



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

COMPARACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE
CAPSAICINA Y DIHIDROCAPSAICINA EN CULTIVO DE TEJIDOS *IN*
VITRO DE CHILE SERRANO (*Capsicum annuum* L.) SILVESTRES Y
EXPRESANDO LA PIROFOSFATASA INORGÁNICA SOLUBLE 4 DE
Arabidopsis thaliana

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
SARA CRISTINA BRITO SÁNCHEZ**

México, Ciudad de México
Ciudad Universitaria, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
VOCAL: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
SECRETARIO: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
1ER SUPLENTE: JUAN MANUEL GERMAN ACACIO
2DO SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARIN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:

LABORATORIO 115 CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

PROYECTO FINANCIADO POR: DGAPA IN216815

LA SUSTENTANTE FUE APOYADA POR UNA BECA DE ESTE PROYECTO

ASESOR DEL TEMA:

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SUPERVISOR TÉCNICO:

ING. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

SUSTENTANTE:

SARA CRISTINA BRITO SÁNCHEZ

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al CONACyT, proyecto A1-S-8650 y al DGAPA, proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IN216815 por la beca que me otorgó y por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE ESQUEMAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS EN ANEXOS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXOS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Aspectos generales de <i>Capsicum annuum</i> L. `serrano´	5
2.1.1. Descripción de <i>Capsicum</i> spp.....	5
2.1.1.1. Clasificación taxonómica del género <i>Capsicum</i>	5
2.1.1.2. Descripción botánica de <i>Capsicum annuum</i> L.	6
2.1.2. Importancia cultural y económica del género <i>Capsicum</i> spp. en México.	7
2.1.3. Importancia y uso de los frutos de <i>Capsicum</i> spp.....	8
2.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	9
2.2.1. Aspectos generales del cultivo de tejidos	10
2.2.2. Condiciones para la obtención de células in vitro	11
2.2.3. Tipo de cultivos celulares.....	13
2.2.4. Transformación genética.....	15
2.2.4.1. Métodos de transformación.....	18
2.2.4.1.1. Biobalística.....	19
2.3. Metabolismo de las plantas	20
2.3.1. Factores que influyen en la producción de metabolitos secundarios.	21
2.3.1.1. Estrés salino.	23
2.3.1.2. Estrés por insuficiencia de luz.....	24
2.3.2. Metabolitos secundarios del género <i>Capsicum</i>	24

2.3.2.1. Capsaicinoides.....	25
2.3.2.1.1. Métodos de extracción y análisis	27
2.4. Aspectos generales de las Pirofosfatasas inorgánicas solubles	32
2.4.1. Función del Pirofosfato (PPi) en las plantas	33
2.4.2. Pirofosfatasas en Arabidopsis thaliana	34
III. OBJETIVOS	35
IV. HIPÓTESIS	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Material biológico	37
5.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	38
5.2.1 Desinfección de semillas.....	38
5.2.2 Germinación de semillas y obtención de plántulas en condiciones asépticas	38
5.2.3 Inducción y proliferación de callo	38
5.2.4 Transformación genética por biobalística.....	39
5.3 Medición de proteína y actividad pirofosfatasa de callos	40
5.3.1. Preparación de la muestra	40
5.3.2. Cuantificación de proteína	41
5.3.3. Electroforesis SDS-PAGE	41
5.3.4. Medición de la actividad de pirofosfatasa	43
5.3.5. SDS-PAGE – Inmunoblot.....	44
5.4 Tratamientos de estrés para cultivo de agregados celulares	45
5.5. Curva de crecimiento para cultivo de agregados celulares en tratamientos de estrés	45
5.6. Extracción de metabolitos secundarios y análisis por cromatografía en capa fina (TLC)	46
5.7. Extracción de metabolitos secundarios y análisis usando espectrometría de masas: AxION 2 DSA TOF MS®.....	47
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
VII. CONCLUSIONES	74

VII. PERSPECTIVAS.....	74
IX. REFERENCIAS.....	75
X. ANEXOS	88
Anexo I. Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).....	88
Anexo II. Preparación de balas de tungsteno con DNA para el bombardeo	90
Anexo III. Resultados obtenidos al analizar los extractos obtenidos para diferentes muestras usando el software TOF MS Drive.....	91
Anexo IV. Relación entre la producción de dihidrocapsaicina con respecto a la capsaicina usando el área de los picos correspondientes para cada compuesto	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los pasos requeridos para obtener plantas genéticamente transformadas por medio de biobalística.....	200
Figura 2. Estructuras químicas de algunos capsaicinoides	255
Figura 3. Imagen en la que se muestra la placenta en un fruto de <i>C. annuum</i>	266
Figura 4. Ruta propuesta para la vía que sigue la biosíntesis de la capsaicina en el género <i>Capsicum</i>	288
Figura 5. Estrategias que se han utilizado en el cultivo de tejidos vegetales de <i>Capsicum</i> para mejorar la producción de capsaicinoides.....	29
Figura 6. Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizado por una pirofosfatasa inorgánica soluble dependiente de Mg^{2+}	322
Figura 7. Ruta experimental seguida	366
Figura 8. Mapa general del vector de expresión transitoria pEarleyGate serie 100 usado para la transformación genética de callos de <i>C. annuum</i> L.	377
Figura 9. Plantas de <i>C. annuum</i> L. en condiciones asépticas para la obtención de callo e inducción de callo utilizando como explante el hipocótilo.....	500
Figura 10. Callo obtenido después de realizar subcultivos periódicos en medio de cultivo.	500
Figura 11. Imágenes de microscopia confocal a los 5 días de realizar el bombardeo a células de <i>Capsicum annuum</i> L.	522
Figura 12. Fluorescencia de extractos obtenidos para calcular cantidad de proteína y actividad pirofosfatasa de callos de <i>C. annuum</i> L. WTy 4-YFP.....	533

Figura 13. Resultados para callos de <i>C. annuum</i> L. WT y 4-YFP del contenido de proteína y actividad específica de pirofosfatasa.	544
Figura 14. Gel de electroforesis SDS-PAGE..	555
Figura 15. Inmunoréplica tipo western de extracto proteico soluble de callo de <i>C. annuum</i> L. 4-YFP y WT.	566
Figura 16. Caracterización del crecimiento de callos de <i>C. annuum</i> L. WT en medio líquido, p sometidos a diferentes tratamientos durante 15 días.....	59
Figura 17. Caracterización del crecimiento de callos de <i>C. annuum</i> L. 4-YFP en medio líquido, sometidos a diferentes tratamientos durante 15 días.....	59
Figura 18. Crecimiento de agregados celulares en suspensión en diferentes tratamientos durante 15 días.....	611
Figura 19. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de callos de <i>C. annuum</i> L. WT a 24 horas en contacto con los disolventes.	633
Figura 20. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de callos de <i>C. annuum</i> L. WT a los 3 días en contacto con los disolventes.....	644
Figura 21. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de callos de <i>C. annuum</i> L. 4-YFP a los 3 días de estar en contacto con el disolvente y del medio de cultivo.	666
Figura 22. Estándar de capsaicina analizado con AxION 2 DSA TOF MS®.	700
Figura 23. Relacon entre la producción de capsaicina y dihidrocapsaicina para callos WT y 4-YFP sometidos a diferentees tratamientos.	733

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general por jerarquías taxonómicas para <i>Capsicum</i>	5
Tabla 2. Estudios sobre contenido de capsaicinoides en frutos de diferentes variedades de <i>Capsicum</i>	300
Tabla 3. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados para la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.....	422
Tabla 4. Tratamientos utilizados para inducción de estrés a cultivo de agregados celulares.	455

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Cálculo de la actividad de pirofosfatasa.	444
Esquema 2. Cálculo del contenido relativo de Capsaicina/dihidrocapsaicina.....	711

ÍNDICE DE FIGURAS EN ANEXOS

Figura III-1. Extracto metanólico de placenta de fruto de <i>C. annuum</i> L analizado con AxION 2 DSA TOF MS [®]	911
Figura III-2. Tratamiento Fotoperiodo de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS [®]	922
Figura III-3. Tratamiento Obscuridad de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS [®]	933
Figura III-4. Tratamiento Fotoperiodo + NaCl de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS [®]	944
Figura III-5. Tratamiento Obscuridad + NaCl de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS [®]	955

Figura III-6. Extractos realizados al medio de cultivo líquido de callos WT de <i>C. annuum</i> L. analizado con AxION 2 DSA TOF MS®	966
Figura III-7. Tratamiento Fotoperiodo de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®	977
Figura III-8. Tratamiento Oscuridad de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®	988
Figura III-9. Tratamiento Fotoperiodo + NaCl de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®	99
Figura III-10. Tratamiento Oscuridad + NaCl de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®	1000
Figura III-11. Extractos realizados al medio de cultivo líquido de callos 4-YFP de <i>C. annuum</i> L. analizados con AxION 2 DSA TOF MS®	1011

ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXOS

Tabla I- 1. Composición de sales con macro- y micronutrientes	888
Tabla I- 2. Vitaminas originales	89
Tabla I- 3. Vitaminas B5 para medio MSB5.	889
Tabla IV- 1. Resultados obtenidos para calcular la relación entre capsaicina y dihidrocapsaicina analizados con AxION 2 DSA TOF MS®	1022

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
GFP	Green Fluorescent Protein
BFP	Blue Fluorescent Protein
CFP	Cyan Fluorescent Protein
YFP	Yellow Fluorescent Protein
PEG	Polietilenglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
He	Helio
CO ₂	Dióxido de carbono
N ₂	Nitrógeno
NO ₃ ⁻	Nitrato
SO ₄ ²⁻	Sulfato
NH ₄ ⁺	Amonio
K ⁺	Potasio
Ca ²⁺	Calcio
Cl ⁻	Cloro
Na ⁺	Sodio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
PO ₄ ²⁻	Fosfato
CS	Capsaicinoide Sintasa
TLC	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MS	Espectrometría de masas
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía líquida

HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
¹ H NMR	Resonancia magnética nuclear de protones
APCI	Ionización química a presión atmosférica
PPi	Pirofosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
ADP	Adenosín Difosfato
UTP	Uridina Trifosfato
UDP	Uridina Difosfato
AtPPa1	Pirofosfatasa inorgánica soluble 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtPPa4	Pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtPPa6	Pirofosfatasa inorgánica soluble 6 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
%	Porcentaje
PPiasas	Pirofosfatasa inorgánicas
siPPasas	Pirofosfatasa inorgánicas solubles
Mg (II) / Mg ²⁺	Magnesio
Mn (II)	Manganeso
NaCl	Cloruro de sodio
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
l	Litro
ml	Mililitro
µl	Microlitro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
µm	Micrómetro
M	Molar
mM	Milimolar
v	Volumen
h	Hora
VI	

min	Minuto
°C	Grados Celsius
psi	Libras por pulgada cuadrada
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
mV	Milivolt
kDa	Kilodalton
WT	Callo de <i>Capsicum annuum</i> L. silvestre
35S::AtPPasa4-YFP	Plásmido con promotor 35 S unido a pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y a proteína fluorescente color amarillo
4-YFP	Callo de <i>Capsicum annuum</i> L. transformado con plásmido
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
MSB5	Medio MS con mezcla de vitaminas B
MS-TOF	Espectrometría de Masas con detección por tiempo de vuelo
AxION 2 DSA	Análisis directo de muestra
Tris	Trisaminometano
HCl	Ácido clorhídrico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	Tetrametiletilendiamina
VM	Verde de malaquita

RESUMEN

El pirofosfato (PPi) es un compuesto esencial para las plantas y sus niveles se mantienen constantes aún en condiciones de estrés. Este compuesto es hidrolizado por las pirofosfatasas (PPasas), y entre estas enzimas, las Pirofosfatasas inorgánicas solubles (PPa) son constitutivas. Los genomas vegetales codifican para varias copias de éstas, pero la ausencia o sobreexpresión de alguna de las isoformas puede causar cambios en el metabolismo celular afectando su fenotipo, incluso, su ausencia puede ser letal, o alterar la respuesta de las plantas al estrés. Además de estos datos, sus funciones en el metabolismo de las plantas no son bien conocidas.

Para poder relacionar a las PPa con el metabolismo secundario en plantas se utilizó como modelo el chile (*Capsicum spp.*) ya que es uno de los vegetales más importantes a nivel mundial debido a su sabor característico, único y produce unos compuestos llamados capsaicinoides. Estos son metabolitos secundarios de la planta que se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta del fruto, de estos los que más se producen son la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Debido a lo anterior, en este trabajo se analizaron células de *C. annuum* L. las cuales fueron sometidas a una transformación genética para expresar una pirofosfatasa inorgánica soluble de *A. thaliana*.

El objetivo de este trabajo fue el expresar la pirofosftasa soluble 4 de *A. thaliana* (AtPPasa4) y observar si esta expresión tiene impacto en el metabolismo secundario de las células de *C. annuum* L. al observar cambios en la producción de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Este trabajo se logró utilizando el cultivo de tejidos vegetales para obtener callo de *C. annuum* L. a partir de hipocótilo, con lo cual se obtuvieron células con características adecuadas para llevar a cabo una transformación genética. Por medio de biobalística, se obtuvieron células que expresaban la pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de *A. thaliana* (AtPPasa4). Estas células se sometieron a un tratamiento de selección por

medio de subcultivos en un medio con herbicida, después se realizó un inmunoblot para confirmar que las células transformadas expresaran la AtPPasa4.

Debido a que el callo de estas células produce muy poca cantidad de capsaicinoides, se modificaron las condiciones de incubación tanto de células silvestres (WT) como transformadas (4-YFP) para someterlas a diferentes tratamientos de estrés como fue estrés salino, insuficiencia de luz y la combinación de ambas condiciones y, de esta forma estimular una mayor obtención de metabolitos secundarios, de esta forma comprobar si hay cambios en la relación entre capsaicina y dihidrocapsaicina. La extracción de los metabolitos se llevó a cabo con diferentes disolventes y los extractos obtenidos se analizaron con una técnica analítica muy sensible llamada Espectrometría de Masas con detección por tiempo de vuelo (MS-TOF) con inyección directa (AxION 2 DSA TOF MS®).

Con lo cual, se logró la obtención de células de *C. annuum* L. transformadas genéticamente y la detección efectiva de capsaicina y dihidrocapsaicina en los extractos obtenidos, lo cual, nos indicó que hay una posible alteración en los mecanismos que regulan la acumulación de estos metabolitos secundarios en células transformadas que expresan una PPa heteróloga, ya que incluso los agregados celulares de los cultivos de células transformadas (4-YFP) parecen más tolerantes a condiciones de estrés impuesto por el cultivo al observarse la presencia reducida de oxidación, pero se necesitan hacer estudios más a fondo para confirmarlo.

I. INTRODUCCIÓN

Las pirofosfatasas (PPasas; EC. 3.6.1.1) son proteínas presentes en todos los organismos, las cuales hidrolizan en pirofosfato, en dos moléculas de fosfato (Heinonen, 2001). El pirofosfato (PPi) es esencial para el crecimiento de las plantas y sus niveles a nivel celular se mantienen constante aún en condiciones de estrés (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2018). por lo que las PPasas inorgánicas solubles son enzimas esenciales (Kornberg, 1962). Además de su papel en la reutilización del fosfato, sus funciones en el metabolismo de las plantas no son bien conocidas. Estudios anteriores indican que las PPasas inorgánicas solubles de plantas (PPa) son constitutivas y que los genomas vegetales codifican para varias copias de estas (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007). Además, la ausencia o sobreexpresión de PPa puede causar cambios en el metabolismo celular afectando su fenotipo y su ausencia puede ser letal, o alterar la respuesta de las plantas al estrés (Geigenberger *et al.*, 1996; Hernández-Domínguez, *et al.*, 2012); es por ello que se considera posible una relación entre las PPa y el metabolismo secundario de las plantas (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2018). *A. thaliana* es la planta que más se ha estudiado y se sabe que su genoma codifica para 6 isoformas de PPasas, (AtPPasa1 – AtPPasa6), de las cuales se ha encontrado que la expresión de la isoforma 4 (AtPPasa4) responde a condiciones de estrés (Lan *et al.*, 2012).

El chile (*Capsicum spp.*) es uno de los vegetales más importantes a nivel mundial debido a su sabor característico y único, el cual es producido por unos compuestos llamados capsaicinoides, los cuales son metabolitos secundarios de la planta que se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta del fruto, de estos compuestos la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los que se sintetizan en mayor cantidad siendo la capsaicina la que se sintetiza más (Kehie *et al.*, 2014). De todas las especies que se conocen de chiles, *C. annum* L. es la de mayor producción y consumo y entre ellos, la variedad 'serrano' es una de las más importantes (Hernández Verdugo, 2014) y posee alto grado de picor (producción de capsaicinoides).

El uso de técnicas como el cultivo de tejidos vegetales, nos brinda una alternativa para la obtención de células vegetales transformadas genéticamente y para el análisis del

metabolismo celular de las plantas (Walker & Rapley, 2008), de esta forma en el presente trabajo podremos llevar a cabo la obtención de células vegetales de *C. annuum* L. que expresen la pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de *A. thaliana* (AtPPasa4) por medio de biobalística. El objetivo de este trabajo es estudiar si la expresión de la AtPPasa4 tendrá impacto en el metabolismo secundario de las células del chile serrano, además de modificar las condiciones de incubación de estas células al someterlas a diferentes tratamientos de estrés y comprobar si hay una alteración en la producción de metabolitos secundarios. Así mismo se al compararan cambios en la producción de la relación entre capsaicina y dihidrocapsaicina por medio de técnicas analíticas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos generales de *Capsicum annum* L. 'serrano'

2.1.1. Descripción de *Capsicum* spp.

2.1.1.1. Clasificación taxonómica del género *Capsicum*

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae, que corresponde a una de las familias más grandes de angiospermas, ya que en ella se agrupan alrededor de 102 géneros y 2,460 especies. Entre estas podemos encontrar diversas plantas que tienen importancia económica incluyendo a la papa (*Solannuum tuberosum*), el jitomate (*Solannuum lycopersicon*), el tomate verde (*Physalis philadelphica*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y los chiles (*Capsicum spp*) (Martínez *et al.*, 2011). Las plantas de este último clado comparten características comunes a la familia y otras son específicas del género (Long-Solís, 2012). En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de *Capsicum*

Tabla 1. Clasificación general por jerarquías taxonómicas para *Capsicum*.

<i>Jerarquías</i>	
<i>Reino</i>	Plantae
<i>Subreino</i>	Tracheobionta
<i>División</i>	Magnoliofita
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Subclase</i>	Asteridae
<i>Orden</i>	Solanales
<i>Familia</i>	Solanaceae
<i>Género</i>	<i>Capsicum</i>

Tomado y adaptado del artículo Advances and perspectives about the study of the origin and genetic diversity of *Capsicum* spp. (Pérez, Castañón, & Ramírez, 2015).

Se conocen alrededor de treinta especies en este género, de ellas cinco son las que se han domesticado y corresponden a *Capsicum annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* (McLeod *et al.* 1982; Ibiza, *et al.* 2012; Wang & Bosland, 2006).

Siendo *C. annuum* la especie más conocida, cultivada y extendida en todo el mundo (SAGARPA, 2017; Hernández Verdugo, 2014).

También, se puede hacer otra separación de género, basada en el color de las flores, característica que ha resultado constante y confiable para la clasificación y ha sido confirmada por estudios bioquímicos, fitogeográficos, morfológicos y electroforéticos (Zhigila *et al.*, 2014, Kraft *et al.*, 2013; Heiser & Pickersgill, 2012; Montes, 2010; Pickersgill, 1971).

2.1.1.2. Descripción botánica de *Capsicum annuum* L.

La especie *C. annuum* es una planta anual, pero en zonas tropicales puede ser perenne, su tamaño va de los 35 a 75 cm de alto según las condiciones ambientales en las que crece y del tipo de fruto que da. La raíz es profunda, formada por una raíz principal axonomorfa de la cual salen raíces adventicias que horizontalmente llegan a medir de 0.5 a 1 m de longitud. Su tallo es glabrescente y ramificado con hojas aovadas, pecioladas, solitarias o por pares que van de los 4 a los 12 cm de largo y de 1.5 a 4 cm de ancho (Kraft *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2011).

La flor sale de pedúnculos solitarios y colgantes que nacen de la axila de las hojas con el tallo, está formada por una corola aproximadamente de 1 cm de tamaño con 5 a 7 pétalos color blanco lechoso, sus anteras son color azul o morado y tiene un cáliz dentado con 5 a 7 costillas principales, es monoica, es decir, que tiene los dos sexos incorporados en una misma flor, por lo que es capaz de la autopolinización (Zhigila *et al.*, 2014, Kraft *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2011; Montes, 2010).

El fruto puede variar en tamaño y colores que van desde verde o amarillo en el estado inmaduro a rojo, amarillo o café en el estado maduro. Dicho fruto es una baya hueca con 2 a 4 tabiques incompletos en los que se alojan las semillas densamente empaquetadas y que son en forma de embrión redondeado con colores que van desde crema a amarillo y tamaño variable, dependiendo del tamaño del fruto.

En esta especie se pueden encontrar aquellas plantas que dan frutos muy picantes hasta aquellos frutos que se consideran dulces (Long-Solís, 2012).

2.1.2. Importancia cultural y económica del género *Capsicum* spp. en México.

El nombre de *Capsicum* proviene del griego *kapsakes* que significa cápsula, pero comúnmente el fruto es conocido como 'chile' palabra española modificada del náhuatl 'chilli' (Long-Solís, 2012; Martínez *et al.*, 2011).

El origen y domesticación del género *Capsicum* spp. fue en Mesoamérica ya que no se conocen registros de este género en otras partes del mundo antes de la conquista, siendo México el centro de diversificación y domesticación de *C. annuum* y por lo tanto uno de los países que más lo produce y consume ya que el uso del chile se ha dado desde tiempos prehispánicos. Este fruto era utilizado como alimento, medicamento, castigo, moneda y material de tributo (Montes, 2010). Además, es la especie con la mayor cantidad de las variedades cultivables y con la distribución más amplia en el mundo (Hernández Verdugo, 2014; Nicolai *et al.*, 2013).

En México, el cultivo de chile ocupa el octavo lugar a nivel nacional en ocupación de área agrícola y genera ganancias alrededor de los 13 mil millones de pesos anualmente, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas, del cual se exportan cerca de 900 mil toneladas de chiles frescos, secos y en preparaciones a países como Estados Unidos, Malasia, España y Tailandia. Se cultivan más de 140 mil hectáreas de este fruto (SAGARPA, 2017).

Actualmente existen más de cuarenta variedades de chiles de la especie *C. annuum* que se comen frescos o deshidratados. Las variedades mas cultivadas que se comen frescas son, el chile jalapeño, serrano, pimiento morrón, poblano, chilaca, Anaheim, mirasol, soledad, de árbol y piquín; y aquellos deshidratados o secos son, el chile ancho, guajillo, mirasol, colorado, pasilla, de árbol, puya y costeño (Caribe, 2010).

En el caso del chile serrano es la segunda variedad en producción en México. Se ocupa poco en estado seco, pero el fruto fresco es usado para la elaboración de salsas y de una diversidad amplia de platillos. Se cultiva en 25 estados y las principales zonas productoras son: San Luis Potosí, Nayarit, Hidalgo, Tamaulipas, Veracruz, Puebla, Nuevo León, Coahuila, Jalisco y Sinaloa (Aguirre-Hernández & Muñoz-Ocotero, 2015).

2.1.3. Importancia y uso de los frutos de *Capsicum* spp.

La alta demanda mundial del chile se debe, además de ser utilizados como parte de los alimentos para el hombre, a que se utiliza para la elaboración de diversos productos, como medicamentos, pomadas, cosméticos, insecticidas a base de plantas y otros.

Evolutivamente se considera que la pungencia del chile se seleccionó por sus ventajas como una defensa de estas plantas contra mamíferos herbívoros, pero esta característica lo hizo atractivo para el hombre (Aguirre-Hernández & Muñoz-Ocotero, 2015). Como con muchas otras especies cultivables el hombre ha influido en la diversificación de la especie generando un proceso de coevolución de diversas especies de *Capsicum* y ciertamente la especie *C. annum* L. ha sido, históricamente, la de mayor importancia económica, lo que por tanto, llevó a su mayor diversificación entre las culturas humanas modernas (Luna-Ruiz *et al.*, 2018).

Los capsaicinoides se forman de manera natural y se encuentran en el fruto del chile. Estos compuestos son alcaloides con propiedades pungentes (picantes) debido a su afinidad por los receptores al calor, los más abundantes son la capsaicina y dihidrocapsaicina, aunque existen otros compuestos de este tipo en menor cantidad (Srinivasan, 2016; Asnin & Park, 2015; Sganzerla *et al.*, 2014). Los capsaicinoides son usados como repelente de herbívoros en la agricultura, en la ganadería contra mamíferos depredadores; en la industria tabacalera, para mejorar el sabor de ciertas mezclas de tabaco; en la industria farmacéutica, como analgésicos; así como en la fabricación de aerosoles defensivos. Tienen propiedades medicinales, como estimulante de la digestión y de la liberación de endorfinas, además de ser uno de los analgésicos naturales de uso

tópico más potentes conocidos (Srinivasan, 2016). Estos compuestos no suelen usarse en estado puro, ya que son usados como oleorresinas que están compuestas principalmente de aceite esencial, resinas solubles, ácidos grasos no volátiles, pigmentos terpenoides, flavonoides y capsaicinoides.

Además de los capsaicinoides, el chile es el vegetal con mayor concentración de ácido ascórbico que se conoce, ya que los frutos frescos llegan a contener más del doble de vitamina C por gramo de peso fresco que frutos como el limón o la naranja y casi seis veces más que la toronja. Esta vitamina actúa como coenzima en la vía de modificación de la colágena y por sus propiedades antioxidantes participa de manera central en la contención del estrés oxidativo. Su papel antioxidante lo hace un importante factor preventivo del cáncer por su capacidad de inhibir la síntesis de compuestos N-nitrosos en el estómago y por estimular al sistema inmune (Pérez *et al.*, 2007).

Los frutos contienen abundantes compuestos coloridos como los carotenoides que corresponden a la capsantina y capsorrubina que confieren la coloración naranja o rojiza y esto se utiliza como una fuente de colorantes para alimentos y cosméticos de origen natural (Wahyuni *et al.*, 2013) Entre los carotenoides de importancia se encuentra además el β -caroteno, que es precursor de la vitamina A (Monforte-González *et al.*, 2010; Wahyuni *et al.*, 2011; Wahyuni *et al.*, 2013).

También, se ha comprobado que el consumo de este fruto estimula el flujo de la saliva y la secreción de jugos gástricos que elevan la digestibilidad de proteínas en el maíz y el frijol; de modo que la típica tríada alimenticia mexicana de maíz, frijol y chile, integra un complejo de componentes altamente alimenticios que se equilibran y refuerzan entre sí (Hernández & Muñoz, 2015).

2.2 Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que ayuda a la propagación de material vegetal *in vitro*. Estas técnicas hacen posible el cultivar células, tejidos, órganos e incluso protoplastos (células desprovistas de pared celular). A partir de dichos cultivos

se pueden obtener plantas completas en condiciones asépticas, libres de microorganismos (hongos, bacterias) y virus (Segretín, 2006; Calva & Pérez, 2005). Estas técnicas se basan en el principio de la *totipotencialidad celular*. La cual se define como la habilidad que tiene una célula vegetal para regenerar una planta completa a partir de una célula inicial, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos (Vasil & Vasil, 1972). Esta capacidad, se debe a que contiene la copia integral del material genético de la planta de la que proviene (lo cual depende poco de su función o posición en la planta que la originó) y a que los procesos de diferenciación celular no se han fijado de manera irreversible. Estas técnicas hacen uso de medios de cultivo nutritivos asépticos (estériles) y con condiciones ambientales controladas de luz, temperatura, etc. (Segretín, 2006).

2.2.1. Aspectos generales del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales nos ofrece ventajas ya que permite la reducción en los tiempos de propagación y crecimiento de material vegetal, casi siempre con reducción del espacio destinado a la propagación de plantas en comparación del método tradicional que es en suelo (Segretín, 2006).

El material resultante se puede emplear con fines de mantenimiento de germoplasma, con fines de investigación o con fines agrícolas y comerciales; es decir, esta técnica tiene numerosas aplicaciones, como son:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil reproducción por semilla o vegetativa y para especies amenazadas.
- Clonación de individuos con características agronómicas uniformes y deseables, que resulten accesibles además durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Germinación de semillas y producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).

- Biosíntesis y obtención de metabolitos secundarios.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas).
- Producción de haploides.
- Investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Loyola-Vargas & Vasquez-Flota, 2006; Segretín, 2006).

2.2.2. Condiciones para la obtención de células *in vitro*

Para establecer células vegetales de manera *in vitro*, se disectan órganos o fragmentos de tejido de la planta madre llamados explantes, los cuales pueden ser tallos, hojas, semillas, ápices, meristemas, anteras, raíces, entre otros, ya sea de plantas germinadas de manera aséptica o de plantas crecidas en tierra. Si se trata de plantas expuestas al medioambiente natural, deben ser previamente pasadas por tratamientos de desinfección, para eliminar los organismos que pudiera encontrarse en el explante a usar, ya que, de no hacerlo, causarían contaminación microbiológica del cultivo vegetal y casi siempre su muerte.

Los explantes son sembrados en medios de cultivo nutritivos sólidos o semisólidos que son gelificados con agentes como el agar, Gelrite®, Phytigel® entre otros y se ponen en incubación bajo condiciones físicas y fisicoquímicas controladas (Vasil & Vasil, 1972; Walker & Rapley, 2008; Segretín, 2006; Glase, 1990).

Cuando se escoge el explante para el inicio de los cultivos celulares *in vitro*, casi siempre se utilizan tejidos que contengan células meristemáticas (zonas de la planta con alta división celular y con células no diferenciadas), pero también se debe tomar en cuenta la edad de la planta. En general, el potencial de regeneración se reduce con el envejecimiento de la planta, aunque también está influido por el genotipo, y las condiciones fisicoquímicas, nutricionales y ambientales en las que crece dicha planta (Segretín, 2006; Calva & Pérez, 2005).

Cada organismo vegetal tiene diferencias en los requerimientos para su crecimiento de forma óptima, es por esto, que para obtener células de forma *in vitro*, se debe tomar en

cuenta la formulación del medio de cultivo. Dichos medios deben contener los elementos nutritivos esenciales, los cuales se pueden dividir básicamente en cinco grupos de ingredientes:

- Fuente de carbono: Se utiliza azúcar como la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón o melazas.
- Fuente de nitrógeno: El nitrógeno puede ser administrado en forma de sales de nitrato, nitrito y amonio, pero también se ha utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La relación entre nitrato y amonio tiene particular importancia y el medio Murashige y Skoog (1962), el cual es el más utilizado, tiene un alto contenido de nitrógeno y una alta relación nitrato / amonio.
- Vitaminas: Las vitaminas son compuestos que requieren las plantas. Como los organismos vegetales son autótrofos, son capaces de producir todos los compuestos esenciales por sí mismos, sin embargo, las condiciones del cultivo y al eliminar la organización de los órganos de la planta puede generar deficiencias en la producción de alguna vitamina y la dependencia parcial o total del cultivo de dicho factor. Las vitaminas que más se usan en los medios de cultivo son la tiamina (Vit. B₁), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (Vit. B₆) y el mioinositol. Estas cuatro vitaminas se encuentran en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).
- Reguladores del crecimiento: Como todos los organismos vivos, las células vegetales responden a mensajeros químicos endógenos y de tipo hormonal que se conocen como fitorreguladores del crecimiento. En los cultivos de tejidos, estos reguladores se emplean como estrategia para inducir la dediferenciación celular o su rediferenciación, según se requiera. Existen diversos tipos de fitorreguladores importantes para el crecimiento vegetal, pero en cultivo de tejidos, los más usados pertenecen a las categorías de las auxinas y citocininas. El regulador más usado para la inducción y mantenimiento de tejido calloso es, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es debido a que es una auxina que suprime severamente la organogénesis.

- Nutrientes inorgánicos: Según su requerimiento, los nutrientes minerales para las plantas se clasifican en macro y micronutrientes. Todos los medios de cultivos requieren nitrógeno y carbono, como se mencionó arriba, pero también requieren fósforo, potasio y azufre. Dichos minerales se encuentran en el medio MS en concentración milimolar y se consideran macronutrientes. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son los requeridos en cantidades micromolar o submicromolar y son utilizados por las células como cofactores enzimáticos o componentes estructurales menores. Por ejemplo, el molibdeno es esencial para la enzima nitrato reductasa y el magnesio para algunas cinasas (Walker & Rapley, 2008; Thorpe *et al.*, 2008), pero además se requiere Boro, Silicio, Zinc, Hierro, Calcio, Magnesio y otros más. El medio MS contiene una combinación compleja de sales que aseguren disponibilidad de estos micronutrientes (Murashige y Skoog, 1962).

2.2.3. Tipo de cultivos celulares

Existen diferentes tipos de técnicas para manipular las células vegetales y con ellas se pueden obtener diferentes respuestas como pueden ser:

- Cultivos de callos.
- Cultivos de células en suspensión y agregados celulares.
- Obtención de embriones somáticos. Si la obtención de los embriones pasa previamente por la formación de callo el proceso se considera embriogénesis indirecta, pero si los embriones se generan sobre el explante se considera embriogénesis directa.
- Obtención de protoplastos.
- Obtención de órganos. Si éstos se obtienen a partir de la formación de callo se dice que la organogénesis es indirecta, y si la formación de órganos se da directamente del explante se dice que la organogénesis es directa.

2.2.3.1. Obtención de callo

El término callo se refiere a aquellas células vegetales del parénquima producidas en respuesta a una lesión. Este tejido está presente en diferentes órganos de las plantas superiores y, por medio de una herida, se induce la formación de una masa de células indiferenciadas que tienen una proliferación desorganizada y generalmente son friables, es decir, que son susceptibles a ser disgregados en fragmentos pequeños (Segretín, 2006; Vasil & Vasil, 1972; Walker & Rapley, 2008; Loyola-Vargas & Vasquez-Flota, 2006).

Para lograr la obtención de callo se utilizan explantes de diversas partes la planta y se colocan en un medio nutritivo gelificado con la adición de reguladores de crecimiento que varían en concentración y tipo según el tejido que se desea inducir, siendo recurrente el uso, como se mencionó, de auxinas y citocininas. Pero posiblemente, la auxina sintética 2,4-D es la más empleada (Loyola-Vargas & Vasquez-Flota, 2006).

Una vez obtenido el callo, puede ser cultivado indefinidamente por medio de transferencia periódica a medio fresco (subcultivo) y puede ser inducido a la rediferenciación por medio de cambios en el contenido de reguladores de crecimiento en el medio, para así formar brotes de raíces, tallos (organogénesis) o embriones (embriogénesis), que luego pueden mantenerse hasta regenerar una planta entera. (Calva & Pérez, 2005).

2.2.3.2 Cultivo de agregados celulares y células en suspensión

Este tipo de cultivo exige que el callo obtenido sea friable pero aún funcionales (Loyola-Vargas & Vasquez-Flota, 2006), esto se logra al colocarlos en medios nutritivos líquidos y mantenerlos en agitación constante durante la incubación (50-200 rpm, en un agitador orbital) lo que va a provocar que las células se disgreguen en células individuales y pequeños cúmulos que van a estar en contacto directo con los nutrientes del medio de cultivo. En general, en estas condiciones las células crecen de manera más homogénea y rápida (Walker & Rapley, 2008; Thorpe *et al.*, 2008).

Idealmente se busca la obtención de células individuales, pero normalmente se forman agregados celulares que constan de grupos de 20 a 100 células (100-1,000 μm) y se deben hacer subcultivos cuando las células estén al final de la fase de crecimiento exponencial para evitar la falta de homogeneidad y reducir inestabilidad de los cultivos.

Estos cultivos se pueden utilizar en la investigación de bioquímica y de fisiología celular, así como para el estudio del crecimiento, el metabolismo, la biología molecular y experimentos de ingeniería genética y en la producción de metabolitos secundarios a pequeña, media o gran escala (Walker & Rapley, 2008; Loyola-Vargas & Vasquez-Flota, 2006).

2.2.4. Transformación genética

La transformación genética es un proceso que ocurre de forma natural en un organismo cuando acepta DNA propio o ajeno y lo incorpora a su genoma. Si el fragmento incorporado resulta funcional o bien si se inserta en un sitio que cause alteración de la funcionalidad del DNA propio, el genoma se verá alterado, es decir, habrá un cambio en el genotipo, que puede asociarse o no a variación en las características fenotípicas del organismo modificado (Mubeen *et al.*, 2016; Yelda, 2012; Hansen & Wright, 1999).

La biotecnología hace uso de este tipo de procesos para llevar a cabo la transformación genética dirigida en plantas, buscando introducir ciertas características deseadas (Mubeen *et al.*, 2016). Con ello, se logra acortar los tiempos de obtención de plantas por los métodos tradicionales del fitomejoramiento clásico, tales como las retrocruzas, la selección y la hibridación, pues se pueden seleccionar genes específicos que le den a la planta características agronómicas de interés para el hombre, como puede ser un crecimiento más rápido, obtención de frutos con mayor tamaño, tolerancia o resistencia a factores abióticos como sequías o temperaturas adversas para la planta ya sea de frío o calor, así como también resistencia a enfermedades virales, bacterianas o fúngicas, así como plagas de insectos, arácnidos y nemátodos, entre otros factores que pudieran afectar e incluso matar a las plantas de interés para el hombre (Mubeen *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2003).

Las principales diferencias entre la reproducción agrícola tradicional y los métodos de transformación genética estriban en la velocidad, precisión, confiabilidad y alcance de las modificaciones ya que la ocurrencia natural de ciertas variaciones puede ser tan baja, que la selección de una planta con las características que presenta una planta transformada podría tomar miles e incluso millones de años. Una transformación genética alcanza éxito, cuando la incorporación del gen nuevo en el genoma de la planta receptora es estable, lo que quiere decir que el gen asociado es heredable y se va a conservar en las siguientes generaciones (Mubeen *et al.*, 2016).

Muchos son los factores a considerar para elegir el o los genes a transferir y en el caso de los métodos de cultivo de tejidos uno de ellos es la elección del tejido que se va a transformar, el cual que debe ser competente para la transformación y capaz de propagación y posterior regeneración.

Por otro lado, el fragmento de DNA a transferir debe contener características que le confieran funcionalidad en la célula receptora, es decir debe contar con:

A) Una región promotora que sea reconocida por la maquinaria de regulación de la expresión genética presente en la célula receptora. Esta es una región de DNA no codificante que se encuentra río arriba de la región codificante del gen que queremos transferir y que controla la frecuencia, la temporalidad y el tipo celular en que el gen puede ser transcrito para dar lugar a los cambios fenotípicos deseados. Los promotores de plantas se pueden clasificar según el tipo de control para la expresión génica, pueden ser constitutivos o inducibles y pueden expresarse en todos los linajes celulares o ser específicos de un tejido, e incluso de un tipo celular particular dentro del tejido (Mubeen *et al.*, 2016).

B) Una región terminadora de la transcripción. Si el gen cuenta con un promotor funcional se puede transcribir, pero para que la transcripción se regule correctamente es necesario que exista una región río abajo del gen que permita a la maquinaria transcripcional reconocer que la transcripción debe terminar. La combinación promotor-terminador es a

menudo relevante para favorecer una expresión génica eficiente del gen introducido (Nagaya *et al.*, 2010).

C) Región transcribible. Esta región se encuentra contenida entre el promotor y el terminador y es la que será copiada por la maquinaria nuclear para dar lugar a un transcrito primario de RNA. Dicho transcrito debe ser funcional, según el fin para el que se introdujo, lo cual implica que posee características reconocibles para la maquinaria celular que le permiten ser modificado, reconocido y transportado al sitio en el que ejerce su función (Nelson & Cox 2017). Por ejemplo, si se trata de un gen que condifica para la síntesis de una proteína, deberá contar con una región inicial (5'-UTR) para recibir el Capuchón o CAP, seguido de una secuencia característica para su interacción con el aparato de traducción. Además, debe contener una región final (3'-UTR) para recibir la adición de una extensión de poliadeninas llamada cola de poliA, que también es esencial para su transporte al citoplasma y su traducción a proteína. La región codificante (CDS) debe además poseer un uso de codones que sea compatible con la célula vegetal y, en caso de contar con regiones que interrumpen la codificación (intrones), estos deben tener señales adecuadas para que la célula los remueva correctamente.

Debido a que la transformación es un fenómeno azaroso, no todas las células se transforman por igual y, de hecho, la frecuencia de transformación suele ser baja. Por ello, se debe hacer una selección de células transformadas, para lo cual se utilizan agentes de selección que permite diferenciar las células transgénicas de las no transformadas. Es decir, generalmente, además del gen que codifica para la característica deseada, se suelen introducir genes de resistencia a antibióticos como la higromicina, kanamicina, geneticina o a herbicidas como bialafos o glifosato (Gutiérrez *et al.*, 2003). Este gen permite usar el antibiótico o el herbicida para eliminar a las células no transformadas y recuperar aquellas que resultaron genéticamente modificadas.

Frecuentemente, se cuenta con un gen reportero que funciona como un indicador del nivel de expresión de una proteína. Una manera de hacer esto es crear un CDS artificial que codifique para una proteína quimérica que presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés y la de la proteína reportera, de tal manera, que ambas mantengan

su plegamiento y funcionalidad. Así es posible rastrear al reportero en el nuevo huésped y de esta forma nos informa si el gen de interés transferido se ha integrado o no al genoma tratado y cuando o donde se expresa. Es decir, nos permiten monitorear la expresión activa de genes e incluso en algunos casos, poder monitorear la actividad que tienen proteínas de interés. Entre los reporteros más utilizados están los genes que codifican para proteínas fluorescentes, genes que codifican para la proteína luciferasa y enzimas como la beta glucuronidasa o la beta galactosidasa, estas dos últimas provenientes de *Escherichia coli* (Mubeen *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2003). En el caso de las proteínas fluorescentes, estas son tomadas de organismos marinos y suelen estar constituidas por 230 aminoácidos aproximadamente, presentando coloraciones diversas que se pueden observar en el espectro visible y ultravioleta. La más usada en la investigación y la primera en descubrirse fue la proteína verde fluorescente llamada GFP (por sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein), se obtuvo de la medusa *Aequorea victoria* (Welter, 2008). Con el paso del tiempo ha sido modificada para producir variantes que emiten en regiones del azul (BFP), azul claro (CFP), amarillo (YFP) entre otros, y, cada una tiene su rango en el espectro máximo de emisión, en el caso de la proteína YFP su espectro máximo de emisión es de 521 a 550 nm (Pérez & Becu-Villalobos, 2009).

2.2.4.1. Métodos de transformación.

Existen diferentes métodos para llevar a cabo una transformación genética en plantas y se dividen en métodos físicos y métodos basados en vectores biológicos (Mubeen *et al.*, 2016):

- Métodos físicos: el bombardeo de micropartículas (biobalística); electroporación de protoplastos y de tejidos; microinyección; sonicación; transformación de protoplastos mediado por polimeros como el polietilenglicol (PEG) o el polivinilpirrolidona (PVP) y/o por fusógenos lipídicos y la transferencia usando obleas de siliconas como el carburo de silicio.
- Vectores biológicos; los cuales utilizan bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* y el uso de sistemas basados en virus vegetales.

Los métodos más comunes para la transformación de plantas son el uso de *Agrobacterium* y la biobalística (Calva & Pérez, 2005; Hansen & Wright, 1999).

2.2.4.1.1. Biobalística.

La biobalística es una técnica de transferencia directa de DNA en biotecnología vegetal. Como se observa en la Figura 1, esta técnica consiste en el uso de micropartículas de oro o tungsteno (0.4 – 2.0 μm) recubiertas con el DNA que se utilizará para llevar a cabo la transformación genética, los tejidos vegetales se colocan en placas que contienen medio de cultivo sólido; para introducir el DNA externo en las células vegetales, las micropartículas recubiertas se cargan en una pistola y se aceleran hasta una velocidad alta, ya sea mediante la energía electrostática liberada a partir de una gota de agua expuesta a alta tensión o utilizando gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO_2 o N_2). Se pueden bombardear suspensiones de células vegetales, cultivos de callos o tejidos. Los microproyectiles penetran en las paredes y membranas celulares de la planta. A medida que los microproyectiles ingresan a las células, se libera el DNA externo de la superficie de la partícula el cual puede ser empleado por la célula para su incorporación al genoma, o bien ser degradado (Yelda, 2012).

La integración del DNA en el genoma de la planta es la etapa menos eficiente en la transformación, pues solo una pequeña proporción de las células que reciben DNA se transforman de manera estable. El DNA que ingresa a la célula y no es integrado puede expresarse durante un corto tiempo (expresión transitoria), pero eventualmente se degrada por nucleasas. A pesar de ser efímera, la expresión transitoria puede ser aprovechada y ha permitido comprender la regulación de ciertos genes (Altpeter *et al.*, 2005).

La transformación por biobalística es aplicable a un amplio rango de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, además cualquier tejido puede ser utilizado para llevar a cabo un bombardeo, desde tejidos diferenciados bombardeados in planta, como tejidos u órganos disectados y tejidos desdiferenciados como callos y células en suspensión. Sus desventajas son el daño tisular que causa estrés a la célula, así como la baja eficiencia de transformación (Mubeen *et al.*, 2016).

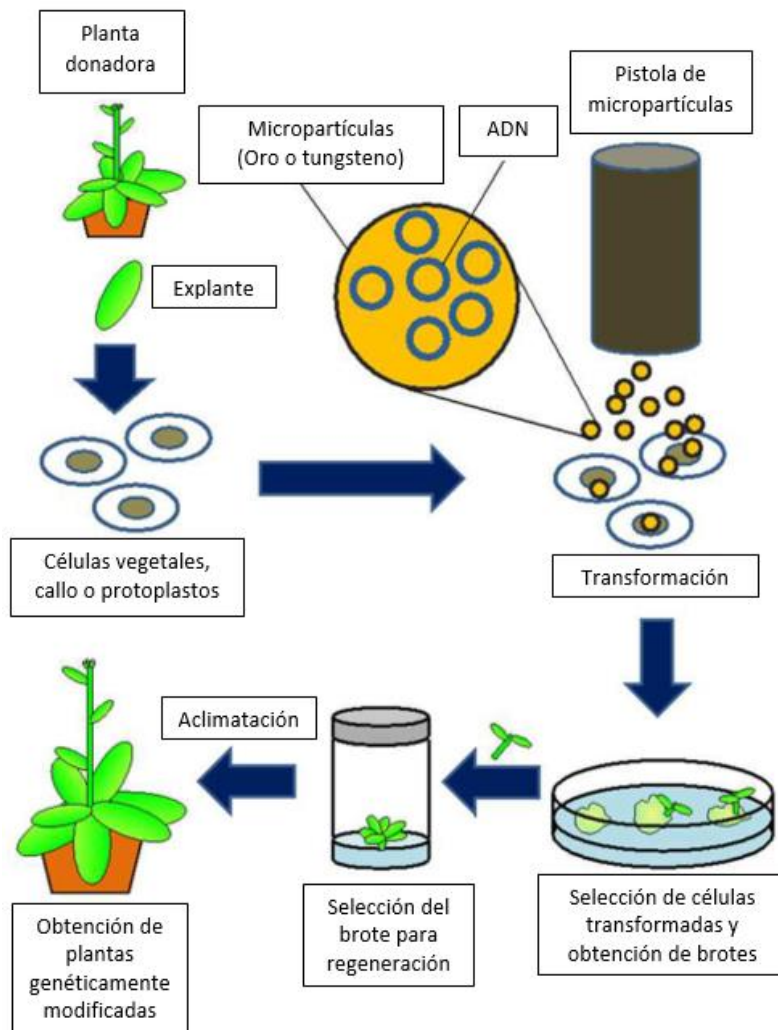


Figura 1. Esquema de los pasos requeridos para obtener plantas genéticamente transformadas por medio de biobalística. Tomado y modificado de Yelda, (2012).

2.3. Metabolismo de las plantas.

El metabolismo de las plantas es muy diverso y su clasificación es compleja debido a que forma una intrincada red profusamente interrelacionada. Dependiendo de si resulta esencial o no, puede subdividirse en:

(I) El metabolismo primario que agrupa procesos anabólicos y catabólicos esenciales relacionados con la obtención de energía y materias primas para mantenerse y proliferar,

en él se forman y degradan ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos (Hadacek, 2002; Kliebenstein, 2004).

(II) El metabolismo secundario es aquel que no es indispensable para crecer, pero que usan los organismos para la adaptación y supervivencia en el ambiente en el que se encuentran, ya que en él se producen compuestos conocidos como metabolitos secundarios (Kliebenstein, 2004; Demain & Fang, 2000) los cuales son utilizados para diversos propósitos, a saber:

- a) Defensa contra patógenos o herbívoros, atrectores reproductivos, cuyo papel es favorecer la dispersión del polen y de las semillas.
- b) Agentes para movilizar y facilitar la asimilación de recursos minerales del suelo como iones metálicos, y aniones diversos.
- c) Señales de comunicación con microorganismos para establecer interacciones mutualistas, como la simbiosis o limitar el establecimiento de relaciones parasíticas.
- d) Factores de diferenciación para regular el crecimiento.

2.3.1. Factores que influyen en la producción de metabolitos secundarios.

Genéticos y epigenéticos: Como resultado de su propia historia evolutiva cada organismo va a tener su propio conjunto característico de metabolitos secundarios (Verpoorte & Alfermann, 2000). La capacidad de producirlos está codificada en sus genes y puede estar modulada por factores epigenéticos (Nelson & Cox, 2017).

Respuestas a señales intrínsecas: La biosíntesis y acumulación de los metabolitos surgen de procesos altamente regulados que se relacionan con el origen metabólico del compuesto y que pueden involucrar fenómenos de regulación de la expresión génica, señalización, compartimentalización y transporte intra e intercelulares (Hadacek, 2002).

Según su función, la regulación de la producción de los diferentes metabolitos puede estar sujeta a controles que dependen del tejido, estadio de desarrollo, condiciones

ambientales como son los niveles de nutrientes, factores de estrés, luz, reguladores de crecimiento y otros. Tales señales pueden inducir rutas completas o parte de la ruta, haciendo que su acumulación se induzca *de novo*, o que cambie la diversidad de especies químicas producidas (Ramachandra & Ravishankar, 2002; Verpoorte & Alfermann, 2000).

Respuestas a señales extrínsecas: Por ser organismos sésiles, las plantas suelen estar sometidas a condiciones medioambientales desfavorables, a este tipo de alteraciones se le conoce como estrés medioambiental. Para poder sobrevivir, una planta debe adaptarse a los cambios y cada especie presenta una tolerancia distinta a los diferentes tipos de estrés. Así, se presentan mecanismos para resistir, evitar y/o escapar a los estímulos ambientales negativos, pero cuando dichos mecanismos no alcanzan la eficacia suficiente, se dan manifestaciones fenotípicas como deformaciones, amarillamiento, manchas, necrosis, etc. Dichas alteraciones se acompañan de cambios en la expresión génica, la actividad metabólica, la fisiología y la estructura celular que no se observan a simple vista (Basurto *et al.*, 2012; Azcón-Bieto & Talon, 1993).

Los diferentes tipos de estrés medioambientales se pueden clasificar en tres grupos: físicos, químicos y biológicos.

Estrés físico: Son cambios en las condiciones fisicoquímicas circundantes, por ejemplo: el déficit hídrico, la salinidad, frío, calor, falta o alteración de la iluminación en cantidad o calidad, microaerobiosis o anaerobiosis y daño mecánico como el viento, heridas y otros.

Estrés químico: Son los producidos por la exposición a xenobióticos tóxicos como metales pesados, sales tóxicas, contaminantes atmosféricos (como el ozono, el SO₂, etc.), herbicidas, compuestos alelopáticos provenientes de especies antagónicas, e insuficiencia nutrimental.

Estrés biológico: Causado por la acción de otros seres vivos antagónicos (Azcón-Bieto & Talon, 1993).

Con frecuencia, estas condiciones de estrés ocurren asociadas, por ejemplo, el frío se acompaña de daño mecánico por los cristales de hielo y estrés osmótico para la baja disponibilidad de agua líquida, el estrés salino limita la absorción de agua y causa agobio hídrico, etc. (Buchanan *et al*, 2000).

2.3.1.1. Estrés salino.

Un hábitat salino se caracteriza por la presencia de un contenido muy alto de sales solubles. Las plantas son sometidas a un estrés salino sufren de alteraciones en la retención osmótica del agua, y acusan daño por efecto de la fuerza iónica, específicamente sobre el citoplasma y las membranas de las células. Los sistemas enzimáticos del metabolismo primario son especialmente sensibles a las soluciones salinas, lo que causa un déficit de energía. A su vez, también se limita la adquisición de nutrientes y se observa una disminución del crecimiento de la planta y germinación de la semilla (Basurto *et al.*, 2012).

El estrés salino tiene dos componentes: el componente osmótico y el componente iónico. Un suelo salino posee bajo potencial hídrico, lo cual induce agobio hídrico en las plantas. Por otro lado, la acumulación excesiva de iones resulta tóxica para la mayoría de las plantas cultivadas. Entre los iones tóxicos más abundantes se encuentran el Cl^- y el Na^+ aunque iones como NO_x y SO_2 conocidos como agentes contaminantes xenobióticos, producidos por la actividad industrial y/o agrícola, llegan a causar problemas, debido a que se reduce el pH de la tierra a valores entre 1.5 y 3.5, lo cual, puede provocar un déficit de nutrientes como K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- (Azcón-Bieto & Talon, 1993).

Al estudiar las respuestas o adaptaciones a la salinidad hay que tener en cuenta si estas son debidas al componente osmótico, al iónico o a una interacción entre ambos.

Con excepción de las bacterias halófilas, los organismos vivos no pueden desarrollarse en presencia de elevadas concentraciones de NaCl en su citoplasma. Los mecanismos desarrollados por las plantas tolerantes a la sal se basan en la exclusión del Cl^- y el Na^+ del citoplasma, mediante la inhibición de su entrada o la estimulación de su salida de la célula o el atrapamiento en vacuolas especializadas (Basurto *et al.*, 2012).

Para inducir la producción de metabolitos secundarios en callos de *Capsicum chinense* (chile habanero) se probaron diferentes concentraciones de NaCl para producir un estrés osmótico, teniendo un control sin NaCl con una producción de capsaicina alrededor de 100 a 140 $\mu\text{g g}^{-1}$ y usando 40 mM de NaCl, se aumentó la producción de capsaicina en una concentración de 1,644.1 $\mu\text{g g}^{-1}$, así también, observaron que se debe cuidar la concentración de NaCl usada pues un exceso (por encima de los 80 mM de NaCl) puede ser letal para los cultivos (Kehie *et al*, 2012).

2.3.1.2. Estrés por insuficiencia de luz.

La luz es esencial para que las plantas puedan crecer y reproducirse ya que es captada y convertida a energía química, por medio de la fotosíntesis, la cual ocurre en las partes aéreas. Pero también se adaptan a periodos sin luz que ocurren con una periodicidad predecible en el ambiente natural. El guardar a las plantas en oscuridad continua conduce a un déficit energético severo que puede conducir a la muerte de la planta (Moura *et al.*, 2010; McClung, 2006; Azcón-Bieto & Talon, 1993).

Todas las plantas tienen un reloj biológico celular, que responde a la temporalidad de los cambios en la cantidad y calidad de la luz. En los cultivos de tejidos, los periodos de iluminación son parte de las condiciones que se pueden manipular para modificar el crecimiento y diferenciación celular (Bhatia & Ashwath, 2005).

En un estudio realizado en cultivo de callos de *Capsicum annum* var. Jalapeño, se observó que hay una mayor producción de capsaicina si las células se cultivan en oscuridad aumentando en promedio un 70% el contenido de capsaicina y a medida que se aumentaba la intensidad de la luz, la producción de capsaicina disminuía independientemente del medio de cultivo empleado (Weathers, Fadzillah, & Cheetham, 1992).

2.3.2. Metabolitos secundarios del género *Capsicum*

En el género *Capsicum* los metabolitos secundarios más importantes son los capsaicinoides (responsables de la pungencia) y la capsantina y capsorrubina

(responsables de la coloración naranja o rojiza de los frutos), pero también pueden tener compuestos como carotenos, criptoxantinas, zeaxantinas, anteraxantinas, violaxantinas y neoxantinas, todos, de importancia nutricional y/o comercial (Gallego, 2007).

2.3.2.1. Capsaicinoides

Los compuestos capsaicinoides, son un grupo de más de 20 moléculas que incluyen a la capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homocapsaicina, y la nonivamida (Fig 2). Sin embargo, la capsaicina y la dihidrocapsaicina, que difieren solo en un doble enlace, componen el 90 % del contenido total de capsaicinoides. De ellos, la capsaicina es el compuesto más picante (Kehie *et al.*, 2014).

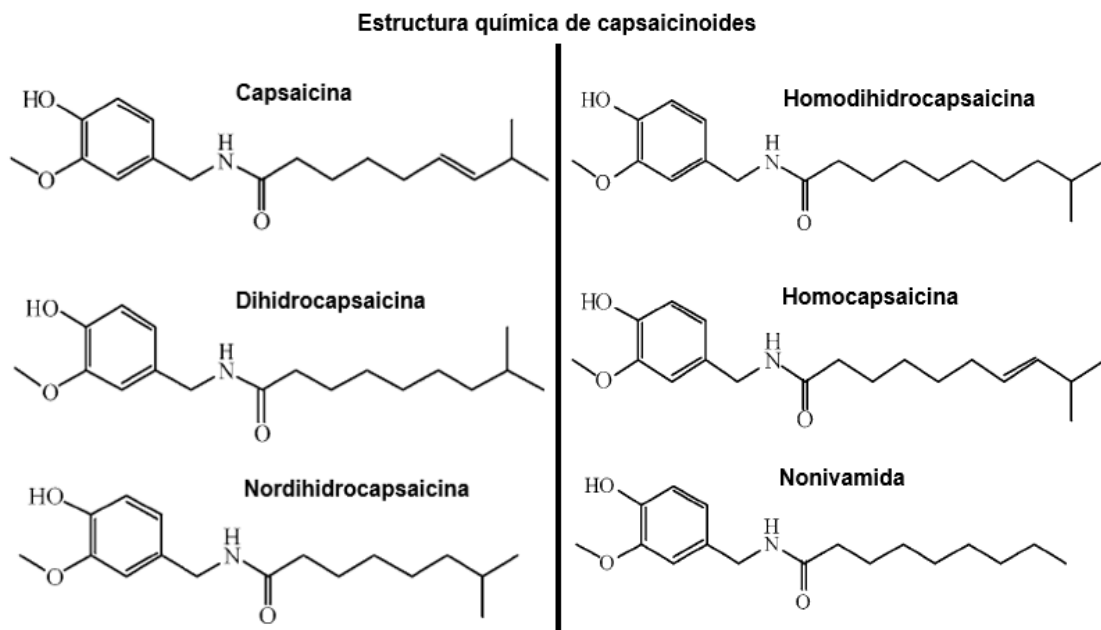


Figura 2. Estructuras químicas de algunos capsaicinoides, las diferencias radican en cambios en la cadena del ácido graso. Modificado de Kehie *et al.* (2014).

Los capsaicinoides se producen y almacenan en el tejido llamado placenta que se encuentra en el fruto como se muestra en la Figura 3. Su estructura química consiste en un núcleo fenólico de vainillilamina unido mediante un enlace amida a un ácido graso de cadena corta. La porción fenólica proviene de la fenilalanina por medio de la ruta de los

fenilpropanoides. El ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada como la valina o la leucina, pero los detalles de esta ruta y su condensación con la vainillilamina no se han estudiado con suficiente detalle, aunque se sabe que participa una enzima denominada capsaicinoide sintasa (CS) como se observa en la Figura 4 (Kehie *et al.*, 2014; Luo, Peng, & Li, 2011; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Según su genotipo, cada variedad de chile produce frutos que tendrán su grado de pungencia, la interacción genotipo-entorno regula la síntesis de capsaicinoides en el fruto. Así, se puede dar una alta variación en el picor de los frutos que produce cada planta, aún si el genotipo es uniforme. (Gurung *et al.*, 2011).

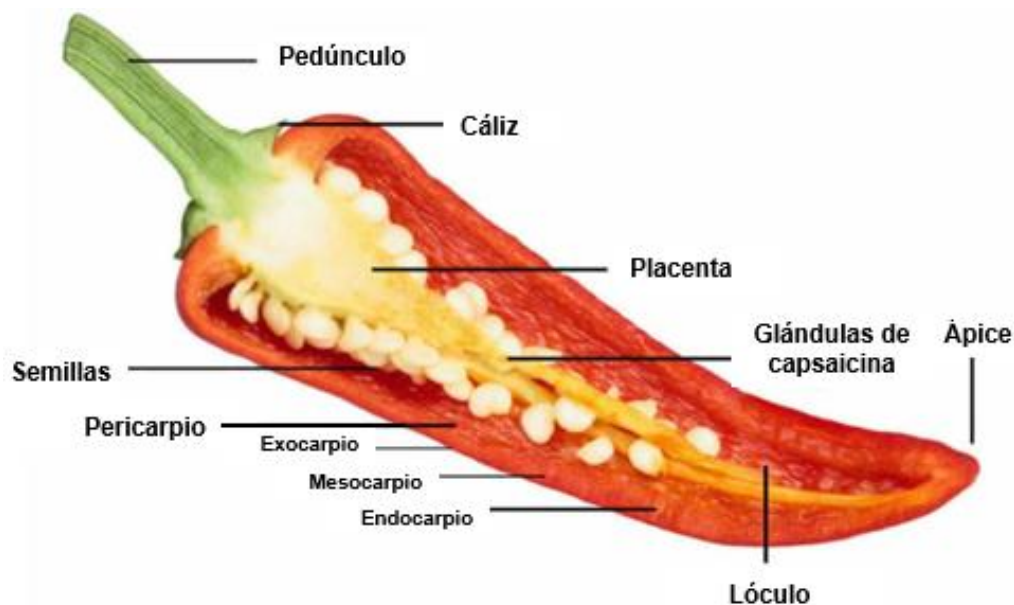


Figura 3. Imagen en la que se muestra la placenta en un fruto de *C. annuum*. Tomado y modificado de Bray, 2019.

Los capsaicinoides tienen una gran importancia económica debido a sus aplicaciones en la industria alimenticia, farmacológica y cosmética, ya que producen diversos efectos fisiológicos y farmacológicos en quien los consume, actuando en el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular y respiratorio, así como los sistemas, sensorial y de termorregulación. La capsaicina se utiliza como medicamento, en ungüentos tópicos o como parche dérmico para aliviar el dolor de la neuropatía periférica, como la neuralgia post-herpética causada por el herpes zoster, proporciona alivio en la artritis y

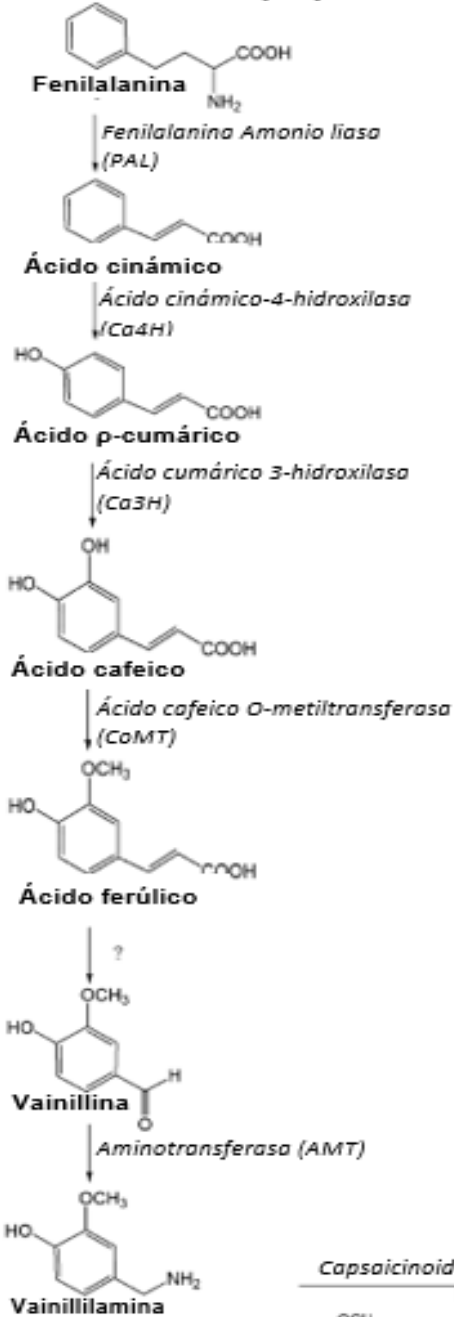
enfermedades respiratorias, es un agente contrairritante y analgésico, e incluso se ha encontrado que mata a algunos tipos de células cancerosas (Luo *et al.*, 2011; Reyes-Escogido *et al.*, 2011).

2.3.2.1.1. Métodos de extracción y análisis

Los primeros análisis en contenido de capsaicinoides en frutos del chile se realizaron midiendo la pungencia y, en 1912, el farmacéutico Scoville ideó la llamada prueba organoléptica de Scoville. Consiste en obtener una disolución del extracto del fruto y diluirla en agua con azúcar; el número de veces que la muestra debe diluirse para que deje de percibirse la sensación de picor determina los grados en la escala del método, llamadas unidades Scoville (US). Esta clasificación resulta un tanto subjetiva, por lo cual se han desarrollado métodos analíticos cromatográficos para determinar la concentración de capsaicina y dar la equivalencia en la escala Scoville; se ha establecido que 1 ppm de capsaicina corresponde a 15 unidades Scoville (Aguirre-Hernández & Muñoz-Ocotoero, 2015).

Debido a la importancia comercial de los capsaicinoides, se han ideado estrategias para analizar la cantidad y el tipo de capsaicinoides que tienen los frutos en diferentes especies de *Capsicum*, para ello se deben escoger los disolventes más eficientes para llevar a cabo la extracción de estos compuestos (Tabla 2). En varios estudios se han hecho extracciones con diferentes disolventes y usando diferentes partes del fruto y por medio de diferentes técnicas se han analizado los extractos obtenidos. Entre las técnicas más utilizadas está la cromatografía en capa fina (TLC), pero para llevar a cabo un análisis más detallado y cuantitativo, se utilizan técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la que puede acoplarse con espectrometría de masas (MS), espectrofluorometría, o resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR).

Síntesis de Fenilpropanoides



Síntesis Ácido Graso Ramificado

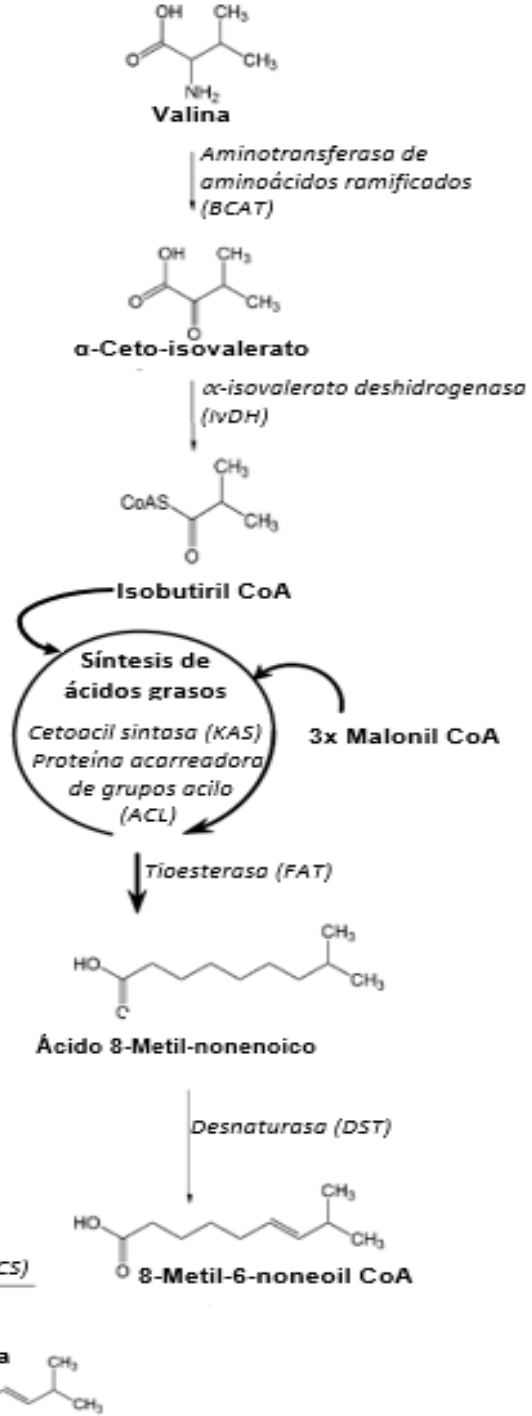


Figura 4. Ruta propuesta para la vía que sigue la biosíntesis de la capsaicina en el género *Capsicum*, se muestran las principales enzimas e intermediarios. Modificado de Kehie *et al.* (2014).

Se han intentado usar estrategias para la producción en serie de capsaicinoides y cubrir la alta demanda de estos compuestos, una de estas técnicas ha sido el cultivo de tejidos vegetales, pero la obtención de los capsaicinoides por esta técnica está muy por debajo de la que se produce naturalmente en los frutos del chile. Por esto se han probado diferentes estrategias para aumentar la capacidad de biosíntesis de las células (Fig 5), tales como la inmovilización de células o tejidos, alimentación de precursores, biotransformación, uso de intermediarios de la ruta biosintética de capsaicinoides, estrés por medio del pH, limitación de nutrientes, estrés osmótico, cambios en los regímenes de luz, entre otros (Kehie *et al.*, 2014).

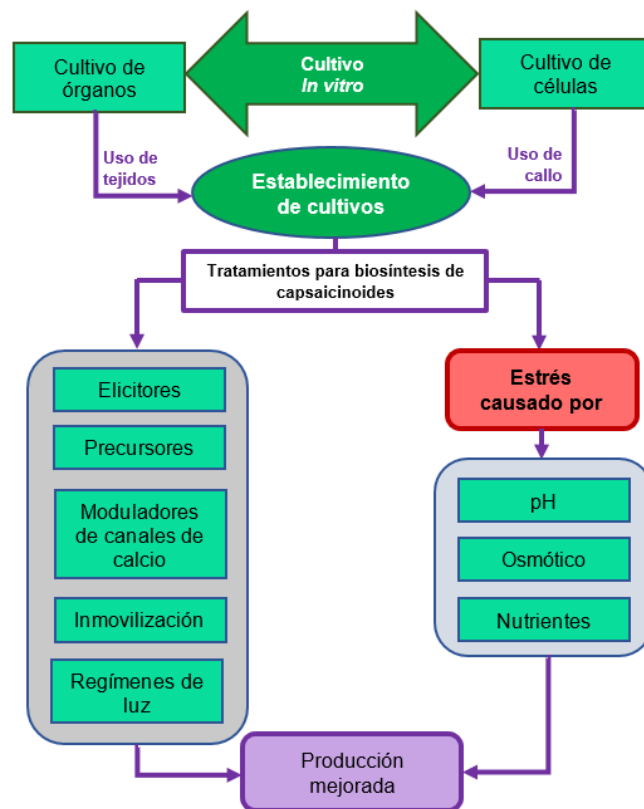


Figura 5. Estrategias que se han utilizado en el cultivo de tejidos vegetales de *Capsicum* para mejorar la producción de capsaicinoides. Tomado y modificado de Kehie *et al.* (2014).

Tabla 2. Diferentes estudios sobre contenido de capsaicinoides en frutos de diferentes variedades de *Capsicum sp.*

Especie	Tejido usado	Solventes para extracción	Fase móvil	Tipo de análisis	Referencia
<i>C. annuum L.</i>	Pericarpio de fruto (10g)	Acetona : éter de petróleo (1:1)	Benceno : acetato etilo : metanol (75:20:5)	TLC y HPLC	(Perucka & Oleszek, 2000)
<i>C. chinense Jacq</i>	Placenta del fruto	Acetona	Ciclohexano : cloroformo : ácido acético (70:20:10)	TLC y GC	(Monforte-González <i>et al.</i> , 2007)
<i>Capsicum</i>	Fruto molido y seco	Acetona	Metanol : agua (70:30)	HPLC	(Tapia & Bonilla, 2008)
<i>C. chinense Jacq</i>	Fruto (5g)	Tolueno	hexano : acetato etilo (3:1)	TLC y ¹ H NMR	(Wagner, Cahill, & Marshall, 2011)
<i>C. annuum L.</i>	Frutos color rojo secos	Metanol	Cloroformo : metanol : ácido acético (95:5:1)	TLC y HPTLC	(Cheema & Pant, 2011)
<i>C. chinense</i>	Frutos color rojo secos	Acetona	Éter de petróleo : acetato etilo : metanol (75:20:5)	CC, TLC y HPLC	(Gahungu <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. annuum y C. frutescens</i>	Frutos secos	Metanol	Metanol : agua desionizada (66:44)	RP-HPLC-Fluorescencia	(Chanthai <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. frutescens</i>	Fruto, pericarpio, semillas secas (2g peso seco c/u)	Cloroformo	Éter	TLC	(Bhuvaneshwari, Karthik, & Kuruvilla, 2013)
<i>C. chinense</i>	Fruto seco	12 disolventes. Acetona y acetonitrilo con mayor capsaicina	Éter de petróleo : cloroformo: acetonitrilo (40:45:15)	TLC y HPLC	(Amruthraj, Raj, & Lebel, 2014)

Especie	Tejido usado	Solventes para extracción	Fase móvil	Tipo de análisis	Referencia
<i>C. chinense</i>	Fruto colores naranja, amarillo, rojo	Metanol, acetona, acetonitrilo	Agua : acetonitrilo (40:60)	UHPLC	(Sganzerla, <i>et al.</i> 2014)
<i>C. frutescens</i>	Fruto color rojo y seco	Etanol, acetonitrilo, éter, metanol	Cloroformo : metanol: ácido acético (95:5:1)	TLC y HPTLC	(Goci <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. annuum</i>	Fruto fresco dividido en: Pericarpio, placenta y semillas	Etanol	Éter de petróleo : cloroformo : acetonitrilo (40:45:15)	TLC y LC-MS	(Govindappa <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. annuum</i>	Frutos maduros (rojos) y secos	14 disolventes y etanol con mayor eficiencia	Cloroformo : metanol : ácido acético : hexano (2.85:0.15:0.15:0.1)	TLC y HPTLC	(Das, Kundu, & Ghosh, 2015)
<i>C. chinense</i>	Fruto seco	Metanol	Agua : metanol con 0.1% ácido acético	HPLC-APCI-MS	(Bajer <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. frutescens</i>	Fruto seco	Acetonitrilo	Acetonitrilo : agua (60:40)	HPLC	(Santos <i>et al.</i> , 2016)
<i>C. annuum L.</i>	Fruto dividido en: Pericarpio, placenta y semillas. Se deja secar	Metanol, etanol, acetato etilo, acetona, isopropanol y acetonitrilo. Metanol mayor eficiencia	Agua : metanol (25:75)	LC	(Mokhtar <i>et al.</i> , 2016)

2.4. Aspectos generales de las Pirofosfatasas inorgánicas solubles

Las pirofosfatasas inorgánicas también conocidas como difosfato hidrolasas (EC 3.6.1.1; PPiasas) son enzimas que hidrolizan los enlaces fosfoanhídrido en el pirofosfato inorgánico.(Figura 6) Aunque aquellas que no son específicas y pueden actuar sobre ésteres de fósforo se consideran fosfatasas(Gutiérrez-Luna *et al.*,2018).

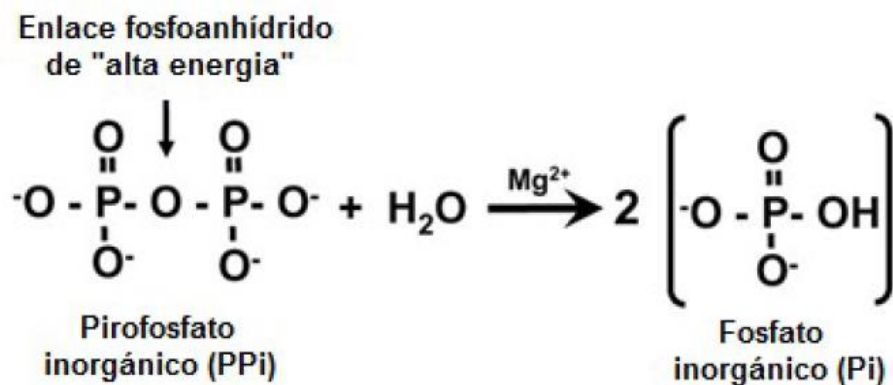


Figura 6. Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizada por una pirofosfatasa inorgánica soluble dependiente de Mg²⁺ (Plaxton 2010).

Las PPiasas específicas se dividen en dos grupos principales: las pirofosfatasas inorgánicas solubles y asociadas a membranas.

Las pirofosfatasas inorgánicas solubles (siPPasas) son proteínas ubicuas, dependientes de metales y encontradas en los tres dominios filogenéticos. Se descubrieron inicialmente en tejidos animales en 1928; dada su función como reguladores centrales del metabolismo celular, son proteínas que se expresan de forma constitutiva en prácticamente todas las líneas celulares y comprenden aproximadamente entre un 0.1 y 0.5 % de la proteína total de la célula(Kajander, Kellosalo, & Goldman, 2013; García-Contreras & Romero, 2003).

Según su secuencia de aminoácidos, las siPPiasas pueden subdividirse en Familia I y Familia II y son inactivas en ausencia de cationes divalentes. La Familia I corresponde a pirofosfatasa inorgánica que dependen del Mg (II) y la Familia II dependen del Mn (II) para su actividad catalítica. La función metabólica de estas pirofosfatasa consiste en hidrolizar el PPI disponible y permitir la reutilización del fosfato. Aunque en las plantas, aparentemente participan en el control del desarrollo y elongación de tubos polínicos durante la polinización de las flores (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2018).

2.4.1. Función del Pirofosfato (PPI) en las plantas

El PPI se forma como subproducto de la biosíntesis de macromoléculas del metabolismo como son DNA, RNA, carbohidratos, lípidos, proteínas y metabolitos secundarios como carotenos (Kornberg, 1962). Además de actuar como fuente de energía bioquímica, el PPI regula numerosos procesos bioquímicos, se ha reportado que puede inhibir y activar enzimas, cinéticamente, así como, influenciar la fidelidad de la síntesis de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, afectar la proliferación celular, la calcificación de tejidos y el transporte de hierro, además de estar involucrado en algunas condiciones patológicas.

La producción del PPI es mayor durante el desarrollo de las plantas y suele haber mayor acumulación de PPI en células de plantas (entre 200 y 300 μM), al que se acumula en células animales, esta concentración permanece constante aún en condiciones de estrés y se ha propuesto como un donador de energía en diversos organismos al presentar respuestas metabólicas adaptativas cuando las plantas están bajo deficiencia de fosfato, utilizan el PPI como fuente de energía, que implica una forma alternativa de glucólisis por medio de una disminución de ATP a ADP o de UTP a UDP (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2018).

La concentración y movilidad del fosfato en el suelo es más baja que la de los otros nutrientes principales, El contenido de fósforo orgánico el cual que puede ser utilizado

por las plantas varía mucho en los suelos, pudiendo ser un 20 % hasta un 80 % del fósforo total, es por esto que muchas veces la disponibilidad del fosforo puede limitar el crecimiento de las plantas. Las plantas absorben el fósforo como fosfato inorgánico ya que las fuentes orgánicas deben descomponerse antes para poder ser utilizadas por las plantas, hay microorganismos que pueden llevar a cabo esta descomposición como son los hongos micorrízicos, pero también las plantas pueden secretar enzimas para obtener fosfato de sustratos orgánicos, es por esto que, la hidrólisis de PPi es esencial para apoyar el crecimiento en las células en plantas (Trull & Deikman, 1998).

2.4.2. Pirofosfatasas en *Arabidopsis thaliana*

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene genes que codifican para 6 pirofosfatasas inorgánicas (AtPPa1 a AtPPa6) y se expresan constitutivamente en todos los órganos y durante todos los estadios del desarrollo de la planta (Hernández-Domínguez, *et al.* 2012).

Las AtPPa1 a AtPPa5 se encuentran en el citoplasma (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2016; Navarro de la Sancha, 2009), de las cuales, las isoformas como la AtPPa1 y AtPPa4 dependen del Mg^{2+} y de manera más pobre el Mn^{2+} (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007). La isoforma AtPPa6 parece ser una enzima exclusivamente cloroplástica y es esencial para la supervivencia de la planta (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2016) y la AtPPa4 también se encuentra en el apoplasto, sin embargo, todavía no hay suficiente explicación para explicar porque las plantas tienen varias isoformas, debido a que sus propiedades cinéticas son similares, más de una tiene una expresión constitutiva y porque hay ejemplos de organismos eucariontes fotosintéticos unicelulares que carecen de una proteína citoplásmica de esta clase (Gutiérrez-Luna, *et al.*, 2018).

III. OBJETIVOS

General:

- Transformar un cultivo de células *in vitro* de *C. annuum* L., con AtPPasa4 y someterlas a condiciones que favorezcan la biosíntesis de capsaicinoides, para analizar en estas muestras la producción relativa de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Particulares:

- Obtener y propagar cultivos de células *in vitro* silvestres de *C. annuum* L. 'serrano'.
- Llevar a cabo una transformación genética de las células *in vitro* silvestres de *C. annuum* L. por biobalística.
- Confirmar que la proteína de interés se encuentra en las células *in vitro* transformadas y que tiene actividad.
- Incubar las células *in vitro* silvestres y transformadas de *C. annuum* L. en condiciones que favorezcan una mayor producción de capsaicinoides.
- Extraer e identificar cambios en la producción de capsaicina y dihidrocapsaicina producidos en células *in vitro* silvestres y transformados de *C. annuum* L.

IV. HIPÓTESIS

- El cultivo de células *in vitro* de *Capsicum annuum* L. que expresan la pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de *A. thaliana* presentarán un cambio en la acumulación relativa de capsaicina y dihidrocapsaicina en comparación con células silvestre *in vitro*, en condiciones semejantes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos y demostración de la hipótesis, la parte experimental se realizó en el laboratorio 115 y 116 del departamento de Bioquímica, siguiendo las estrategias planteadas en la figura 7.

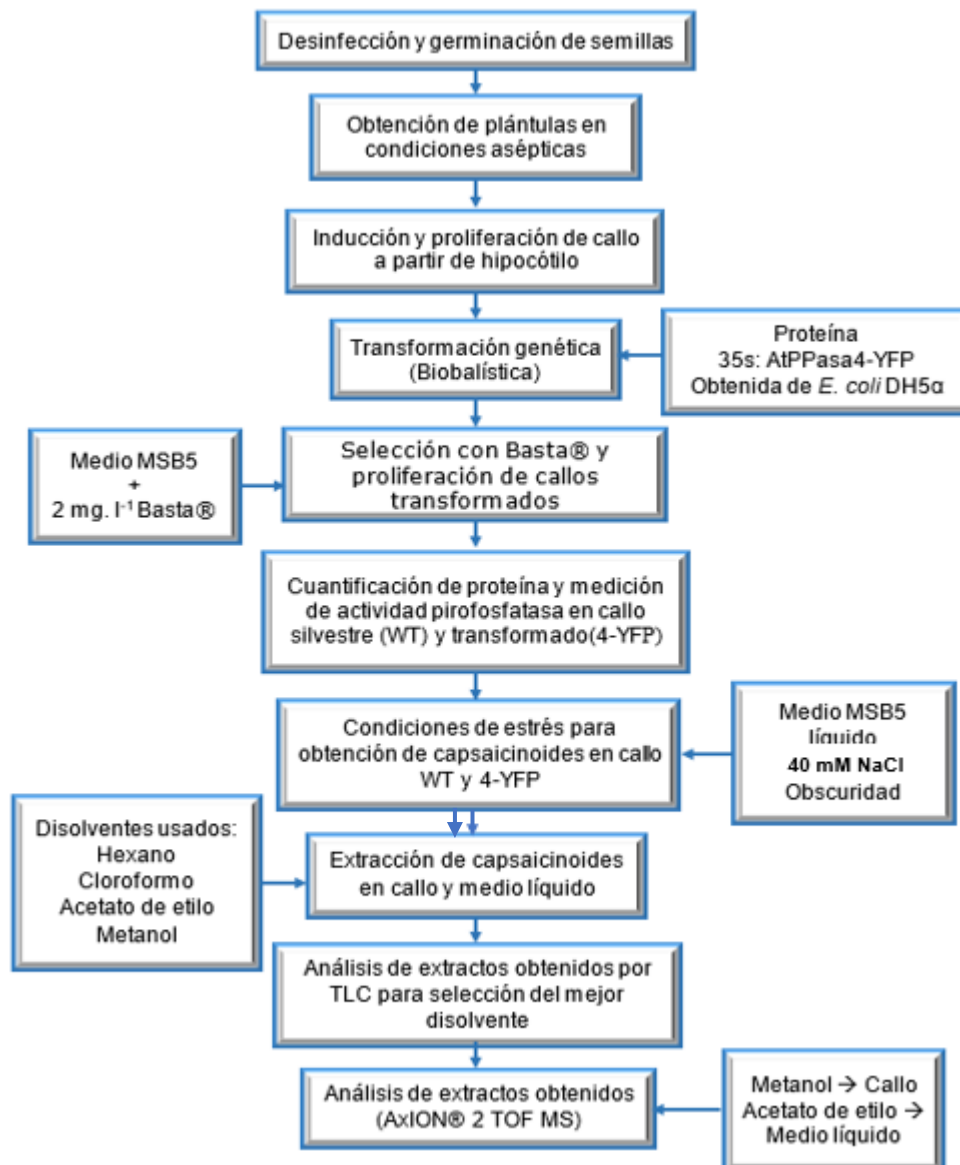


Figura 7. Ruta experimental seguida para la obtención de callo de *C. annuum* L. silvestre (WT), su transformación genética (4-YFP) y para el análisis en la acumulación de capsaicina y dihidrocapsaicina.

5.2 Cultivo de tejidos vegetales

5.2.1 Desinfección de semillas

Las semillas se colocaron en remojo por 24 h utilizando agua desionizada estéril, luego, bajo condiciones asépticas, se sumergieron las semillas en alcohol al 70% durante un minuto y se dieron tres enjuagues con agua desionizada estéril. Después, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30 % (v/v) + Tritón™ X-100 (3 gotas por cada 250 ml de solución) durante 15 minutos con agitación suave ocasional y se procedió a dar tres enjuagues con agua desionizada estéril.

5.2.2 Germinación de semillas y obtención de plántulas en condiciones asépticas

Las semillas desinfectadas se colocaron en un medio de germinación (Zaragoza-Pérez, 2016) que contenía sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100%, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, 2 mg.l⁻¹ de glicina, 2 mg.l⁻¹ de ácido giberélico y 3.3 g.l⁻¹ de Gelzan; se sembraron 7 semillas por frasco y se pusieron a incubar en un cuarto con ambiente controlado, con fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad, a una temperatura de 23°C ± 2°C y se dejaron crecer las plantas alrededor de 15 a 18 días.

5.2.3 Inducción y proliferación de callo

El medio utilizado para la inducción y proliferación de callo (MSB5) se preparó a partir de soluciones concentradas 100X del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con vitaminas (ver Anexo I-A) llamadas vitaminas B5 (ver Anexo I-B) al 100%, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, 2 mg.l⁻¹ de adenina, 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D, 200 mg.l⁻¹ de caseína, 1 g.l⁻¹ de PVP, ácido cítrico y ácido ascórbico 100 mg.l⁻¹ de cada uno y 8 g.l⁻¹ de agar gel.

El explante utilizado para la obtención de callo fue el hipocótilo, el cual se cortó en segmentos de 0.5 cm de largo y se colocaron los segmentos en cajas Petri de plástico de 100 x 15 mm conteniendo 15 ml de medio MSB5, para llevar a cabo la inducción de callo. Para llevar a cabo la proliferación, se colocó el callo obtenido en frascos de 50 ml que contenían 30 ml de medio MSB5, se realizaron subcultivos cada 15 días durante 3 meses hasta obtener la cantidad de callo deseado, después de este tiempo, los subcultivos se hicieron cada mes para el mantenimiento de los callos. Todos los cultivos se incubaron en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y a una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.2.4 Transformación genética por biobalística

Con forme a las condiciones de transformación planteadas en la tesis de licenciatura de Zaragoza-Pérez (2016), se utilizaron callos con 8 días de subcultivo previo en medio MSB5, los cuales se pasaron un día antes de llevar a cabo el bombardeo a cajas Petri con medio MSB5 que contenía 0.5 g.l^{-1} de gel de agar extra en las cuales se colocó una monocapa de callo de aproximadamente 1 cm de diámetro.

Para los tratamientos de transformación genética se utilizaron balas de tungsteno de $0.4 \mu\text{m}$ del laboratorio 116 (CTV) a los cuales se les añadió el plásmido de interés 35S::AtPPasa4-YFP siguiendo la metodología descrita en el Anexo II.

Para el bombardeo se utilizó una cámara de alta presión de Bio-Rad modelo PDS-1000 y las condiciones óptimas reportadas en la tesis realizada por Zaragoza Pérez (2016) que correspondieron a:

- Presión de 1100 psi.
- Distancia Macrocarrier–Disco de ruptura 3 cm.
- Distancia Macrocarrier–Callo 12 cm.

- Tamaño de bala de tungsteno 5M (0.4 μm).
- 2 disparos.

Se llevaron a cabo 3 repeticiones de un control negativo en el cual se utilizaron las mismas condiciones de bombardeo, sustituyendo el plásmido por adición de agua desionizada estéril.

Se hicieron 6 repeticiones con el plásmido de interés el cual contenía la pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de *Arabidopsis thaliana* y una proteína fluorescente color amarillo (4-YFP).

A los 5 días de realizarse la transformación genética de callos por biobalística, estos se observaron en el microscopio confocal de fluorescencia (40x) FluoView™1000 marca OLYMPUS perteneciente a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), para detectar la presencia de la proteína reportera fluorescente color amarillo (4-YFP) en las células.

Se procedió a la selección de los callos transformados durante 2 meses colocándolos en medio MSB5 con 2 mg.l^{-1} de herbicida Basta® y, posteriormente, se llevaron a cabo subcultivos en el medio MSB5 para la proliferación de dichos callos.

5.3 Medición de proteína y actividad pirofosfatasa de callos

5.3.1. Preparación de la muestra

Se pesaron 7 g de callo fresco sin transformar (WT) y callo transformado con la construcción de interés 35S::AtPPasa4-YFP (4-YFP) obtenido de hipocótilos.

Todo el callo se congeló con nitrógeno líquido y se pulverizó con ayuda de un mortero, el polvo obtenido se mezcló con 15 ml de buffer pH 7.5 preparado con TRIS 0.1 M, EDTA

1.0 mM y $MgCl_2$ 3.0 mM, agregando 1 pastilla de *Complete*TM de ROCHE® por cada 50 ml de buffer para inhibir proteasas. La mezcla se centrifugó 20 min a 4°C, 20 000 xg.

Se dializó el sobrenadante obtenido de ambos callos (WT y 4-YFP) en una membrana para diálisis contra 100 vol. de buffer con TRIS, EDTA y $MgCl_2$ agitando durante 24h. Se concentraron las muestras dializadas colocándolas las bolsas de diálisis sobre polietilenglicol 35 000 (PEG 35 000) y polvo de poliacrilato-polialcohol. El volumen de las muestras se redujo a 6.5 ml de extracto total.

5.3.2. Cuantificación de proteína

La determinación de proteína soluble en los extractos se realizó mediante la técnica de Bradford modificada de Zor y Seelinger (1996). En este método debe prepararse el reactivo Bradford disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomasie G-250® en 50 ml de una disolución de EtOH al 95 % v/v, posteriormente se agregaron 100 ml de H_3PO_4 al 85 % p/v y se aforó a 1000 ml. Se usó una curva patrón usando diluciones estándar de BSA (albúmina sérica bovina) 0 a 12 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$ (0 a 10 μl de solución stock con una concentración de 12 $mg \cdot l^{-1}$) y 150 μl de reactivo Bradford. La medición de proteína de las muestras se realizó mezclando una alícuota de 5 μl de muestra, 95 μl de agua desionizada y 150 μl de reactivo Bradford, a una longitud de onda de 595 nm, en un lector de placas de Elisa BioRad Benchmark®

NOTA: La proteína precipita a los 20 minutos de haber agregado el reactivo Bradford por lo que las mediciones deben hacerse antes de este tiempo.

5.3.3. Electroforesis SDS-PAGE

Previamente se midió la concentración de proteína con el método Bradford para poder llevar a cabo la electroforesis SDS-PAGE y comparar las proteínas encontradas en las muestras de callo WT y 4-YFP.

Se prepararon geles de poliacrilamida con la siguiente composición como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados para la electroforesis desnaturante SDS-PAGE.

DISOLUCIÓN	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 8%	4 ml	0.67 ml
Amortiguador para gel separador (Tris-HCl 0.75 M pH 8.8)	2.5 ml	0 ml
Amortiguador para gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8)	0 ml	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
Agua destilada	3.35 ml	3 ml
Desgasificar la disolución con vacío durante 10 minutos		
TEMED	5 μ l	25 μ l
Persulfato de amonio 10 %	50 μ l	25 μ l

El gel se corrió aplicando un potencial eléctrico de 60mV por un periodo de 30 minutos y 120 mV por un periodo de 1 hora con 30 minutos.

Se cargó en cada carril del gel 11.7 μ g de proteína y se realizó por triplicado para cada muestra (WT y 4-YFP).

Se realizó una tinción con plata para revelar el gel y se documentó con un sistema de procesamiento de imágenes ChemiDoc de BioRad®.

5.3.4. Medición de la actividad de pirofosfatasa

La medición de la actividad hidrolítica de la enzima pirofosfatasa (PPiase) se efectuó a partir de la concentración del producto (PO_4^{2-}) liberado por minuto. Los ensayos se llevaron a cabo en placas tipo ELISA de 96 pozos. Los ensayos deben realizarse por triplicado en presencia y en ausencia de MgCl_2 6.0 mM hasta obtenerse una dilución final del *buffer* al 50 %. Se colocaron 10 μl de muestra y esta se incubó por un periodo de 30 minutos (actividad esperada para la proteína), transcurrido los cuales se adicionó un volumen de 200 μl del reactivo verde de Malaquita (VM).

El reactivo se preparó empleando 2 ml de una disolución de HCl 2 M de la N,N, N', N',-tetrametil-4,4-diaminotrifencilcarbeno o verde básico 4 al 0.45 % (v/v), al cual se le adicionó 1 ml de NaCl 4 M con el detergente Brij[®] al 3 %. Una vez afectado el proceso de la reacción, se incubó durante 10 min adicionales, antes de determinar mediante espectrometría la concentración de fosfato en la mezcla de reacción, a la longitud de onda de 595 nm, en un lector de placas de Elisa Epoch Biotek[™].

Para determinar la cantidad de PO_4^{2-} producida, se realizó paralelamente una curva patrón a partir de una disolución de Na_2HPO_4 0.1 mM, (que se mantuvo almacenada a -20 °C, en alícuotas) muestras de 25 μl de concentraciones finales desde 0.2 nmol hasta 20 nmol de ortofosfato. Las disoluciones fueron mezcladas con 25 μl de amortiguador de ensayo y 200 μl de verde de malaquita (VM) y su absorbancia leída en el espectrofotómetro

La actividad se determinó como cantidad de producto acumulada durante la incubación, dividida por el coeficiente estequiométrico de la reacción (2) y en tiempo transcurrido de la reacción (30 min).

$$\text{A) Actividad pirofosfatasa} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min}} \right] = \left(\frac{1}{2} \right) \left(\frac{PO_4 [\text{nmol}]}{\text{tiempo} [\text{min}]} \right)$$

$$\text{B) Actividad específica} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}] = \left(\frac{1}{2} \right) \left(\frac{PO_4 [\mu\text{mol}]}{\text{tiempo} [\text{min}]} \right) \left(\frac{1}{\text{mg. prot aplicada}} \right)$$

Esquema 1. Cálculo de la actividad de pirofosfatasa **(A)** en el ensayo y **(B)** específica.

5.3.5. SDS-PAGE – Inmunoblot

Se tomaron 7 g (peso fresco) de callo WT y 4-YFP cada uno, el callo se colocó en un mortero y con ayuda de nitrógeno líquido, se congelaron las muestras para ser pulverizadas hasta obtener un polvo. Para 1 g de tejido pulverizado se agregaron 4 ml de buffer TRIS-HCl pH 7.5 que contiene Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3mM y 1 pastilla de inhibidor de proteasas Complete™ de ROCHE® por cada 500 ml de buffer. La mezcla se centrifugó a 15 000 xg por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se llevó a cabo la cuantificación de proteína mediante el método Bradford. Se llevó a cabo la separación electroforética mediante un gel SDS-PAGE 12 %. Para el Western blot o inmunoblot, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida-SDS fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando una solución que contenía Tris 25mM pH 8.4 con glicina 192 mM, SDS 3.5 mM, metanol 15% (v/v). Para permitir el reconocimiento por los anticuerpos, se usó como anticuerpo primario el anti-GFP (Santa Cruz) en una dilución de 1/5,000 con buffer PBS 1x, Tween 0.3% y leche en polvo al 5 %, se incubó toda la noche. Para el caso del anticuerpo secundario se usó el anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa en una dilución de 1/10 000 con buffer PBS 1x, Tween 0.3 % y leche en polvo al 5 %, se incubó por 1 h. Las membranas fueron reveladas usando el kit quimioluminiscencia Inmobilon™ Western de Millipore® y se registró el resultado con un sistema de procesamiento de imágenes ChemiDoc de Biorad®.

5.4 Tratamientos de estrés para cultivo de agregados celulares

Se llevaron a cabo diferentes tratamientos de estrés como se presenta en la Tabla 4 para ambos callos silvestre (WT) y transformado (4-YFP).

Tabla 4. Tratamientos utilizados para inducción de estrés a cultivo de agregados celulares.

Nombre del tratamiento	Medio de cultivo	Concentración NaCl	Condiciones de incubación	No. Repetición	Cita bibliográfica
Fotoperiodo	MSB5 (líquido)	-	16 h luz / 8 h oscuridad	3	-
Oscuridad		-	24 h oscuridad	3	Weathers <i>et al</i> , 1992
Fotoperiodo + NaCl		40 mM	16 h luz / 8 h oscuridad	3	Kehie <i>et al</i> , 2012
Oscuridad + NaCl		40 mM	24 h oscuridad	3	-

Nota: Cada tratamiento se hizo por triplicado, colocando 2 g de callo fresco en matraces de 50 mL que contenían 25 ml del medio, se incubaron en agitación a 100 rpm y una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15 días.

5.5. Curva de crecimiento para cultivo de agregados celulares en tratamientos de estrés

Para caracterizar el crecimiento de los callos silvestre (WT) y transformado (4-YFP) durante los 15 días de tratamiento se realizó una curva de crecimiento en la cual, se obtuvo por triplicado el peso seco del callo durante los días 0, 5, 9 y 15.

Se separó el callo del medio líquido por medio de filtración a presión reducida con Büchner, se deshidrató el callo a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para obtener el peso seco del callo y al terminar la cinética se calculó el promedio y desviación estándar de los datos, para generar la cinética de crecimiento durante los 15 días de monitoreo con ayuda de Excel.

5.6. Extracción de metabolitos secundarios y análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron los agregados celulares de callos silvestres (WT) y transformados (4-YFP), que fueron sometidos a los diferentes tratamientos de estrés (control, obscuridad, NaCl y NaCl+Obscuridad) durante 15 días.

Se llevó a cabo una extracción secuencial con disolventes siguiendo la polaridad de estos iniciando con el menos polar hasta llegar al más polar y, con ello, seleccionar el disolvente más adecuado para llevar a cabo los análisis fitoquímicos posteriores, se realizó por duplicado.

Los disolventes utilizados tanto para los agregados celulares como para la placenta del fruto de chile serrano fueron: hexano → cloroformo → acetato de etilo → metanol.

Así mismo se hicieron análisis fitoquímicos al medio de cultivo y se utilizaron los disolventes: hexano → acetato de etilo.

Se separó el callo tanto silvestre (WT) como transformado (4-YFP) del medio de cultivo por filtración a presión reducida con Büchner

El callo se puso a macerar en cada uno de los disolventes durante 3 días en una relación de 10 ml de disolvente por 1 g de peso fresco de callo.

Se realizó la misma metodología para 1 g de placenta de chile serrano obtenido en forma comercial.

Para el medio líquido se usó una relación de 1 ml de disolvente por 1 ml de medio de cultivo y se separó con ayuda de un embudo de separación.

Los disolventes fueron evaporados a presión reducida con un rotavapor a 50°C y el extracto fue resuspendido con el mismo disolvente usado para la extracción y se

colocó en viales de vidrio etiquetados para usarlos en la cromatografía en capa fina (TLC)

Para el estándar se utilizó capsaicina con una pureza $\geq 95\%$ de la marca SIGMA® y se preparó colocando 10 mg de capsaicina en 1000 μl de etanol absoluto.

Los extractos obtenidos se analizaron por TLC colocando 15 μl de extracto en cada carril y 2 μl del estándar. Se utilizaron cromatoplasmas de sílicagel 60 F₂₅₄ de la empresa MERCK™ de una medida de 10 x 15 cm y como fase móvil se usó una mezcla de acetato de etilo:hexano en una proporción de 6:4 (v/v) y se reveló con vapores de yodo.

5.7. Extracción de metabolitos secundarios y análisis usando espectrometría de masas: AxION 2 DSA TOF MS®.

Los extractos obtenidos de los agregados celulares WT y 4-YFP que fueron sometidos a los diferentes tratamientos de estrés (Control, Oscuridad, NaCl, NaCl+Oscuridad), se analizaron con el espectrómetro de masas de PerkinElmer modelo AxION 2 DSA TOF MS® (Direct Sample Analysis 2 Time-of-Flight Mass Spectrometer).

Se separó el medio de cultivo de los callos por medio de filtración al vacío, se dejó secar el material biológico a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para el callo seco se usó metanol grado HPLC 10 ml por 1 g de peso seco y se dejó macerar por 1 hora, se separó el callo por medio de filtración al vacío y se centrifugó durante 15 min a 4°C , 10 000 $\times g$. El extracto obtenido se concentró con presión reducida a 50°C usando un rotavapor y el extracto se recuperó con diclorometano en viales previamente pesados para obtener por diferencia de peso el peso del extracto dejando evaporar completamente el disolvente a temperatura ambiente.

Para el medio líquido se usó acetato de etilo en una relación de 1 ml de disolvente por 1 ml de medio líquido y se separó con ayuda de un embudo de separación, se realizó por triplicado. El extracto se concentró por medio de presión reducida a 50°C usando un rotavapor y el extracto se recuperó con acetato de etilo en viales previamente pesados para obtener por diferencia de peso el peso de extracto dejando evaporar completamente el disolvente a temperatura ambiente.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de callo de *C. annuum* L. (chile serrano)

Las plántulas de chile de 18 días (Figura 9-A) se usaron para disectar segmentos de 0.5 cm de largo del hipocótilo, que se sembraron durante 15 días en medio MSB5. La Figura 9-B muestra el crecimiento de una masa proliferante de células, conocida como callo. El crecimiento más abundante fue en los extremos del explante ya que es en esa zona donde se llevó a cabo un corte y este tipo de células suelen producirse en respuesta a una lesión (Walker & Rapley, 2008).

Para lograr el crecimiento del callo, fue necesario hacer subcultivos cada 15 días durante 3 meses en el medio MSB5 bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, a una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo, los subcultivos se realizaron cada mes. Esto permite suministrar medio fresco, evitando el agotamiento de los nutrientes y la deshidratación del mismo, lo que conduciría a la muerte del cultivo (Agrawal, Chandra & Kothari, 1989).

El callo mantenido bajo subcultivos periódicos fue blanquecino, friable y de crecimiento rápido como se observa en la Figura 10. Este material resultó competente para la transformación genética por biobalística, de acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo.

Todo esto debe mantenerse en condiciones asépticas, ya que de esta forma se evita el crecimiento de microorganismos, característica importante en la técnica del cultivo de tejidos vegetales, debido a que los microorganismos pueden impedir el crecimiento de las plantas y los callos al competir por los nutrimentos del medio de cultivo (Segretín, 2006).

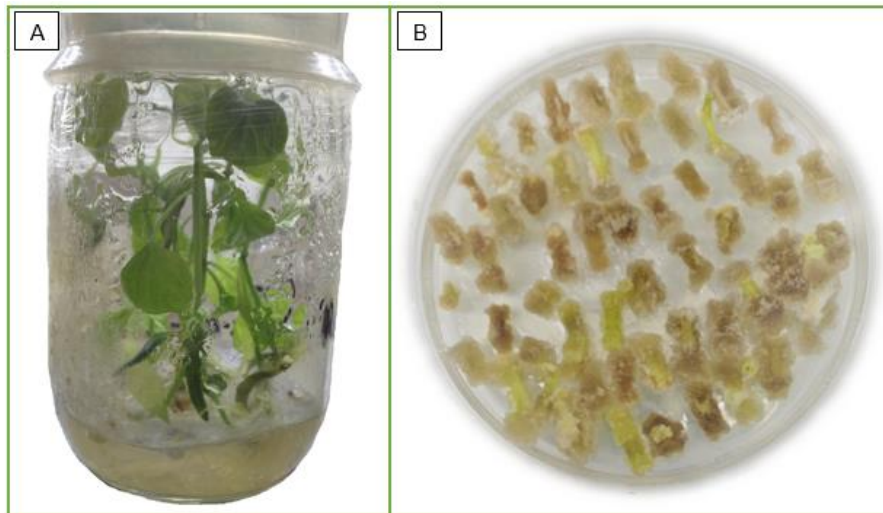


Figura 9. (A) Plantas de *C. annuum* L. en condiciones asépticas para la obtención de callo. (B) Inducción de callo utilizando como explante el hipocótilo de plantas de *Capsicum annuum* L. crecidas durante 18 días, se observa mayor crecimiento de callo en las zonas de corte (parte superior e inferior de cada segmento).



Figura 10. Callo obtenido después de realizar subcultivos periódicos en medio de cultivo fresco, con las características típicas que debe tener el callo de *C. annuum* L.

Transformación genética de callos por medio de Biobalística

La transformación genética de plantas dicotiledóneas suele realizarse con el plásmido Ti modificado de *Agrobacterium tumefaciens*, y empleando la bacteria como medio para la inserción del material en el genoma. Más recientemente, la biobalística ha ganado terreno para introducir DNA extraño en células vegetales tanto en plantas monocotiledóneas, como en plantas dicotiledóneas.

En el caso del género *Capsicum* los reportes se han centrado en el uso de *Agrobacterium* para introducir modificaciones genéticas dirigidas a conferir resistencia a infecciones por hongos fitopatógenos, bacterias o virus. Sin embargo, los avances de la investigación en esta área han sido pocos debido a la baja eficiencia en la transformación genética de estas plantas, al hecho de que no todos los genotipos son susceptibles de transformación y a que la regeneración de plantas a partir de callo no ha dado buenos resultados (Kothari *et al.*, 2010).

Por ello en la tesis realizada por Zaragoza-Pérez en el 2016, se establecieron las condiciones para obtener callos de *C. annuum* L., 'serrano' susceptibles de transformación genética y en este trabajo se probaron diferentes distancias, tamaño de bala y número de disparos, para mejorar la eficiencia de transformación del tejido. Los mejores resultados se obtuvieron al realizar 2 disparos al tejido con microproyectiles de 0.5 μm a una distancia de 12 cm entre el Macrocarrier y el callo, esto fue evaluado de forma cualitativa al observar las células a los 5 días con el microscopio confocal y, como se muestra en la Figura 11-B, se observó la fluorescencia la da la proteína YFP, la cual emite luz de color amarillo, teniendo como control, células que fueron bombardeadas sin el plásmido de interés como se puede ver en la Figura 11-A, de esta forma se confirmó la presencia del plásmido de interés dentro de las células.

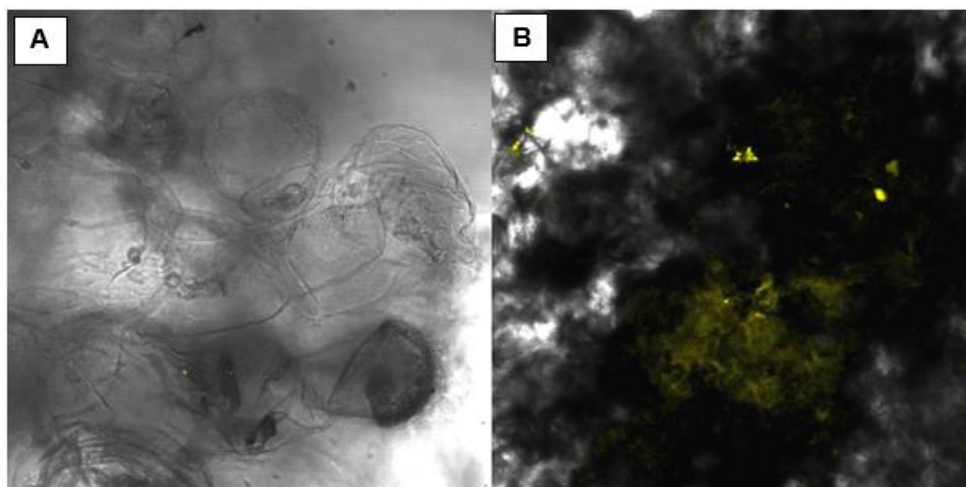


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal a los 5 días de realizar el bombardeo. (A) Control negativo de células de *Capsicum annuum* L. bombardeadas sin agregar el plásmido de interés (40X). (B) Células de *C. annuum* L. bombardeadas con el plásmido de interés que contenía la pirofosfatasa inorgánica soluble 4 de *Arabidopsis thaliana* y una proteína fluorescente color amarillo 35S:AtPPasa4-YFP (40X).

Los callos sometidos a la transformación genética se pusieron en un medio de selección el cual contenía 2 mg l^{-1} de BASTA™ que contiene como principio activo glufosinato de amonio que se usa como un herbicida de contacto no selectivo. Este compuesto es un análogo de glutamato e inhibe la glutamina sintetasa, que provoca en la planta una rápida acumulación amoníaco, conlleva a un agotamiento de glutamina y varios otros aminoácidos presentes en las plantas, reduce la fijación fotosintética de CO_2 , causa clorosis y desecación de la célula vegetal (Hoerlein, 1994).

En aquellas plantas que no poseen resistencia natural a este herbicida, solo las células que expresan el gen de resistencia a Basta™ pueden sobrevivir en el medio de selección. De esta manera, es posible obtener un cultivo homogéneo en lo que respecta a la transformación, a pesar de que la biobalística no garantiza la transformación del 100% de las células.

Medición de proteína y actividad pirofosfatasa en callos

Se llevó a cabo la extracción para cuantificación de proteína y medición de actividad pirofosfatasa, para encontrar diferencias entre callos silvestres (WT) y callos transformados (4-YFP).

En la Figura 12 se observa la fluorescencia de los extractos crudos de proteína soluble recuperados de callos silvestres (WT) o transformados con la construcción (4YFP). Se comprobó que el buffer de extracción no confiere fluorescencia a los extractos y que, los extractos más brillantes fueron los recuperados de los cultivos bombardeados con el plásmido 35S::AtPPA4-YFP, aunque esta fluorescencia solo se observa después de centrifugar los extractos y someterlos a una diálisis. Los extractos vegetales suelen tener una cierta fluorescencia basal debida a las flavoproteínas, compuestos fenólicos y fragmentos de la pared celular. Sin embargo, los extractos de callos transformados (4-YFP), fluorescen con más intensidad, en concordancia con la expresión esperada de la proteína fluorescente en callos silvestres (WT).

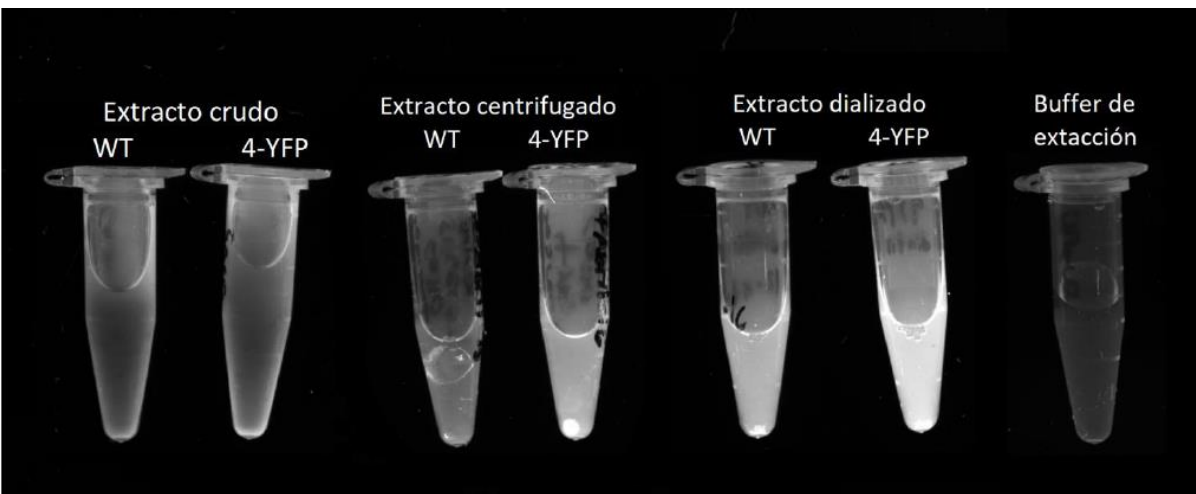


Figura 12. Fluorescencia de extractos obtenidos para calcular cantidad de proteína y actividad pirofosfatasa de callos de *C. annuum* L. silvestre (WT) y transformado (4-YFP).

Para medir la concentración de proteína y la actividad pirofosfatasa (PPiase), se utilizaron los extractos dializados, cada ensayo fue realizado por triplicado y de acuerdo con los valores obtenidos, en la Figura 13-A se observa que hay una menor cantidad de proteína en los extractos correspondientes al callo 4-YFP ($0.726 \pm 0.193 \text{ mg proteína g}_{\text{Peso Fresco}}^{-1}$) con respecto al extracto del callo WT ($1.194 \pm 0.137 \text{ mg proteína g}_{\text{Peso Fresco}}^{-1}$). Pero al cuantificar la actividad PPiase específica, se observó una mayor actividad en el callo 4-YFP con respecto a la muestra de callos WT (Figura 13-B), esto se podría correlacionar con la sobreexpresión de la proteína de *A. thaliana*, pero también podrían existir cambios compensatorios en la expresión de otras isoformas, por lo que el dato no es concluyente.

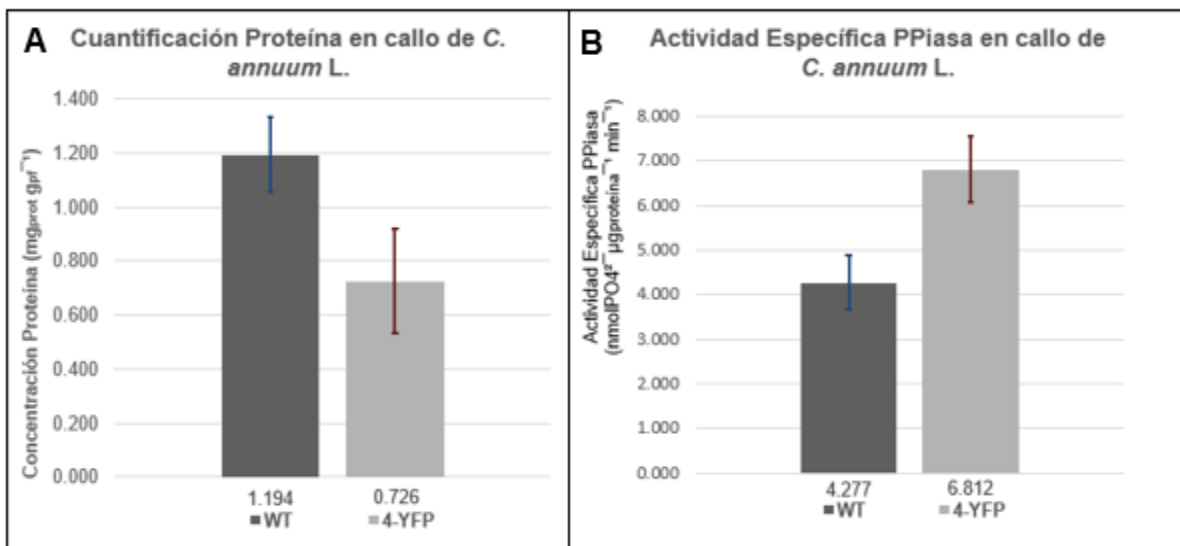


Figura 13. Resultados para callos de *C. annuum* L. WT y 4-YFP de (A) $\text{mg}_{\text{prot}} \text{g}_{\text{pf}}^{-1}$ cantidad de proteína con respecto al peso fresco de tejido extraído; y (B) Actividad específica de pirofosfatasa que se calculó tomando en cuenta los valores dependientes de Mg^{2+} restando el fosfato hidrolizado en ausencia de Mg^{2+} del valor obtenido en su presencia.

Para comparar posibles cambios en el patrón de proteínas se separó la proteína de las muestras por SDS-PAGE (Figura 14). Se puede observar un aumento relativo en la intensidad de la banda a la altura de $\sim 20 \text{ kDa}$, pero no de la banda esperada de 52 kDa

para la proteína de fusión. Esto no resulta sorprendente, en virtud de la complejidad del proteoma vegetal y de la limitada resolución de la electroforesis unidimensional.

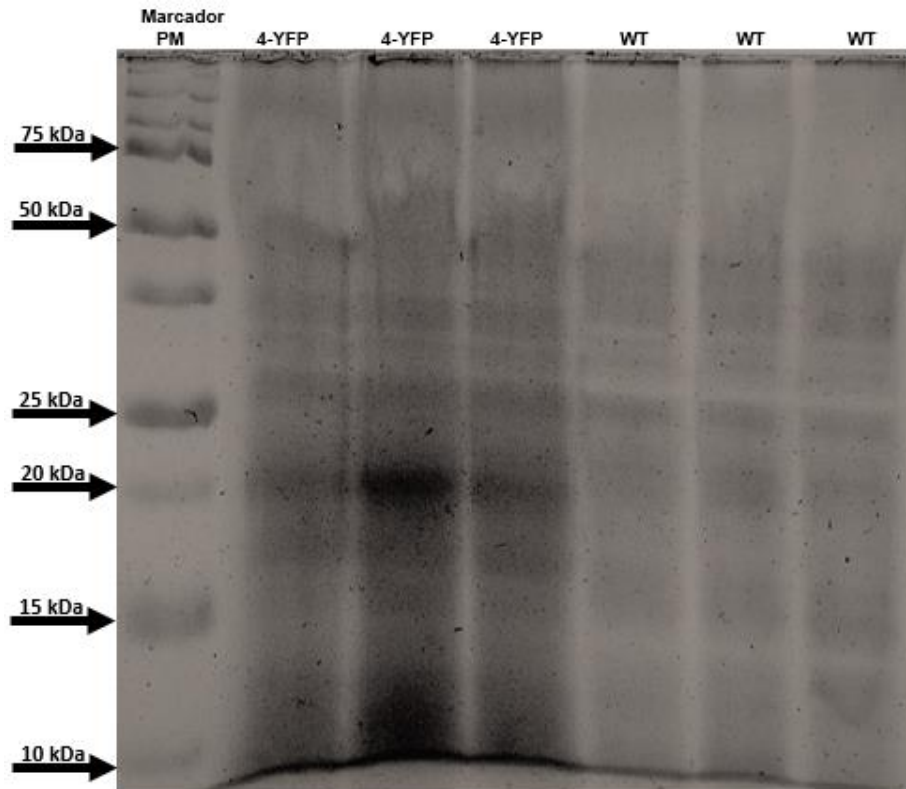


Figura 14. Gel de electroforesis SDS-PAGE. Contenido por carril de 11.7 μ g de proteína en extractos dializados para callo 4-YFP y WT que se llevó a cabo por triplicado. Tinción con plata.

SDS-PAGE – Inmunoblot

Para tener la certeza de que los callos transformados genéticamente estuvieran expresando la proteína de interés la cual estaba fusionada a YFP aún después de llevar a cabo los subcultivos para su proliferación, se realizó una Inmunoréplica usando el anticuerpo anti-GFP y como se observa en la Figura 15, hay una banda en el peso esperado de 45 a 50 KDa únicamente en los carriles que correspondían a las muestras obtenidas del callo transformado genéticamente (AtPPa4-YFP), de esta forma se

comprobó que sigue presente la proteína de interés y que se mantiene estable al no presentarse una degradación de la banda.

Debido a que los callos están compuestos en su mayor parte por agua, los extractos obtenidos tenían muy poca proteína, por lo cual, fue necesario exponer por un largo periodo la membrana a la quimioluminiscencia y de esta forma se logró observar la banda de interés. Se observa la presencia de una banda de mayor peso molecular (75 kDa aproximadamente), mismo comportamiento que se observa en un estudio anterior realizado por Gutiérrez-Luna y colaboradores en el 2016 en el cual se utilizaron plantas de *A. thaliana* transformadas con diferentes pirofosfatasa, lo cual nos dice que este comportamiento se da al expresar una pirofosfatasa en plantas, pero no hay más evidencia que explique la presencia de estas bandas al realizar una Inmunoréplica de estos extractos.

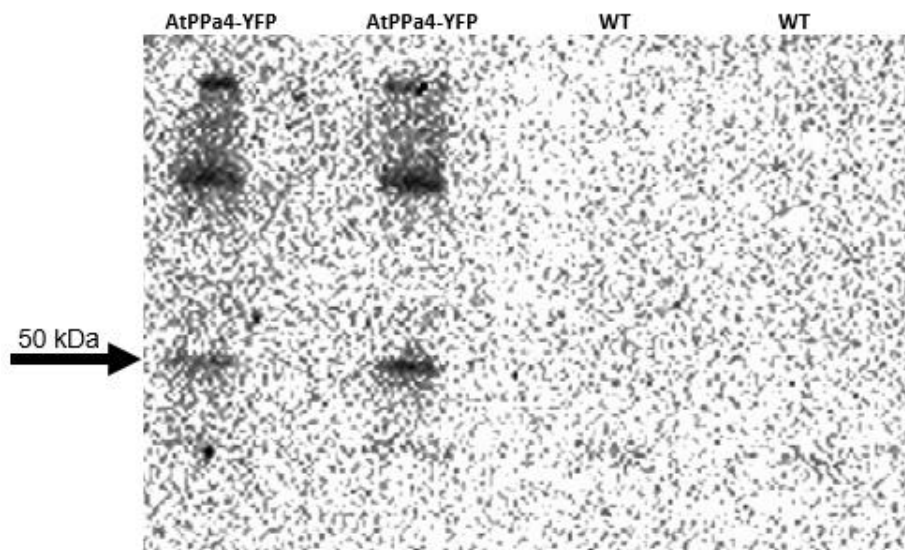


Figura 15. Inmunoréplica tipo western de extracto proteico soluble de callo de *C. annuum* L. transformado (4-YFP) y silvestre (WT) en el que se detecta la proteína de fusión (PPiase 4 de *A. thaliana*) expresada en callos de *C. annuum* L. transformados genéticamente por medio de biobalística usando el anticuerpo anti-GFP, la banda se observa en 50 kDa.

Tratamientos de estrés para cultivo de agregados celulares

Se sabe que la obtención de metabolitos secundarios en cultivo de tejidos celulares de *C. annuum* L. es mucho más baja que la que se obtendría del fruto de estos, es por esto que se han llevado a cabo diversos estudios para aumentar la producción de capsaicinoides en cultivo de tejidos celulares en *C. annuum* (Kehie *et al.*, 2014), una de las estrategias que más se usan es el someter a estrés los cultivos celulares, ya que de esta forma activan el metabolismo secundario de las células, para este trabajo se decidió utilizar el estrés osmótico, simulando uno de las condiciones de estrés más comunes que sufren las plantas cuando hay deficiencia de agua debido a las sequías, y otro es el estrés causado por deficiencia de luz, ya que sabemos que la luz es esencial para el crecimiento y funcionalidad de las plantas.

Después de llevar a cabo la proliferación del callo transformado (4-YFP), se probaron diferentes tratamientos para aumentar la producción de capsaicina en los callos tanto WT como 4-YFP, se usó medio de cultivo líquido para que el callo estuviera en contacto directo durante los 15 días con las condiciones de estrés, como tratamiento control, se dejaron callos en condiciones normales de crecimiento usando el medio MSB5 líquido con condiciones de fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, el cual se denominó como tratamiento Fotoperiodo.

Para los tratamientos de estrés, se provocó el estrés osmótico a las células (tratamiento Fotoperiodo + NaCl), para hacer esto se usó cloruro de sodio (NaCl) en una concentración de 40 mM ya que en el estudio realizado por Kehie *et al.* (2012) probaron diferentes concentraciones de sal y azúcar para inducir un estrés osmótico y observaron que a la concentración de 40 mM de NaCl las células aumentan la producción de capsaicina, pero sin causar muerte a las células debido al estrés. Se asignó un periodo de estrés de 15 días, ya que en el estudio mencionado es en este periodo de tiempo

cuando se obtenía la mayor síntesis de capsaicinoides y pasando este tiempo comenzaba a disminuir la producción de estos compuestos.

Otro tratamiento utilizado fue la ausencia de luz (tratamiento Oscuridad), ya que el estudio realizado por Weathers *et al.* (1992), encontraron que la luz puede inhibir la producción de capsaicinoides.

Por último, se decidió usar las dos condiciones de estrés en un mismo tratamiento (tratamiento Oscuridad + NaCl), para comprobar si se interferían, tenían efecto aditivo o sinérgico.

Durante los 15 días que duraron los tratamientos, se monitoreó el crecimiento de las células y se puede ver en la Figura 16 que el callo WT tiene un crecimiento constante durante los 15 días tanto en el tratamiento Fotoperiodo como en los tratamientos de estrés llegando a crecer más del doble en este periodo que duró el tratamiento.

En el caso del callo 4-YFP se observa en la Figura 17 que en los primeros 9 días su crecimiento es lento, pero después de los 15 días aumenta su peso casi al doble del peso inicial, esto se puede apreciar para todos los tratamientos, de esta forma podemos ver que, aunque las células estén sometidas a condiciones de estrés, éste no es letal al mostrar que la acumulación de biomasa no está afectada.

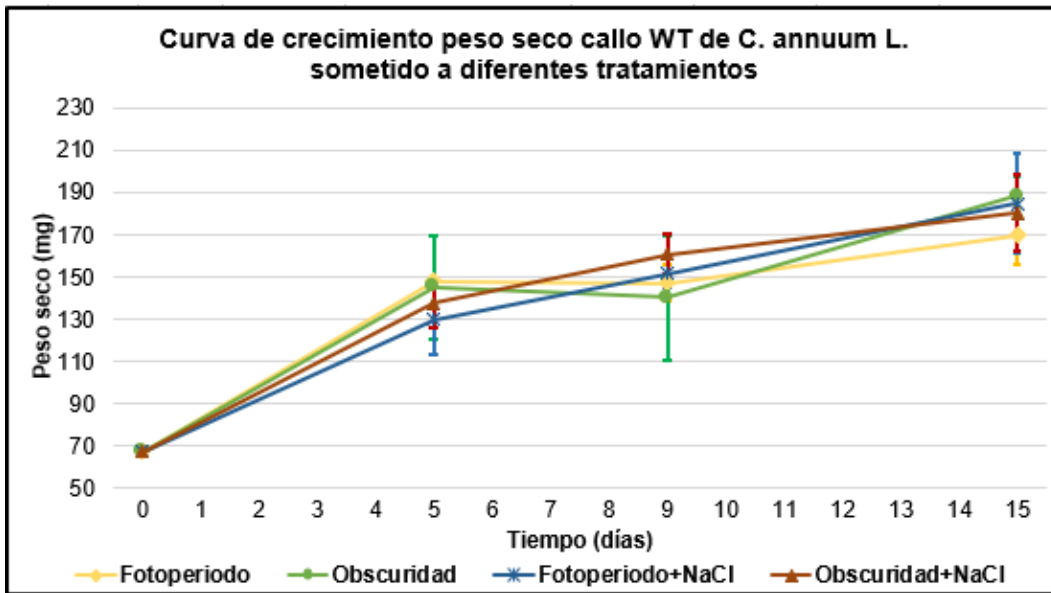


Figura 16. Caracterización del crecimiento de callos de *C. annuum* L. silvestres (WT) en medio líquido, para observar su comportamiento cuando son sometidos a diferentes tratamientos durante 15 días. Cada punto en la cinética de crecimiento se realizó por triplicado.

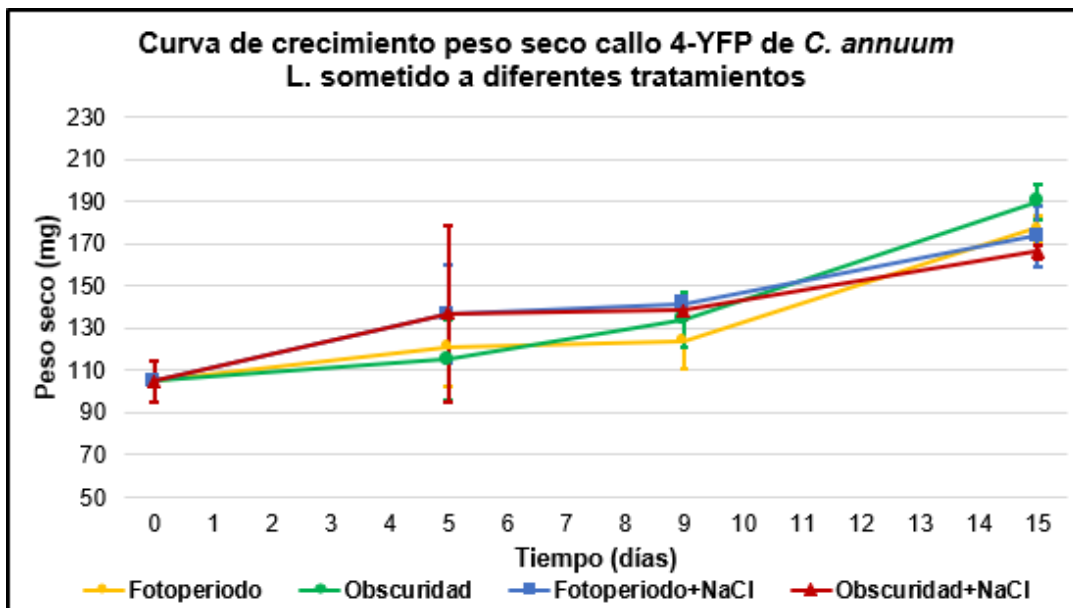


Figura 17. Caracterización del crecimiento de callos de *C. annuum* L. transformados genéticamente (4-YFP) en medio líquido, para observar su comportamiento cuando son sometidos a diferentes tratamientos durante 15 días. Cada punto en la cinética de crecimiento se realizó por triplicado.

Otra forma en la que se manifestó el estrés al que estaban sometidas las células fue en la apariencia de los agregados celulares, ya que a los 15 días de tratamiento en la Figura 18 se observa que los conglomerados de células WT presentaban un oscurecimiento y, aunque se observa oscurecimiento en el tratamiento Fotoperiodo (Figura 18-A), hay mayor oscurecimiento en las células que están sometidas a los tratamientos de estrés, siendo más notorio en aquellos tratamientos con 40 mM de NaCl (tratamiento Fotoperiodo + NaCl Figura 18-B y tratamiento Oscuridad + NaCl Figura 18-D). Dicho oscurecimiento nos indica una oxidación celular, que suele presentarse en las células vegetales *in vitro*, cuando las condiciones no son adecuadas para el crecimiento óptimo. La oxidación se debe a compuestos fenólicos cuya formación está catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO), capaz de generar quinonas muy reactivas, que causan daño celular y pueden llevar a la muerte del tejido (Azofeifa, 2009).

En contraste, para el caso de los callos 4-YFP (Figura 18-E; 18-F: 18-G y 18-H) no se observa evidencia de oxidación, es decir, no hay cambio en la coloración de ninguno de los tratamientos. Lo anterior sugiere que la transformación genética de los callos con la construcción que sobreexpresa la pirofosfatasa inorgánica soluble de *A. thaliana* y/o su selección alteran la respuesta a condiciones de estrés salino y ausencia de luz, reduciendo la expresión de las PPO. Estudios anteriores realizados con *A. thaliana*, demuestran que las mutantes nulas en algunas de las isoformas de pirofosfatasa inorgánica soluble, activan ciertos mecanismos de respuesta al estrés en forma anticipada y sufren menos daño por efecto del estrés (Perales-Baños, 2008; De Villafranca-Casas, 2011). No obstante, la sobreexpresión de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *Escherichia coli* en el floema de plantas de tabaco conduce a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos con acumulación de azúcares solubles en las hojas y un crecimiento atrofiado (Geigenberger *et al.*, 1996) Adicionalmente, la sobreexpresión de una pirofosfatasa inorgánica de protones (H⁺-PPasa) vacuolar en plantas de tabaco y

en otras especies de plantas aumentó su tolerancia a la deficiencia de fósforo, al estrés por salinidad, o por sequía (Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2010).

Todo lo anterior indica que, las alteraciones en la expresión de las pirofosfatasa, está relacionada con la capacidad de las plantas para adaptarse a condiciones de estrés.

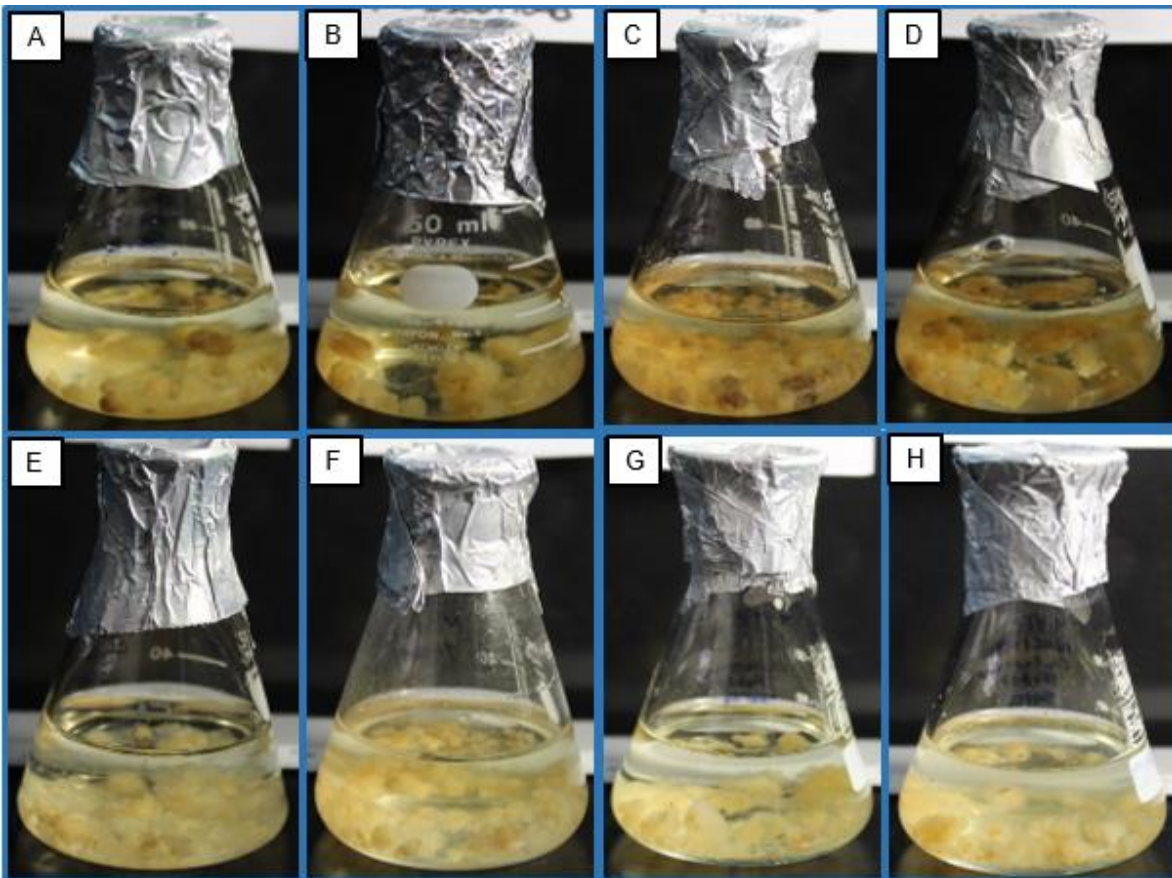


Figura 18. Crecimiento de agregados celulares en suspensión en diferentes tratamientos durante 15 días. **(A)** Células de callo WT en tratamiento Fotoperiodo. **(B)** Células de callo WT en tratamiento de Oscuridad. **(C)** Células de callo WT en tratamiento Fotoperiodo + NaCl. **(D)** Células de callo WT en tratamiento Oscuridad + NaCl. **(E)** Células de callo 4-YFP en tratamiento Fotoperiodo. **(F)** Células de callo 4-YFP en tratamiento Oscuridad. **(G)** Células de callo 4-YFP en tratamiento Fotoperiodo + NaCl. **(H)** Células de callo 4-YFP en tratamiento Oscuridad + NaCl.

Extracción de metabolitos secundarios y análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Para llevar a cabo la extracción de metabolitos secundarios de callos de *C. annuum* L. se debían establecer parámetros que nos permitieran obtener una recuperación suficiente para el análisis posterior.

Para lograrlo, se debían establecer los tiempos de extracción y los disolventes más útiles. Esto resulta crucial, debido a que el callo es en su mayoría agua y que la síntesis de capsaicinoides *in vitro* es menor que en el fruto natural. Para establecer el tiempo se probaron tiempos de 24 horas y 3 días de maceración de agregados celulares de callo WT en cada disolvente, como control positivo para llevar a cabo la extracción de metabolitos secundarios se usó el tejido de la placenta de frutos de chile serrano y también se empleó el estándar de capsaicina de Sigma® como referencia. En la Figura 19 se observa que, a las 24 horas de maceración, no se recuperan manchas correspondientes a capsaicinoides. El extracto de fruto de *C. annuum* L. 'serrano' se colocó en el carril 13 para todas las placas de la Figura 19. Se observó la mancha correspondiente a capsaicina con hexano (Figura 19-A) y cloroformo (Figura 19-B), pero no con acetato de etilo (Figura 19-C) o metanol (Figura 19-D). Estos resultados sugieren que 24 horas no es tiempo suficiente para la extracción de los compuestos de interés, con buen rendimiento.

Al dejar los callos de *C. annuum* L. macerando por 3 días se obtuvieron mejores rendimientos de extracción (Figura 20) ya que se observa el corrimiento de compuestos en todos los carriles correspondientes al callo (Figura 20: carriles 1 al 12 para todos los disolventes usados).

Una vez establecido el tiempo de extracción, por medio de las placas de TLC podemos observar con que disolvente se obtiene un mayor rendimiento de extracción de compuestos y se estableció que el acetato de etilo (Figura 20-C) y el metanol (Figura 20-62

D) son los disolventes que ayudan a una mayor obtención de compuestos, aunque en el caso del hexano (Figura 20-A) se observa en el carril correspondiente al fruto del chile (Carril 13) que hay presencia de capsaicina incluso más intensa que en el estándar (Carril 14), para el caso del callo (Carriles 1 al 12) no se observa tanta presencia de compuestos y en el caso de los extractos con cloroformo (Figura 20-C) la presencia de compuestos es muy baja.

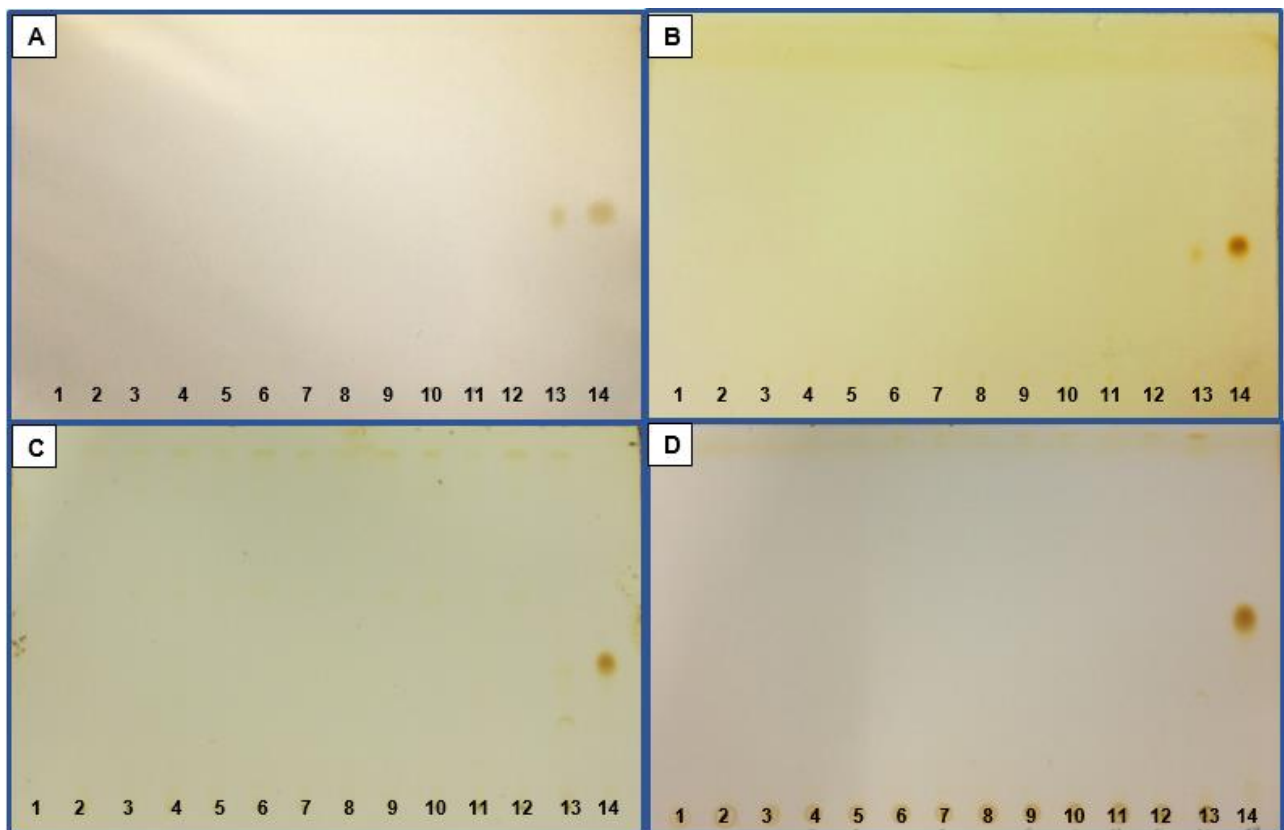


Figura 19. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de callos de *C. annuum* L. silvestres (WT) a 24 horas en contacto con los disolventes: **(A)** hexano, **(B)** cloroformo, **(C)** acetato de etilo y **(D)** metanol. Cada extracción se realizó por triplicado y aplicaron 15 μ L de extracto por carril. Carriles 1-3 tratamiento Fotoperiodo. Carriles 4-6. tratamiento Oscuridad. Carriles 7-9 tratamiento Fotoperiodo + NaCl. Carriles 10-12 tratamiento Oscuridad + NaCl. Carril 13 fruto de chile sometido a las mismas condiciones de extracción.

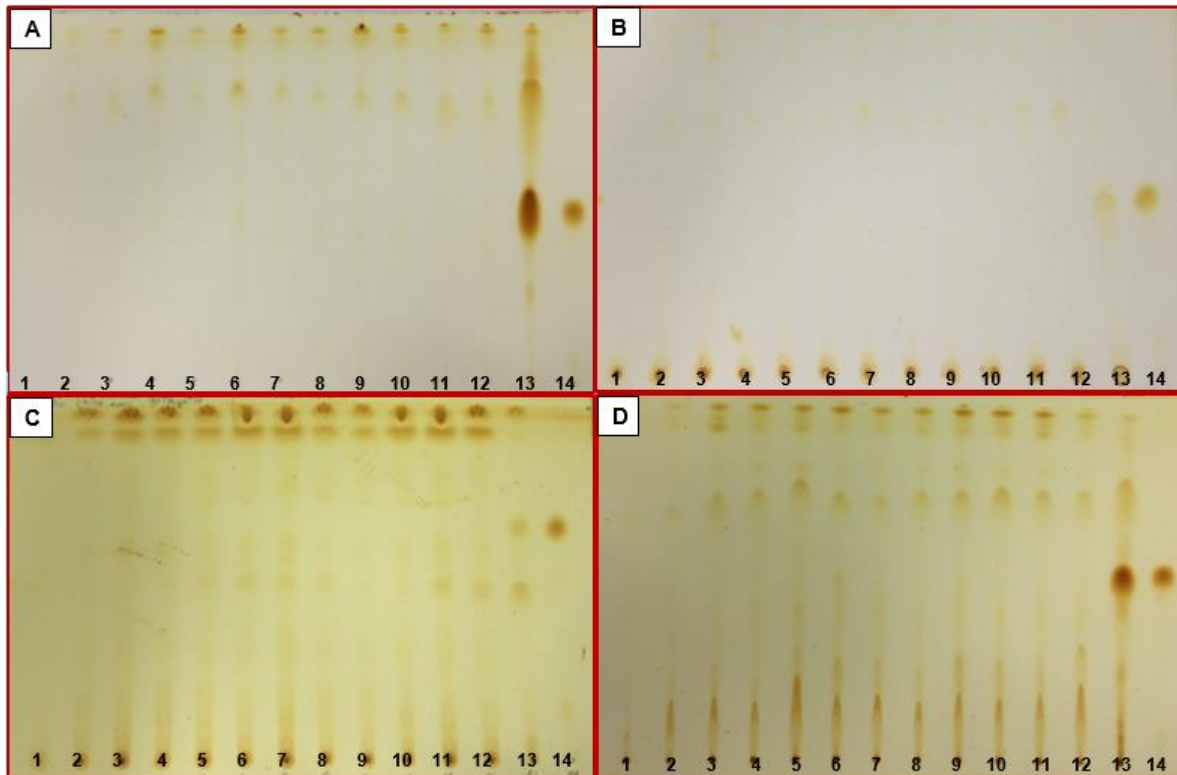


Figura 20. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de callos de *C. annuum L.* silvestres (WT) a los 3 días en contacto con los disolventes: **(A)** hexano, **(B)** cloroformo, **(C)** acetato de etilo, **(D)** metanol. Cada extracción se realizó por triplicado y se aplicaron 15 μ L de extracto por carril. Carriles **1-3** tratamiento Fotoperiodo. Carriles **4-6**. tratamiento Oscuridad. Carriles **7-9** tratamiento Fotoperiodo + NaCl. Carriles **10-12** tratamiento Oscuridad + NaCl. Carril **13** fruto de chile sometido a las mismas condiciones de extracción. Carril **14** estándar de capsaicina. Fase móvil usada para correr las placas acetato de etilo : hexano 6:4 (v/v). Revelado con vapores de yodo.

Las pruebas de extracción con disolventes se realizaron también con el callo transformado (4-YFP) y con el medio de cultivo (Figura 21). La maceración se realizó por 3 días con, hexano (Figura 21-A), cloroformo (Figura 21-B), acetato de etilo (Figura 21-C) o metanol (Figura 21-D). Nuevamente, acetato de etilo y metanol resultaron en mejor rendimiento de extracción. Para el caso del medio de cultivo, se usó hexano (Figura 21-E) o acetato de etilo (Figura 21-F) los cuales no son miscibles con el agua y adecuados para la extracción por medio de separación de fases. En este caso acetato de etilo resultó

también el mejor disolvente para llevar a cabo la extracción de compuestos del medio de cultivo.

Los extractos obtenidos de callo de *C. annuum* L. nos ayudaron a establecer tiempos de extracción y los disolventes adecuados pero debido a que la síntesis de metabolitos en cultivo de tejidos celulares de esta especie es baja (Kehie *et al.*, 2014), no es posible llevar a cabo un análisis cuantitativo de capsaicinoides con TLC, que además adolece de una resolución limitada y no da certeza en la identidad de la mancha.

En el caso del extracto obtenido del fruto de chile se observa que hay una mancha clara a la altura del estándar de capsaicina proveniente de la placenta que se encuentra en los frutos del chile, pues es en este tejido donde se lleva a cabo la síntesis y almacenamiento de capsaicinoides (Kehie *et al.*, 2014).

En los callos se observan con más intensidad otras manchas, incluida una con menor R_f, que podría corresponder a la dihidrocapsaicina, la que también está presente en el fruto, pero en proporción menor que la capsaicina.

Para un análisis más confiable de las muestras de callos se necesita el uso de técnicas más sensibles y resolutivas que nos ayuden a la detección de compuestos como capsaicina y dihidrocapsaicina; una alternativa para la detección de compuestos en concentraciones muy bajas es la espectrometría de masas (Garcés-Claver *et al.* 2006).

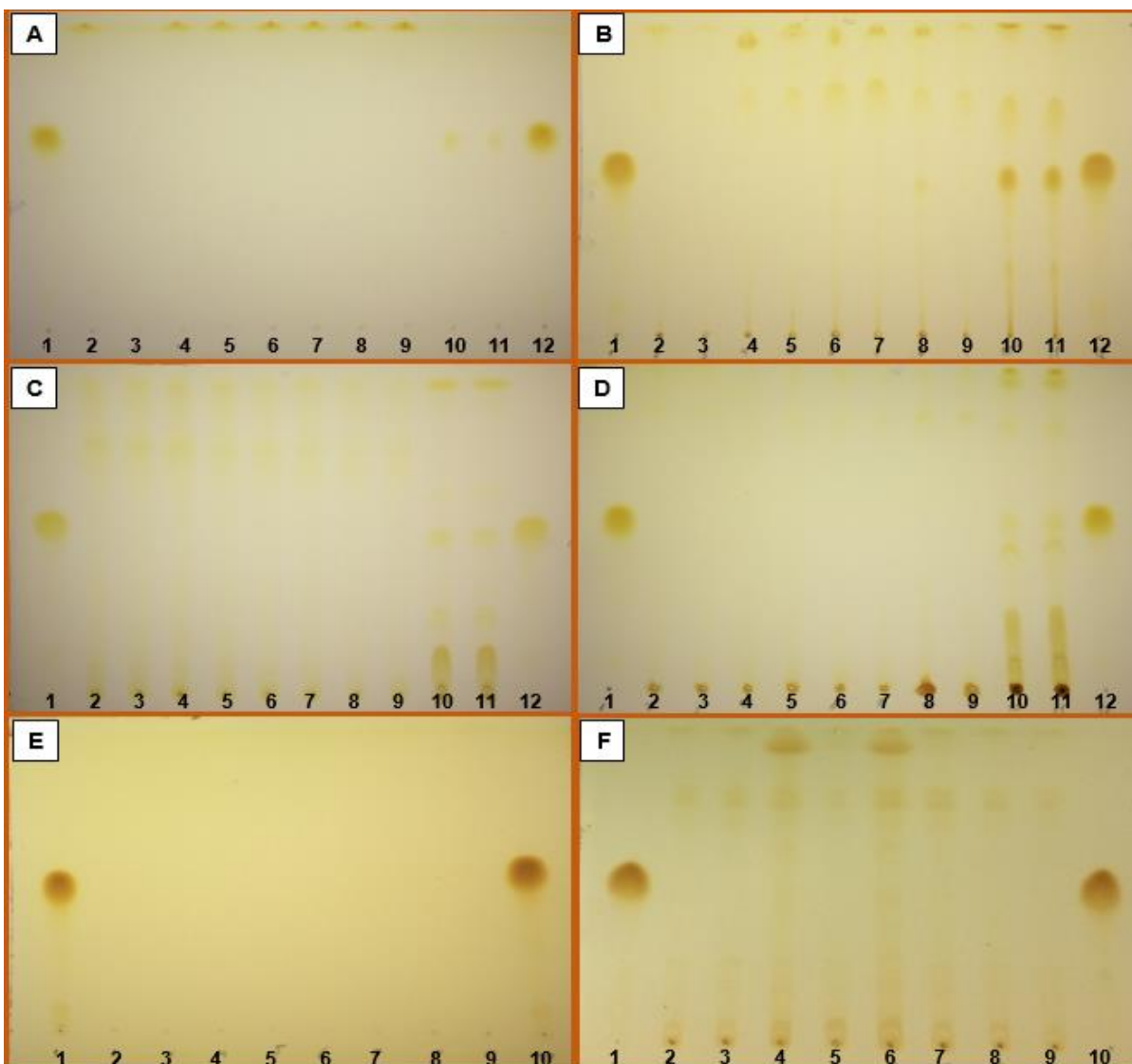


Figura 21. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de callos de *C. annuum* L. transformados (4-YFP) usando **(A)** hexano, **(B)** cloroformo, **(C)** acetato de etilo, o **(D)** metanol. Los callos permanecieron 3 días en el disolvente. Carriles 1 y 12 estándar de capsaicina. Carriles 2-3 tratamiento Fotoperiodo. Carriles 4-5 tratamiento Oscuridad. Carriles 6-7 tratamiento Fotoperiodo + NaCl. Carriles 8-9 tratamiento Oscuridad + NaCl. Carriles 10-11 fruto de chile sometido a las mismas condiciones de extracción. Para medio de cultivo líquido la extracción fue con **(E)** hexano o **(F)** acetato de etilo. En todos los casos la extracción se realizó por duplicado y se aplicaron 15 μ L de extracto por carril. Carriles 1 y 10 estándar de capsaicina. Carriles 2-3 tratamiento Fotoperiodo. Carriles 4-5 tratamiento Oscuridad. Carriles 6-7 tratamiento Fotoperiodo + NaCl. Carriles 8-9 tratamiento Oscuridad + NaCl. Fase móvil usada acetato de etilo : hexano 6:4 (v/v). Revelado con vapores de yodo.

Análisis de extractos usando el espectrómetro de masas: AxION 2 DSA TOF MS®

Se llevaron a cabo análisis por triplicado de extractos de *C. annuum* L. por inyección directa en espectrometría de masas y detección por tiempo de vuelo en el equipo AxION 2 DSA TOF MS®. Este equipo fue adquirido por la USAII de la Facultad de Química, pero debido a limitación en los tiempos de instalación, el aparato empleado en estos experimentos fue proporcionado por la empresa Perkin-Elmer™. Con este equipo se pueden obtener espectros de masas incluso de mezclas muy complejas debido a su alta resolución y sensibilidad. La identificación de los compuestos se lleva a cabo por comparación de las huellas moleculares de los compuestos de interés en la muestra, con la ayuda de un software especializado. Dependiendo de la calibración y de la presencia de un estándar interno, el análisis puede ser cualitativo o cuantitativo. En este caso, no contábamos con un estándar interno apropiado, del que tuviéramos completa certeza de su presencia en la muestra y cuyas propiedades fueran semejantes a los capsaicinoides. Por ello, el espectrómetro de masas AxION 2® se empleó para analizar los niveles relativos de capsaicina y dihidrocapsaicina en los cultivos celulares, ya que los resultados de TLC sugerían que esta relación estaba alterada en los cultivos.

El equipo se calibró con los protocolos recomendados de Perkin-Elmer™ y luego las muestras se aplicaron en rejillas metálicas para la ionización. Se usó un estándar de capsaicina de la marca Sigma® con una pureza $\geq 95\%$ y un control positivo para la detección de capsaicina y dihidrocapsaicina usando tejido de placenta del fruto de chile serrano. Tanto los cultivos en suspensión WT y 4-YFP, como el tejido de la placenta de fruto maduro se trataron con las mismas condiciones de extracción. Además, se llevó a cabo una extracción al medio líquido recuperado a los 15 días de tratamiento de los agregados celulares crecidos en condiciones control o bajo estrés. El análisis reveló que el estándar de capsaicina tiene de 5 a 10% de dihidrocapsaicina, lo cual no se llega a detectar en las Figuras 19 a 21.

Al analizar los resultados obtenidos con el software MS Driver[®], pudimos identificar los picos de iones de interés, correspondientes a la relación masas/carga (m/z) esperada para capsaicina (306.2070) y dihidrocapsaicina (308.2171), como se muestra en la Figura 22-A. El error correspondiente para cada valor de m/z , se calculó con respecto al teórico en partes por millón (ppm), y se muestra para la capsaicina y para dihidrocapsaicina. En la Figura 22, también se muestra la identificación de las señales para las formas isotópicas de mayor abundancia para capsaicina (Figura 22-B; m/z : 306.2070 y 307.2112) y para dihidrocapsaicina (Figura 22-C; m/z : 308.2117 y 309.2254).

Este análisis se realizó por triplicado para los extractos obtenidos tanto para el fruto del chile serrano como para los callos tanto WT como 4-YFP. Los resultados en extenso se incluyen en el Anexo III y a partir de los cuales se obtuvieron los valores de la media y la desviación estándar mostrados en la Figura 23.

Los resultados obtenidos para la placenta del fruto de *C. annuum* L. mostrados en el Anexo III (Figura III-1), muestran los picos esperados para capsaicina y dihidrocapsaicina y aunque estos análisis no son cuantitativos, por la carencia de un estándar interno, la relación de áreas bajo la curva permite establecer su abundancia relativa. Así, se puede observar una abundancia mayor de capsaicina (m/z de 306.2097) en comparación con el pico iónico de la dihidrocapsaicina (m/z de 308.2259), esto coincide con lo reportado en la literatura que reporta a capsaicina y dihidrocapsaicina como los capsaicinoides más abundantes en el chile (Luo *et al.*, 2011), en ese orden.

Debido a la alta sensibilidad del espectrómetro de masas AxION 2[®] se pudo identificar y detectar valores cercanos al m/z esperado para la capsaicina y dihidrocapsaicina, para los extractos de cultivos celulares WT sometidos a tratamientos de estrés (Anexo III, Figura III-2, III-3, III-4 y III-5). El error observado en algunos casos supera las 25 ppm, pero esto se atribuye a la complejidad de la muestra, que ocasiona interferencia en las señales (Cappiello *et al.*, 2010). Se debe tener muy en cuenta el efecto que va a tener la

68

matriz, pues esto puede afectar en gran medida la reproducibilidad, la linealidad y la precisión del método, reduciendo su confiabilidad. Afortunadamente, en este caso, la ausencia de otras señales vecinas reduce la posibilidad de error en la asignación de los picos.

Lo mismos picos se observaron en los extractos de cultivos celulares 4-YFP (Figura III-7, III-8, III-9 y III-10). Una estrategia que podría complementar y confirmar el análisis realizado sería la separación por HPLC, sin embargo, la separación también introduce nuevas fuentes de error (Liu *et al.*, 2016; Cappiello *et al.*, 2010) y hace difícil el análisis con muestras complejas en las que el analito de interés está en baja concentración.

En el caso de las muestras obtenidas del medio líquido para los cultivos celulares WT (Figura III-6) y 4-YFP (Figura III-11), no se observa la presencia de capsaicina ni dihidrocapsaicina, ya que las señales más cercanas en m/z no corresponden al perfil isotópico esperado, indicando la ausencia de estos compuestos en la muestra.

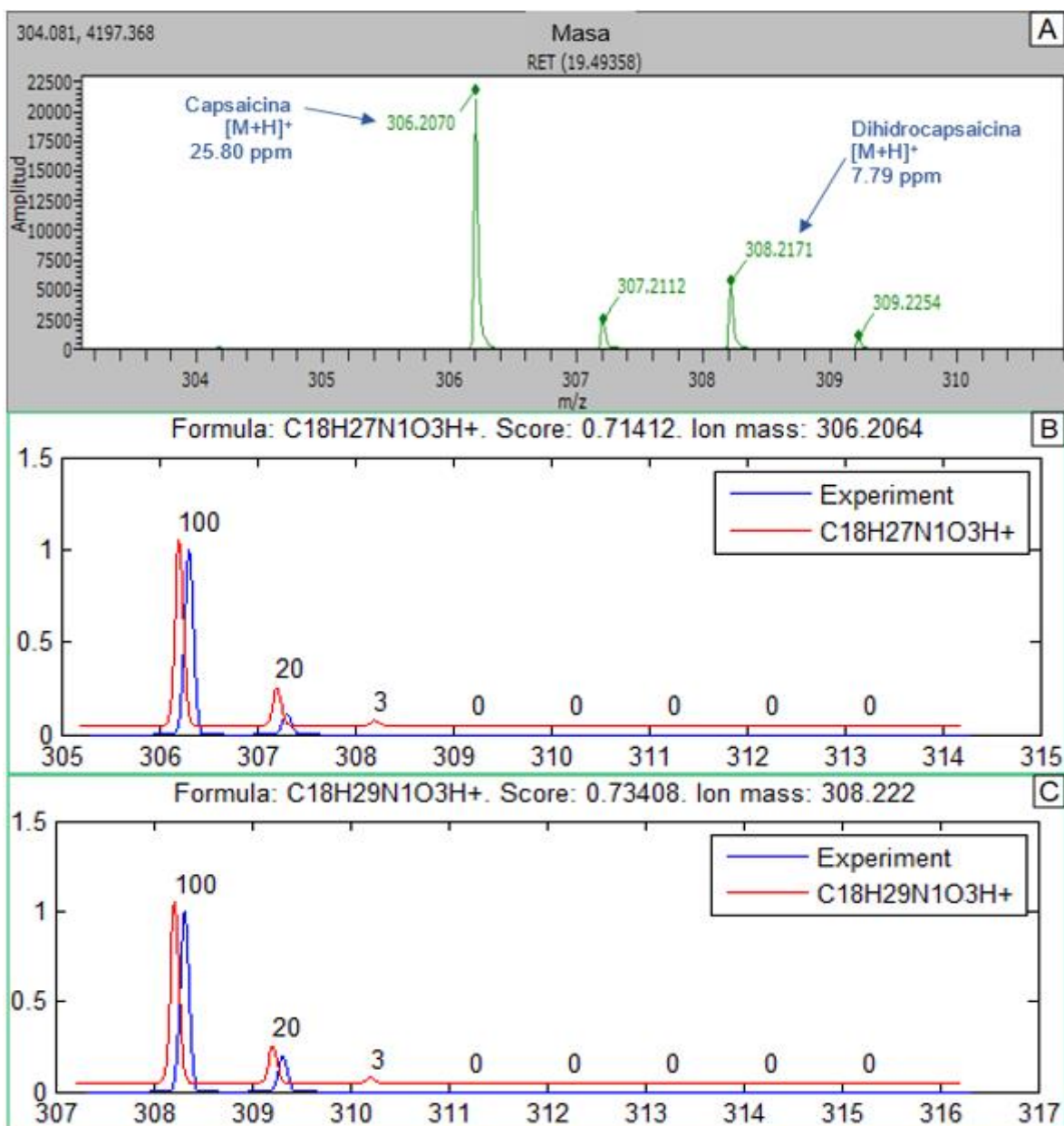


Figura 22. Estándar de capsaicina analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de valores masa/carga (m/z) de cada molécula de interés contra amplitud de la señal. Los picos teóricos (trazo rojo) se comparan con las señales detectadas por los topoisómeros de mayor abundancia (trazo azul) correspondientes para: **(B)** capsaicina con m/z de 306.2070 y 307.2112y con un error de 25.80 ppm y 15% de variación respecto del patrón isotópico teórico; **(C)** dihidrocapsaicina con m/z: 308.2171 y 309.2254 con un error de 7.79 ppm y un 10% de variación respecto al patrón isotópico teórico.

Relación entre la producción de capsaicina y dihidrocapsaicina para callos WT y 4-YFP sometidos a diferentes tratamientos

Para llevar a cabo un análisis relacionando entre el contenido de dihidrocapsaicina con respecto al de la capsaicina, se usaron los valores obtenidos del área correspondiente al pico de cada uno de los compuestos, calculados por el software y según la fórmula del esquema 2. El área proporcionada por el software TOF-MS driver® ya es la sumatoria de las señales correspondientes, de modo que basta con determinar el cociente.

$$\frac{[DHCap]}{[Cap]} = \frac{\sum_{i=1}^{i=m} A_i(DHCap)}{\sum_{i=1}^{i=n} A_i(Cap)}$$

Esquema 2. Cálculo del contenido relativo de Capsaicina/dihidrocapsaicina. En donde, [DHCap] es la concentración de dihidrocapsaicina; [Cap], la concentración de capsaicina y A_i el área bajo la curva del pico del topoisómero i , esperado para dihidrocapsaicina $A_i(DHCap)$ o capsaicina $A_i(Cap)$. Los datos numéricos se muestran en el Anexo IV, y los valores promedio y su desviación estándar para el contenido relativo de dihidrocapsaicina vs. capsaicina se resumen en la Figura 23.

A pesar de que los datos de TLC no revelaron la presencia de dihidrocapsaicina en el estándar de capsaicina, los datos obtenidos en el Anexo IV se simplificaron en la Figura 23 mostrando el valor promedio y la desviación estándar, en la cual se observa que el equipo de masas sí pudo detectar alrededor de un cociente de 0.25, que corresponde a una contaminación de ~20 % por dicho compuesto. Es claro que el estándar no es 100 % puro pero el nivel de impureza es superior al reportado por el fabricante. Para el caso del fruto de la dihidrocapsaicina es de 0.62 con respecto a la capsaicina. Es decir, la dihidrocapsaicina sería un 31.7 ± 8.86 % del total de capsaicinoides, asumiendo que los capsaicinoides menores (no analizados aquí) representan 5 % del total presente. Este resultado es como ya se indicó, concordante con lo esperado (Luo *et al.*, 2011).

En las muestras de cultivos celulares silvestres (WT), la proporción de dihidrocapsaicina es menor que en el fruto, tratamiento fotoperiodo (0.14) en o en obscuridad (0.13), pero

aumenta bajo estrés salino (tratamiento Fotoperiodo + NaCl con 0.39) o en oscuridad + NaCl (0.41).

En los cultivos transformados (4-YFP) se presenta un importante aumento en la proporción de dihidrocapsaicina siendo la relación ahora más cercana a la equimolaridad, tanto en el tratamiento de fotoperiodo (0.97) como con estrés por oscuridad, (con 0.90) o con tratamiento oscuridad + NaCl (1.01). En el caso del tratamiento con estrés osmótico y en luz (Fotoperiodo + NaCl) se observa incluso mayor presencia de dihidrocapsaicina que de capsaicina (1.57), representando en este caso un contenido aproximado de 57.9 ± 3.60 % de dihidrocapsaicina respecto de total de capsaicinoides (de nuevo considerando un 5 % de otros capsaicinoides no analizados)

Los datos obtenidos a lo largo de este estudio permiten proponer que la presencia del transgén induce una adaptación metabólica de la planta al aumentar su capacidad para soportar el estrés y esto podría responder los cambios en la acumulación relativa de capsaicina y dihidrocapsaicina favoreciendo la presencia de dihidrocapsaicina.

Este resultado es muy interesante y hace ver la posibilidad de que la pirofosfatasa inorgánica soluble esté modificando el metabolismo secundario de síntesis de capsaicinoides, si bien, futuros experimentos deberán contemplar controles adicionales para discriminar otros factores relacionados con el estrés ocasionado por la transformación y la selección, los cuales no fueron abordados aquí por limitación del tiempo para el desarrollo de esta tesis.

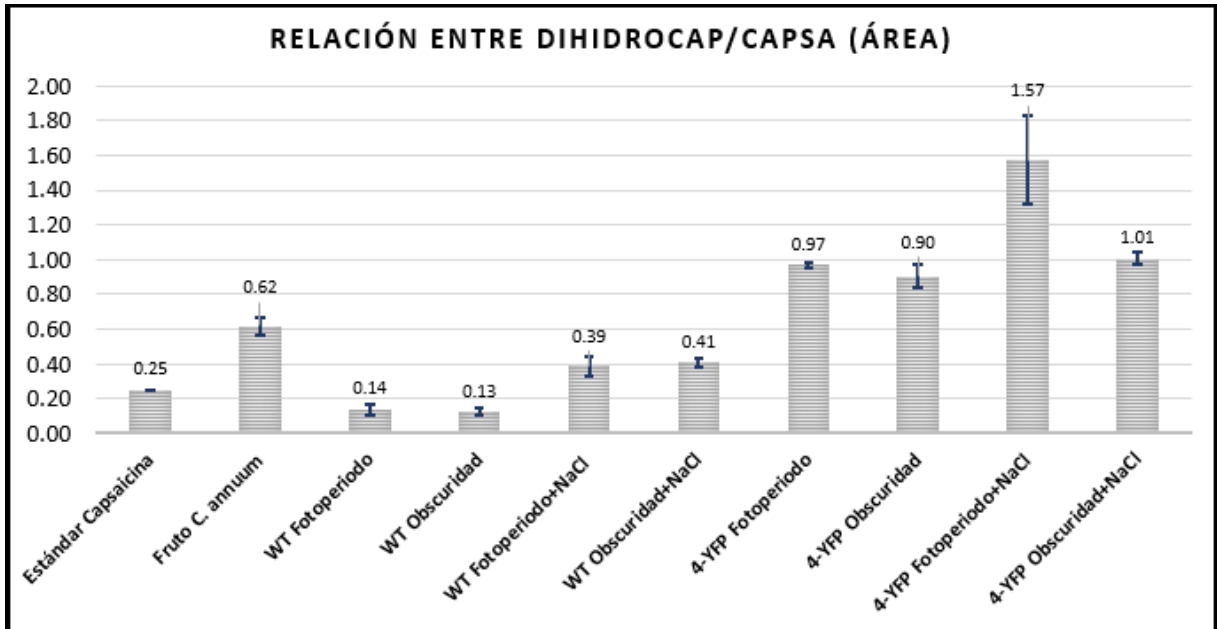


Figura 23. Contenido relativo de capsaicina y dihidrocapsaicina en el estándar de capsaicina, el extracto de placenta de fruto maduro y para cultivos en suspensión de *C. annuum* L. 'serrano' silvestre (WT) y transformado (4-YFP) crecidos por 15 días bajo el tratamiento Fotoperiodo o bajo tratamiento Oscuridad de salinidad (tratamiento Fotoperiodo + NaCl) o ambas condiciones de estrés (Oscuridad + NaCl). El análisis de los extractos obtenidos se llevó a cabo por triplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En cualquier caso, la contribución de este trabajo es significativa, pues permite que los futuros experimentos se realicen enfocándose en el tratamiento que produce los cambios más conspicuos, que corresponde al tratamiento Fotoperiodo con NaCl. Con ello se reduce el número de tratamientos que deben manejarse y es posible analizar un mayor número de líneas transformadas.

VII. CONCLUSIONES

- Por medio del cultivo de tejidos vegetales se obtuvieron cultivos celulares de *C. annuum* L. y se logró la transformación genética con la construcción 4-YFP de manera estable, para de esta forma analizar de manera relativa la acumulación de capsaicina y dihidrocapsaicina, con lo cual es posible que la alteración en los mecanismos que regulan la acumulación de capsaicinoides observada en los callos de *C. annuum* L. 'serrano' transformados con la construcción 4-YFP se deba a la sobreexpresión de la pirofosfatasa inorgánica soluble heteróloga. Si bien, en este momento no es posible descartar totalmente que se deba a otros factores.

VII. PERSPECTIVAS

Realizar transformaciones que conduzcan a la sobreexpresión de la GFP, la proteína PPa4 (de preferencia la endógena) fusionada a GFP y la proteína PPa4 silvestre, usando un promotor endógeno de chile, para determinar si en cultivos de células en suspensión de estas líneas, mantenidos con estrés salino y bajo iluminación, se reproduce la alteración en el contenido relativo de dihidrocapsaicina y si esta alteración se relaciona con la sobreexpresión de la proteína PPa4, o con algún otro de los componentes de la construcción o factores del protocolo de transformación y/o selección.

Producir estándares de capsaicina con abundancia isotópica no natural de ^{13}C , para emplearlos como estándares internos y que permitan la cuantificación absoluta de la capsaicina.

IX. REFERENCIAS

- Agrawal, S., Chandra, N., & Kothari, S. L. (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annum* L. cv. mathania). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(1), 47–55.
- Aguirre-Hernández, E., & Muñoz-Ocoter, V. (2015). El chile como alimento. *Revista de La Academia Mexicana de Ciencias*, 66(3), 16–23.
- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P. & Visser, R. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: Myths and realities. *Molecular Breeding*, 15(3), 305–327.
- Amruthraj, N.J., Raj, J. P., & Lebel, L.A. (2014). Impact of organic solvents in the extraction efficiency of therapeutic analogue capsaicin from *capsicum* Chinense Bhut Jolokia Fruits. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2), 159–164.
- Asnin, L. & Park, S. W. (2015) Isolation and analysis of bioactive compounds in *Capsicum* peppers *Crit rev food sci nutr* 55, 254-89.
- Azcón-Bieto J. & Talón M. (1993). Respiración. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Madrid, McGraw-Hillj Interamericana, 173-191 pp.
- Azofeifa, A. (2009). Revisión: Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro, *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 153-175.
- Bajer, T., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., & Ventura, K. (2015). Central composite design of pressurised hot water extraction process for extracting capsaicinoids from chili peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 32–38.

- Basurto S. M., Núñez B. A., Pérez L. R., & Hernández R. O. A. (2012). Fisiología del Estrés Ambiental en Plantas. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 54(1), 1–8.
- Bhatia, P., & Ashwath, N. (2005). Effect of duration of light: dark cycles on in vitro shoot regeneration of tomato. *Asian Journal of Plant Sciences*. 4(3), 255-260
- Bhuvaneshwari, S., S, B., Karthik, P., & Kuruvilla, A. (2013). Estimation of Capsaicin Content of Two Varieties of Green Chilies by TLC Method. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(6), 1186–1188.
- Bray M. (2019). Pepper Anatomy: What's Inside Your Chili?. [En línea] Disponible en: <https://www.pepperscale.com/pepper-anatomy/> [Último acceso el 07-abril-2020].
- Buchanan, B. B., Gruissem, W.; Jones, R. L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16.
- Cappiello, A., Famigliani, G., Palma, P. & Trufelli, H, (2010). Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33 (12), 1067-1081.
- Caribe, U. del. (2010). *Clasificación del Chile Nacional*. México.
- Chanthai, S., Juangsamoot, J., Ruangviriyachai, C., Techawongstien, S., & Kaen, K. (2012). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Some Chilli Varieties using Accelerated Solvent Extraction Associated with Solid Phase Extraction Methods and RP- HPLC-Fluorescence. *E. Journal of Chemistry*, 9(3), 1550–1561.

- Cheema, S. K., & Pant, M. R. (2011). Estimation of capsaicin in seven cultivated varieties of *Capsicum annuum* L. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 701–706.
- Das, A., Kundu, S., & Ghosh, B. (2015). A Simple and Efficient Method for Extraction and Quantification of Capsaicin from Pepper Fruits through High Performance Thin Layer Chromatography. *Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 606–612.
- De Villafranca-Casas, M. J. (2011). Alteraciones en la Expresión Génica de Mutantes de *Arabidopsis thaliana* como Resultado de la Deficiencia de una Pirofosfatasa Inorgánica Soluble. Tesis de Licenciatura. Ingeniera Química, FQ, UNAM, México D.F.
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Springer-Verlag*, 69, 1–39.
- Gahungu, A., Ruganintwali, E., Karangwa, E., Zhang, X., & Mukunzi, D. (2011). Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum chinense*) scotch bonnet variety at red stage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(3), 211–218.
- Gallego, M. R. (2007). Oleorresinas de *Capsicum* en la industria alimentaria. *Lasallista De Investigacion*, 3(2), 43–47.
- Garcés-Claver A., Arnedo-Andrés M.S., Abadía J., Gil-Ortega R & Alvarez-Fernandez A. (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25):9303-9311.

García-Contreras, R., & Romero, I. (2003). Las Pirofosfatasas. Avances recientes.

Revista de Educacion Bioquimica, 22(4), 183–190.

Geigenberger, P., Lerchi, J., Stitt, M., Sonnewald, U. (1996). Phloem-specific Expression of Pyrophosphatase Inhibits Long Distance Transport of Carbohydrates and Amino Acids in Tobacco Plants, *Plant Cell Environ*, 19, 43–55.

Goci, E., Haloçi, E., Vide, K., & Malaj, L. (2014). Application and Comparison of Three Different Extraction Methods of Capsaicin From *Capsicum* Fruits. *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 16–19.

Godoy-Hernández, G., & Vázquez-Flota, F. A. (2006) Growth Measurements. Estimation of Cell Division and Cell Expansion. En: *Plant Cell Culture Protocols.*, Eds. Loyola-Vargas & F. A. Vázquez-Flota. Totowa, NJ. 51–58 pp.

Govindappa, M., Shruthi, B., Sahana, N. M., Shwetha, S., Akshatha, R., Channabasava, & Ravishankar, R. V. (2015). Determination of Capsaicinoids from Endophytic Fungi (*Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. and *Penicillium* sp.) of *Capsicum annum* using LC-MS. *Plant Sciences Feed*, 5(2), 21–27.

Gurung, T., Techawongstien, S., Suriharn, B., & Techawongstien, S. (2011). Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *capsicum* spp. *HortScience*, 46(12), 1576–1581.

Gutiérrez-Luna F.M., de la Sancha E.N., Valencia-Turcotte L.G., Vázquez-Santana S., & Rodríguez-Sotres R. (2016) Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family I isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 253(supplement C): 229--242.

Hadacek, F. (2002). Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and

- future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273–322.
- Hansen, G., & Wright, M. S. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends. Plant Science*, 4(6), 226–231.
- Heiser, C. B., & Pickersgill, B. (2012). Names for the Cultivated *Capsicum* Species (Solanaceae). *Taxon*, 18(3), 277–283.
- Heinonen, J. K. (2001). Biological Role of Inorganic Pyrophosphate. *Springer Science-Business Media*, New York 77-121 pp.
- Hernández-Domínguez, E.E.; Valencia-Turcotte, L. G.; Rodríguez-Sotres, R. (2012). Changes in the Expression of Soluble Inorganic Pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* Under Phosphate Starvation, *Plant Science*. 187, 39–48.
- Hernández V. S. (2014). Importancia del chile silvestre (*Capsicum annum*) como recurso genético de México. *Mensaje Bioquímico*, 41, 289–304.
- Hoerlein G. 1994. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 138, 73-145.
- Ibiza, V. P., Blanca, J., Cañizares, J., & Nuez, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(6), 1077–1088.
- Kajander, T., Kellosalo, J., & Goldman, A. (2013). Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *FEBS Letters*, 587(13), 1863–1869.
- Kehie, M., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). Osmotic stress induced-capsaicin production in suspension cultures of *Capsicum chinense* Jacq.cv. Naga King Chili.

Acta Physiologiae Plantarum, 34(5), 2039–2044.

Kehie, M., Kumaria, S., Tandon, P., & Ramchiary, N. (2014). Biotechnological advances on in vitro capsaicinoids biosynthesis in *Capsicum*: a review. *Phytochemistry Reviews*, 14, 189–201.

Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: A view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell and Environment*, 27(6), 675–684.

Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers - A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35–48.

Kornberg, A. (1962) On the metabolic significance of phosphorylic and pyrophosphorylic reactions, In: Horizons in Biochemistry. Eds: Kasha M. and Pullman B. Academic Press, New York. 251-264 pp.

Kraft, K., Brown, C., Nabhan, G., Luedeling, E., De Jesús Luna Ruiz, J., D'Eeckenbrugge, G., Gepts, P. (2013). A new collection of wild populations of *Capsicum* in Mexico and the southern United States. *Genet Resour Corp Evol*, 60, 225-232.

Lan P., Li W., Wen T., Schmidt W. (2012) Quantitative phosphoproteome profiling of iron-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 159: 403-417

Li, X., Guo, Ch., Gu, J., Duan, W., Zhao, M., Ma, Ch., Du, X., Lu, W., & Xiao K. (2014). Overexpression of VP, a Vacuolar H⁺ -pyrophosphatase Gene in Wheat (*Triticum aestivum* L.), Improves Tobacco Plant Growth Under Pi and N Deprivation, High Salinity, and Drought. *Journal of Experimental Botany*, 65 (2), 683696.

- Li, Z., Baldwin C.M., Hu, Q., Liu, H., & Lou, H. (2010). Heterologous Expression of Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase Enhances Salt Toleranc in Transgenic Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Plant Cell Environ*, 33 (2), 272–289.
- Liu, R., Xiong, K., Chao-Luo, Y., Ze-Dai, X., Min-Liu, Z. & Tong- Xue, W., (2010). Changes in volatile compounds of a native Chinese chilli pepper (*Capsicum frutescens* var.) during ripening, *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2470–2475.
- Long-Solís, J. (2012). *Capsicum* y cultura: La historia del chile (2°). México: Fondo de Cultura Económica.
- Loyola-Vargas, V. M., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., & Quiroz-Figueroa, F. R. (2008). Plant Tissue Culture. In: *Molecular Biomethods Handbook*, Eds. Walker J. M. & Rapley R. Human Press Inc. Totowa, NJ. 875–904 pp.
- Luna-Ruiz JdJ, Nabhan GP , & Aguilar-Meléndez A (2018) Shifts in Plant Chemical Defenses of Chile Pepper (*Capsicum annuum* L.) Due to Domestication in Mesoamerica. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6:48.
- Luo, X. J., Peng, J., & Li, Y. J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 1–7.
- Martínez, M., Rodríguez, A., Vargas, O., & Chiang, F. (2011). *Catálogo nomenclatural de las Solanaceae de México. Universidad Autónoma de Querétaro. Informe Final SNIB-CONABIO. Proyecto HS004.* México, DF.
- McClung, C. R. (2006). Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell*, 18(4), 792–803.
- McLeod, M. J., Guttman, S. I., & Eshbaugh, W. H. (1982). Early Evolution of Chili Peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36(4), 361–368.

- Mineo, L. (1990). Plant Tissue Culture Techniques. In: *Tested studies for laboratory teaching*, Ed. Glase J. C. Hunt Publishing Company. Pennsylvania: Kendall. 151–174 pp.
- Mokhtar, M., Russo, M., Cacciola, F., Donato, P., Giuffrida, D., Riazi, A., & Mondello, L. (2016). Capsaicinoids and Carotenoids in *Capsicum annum* L.: Optimization of the Extraction Method, Analytical Characterization, and Evaluation of its Biological Properties. *Food Analytical Methods*, 9(5), 1381–1390.
- Monforte-González, M., Guzmán-Antonio, A., Uuh-Chim, F., & Vázquez-Flota, F. (2010). Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(5), 764–768.
- Monforte-González, M., Medina-Lara, F., Gutiérrez-Carbajal, G., & Vázquez-Flota, F. (2007). Capsaicinoid Quantitation by *In Situ* Densitometry of Thin Layer Chromatography Plates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(11), 1697–1704.
- Montes, S. (2010). Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México. *Inifap*. México.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4), 360–376.
- Mubeen, H., Naqvi, U. Z., Masood, A., Shoaib, M. W., & Raza, S. (2016). Gene transformation : Methods, Uses and Applications. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4(2), 1–4.

- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nagaya S , Kawamura K , Shinmyo A , & Kato K (2010) The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiology*, 51(2):328-32.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Yamasaki, S., & Masaki, I. (2012). Methods to Transfer Foreign Genes to Plants. In: *Transgenic Plants – Advances and Limitations*. Ed. Yelda O. InTech. Okayama. Japan 174–188 pp.
- Navarro de la Sancha, E., Coello-Coutiño, M.P., Valencia-Turcotte, L. G., Hernández-Domínguez E. E., Trejo-Yepes, G. & Rodríguez-Sotres, R. (2007). Characterization of Two Soluble Inorganic Pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 172(4), 796–807.
- Navarro de la Sancha, E. (2009). Localización Intracelular de Algunas Isoenzimas de Pirofosfatasa en Plantas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. FQ, UNAM, México D.F.
- Nicolaï, M., Cantet, M., Lefebvre, V., Sage-Palloix, A.-M., & Palloix, A. (2013). Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 2375–2390.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2017) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th Ed., MacMillan learning-MacMillan One, New York, NY
- Perales-Baños, L. R. (2008). Caracterización de Mutantes de *Arabidopsis thaliana* y su

Respuesta a condiciones de Estrés. Tesis de Licenciatura. Químico Fármaco Biólogo, FQ, UNAM, México DF.

Pérez, A. B. C., Hernández, V. A. G., Marcos, R., Hernández, S., Gutiérrez, M. A., Béjar, A. A. G. (2007). Capsaicinoids, Vitamin C and Heterosis during fruit development of Manzano Hot Pepper. *Agrociencia*, 41, 627–635.

Pérez, M., Castañón, G., & Ramírez, M. (2015). Avances y Perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 117–128.

Pérez Millan, M. I., & Becu-Villalobos, B. (2009). Avances en la tecnología para obtener nuevas proteínas fluorescentes. *Medicina*, 69, 370–374.

Perucka, I., & Oleszek, W. (2000). Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 71(2), 287–291.

Pickersgill, B. (1971). Relationships Between Weedy and Cultivated Forms in Some Species of Chili Peppers (Genus *capsicum*). *Society for the Study of Evolution*, 25(4), 683–691.

Plaxton. W.C. (2010). Metabolic Flexibility Helps Plants to Survive Stress. *Plant Physiology and Development*. [En línea] Disponible en: <http://6e.plantphys.net/essay12.01.html> [Último acceso el 06-abril-2020].

Ramachandra R., S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153.

Reyes-Escogido, M. de L., Gonzalez-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E.

- (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 16(2), 1253–1270.
- Santos, T.C., Arrigoni-Blank, M.F., Blank, A.F., & Menezes, M.M.L.A., (2016). In vitro conservation of vetiver accessions, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). *Bioscience Journal* 28 (6), 963–970.
- SAGARPA, (2017) Chiles y pimientos Mexicanos. 2017-2030. [En Línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/produccion-del-chile-mexicano> [Último acceso el 19-julio-2017].
- Scoville, W.L. 1912. Note on Capsicum. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 1:453
- Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo Argentino Para La Información y El Desarrollo de La Biotecnología.* 2, 5,8.
- Sganzerla, M., Coutinho, J. P., de Melo, A. M. T., & Godoy, H. T. (2014). Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food Research International*, 64, 718–725.
- Srinivasan K. (2016) Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annuum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56: 1488-1500
- Tapia, J., & Bonilla-petriciolet, A. (2008). Isolation of Capsaicinoids from the *capsicum* fruit. *Afinidad*, 536, 307–313.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., Klerk, G.-J., Roberts, A., & E.F., G. (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 1(1962), 115–

174.

- Trull, M. C., & Deikman, J. (1998). An Arabidopsis Mutant Missing one Acid Phosphatase Isoform. *Planta*, 206(4), 544–550.
- Vasil, I. K., & Vasil, V. (1972). Totipotency and Embryogenesis in Plant Cell and Tissue Cultures. *Society for In Vitro Biology*, 8(3), 117–127.
- Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, M. D. L., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., & Nieto-Pelayo, Y. (2007). La biosíntesis de Capsaicinoides, el Principio Picante del Chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 353–360.
- Verpoorte, R., & Alfermann, A. W. (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. *Kluwer Academic Publishers*. Boston.
- Wagner, C. E., Cahill, T. M., & Marshall, P. A. (2011). Extraction, Purification, and Spectroscopic Characterization of a Mixture of Capsaicinoids. *Journal of Chemical Education*, 88(11), 1574–1579.
- Wang, D., & Bosland, P. W. (2006). The Genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41(5), 1169–1187.
- Wahyuni, Y, Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J. and Bovy, A. G. (2011) Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72, 1358 - 1370
- Wahyuni Y, Ballester A, Sudarmonowati E , Bino RJ , & Bovy AG (2013) Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J Nat*

Prod 76(4):783-93.

Weathers, P. J., Fadzillah, N. A. M., & Cheetham, R. D. (1992). Light inhibits the formation of capsaicin from *Capsicum* callus. *Planta Medica*, 58(3), 278–279.

Welter, K. (2008). La proteína verde fluorescente una herramienta valiosa en la biomedicina. *Journal Of Cellular And Comparative Physiology*, 3(3), 99–103.

Zaragoza-Pérez F. A. (2016). Establecimiento caracterización y transformación de cultivos *in vitro* de dos especies de *Capsicum* (*C. annum* L y *C. chinense* jac.). Tesis de Licenciatura. Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.

Zhigila, D. A., Abdulrahman, A. A., Kolawole, O. S., & Oladele, F. A. (2014). Fruit Morphology as Taxonomic Features in Five Varieties of *Capsicum annum* L. Solanaceae. *Journal of Botany*, 20, 1–6.

X. ANEXOS

Anexo I. Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

Tabla I- 1. Composición de sales con macro- y micronutrientes.

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M. (g)	Cantidades para un litro (1X)	
			Masa (mg)	Moles (mM)
Compuestos inorgánicos				
Macronutrientes				
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	1900	18.791
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	1650	20.614
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	440	2.993
	CaCl ₂ .H ₂ O	128.99	385.93	2.993
	CaCl ₂	110.99	332.08	2.993
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	370	1.501
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	154.086	192.48	1.249
	KH ₂ PO ₄	136.09	170	1.249
	K ₂ HPO ₄	174.2	217.6	1.249
Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	22.3	0.099
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	16.7	0.099
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6	0.0299
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.86	6.2	0.1002
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.99x10 ⁻³
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025	0.1 μM
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.25	1.03 μM
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	0.025	0.105 μM
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.8	0.1
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	33.28	0.099
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.3	37.3	0.099

Tabla I- 2. Vitaminas originales.

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M. (g)	Cantidades para un litro (1X)	
			Masa (mg)	Moles (mM)
Compuestos orgánicos				
Aminoácidos				
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	2	0.0266
Vitaminas				
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₅	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₆ S.HCl	337.3	0.1	2.964x10 ⁻⁴
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.5	4.062x10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	0.5	2.432x10 ⁻³

Tabla I- 3. Vitaminas B5 para medio MSB5.

Vitaminas B5

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M. (g)	Cantidades para un litro (1X)	
			Masa (mg)	Moles (M)
Compuestos orgánicos				
Vitaminas				
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₅	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₆ S.HCl	337.3	10	2.964x10 ⁻⁴
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	1	4.062x10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	1	2.432x10 ⁻³

Anexo II. Preparación de balas de tungsteno con DNA para el bombardeo

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml colocar 50 μl de micropartículas de tungsteno.
2. Colocar en la pared del tubo Eppendorf 5 μl de DNA de interés [$1 \mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$] y 50 μl de CaCl_2 2.5 M, evitando que el DNA y el CaCl_2 se mezcle con las micropartículas de tungsteno.
3. Posteriormente agregar 20 μl de espermidina 0.1 M para mezclar el DNA y el CaCl_2 y resuspender con micropartículas con ayuda de micropipeta de 200 μl .
4. Agitar durante 1 minuto con vortex e incubar la mezcla durante 5 minutos.
5. Centrifugar por 1 minuto y retirar el sobrenadante.
6. Añadir 140 μl de etanol al 70 % y mezclar por 1 minuto con vortex.
7. Centrifugar por 1 minuto y retirar el sobrenadante.
8. Añadir 140 μl de etanol al 100% (grado HPLC) y mezclar por 1 minuto con vortex.
9. Centrifugar por 1 minuto y retirar el sobrenadante.
10. Agregar 48 μl de etanol al 100% (grado HPLC).
11. Resuspender con ayuda de una micropipeta de 1000 μl .
12. Depositar en el *Macrocarrier* 8 μl de la mezcla. Dejar que etanol se evapore y colocar la muestra en la cámara de biobalística.
13. Llevar a cabo el bombardeo.

Anexo III. Resultados obtenidos al analizar los extractos obtenidos para diferentes muestras usando el software TOF MS Drive.

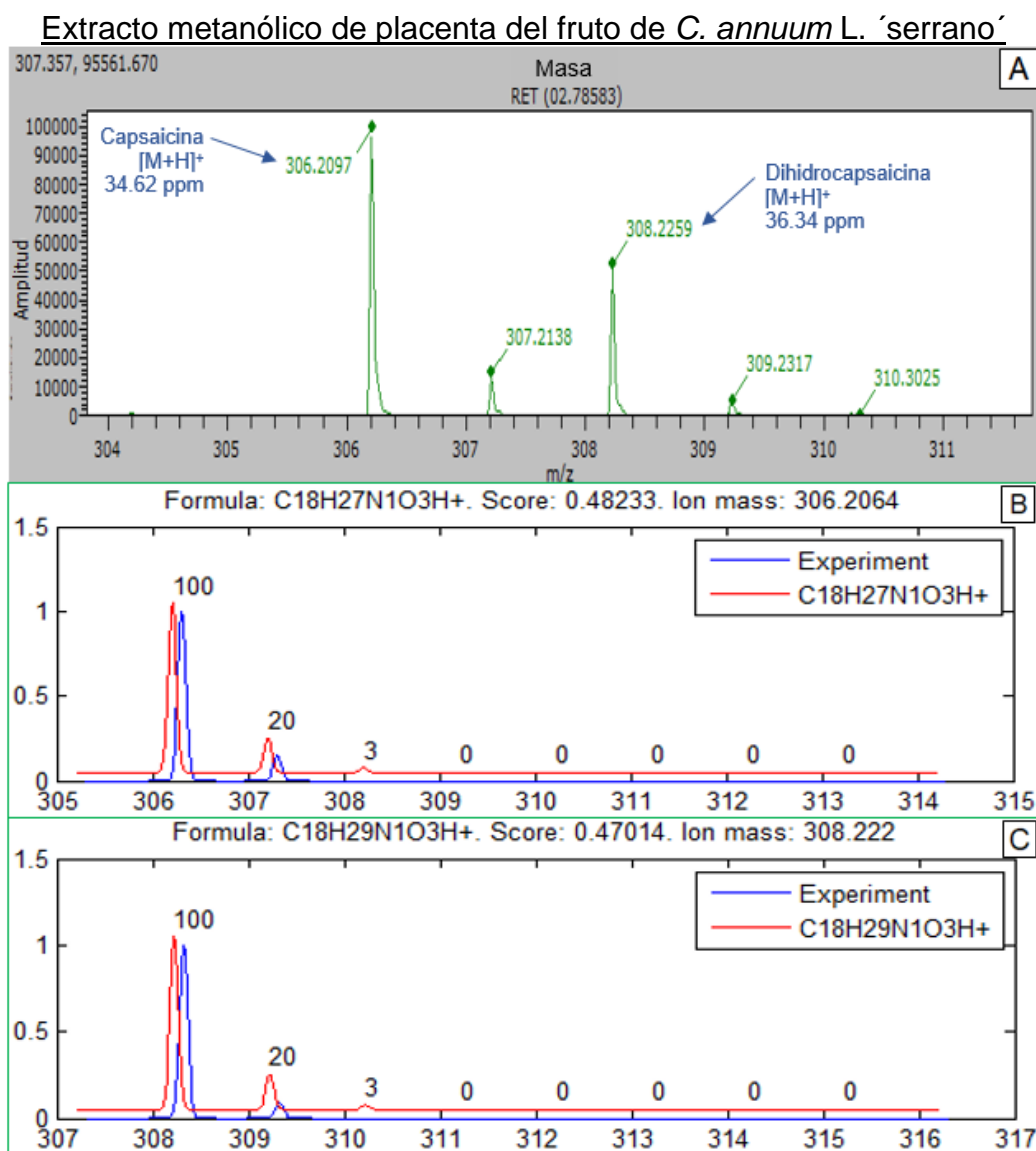


Figura III-1. Extracto metanólico de placenta de fruto de *C. annuum* L analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z : 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo WT sometido al tratamiento Fotoperiodo

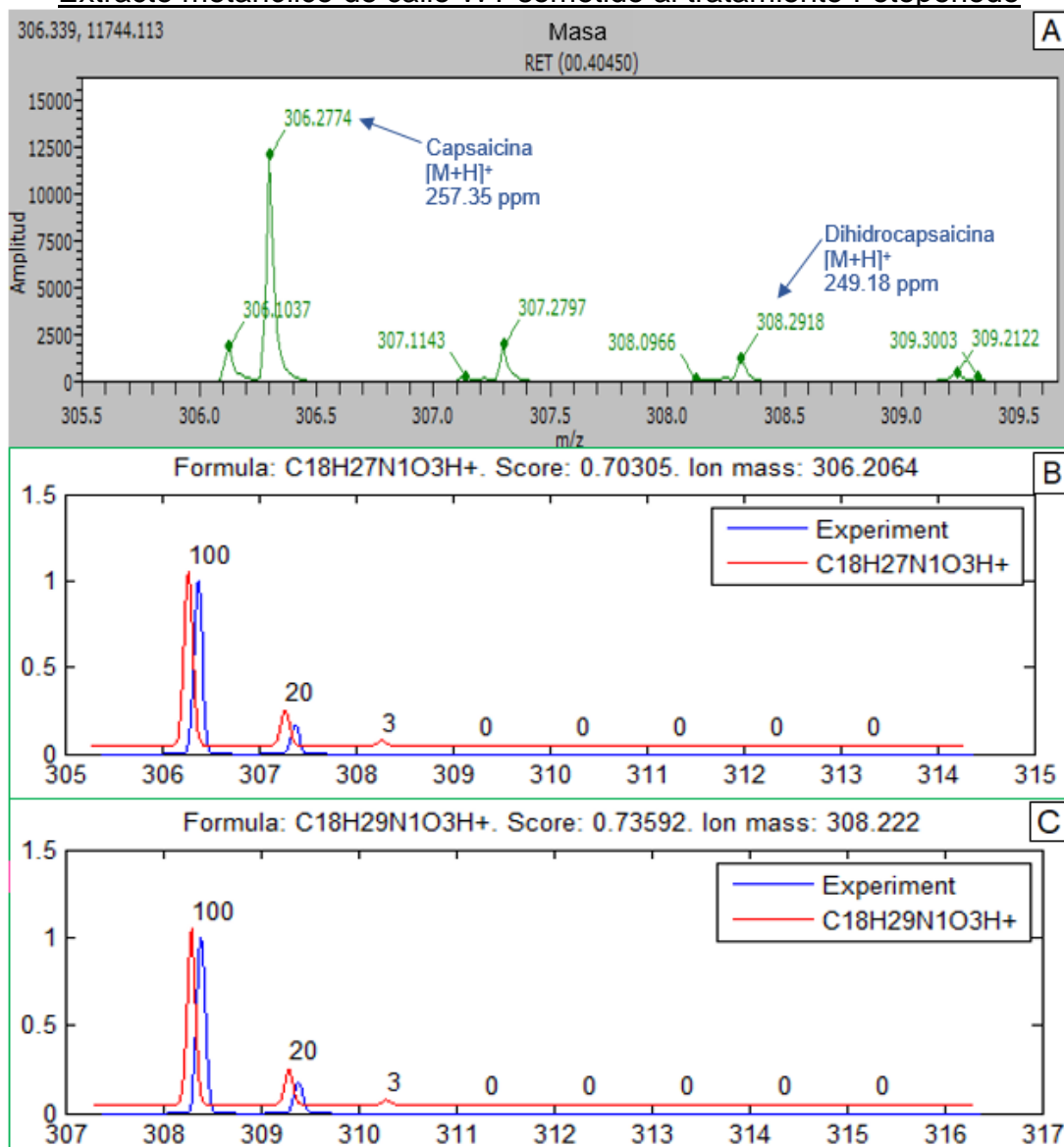


Figura III-2. Tratamiento Fotoperiodo de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo WT sometido al tratamiento Obscuridad

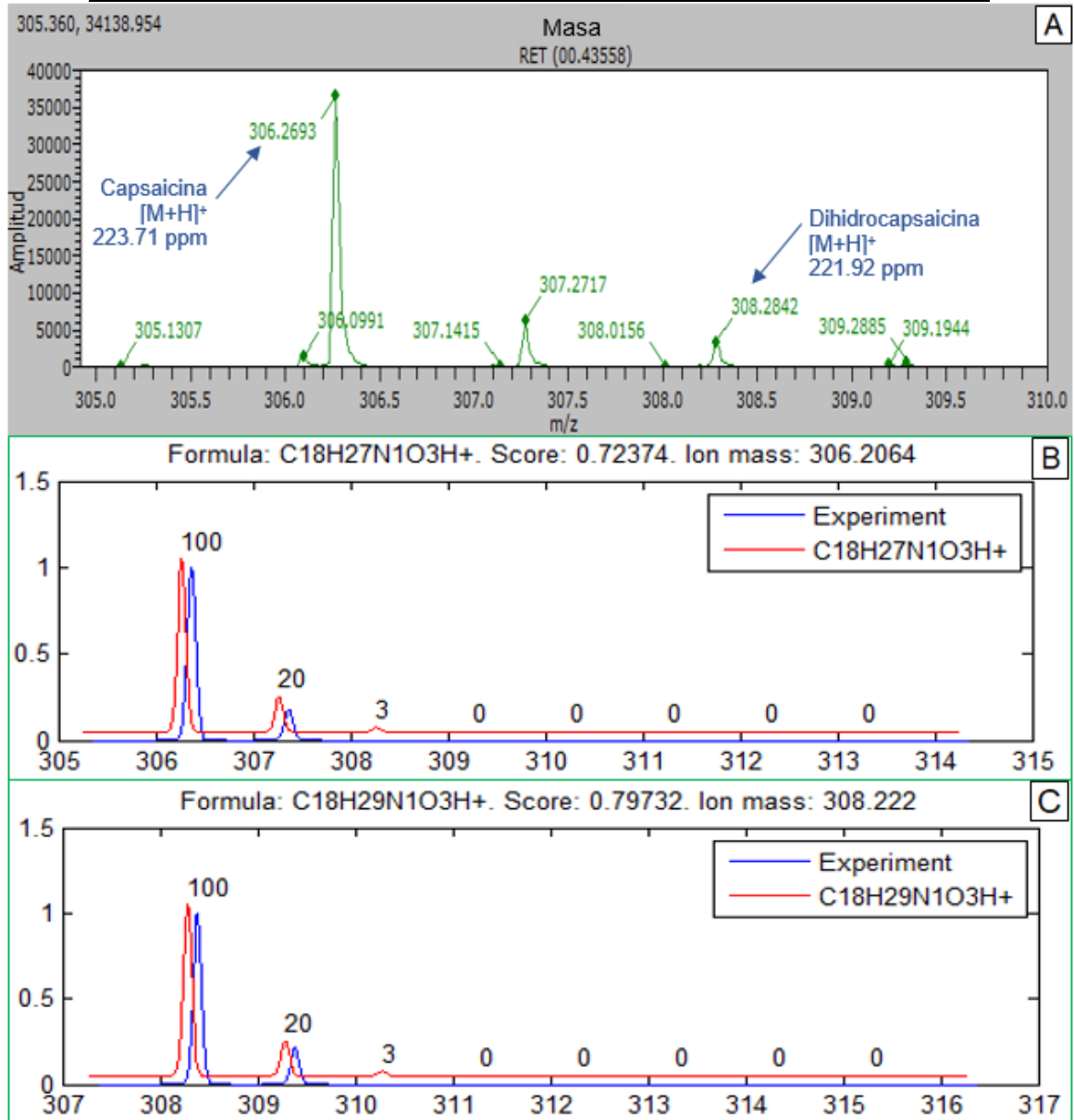


Figura III-3. Tratamiento Obscuridad de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo WT sometido al tratamiento Fotoperiodo + NaCl

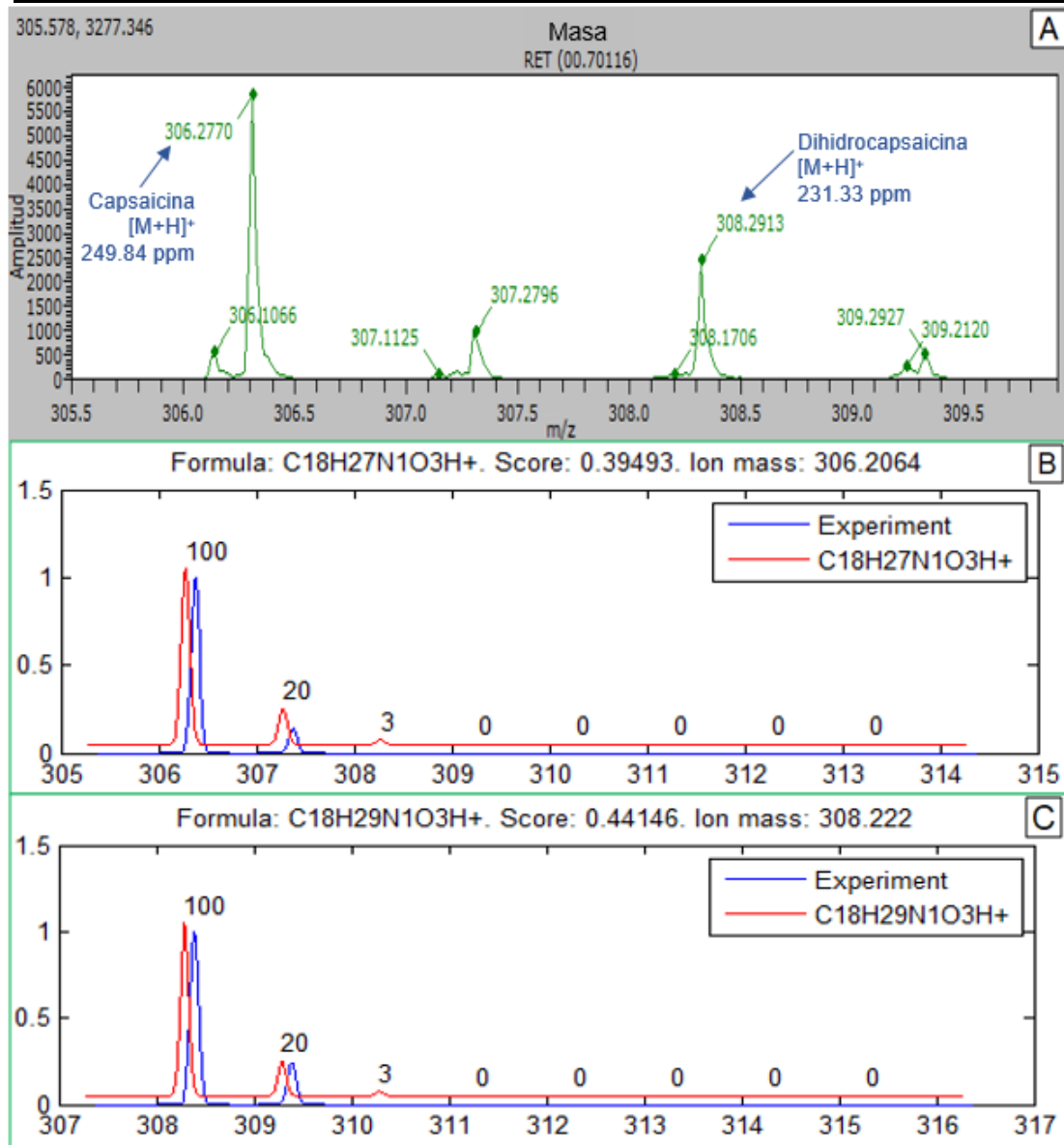


Figura III-4. Tratamiento Fotoperiodo + NaCl de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z : 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo WT sometido al tratamiento Obscuridad + NaCl

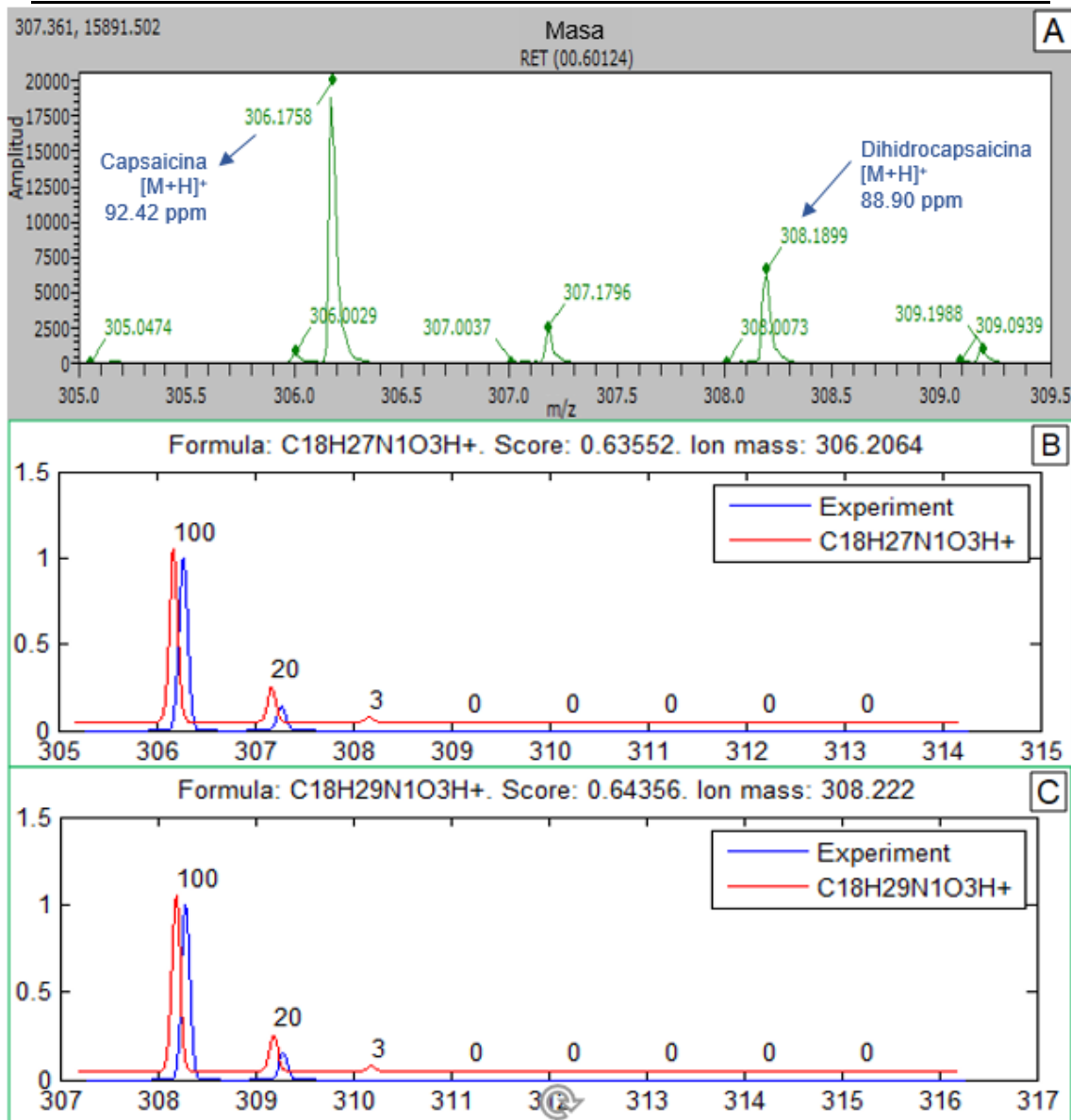


Figura III-5. Tratamiento Obscuridad + NaCl de callo WT analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Resultados obtenidos al realizar la extracción con acetato de etilo al medio de cultivo líquido de callos WT sometidos a diferentes tratamientos

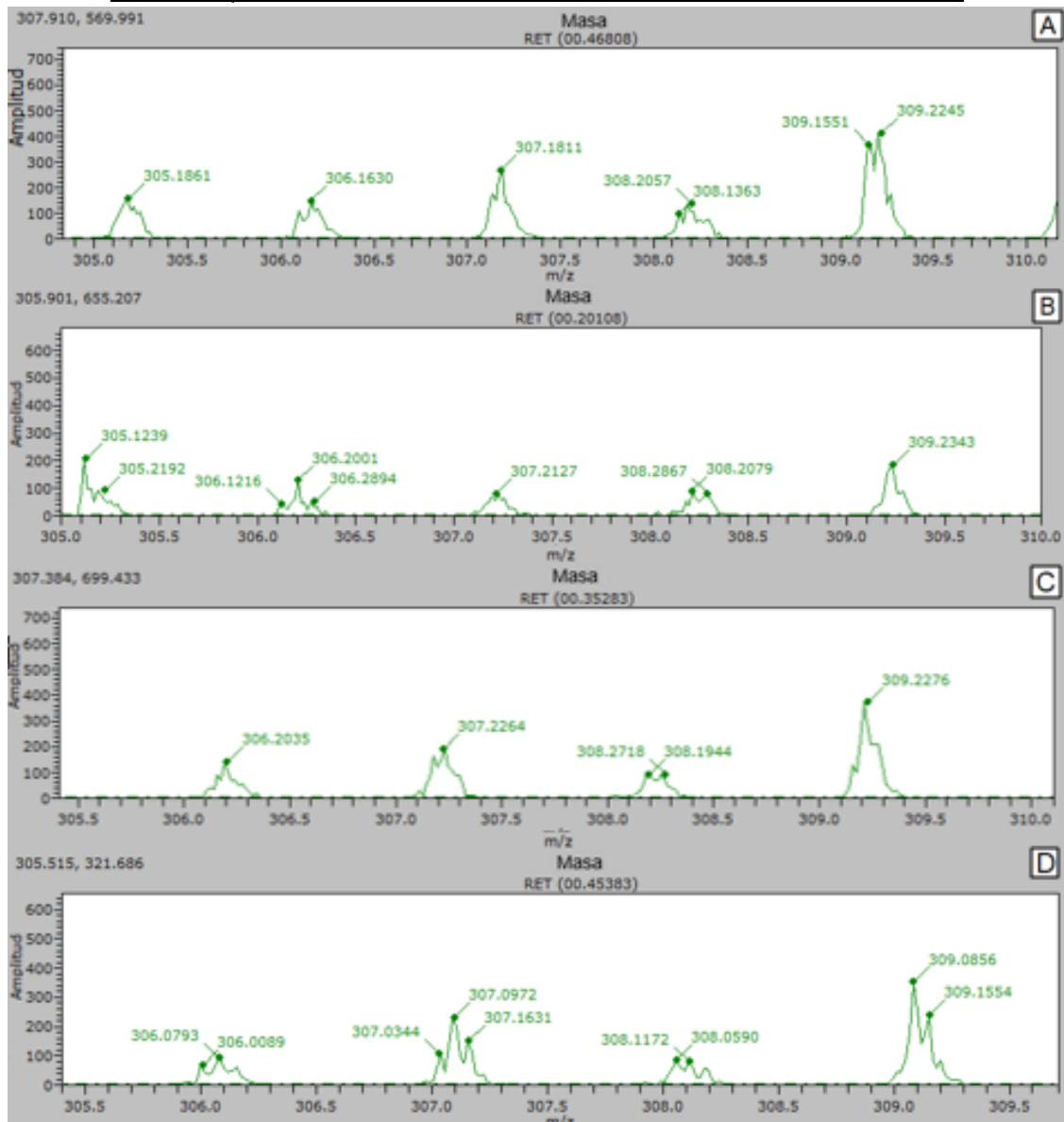


Figura III-6. Extractos realizados al medio de cultivo líquido obtenido después de someter a diferentes tratamientos los callos WT de *C. annuum* L. analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, (A) Tratamiento Control. (B) Tratamiento Oscuridad. (C) Tratamiento NaCl. (D) Tratamiento NaCl + Oscuridad. No se observa la presencia de capsaicina ni dihidrocapsaicina en ninguno de los tratamientos usados.

Extracto metanólico de callo 4-YFP sometido al tratamiento Fotoperiodo

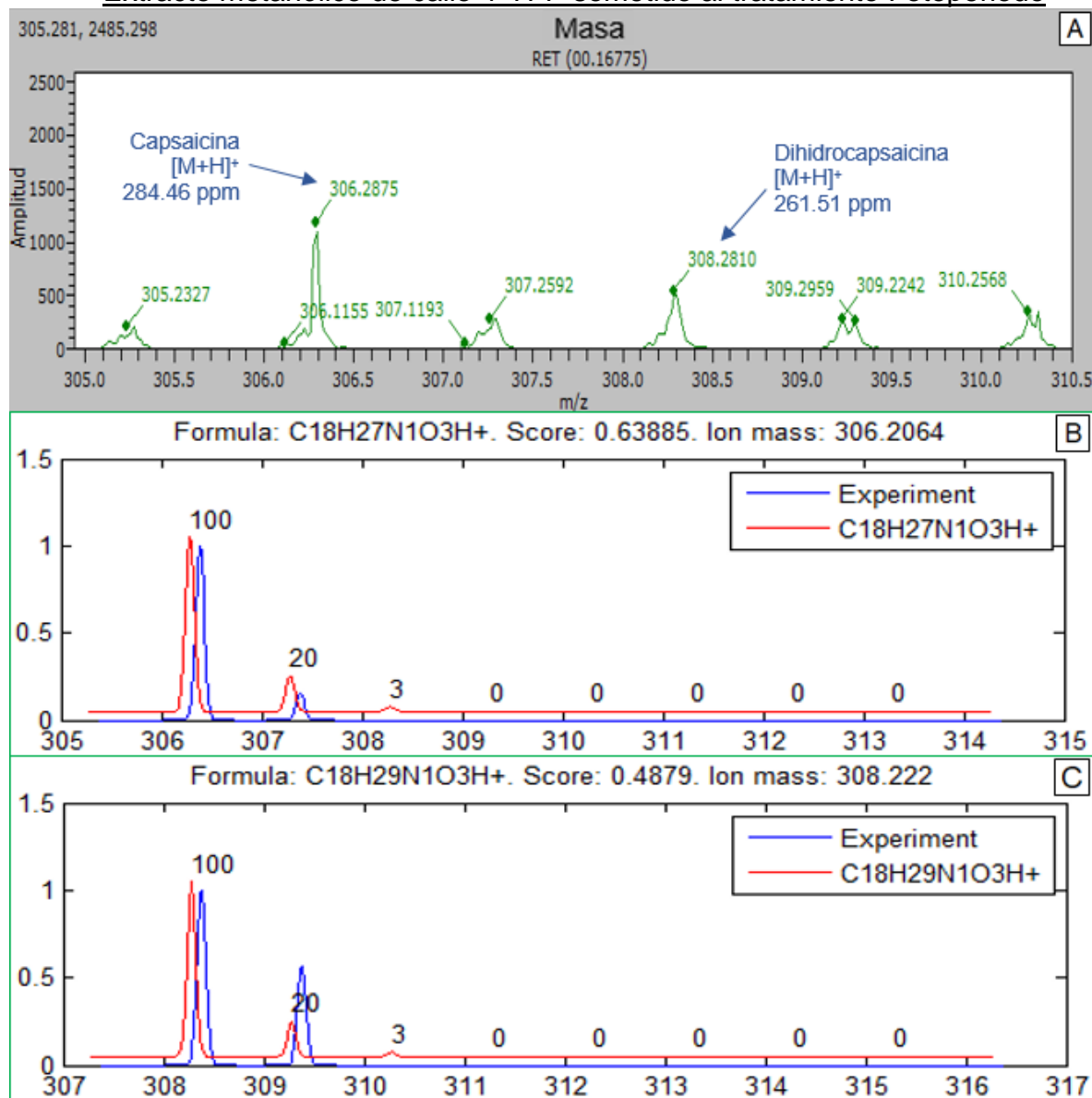


Figura III-7. Tratamiento Fotoperiodo de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS[®], **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo 4-YFP sometido al tratamiento Obscuridad

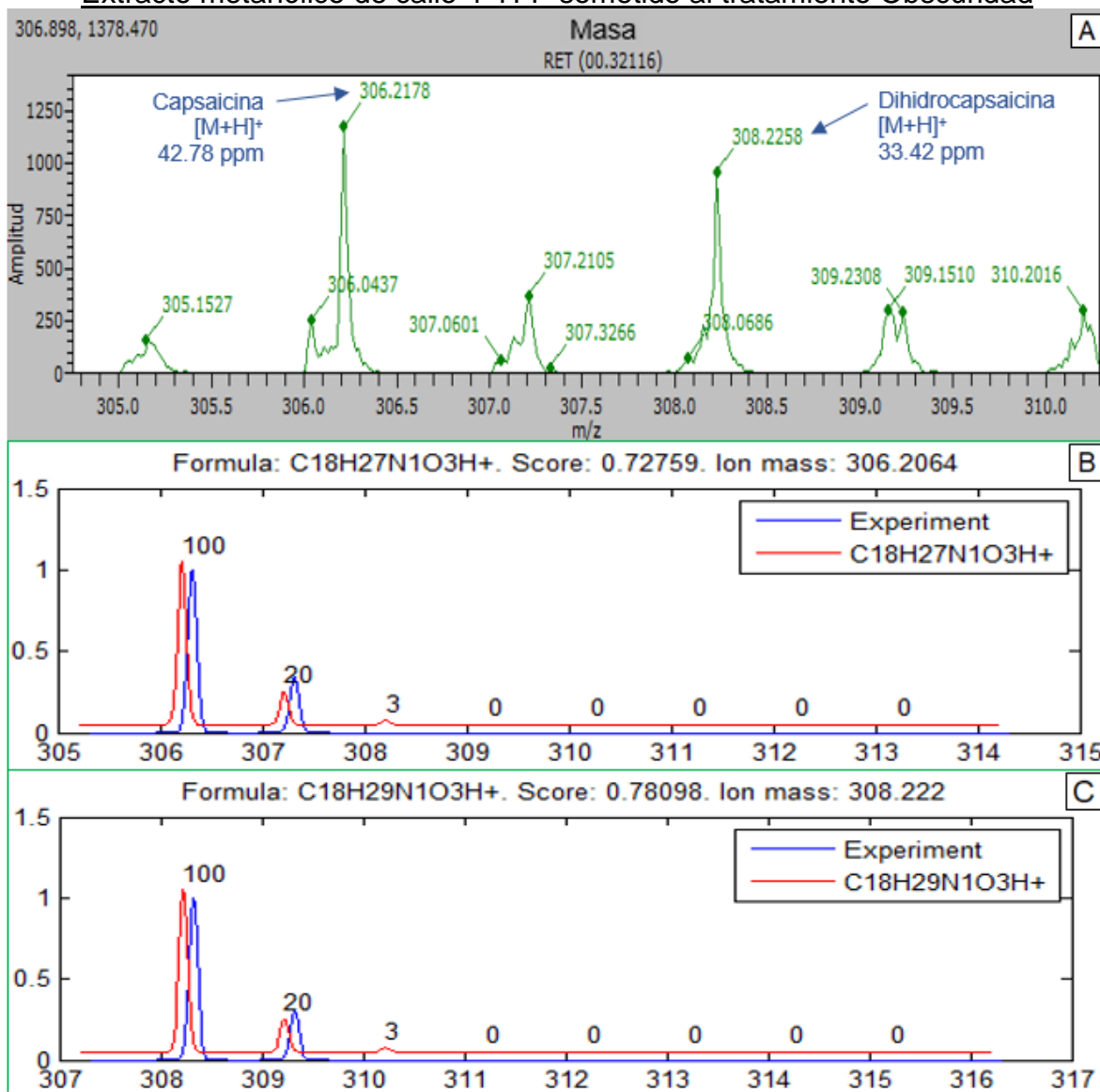


Figura III-8. Tratamiento Obscuridad de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo 4-YFP sometido al tratamiento Fotoperiodo + NaCl

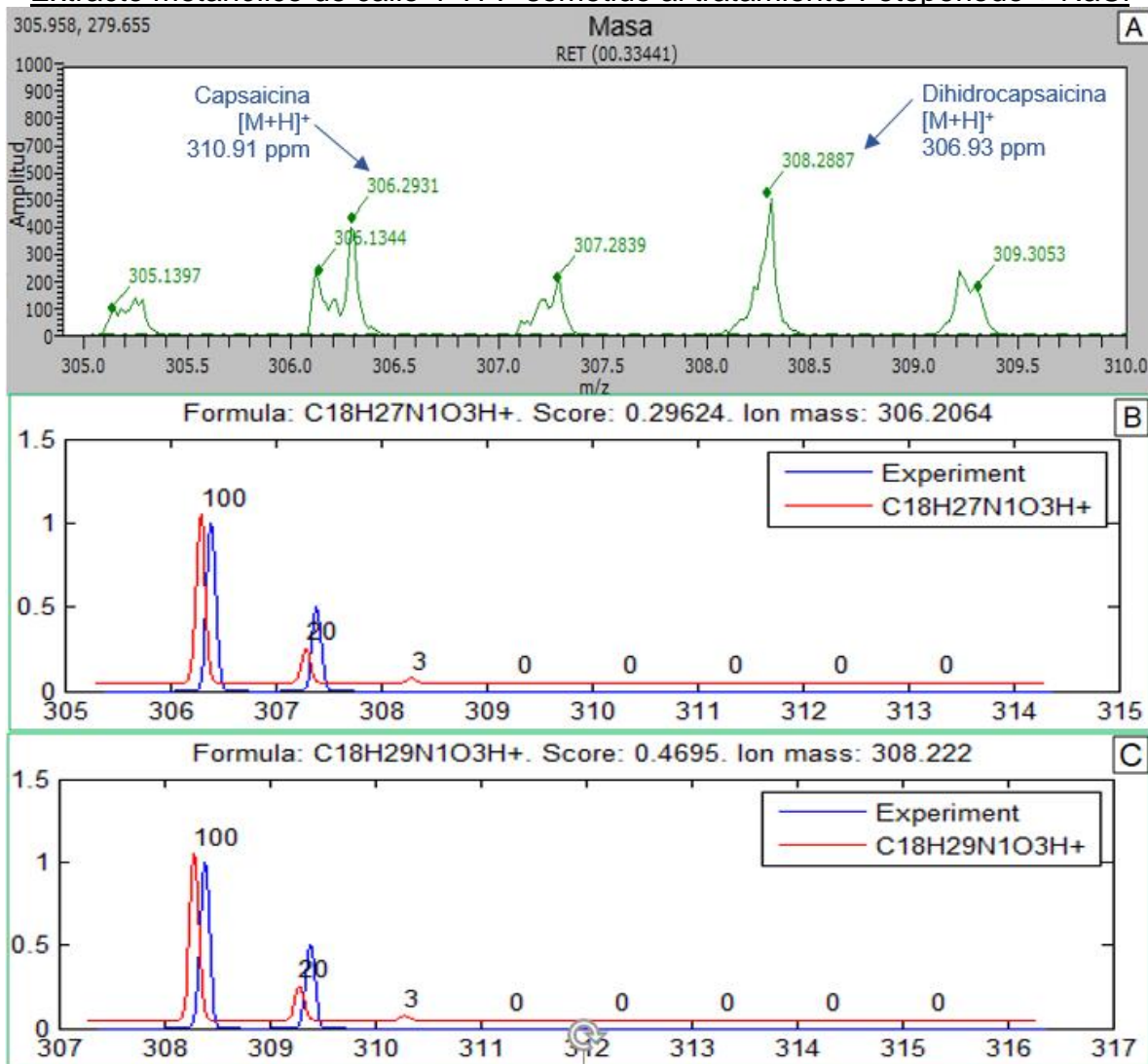


Figura III-9. Tratamiento Fotoperiodo + NaCl de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, (A) Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para (B) capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); (C) dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Extracto metanólico de callo 4-YFP sometido al tratamiento Oscuridad + NaCl

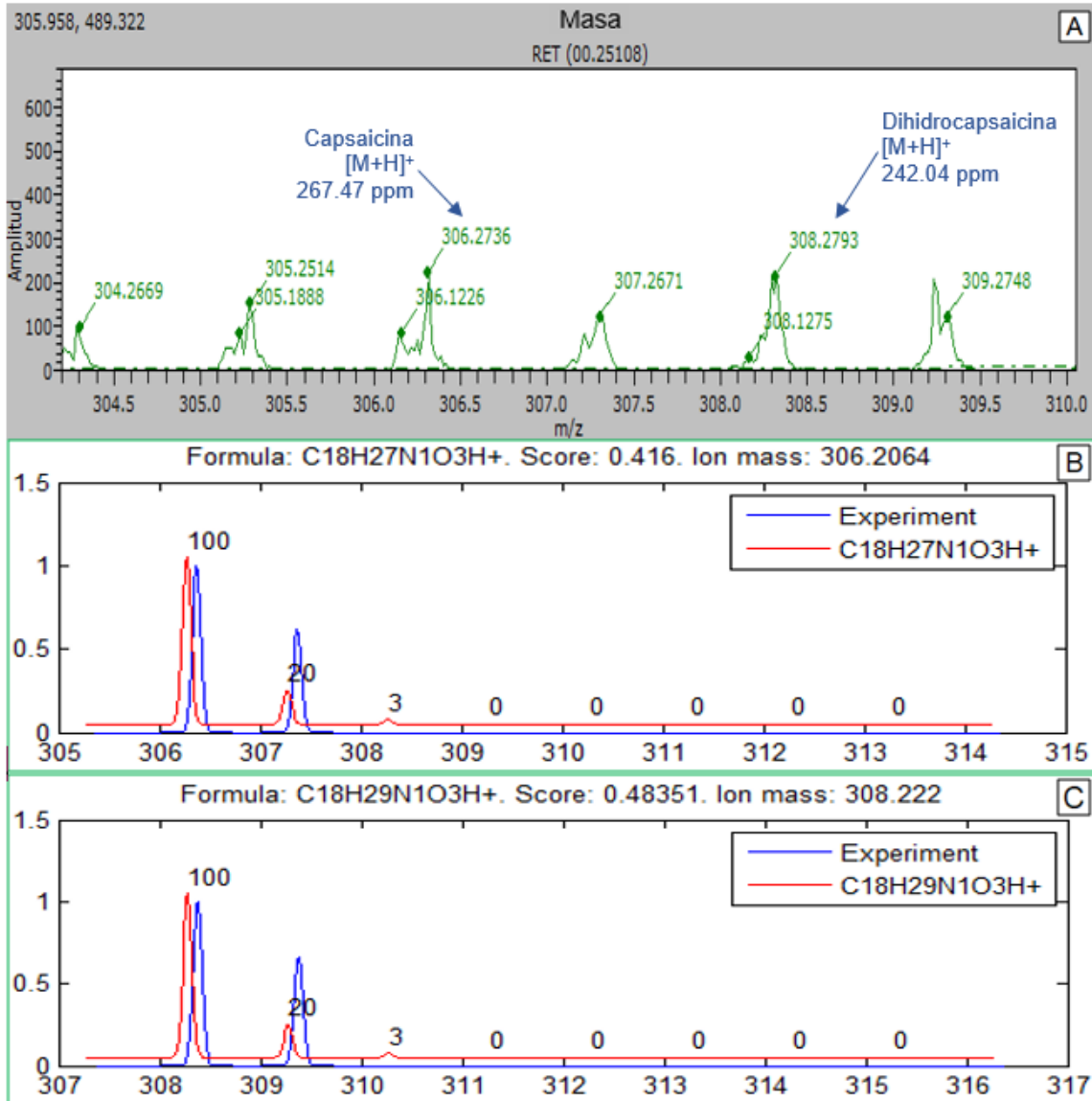


Figura III-10. Tratamiento Oscuridad + NaCl de callo 4-YFP analizado con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Espectro de señales masa/carga (m/z) contra amplitud de la señal. La comparación de señales esperadas y detectadas para **(B)** capsaicina (m/z 306.2097 y 307.2138; error 34.62 ppm y 20% de variación del patrón isotópico teórico); **(C)** dihidrocapsaicina (m/z: 308.2259 y 309.2317, error 36.34 ppm y un 20% de variación del patrón isotópico teórico).

Resultados obtenidos al realizar la extracción con acetato de etilo al medio de cultivo líquido de callos 4-YFP sometidos a diferentes tratamientos

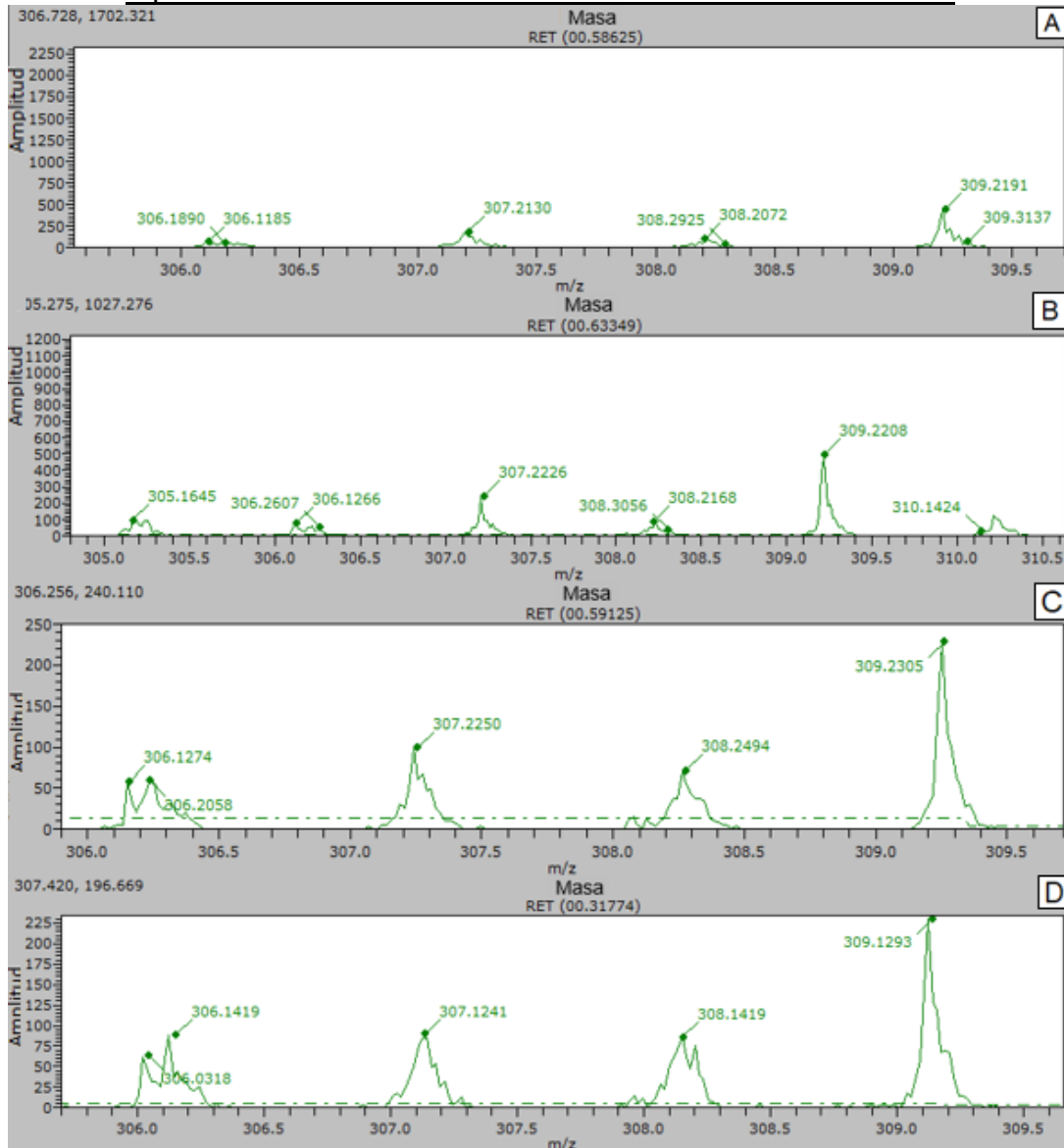


Figura III-11. Extractos realizados al medio de cultivo líquido obtenido después de someter a diferentes tratamientos los callos 4-YFP de *C. annuum* L. analizados con AxION 2 DSA TOF MS®, **(A)** Tratamiento Fotoperiodo. **(B)** Tratamiento Oscuridad. **(C)** Tratamiento Fotoperiodo + NaCl. **(D)** Tratamiento Oscuridad + NaCl. No se observa la presencia de capsaicina ni de dihidrocapsaicina en ninguno de los tratamientos usados.

Anexo IV. Relación entre la producción de dihidrocapsaicina con respecto a la capsaicina usando el área de los picos correspondientes para cada compuesto

Resultados obtenidos al analizar extractos obtenidos de Fruto de *C. annuum* L. (serrano) y de callos WT y 4-YFP sometidos a diferentes tratamientos durante 15 días, para obtener la relación entre el área de dihidrocapsaicina con respecto al área de la dihidrocapsaicina y ver la relación entre la producción de capsaicina y dihidrocapsaicina. Cada análisis se realizó por triplicado.

Tabla IV- 1. Resultados obtenidos para calcular la relación entre capsaicina y dihidrocapsaicina analizados con AxION 2 DSA TOF MS®.

Muestra	Capsaicina 306.1991 g mol ⁻¹		Dihidrocapsaicina 308.2147 g mol ⁻¹		Relación entre dihidrocap/capsa (Área)
	Amplitud máxima (m/z)	Área	Amplitud máxima (m/z)	Área	
Estándar Capsaicina Sigma	306.207	667.02	308.2171	167.4	0.2510
Fruto <i>C. annuum</i>	306.208	3222.9	308.2273	1877.48	0.5825
	306.21	886.14	308.2206	259.9	0.5935
	306.216	2617.7	308.2315	1761.27	0.6728
Extracciones realizadas para callo (peso seco)					
Callo WT Fotoperiodo	306.278	54.54	308.2915	9.57	0.1755
	306.276	794.21	308.2939	95.2	0.1199
	306.274	393.35	308.2898	47.89	0.1217
Callo WT Oscuridad	306.277	173.96	308.2984	24.27	0.1395
	306.268	1226.4	308.2831	130.22	0.1062
	306.272	412.47	308.2823	54.71	0.1326
Callo WT Fotoperiodo + NaCl	306.269	546.83	308.2843	212.53	0.3887
	306.275	809.45	308.2919	267.73	0.3308
	306.276	186.33	308.286	83.41	0.4476
	306.171	670.72	308.1873	253.75	0.3783

Callo WT Obscuridad + NaCl	306.216	101.02	308.2257	43.56	0.4312
	306.264	449.35	308.2793	186.35	0.4147
Medio líquido WT Fotoperiodo	0	0	0	0	0.0000
Medio líquido WT Obscuridad	0	0	0	0	0.0000
Medio líquido WT Fotoperiodo + NaCl	0	0	0	0	0.0000
Medio líquido WT Obscuridad + NaCl	0	0	0	0	0.0000
Callo 4-YFP Fotoperiodo	306.289	51.95	308.2968	49.46	0.9521
	306.286	42.78	308.2953	42.11	0.9843
	306.263	34.25	308.2626	33.1	0.9664
Callo 4-YFP Obscuridad	306.212	47.24	308.225	45.98	0.9733
	306.278	37.14	308.2963	31.11	0.8376
	306.214	44.82	308.225	40.5	0.9036
Callo 4-YFP Fotoperiodo + NaCl	306.294	20.11	308.3093	37.24	1.8518
	306.171	20.82	308.1792	31.37	1.5067
	306.172	20.03	308.1799	27.09	1.3525
Callo 4-YFP Obscuridad + NaCl	306.255	44.74	308.2703	43.46	0.9714
	306.281	32.58	308.2893	32.81	1.0071
	306.268	30.41	308.2795	31.6	1.0391
Medio líquido4-YFP Fotoperiodo	0	0	0	0	0.0000
Medio líquido4-YFP Obscuridad	0	0	0	0	0.0000
Medio líquido4-YFP Fotoperiodo + NaCl	0	0	0	0	0.0000
Medio líquido4-YFP Obscuridad + NaCl	0	0	0	0	0.0000