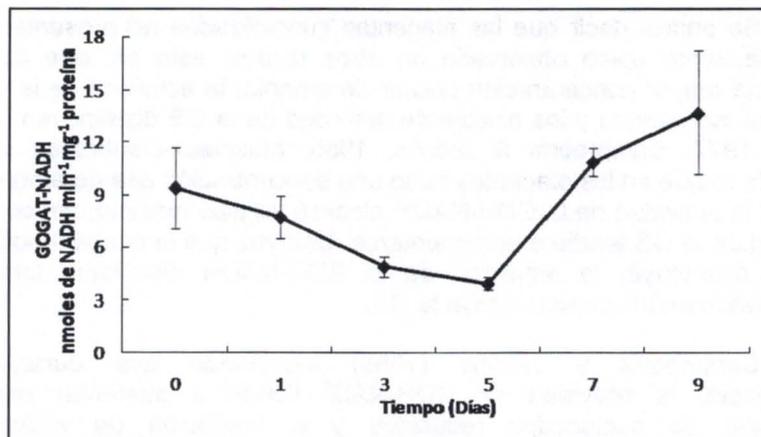


Figura 3.17. Actividad de la GOGAT-NADH en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Cuando se comparan los patrones de actividad en las placentas inmovilizadas con el de las placentas durante el periodo post-cosecha (Figs. 3.17 y 3.18), se observa que si bien al principio presentan comportamientos similares, hacia el final del periodo hubo diferencias notables, ya que en el caso de las primeras, la actividad se incrementó, más no en las segundas.

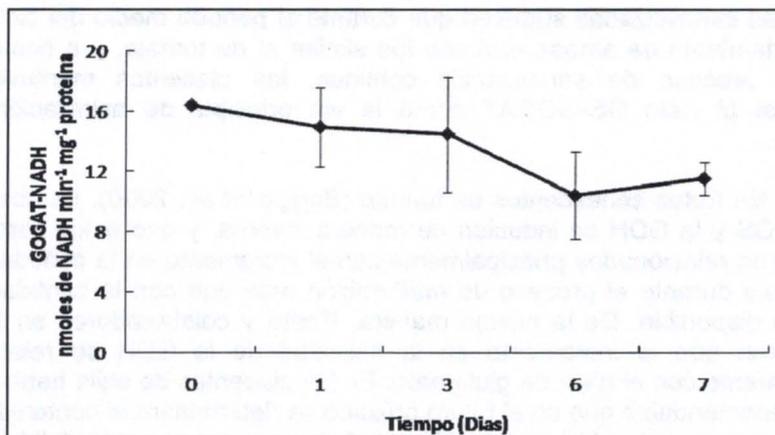


Figura 3.18. Actividad de la GOGAT-NADH en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Se podría decir que las placentas inmovilizadas no presentaron el comportamiento típico observado en otros tejidos, esto es, que cuando existe una mayor concentración celular de amonio, la actividad de la GDH-NADH se incrementa y los niveles de actividad de la GS disminuyen (Mifflin & Lea, 1977; Cammaerts & Jacobs, 1985; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006), dado que en las placentas hubo una concentración alta de amonio en el día 3, la actividad de la GDH-NADH alcanzó su pico máximo, así como la actividad de la GS tendió a incrementarse. Una vez que la concentración de amonio disminuyó, la actividad de la GDH-NADH disminuyó también, manteniéndose únicamente activa la GS.

Cammaerts y Jacobs (1985) mencionan que durante la senescencia, la actividad de GDH-NAD⁺ tiende a aumentar para la producción de nucleótidos reducidos y la liberación de esqueletos carbonados para el metabolismo de carbohidratos, ya que en estas circunstancias, el cloroplasto se encuentra prácticamente inactivo; en contraste, en las placentas no se observó este comportamiento, ya que la actividad desaminativa disminuyó desde el principio del ciclo de cultivo.

En cuanto a las actividades de la GS y la GDH-NADH, los estudios de Gallardo *et al.* (1988) indican que ambas enzimas pueden estar presentes en distintos periodos de madurez de tomate, y aunque la vía de asimilación primaria es a través del ciclo GS-GOGAT, la GDH puede actuar en la vía de síntesis para asegurar que los niveles de amonio se mantengan bajos durante la maduración del fruto. En este sentido, los resultados en placentas inmovilizadas sugieren que durante el periodo medio del ciclo, el comportamiento de ambas enzimas fue similar al de tomate, y a pesar de que el proceso de senescencia continua, las placentas mantuvieron funcional al ciclo GS-GOGAT como la vía principal de asimilación de amonio.

En frutos senescentes de tomate (Boggio *et al.*, 2000), se observó que la GS y la GDH se inducían de manera inversa, y que estos cambios estuvieron relacionados principalmente con el incremento en la cantidad de glutamato durante el proceso de maduración más que con la cantidad de amonio disponible. De la misma manera, Pratta y colaboradores en 2004 reportaron que el incremento en la actividad de la GDH se relacionó directamente con el nivel de glutamato. En las placentas de chile habanero, sería recomendable que en el futuro próximo se determinara el contenido de glutamato para establecer si esto también ocurre en este tejido. No obstante, si se toma en cuenta la cantidad de amonio disponible, se podría suponer que la actividad de GDH pueda, de igual manera que en los frutos de tomate, estar en función de la cantidad de glutamato disponible.

3.3.6. Actividades enzimáticas en hojas de plantas maduras e inmaduras y raíces

Además del análisis realizado de las enzimas encargadas de la asimilación de amonio en placentas, se determinaron las actividades de estas enzimas en hojas de plantas maduras y de plántulas, así como también en raíces de plántulas, con la finalidad de tener un espectro más amplio para realizar comparaciones debido a que existe bastante información con respecto a estos tejidos, y así facilitar la propuesta de un modelo sobre la asimilación de amonio en las placentas de chile habanero.

Con respecto a la enzima GS, ésta se encuentra más activa en las hojas de plántulas, y después en raíces, mientras que la menor actividad se detectó en las hojas de plantas maduras, pues esta actividad tiende a disminuir conforme se va dando el proceso de senescencia (Cabello *et al.*, 2006; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Por otro lado, en las raíces la actividad detectada es cuatro veces superior a lo que se reporta para raíces de maíz (Sakakibara *et al.*, 1996).

La actividad de la GOGAT-NADH (Fig. 3.19) fue ligeramente mayor en las raíces de plántulas que en las hojas, ya que se trata de un tejido no fotosintético, a diferencia de las hojas en donde la Fd-GOGAT desarrolla el papel principal en la asimilación de amonio (Anderson *et al.*, 1989; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). La actividad de GOGAT-NADH se ve inducida en las raíces a las que se les adicionó amonio, a diferencia de la Fd-GOGAT, lo que implica que esta enzima sea fundamental en la asimilación de amonio en este tejido. En cuanto a los niveles detectados en las hojas, se encontró que los valores fueron superiores a los que reportan Masclaux-Daubresse y colaboradores (2006) en hojas de tabaco, tanto jóvenes como viejas (hojas jóvenes: 0.33-0.41 nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína; hojas viejas: 0.11-0.14 nmoles NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína), lo que nos indica que esta enzima aunque no es fundamental en estos tejidos, si puede contribuir a realizar la asimilación en menor proporción.

La GDH (Fig. 3.19) presentó un sesgo en el cociente hacia el sentido aminativo en ambos tipos de hojas (relación 1.5-1.6), mientras que en las raíces, la actividad no se vió favorecida en ningún sentido (relación de 1). A pesar de esto, la actividad que se detectó en raíces fue 3 y 10 veces superior a lo determinado en hojas de plántulas y hojas maduras, respectivamente.

En las hojas, la GDH no siguió el comportamiento reportado, *i.e.* no se encontró mayor actividad durante la senescencia en comparación con las hojas jóvenes (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2002; 2006). Al parecer, en

plantas de chile habanero podría existir una tendencia natural hacia el sentido aminativo en las hojas, independientemente de su estado fisiológico.

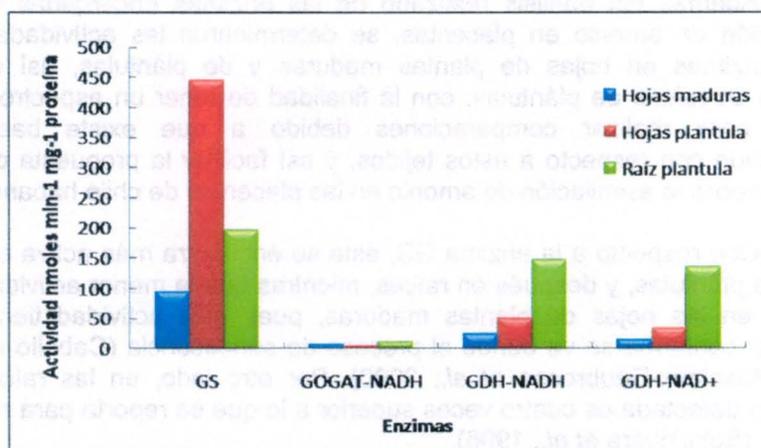


Figura 3.19. Comparación de actividades enzimáticas en hojas maduras, hojas de plántulas y raíces de plántulas. Los datos corresponden a tres repeticiones.

Como se pudo observar, las enzimas que presentaron mayor variación fueron la GS y la GDH, tanto en sentido aminativo como el desaminativo, mientras que la GOGAT-NADH no presentó diferencias significativas (Fig. 3.19), esto nos indica que en la planta de chile habanero podrían existir mecanismos diferentes de regulación dependiendo del tejido en el cuál se evalúen.

3.4. Contenidos de proteínas, amonio y aminoácidos en placentas inmovilizadas, medios de cultivo y placentas durante el periodo de post-cosecha

Con la finalidad de conocer cuáles eran los niveles de los sustratos necesarios para las funciones de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio, se cuantificaron los contenidos de proteínas, amonio y aminoácidos. Los resultados que se obtuvieron se discuten a continuación.

3.4.1. Contenido de proteínas

Durante el análisis realizado en el estudio de placentas inmovilizadas en cultivo *in vitro*, un parámetro importante para determinar el estado del tejido fue la cantidad de proteína soluble presente tanto en las placentas como la liberada al medio de cultivo.

Con respecto a las placentas, en la figura 3.20, se puede notar una importante pérdida en la cantidad de proteína durante los primeros tres días de cultivo, para luego, no presentar variaciones mayores.

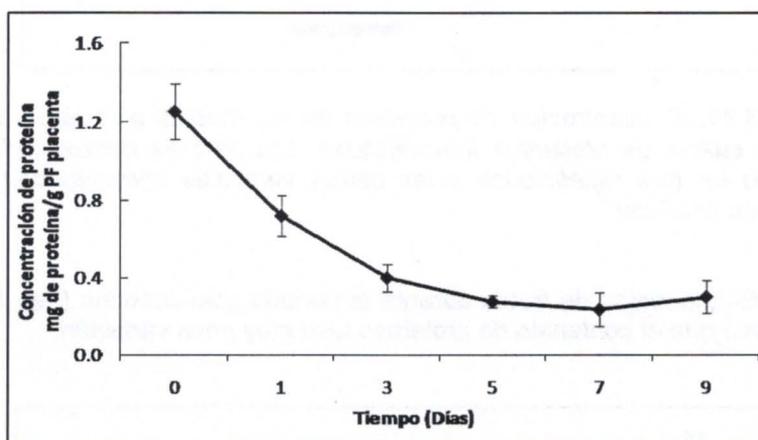


Figura 3.20. Concentración de proteínas en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

En contraste, la concentración de proteína en el medio de cultivo (Fig. 3.21) aumentó de manera significativa hasta el quinto día de cultivo (16 veces por encima del día cero), para después disminuir aproximadamente a la mitad, alcanzando los niveles determinados en el día tres.

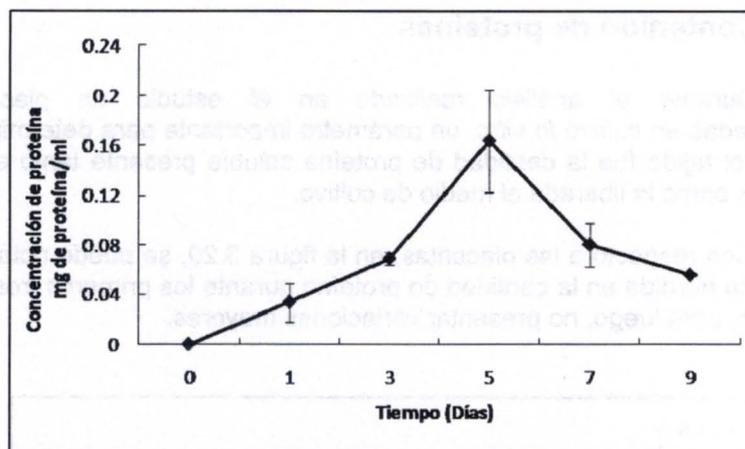


Figura 3.21. Concentración de proteínas en los medios a lo largo de un ciclo de cultivo de placentas inmovilizadas. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

En placentas de frutos durante el periodo post-cosecha (Fig. 3.22), se observó que el contenido de proteínas tuvo muy poca variación.

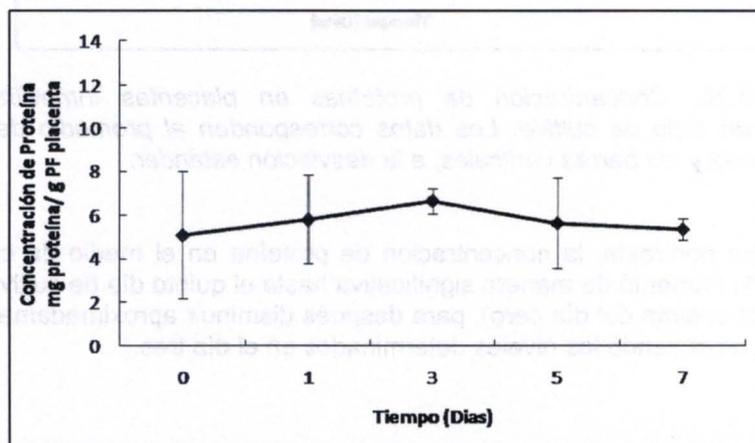


Figura 3.22. Concentración de proteína en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Si se comparan los patrones observados en las placentas en periodo de post-cosecha con aquellas que fueron inmovilizadas, se pudo apreciar que hay diferencias notorias; en las inmovilizadas, el contenido de proteína tendió a disminuir a lo largo del ciclo de cultivo, mientras que en las otras, esta disminución no se presentó. En contraste, en frutos senescentes de tomate (Gallardo *et al.*, 1988), el contenido de proteína tiende a incrementarse durante el proceso de maduración.

Por lo que respecta a las concentraciones reportadas, en el cultivo de placentas inmovilizadas se encontraron cantidades comparables a las detectadas en los tomates en el periodo de maduración temprana (0.14 mg proteína g⁻¹ PF, coloración rosa-nivel 2).

3.4.2. Contenido de amonio

Los niveles de amonio en las placentas (Fig. 3.23) tendieron a incrementarse con el paso del tiempo, siendo el día tres el día de máxima acumulación interna, para luego disminuir, y mantener un nivel cercano a los 3.0 mg g⁻¹ PF, el cual está ligeramente por encima del nivel de amonio inicial.

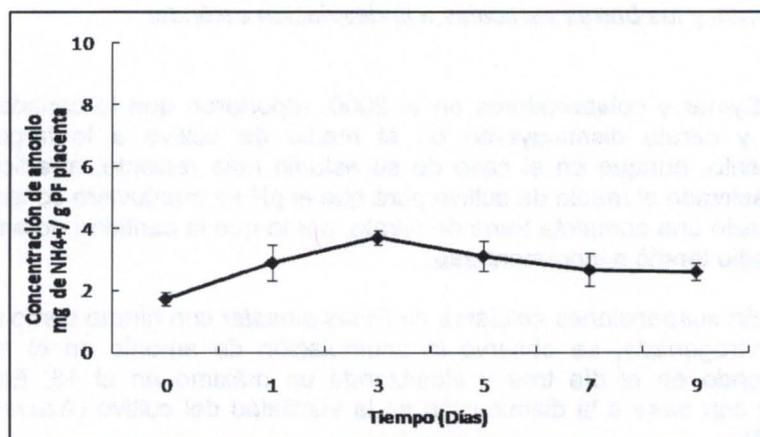


Figura 3.23. Contenido de amonio en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales a la desviación estándar.

En el medio de cultivo (Fig. 3.24), el incremento se dio más lentamente, con un máximo en el día 5, y al igual que ocurre en las placentas, el contenido disminuyó regresando a niveles ligeramente superiores a los iniciales.

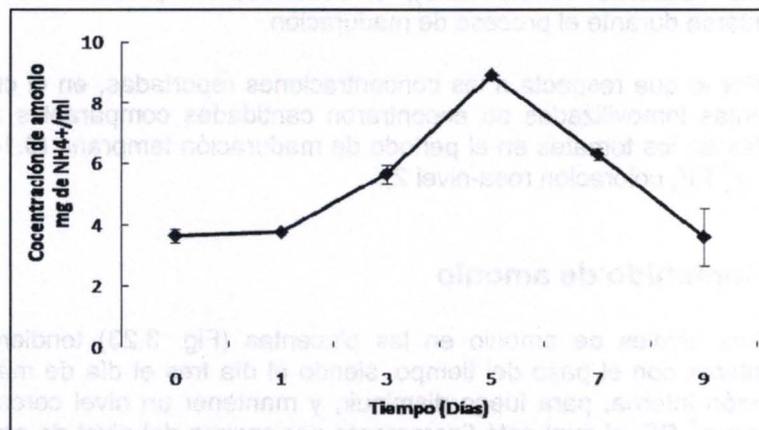


Figura 3.24. Contenido de amonio en medio de placentas inmobilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Eymar y colaboradores en el 2000, reportaron que la cantidad de amonio y nitrato disminuyeron en el medio de cultivo a lo largo del experimento, aunque en el caso de su estudio más reciente, al adicionar carbon activado al medio de cultivo para que el pH se mantuviera constante, se favoreció una completa toma de nitrato, por lo que la cantidad de amonio en el medio tendió a incrementarse.

En suspensiones celulares de *Pinus pinaster* con nitrato como única fuente nitrogenada, se observó la acumulación de amonio en el medio comenzando en el día tres y alcanzando un máximo en el 18. Esto lo explican con base a la disminución en la viabilidad del cultivo (Azevedo *et al.*, 2008).

En este trabajo, se observó que en las placentas *in vitro* se está dando un flujo de amonio entre el medio de cultivo y el tejido placentario. Además, el hecho de que la cantidad de amonio al final del ciclo disminuyera, tanto en las placentas como en el medio de cultivo, podría sugerir que las placentas inmobilizadas se encuentran viables, y que las reacciones fisiológicas que involucran a este compuesto, se encuentran

activas depurando este compuesto y quizá, se esté favoreciendo la formación de diversos compuestos nitrogenados.

En los análisis llevados a cabo en placentas durante un periodo post-cosecha, el contenido de amonio tendió a incrementarse ligeramente a lo largo del tiempo (Fig. 3.25). Esto podría deberse, a que durante este periodo, muchas proteínas son degradadas, liberando el nitrógeno en forma de amonio.

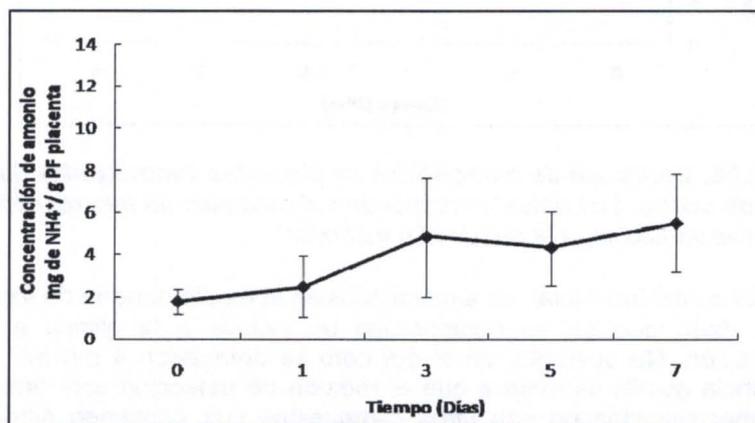


Figura 3.25. Contenido de amonio en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

En el estudio realizado en el proceso de maduración de tomate (Gallardo *et. al.*, 1988), se ha reportado que no existen cambios importantes en el contenido de amonio, mientras que en las placentas en periodo post-cosecha, los cambios observados indicarían que en éstas se están dando todavía muchas reacciones metabólicas relacionadas a la asimilación y la reasimilación de amonio.

3.4.3. Contenido de aminoácidos

En cuanto a esta poza, se determinó que el contenido de aminoácidos en las placentas (Fig. 3.26) tuvo una ligera disminución a lo largo del ciclo de cultivo, que no sobrepasó en más de una unidad a los niveles encontrados al inicio del ciclo.

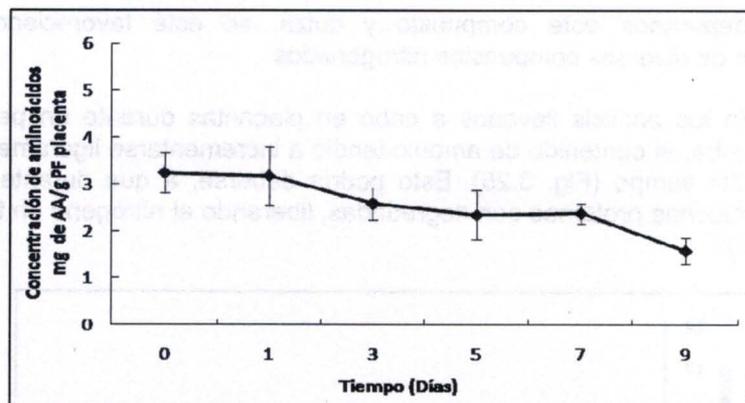


Figura 3.26. Contenido de aminoácidos en placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

El contenido inicial de aminoácidos en el medio debería de ser de $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, dado que en su composición se incluye a la glicina en esa concentración. No obstante, en el día cero se detectaron 4 mg ml^{-1} , esta discrepancia puede deberse a que el método de detección con ninhidrina pudo haber reaccionado con otros compuestos que contienen nitrógeno, como las vitaminas, entre otros. En la figura 3.27, no se observaron cambios significativos en el curso temporal del análisis realizado.

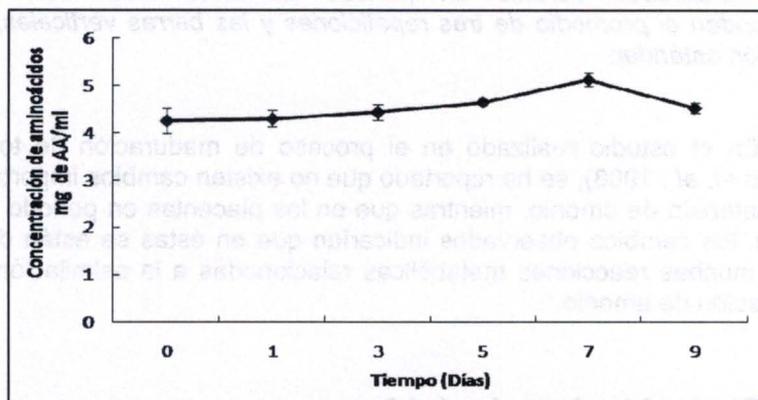


Figura 3.27. Contenido de aminoácidos en los medios de placentas inmovilizadas durante un ciclo de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

En el caso de las placentas durante el periodo post-cosecha (Fig. 3.28), el contenido de aminoácidos también se mantuvo en niveles constantes. En estas placentas, el contenido de aminoácidos fue de aproximadamente dos veces el encontrado en las inmovilizadas; sin embargo, al tomarse en cuenta la cantidad de aminoácidos liberados al medio por las placentas inmovilizadas, se podría decir que este contenido fue casi el mismo.

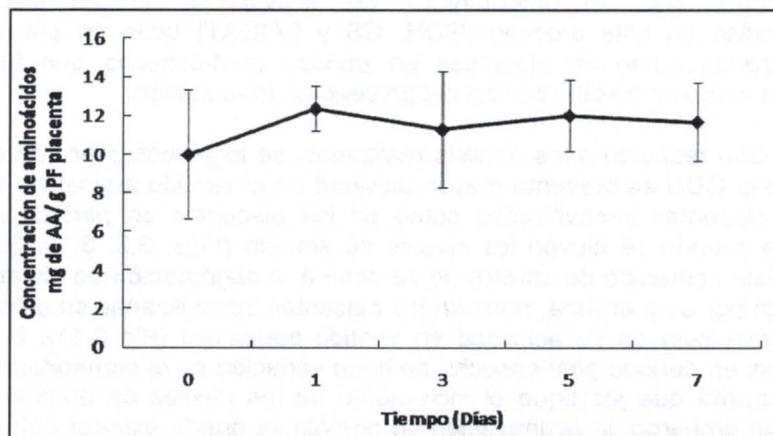


Figura 3.28. Contenido de aminoácidos en placentas provenientes de frutos frescos analizadas durante un periodo de siete días. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones y las barras verticales, a la desviación estándar.

Estos resultados sugieren que, al no existir variaciones en la poza de aminoácidos, se requiere de una concentración basal que se tiende a mantener, independientemente de los procesos metabólicos que se estén llevando a cabo en el tejido. Esto contrasta con lo que se reporta en frutos senescentes de tomate (Bortolotti *et al.*, 2003), en donde el contenido total de aminoácidos disminuye durante la maduración, así como en hojas de tabaco (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006) y girasol (Cabello *et al.*, 2006), en donde la cantidad de aminoácidos tiende a incrementarse, cuando las hojas envejecen.

3.5. Discusión general

En este trabajo se cuantificó la actividad de las enzimas de asimilación de amonio en placentas inmovilizadas de chile habanero, con la finalidad de evaluar la capacidad del tejido placentario para llevar a cabo el proceso de asimilación de amonio, a fin de proveer de precursores para la síntesis de capsaicinoides en este tejido.

Para ello, se determinaron las actividades de las enzimas involucradas en este proceso (GDH, GS y GOGAT) tanto en placentas inmovilizadas como en placentas en periodo post-cosecha que fueron tomadas como un posible control del proceso de maduración.

Con respecto a los análisis realizados, se logró observar que en el caso de la GDH se presenta mayor actividad en el sentido aminativo, tanto en las placentas inmovilizadas como en las placentas en periodo post-cosecha cuando se elevan los niveles de amonio (Figs. 3.8, 3.10, 3.23 y 3.24). Este contenido de amonio no se debe a la degradación de glutamato realizada por esta enzima, pues en las placentas inmovilizadas se presentó una disminución de su actividad en sentido catabólico (Fig 3.11). En las placentas en periodo post-cosecha no hubo variación en el comportamiento de la enzima que justifique el incremento de los niveles de amonio (Fig 3.12); sin embargo, la acumulación de amonio se puede explicar con base en la liberación en otros procesos metabólicos, como pueden ser la fotorespiración y la degradación de nucleótidos y vitaminas (Dubois *et al.*, 2003).

La GS se mantiene como la vía principal por la que las placentas asimilan amonio, pues en ambos casos (placentas inmovilizadas, Fig. 3.15 y periodo post-cosecha, Fig. 3.16), su actividad se incrementa a lo largo del periodo de análisis.

Por otro lado, la GOGAT parecería requerir de cierta cantidad de glutamina acumulada para activarse, ya que se observó que cuando la actividad de GS se incrementa, la primera disminuye su actividad. Este patrón se observó tanto para las placentas inmovilizadas como para las placentas en periodo post-cosecha (Figs. 3.17 y 3.18). Además, en las placentas inmovilizadas se determinó que al disminuir GS su actividad en el día siete, hubo un incremento concomitante en la actividad de GOGAT.

En el tejido placentario, la GDH y la GOGAT (Fig. 3.19) actúan de manera similar a las raíces, mientras que la GS lo hace como en las hojas de plántulas. Adicionalmente, en los distintos órganos de las plantas la GDH tiene una función aminativa (raíces y hojas), mientras que no ocurre así en

los frutos (placentas en el periodo post-cosecha). Este comportamiento de las placentas inmovilizadas pudiera explicarse con base en las condiciones bajo las cuales se encuentra este cultivo, puesto que se ha reportado que la GDH en el sentido aminativo es activada por luz y exceso de amonio en el medio (Melo-Oliveira, *et. al.*, 1996; Dubois *et al.*, 2003).

Por otra parte, la GS si presenta un comportamiento fisiológico diferente, tanto en las placentas en periodo post-cosecha, así como en las placentas inmovilizadas, por lo que esta enzima podría estar bajo un tipo de regulación diferente al que ocurre en las hojas y a diferencia de la GDH, es independiente de las condiciones del medio de cultivo.

Finalmente el hecho de no observar cambios significativos en el contenido de aminoácidos, a pesar del incremento en las actividades de las enzimas involucradas sugiere que los aminoácidos recién sintetizados son utilizados inmediatamente, quizá para la síntesis de capsaicinoides, ya que en los días que se presentó una mayor actividad de las enzimas (días 3 y 5 para GDH y GS), hubo una recuperación del 17% del contenido de estos compuestos en el cultivo de las placentas inmovilizadas (Cuadro 3.1), y por tanto, el nivel endógeno se mantiene constante.

En la figura 3.29, se describe lo que podría estar sucediendo en el tejido placentario durante el ciclo de cultivo, en donde primero se produce una disminución de la actividad de GDH-NAD⁺, con base en la disponibilidad de amonio en el medio de cultivo. El amonio liberado internamente provoca un incremento en la actividad de las enzimas principales de asimilación de amonio, GS y GDH-NADH. Al mismo tiempo, se incrementa la concentración de aminoácidos, entre ellos la glutamina, para que GOGAT-NADH pueda actuar y acoplarse a la actividad de GS. Los aminoácidos sintetizados pueden entonces ser empleados en la síntesis de los capsaicinoides.

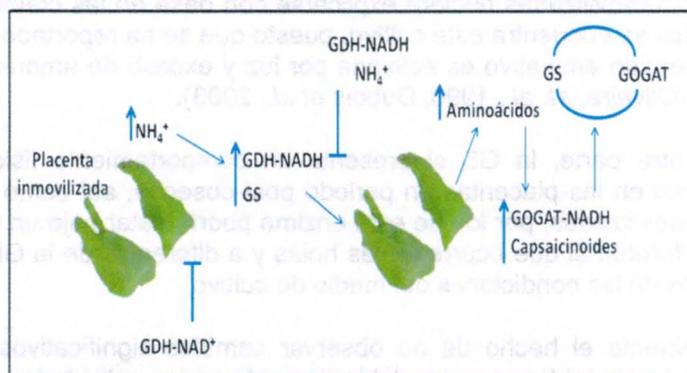


Figura 3.29. Modelo teórico que explica los eventos que se encontraron durante el análisis llevado a cabo. 1. Incremento intracelular de amonio, disminución de la actividad de GDH desaminativa. 2. Incremento de GS y GDH aminativa. 3. Disminución de GDH aminativa, baja concentración de amonio, se eleva la concentración de aminoácidos y capsaicinoides, así como la actividad de GOGAT. 4. GS y GOGAT se acoplan como ciclo.

3.6. Bibliografía

Anderson, M. P., C. P. Vance, G. H. Geichel and S. S. Miller (1989). *Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules*. Plant Physiology, 90, 351-358.

Azevedo, H., A. Dias and R. M. Tavares (2008). *Establishment and characterization of Pinus pinaster suspension cell cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93, 115-121.

Bauer, D., K. Biehler, H. Fock, E. Carrayol, B. Hirel, A. Migge and T. W. Becker (1997). *A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato*. Physiologia Plantarum, 99, 241-248.

Becker, T. W., E. Carrayol and B. Hirel (2000). *Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport*. Planta, 211, 800-806.

Boggio, S. B., J. F. Palatnik, H. W. Heldt and E. M. Valle (2000). *Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of Lycopersicon esculentum Mill.* Plant Science, 159, 125-133.

Bortolotti, S., S. B. Boggio, L. Delgado, E. G. Orellano and E. M. Valle (2003). *Different induction patterns of glutamate metabolizing enzymes in ripening fruits of the tomato mutant green flesh.* Physiologia Plantarum, 119, 384-391.

Cabello, P., E. Agüera and P. de la Haba (2006). *Metabolic changes during natural ageing in sunflower (Helianthus annuus) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence.* Physiologia Plantarum, 128, 175-185.

Cammaerts, D. and M. Jacobs (1985). *A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of Arabidopsis thaliana.* Planta, 163, 517-526.

Castro-Concha, L., R. M. Escobedo and M. L. Miranda-Ham (2006). "Measurement of cell viability in *in vitro* cultures", in *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (eds). Human Press, Totowa, New Jersey. pp. 71-76.

Contreras-Padilla, M. and E. M. Yahia (1998). *Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chili peppers and relation with peroxidase activity.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2075-2079.

Dubois, F., T. Tercé-Laforgue, M. B. González-Moro, J. M. Estavillo, R. Sangwan, A. Gallais and B. Hirel (2003). *Glutamate dehydrogenase in plants: Is there a new story for an old enzyme?* Plant Physiology and Biochemistry, 41, 565-576.

Eymar, E., J. Alegre, M. Toribio and D. Lopez-Vela (2000). *Effect of 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by Langstroemia indica.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63, 57-65.

Gallardo, F., S. Gálvez, M. A. Quesada, F. M. Cánovas and I. Nuñez de Castro (1988). *Glutamine synthetase activity during the ripening of tomato.* Plant Physiology and Biochemistry, 26, 747-752.

Garg, N., R. Singh and V. I. P. Batra (1984). *Enzymes of glutamine and asparagine metabolism in developing wheat grains*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32, 519-523.

Godoy-Hernandez, G. and F. Vázquez-Flota (2006). "Growth Measurements: Estimation of Cell Division and Cell Expansion", in *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (eds). Human Press, Totowa, New Jersey. pp. 51-58.

Hall, R. D. and M. M. Yeoman (1991). *The influence of intracellular pools of phenylalanine derivatives upon the synthesis of capsaicin by immobilized cell cultures of the chilli pepper, Capsicum frutescens*. Planta, 185, 72-80.

Kim, M., S. Kim, S. Kim, and B. D. Kim (2001). *Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization*. Molecules and Cells, 11, 213-219.

Kwok, K. H., P. Tsoulpha and P. M. Doran (1992). *Limitations associated with conductivity measurement for monitoring growth in plant tissue culture*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29, 93-99.

Lehmann, T. and L. Ratajczak (2008). *The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating sedes of yellow lupine*. Journal of Plant Physiology, 165, 149-158.

Leifert, C., S. Pryce, P. J. Lumsden and W. M. Waites (1992). *Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 171-179.

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

Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (2006). "History of Plant Tissue Culture", in *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. and F. Vázquez-Flota (eds). Human Press, Totowa, New Jersey. pp. 3-8.

Masclaux-Daubresse, C., M. H. Valadier, E. Carrayol, M. Reisdorf-Cren and B. Hirel (2002). *Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves*. Plant, Cell and Environment, 25, 1451-1462.

Masclaux-Daubresse, C., C. K. Reisdorf, K., Pageau, M. Lelandais, O. Grandjean, J. Kronenberger, M. Héline, M. Feraud, T. Jouglet and A. Suzuki (2006). *Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco*. *Plant Physiology*, 140, 444-456.

Melo-Oliveira, R., I. Oliveira Cunha and G. M. Coruzzi (1996). *Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 4718-4723.

Miflin, B. J. and P. J. Lea (1977). *Amino acid metabolism*. *Annual Review of Plant Physiology*, 28, 299-329.

Paczek, V., F. Dubois, R. Sangwan, J. F. Morot-Gaudry, K. A. Roubelakis-Angelakis and B. Hirel (2002). *Cellular and subcellular localisation of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in grapes gives new insights on the regulation of carbon and nitrogen metabolism*. *Planta*, 216, 245-254.

Pratta, G., R. Zorzoli, S. B. Boggio, L. A. Picardi and E. M. Valle (2004). *Glutamine and glutamate levels and related metabolizing enzymes in tomato fruits with different shelf-life*. *Scientia Horticulturae*, 100, 341-347.

Raven, A. J. and F. A. Smith (1976). *Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation*. *New Phytologist*, 76, 415-431.

Robinson, S. A., A. P. Slade, G. G. Fox, R. Phillips, R. G. Ratcliffe and G. Stewart (1991). *The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism*. *Plant Physiology*, 95, 509-516.

Robinson, S. A., G. R. Stewart and R. Phillips (1992). *Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures*. *Plant Physiology*, 98, 1190-1195.

Sakakibara, H., H. Shimizu, T. Hase, Y. Yamazaki, T. Takao, T. Shimonishi and T. Sugiyama (1996). *Molecular identification, and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots*. *Journal of Biochemical Chemistry*, 271, 29561-29568.

Scarpeci, E. E., M. L. Marro, S. Bortolotti, S. B. Boggio and E. M. Valle (2007). *Plant nutritional status modulates glutamine synthetase levels in ripe*

tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. *Micro-Tom*). *Journal of Plant Physiology*, 164, 137-145.

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

Susuki, T., H. Fujiwake and 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*, 2, 839-853.

Zamski, E., O. Shoham, D. Palevitch and A. Levy (1982). *Ultrastructure of capsaicinoid secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (Capsicum annuum L.) cultivars*. *Botanical Gazette*, 148, 1-6.

Capítulo 4

Conclusiones y perspectivas

Las placentas inmovilizadas de chile habanero constituyen un buen modelo para el estudio del metabolismo primario de nitrógeno, ya que los capsaicinoides que se sintetizan en este tejido (Kim *et al.*, 2001; Blum *et al.*, 2003) requieren de precursores provenientes del metabolismo primario, como son los aminoácidos, por lo que en este trabajo, se pretendió tener un acercamiento sobre los procesos metabólicos que conlleva la asimilación del amonio y establecer la relación que existe con la capacidad del tejido placentario para la producción de capsaicinoides.

Los datos que se derivan de este estudio permiten concluir que las placentas inmovilizadas son capaces de realizar el proceso de asimilación de amonio. Sería deseable establecer estudios enfocados en el seguimiento del nitrógeno en la molécula de amonio para comprobar que este elemento asimilado es el que se utiliza para la síntesis de capsaicinoides.

Además, se propone realizar estudios sobre el comportamiento de estas enzimas bajo diferentes condiciones de luz y fuentes nitrogenadas, con el fin de establecer el efecto que estas condiciones pudieran tener en los análisis realizados, puesto que se sabe que estos factores tienen efecto a nivel regulatorio sobre las actividades enzimáticas analizadas.

Otros estudios que nos brindarían un panorama más completo en cuanto a la regulación de estas enzimas serían a través de la realización de estudios moleculares y el uso de inductores del metabolismo secundario.

4.1. Bibliografía

Blum, E., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran (2003). *Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics, 108, 79-86.

Kim, M., S. Kim, S. Kim and B. D. Kim (2001). *Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization*. Molecules and Cells, 11, 213-219.