

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY
ESCUELA DE INGENIERÍA Y SISTEMAS DE INFORMACIÓN



ANÁLISIS METABOLÓMICO DIFERENCIAL EN FRUTO DE CHILE HABANERO
(*Capsicum chinense* Jacq.) DURANTE MADURACIÓN Y EN RESPUESTA A
CONDICIONES EDÁFICAS SUBÓPTIMAS

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

POR:
RAFAEL URREA LÓPEZ

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 2014

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

ESCUELA DE INGENIERÍA Y SISTEMAS DE INFORMACIÓN

Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por el M.C. Rafael Urrea López, sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

Doctor en Ciencias de Ingeniería con
Especialidad en Biotecnología

Comité de Tesis:

Rocío Isabel Díaz de la Garza, Ph.D.
Director

Juan Ignacio Valiente Banuet, Ph.D.
Co-director

Víctor Manuel Treviño Alvarado, Ph.D.
Sinodal

Guy A. Cardineau, Ph.D.
Sinodal

Héctor Gordon Nuñez Palenius, Ph.D.
Sinodal externo

Neale Ricardo Smith Cornejo, Ph.D.
Director de Programa de Ciencias de Ingeniería
Mayo de 2014

Análisis metabolómico diferencial en fruto de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante maduración y en respuesta a condiciones edáficas subóptimas

Por
RAFAEL URREA LÓPEZ

TESIS

Presentada al Programa de Graduados en Ingeniería

Este trabajo es requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de la Ingeniería con
Especialidad en Biotecnología

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY

Mayo 2014

Dedicatoria

**A mi esposa Natalia, porque este sueño profesional
sin ti no sería posible**

Agradecimientos

A mi esposa Natalia por ser el soporte emocional en este largo y retador trayecto, sin tu apoyo incondicional para perseguir mis sueños profesionales esto hubiera sido imposible, mil gracias por acompañarme, ayudarme y motivarme.

A mis asesores por la confianza y apoyo académico para el desarrollo de un proyecto retador y novedoso que enriqueció mi formación y mi visión del área de biología molecular vegetal y analítica.

A mi amigo Carlos Rodríguez por el apoyo desinteresado en el área analítica y de procesamiento de datos, su compromiso y dedicación no solo fueron determinantes en obtener buenos resultados y a tiempo sino que son un gran ejemplo de integridad profesional.

A Caro, Roberto, Marco, Alex, Felipe, Ever y todos los buenos amigos con los que compartí tantas experiencias en el laboratorio y por fuera de él.

A todos aquellos que colaboraron en alguna medida en el desarrollo de este estudio.

Al ITESM y la cátedra y proyectos del Dr. Valiente por el apoyo económico de la colegiatura y muchos de los materiales y equipos necesarios para realizar los experimentos y análisis.

A CONACyT por el apoyo económico de sostenimiento por cuatro años y medio.

Resumen

El chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.) es un fruto de alto valor, apreciado por sus propiedades organolépticas de sabor y elevada pungencia. Sin embargo, su producción se ve limitada por la escasez de variedades altamente productivas con buen desempeño ante estreses bióticos y abióticos. El objetivo de este estudio fue caracterizar los efectos de la exposición prolongada a condiciones edafológicas subóptimas en el estatus metabolómico del fruto de chile habanero durante maduración, utilizando e implementando técnicas de metabolómica dirigida y no-dirigida; así como también caracterizar la respuesta fisiológica general de la planta y su rendimiento. Para ello se sometieron plantas de chile habanero a tratamientos de bajo P, bajo N y dos niveles de salinidad (4 y 7 dS·m⁻¹), en cultivo hidropónico con fertirriego basado en solución nutritiva Hoagland, aplicado desde el inicio de floración. A través de técnicas dirigidas se evaluó la respuesta de fotosíntesis de la planta, de partición de biomasa, y de metabolitos relacionados con calidad en frutos maduros (capsaicinoides, ascorbato, carotenoides, fenólicos y azúcares). El perfil de los cambios en metaboloma durante maduración y por efecto de los tratamientos se evaluó a través de HPLC-ESI-TOF en pericarpio de frutos en tres estados de maduración; el procesamiento de datos se realizó con MZmine y los datos se analizaron con modelo lineal de efectos mixtos (MLEM $p \leq 0.001$) programado en R; la identificación tentativa se asignó por comparación de patrones de fragmentación obtenidos por MS/MS. De los tratamientos aplicados, el bajo P fue el más devastador para el desarrollo y rendimiento de las plantas de chile habanero. De los metabolitos relacionados con calidad de fruto se observó que los tratamientos de bajo N y 7 dS·m⁻¹ causaron mayor acumulación de fructosa y glucosa, respectivamente; mientras que bajo P causó una disminución de fructosa en pericarpio maduro. Por medio del enfoque de metabolómica no dirigida se caracterizaron los cambios en el perfil del metaboloma durante maduración observando una tendencia a la disminución en la acumulación de picos de m/z mayores a 500 en frutos maduros, indicando un posible

desdoblamiento de moléculas complejas durante maduración. En la evaluación del efecto de los tratamientos en el perfil del metaboloma durante maduración se observó que 32% de los 13,974 picos detectados correspondieron a picos compartidos entre los diferentes estados, de los cuales el 3.2% se compartieron en los tres estados evaluados; de los picos significativos para salinidad solo se compartieron cuatro entre los estados rompiente y maduro; en cambio para los efectos por macronutrientes se compartieron picos entre todos los estados, principalmente entre rompiente y maduro, siendo la mayoría entre 500 a 1,200 *m/z*. Los cambios en el metaboloma del fruto se debieron principalmente a los tratamientos de déficit de macronutrientes y en menor medida a los de salinidad, siendo el estado maduro en el que se presentaron los mayores cambios en particular en aquellos sub-acumulados ($p \leq 0.001$, magnitud de cambio ≥ 2). El tratamiento que causó los mayores efectos en el perfil del metaboloma fue el de bajo P, en los tres diferentes estados de maduración, siendo los mayores en maduro, donde el 80% correspondieron a aquellos que disminuyó su acumulación. Entre los picos que cambiaron su acumulación de forma significativa por efecto de bajo P, 13 se comparten entre rompiente y maduro y 1 entre verde y maduro. Del total de picos que cambian por efecto de bajo P ($p \leq 0.001$, magnitud de cambio ≥ 2) se asignó identificación tentativa a tres de ellos correspondientes a moléculas de diterpenos acíclicos glicosilados, de estos se sub-acumuló en rompiente y maduro el capsianósido II, se sub-acumuló en maduro el capsianósido X, estos dos observados por primera vez en chile habanero; y uno se sobre-acumuló en maduro correspondiente al Capsianósido XV. Esta sería la primera vez que se observa efecto del déficit de P sobre estas tres moléculas en plantas, las cuales podrían tener un efecto sobre la susceptibilidad de la planta a herbívoros. Este trabajo aporta información complementaria del perfil del metaboloma debido a maduración en chile habanero, así como información nueva del efecto del déficit de macronutrientes y salinidad durante maduración. Estos resultados pueden ser útiles en la formulación de protocolos de fertilización y manejo de condiciones de salinidad en el área de producción hortícola. La identificación de

metabolitos que cambian significativamente por efecto de los tratamientos estudiados podrán ser correlacionados con los resultados reportados recientemente de secuenciación del genoma y transcriptómica en chile habanero.

Abstract

The habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) is a high-value fruit, appreciated for its flavor and organoleptic properties of high pungency. However, its production is limited by the shortage of high yielding varieties with good performance against biotic and abiotic factors. The aim of this study was to characterize the effects of prolonged exposure to suboptimal soil conditions in the metabolomic status habanero fruit during ripening, using and implementing targeted and untargeted metabolomics techniques; also characterize the overall physiological response of the plant and its performance. Habanero plants were undergone to treatments low P, low N and two salinity levels (4 and 7 dS·m⁻¹), hydroponics fertigation based nutrient solution Hoagland, applied from the start of flowering. The photosynthetic response, the plant biomass partition and related metabolites in ripe fruit quality (Capsaicinoids, ascorbate, carotenoids, phenolic and sugars) were evaluated through targeted techniques. The profile of the metabolome changes during maturation and the effect of the treatments was assessed using HPLC -ESI- TOF in pericarp fruit ripening in three states; data processing was performed with MZmine and data were analyzed using linear mixed effects model ($p \leq 0.001$ MLEM) programmed in R; the tentative identification was assigned by comparison of fragmentation patterns obtained by MS/MS. Of the treatments applied, low P was the most devastating for the development and yield of habanero pepper plants. Metabolites related to the quality of fruit it was observed that the treatment under N and 7 dS·m⁻¹ caused greater accumulation of fructose and glucose, respectively, whereas low P caused a decrease in ripe pericarp fructose. Through untargeted metabolomic approach were characterized metabolome profile changes during ripening showing a trend towards a decrease in the accumulation of peaks m/z 500 in greater ripe fruits, indicating possible split complex molecules during ripening. In evaluating the effect of treatments on the metabolome profile during ripening was observed that 32% of detected peaks corresponded to 13,974 shared between different states, of

which 3.2% were shared in the three states evaluated peaks; the significant peaks for salinity only made four between surf and mature states; in contrast to the effects of macronutrients peaks among all states is shared mainly between breaker and ripe, with most between 500 and 1,200 m/z . Changes in the metabolome of the fruit were mainly due to macronutrient deficiency treatments and to a lesser extent salinity, being the ripe state where the biggest changes particularly in those sub - accumulated ($p \leq 0.001$ were presented magnitude of change ≥ 2). The treatment caused the greatest effects on the metabolome profile P was low in the three different stages of ripening, being higher in ripe, where 80 % were those who decreased their accumulation. Among the peaks changed significantly accumulation effect of low P, 13 are shared between breaker and ripe and one in green and ripe. Of the total of peaks change as a result of low P ($p \leq 0.001$, magnitude of change ≥ 2) an attempt to identify three of which correspond to acyclic diterpenes glycosylated molecules, of these, the capsianoside II was sub-accumulated in breaker and ripe, the X capsianoside is sub-accumulated in ripe, these two first observed in habanero pepper; and one over- accumulated in ripe corresponding to capsianoside XV. This would be the first time that the effect of P deficiency on these three molecules in plants, which could have an effect on the susceptibility of the plant to herbivores is observed. This work provides additional information metabolome profile due to ripening habanero pepper and new information on the effect of salinity and macronutrient deficiency during this stage. These results may be useful in formulating protocols fertilization and management of salinity conditions in the area of horticultural production. The identification of metabolites that change significantly as a result of the treatments may be correlated with the results recently reported genome sequencing and transcriptomics in habanero pepper.

Contenido

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	3
2.1. El género <i>Capsicum</i> y su importancia	3
2.2. Estrés abiótico en plantas y su importancia para la agricultura	4
2.2.1. Estrés por déficit de nutrientes en las plantas	5
2.2.2. Estrés salino en plantas	10
2.3. Efectos del estrés abiótico en rendimiento y calidad de cultivos	15
2.3.1. Efecto del estrés en rendimiento de cultivos	15
2.3.2. Efecto del estrés en la calidad nutricional de cultivos	16
2.3.3. Efecto del estrés en la calidad sensorial de frutos	17
2.4. El género <i>Capsicum</i> y el estrés abiótico	18
2.5. Metabolómica	19
2.5.1. Definiciones y alcances	19
2.5.2. Metabolómica dirigida y no dirigida	21
2.5.3. Instrumentación analítica	22
2.5.4. Análisis de datos metabolómicos	27
2.5.5. Identificación de compuestos	29
2.5.6. Metabolómica de las plantas en respuesta al estrés	31
Capítulo 3. Materiales y métodos	35
3.1. Material vegetal	35
3.2. Evaluación de respuesta fisiológica de la planta	39
3.3. Evaluación metabolómica no dirigida	39
3.3.1. Extracción de metabolitos	39
3.3.2. Análisis por HPLC-TOF	40
3.3.3. Procesamiento de datos metabolómicos	41
3.3.4. Análisis estadístico y multivariado	43

3.4. Identificación putativa de metabolitos diferenciales	45
Capítulo 4. Artículo científico	49
Capítulo 5. Resultados y Discusión	56
5.1. Calibración HPLC-TOF	57
5.2. Separación cromatográfica	57
5.3. Procesamiento de datos	58
5.4. Cambios en metaboloma durante maduración	62
5.4.1. Análisis estadístico y multivariado	62
5.5. Cambios en metaboloma por condiciones edáficas subóptimas	66
5.5.1. Análisis estadístico y multivariado	66
5.6. Validación de resultados de metabolómica diferencial no dirigida	82
5.7. Procedimiento para jerarquizar y delimitar picos potenciales para su identificación por MS ⁿ	90
5.8. Metabolitos semi-polares identificados	95
5.9. Discusión de resultados	95
5.9.1. Impacto de maduración en el metaboloma del fruto del chile habanero	97
5.9.2. Impacto de condiciones edafológicas subóptimas en metaboloma en frutos de chile habanero durante maduración	101
Limitaciones en identificación de metabolitos.	108
Metabolitos tentativamente identificados.	109
Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones	113
6.1. Recomendaciones y futuros trabajos	117

Índice de figuras

- Figura 2-1* Diferencia de resolución obtenida de acuerdo a espectrómetro de masas, FT-ICR-MS vs Q-TOF (línea azul continua vs línea verde punteada) tomado de Kind (2010). 26
- Figura 2-2* Efecto de la resolución en análisis de metabolitos presentes a bajas concentraciones. Tomado de Kellmann (2009). En el eje de las X, se observa el tiempo de retención en minutos, en el de las Y la abundancia relativa 27
- Figura 2-3* Ejemplo de los diferentes resultados de patrones de fragmentación de acuerdo con el espectrómetro que se utilice (Scheubert 2013). 32
- Figura 3-1* Metodología seguida para caracterizar cambios a nivel metabólico en frutos y fisiológicos en planta, por la exposición prolongada a condiciones edáficas sub-óptimas en chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.). 36
- Figura 5-1* Cromatograma total de iones de pericarpio de chile habanero en planta testigo; eje X tiempo de retención, eje Y intensidad de picos. En color verde: frutos en estado de maduración verde; azul: rompiente; rojo: maduro. 59
- Figura 5-2* Distribución de densidad de todos los picos detectados en pericarpio de frutos de chile habanero, bajo tratamientos de déficit de macronutrientes y salinidad y en estado de maduración verde, rompiente y maduro (color verde, amarillo y rojo respectivamente) A) para m/z , B) para tiempo de retención. 61
- Figura 5-3* Análisis de componentes principales de picos identificados en pericarpio de frutos de chile habanero testigo en tres estados de maduración. A) colores verde, naranja y rojo corresponden a frutos en estado de maduración verde, rompiente y maduro, respectivamente. B) colores negro, azul y rojo corresponden a inyección 1, 2 y 3, respectivamente. 62

Figura 5-4 Mapa de calor de los picos significativos durante maduración, con agrupamiento jerárquico para los estados de maduración verde, rompiente y maduro (color verde, amarillo y rojo, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 64

Figura 5-5 Patrón de acumulación durante maduración para frutos de tratamiento testigo, y la distribución de las m/z para cada patrón. En frutos testigo en estado de maduración verde, rompiente y maduro (puntos verdes, amarillos y rojo respectivamente). 65

Figura 5-6 Análisis de componentes principales de picos identificados en pericarpio de frutos de chile habanero en tres estados de maduración, bajo tratamientos de déficit de macronutrientes y salinidad. A) colores verde, naranja y rojo corresponden a frutos en estado de maduración verde, rompiente y maduro, respectivamente. B) colores negro, azul y rojo corresponden a inyección 1, 2 y 3, respectivamente. 66

Figura 5-7 Distribución de densidad de los picos significativos a un valor- $p \leq 0.001$, detectados en pericarpio de frutos de chile habanero en estado verde, rompiente y maduro (color verde, amarillo y rojo respectivamente) para todos los tratamientos A) para m/z , B) para tiempo de retención. 69

Figura 5-8 Mapa de calor de los picos significativos por déficit de macronutrientes en frutos verdes con agrupamiento jerárquico para los tratamientos de bajo P, bajo N y testigo (magenta, azul y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 71

Figura 5-9 Mapa de calor de los picos significativos por déficit de macronutrientes en frutos en estado rompiente, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos de bajo P, bajo N y testigo (magenta, azul y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 72

Figura 5-10 Mapa de calor de los picos significativos por déficit de macronutrientes en frutos maduros, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos de bajo P, bajo N y testigo (magenta, azul y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 73

Figura 5-11 Mapa de calor de los picos significativos por salinidad en frutos verdes, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos 4 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, 7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y testigo (azul, magenta y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 74

Figura 5-12 Mapa de calor de los picos significativos por salinidad en frutos en estado rompiente, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos 4 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, 7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y testigo (azul, magenta y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 75

Figura 5-13 Mapa de calor de los picos significativos por salinidad en frutos maduros, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos 4 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, 7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y testigo (azul, magenta y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z). 76

Figura 5-14 Diagrama de Venn para picos que se comparten en los tratamientos de macronutrientes en los diferentes estados de maduración de frutos de chile habanero. A) picos totales identificados por procesamiento de datos. B) picos significativos valor- $p \leq 0.001$ 79

Figura 5-15 Diagrama de Venn para picos significativos (valor- $p \leq 0.001$) que se comparten en los tratamientos en los diferentes estados de maduración de frutos de chile habanero. A) picos significativos para macronutrientes. B) picos significativos para salinidad. Tablas muestran rango de m/z de los picos compartidos. 80

Figura 5-16 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo P en frutos verdes de chile habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

84

Figura 5-17 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo P en frutos en estado rompiente de chile habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

85

Figura 5-18 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo P en frutos maduros de chile habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

86

Figura 5-19 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo N en frutos verdes de chile habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

87

Figura 5-20 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo N en frutos en estado rompiente de chile habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

88

- Figura 5-21* Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente (valor- $p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo N en frutos maduros de chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p . 89
- Figura 5-22* Ejemplo patrón isotópico (M+1, M+2, M+3). 92
- Figura 5-23* Análisis de patrones de fragmentación para identificar pérdidas neutrales y compararla con patrones de literatura. A) estructura de capsianósido XV ($C_{50}H_{84}O_{26}$) B) patrón de fragmentación obtenido del trampa de iones. C) cálculo de diferentes posibles pérdidas 96
- Figura 6-1* Pasos críticos en los análisis metabólico de muestras vegetales complejas 116

Índice de tablas

Tabla 2-1 Tomada de Hoffmann & Stroobant,(2007)	23
Tabla 3-1 Número de moléculas de cada elemento usado en los diferentes tratamientos, basado en la solución nutritiva Hoagland	37
Tabla 3-2 Condiciones de corrida HPLC TOF. A) Gradiente para separación de metabolitos por HPLC. B) Condiciones ESI- TOF bajo las que se corrieron las muestras (tomados de De Vos et al. 2007).	40
Tabla 3-3 Diseño experimental con total de muestras por estado de maduración y tratamiento. Cada muestra corresponde a la mezcla de hasta 6 frutos por planta	41
Tabla 3-4 Parámetros evaluados en optimización de análisis de datos, con los respectivos niveles y códigos usados.	43
Tabla 3-5 Parámetros de análisis de datos seguido para todos los resultados en programa MZmine usando módulo de detección de picos GridMass	44
Tabla 5-1 Parámetros de calibración del LC/MSD TOF, antes de correr las muestras.	57
Tabla 5-2 Número de picos detectados por MZmine y filtrados por R para cada estado de maduración por separado y en maduración en frutos testigo.	60
Tabla 5-3 Número de picos significativos en pericarpio de frutos de chile habanero.	68
Tabla 5-4 Metabolitos semi-polares significativamente acumulados en pericarpio de frutos de chile habanero	78
Tabla 5-5 Picos acumulados significativamente por efecto de bajo P compartidos durante maduración. A) rompiente y maduro, B) verde, y maduro.	91

Tabla 5-6 Patrones de fragmentación de metabolitos significativos bajo P vs testigo. A) sub-acumulados en frutos en estado rompiente, B) sub-acumulados en frutos en estado maduro 94

Tabla 5-7 Metabolitos identificados en pericarpio de chile habanero en tratamiento de déficit de P 95

Capítulo 1. Introducción

La agricultura moderna enfrenta el reto de satisfacer una creciente demanda de productos de base agrícola para una población en aumento, sin ampliar la superficie de tierras aptas para la agricultura, bajo un contexto de alteraciones en los patrones climatológicos mundiales. Los efectos del cambio climático imponen diferentes estreses abióticos que disminuyen la producción. Para conocer la respuesta de las plantas a los principales factores que afectan su crecimiento y productividad se han utilizado varios enfoques tanto a nivel de ciencia básica como de estrategias de mejoramiento vegetal tradicional y biotecnológico.

Los estudios de respuesta de las plantas a condiciones ambientales están divididos en estudios de enfoque dirigido y no-dirigido. Los estudios de enfoque dirigido consisten en evaluar metabolitos conocidos por técnicas cualitativas y cuantitativas. Por otro lado, los estudios de enfoque no-dirigido buscan obtener una gran cantidad de información de la respuesta de la planta y permiten evaluar diversas variables de forma simultánea. Dentro de estos estudios se encuentra la metabolómica no-dirigida que, mediante complejos equipos analíticos de espectrometría de masas y resonancia nuclear magnética, busca obtener información del estatus metabolómico del desarrollo de la planta en un momento determinado tanto de metabolitos conocidos y desconocidos, y llegar hasta la identificación de nuevas moléculas.

Tradicionalmente, la mayoría de los estudios de metabolismo en fruto siguen un enfoque de metabolómica dirigida enfocados hacia metabolitos relacionados con su calidad nutricional y organoléptica. Por el contrario, los estudios a nivel de fruto con enfoque de

metabolómica no dirigida son recientes (de 2005 a la fecha), y hasta el momento pocos estudios se han realizado en respuesta a condiciones de estrés abiótico.

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un fruto altamente apreciado por su sabor y propiedades organolépticas y es afectado por diferentes condiciones de estrés abiótico durante su producción. El presente trabajo se desarrolló con el fin de contribuir al conocimiento de los cambios a nivel fisiológico y metabolómico a nivel de fruto, inducidos en chile Habanero por diferentes condiciones de estrés abiótico.

El objetivo general de este trabajo consistió en caracterizar los efectos de la exposición prolongada a condiciones subóptimas de sustrato por déficit de macronutrientes: bajo N, y bajo P; y por salinidad (4 y 7 dS·m⁻¹) en el estatus metabolómico del fruto de chile habanero durante maduración, utilizando e implementando técnicas de metabolómica dirigida a metabolitos directamente relacionados con calidad y de metabolómica no-dirigida. Asimismo, también se caracterizó la respuesta fisiológica general de la planta y su rendimiento.

Los objetivos específicos incluyeron: 1) Identificar cambios en el metabolismo básico (respuesta fotosintética, crecimiento y partición de biomasa) de plantas de chile habanero en respuesta a condiciones edáficas sub-óptimas; 2) Realizar un estudio de enfoque dirigido para caracterizar los cambios en los contenidos de metabolitos relacionados con calidad de fruto (pungencia, sabor, y antioxidantes) en frutos maduros de chile habanero bajo condiciones edafológicas sub-óptimas; 3) Implementar metodología analítica y de procesamiento de datos de metabolómica no dirigida por espectrometría de masas para frutos bajo condiciones edáficas subóptimas y durante maduración. 4) Identificar compuestos diferenciales significativos que cambian su acumulación en frutos de chile habanero durante maduración, por efecto de condiciones edafológicas sub-óptimas.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. El género *Capsicum* y su importancia

El chile es de gran importancia económica a nivel mundial por sus características organolépticas y nutricionales que lo hacen indispensable para la industria alimenticia. En el periodo comprendido de 1998 a 2008, la producción mundial de chile se incrementó en un 53 % (Bosland, Votava, & Votava, 2012). En México la importancia del chile radica en su amplio consumo y alto valor comercial. Se estima que en 2012 México fue el segundo mayor productor de chile fresco a nivel mundial sólo superado por China (FAO, 2014).

El chile pertenece al género *Capsicum*, de la familia de las solanaceas, que contiene aproximadamente 27 especies (W. Eshbaugh, 1993), y más de 2,000 cultivares, todos derivados de tres o cinco especies silvestres (Andrews, 1995; DeWitt & Bosland, 1996). El centro de origen del género *Capsicum* se cree que es América del Sur donde 22 de las especies son endémicas (Hunziker, 1979). Cinco de las especies de importancia económica que han sido domesticadas incluyen: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, y *C. pubescens* (Laborde & Pozo, 1984).

La especie *C. annuum* es la única especie considerada como nativa de México y cuenta con distribución mundial. En *C. annuum* las formas y tamaños del fruto varían ampliamente dando origen a más de 20 variedades botánicas (ej. Var. *annuum*, *conicum*, *grossum*, *leucocarpum*, *anomalum*, *cerasiforme*, *mínimum*, *microcarpum*, *cordiforme*, *acuminatum*, y *violaceum*, entre otras) (Chavez, 2003). Adicionalmente, *glabriusculum*, es considerada como progenitor silvestre de la especie domesticada (W. H. Eshbaugh, 1975), y se encuentra en México ampliamente distribuida (Laborde & Pozo, 1984). De las especies domesticadas, *C. chinense*, y *C. pubescens* también han sido identificadas en México, la

primera fue introducida desde Cuba y la segunda desde América del Sur, particularmente Perú o Bolivia (Laborde & Pozo, 1984). Las plantas del género *Capsicum* presentan una amplia heterogeneidad genética (Loaiza-Figueroa, Ritland, Laborde-Cancino, & Tanksley, 1989), lo cual es evidente en la presencia de genotipos sensibles y tolerantes a diferentes estreses abióticos como salinidad entre otros (Aktas, Abak, & Cakmak, 2006; Niu, Rodriguez, Crosby, Leskovar, & Jifon, 2010).

2.2. Estrés abiótico en plantas y su importancia para la agricultura

En la naturaleza las plantas están constantemente expuestas a condiciones externas que, dependiendo de su intensidad y duración pueden inhibir su crecimiento, normal desarrollo y reproducción. El estrés se define como aquellas condiciones que limitan la expresión del potencial de rendimiento genético y varían dependiendo de la susceptibilidad de cada especie (Jones & Jones, 1989). Las condiciones de estrés pueden tener un efecto significativo en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas, determinando la zona de distribución de las especies, y generando una presión selectiva en la evolución de una población determinada (Doroszuk, Wojewodzic, & Kammenga, 2006).

Las condiciones de estrés externo pueden ser de origen biótico o abiótico, y pueden afectar negativamente la supervivencia, producción y rendimiento de los principales cultivos agrícolas (Mantri, Patade, Penna, Ford, & Pang, 2012).

Estos estímulos ambientales también pueden ser ocasionados o exacerbados por la actividad humana, como la degradación química, la pérdida de nutrientes y la salinidad (Oldeman, 1991). Las degradación química del perfil de suelo han sido consideradas responsables de pérdidas en productividad estimadas en 12.7 % en suelos con aptitud agrícola y 3.8 % en suelos con aptitud para zonas ganaderas de pastoreo (Oldeman, 1998).

El déficit de macronutrientes (ej. N y P) en plantas también es responsable de reducciones en el rendimiento en diferentes cultivos como el cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (Dordas & Sioulas, 2008), el pasto varilla (*Panicum virgatum*) (Lemus et al., 2008), maíz (Di Paolo & Rinaldi, 2008), amaranto (*Amaranthus caudatus*), quinua (*Chenopodium quinoa*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (Schulte auf'm Erley, Kaul, Kruse, & Aufhammer, 2005), jitomate, arroz (*Oryza sativa*) (Yang et al., 2007), y chile (*Capsicum* spp.) (Roy, Khan, & Pall, 2011), entre otros.

2.2.1. Estrés por déficit de nutrientes en las plantas

Estrés por deficiencia de nitrógeno en plantas. El nitrógeno (N) es un elemento esencial y se le considera como el nutriente más limitante para el crecimiento y rendimiento de cultivos agrícolas (Halvin, Beaton, Tisdale, & Nelson, 2005).

El N está presente en los suelos en diferentes formas como el nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y aminoácidos. El NO_3^- es la principal forma disponible para la mayoría de las plantas en los suelos agrícolas bien oxigenados. El N es fijado de la atmósfera por medio de microorganismos de vida libre y simbióticos, y por procesos electroquímicos. A partir de ahí, el N es transformado a NO_3^- por micro-organismos a partir de otras fuentes de N vía intermediarios como NH_4^+ y nitrito (NO_2^-), que se encuentran usualmente en el suelo a bajas concentraciones. El NH_4^+ constituye la segunda forma más importante en suelos no alterados y no fertilizados; y los aminoácidos, péptidos pequeños e incluso proteínas son una fuente importante de N en suelos no fertilizados (Gioseffi, de-Neergaard, & Schjoerring, 2012; Paungfoo-Lonhienne, Visser, Lonhienne, & Schmidt, 2012).

La disponibilidad de N para las plantas en ambientes naturales está afectada por la composición del suelo y condiciones ambientales. El NO_3^- se volatiliza del suelo en forma

de gas N_2 bajo condiciones de hipoxia cuando las bacterias lo usan durante la respiración en lugar del oxígeno; o por lixiviación dada la facilidad de esta forma aniónica para disolverse en agua y ser lavado del suelo (Miller, Fan, Orsel, Smith, & Wells, 2007). Adicionalmente, el NO_3^- puede tener una distribución heterogénea en tiempo y espacio que también influye negativamente en su disponibilidad.

La principal forma de absorción del N es en la forma de ion nitrato (NO_3^-), sin embargo, este puede ser absorbido en otras formas reducidas como el NH_4^+ y en menor proporción aminoácidos. Se ha encontrado que en algunos casos las plantas, en presencia de NH_4^+ , pueden inhibir la absorción de NO_3^- , llegando incluso a ocasionar un flujo de salida de NO_3^- . (Kronzucker, Glass, & Siddiqi, 1999). Sin embargo, el NH_4^+ puede presentar un efecto tóxico en algunas especies cuando es la única fuente de N disponible (Britto & Kronzucker, 2002).

El déficit de N causa una represión coordinada de los genes relacionados con fotosíntesis, síntesis de clorofila, síntesis de proteínas, de plástidos, inducción de genes para metabolitos secundarios y reprogramación del transporte de electrones mitocondrial (Wolf-Rüdiger et al., 2004). El déficit de N afecta procesos metabólicos energéticos vitales de las plantas relacionados con fotosíntesis y respiración (de-Groot, van-den-Boogaard, Marcelis, Harbinson, & Lambers, 2003). Una reducción en la disponibilidad de N disminuye la síntesis de estructuras fotosintéticas ricas en nitrógeno, como la clorofila y la proteína ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo), por lo que la fijación de CO_2 se reduce significativamente (Evans & Poorter, 2001).

Adaptaciones de las plantas al déficit de nitrógeno. El N puede ser fijado de la atmósfera a través de simbiosis con micro-organismos fijadores de N_2 atmosférico. La capacidad de fijación de N pertenece a un número reducido de plantas vasculares, todas las

plantas del grupo actinorricas, leguminosas y algunas gramíneas C4 como la caña de azúcar (Franche, Lindström, & Elmerich, 2009). Las plantas reciben el nutriente por el sistema radicular en forma de aminoácidos, amidas y ureidos (Owen & Jones, 2001). Otra estrategia general de las plantas es incrementar el volumen de suelo explorado por el sistema radicular (masa total, longitud y área) y a una mayor profundidad con lo que se asegura la intercepción del nitrógeno lixiviado del suelo (Gastal & Lemaire, 2002), de esta manera la disponibilidad de N es un factor que regula la arquitectura del sistema radicular de las plantas (Malamy & Ryan, 2001).

La agricultura moderna es altamente dependiente de la fertilización nitrogenada que incrementa significativamente la producción, al mismo tiempo que sube los costos de producción y pueden generar problemas ambientales por emisiones de amoníaco (NH_3) a la atmósfera (Harrison & Webb, 2001). La fertilización nitrogenada también puede causar contaminación de aguas subterráneas y superficiales por lixiviación y escurrimiento, respectivamente. La contaminación por N en aguas superficiales ocasionan una alteración del ecosistema al promover un aumento desproporcionado de la biomasa que saturan el medio y generan un ambiente anóxico, fenómeno conocido como eutrofización (Jaynes, Colvin, Karlen, Cambardella, & Meek, 2001). La aplicación de N en la forma de fertilizantes inorgánicos, en conjunto con el uso de variedades de alto rendimiento y de sistemas de riego ha permitido incrementos en productividad alrededor del mundo. Por ejemplo, la India logró en un periodo de 30 años (1960 a 1990) incrementar la producción de trigo en cinco veces y la de arroz al doble (Brainerd & Menon, 2014).

Estrés por deficiencia de fósforo en plantas. El fósforo (P) es uno de los 17 nutrientes requeridos para el crecimiento de las plantas (Bielecki, 1973; Raghothama, 1999), y se le considera el segundo en importancia después del N (Halvin et al., 2005). El P tiene un papel en procesos importantes como la generación de energía, síntesis de ácidos

nucleicos, fotosíntesis, glicólisis, respiración, síntesis y estabilidad de membranas, activación e inactivación de enzimas, reacciones de óxido-reducción, señalización, metabolismo de carbohidratos y fijación de nitrógeno.

La disponibilidad de P representa uno de los mayores limitantes para el crecimiento y desarrollo de plantas terrestres tanto en ambientes naturales como en la agricultura, debido a su baja movilidad y alta capacidad de adsorción a las partículas del suelo. Aun y cuando el P pueda estar presente en cantidades adecuadas en el suelo, el P puede presentar problemas de disponibilidad al estar presente en su mayoría en formas orgánicas que no pueden ser absorbidos por las plantas, como el inositol hexafosfato, forma orgánica de mayor abundancia en los suelos (Holford, 1997). Otro problema es la lenta difusión del P en el suelo, por lo que las altas tasas de consumo de los cultivos agrícolas crean zonas alrededor de las raíces donde se agota el P. Pocos suelos no-fertilizados liberan P lo suficientemente rápido para soportar altas tasas de crecimiento de plantas, por lo que la fertilización es una práctica común en cultivos comerciales. Sin embargo, sólo de un 20 % a 30 % del P contenido en el fertilizante aplicado es absorbido por las plantas (Syers, Johnston, & Curtin, 2008), el resto permanece inmóvil y no disponible para la absorción por parte de las plantas, por causa de precipitación, adsorción, o conversión a formas orgánicas (Holford, 1997).

En la agricultura moderna, una práctica tradicional consiste en fertilizar con P para mejorar el rendimiento de las plantas, con la desventaja de un incremento en los costos de producción, y el impacto ambiental ocasionado por los excesos que llegan a cuerpos de agua y promueven la eutrofización de cuerpos de agua aunque en menor medida que el N (Correll, 1998), otra desventaja es su naturaleza de recurso no-renovable, que se estima podría agotarse para finales de nuestro siglo (XXI) (Steen, 1998).

La forma de P más accesible para las plantas es el ortofosfato (Pi) (H_2PO_4^-), que se encuentra en concentraciones que no exceden los 10 μM en la solución del suelo (Bielecki, 1973), mientras que en las células dicha concentración es 1,000 veces mayor. La baja disponibilidad del Pi es debida principalmente a su alta reactividad con componentes del suelo y la rápida conversión por bacterias del suelo de Pi a formas orgánicas (Holford, 1997).

La absorción de Pi es realizado mediante el uso de proteínas transportadoras de alta afinidad (Bucher, 2007), el transporte a través de la membrana plasmática de las células de la raíz es realizado por proteínas intercambiadoras de protones (H^+ -ATPasa), que generan un gradiente de protones (H^+) apoplástico, lo que implica un consumo de energía metabólica representado en la energía necesaria para el movimiento de H^+ , que en el caso de Pi puede ser pequeño en comparación con el flujo de otros iones (F. S. Smith, 2001).

La deficiencia de P induce la represión de más de 1,000 genes, entre ellos varios relacionados con la absorción de P, la movilización de Pi orgánico, la conversión de intermediarios glicolíticos fosforilados a carbohidratos y ácidos orgánicos, la sustitución de los fosfolípidos que contienen P con galactolípidos y la represión de genes implicados en la síntesis de ácidos nucleicos (Morcuende et al., 2007)

Adaptaciones de las plantas al déficit de fósforo. Para enfrentar el estrés por P, diversas especies de plantas domesticadas y no domesticadas adaptaron el desarrollo de su sistema radicular para formar sistemas altamente ramificados que les permite incrementar la capacidad de exploración del suelo (Forde & Lorenzo, 2001; Lynch, 1995). La estrategia de desarrollo radicular resulta en un re-direccionamiento de la acumulación de materia seca a favor del crecimiento de las raíces (Ericsson, 1995), lo que les permite concentrar el crecimiento radicular en la región de suelo que generara mayores rendimientos en términos

de captura de nutrientes (Robinson, 1994). Los cambios en la morfología radicular de la planta por efecto de la disponibilidad o redistribución de nutrientes buscan garantizar la adaptación y supervivencia de la especie pero afecta el crecimiento y rendimiento general de la planta por aumento de la cantidad de carbono neto asimilado por día, utilizado en respiración del tejido de la raíz (Nielsen, Eshel, & Lynch, 2001).

Las plantas utilizan las micorrizas para acceder al P dado el aumento en el volumen de suelo explorado por las hifas fungales. Sin embargo, la absorción de P por medio de la simbiosis con micorrizas tiene un alto costo del carbono fijado por medio de la fotosíntesis. El costo metabólico de este proceso se estima entre 4 % al 20 % de la fotosíntesis neta diaria. (Ryan & Graham, 2002).

Otra estrategia desarrollada por algunas plantas consiste en exudar altas cantidades de ácidos orgánicos, que acidifican el suelo y quelan iones metálicos alrededor de raíces, favoreciendo la movilización de P y algunos nutrientes. Esta estrategia aunque efectiva tiene un alto costo energético para la planta, de hasta un 23 % de la fotosíntesis neta en *Lupinus albus* L. (Oliveira, 1995).

2.2.2. Estrés salino en plantas

La acumulación de sales en el perfil del suelo constituye uno de los estreses de mayor importancia en la agricultura que ocasionan descensos importantes en la producción de alimentos a nivel global. La salinidad puede estar ocasionada por causas naturales y prácticas agrícolas, tales como el mal manejo de sistemas de riego con aguas salinas, el uso de fertilizantes y un drenaje inadecuado de los suelos. Actualmente se estima que la salinidad afecta el 20 % de los suelos bajo riego a nivel mundial (Peleg, Apse, & Blumwald, 2011) y se proyecta que esta condición aumente al 50 % para el 2050

(Blumwald & Grover, 2006), afectando gravemente la producción de alimentos, ya que cerca de la tercera parte del total de los alimentos a nivel mundial se producen en áreas que utilizan riego y por tanto son propensas a padecer problemas de salinidad (Howell, 2001), afectando también el medio ambiente y el bienestar socioeconómico (Ondrasek, Romic, Rengel, Romic, & Zovko, 2009; Rengasamy, 2006).

El cloruro de sodio (NaCl) es la principal sal en los suelos, aunque también se acumulan otras sales como el Na_2SO_4 , MgSO_4 , CaSO_4 , MgCl_2 , KCl y Na_2CO_3 . El sodio (Na^+) es el catión dominante y el cloro (Cl^-) es el anión mayoritario en suelos salinos, al punto que el NaCl comprende la mayoría de las sales solubles totales (Flowers, Troke, & Yeo, 1977).

El sodio no es un elemento esencial para las plantas, pero es benéfico, mientras que el cloro es un micronutriente esencial (Oliveira, 1995). Ambos son potencialmente tóxicos a concentraciones elevadas al generar una interacción competitiva con iones de otros nutrientes como el potasio (K^+), NO_3^- , H_2PO_4^- , por los sitios de unión y proteínas transportadores en las células de las raíces y luego en la translocación, deposición y partición dentro de la planta (Grattan & Grieve, 1999; Tester & Davenport, 2003; White & Broadley, 2001). Adicionalmente, en el suelo las sales impactan la transformación bioquímica, al afectar la biomasa y actividad microbiana (Ondrasek, Rengel, Romic, & Savic, 2012).

El Na^+ ingresa fácilmente en las plantas, a través de la membrana plasmática de las raíces, la cual tiene un potencial eléctrico negativo (-140 mV) (Higinbotham, 1973). Un aumento en la concentración extracelular de Na^+ genera un gradiente de potencial electroquímico que favorece su transporte pasivo desde el suelo hacia el citoplasma (Apse & Blumwald, 2007), a través de canales catiónicos no selectivos (Amtmann & Sanders,

1998; Tester & Davenport, 2003) y posiblemente a través de otros transportadores de Na^+ como transportadores con alta afinidad a K^+ (Haro, Banuelos, Senn, Barrero-Gil, & Rodriguez-Navarro, 2005).

En las plantas el estrés salino tiene 3 fases: en la primera se genera un estrés osmótico por el aumento de solutos en el suelo que dificultan el ingreso de agua hacia la planta. En la segunda hay estrés oxidativo ocasionado como consecuencia del cierre de los estomas que limita el suministro de CO_2 e interrumpe la cadena de transporte de electrones e induce la generación de especies reactivas de oxígeno (las cuales son altamente reactivas) y pueden causar muchos daños a membranas, proteínas y DNA (Davies, 1987; Fridovich, 1986). En la tercera fase se desarrolla un desbalance iónico ocasionado por el aumento de los niveles citoplásmicos de Na^+ y Cl^- y la inhibición de la asimilación de K^+ (Higinbotham, 1973), y de Ca^{2+} (G.R. Cramer, Läuchli, & Polito, 1985; Lynch & Läuchli, 1988). Las altas concentraciones de Na^+ en el citoplasma también afectan procesos bioquímicos y metabólicos críticos, inactivación de enzimas, incremento en las tasas de respiración, cambios en la distribución de minerales, inestabilidad de la membrana por el desplazamiento del Ca^{2+} por Na^+ , y una caída en la eficiencia de la fotosíntesis (Dionisio-Sese & Tobita, 1998).

El principal sitio de daño por toxicidad de Na^+ para la mayoría de las plantas son las hojas, donde se deposita por movimiento pasivo a través del xilema y la deposición en las zonas de transpiración activa (Munns, 2002). Concentraciones de Na^+ por encima de 100 mM inhiben severamente la actividad enzimática, incluyendo las enzimas de fotosíntesis y las que requieren de K^+ como cofactor (Flowers & Dalmond, 1992).

Los efectos de la salinidad sobre la fotosíntesis van desde la restricción del transporte de CO_2 en el mesófilo y de su difusión en el cloroplasto por limitación en la

apertura de los estomas, hasta alteraciones en la fotoquímica de la hoja y el metabolismo del carbono. Lo anterior disminuye la energía disponible y los foto-asimilados para el metabolismo resultando en un incremento en el catabolismo de carbohidratos almacenados vía respiración para proveer energía a las células. Estos efectos varían de acuerdo con la especie de planta, la intensidad y duración del estrés, así como la edad de las hojas (Chaves, Flexas, & Pinheiro, 2009; Chaves, Maroco, & Pereira, 2003; Flexas, Bota, Loreto, Cornic, & Sharkey, 2004; Munns, 2002).

En algunas variedades de soya (*Glycine max* (L.) Merr) la salinidad tiene un efecto negativo sobre la fotosíntesis, siendo mayor el efecto de toxicidad del Cl^- en hojas que el del Na^+ ; mientras que otras variedades de la misma especie (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) presentan mayor susceptibilidad al Na^+ que al Cl^- (Luo, Yu, & Liu, 2005). La principal fuerza de movimiento del Cl^- a través de la membrana plasmática es su gradiente electroquímico (Sanders, 1980), en los suelos la presencia de NO_3^- puede disminuir el efecto tóxico del exceso de Cl^- aparentemente debido al efecto competitivo de ingreso entre NO_3^- y Cl^- (Kafkafi, Valoras, & Letey, 1982). Previamente se ha reportado que el transporte de Cl^- dentro de las células de la raíz de las plantas es disminuido por cationes divalentes externos como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Ehret, Redmann, Harvey, & Cipywnyk, 1990). En plantas de *Arabidopsis* concentraciones de 50mM en el medio de cultivo tuvieron un efecto marginal en el flujo de ingreso de Cl^- en la planta (Saleh & Plieth, 2013). En plantas de melón concentraciones menores a 100mM de Cl^- , no afectaron parámetros fotosintéticos, apenas concentraciones mayores a 150mM causó disminución en el contenido de clorofila, de la tasa fotosintética neta, y del potencial de rendimiento cuántico del fotosistema II (Zhang, Wang, Huang, Xing, & Wang, 2010).

La salinidad es responsable de reducciones en rendimiento de hasta un 50 % de la producción de los principales cultivos a nivel mundial (Bray, Bailey-Serres, & Weretilnyk,

2000; Munns, 2002). La salinidad puede afectar el número y peso de granos, tubérculos y frutos de diversos tipos de plantas; tales como el trigo duro (*Triticum durum*), papa (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays* L.), girasol (*Helianthus annuus*), betabel (*Beta vulgaris*), soya (*Glycine max*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lenteja (*Lens culinaris*), haba (*Vicia faba*) (Katerji, van-Hoorn, Hamdy, & Mastrorilli, 2003), fresa (*Fragaria* spp.) (Kaya, Kirnak, Higgs, & Saltali, 2002), limón (*Citrus* spp.) (García-Sánchez, Carvajal, Porras, Botía, & Martínez, 2003), chile (*Capsicum* spp.) (G. H. Niu et al., 2010), sandía (*Citrullus lanatus*) (Colla, Roupahel, Cardarelli, & Rea, 2006) y melón (*Cucumis melo*) (Botía, Navarro, Cerdá, & Martínez, 2005).

Adaptaciones de las plantas al estrés salino. Las plantas enfrentan el estrés salino mediante diferentes estrategias y dependiendo de la fase de desarrollo. Durante la fase de estrés osmótico, las plantas incluyen cambios en la elasticidad de la pared celular y ajustes del potencial osmótico, mediante la acumulación de compuestos orgánicos solubles y neutros conocidos como solutos compatibles u osmolitos (Bohnert & Shen, 1999). Los osmolitos son pequeñas moléculas hidrofílicas que no perturban las funciones celulares aun cuando se presenten en altas concentraciones (Yancey, 2005), e incluyen aminoácidos (prolina), aminas cuaternarias (glicina, betaína), carbohidratos (trealosa, fructosa, sacarosa), y polioles (manitol, pinitol). Los osmolitos favorecen el movimiento del agua del suelo a las células de las raíces.

Para contrarrestar el estrés oxidativo causado por el incremento en la producción de radicales libres se producen antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, glutatión reducido, tocoferol y carotenoides y enzimas desintoxicantes como la superóxido dismutasa, catalasas, ascorbato peroxidasa, glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa para eliminar radicales libres (P. M. Hasegawa, Bressan, Zhu, & Bohnert, 2003). De estos antioxidantes, algunos osmolitos como el manitol también sirven en la protección de

estructuras celulares mediante la eliminación de radicales libres (Shen, Jensen, & Bohnert, 1997). Las altas concentraciones de Na^+ que llegan a las hojas pueden ser toleradas por algunas plantas, vía adaptaciones anatómicas o partición intracelular. Las adaptaciones anatómicas incluyen las glándulas salinas (tricomatos modificados) y las vejigas (células de la epidermis modificadas) (Flowers, Hajibagheri, & Clipson, 1986). Sin embargo, la mayoría de plantas domesticadas para la alimentación humana no toleran suelos salinos (especies glicófitas) (Horie, Karahara, & Katsuhara, 2012), por lo que carecen de estructuras morfológicas especializadas. En cambio, estas plantas despliegan respuestas fisiológicas y bioquímicas a nivel molecular, celular y de la planta entera (Bohnert, Nelson, & Jensen, 1995).

Las plantas combaten el estrés iónico con ayuda de las vacuolas, el Na^+ remanente que no es expulsado de las células puede ser secuestrado en las vacuolas, aunque las células del meristemo de raíz carecen de grandes vacuolas donde almacenarlo (Guo, Babourina, & Rengel, 2009), en hojas la tasa de $\text{K}^+:\text{Na}^+$ puede ser restaurado confinando el Na^+ en las vacuolas por medio del uso de antiportadores Na^+/H^+ , este transporte activo depende del gradiente electroquímico de H^+ creado por $\text{V-H}^+-\text{ATPasas}$ y $\text{V-H}^+-p\text{Pasas}$ en la membrana vacuolar (tonoplasto) (Taiz, 1992).

2.3. Efectos del estrés abiótico en rendimiento y calidad de cultivos

2.3.1. Efecto del estrés en rendimiento de cultivos

Las condiciones de estrés pueden afectar el rendimiento de las plantas. La respuesta de las plantas para responder a las condiciones de estrés generalmente implican un consumo energético que busca garantizar en primer lugar la supervivencia de la planta pero que puede afectar negativamente el rendimiento (Mitra, 2001).

2.3.2. Efecto del estrés en la calidad nutricional de cultivos

Debido a que la calidad nutricional de los alimentos está determinada por factores genéticos y ambientales. Las condiciones ambientales de estrés también pueden tener efectos en los parámetros de calidad de los órganos cosechables de los cultivos. El estrés salino afecta diferentes parámetros de calidad como los contenidos de proteínas, lípidos y minerales. La salinidad puede inducir un aumento en la concentración de proteínas en las fracciones cosechables de los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Y. Wang & Frei, 2011). La salinidad afecta negativamente la concentración y calidad de lípidos en los cultivos, variando según la especie de cultivo y duración del estrés (Y. Wang & Frei, 2011). El estrés por sal aumenta los iones de Na^+ y Cl^- en frutos y vegetales (Grattan & Grieve, 1999), y puede provocar un desbalance en la concentración de K^+ en frutos (Gómez et al., 1996; Keutgen & Pawelzik, 2008).

El estrés oxidativo afecta positivamente la calidad nutricional de los alimentos, ya que en respuesta a la acumulación de especies reactivas de oxígeno, generadas como subproducto del metabolismo aeróbico durante el estrés (Apel & Hirt, 2004) las plantas despliegan un sistema de defensa enzimático y no enzimático, que produce una variedad de antioxidantes como carotenos, ácido ascórbico, glutatión, compuestos fenólicos, y flavonoides que se acumulan en los diferentes tejidos de las plantas (Gill & Tuteja, 2010). Los diferentes antioxidantes acumulados en tejidos vegetales tienen efectos benéficos sobre la salud humana al consumirlos dada la capacidad de desintoxicación de especies reactivas de oxígeno que puede contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Bazzano et al., 2002).

2.3.3. Efecto del estrés en la calidad sensorial de frutos

El sabor, entendido como la interacción de los componentes químicos del alimento con los sentidos humanos del gusto y el olfato, es el factor organoléptico más importante de calidad en frutas y vegetales (otros factores incluyen la textura y la apariencia). El sabor afecta la apreciación y la aceptación de los productos hortícolas y como consecuencia el potencial de compra de los consumidores (Harker, Gunson, & Jaaeger, 2003).

La salinidad puede impactar positivamente atributos sensoriales relacionados con la calidad de los alimentos al aumentar el contenido de azúcares solubles y ácidos orgánicos en frutos (Auerswald, Schwarz, Kornelson, Krumbein, & Brückner, 1999), los cuales hacen parte importante de la calidad de las frutas al afectar significativamente el sabor y por tanto su aceptabilidad (Malundo, Shewfelt, & Scott, 1995). Los contenidos de estos metabolitos son altamente influenciados tanto por factores genéticos como ambientales (Crespo, Bordonaba, Terry, & Carlen, 2010).

El aumento de azúcares en frutos por efecto de la salinidad se explicaba como un efecto de concentración por un menor flujo de agua hacia el fruto al aumentar la salinidad del suelo (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999). Sin embargo, el efecto de concentración no es el único responsable, la salinidad causa ajustes en el metabolismo y fisiología del fruto (Saito et al., 2008), en las primeras etapas de desarrollo se da un mayor transporte y distribución de carbohidratos en forma de almidón, lo cual altera la actividad de la ADP glucosa pirofosforilasa, a nivel transcripcional y postranscripcional (Saito, Fukuda, Matsukura, & Nishimura, 2009; Yin et al., 2010), aumentando la biosíntesis de almidón en fruto verde el cual a su vez aumenta la fuerza de sumidero, y se suma al total de azúcares importados por el floema al ser degradado durante maduración (Petreikov et al., 2009). Similares resultados de aumento de azúcares se han observado durante estrés por sal en

chile (Azuma et al., 2010), betabel (Hajiboland, Joudmand, & Fotouhi, 2009), pepino (*Cucumis sativus*) (Huang, Tang, Cao, & Bie, 2009), melón (Botía et al., 2005), naranja (*Citrus spp.*) (Grieve, Prior, & Bevington, 2007) y vid (*Vitis vinifera*) (Li, Wang, Li, Yao, & Hao, 2013).

En frutos se ha observado una relación inversa entre la fertilización con nitrógeno y la concentración de sólidos solubles totales (Parisi, Giordano, Pentangelo, & Villari, 2006). En frutos de tomate una disminución de la fertilización con nitrato no afectó significativamente los rendimientos comerciales y en cambio logró un aumento en niveles de azúcares solubles (Benard et al., 2009). En frutos de melón, por el contrario la disponibilidad de N presenta una tendencia inversamente proporcional con la calidad de los frutos, generando frutos con una mayor cavidad interior de semillas, menor pulpa y cascara más gruesa (Ferrante, Spinardi, Maggiore, Testoni, & Gallina, 2008).

El déficit de P causa una reducción en el contenido de azúcares en frutos de manzana (*Malus domestica*) (Zhu et al., 2014), así como también en cultivos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Elamin et al., 2007).

2.4. El género *Capsicum* y el estrés abiótico

Las plantas del género *Capsicum* se reportan como sensibles a estrés por salinidad, evidenciando efectos por estrés osmótico a bajos niveles de sal y efectos de estrés iónico a altas concentraciones de sal (Silva, Martínez, & Carvajal, 2008). El estrés por salinidad afecta el crecimiento de la planta y en particular el rendimiento y los parámetros de calidad de los frutos, provocando cambios en el contenido de compuestos antioxidantes al inhibir la síntesis de ácido ascórbico en estos (Azuma et al.; Rubio, García-Sánchez, Rubio, & Martínez, 2009). El estrés salino disminuye los contenidos de compuestos fenólicos totales

e incrementa el licopeno y la actividad antioxidante en la fracción liofilice (Navarro, Flores, Garrido, & Martinez, 2006), efectos que pueden empeorar con la acción sinérgica de altas temperaturas y condiciones de sequía (Rubio, Rubio, Martínez, & García-Sánchez, 2010).

En accesiones silvestres de *C. annuum* a pesar de la similaridad fenotípica existe gran heterogeneidad genética (Loaiza, Ritland, Laborde, & Tanksley, 2005; Votava, Nabhan, & Bosland, 2004). En respuesta a salinidad, esta heterogeneidad genética se hace evidente en la presencia de genotipos sensibles y tolerantes (Aktas et al., 2006; G. Niu et al., 2010), los genotipos sensibles, salvo algunas excepciones acumulan una mayor cantidad de Na^+ y/o Cl^- en las hojas, como es el caso de chile habanero (G. H. Niu et al., 2010). En un estudio de 102 genotipos de *C. annuum*, bajo condiciones controladas, un genotipo tolerante a salinidad presentó 2.5% de Na^+ en sus hojas mientras que el genotipo sensible presentó 5.4%, sugiriendo que la exclusión del Na^+ desde la raíz juega un papel importante a la tolerancia a salinidad en chiles (Aktas et al., 2006).

2.5. Metabolómica

2.5.1. Definiciones y alcances

La metabolómica es una aproximación de la biología de sistemas que se define como el perfil global de todas las moléculas pequeñas (metabolitos) de bajo peso molecular (<1,000Da) en las células, tejidos, biofluidos e incluso en todo el organismo (Lindon, Nicholson, & Everett, 1999). El metaboloma es el grupo de metabolitos sintetizados por un sistema biológico (Oliver, Winson, Kell, & Baganz, 1998) y los metabolitos son el producto final de la interacción entre genoma, transcriptoma y proteoma con el medio ambiente, por lo que están estrechamente relacionados con el fenotipo bioquímico de un sistema e incluyen importantes características nutricionales y toxicológicas (Hoekenga,

2008; Kok, Keijer, Kleter, & Kuiper, 2008; Sumner, Mendes, & Dixon, 2003). Una de las más importantes características de esta técnica consiste en realizar una caracterización cualitativa y cuantitativa de una gran cantidad de biomoléculas de sistemas dinámicos y complejos.

Actualmente, hay múltiples estudios de metabolómica aplicada a distintos organismos, entre ellos la respuesta de diferentes organismos a factores del medio ambiente (Bundy, Davey, & Viant, 2009), la caracterización bacteriana (Vaidyanathan, Kell, & Goodacre, 2002), análisis en salud humana y nutrición (Watkins & German, 2002), mejoramiento vegetal (Wahyuni et al., 2014), determinación de biomarcadores metabólicos que cambien como indicadores de la presencia de enfermedades o respuesta a intervenciones basadas en fármacos (Lenz, Bright, R., Wilson, & Major, 2004).

Debido a su alta capacidad biosintética, las plantas presentan metabolomas muy complejos capaces de sintetizar más de 100,000 metabolitos secundarios (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Estos organismos acumulan una amplia gama de metabolitos que se dividen en primarios y secundarios acorde a su participación en las funciones básicas de la célula (ej. respiración, biosíntesis de compuestos esenciales), siendo los secundarios aquellos que aunque no participan en el crecimiento y desarrollo cumplen un papel indispensable en la interacción con el medio ambiente (ej. defensa contra herbívoros y patógenos). La medición del metaboloma vegetal provee un panorama del estatus bioquímico de la planta que puede ser usado para medir la respuesta metabólica inducida por un factor externo (ej. estrés abiótico) (Fiehn, 2002).

La gran diversidad de metabolitos del metaboloma vegetal, en conjunto con sus diferencias en concentración, labilidad, polaridad, solubilidad, peso molecular, volatilidad, entre otros, hace muy difícil que un sólo método analítico sea capaz de extraer y detectar

todos los metabolitos acumulados en una muestra. Durante la década pasada diversos métodos fueron desarrollados para el análisis y comparación a gran escala de metabolitos de extractos de plantas (Dixon et al., 2006; Hall, 2006), incluyendo cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS por sus siglas en inglés) (Tolstikov, Lommen, Nakanishi, Tanaka, & Fiehn, 2003).

2.5.2. Metabolómica dirigida y no dirigida

Las estrategias de análisis en metabolómica se dividen en análisis dirigidos y no-dirigidos, en los análisis selectivos hay dos enfoques: perfilado de metabolitos y análisis dirigido de metabolitos. En el perfilado de metabolitos se busca la identificación y cuantificación de un número de metabolitos pre-seleccionados, generalmente relacionados a una ruta metabólica específica. La preparación de la muestra e instrumentación buscan aislar dichos metabolitos de posibles efectos de la matriz en su detección con MS. Asimismo, en el análisis dirigido de metabolitos, donde el objetivo es analizar cualitativa y cuantitativamente uno o pocos metabolitos, se requiere una preparación específica de la muestra y separación de otros metabolitos, generalmente acoplada a separación cromatográfica seguida por detección con UV o MS. Esta técnica es utilizada cuando se requieren bajos límites de detección.

En la metabolómica no-dirigida, los enfoques incluyen la metabolómica de huella dactilar y la metabolómica no dirigida. La metabolómica de huella dactilar es un análisis rápido, global de alto rendimiento de muestras que provee una clasificación de las muestras, donde la cuantificación e identificación no son por lo general empleadas, es una herramienta de tamizaje para discriminar entre muestras de diferente estatus biológico u origen, donde la preparación de la muestras es simple y no se usa separación cromatográfica por lo que el tiempo de análisis es corto. La metabolómica no dirigida,

busca una identificación y cuantificación no selectiva de todos los metabolitos de una muestra biológica. La preparación de la muestra debe ser sencilla para no excluir metabolitos y la selectividad y sensibilidad de la técnica analítica debe ser alta (Dunn & Ellis, 2005).

2.5.3. Instrumentación analítica

La metabolómica exige el uso de instrumentos analíticos de alta sensibilidad y selectividad, entre ellos el más ampliamente usado es la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), que opera a través de la formación de iones en fase gaseosa del material de estudio que se separan por la tasa de su masa a carga (m/z unidad adimensional obtenida de dividir el número de masa de cualquier ion por el número de su carga) (Murray et al., 2013).

Los tres principales componentes de la mayoría de los equipos de MS son una fuente de ionización, un analizador de masas, y un detector; todos ellos mantenidos bajo vacío para optimizar la transmisión de iones hacia el analizador y el detector (Niessen, 1998).

Existen varias fuentes de ionización en MS: la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés), desorción/ionización mediante láser (LDI, por sus siglas en inglés), desorción/ionización sobre sílica porosa (DIOS, por sus siglas en inglés), la ionización por electro atomización (ESI, por sus siglas en inglés), y la fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés), que generan masas moleculares protonadas (en modo positivo), o desprotonadas (en modo negativo) (Kusano et al., 2011). ESI es muy popular porque es una técnica de ionización suave que resulta en poca fragmentación del ion precursor (i.e. la disociación del ion

precursor en la fuente de ionización genera la formación de varios fragmentos), especialmente cuando se usan voltajes bajos en el capilar y en el cono (Gaskell, 1998).

Después de ser producida la fase gaseosa e ionizada, los iones pasan a través del analizador de masas donde son separados de acuerdo a su m/z con base en diferentes principios (Tabla 2-1) que les confieren propiedades y especificaciones únicas. Por último los iones llegan hasta el detector donde sus señales son amplificadas y transformadas a señales eléctricas que son proporcionales a su abundancia.

Tabla 2-1 Tomada de Hoffmann & Stroobant,(2007)

Tipos de analizadores de masas	Símbolo	Principio de separación
Sector eléctrico	E o ESA	Energía cinética
Sector magnético	B	Momentum
Cuadrupolo	Q	m/z (estabilidad de la trayectoria)
Trampa de iones	IT	m/z (frecuencia de resonancia)
Tiempo de vuelo	TOF	velocidad tiempo de vuelo
Resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier	FTICR	m/z (frecuencia de resonancia)
Orbitrap con transformada de Fourier	FT-OT	m/z (frecuencia de resonancia)

Un equipo popular en MS es el tiempo de vuelo acoplado a espectrómetro de masas (TOF/MS, por sus siglas en inglés) que se basa en la teoría de que la masa de un ion está relacionada con su velocidad de vuelo y por tanto el tiempo que demora en llegar al detector es proporcional a su masa (Guilhaus, Mlynski, & Selby, 1997). TOF/MS provee buena sensibilidad y resolución para el perfil de iones precursores intactos generados.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es un método general que involucra al menos dos pasos de análisis de masas, ya sea en combinación con un proceso de disociación o en una reacción química que cause un cambio en la masa o en la carga del

ion. En la mayoría de los MS/MS un primer analizador es usado para aislar un ion precursor, el cual luego es fragmentado y produce fragmentos ionizados y neutrales. Luego un segundo espectrómetro analiza los iones productos. Paso que se puede incrementar, seleccionando iones obtenidos de los fragmentos y analizándolos nuevamente (MS^n). La capacidad de conocer los fragmentos generados a partir del ion precursor es indispensable para la identificación de los metabolitos.

Existen otras técnicas para análisis de metabolómica como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés), es una técnica rápida no destructiva que presenta una selectividad y sensibilidad menor que MS, útil para metabolómica de huella dactilar (H. E. Johnson, Broadhurst, Goodacre, & Smith, 2003)

Otro método es la espectrometría de resonancia nuclear magnética que proporciona un método rápido, no destructivo, de preparación de la muestra; sin embargo la resonancia nuclear magnética en comparación con MS es una técnica con menor sensibilidad, que requiere más muestra con una alta pureza, pero que permite dilucidar la estructura de las moléculas (Guttman, Varoglu, & Khandurina, 2004).

Uso de cromatografía en metabolómica. Las muestras pueden entrar al MS por infusión directa o pueden ser previamente separadas por medio de cromatografía, los equipos de MS por lo general van acoplados a cromatografía líquida (LC por sus siglas en inglés) o de gases (GC por sus siglas en inglés) para realizar una separación de muestras complejas antes de su ingreso al MS, también puede operarse por inyección directa para tamizajes rápidos del metaboloma, pero los isómeros estructurales presentan la misma masa monoisotópica, por lo que para poder detectarlos por separado se requiere de la separación cromatográfica.

La cromatografía líquida puede separar metabolitos no volátiles que no se pueden derivatizar, o compuestos lábiles, por lo que con LC/MS se puede analizar un rango más amplio de compuestos que con GC/MS en enfoques basados en investigación de metabolitos desconocidos (X. Wang, Sun, Zhang, Wang, & Han, 2011).

El uso extendido de la cromatografía en fase reversa ha permitido el estudio de compuestos semi-polares, muchos de los cuales corresponden a metabolitos secundarios con importancia fenotípica, fisiológica, e importancia en el campo de la salud, y la nutrición (Beekwilder et al., 2005; Dixon et al., 2006; Rischer et al., 2006). Los metabolitos secundarios tienen la ventaja de ser adecuadamente extraídos en soluciones acuosas de alcohol y ser directamente analizados sin necesidad de ser derivatizados. Los métodos basados en LC-MS se enfocan en los metabolitos secundarios, los cuales son muy diversos en una amplia gama de propiedades, como alcaloides, saponinas, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides, glucosinolatos, poliaminas y derivados (Huhman & Sumner, 2002; Moco et al., 2006; Rischer et al., 2006; Tolstikov et al., 2003)

Resolución en espectrometría de masas. Una de las principales características técnicas de los equipos de espectrometría de masas es la resolución de masas, definida como la división de un valor de m/z por la menor diferencia $\Delta(m/z)$ entre dos iones que pueden ser separados: $(m/z)/\Delta(m/z)$ (Murray et al., 2013), una mejor resolución de masas permite la separación de dos o más picos espectrales de masas cercanas, y por tanto una mejor capacidad de distinguir iones de diferente composición elemental. Un ejemplo de una mejor separación de picos debida a una mejor resolución de masas espectrales se puede ver en la Figura 2-1 en la que se compara la resolución de un FTICR, con una resolución de un millón frente a un Qq-TOF (un MS/MS) con una resolución de masas de 10,000 (Kind & Fiehn, 2010).

Los espectrómetros de masas con mayor resolución, permiten además un mejor análisis cualitativo y cuantitativo a concentraciones bajas de las moléculas (Figura 2-2), por lo que en análisis de metabolómica dirigida la selección de la resolución de masas está determinada por la concentración de la molécula de interés frente a interferencias que co-eluyan de la matriz (Kellmann, Muenster, Zomer, & Mol, 2009).

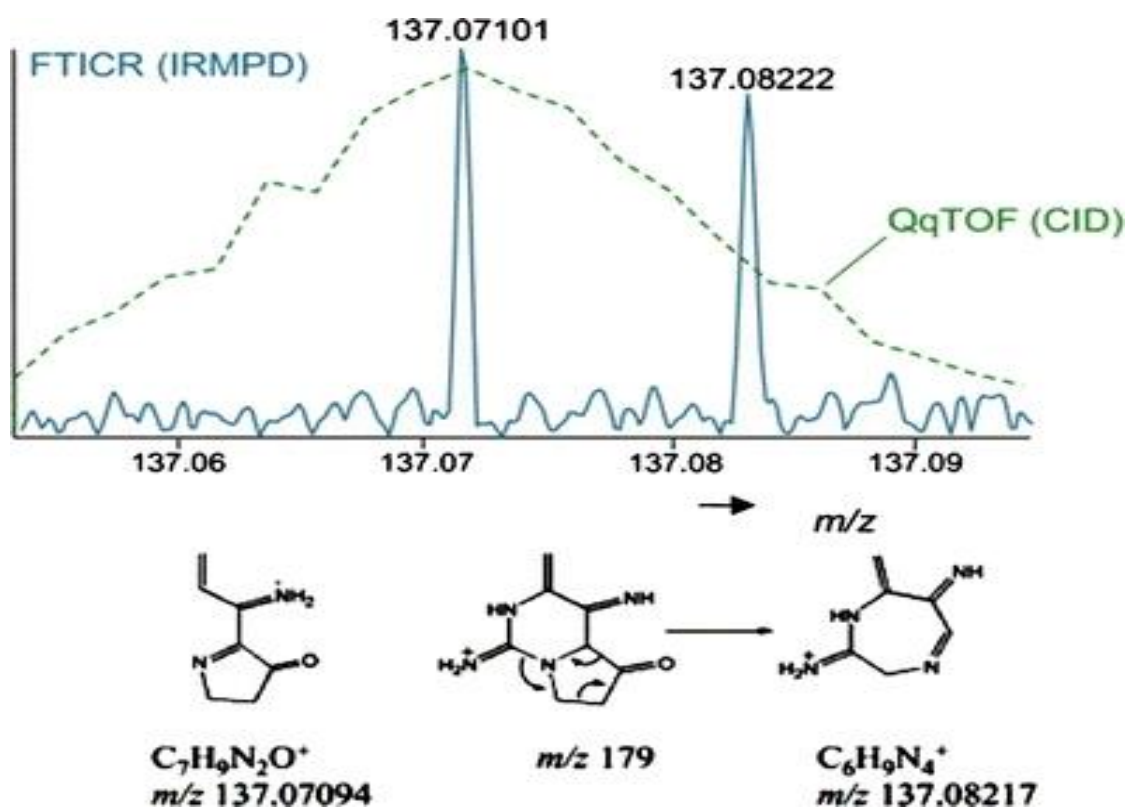


Figura 2-1 Diferencia de resolución obtenida de acuerdo a espectrómetro de masas, FT-ICR-MS vs Q-TOF (línea azul continua vs línea verde punteada) tomado de Kind (2010).

Para la identificación de los metabolitos no es suficiente la caracterización de picos por tiempo de retención y m/z , para poder llegar a una estructura química es necesario primero determinar la fórmula molecular o composición elemental, cada composición

elemental tiene un peso molecular único (masa), pero un peso molecular no tiene una composición elemental única, muchas fórmulas pueden coincidir con la masa, de igual manera pueden haber varios isómeros para cada fórmula, aún con una exactitud de ≤ 1 parte por millón (ppm), no es posible la asignación de una única composición elemental (Kim, Rodgers, & Marshall, 2006; Kind & Fiehn, 2006).

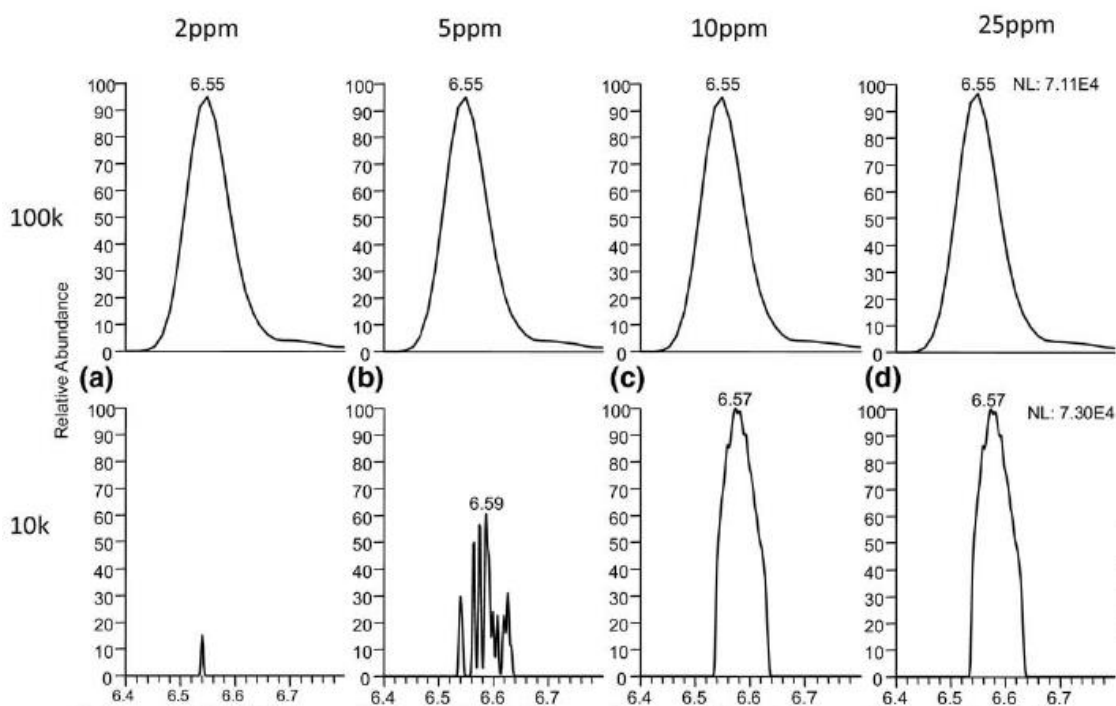


Figura 2-2 Efecto de la resolución en análisis de metabolitos presentes a bajas concentraciones. Tomado de Kellmann (2009). En el eje de las X, se observa el tiempo de retención en minutos, en el de las Y la abundancia relativa

2.5.4. Análisis de datos metabolómicos

Una vez corrida cada muestra, el resultado es un arreglo de miles de m/z detectadas a lo largo del tiempo con sus respectivas intensidades, por lo que estos archivos requieren ser procesados para identificar aquellos picos que presenten m/z y tiempo de retención

únicos, que superen umbrales de ruido de la corrida, y que puedan ser comparados entre las diferentes muestras. Para ello es necesario el uso de programas que ayudan a manejar el gran volumen de datos para realizar los procesos de detección de picos, agrupamiento de isótopos, filtrado por patrón isotópico, alineamiento y llenado de brechas. En la actualidad existen muchos programas para el análisis de datos de MS como MZmine (Katajamaa & Oresic, 2005), XCMS (C. A. Smith, Want, O'Maille, Abagyan, & Siuzdak, 2006), OpenMS (Sturm et al., 2008), MaxQuant (Cox & Mann, 2008), y MRCQuant (Haskins, Petritis, & Zhang, 2011), entre muchos otros.

La detección de picos de masas (también conocidos como features), se realiza sobre los resultados cromatográficos y de espectrometría de cada muestra por separado y busca filtrar aquellos datos que no corresponden a picos con características mínimas de tiempo de retención, m/z , e intensidad. Se agrupa por patrón isotópico y filtran aquellos sin isótopos. Luego la lista de picos de cada muestra es alineada con las listas de las demás muestras, dado que el tiempo de retención cromatográfica puede tener pequeños cambios entre una muestra y otra la alineación debe considerar márgenes de tolerancia. El siguiente paso es el llenado de brechas o ceros, correspondientes a aquellos picos que no fueron detectados o alineados en una muestra y que pueden dificultar el posterior análisis estadístico.

La intensidad de un pico es proporcional a su concentración en la muestra, por lo que la intensidad puede ser utilizada por medio de análisis estadístico para comparar la abundancia de cada pico entre las diferentes muestras.

Análisis estadístico y multivariado. Mediante la aplicación de instrumentos adecuados de análisis estadístico y multivariado, se pueden caracterizar los picos diferenciales, aquellos que de forma estadísticamente significativa se presentan o no, se

sobre- o sub-acumulan en las muestras en respuesta a los tratamientos estudiados, para más adelante identificarlos.

El análisis de componentes principales (PCA) es un método de exploración no supervisado de reconocimiento de patrones que calcula la variación inherente dentro de un conjunto de datos sin el uso de clases. El algoritmo de PCA calcula el monto más alto de variación correlativa a lo largo de PC1 con posteriores PCs que contienen pequeñas cantidades proporcionales de varianza. Para cada modelo construido, los vectores de carga para los PCs pueden ser utilizados para la identificación de los metabolitos para los grupos.

El proceso de recolección de datos puede inducir correlación entre las observaciones o introducir múltiples fuentes de variación más allá de la del error residual. Cada una de estas características (correlación y múltiples fuentes de error) daría lugar a conclusiones ineficientes y potencialmente engañosas en un estudio de investigación si son usados métodos estándar y clásicos de análisis. Los modelos lineales de efectos mixtos son una clase importante de modelos estadísticos que pueden ser usados para analizar datos correlacionados. Como datos que incluyen observaciones agrupadas, mediciones repetidas, mediciones longitudinales, observaciones multivariadas, los cuales no satisfacen la asunción de independencia requerida para muchos métodos estadísticos (Oberg & Mahoney, 2007).

2.5.5. Identificación de compuestos

Identificación por patrones isotópicos. Las especies químicas naturales contienen una mezcla de masas monoisotópicas e isotópicas que dependen de su abundancia natural. Un espectro de masas de resolución suficiente puede presentar la especie iónica en su elemento monoisotópico (M) y un elemento isotópico (M+1) o elementos (M+n). La

composición de la molécula determina la abundancia de sus isótopos, en muchos casos intensidad del pico monoisotópico siempre es más alta que la de sus isótopos, siempre y cuando la molécula no tenga cloro porque en este caso el pico isotópico $M+2$ será el más abundante; o contenga bromo porque $M+1$ y $M+2$ tendrían la misma abundancia

La presencia de picos isotópicos y su abundancia relativa al pico monoisotópico aportan información para limitar la búsqueda de la composición elemental a partir de la medición de la masa exacta. La búsqueda de fórmulas moleculares a partir del patrón isotópico se realiza mediante algoritmos matemáticos, la distribución de isótopos provee información que es única para una composición elemental dada, por lo que el patrón isotópico observado es usado para determinar la composición elemental, para cada fórmula molecular candidata el patrón isotópico es simulado y comparado con el medido, para determinar la mejor coincidencia. Existen diferentes programas para la identificación de la fórmula molecular a partir del patrón isotópico (Scheubert, Hufsky, & Böcker, 2013). Sin embargo, intensidad insuficiente, exactitud limitada, traslapamiento de patrones de isótopos y co-aislamiento complica esta aproximación haciendo de la extracción de patrones de isótopos de datos experimentales una tarea difícil.

Identificación por patrón de fragmentación. El siguiente paso para obtener mayor información de la estructura química consiste en evaluar el patrón de fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS), para crear espectros de masas de múltiples etapas (MS^n) por fragmentación consecutiva del ion precursor y de todos los productos, los espectros resultantes se utilizan para identificar mediante comparación con aquellos reportados en bases de datos de MS/MS que permiten reducir el número de posibles estructuras.

Sin embargo, la identificación definitiva por medio de fragmentación secuencial presenta varias dificultades, entre ellas la resolución de masa nominal de los fragmentos de MS^n que complican el cálculo de la fórmula elemental de la molécula original (Van der Hoof, Vervoort, Bino, & de Vos, 2012); la estrecha cobertura de metabolitos del reino vegetal presentes en las librerías de espectros de masas; la falta de información del comportamiento cromatográfico en los espectros de las librerías, necesario para identificación de isómeros (Wagner, Sefkw, & Kopka, 2003); adicionalmente los problemas inherentes de reproducibilidad de los experimentos de LC/ MS^n generan resultados dependientes de las condiciones de corrida y de los instrumentos (ej. Figura 2-3), limitando el uso de las librerías existentes y por tanto haciendo el proceso de identificación menos eficiente (Bino et al., 2004; Rojas-Cherto et al., 2012). Por lo anterior, muchas de las aproximaciones para identificación de metabolitos usando MS^n involucran intervención manual de expertos en espectrometría de masas por lo que son tareas altamente especializadas y demandantes de tiempo.

2.5.6. Metabolómica de las plantas en respuesta al estrés.

Los estudios de la respuesta y diferencia entre especies sensibles y tolerantes a estrés salino, usando enfoques metabolómicos, han revelado una diversidad de patrones (Sanchez, Siahpoosh, Roessner, Udvardi, & Kopka, 2008), entre ellos, lo primero a destacar es que hay diferencias a nivel constitutivo de metabolitos entre tolerantes y sensibles y lo segundo es que especies diferentes muestran respuestas metabólicas conservadas así como divergentes en respuesta a la salinidad.

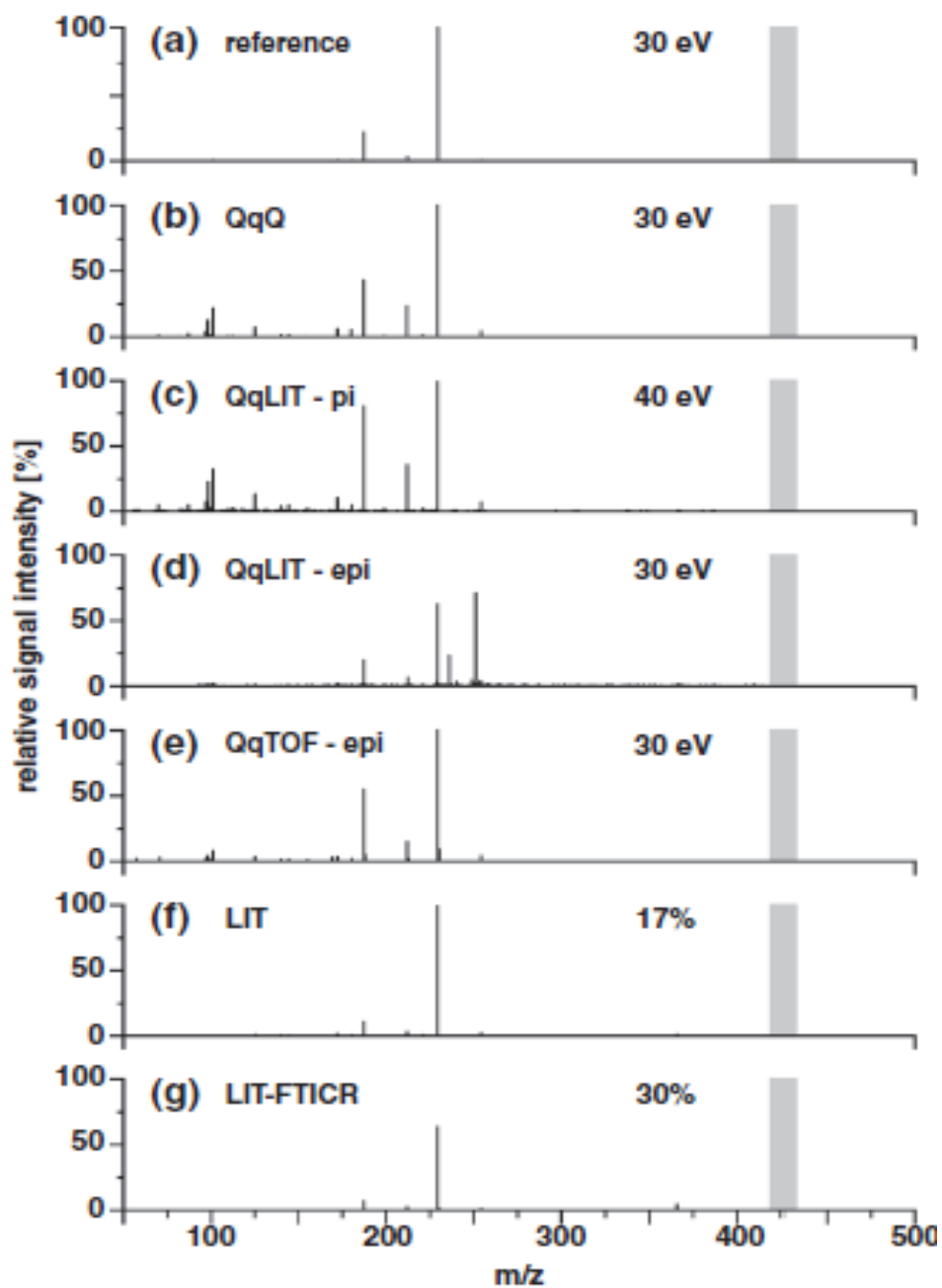


Figura 2-3 Ejemplo de los diferentes resultados de patrones de fragmentación de acuerdo con el espectrómetro que se utilice (Scheubert 2013).

En un estudio de los cambios en los niveles de metabolitos en *Arabidopsis* y *Thellungiella* en respuesta a estrés por salinidad, aquellos positivamente correlacionados participan en mecanismos de remodelación de la pared celular (hidroxiprolina), osmoprotección y almacenamiento (prolina y sacarosa) y fotorrespiración (glicina y serina). Entre los metabolitos que disminuyeron por el estrés en ambas especies están los aminoácidos relacionados con la asimilación y transporte de nitrógeno (glutamina, aspartato y glutamato), así como reguladores de crecimiento (espermidina) (Lugan et al., 2010). La respuesta a estrés de baja intensidad esta probablemente relacionada a los mecanismos de homeostasis y los de alta intensidad enfrentan procesos más caóticos como daños en estructuras y senescencia prematura (Munns, 2002).

Aumentos en contenidos de ciertos aminoácidos (incluido prolina), azúcares (incluyendo sacarosa, fructosa y glucosa) y polioles (incluyendo inositol), han sido reportados en variedades con mayor tolerancia a salinidad al ser comparadas con variedades sensibles de la misma especie, en especies como uva (G. R. Cramer et al., 2007), la halófito *Limonium latifolium* (Gagneul et al., 2007), *Arabidopsis* (Gong, Li, Ma, Indu Rupassara, & Bohnert, 2005; Sanchez, Siahpoosh, et al., 2008), *Lotus japonicus* (Sanchez, Lippold, et al., 2008), y arroz (*Oryza sativa*). Así como una reducción de ácidos orgánicos relacionados con el ciclo del citrato.

En conjunto hay apenas pequeñas diferencias marginales entre las rutas metabólicas activadas por estrés en *Arabidopsis* y *Thellungiella*, diferencias que sugieren que *Thellungiella* es más eficiente en desintoxicación (amonio) y moviliza pocas de sus reservas de almidones (maltosa), posiblemente porque su fotosíntesis persiste por más tiempo (Lugan et al., 2010).

La importancia de la estrategia de ajuste iónico y osmótico a través de compartimentar Na^+ en vacuola también ha sido observada a través de un estudio de la respuesta metabólica a estrés por salinidad en variedades de cebada sensible y tolerantes a salinidad donde los autores concluyen que las diferencias metabólicas pueden estar correlacionadas con la habilidad de secuestrar el Na^+ en la vacuola para evitar daño celular (Widodo et al., 2009). Asociado con la tolerancia en hojas de cebada se observó un incremento en azúcares, polioles y un largo número de ácidos orgánicos los cuales pueden actuar como osmolitos o proveer fuentes de carbón fácilmente disponibles para un mejor crecimiento. En contraste, las hojas de la variedad sensible a salinidad presentan altos contenidos de aminoácidos los cuales pueden estar correlacionados con daño celular, una disminución de ácidos orgánicos posiblemente relacionada con una reducción en la tasa de metabolismo.

En un estudio de la respuesta de césped (*Lolium perenne*) a 24 horas de déficit de P se detectaron alteraciones significativas en el metaboloma y transcriptoma relacionados con el remplazo de fosfolípidos con sulfolípidos y la utilización de un baipás glicolítico (Byrne et al., 2011).

Capítulo 3. Materiales y métodos

En este capítulo se muestra la metodología seguida para caracterizar a nivel fisiológico en planta y metabolómico en frutos, los efectos de la exposición prolongada de condiciones edáficas sub-óptimas en chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.). Los análisis realizados incluyeron mediciones cuantitativas en campo y en laboratorio con el uso de diferentes equipos analíticos para evaluar parámetros fisiológicos de la planta y del fruto (ver Figura 3-1).

3.1. Material vegetal

El estudio se desarrolló en cultivo hidropónico en el invernadero del ITESM (Monterrey, N.L., México 25°40'N 100°18'O, altitud 430 msnm). Para ello se germinaron semillas de chile habanero variedad naranja (Seminis, St. Louis, USA) en bandejas de 128 pozos en peat moss : perlita (2:1 v/v), se trasplantaron a los 45 días a macetas de 7.6 L llenas de perlita; se regaron a diario con agua de pozo con conductividad eléctrica (CE) de 0.9 dS·m⁻¹ y dos veces a la semana con una adaptación de solución Hoagland (Tabla 3-1). El estudio terminó 9 meses después (Julio 2013).

Los tratamientos experimentales consistieron en riego con soluciones nutritivas con déficit de macronutrientes de N (5 mM) tomada de estudio en chile jalapeño (C. D. Johnson & Decoteau, 1996); y déficit de P (0.25 mM) de estudio en chile tabasco (Aldana, 2005); los otros tratamientos consistieron en dos niveles de salinidad (4 y 7 dS·m⁻¹) reportados como negativos para la supervivencia de chile habanero (G. H. Niu et al., 2010); el tratamiento testigo consistió de una adaptación de la solución nutritiva Hoagland (llamada de aquí en adelante Hoagland) a pH 6.0, con CE 2.6 dS·m⁻¹, la cual se ajustó a 15 mM de N y 2.5 mM de P, niveles recomendados para chile jalapeño y chile tabasco, respectivamente.

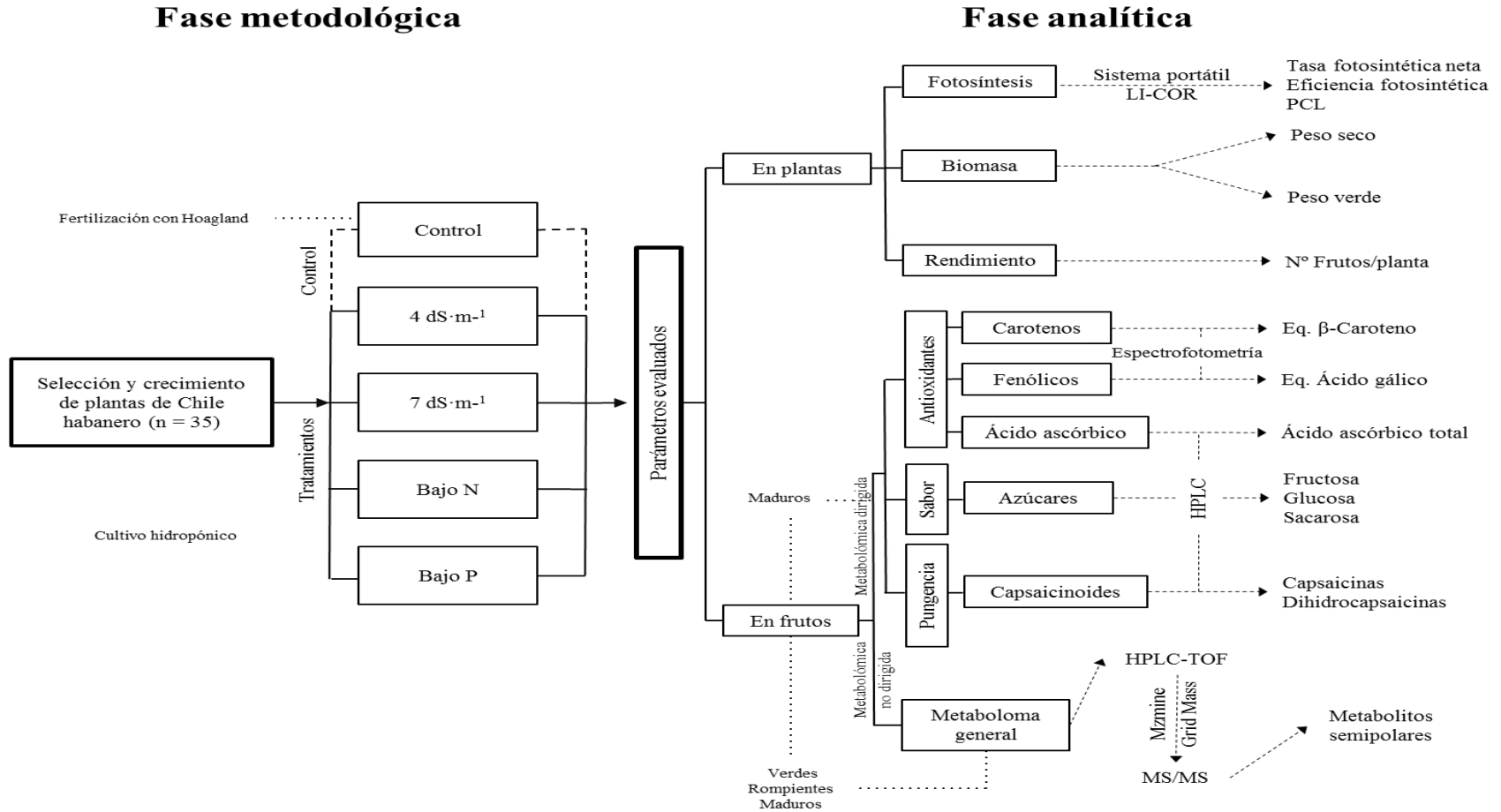


Figura 3-1 Metodología seguida para caracterizar cambios a nivel metabolómico en frutos y fisiológicos en planta, por la exposición prolongada a condiciones edáficas sub-óptimas en chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.).

Los tratamientos de salinidad (CE de 4 y 7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$) se lograron mediante adición de NaCl a la solución Hoagland. La concentración de NaCl en las plantas fue incrementándose gradualmente con cada aplicación de la solución Hoagland a una tasa de 2 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ para evitar un posible shock por sal. Adicionalmente, para prevenir la deficiencia de calcio inducida por salinidad, cada tratamiento de salinidad fue suplementado con 10 mM de Ca^{2+} en forma de CaCl_2 (Cabañero, Martínez, & Carvajal, 2004) (Tabla 3-1). La aplicación de los tratamientos empezó con el inicio de la floración, dos veces a la semana en siete plantas individuales por tratamiento para cada uno de los 5 tratamientos (en total 35 plantas).

Tabla 3-1 *Número de moléculas de cada elemento usado en los diferentes tratamientos, basado en la solución nutritiva Hoagland*

Elemento	Testigo	4 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$	7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$	bajo N	bajo P
K	5.12E+24	5.12E+24	5.12E+24	3.61E+24	4.67E+24
N	9.03E+24	9.03E+24	9.03E+24	3.01E+24	9.03E+24
O	3.79E+25	3.79E+25	3.79E+25	1.99E+25	3.25E+25
H	3.01E+24	3.01E+24	3.01E+24	3.01E+24	3.01E+23
P	1.51E+24	1.51E+24	1.51E+24	1.51E+24	1.51E+23
Mg	1.20E+24	1.20E+24	1.20E+24	1.20E+24	1.20E+24
S	1.20E+24	1.20E+24	1.20E+24	1.20E+24	1.20E+24
Fe	6.02E+22	6.02E+22	6.02E+22	6.02E+22	6.02E+22
Ca	3.01E+24	3.01E+24	3.01E+24	1.20E+24	3.01E+24
Cl	0	9.03E+24	1.51E+25	3.61E+24	0
Na	0	3.01E+24	9.03E+24	0	0
EC	2.6	4	7	2.6	2.6

Microelementos (μM) H_3BO_3 , 46.0; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 9.0; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.76; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.32; $\text{H}_2\text{MoO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.11.

Tabla 3-1 (B) Concentración (mM) de nutrientes en los diferentes tratamientos, basado en la solución Hoagland.

Componente	Testigo	4 dS·m ⁻¹	7 dS·m ⁻¹	bajo N	bajo P
KNO ₃	3.5	3.5	3.5	1	5
KH ₂ PO ₄	2.5	2.5	2.5	2.5	0.25
MgSO ₄	2	2	2	2	2
Fe	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ca(NO ₃) ₂	5	5	5	2	5
CaCl ₂	0	5	5	3	0
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
NaNO ₃	1.5	1.5	1.5	0	0
NaCl	0	5	15	0	0
EC	2.6	4	7	2.6	2.6

Microelementos (μM) H₃BO₃, 46.0; MnCl₂·4H₂O, 9.0; ZnSO₄·7H₂O, 0.76; CuSO₄·5H₂O, 0.32; H₂MoO₄·H₂O, 0.11.

Los frutos se cosecharon en tres diferentes estados de maduración: verde, rompiente (momento en que empieza el cambio externo de verde a naranja) y maduro (tres semanas después de empezar el rompiente). Los frutos colectados fueron pesados individualmente, se removió el cáliz y el pedúnculo y se separó la placenta del pericarpio. Este último fue congelado en nitrógeno líquido y preservado a -80 °C hasta el análisis de metabolitos.

3.2. Evaluación de respuesta fisiológica de la planta

Durante el estudio se evaluaron diferentes parámetros relacionados con la respuesta de la planta a los diferentes tratamientos, como la respuesta fotosintética, los cambios en crecimiento y partición de la biomasa de la planta, y su impacto en metabolitos relacionados con calidad de fruto (pungencia, sabor y antioxidantes). La metodología seguida para estos análisis se presenta a detalle en el capítulo 4, correspondiente al artículo científico “*Effects of substrate salinity and nutrient levels on physiological response, yield, and fruit quality of habanero pepper*”, publicado en la revista HortScience (Urrea-López, Díaz de la Garza, & Valiente-Banuet, 2014).

3.3. Evaluación metabolómica no dirigida

3.3.1. Extracción de metabolitos

La extracción de metabolitos se realizó siguiendo el protocolo de De Vos et al. (2007). Se agrupó el pericarpio congelado de uno a seis frutos por planta, dependiendo de su disponibilidad, y se molió en un mortero congelado con nitrógeno líquido, de esto se tomaron 0.5 g, con un error $\leq 5\%$, y se realizó una extracción con 1.5 ml de 99.875 % de metanol grado HPLC con 0.125% de ácido fórmico frío. Después se mezcló por 10 s usando un agitador de vórtice, seguido por 15 min de sonicación a máxima frecuencia (40 KHz) en agua a temperatura ambiente (20 °C). Luego, la fase líquida fue separada por centrifugación (14,000 Fg a temperatura ambiente) por 10 min; el sobrenadante fue recuperado, filtrado (0.2 μm PTFE) y colectado en viales ámbar de tapa rosca, que se colocaron en el auto-muestreador a temperatura ambiente para su posterior inyección.

3.3.2. Análisis por HPLC-TOF

Los extractos fueron analizados por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés; HPLC 1100 series, Agilent, Santa Clara, California, USA), y espectrometría de masas tiempo de vuelo (MS-TOF por sus siglas en inglés; LC/MSD TOF G1969A, Agilent, Santa Clara, California, USA). De acuerdo con el protocolo de De Vos et al. (2007).

Para la separación cromatográfica se usó una columna Luna 3 μ C18(2) 100Å 150x2.0 mm (Phenomenex, Torrance, California, USA) a 40 °C, con gradiente de agua con 0.1 % de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico (fase B) a un flujo de 0.19 mL·min⁻¹ (Tabla 3-2A). Después de la separación, las muestras pasaron al TOF donde se ionizaron por electro spray (ESI por sus siglas en inglés) en modo negativo y se corrieron bajo las condiciones presentadas en la Tabla 3-2-B. Con el fin de evitar alineamientos sub-óptimos producto de un inadecuado acondicionamiento del sistema, previo a las corridas definitivas se inyectó 4 veces consecutivas la primera muestra y no se inyectaron estándares entre inyecciones de muestras para evitar desplazamientos en los tiempos de retención. Los datos fueron almacenados a razón de un scan por cada 0.9 s, en un rango de 80 a 1800 m/z , en modo centroide el cual genera archivos de menor tamaño que el modo continuo (20 MB vs 60 MB).

Tabla 3-2 *Condiciones de corrida HPLC TOF. A) Gradiente para separación de metabolitos por HPLC. B) Condiciones ESI- TOF bajo las que se corrieron las muestras (tomados de De Vos et al. 2007).*

A)			B)			
Tiempo (min)	% A	% B	Fuente		Parámetros ópticos	
0	95	5	Capilar	2750 V	Fragmentador	225 V
45	65	35	Gas secado	10 L/min	Skimmer	60 V
47	25	75	Presión nebulización	35 psig	OCT RFV	250 V
52	25	75	Temperatura gas	250 °C		
54	95	5				
60	95	5				

Del total de muestras (Tabla 3-3) las primeras extracciones se hicieron en los frutos maduros, las muestras se inyectaron en orden aleatorio para disminuir la posible variación dependiente del tiempo (i.e. deterioro de pre-columna o ESI). Al finalizar todas las muestras se volvieron a inyectar dos veces más, una vez terminadas todas las inyecciones de los frutos maduros se procedió a extraer y correr bajo los mismos protocolos las muestras de chile habanero rompiente y verde.

3.3.3. Procesamiento de datos metabolómicos

Los resultados de las corridas del HPLC-TOF son miles de m/z con tiempo de retención e intensidad, que requieren ser procesados con programas computacionales para

Tabla 3-3 *Diseño experimental con total de muestras por estado de maduración y tratamiento. Cada muestra corresponde a la mezcla de hasta 6 frutos por planta*

Tratamiento Estado	Control	4 dS·min ⁻¹	7 dS·min ⁻¹	bajo N	bajo P	Total muestras
Verde	4	4	4	4	3	19
Rompiente	7	7	6	5	4	29
Maduro	7	6	7	5	5	30
Total muestras	18	17	17	14	12	

identificar aquellos picos que superen umbrales de m/z , tiempo de retención, e intensidad.

Para el procesamiento de datos se utilizó el programa computacional MZmine que realiza las tareas de: reconocimiento del pico (valor m/z) sobre el ruido; agrupamiento de isótopos, filtrado de isótopos y alineamiento de los tiempos de retención a través de múltiples cromatogramas; y la producción de una matriz de datos utilizable para análisis estadísticos.

El procesamiento de los datos se realizó en un computador con procesador Intel Core i7 de 64 bits y 16 Gb de memoria RAM.

Para la identificación de “picos” se utilizó el algoritmo GridMass (elaborado por el Dr. Víctor Treviño y disponible en <http://bioinformatica.mty.itesm.mx/GridMass>) como módulo del programa MZmine 2.1 (Pluskal, Castillo, Villar-Briones, & Orešič, 2010), el cual en un estudio del Dr. Treviño resultó en detectar un mayor número de picos con un menor número de falsos positivos que el algoritmo CentWave (Tautenhahn, Böttcher, & Neumann, 2008), que se ejecuta como un módulo de XCMS (C. A. Smith et al., 2006) en R (R Core Team, 2013) el cual se usa comúnmente en la detección de picos de MS.

Antes de analizar el conjunto de datos de los diferentes tratamientos en los tres estados de maduración se evaluaron diferentes niveles de parámetros del procesamiento de datos, para seleccionar aquellas condiciones capaces de detectar el mayor número de picos, entre los parámetros evaluados están tres niveles de dos parámetros de corrección de línea base; tres parámetros de detección de picos con el GridMass con tres niveles cada parámetro, y de agrupamiento de isótopos dos parámetros con tres niveles (Tabla 3-4), aplicando al final la condición de filtrado de isótopos. Para lo anterior se utilizaron los datos obtenidos del TOF-MS para una muestra de fruto maduro y dos de fruto rompiente en diferentes tratamientos.

De acuerdo con los resultados de la evaluación entre centWave y GridMass, presentados en la sección 3.1 de resultados y discusión, se decidió usar el módulo GridMass para la detección de picos y el programa MZmine 2.1 para el procesamiento de datos. Los parámetros optimizados que se utilizaron para el procesamiento se presentan en la Tabla 3-5.

Tabla 3-4 *Parámetros evaluados en optimización de análisis de datos, con los respectivos niveles y códigos usados.*

<u>Corrección de línea base</u>	
	100,000
<i>Smoothing</i>	1,000,000
	10,000,000
	0.01
<i>m/z bin width</i>	0.1
	1
<u>GridMass</u>	
	50
<i>Minimum height</i>	100
	500
	0.05
<i>m/z tolerance</i>	0.1
	0.25
<i>Smoothing (time-min)</i>	0.075
	0.15
	0.3
<u>Agrupamiento de isótopos</u>	
	0.05
<i>m/z tolerance</i>	0.1
	0.25
	0.05
<i>RT tolerance</i>	0.1
	0.15

3.3.4. Análisis estadístico y multivariado

Una vez identificados los picos en el paso de procesamiento de datos, los resultados fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA) que consiste en un método de agrupamiento no supervisado de reducción de dimensiones, que busca disminuir a un número pequeño de componentes (llamados componentes principales) que expliquen

la mayor parte de la variación de los datos (Jolliffe, 2002). Este y todos los análisis estadísticos de metabolómica se realizaron en el programa R (R Core Team, 2013).

Tabla 3-5 *Parámetros de análisis de datos seguido para todos los resultados en programa MZmine usando módulo de detección de picos GridMass*

Detección de picos (GridMass)	<i>Minimum height</i>	500
	<i>m/z tolerance</i>	0.05
	<i>Minimum width (min)</i>	0.167
	<i>Maximum width (min)</i>	3
	<i>Smoothing time (min)</i>	0.15
	<i>Smoothing m/z</i>	0.05
	<i>False+: Intensity similarity ratio</i>	0.5
	<i>False+: Ignore times</i>	0-5
Agrupamiento de isotopos	<i>m/z tolerance</i>	0.1
	<i>Retention time tolerance</i>	0.15
	<i>Monotonic shape</i>	*sin marcar
	<i>Maximum charge</i>	2
	<i>Representative isotope</i>	<i>Lowest m/z</i>
Filtrado de picos sin isotopos	<i>Minimum peaks in a row</i>	0
	<i>Minimum peaks in an isotope pattern</i>	2
	<i>m/z</i>	<i>Auto range</i>
	<i>Retention time</i>	<i>Auto range</i>
Alineamiento de picos	<i>m/z tolerance (m/z)</i>	0.1
	<i>or (ppm)</i>	30
	<i>RT tolerance (min)</i>	1.5
	<i>RT tolerance after correction (min)</i>	1
	<i>RANSAC iterations</i>	2000
	<i>Minimum number of points</i>	30%
	<i>Threshold value</i>	0.15
	<i>Linear model</i>	Sí
Llenado de brechas	<i>m/z tolerance (m/z)</i>	0.1
	<i>or (ppm)</i>	50

Después del PCA el set de datos obtenidos del procesamiento fueron analizados con un modelo lineal de efectos mixtos, para cada estado de maduración por separado. Este modelo presenta varias ventajas en el análisis de mediciones repetidas ya que se acomoda entre y dentro de la variabilidad individual y maneja conjuntos de datos con observaciones faltantes (i.e. diseños desbalanceados) (De Livera, Zaloumis, & Simpson, 2014). Todos los análisis estadísticos del modelo lineal de efectos mixtos se realizaron usando el paquete lme4 (Bates, Maechler, & Bolker, 2011) en R. El modelo lineal de efectos mixtos sigue la siguiente ecuación $y_i = X_i\beta + Z_i b_i + \epsilon_i$ donde: y_i es la intensidad, X son los efectos fijos o tratamientos de ferti-riego, β son los efectos del tratamiento, Z son las medias de los efectos aleatorios (en este caso, el individuo y la inyección), b son sus coeficientes, y ϵ es el error. El resultado del modelo lineal de efectos mixtos para cada pico fue un valor- p calculado a partir de la función χ^2 , en una comparación contra la hipótesis nula de que no hay cambios ocasionados por el tratamiento ($H_0: y_i = 1 + Z_i b_i + \epsilon_i$)

Sobre los resultados del modelo lineal de efectos mixtos se calcularon valores- q para corregir la proporción de valores significativos que resultan ser. Un valor- q de 0.1 significa que existe un 10% de probabilidad de que el pico detectado como significativamente distinto, no lo sea (Storey & Tibshirani, 2003). Para calcularlo se usó la función `p.adjust`, disponible en el paquete `stats`, en R. Para la caracterización de metabolómica diferencial se usó una magnitud de cambio ≥ 2 , para resultados significativos a un valor- $p \leq 0.001$.

3.4. Identificación putativa de metabolitos diferenciales

Para asignar identidades putativas de metabolitos significativos, se obtuvo el patrón de fragmentación de los picos con valor- $p \leq 0.001$ y magnitud de cambio ≥ 2 , que pudieron ser recuperados al final de la columna de cromatografía, a partir de una nueva extracción

realizada de la mezcla de pericarpios de fruto molidos y guardados a -80°C . La mezcla de varias recuperaciones se inyectaron en un espectrómetro de masas - trampa de iones (LC/MSD Trap XCT Ultra G2446A, Agilent, Santa Clara, California, USA), a $100\ \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$. Para cada infusión se corrió una optimización de parámetros (*Capillary*, y *Ion optics*), por lo que las únicas condiciones que se conservaron fueron las siguientes: gas de secado= $4.0\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de secado= $325\ ^{\circ}\text{C}$, número de iones precursores=2, umbral absoluto=10000.

Se realizó una fragmentación consecutiva automática de iones precursores y de los productos más abundantes, llegando como máximo a MS4 (esto es, la medición de tres fragmentaciones consecutivas) en modo negativo y positivo por cuatro minutos en cada modo, en un rango de 100 a 2000 m/z , definiendo manualmente en cada inyección el primer ion precursor que se debía incluir. Los espectros de masas resultantes se compararon con aquellos reportados en bases de datos de MS/MS y se analizaron para determinar las pérdidas neutrales y tratar de predecir los compuestos perdidos en cada paso de fragmentación.

Para reducir el número posible de fórmulas elementales de los picos inyectados en el trampa de iones, se utilizó el programa *seven golden rules* que usa reglas heurísticas que filtran las fórmulas moleculares a partir de la masa exacta neutral del ion precursor, considerando la exactitud de la masa, la abundancia isotópica experimental y el error de la abundancia isotópica.

El programa *seven golden rules* aplica las siguientes siete reglas heurísticas: 1) restricción del número de elementos, 2) aplicación de las reglas químicas LEWIS y SENIOR, 3) uso de patrones isotópicos, 4) tasas hidrógeno/carbono, 5) relación de nitrógeno, oxígeno, fósforo, y azufre frente a carbono, 6) probabilidades de tasa de

elementos, 7) presencia de compuestos trimetilsililados. Estas reglas permiten la exclusión automática de fórmulas moleculares equivocadas o con contenidos pocos probables de elementos, y generan una asignación correcta con una probabilidad del 98% siempre y cuando exista en la base de datos (Pubchem, Dictionary of Natural Products), y que la adquisición de datos se realice con resolución completa de los compuestos únicos (Kind & Fiehn, 2007).

Los resultados del *seven golden rules* se buscaron en el Dictionary of Natural Products (<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=10509629&si=&>) en Metlin (http://metlin.scripps.edu/metabo_advanced.php) (C. A. Smith et al., 2005), en KNApSAcK (http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK_Family/) (Afendi et al., 2012), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/index.html>), MassBank (<http://www.massbank.eu/MassBank/index.html>) (Horai et al., 2010), y NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>), estas bases de datos a excepción de PubMed permiten buscar también por peso molecular.

Luego los resultados de los patrones de fragmentación se buscaron en el MassBank que tiene 40,889 espectros MS/MS disponibles y en el ReSpect for Phytochemicals (<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/index>) con 9,017 espectros. Asimismo se realizó una búsqueda de los patrones de fragmentación. Los resultados de la búsqueda por pesos moleculares y formulas moleculares se cruzaron con los de patrones de fragmentación y del tamizaje bibliográfico y se propusieron identidades putativas de metabolitos semi-polares.

Capítulo 4. Artículo científico

Este capítulo corresponde al artículo aceptado en la revista HortScience “*Effects of substrate salinity and nutrient levels on physiological response, yield, and fruit quality of habanero pepper*” Urrea-López, Díaz de la Garza, & Valiente-Banuet, 2014. Se adjunta versión impresa del artículo.

Effects of Substrate Salinity and Nutrient Levels on Physiological Response, Yield, and Fruit Quality of Habanero Pepper

Rafael Urrea-López, Rocío I. Díaz de la Garza, and Juan I. Valiente-Banuet¹

Escuela de Biotecnología y Alimentos, Centro de Agrobiotecnología, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, NL 64849, México

Additional index words. *Capsicum chinense*, phosphorus, photosynthetic response, pungency, salinity, soluble sugars

Abstract. Although habanero peppers (*Capsicum chinense*, Jacq.) are highly appreciated as a result of their organoleptic and pungency properties, the crop faces edaphic stresses throughout Mexico. A study was conducted to determine how the photosynthetic parameters, vegetative growth, yield, and fruit quality of the plant change in response to suboptimal conditions in the substrate. Habanero plants were grown in an inert substrate (perlite) and exposed to increased salinity levels (4 and 7 dS·m⁻¹) and reduced nitrogen and phosphorus conditions. Plants grown with a Hoagland-based solution were used as controls. High salinity conditions reduced the light-saturated photosynthetic rates (64% of the control) but did not compromise yield or fruit quality. This effect was possibly the result of the addition of Ca²⁺, which reduced salinity-induced calcium deficiency. Although comparable low nitrogen levels in previous studies were shown to cause a severe reduction in plant viability, in our study, low nitrogen reduced the light-saturated photosynthetic rates (47% of the control) and shoot:root ratio (67% of the control) but did not significantly affect yield or fruit quality. Low nitrogen and 7-dS·m⁻¹ treatments increased fructose and glucose content (increases of 27% and 21%, respectively). Low phosphorus significantly affected plant growth and yield and reduced fructose content (73% of the control). Plants were not sensitive to low nitrogen and high salinity, possibly as a result of the use of nitrate-based fertilizers and the addition of calcium, respectively. These results provide guidelines for habanero pepper production under suboptimal edaphic conditions.

Habanero pepper plants belong to the *Capsicum* genus, which contains 327 domesticated species and 2000 cultivars (Eshbaugh, 1993). These cultivated species originate from three to five wild relatives (Andrews, 1995; DeWitt and Bosland, 1996) and their phylogenetic center of origin is probably Peru or Bolivia (Basu and De, 2003). Although habanero peppers were first introduced into Mexico from Cuba (Laborde and Pozo, 1984), currently the Yucatan peninsula is considered a genetic reservoir for this species. Habanero peppers are highly appreciated as

a result of their flavor and high pungency; however, their widespread production is limited by a lack of highly productive cultivars that show good performance when facing suboptimal biotic and abiotic factors (Santana-Buzzy, 2010).

High salinity conditions in agricultural soils constitute one of the most serious challenges faced by horticultural crops in Mexico. It is estimated that by 2002, more than 1 million hectares were affected by salinity problems (SEMARNAT, 2012), causing a reduction in agricultural productivity between 30% and 50% (Umali-deininger, 1993). This problem may continue to worsen as a result of deficient irrigation practices, the wide use of well water and fertilizers, high evaporative conditions, and the recurrence of droughts. Plants of the *Capsicum* genus show wide genetic heterogeneity (Loaiza-Figueroa et al., 1989), which is evident by the presence of sensitive and tolerant genotypes in their response to salinity (Aktas et al., 2006; Niu et al., 2010b). In sensitive cultivars, salinity affects growth, yield, and fruit quality (Ayers and Westcot, 1985; Lycoskoufis et al., 2005; Navarro et al., 2002). Bell pepper (*C. annuum* L. ‘California Wonder’) is an example of

a sensitive cultivar in which salinity primarily affects plant–water relations. At low salt levels (30 mM NaCl or 33.8 dS·m⁻¹), this response is related to osmotic stress, whereas at higher levels (60 mM NaCl or 37.5 dS·m⁻¹), the plant–water effects are related to ionic stress (Silva et al., 2008). The detrimental impact of salinity on chile ancho plants (*C. annuum* ‘Caballero’) varies for each tissue; fruits are more sensitive than leaves and stems (Azuma et al., 2010). On the other hand, *C. annuum* ‘NMCA10652’ has shown more tolerance to salinity treatments, having a 100% survival rate and showing no significant changes in plant growth and fruit yield up to a soil electrical conductivity (EC) of 4.1 dS·m⁻¹ (Niu et al., 2010a).

Another important limiting factor for plant development that affects *Capsicum* plants is soil nutrient deficiency. In modern agriculture, nitrogen (N) is considered the most commonly deficient nutrient followed by phosphorus (P) (Halvin et al., 2005). In *Capsicum*, N deficiency affects plant growth, yield, and the accumulation of secondary metabolites (e.g., capsaicin) (Johnson and Decoteau, 1996; Medina-Lara et al., 2008). Similarly, P deficiency reduces the light-saturated photosynthetic rate, stomatal conductance, and leaf internal CO₂ concentration of chile ancho ‘San Luis’ and bell pepper ‘Jupiter’ (Davies et al., 1999). P concentration of 0.25 mM in a hydroponic system has been found to be insufficient for pepper production of *C. frutescens* (Aldana, 2005). A deficit of both macronutrients (N and P) severely reduces yield and fruit size (weight and length) of ‘California Wonder’ (Roy et al., 2011).

On the other hand, plant growth conditions also affect the accumulation of primary and secondary metabolites within the pepper fruit. Changes in metabolite levels have an impact on the plants’ organoleptic and nutritious properties. The metabolites involved in protection or detoxification change at high salinity levels (Mansour, 2000) and conditions of macronutrient deficiency (Dixon and Paiva, 1995). These metabolites also change as a result of the plants’ adaptation to high salinity or macronutrient deficiency, affecting fruit quality parameters (Wang and Frei, 2011).

The objective of this study was to characterize the effects of long-term exposure to common suboptimal substrate conditions on a full range of parameters in habanero pepper plants. These parameters include yield and photosynthetic response and the impact on fruit quality by measuring capsaicinoids, total phenolics, ascorbic acid, carotenoids, and sugars in the pericarp of ripe fruit.

Materials and Methods

Plant materials. The study was conducted under greenhouse conditions at ITESM facilities in Monterrey, N.L., Mexico (lat. 25°40′ N, long. 100°18′ W, altitude 430 m). Habanero pepper ‘Orange’ seeds (Seminis, St. Louis, MO) were established in 128-cavity trays

Received for publication 3 Jan. 2014. Accepted for publication 18 Mar. 2014.

This research was funded by the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, scholarship 229274 to R.U.-L.), the Cátedra Empresarial de Tecnologías de Agricultura Intensiva, the Biotecnología Agrícola y Ambiental Strategic Project, and to the Graduate Program of the Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

We thank Ivan Vaingerl for technical assistance with the photosynthetic measurements.

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail valiente@itesm.mx.

filled with 2 sphagnum peatmoss:1 perlite (by volume). At 45 d after planting (Oct. 2012), the seedlings were transplanted to 7.6-L containers filled with perlite; plants were irrigated daily with well water (EC of 0.9 dS·m⁻¹) and twice a week with a Hoagland-based solution (see below). The study was ended 9 months later (July 2013).

Experimental treatments were initiated at the onset of flowering and consisted of the application of different nutrient solutions (Table 1) twice a week on seven individual plants per treatment (total number of plants was 35). Control treatments consisted of Hoagland-based nutrient solution (hereinafter referred to as Hoagland) at pH 6.0 with an EC of 2.6 dS·m⁻¹. This solution was modified from the basic Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950) adjusting to 15 mM N concentration, recommended for Jalapeño pepper (Johnson and Decoteau, 1996) and to 2.5 mM P concentration recommended for Tabasco pepper (Aldana, 2005). Increased salinity levels (EC of 4 and 7 dS·m⁻¹) were achieved by the addition of sodium chloride to the Hoagland solution. Sodium chloride was gradually increased with each application of Hoagland solution at a rate of 2 dS·m⁻¹ per week to avoid possible salt shock. Additionally, to prevent sodium-induced calcium deficiency, each salinity treatment was supplemented with 10 mM Ca²⁺ as CaCl₂ (Cabañero et al., 2004). Low N and low P solutions were prepared based on the Hoagland solution by reducing the concentration from 15 to 5 mM for N and from 2.5 to 0.25 mM for P. CaCl₂ was added to the low N treatment for calcium balance (Table 1).

Photosynthetic response. Light response curves were measured at the end of the study on healthy mature leaves from four different plants under each treatment condition using a portable photosynthesis system (LI-6400XT; LI-COR, Lincoln, NE). Leaves were exposed to irradiance levels from 0 to 2000 μmol·m⁻²·s⁻¹ and allowed to equilibrate. In the leaf chamber, the flow rate of CO₂ was fixed at 400 μmol·s⁻¹, air temperature was set at 25 °C, and relative humidity at 50% to 70%. The photosynthetic parameters evaluated included light compensation point, photosynthetic efficiency, and light-saturated photosynthetic rate. Photosynthetic efficiency was estimated using the slope of the response curve at the five lowest

photosynthetic photon flux densities (from 0 to 150 μmol·m⁻²·s⁻¹) (Bassman and Zwier, 1991; Björkman, 1981).

Biomass analysis. General plant growth and partition were assessed using three representative plants from each treatment condition to complete a biomass analysis. Yield data included the cumulative number of fruits and their corresponding weights for each plant. Foliar area was calculated by scanning all leaves from each plant using a portable area meter (LI-3000C; LI-COR). Fresh and dry weight biomasses were calculated separately for shoots and roots.

Metabolite extraction. Fruit samples were obtained by tagging fruits at the breaker ripening stage and collecting them 3 weeks later. On harvesting, calyx and peduncle were removed from the fruits, and the pericarp tissue was separated from the placenta. Pericarp was frozen in liquid N and preserved at -80 °C until metabolite analysis.

Frozen pericarps from six fruits per plant replicate were pooled and grinded in a frozen mortar with liquid N₂; for the low P case, one fruit per plant was analyzed as a result of low fruit production. The grinded material was divided into aliquots of ≈0.2 g for each metabolite extraction. In general, grinded samples were sonicated for 5 min in an appropriate solvent depending on the extraction protocol (details below). Then, the liquid phase was separated by centrifugation (14,000 g at 4 °C) for 10 min; the supernatant was recovered and kept on ice while the extraction was repeated at least another two times on the pellet. Pooled extracts were filtered using syringe filters (0.2 μm) and collected in amber glass vials for measurement.

Ascorbic acid. Ascorbic acid analysis was performed using the technique described by Gökmen et al. (2000) with modifications. Extractions were made in deionized water. Polyphenols were eliminated from the sample using a solid-phase extraction (SPE) cartridge (Oasis MAX, Milford, MA). Extracts were passed through an equilibrated SPE (6 mL methanol with 0.1% HCl) followed by 6 mL water with 0.1% HCl from which the flow-through was recovered. Cleaned extracts were filtered and incubated with 1 mg·mL⁻¹ dithiothreitol at room temperature for 75 min under N₂ atmosphere. Sample separation and detection were conducted on a high-performance liquid chromatography

(HPLC)-photo diode array system (HPLC-PDA 2996, Milford, MA) using an Atlantis dC18 column (Catalog 186001344; Milford, MA) with an isocratic elution using a phosphate buffer (200 mM; pH 2.4) as the mobile phase. Ascorbic acid quantification was estimated at 244 nm using calibration curves made with an ascorbic acid standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Sugars. Sugars were extracted with deionized water and the extracts were filtered and injected into an HPLC-evaporative light-scattering detection system (ELSD 1200 series, Santa Clara, CA). Separation was achieved at 35 °C using an Xbridge column (Catalog 186004870, Milford, MA) with a gradient of acetonitrile:water (80:20, v/v) with 0.2% triethylamine (Phase A) to acetonitrile:water (30:70, v/v) containing 0.2% triethylamine (Phase B) with a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The gradient consisted of 10% Phase B at Time 0, increasing until 70% in 16 min. For the ELSD, the drift tube temperature was set at 50 °C. Fructose, glucose, and sucrose were identified and quantified by comparison with an external calibration mixture made with commercial standards (Merck, Darmstadt, Germany).

Carotenoids. Carotenoids were measured by extracting samples with 10 mL of acetone followed by sonication and filtration through filter paper (Whatman number 1, Little Chalfont, U.K.) under dim light. The permeated liquid was flushed with N₂ and kept on ice while samples were re-extracted until the solid was colorless. The concentration of the pooled extracts was measured at 450 nm in a spectrophotometer (DU 800, Pasadena, CA). Total carotenoid content was expressed as β-carotene equivalents calculated using a β-carotene extinction coefficient in acetone ($\epsilon = 140663 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Phenolics. Total phenolic contents were determined using the Folin-Ciocalteu (FC) assay (Folin and Ciocalteu, 1927). Aliquots were extracted in accordance with Marinova et al. (2005) using methanol:water (80:20 v/v). FC reagent (Sigma-Aldrich) was added to the extracts and the total phenolic concentration was measured at 765 nm with a multimode microplate reader Synergy HT (BioTek, VT) and expressed as gallic acid equivalents according to a calibration curve made with gallic acid (Sigma-Aldrich).

Capsaicinoids. Capsaicinoids were extracted using the procedure described by Wahyuni et al. (2011). Briefly, samples were subjected to methanol extraction and the extracts were separated using liquid chromatography (HPLC-PDA 2996) using a Luna C18(2) column (Catalog 00F-4251-B0, Torrance, CA) maintained at 40 °C with a 28-min gradient of water:formic acid 0.1% (Phase A) and acetonitrile:formic acid 0.1% (Phase B) starting with 50% Phase B that increased to 63% in 15 min. Then, the column was washed for 3 min with 90% B and equilibrated for 10 min before the next injection with a flow rate of 0.19 mL·min⁻¹. Detection was achieved at 280 nm by a PDA detector. Capsaicin and dihydrocapsaicin were identified and quantified

Table 1. Hoagland-based nutrient solution components in different treatments.^a

Component (mM)	Ctrl	4 dS·m ⁻¹	7 dS·m ⁻¹	Low nitrogen	Low phosphorus
KNO ₃	3.5	3.5	3.5	1	5
KH ₂ PO ₄	2.5	2.5	2.5	2.5	0.25
MgSO ₄	2	2	2	2	2
Iron	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ca(NO ₃) ₂	5	5	5	2	5
CaCl ₂	0	5	5	3	0
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
NaNO ₃	1.5	1.5	1.5	0	0
NaCl	0	5	15	0	0
Electrical conductivity	2.6	4	7	2.6	2.6

^aSeven individual plants were used for each treatment. Microelements (μM) H₃BO₃, 46.0; MnCl₂·4 H₂O, 9.0; ZnSO₄·7 H₂O, 0.76; CuSO₄·5 H₂O, 0.32; H₂MoO₄·H₂O, 0.11.

using an external calibration curve obtained using commercial standards (Sigma, St. Louis, MO).

Statistical analysis. Treatments were conducted for seven independent plant replicates. The results show the calculated mean and SD values. Data were analyzed using analysis of variance (SPSS Version 15, Chicago, IL). Tukey's honestly significant difference post hoc tests and homogeneous subset analyses were conducted to determine which treatments significantly differed from each other. Variations were considered significant at the $P \leq 0.05$ significance level. Light response curves were evaluated using repeated measures analysis.

Results

Photosynthesis. The impact of nutrient levels and salinity conditions on photosynthetic efficiency was measured in four independently treated plants and compared with controls grown with Hoagland solution irrigation. Light response curves show how each treatment affected the capacity of the plant to fixate CO_2 (Fig. 1). Control plants had a photosynthetic efficiency comparable to

values obtained in previous studies on *C. annuum* 'Zhongjiao' and 'Nuijiao' (Fu et al., 2010). The light-saturated photosynthetic rate was reduced significantly at low N and 7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ salinity levels to 47% and 64%, respectively, of the observed control rate (Table 2; Fig. 1). Light compensation point and photosynthetic efficiency were unaffected by any of the treatments.

Yield and biomass. Three plants per treatment and control were subjected to complete biomass analysis. Foliar area and leaf biomass were reduced significantly in the low P treatment. On the other hand, the shoot:root ratio showed a significant reduction in the low N and low P treatments (Table 3). Fruit yield, measured as the number of fruits and biomass per plant, was only significantly reduced when plants were exposed to low P. Individual plants that were subjected to this treatment produced just one to six fruits per plant in comparison with the average of 34 produced by the control plants (Table 3). Interestingly, these few fruits reached a similar weight as the controls and matured normally. The other treatments did not produce significant changes in the other fruit parameters measured. Nonetheless, although

not significantly different, plants exposed to low N conditions presented a slight increase in yield.

Metabolites in fruit. Metabolites related to fruit quality (pungency, flavor, and antioxidants) were quantified in pericarp tissue: capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin), sugars (fructose, glucose, and sucrose), and antioxidants (ascorbic acids, carotenoids, and phenolics). Capsaicin and dihydrocapsaicin levels were measured as indicators of pungency (Fig. 2). Capsaicinoid accumulation varies greatly among habanero cultivars; the levels found in 'Orange' are comparable to the low content end of those found in the pericarp of other habanero cultivars (Canto-Flick et al., 2008). Capsaicin was the most abundant capsaicinoid in all treatments, averaging 70% of total capsaicin levels; dihydrocapsaicin was the second-most abundant capsaicinoid detected in all pericarp samples. Although not significantly different from the controls, capsaicin and dihydrocapsaicin levels were highest for the high salinity treatments (179.9 $\text{mg}/100\text{ g}$ at 7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$) and reduced at the low P concentration (66.4 $\text{mg}/100\text{ g}$) (Fig. 2).

Sugars contribute considerably to the flavor and nutritional value of *Capsicum*

121

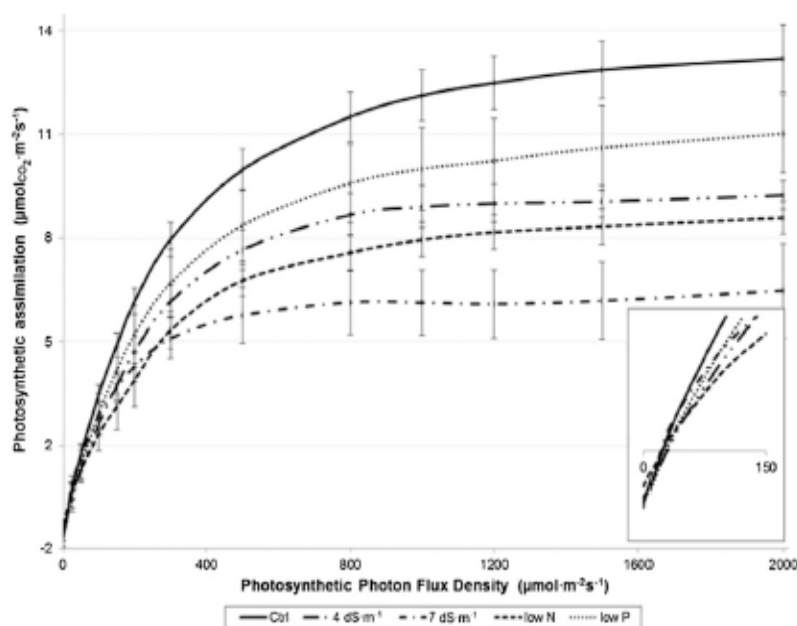


Fig. 1. Light response curve in habanero 'Orange' exposed to suboptimal nutrient levels and increased salinity conditions. Each point represents the average of at least four biological replicates; vertical lines indicate \pm se.

Table 2. Comparison of photosynthetic characteristics of mature leaves of habanero 'Orange' grown under suboptimal substrate conditions.^a

Parameters	Ctrl	4 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$	7 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$	Low nitrogen	Low phosphorus
LCP ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	22.7 (6.9)	30.6 (8.7)	23.6 (11.9)	30.5 (13.1)	29.9 (11.9)
P_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	12.7 (1.0) c ^b	8.7 (0.4) a,b,c	6.0 (1.4) a*	8.1 (0.5) a,b*	10.5 (1.1) b,c
PE	0.036 (0.002)	0.028 (0.002)	0.028 (0.003)	0.022 (0.004)	0.032 (0.005)

^aLCP = light compensation point; P_{max} = light-saturated photosynthetic rate; PE = photosynthetic efficiency (\pm se).

^bDifferent letter indicates significant difference from homogeneous subset Tukey's test when the main effect was significant.

^cStatistically significant difference, $P \leq 0.05$ from analysis of variance compared with control Tukey's post hoc test.

Table 3. Influence of treatments on yield of habanero 'Orange' pepper plants.^a

Parameters	Ctrl	4 dS.m ⁻¹	7 dS.m ⁻¹	Low nitrogen	Low phosphorus
Leaf area (cm ²)	4244.0 (746.9) a ^b	3394.0 (636.6) a, b	2893.2 (582.1) a, b	3015.0 (931) a, b	1920.0 (708.4) b*
Dry shoot (g/plant)	97.2 (24.7) a	80.3 (3.4) a	65.6 (5.3) a, b	63.1 (18.1) a, b	36.2 (10.3) b*
Dry root (g/plant)	24.8 (3.1)	20.2 (1.6)	20.9 (5.0)	24.6 (9.2)	15.4 (3.4)
Shoot:root ratio	3.9 (0.7) a	4.0 (0.2) a	3.2 (0.6) a, b	2.6 (0.3) a, b*	2.3 (0.8) b*
Fruit number (g/plant)	34 (7) a, b	24 (10) a	36 (18) a, b	45 (16) b	2 (2) c*
Fruit biomass (g/plant)	150.9 (28.7) a, b	97.8 (18.3) a	103.6 (36.5) a	189.7 (53.8) b	8.3 (8.7) c*
Average fruit weight (g)	4.4 (0.4)	4.4 (1.0)	3.3 (1.1)	4.3 (0.4)	3.7 (0.6)
Fruit moisture (%)	87.2 (1.3)	86.6 (0.5)	85.8 (1.3)	86.1 (0.5)	86.7 (0.4)

^aValues represent the average of at least three biological replicates (\pm se).

^bDifferent letter indicates significant difference from homogeneous subset Tukey's test when the main effect was significant.

*Statistically significant difference, $P \leq 0.05$ from analysis of variance compared with control Tukey's post hoc test.

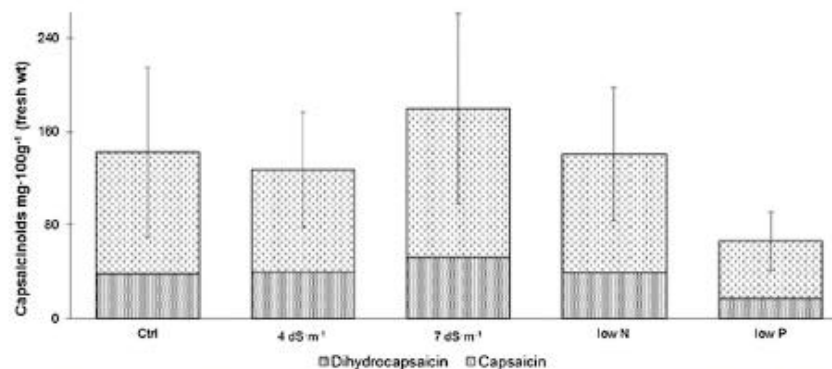


Fig. 2. Levels of capsaicin and dihydrocapsaicin in pericarp of ripe fruits of habanero 'Orange' grown under suboptimal nutrient levels and increased salinity conditions. Each bar represents the average of at least five biological replicates; vertical lines indicate \pm se of total capsaicinoids.

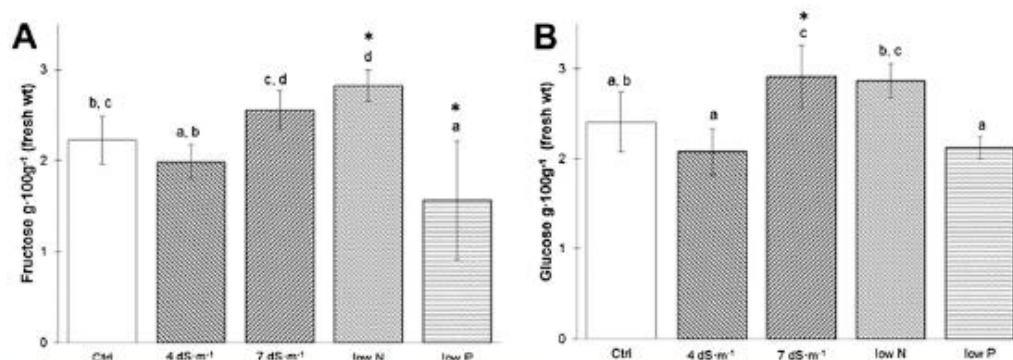


Fig. 3. Levels of fructose (A) and glucose (B) in pericarp of ripe fruits of habanero 'Orange' grown under suboptimal nutrient levels and increased salinity conditions. Each bar represents the average of at least five biological replicates; vertical lines indicate \pm se. *Statistically significant difference, $P \leq 0.05$ from analysis of variance compared with control Tukey's post hoc test. Different letter indicates significant difference from homogeneous subset Tukey's test when the main effect was significant.

fruits (Luning et al., 1994; Navarro et al., 2006). In all treatments studied, fruit accumulated glucose and fructose; sucrose accumulation was below our detection limits in all samples. Significant differences were found in some treatments regarding both sugars in mature pepper pericarp. Low N and the salinity treatment 7 dS·m⁻¹ significantly increased fructose and glucose levels by 27% and 21%, respectively (Fig. 3). Conversely,

low P significantly reduced fructose accumulation in the fruit (73% of the control).

Capsicum fruits are considered a good source of provitamin A (carotenoids) and vitamin C (ascorbate); these groups of metabolites have well-recognized antioxidant properties. In addition, the fruits also accumulate phenolic compounds that can have an antioxidant effect when consumed (Antonious et al., 2006). Surprisingly, the conditions tested in this

study did not significantly affect the accumulation of these metabolites in mature habanero peppers (Fig. 4). Phenolic compounds accumulated to the same extent throughout all samples analyzed (Fig. 4C). However, we did observe an increasing trend in the accumulation of carotenoids and ascorbic acid in the low P condition, the treatment that caused the highest impact, lowering fruit production to just a couple of fruits per plant (Fig. 4A–B).

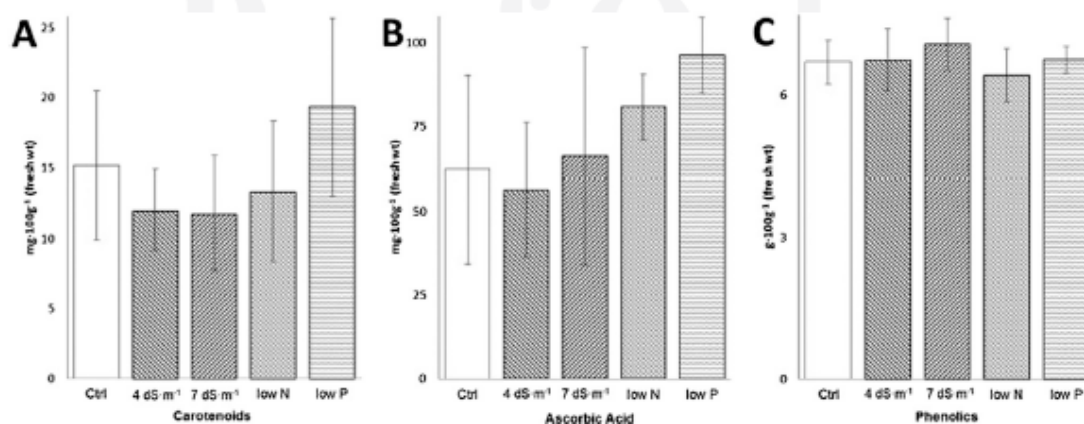


Fig. 4. Levels of carotenoids (A), ascorbic acid (B), and phenolics (C) in pericarp of ripe fruits of habanero 'Orange' grown under suboptimal nutrient levels and increased salinity conditions. Each bar represents the average of at least five biological replicates; vertical lines indicate \pm SD.

Discussion

Horticultural crops present a wide variety of responses to long-term exposure to sub-optimal substrate conditions. In the case of *Capsicum*, different cultivars have shown a wide variety of responses to nutritional and abiotic stresses. Thus, it is important to characterize cultivars based on the most common edaphic problems faced by horticultural crops. Habanero pepper is considered an economically important cultivar in southern Mexico, where soil conditions are not optimal (e.g., high salinity, low N and P). In this article, we present an integrated analysis that investigated these effects on several aspects of plants' physiological parameters, including photosynthetic response, yield, biomass, and fruit quality. All experiments were conducted using an inert substrate (perlite). Although the use of substrates may not necessarily reflect an actual plant-soil interaction, they constitute a suitable means to evaluate plant responses to controlled conditions in the substrate (Poorter et al., 2012). This knowledge can be promptly applied for habanero pepper greenhouse production and/or serve as the basis for field determinations.

Increased salinity. Suboptimal substrate conditions had an inhibitory effect on the light-saturated photosynthetic rate. High salinity levels have been documented as reducing photosynthetic response (see Sudhir and Murthy, 2004), and in our study, only the high salinity treatment ($7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) significantly reduced the light-saturated photosynthetic rates (47.2% of the control) (Table 3). These results are in agreement with those of Azuma et al. (2010), who grew chile ancho peppers with 50 and 100 mM of salt (≈ 7 and $11 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, respectively) and observed reductions in the light-saturated photosynthetic rate of *Capsicum* plants of 18% and 32%, respectively. Reduction of the photosynthetic response caused by salinity treatments was more evident in habanero pepper plants than chile ancho; however, light-saturated

photosynthetic rate measurements for these plants were performed earlier in their development, which could have impacted the effects of the treatments. In our case, photosynthetic measurements were carried out at the end of the study; therefore, the reduction in photosynthetic response could be related to an intensified effect of sodium and/or chlorine in plant tissue over time.

Although the increased salinity treatment ($7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) reduced the photosynthetic response, it did not significantly affect any of the measured fruit yield parameters (i.e., total and average fruit weight, number of fruits, or moisture content). Our results this time contrast with the changes observed in chile ancho plants, in which the fruit was the only organ that changed biomass in response to high salinity treatments (a reduction of 66% of the control).

On the other hand, Niu et al. (2010a) reported that comparable salinity levels (2.5 and $4.1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) severely damaged habanero plants grown in the field, whereas all plants in this group of greenhouse-grown habanero peppers survived throughout this study. The contrasting responses could have been caused by differences in experimental conditions. Plants grown in the field were probably exposed to higher salinity levels than the applied treatments as a result of intrinsic soil salinity, interaction with soil particles, and variations in soil-water availability. In addition, the timing of the treatments was different; although we started at the onset of flowering, in their work, salinity treatments were applied to younger plants. Furthermore, we added Ca^{2+} to the nutrient solution (Table 1), which possibly reduced salinity-induced calcium deficiency. All this could contribute to the resilience to higher salinity conditions observed in this work. Our results also show that even the high salinity levels used in our study were not sufficiently elevated to affect fruit yield when supplemented with calcium. Therefore, we suggest that, for habanero pepper plants, the addition of calcium could

ameliorate the effects of high salinity on fruit yield, as suggested by Cabañero et al. (2004) for 'California'.

High salinity treatments ($7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) also caused a significant increase in fruit glucose levels. Accordingly, in 'Caballero' peppers, a 20% increase in soluble sugars was observed in fruit grown at high salinity levels (Azuma et al., 2010). Salinity in soil can be responsible for changes in fruit metabolism and physiology (Saito et al., 2008). Also, in another study on Solanaceae, tomato plants that were exposed to moderate salinity levels presented an increase in starch biosynthesis in developing fruits, which is believed to increase sink strength. During maturation, subsequent starch hydrolysis could increase soluble sugar levels (Petreikov et al., 2009). In the 'Momotaro Fight' tomato cultivar, increased sugar accumulation from NaCl treatment ($5 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) was sufficient to be perceived by consumers, which could have a positive impact on its organoleptic properties. It appears that tomato cultivars can be more susceptible to salinity treatments (including reduction in yield, fruit number, and weight) than habanero 'Orange'. Other fruits that have presented increased sugar levels after salinity treatment include: melons, grapes, and oranges (Botia et al., 2005; Grieve et al., 2007; Li et al., 2013).

In regard to pungency, increased salinity levels did not have a significant effect on capsaicinoid accumulation in pericarp (capsaicin and dihydrocapsaicin). Although pungency is related to environmental conditions and increases in response to stressful conditions (Harvell and Bosland, 1997), for habanero 'Orange', high salinity conditions ($7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) marginally increased pericarp capsaicin content (not statistically significant at $P \leq 0.05$). Similar trends in capsaicin concentration were found in 'Jalapeño' peppers under salt treatments (Arrowsmith et al., 2012).

High salinity conditions ($7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) reduced light-saturated photosynthetic rates but did not compromise fruit production or

quality (determined by fruit number and weight and content of key metabolites, i.e., capsaicinoids, phenolics, ascorbic acid, and carotenoid levels). The addition of calcium under high salinity conditions could be used to mitigate salinity effects on *Capsicum* plants.

Low nitrogen. Although low N ($5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$) treatments caused a significant reduction in the light-saturated photosynthetic rate, and plant leaves were chlorotic (a characteristic symptom of low N), this treatment did not cause a reduction in yield when compared with controls ($15 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$). Low N conditions significantly reduced the shoot:root ratio in habanero plants (67% of the control) but did not significantly affect dry shoot, dry root, or yield parameters (Table 3). Our results contrast with those reported by Medina-Lara et al. (2008), who grew plants of the same habanero cultivar in iron-rich (luvisol) soils; when exposed to comparable N levels (0, 1, 7.5 mM urea), the plants showed severe inhibition of fruit production. In their study, the effect of low N could have been aggravated by its retention by the metal ions in the iron-rich soils (Baker, 1987) or possible sequestration by the organic fraction of their soil (Soon, 1998). Furthermore, their use of a non-readily available N source (urea) in comparison with our use of KNO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ in the Hoagland solution could have generated even lower accessible amounts of N.

Low N treatments caused a significant increase in soluble sugar contents, particularly fructose ($P \leq 0.05$) (Fig. 3A). These results may be related to the tendency of plants to accumulate carbohydrates when exposed to low N conditions (Davies and Winsor, 1967). In tomato plants grown in the field, the sugar:solid ratio and glucose and fructose concentrations decreased slightly with the increase of N fertilization (Parisi et al., 2006). In a comparable study, also using greenhouse-grown tomato plants, a decrease in nitrate fertilization (from 12 to 4 mM) caused a reduction in vegetative growth but did not affect commercial yield and increased the soluble sugar levels in the fruit (Benard et al., 2009).

Capsaicinoid levels were not significantly affected by N availability (Fig. 2). A previous study on the same habanero cultivar supports this observation (Medina-Lara et al., 2008). Low N treatments slightly increased ascorbic acid content (Fig. 4B), similar to the values observed in tomato fruit (Benard et al., 2009), but our results were not statistically significant ($P \leq 0.05$). These results agree with a recent study that reported that bioactive compounds with antioxidant activity and the total polyphenols of habanero were not significantly affected by changes in N fertilization (32, 80, 160, 320 kg N/ha) (Núñez-Ramírez et al., 2011).

Reduction of N levels in the Hoagland solution (to $5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ of N) using nitrate-based fertilizers caused relatively minor effects on overall plant productivity (yield, pungency, and other fruit metabolites). Comparable rates of N fertilization using urea as

the main N source in the same cultivar caused severe damage to the plants. Therefore, it is recommended that supplemental N fertilization for habanero plants should use nitrate-based fertilizers, because they are more efficient for supplemental N fertilization for habanero pepper production.

Low phosphorus. From all the evaluated treatments, low P conditions caused the least amount of reduction in photosynthetic parameters. Low P had no significant effect on the light-saturated photosynthetic rate, photosynthetic efficiency, and light compensation point (Fig. 1; Table 2). The observed effect of the low P treatment diverged with that observed by Davies et al. (1999), who found that low P treatments significantly affected the photosynthetic response.

Nevertheless, at the whole-plant level, low P levels caused the poorest aerial development and reduced fruit yield (Table 3). In this study, dry-root biomass was reduced to 62% of the control, whereas dry-shoot biomass was significantly reduced to 37% of the control. The effect of low P on aerial development could be attributable in part to the reduction in photosynthesis (Davies et al., 1999), as is evidenced in this work (Fig. 1), but mainly because plants in P-deficient conditions typically tend to increase root mass (reduced shoot:root ratio) as an adaptive strategy to access P (given its relative soil immobility). Although similar responses have been documented for 'Long Slim Cayenne' peppers, this study constitutes the first evidence of this type of response for habanero pepper.

Low P conditions also caused a very significant reduction in the number of fruits and the fruit biomass. However, once the fruits were set, they had the same weight and water content as the controls (Table 3). Soluble sugar contents (particularly fructose) were reduced by low P conditions, most likely caused by a reduction of available photo assimilates (Fig. 3A). Other metabolites (carotenoids, ascorbic acid, and phenolics) were not significantly affected. Although not statistically significant, ascorbic acid content was higher than the controls (Fig. 4). Low P seems to affect capsaicin accumulation; also, although not significant, the low-P-treated plants produced the least capsaicin across all treatments (Fig. 2), which may have an impact on pungency.

Previous work with 'Long Slim Cayenne' pepper plants treated with higher levels of P showed consistent effects to those obtained in this work (increased plant height, leaf area, shoot, and root dry matter, number of fruit per plant, and yield compared with control plants) (Emongor and Mabe, 2012). The remarkable response to the P conditions shows that P is a critical nutrient for habanero pepper plants and proper fertilization has a significant impact on plant growth and yield.

Conclusion

This work describes the responses of habanero pepper to a number of common abiotic

conditions in the soil. Low P conditions were more devastating to habanero pepper plant development and yield than either low N or moderate salinity. Reduced N and increased salinity had a relatively minor effect on overall plant productivity. The effects of salinity conditions on habanero pepper production were moderated with the inclusion of calcium chloride to reduce the effect of salinity-induced calcium deficiency. Results from this work can aid in the formulation of guidelines for fertilization and the management of salinity conditions in horticultural production areas.

Literature Cited

- Aktas, H., K. Abak, and I. Cakmak. 2006. Genotypic variation in the response of pepper to salinity. *Sci. Hort.* 110:260–266.
- Aldana, M.E. 2005. Effect of phosphorus and potassium fertility on fruit quality and growth of tabasco pepper (*Capsicum frutescens*) in hydroponic culture. MS thesis, Louisiana State University, LA.
- Andrews, J. 1995. Peppers, the domesticated capsicums. University of Texas Press, Austin, TX.
- Antonios, G.F., T.S. Kochhar, R.L. Jarret, and J.C. Snyder. 2006. Antioxidants in hot pepper: Variation among accessions. *J. Environ. Sci. Health B* 41:1237–1243.
- Arrowsmith, S., T.P. Egan, J.F. Meekins, D. Powers, and M. Metcalfe. 2012. Effects of salt stress on capsaicin content, growth, and fluorescence in a Jalapeño cultivar of *Capsicum annuum* (Solanaceae). *BIOS* 83:1–7.
- Ayers, R. and D.W. Westcot. 1985. Water quality for agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper. 20 June 2013. <<http://www.fao.org/docrep/003/t0234e/t0234e00.htm>>.
- Azuma, R., N. Ito, N. Nakayama, R. Sawa, N.T. Nguyen, J.A. Larrinaga-Mayoral, M. Esaka, H. Fujiyama, and H. Saneoka. 2010. Fruits are more sensitive to salinity than leaves and stems in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Sci. Hort.* 125:171–178.
- Baker, J. 1987. Distribution of N in a simulated profile of a podsollic gray luvisol following urea fertilization. *Can. J. Soil Sci.* 67:271–280.
- Bassman, J.H. and J.C. Zwieter. 1991. Gas exchange characteristics of *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and *Populus trichocarpa* × *P. deltoides* clones. *Tree Physiol.* 8:145–159.
- Basu, S.K. and A.K. De. 2003. Capsicum: Historical and botanical perspective, p. 1–15. In: De, A.K. (ed.). *Capsicum: The genus Capsicum*. Taylor & Francis, London, UK.
- Benard, C., H. Gauthier, F. Bourgaud, D. Grasselly, B. Navez, C. Caris-Veyrat, M. Weiss, and M. Génard. 2009. Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* 57:4112–4123.
- Björkman, O. 1981. Responses to different quantum flux densities, p. 57–107. In: Lange, O.L., P.S. Nobel, C.B. Osmond, and H. Ziegler (eds.). *Physiological plant ecology*. Springer, Berlin, Germany.
- Botía, P., J.M. Navarro, A. Cerdá, and V. Martínez. 2005. Yield and fruit quality of two melon cultivars irrigated with saline water at different stages of development. *Eur. J. Agron.* 23:243–253.
- Caballero, F.J., V. Martínez, and M. Carvajal. 2004. Does calcium determine water uptake

- under saline conditions in pepper plants, or is it water flux which determines calcium uptake? *Plant Sci.* 166:443–450.
- Canto-Flick, A., J. G. Iglesias-Andreu, E. Balam-Uc, J.J. Bello-Bello, C. Lecona-Guzmán, D. Solís-Marroquín, S. Avilés-Viñas, E. Gómez-Uc, G. López-Puc, and N. Santana-Buzzy. 2008. Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest known cultivars. *HortScience* 43:1344–1349.
- Davies, F.T., S.A. Duray, L. Phavaphutanon, and R.S. Stahl. 1999. Influence of phosphorus on gas exchange and plant growth of two morphologically distinct types of *Capsicum annuum*. *Photosynthetica* 36:99–106.
- Davies, J.N. and G.W. Winsor. 1967. Effect of nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium and liming on the composition of tomato fruit. *J. Sci. Food Agr.* 18:459–466.
- DeWitt, D. and P.W. Bosland. 1996. *Peppers of the world: An identification guide*. Ten Speed Press, Berkeley, CA.
- Dixon, R.A. and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097.
- Emongor, V.E. and O. Mabe. 2012. Effects of phosphorus on growth, yield and yield components of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Proc. XXVIII IHC-IS on Quality-Chain Mgt. of Fresh Veg.: From Fork to Farm* 936:327–333.
- Eshbaugh, W.H. 1993. *Peppers: History and exploitation of a serendipitous new crop discovery*, p. 132–139. In: Janick, J. and J.E. Simon (eds.). *New crops*. Wiley, New York, NY.
- Folin, O. and V. Ciocalteu. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73:627–650.
- Fu, Q.S., B. Zhao, Y.J. Wang, S. Ren, and Y.D. Guo. 2010. Stomatal development and associated photosynthetic performance of capsicum in response to differential light availabilities. *Photosynthetica* 48:189–198.
- Gökmen, V., N. Kahraman, N. Demir, and J. Acar. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *J. Chromatography* 881:309–316.
- Grieve, A.M., L.D. Prior, and K.B. Bevington. 2007. Long-term effects of saline irrigation water on growth, yield, and fruit quality of 'Valencia' orange trees. *Aust. J. Agr. Res.* 58:342–348.
- Halvin, J.L., J.D. Beaton, S.L. Tisdale, and W.L. Nelson. 2005. *Soil fertility and fertilizers*. 7th Ed. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.
- Harvell, K.P. and P.W. Bosland. 1997. The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience* 32:1292.
- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1950. *The water-culture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment Station, Circular 347:1–32.
- Johnson, C.D. and D.R. Decoteau. 1996. Nitrogen and potassium fertility affects jalapeño pepper plant growth, pod yield, and pungency. *HortScience* 31:1119–1123.
- Laborde, C. and C. Pozo. 1984. *Presente y Pasado del Chile en México*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México.
- Li, X.L., C.R. Wang, X.Y. Li, Y.X. Yao, and Y.J. Hao. 2013. Modifications of Kyoho grape berry quality under long-term NaCl treatment. *Food Chem.* 139:931–937.
- Loaiza-Figueroa, F., K. Ritland, J.A. Laborde-Cancino, and S.D. Tanksley. 1989. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Syst. Evol.* 165:159–188.
- Luning, P.A., R. van der Vuurst de Vries, D. Yuksel, T. Ebbenhorst-Seller, H.J. Wichers, and J.P. Roozen. 1994. Combined instrumental and sensory evaluation of flavor of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) harvested at three maturation stages. *J. Agr. Food Chem.* 42:2855–2861.
- Lyousskoufis, I.H., D. Savvas, and G. Mavrogianopoulos. 2005. Growth, gas exchange, and nutrient status in pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in recirculating nutrient solution as affected by salinity imposed to half of the root system. *Sci. Hort.* 106:147–161.
- Mansour, M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43:491–500.
- Marinova, D., F. Ribarova, and M. Atanasova. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J. of the Univ. of Chem. Technol. and Metallurgy* 40:255–260.
- Medina-Lara, F., I. Echevarría-Machado, R. Pacheco-Arjona, N. Ruiz-Lau, A. Guzmán-Antonio, and M. Martínez-Estévez. 2008. Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience* 43:1549–1554.
- Navarro, J.M., P. Flores, C. Garrido, and V. Martínez. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96:66–73.
- Navarro, J.M., C. Garrido, M. Carvajal, and V. Martínez. 2002. Yield and fruit quality of pepper plants under sulphate and chloride salinity. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 77:52–57.
- Niu, G., D.S. Rodríguez, E. Call, P.W. Bosland, A. Ulery, and E. Acosta. 2010a. Responses of eight Chile peppers to saline water irrigation. *Sci. Hort.* 126:215–222.
- Niu, G., D.S. Rodríguez, K. Crosby, D. Leskovar, and J. Jifon. 2010b. Rapid screening for relative salt tolerance among Chile pepper genotypes. *HortScience* 45:1192–1195.
- Núñez-Ramírez, F., D. González-Mendoza, O. Grimaldo-Juárez, and L. Cervantes Díaz. 2011. Nitrogen fertilization effect on antioxidants compounds in fruits of habanero chili pepper (*Capsicum chinense*). *Intl. J. of Agr. and Biol.* 13:827–830.
- Parisi, M., I. Giordano, A. Pentangelo, and G. Villari. 2006. Effects of different levels of nitrogen fertilization on yield and fruit quality in processing tomato. *Proc. IS. Towards Ecol. Sound Fert. Strategies for Field Veg. Prod.* 700:129–132.
- Petreikov, M., L. Yeselson, S. Shen, I. Levin, A.A. Schaffer, A. Efrati, and M. Bar. 2009. Carbohydrate balance and accumulation during development of near-isogenic tomato lines differing in the *AGPase-L1* allele. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:134–140.
- Poorter, H., F. Fiorani, M. Stitt, U. Schurr, A. Finck, Y. Gibon, B. Usadel, R. Munn, O.K. Atkin, F. Tardieu, and T.L. Pons. 2012. The art of growing plants for experimental purposes: A practical guide for the plant biologist. *Funct. Plant Biol.* 39:821–838.
- Roy, S.S., M.S.I. Khan, and K.K. Pall. 2011. Nitrogen and phosphorus efficiency on the fruit size and yield of *Capsicum*. *J. of Expt. Sci.* 2:32–37.
- Saito, T., C. Matsukura, Y. Ban, K. Shoji, M. Sugiyama, N. Fukuda, and S. Nishimura. 2008. Salinity stress affects assimilate metabolism at the gene-expression level during fruit development and improves fruit quality in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 77:61–68.
- Santana-Buzzy, N. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), p. 269–279. In: del Castillo, L., M.L. Robert, A. Larqué, and I. Higuera (eds.). *CICY treinta años de labor científica y educativa*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida.
- SEMARNAT. 2012. La degradación de los suelos en México, p. 122–142. In: SEMARNAT (ed.). *Informe de la situación del medio ambiente en México*. Compendio de estadísticas ambientales. Indicadores clave y de desempeño ambiental. SEMARNAT, México.
- Silva, C., V. Martínez, and M. Carvajal. 2008. Osmotic versus toxic effects of NaCl on pepper plants. *Biol. Plant.* 52:72–79.
- Soon, Y.K. 1998. Nitrogen cycling involving non-exchangeable ammonium in a gray luvisol. *Biol. Fertil. Soils* 27:425–429.
- Sudhir, P. and S.D.S. Murthy. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42:481–486.
- Umali-deinger, D. 1993. *Irrigation-induced salinity: A growing problem for development and the environment*. The World Bank, Washington, DC.
- Wahyuni, Y., A.R. Ballester, E. Sudarmonowati, R.J. Bino, and A.G. Bovy. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72:1358–1370.
- Wang, Y. and M. Frei. 2011. Stressed food—The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agr. Ecosyst. Environ.* 141:271–286.

Capítulo 5. Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan los resultados de la metabolómica no dirigida durante maduración en pericarpio de frutos de chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.) y se analizan sus cambios por efecto de la exposición prolongada a condiciones edáficas sub-óptimas. Los resultados se discuten relacionándolos con parámetros fisiológicos evaluados en planta y parámetros de calidad en frutos maduros. Finalmente se presenta la identificación tentativa de metabolitos acumulados diferencialmente en el tratamiento de limitaciones de fósforo que fue el que más afectó los parámetros fisiológicos en planta y calidad de fruto.

Como se presentó en el 0, a pesar de las reducciones significativas observadas en tasa fotosintética neta por los tratamientos de bajo N y salinidad de $7 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ (47 % y 64 % del testigo, respectivamente), su biomasa, rendimiento y metabolitos relacionados con calidad de fruto (capsaicinoides, azúcares, fenólicos totales, ácido ascórbico y carotenos) no disminuyeron, por el contrario aumentaron los contenidos de azúcares (27 % de fructosa y 21 % de glucosa, respectivamente), por lo que en general, las plantas de chile habanero no fueron sensibles a los niveles de bajo N y salinidad, posiblemente debido al uso de nitrato, un fertilizante fácilmente disponible para las plantas; y a que en los tratamientos de salinidad se añadió calcio para evitar su déficit inducido por salinidad, el cual enmascara los efectos específicos por el aumento de NaCl.

Por otro lado, el tratamiento de bajo P fue el que más afectó el desarrollo y rendimiento de las plantas, presentando una reducción significativa en la tasa parte-aérea/radicular, respuesta descrita en otras en plantas pero observada por primera vez en chile habanero. También afectó la calidad organoléptica y nutritiva del fruto al reducir significativamente el contenido de fructosa (73 % del testigo), y también el de

capsaicinoides (no significativo). En este capítulo se presentan los resultados de los cambios de metabolitos semi-polares que se acumulan en el pericarpio del fruto durante maduración por efecto de los tratamientos de condiciones edáficas subóptimas.

5.1. Calibración HPLC-TOF

Para asegurar una detección apropiada de compuestos primero se midió el error del HPLC-TOF durante el proceso de calibración, mediante el uso de una solución de calibración con 10 masas en el rango de 100 a 3,000 Da (Tabla 5-1). El resultado obtenido indica una buena exactitud del equipo, y bajo estas condiciones instrumentales se corrieron las muestras.

Tabla 5-1 *Parámetros de calibración del LC/MSD TOF, antes de correr las muestras.*

Masa esperada	exactitud (ppm)
112.985587	-2.2
301.998139	-0.1
601.978977	-0.1
1033.988109	0.5
1333.968947	0.7
1633.949786	-0.3
1933.930624	0.3
2233.911463	0.9
2533.892301	-0.1
2833.873139	0.3

5.2. Separación cromatográfica

La separación cromatográfica presentó en general para los tres estados de maduración un gran número de picos, eluyendo la fracción polar en los primeros 5 minutos de corrida, en la que el 5% de la fase es acetonitrilo, seguido de un segmento de pocos

picos y un aumento gradual a los 20 minutos a medida que cambia el gradiente de las fases móviles aumentando el contenido de acetonitrilo, haciéndose mayor el número de picos que eluyen cerca al final de la corrida a los 60 minutos.(Figura 5-1).

5.3. Procesamiento de datos

Después de la extracción de datos a formato *.netCDF se inició su procesamiento. El primer paso consiste en la optimización de diferentes parámetros, entre ellos corrección de línea base, detección de picos por GridMass, y agrupamiento de isótopos, buscando la combinación de condiciones que generaran el mayor número de picos detectados. Para ello se analizaron los datos de una corrida del HPLC-TOF para pericarpio de chile habanero maduro y rompiente en diferentes tratamientos, empezando con todos los parámetros y niveles de corrección de línea base contra los menos restrictivos de GridMass, de lo cual se observó que la condición que mayor número de picos detectó al usar corrección de línea base es mayor un uno por ciento que cuando no se utiliza, y dado que la corrección de línea base es un paso que demanda mucha capacidad de procesamiento, almacenamiento y tiempo, se omitió del procesamiento posterior de datos.

De los parámetros de GridMass el de altura mínima (*minimum height*), fue el de menor efecto entre las diferentes combinaciones, por lo que se decidió usar el mayor nivel evaluado por consideraciones de capacidad de procesamiento, almacenamiento y tiempo de cómputo; los otros niveles seleccionados como óptimos para los demás parámetros evaluados en el módulo GridMass fueron el de menor tolerancia de m/z y el nivel medio de suavizado de tiempo (min). De los parámetros de agrupamiento de isótopos el que mayor número de picos detectó fue el de menor tolerancia de m/z y mayor tolerancia en tiempo de retención (Ver Tabla 3-5).

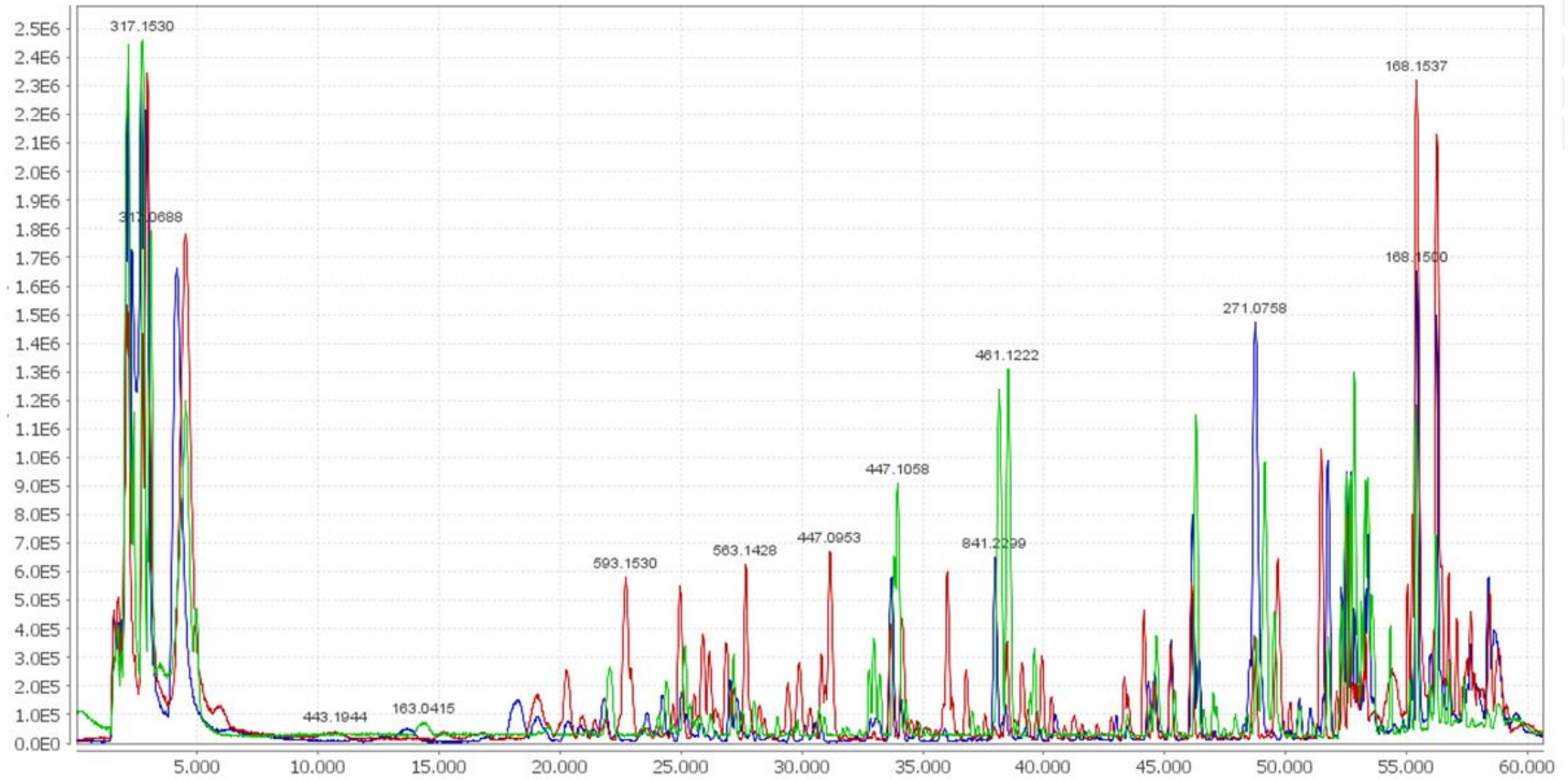


Figura 5-1 Cromatograma total de iones de pericarpio de chile habanero en planta testigo; eje X tiempo de retención, eje Y intensidad de picos. En color verde: frutos en estado de maduración verde; azul: rompiente; rojo: maduro.

Con los parámetros optimizados se procesaron todos los datos del estudio usando el programa MZmine y el módulo de detección de picos GridMass. Dado el gran número de muestras (*Tabla 3-3*) y el largo tiempo de corrida (separación cromatográfica en HPLC), las muestras se extrajeron e inyectaron en el HPLC-TOF-MS de acuerdo a su estado de maduración. El procesamiento de datos en MZmine también se realizó de acuerdo al estado de maduración, no fue posible procesar todos los datos de los tres diferentes estados de maduración al mismo tiempo, porque se bloqueaba la computadora por falta de memoria suficiente. Una vez procesados por el MZmine se exportan como archivo *.CSV para ser utilizado en los análisis estadísticos y multivariado en el programa R. Los resultados del MZmine deben ser inspeccionados para confirmar que no haya datos duplicados, en nuestro caso se observaron una gran cantidad de datos duplicados por lo que se corrió un filtro de datos duplicados e isótopos en el programa R, como resultado la cantidad de picos se redujo a casi la mitad (*Tabla 5-2*).

Tabla 5-2 Número de picos detectados por MZmine y filtrados por R para cada estado de maduración por separado y en maduración en frutos testigo.

	# picos (Mzmine)	# picos (filtrados en R)
Verde	8,279	4,618
Rompiente	13,241	6,305
Maduro	13,190	6,806
V-R-M en Ctrl	14,532	7,377

Los resultados filtrados se usaron para los análisis estadísticos y multivariado en el programa R. Primero se elaboraron figuras de la distribución de densidad de las corridas de todos los tratamientos en los tres diferentes estados de maduración, ésta mostró una mayor

densidad de picos de masa (valores m/z) en el rango entre 500 a 1000 m/z para los tres diferentes estados de maduración con muy pocos mayores a 1500 m/z (Figura 5-2-A), la mayoría de los picos se concentraron de los 20 a los 60 minutos siendo en los últimos 10 minutos de la separación cromatográfica donde eluyeron el mayor número de picos (Figura 5-2-B), indicando esto la acumulación de un gran número de metabolitos semi-polares en pericarpio en frutos de chile habanero.

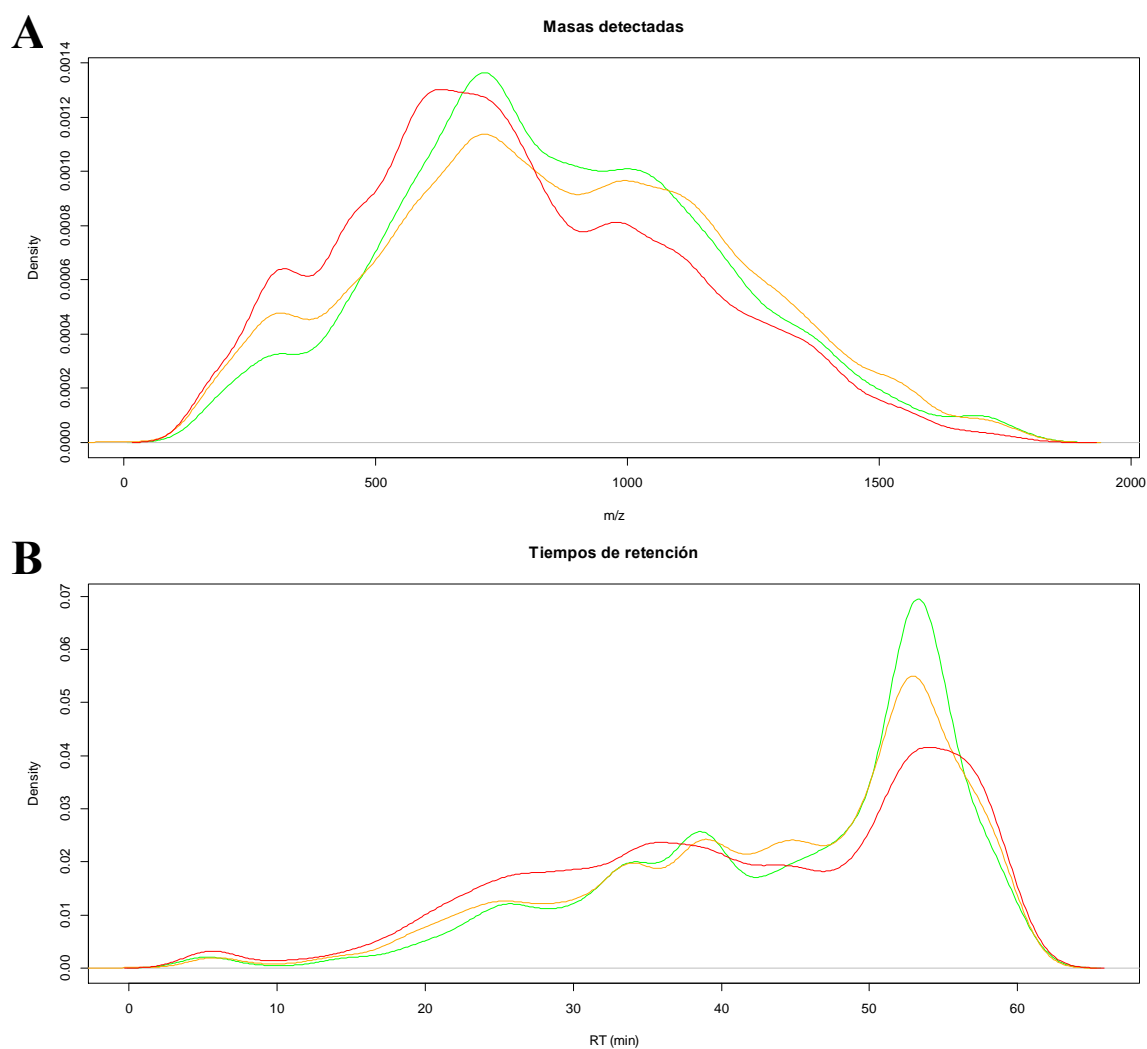


Figura 5-2 Distribución de densidad de todos los picos detectados en pericarpio de frutos de chile habanero, bajo tratamientos de déficit de macronutrientes y salinidad y en estado de maduración verde, rompiente y maduro (color verde, amarillo y rojo respectivamente) A) para m/z , B) para tiempo de retención.

5.4. Cambios en metaboloma durante maduración

5.4.1. Análisis estadístico y multivariado

El análisis multivariado PCA de los resultados de procesamiento de datos de los frutos testigo para los tres estados de maduración para reducir el número de componentes que expliquen la mayor parte de la variación de los datos. El análisis de componente principales (Figura 5.3) muestra que los principales componentes que agruparon los datos son determinados por su estado de maduración, la correlación de la varianza explicada por PC1 y PC2 fue en conjunto 84.3 %. El análisis de la distribución de las inyecciones por PCA no muestra un sesgo marcado para los frutos verde y rompiente, pero sí ligero para la tercera inyección de los frutos maduros (Figura 5-6-B).

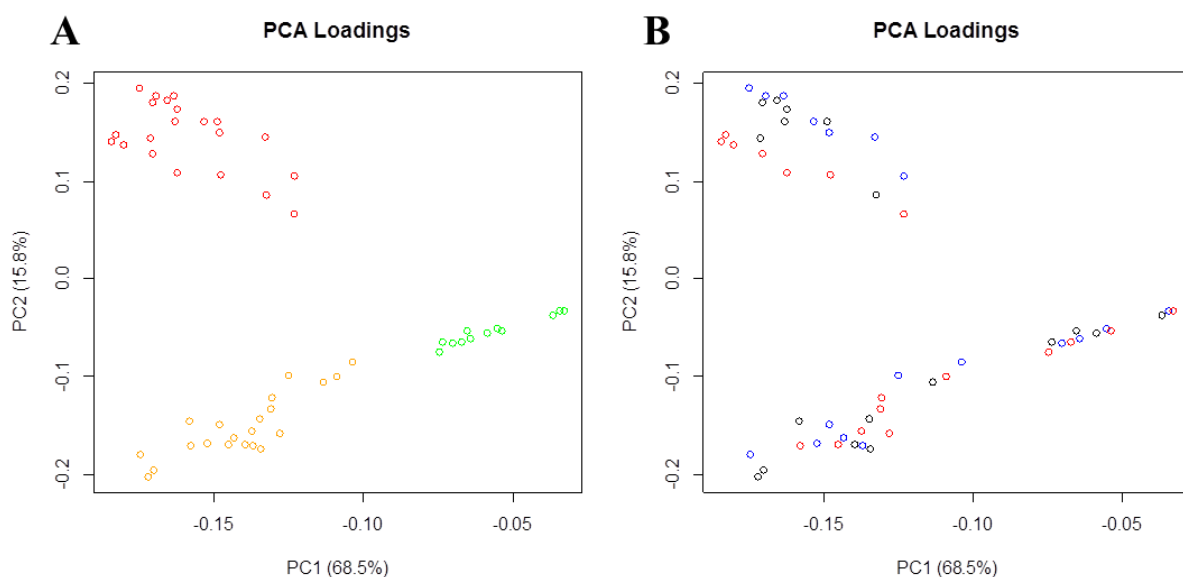


Figura 5-3 Análisis de componentes principales de picos identificados en pericarpio de frutos de chile habanero testigo en tres estados de maduración. A) colores verde, naranja y rojo corresponden a frutos en estado de maduración verde, rompiente y maduro, respectivamente. B) colores negro, azul y rojo corresponden a inyección 1, 2 y 3, respectivamente.

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas ocasionadas por los tratamientos en cada estado, los resultados del procesamiento de datos por medio del cual se detectaron los picos fueron analizados por medio de un modelo lineal de efectos mixtos (MLEM) en comparaciones por pares en R. Con este modelo se evaluó la hipótesis nula de que no hay cambios ocasionados por el estado de maduración y se obtuvo un valor- p .

Los mapas de calor se usan para comparar visualmente si los resultados significativos corresponden a una respuesta por el tratamiento. Usando una transformación a escala z de los datos, que corresponde a la diferencia de la intensidad de cada pico con la media, dividido por la desviación estándar; también se calculó un agrupamiento jerárquico, utilizando la distancia euclidiana y el algoritmo de agrupamiento de Ward en R.

El mapa de calor para maduración indica que en la mayoría de los picos significativos en cada planta sí se deben al efecto de maduración, porque presentan agrupación jerárquica definida para cada estado de maduración (Figura 5-4), y se forman diferentes grupos de picos que aumentan su acumulación en un estado y disminuyen en otro. En general, se ve una distribución de picos con diferente m/z que se sobre- y sub-acumulan por efecto de los diferentes estados de maduración.

De los 4,206 picos que cambiaron su acumulación significativamente durante maduración, aproximadamente la mitad corresponde a picos cuya acumulación era menor en estado inmaduro (verde) y luego aumentó y la otra mitad corresponde a aquellos que aumentaron su acumulación de verde a maduro. La mayor tendencia en el cambio en la acumulación de picos se observó en los que estaban en un nivel alto en frutos verdes y bajo durante la maduración, siendo en su mayoría picos correspondientes a moléculas en el rango de 500 a 900 m/z y el de 900 a 1200 m/z . Lo que indica la acumulación de moléculas menos complejas a medida que el fruto va madurando (Figura 5-5).

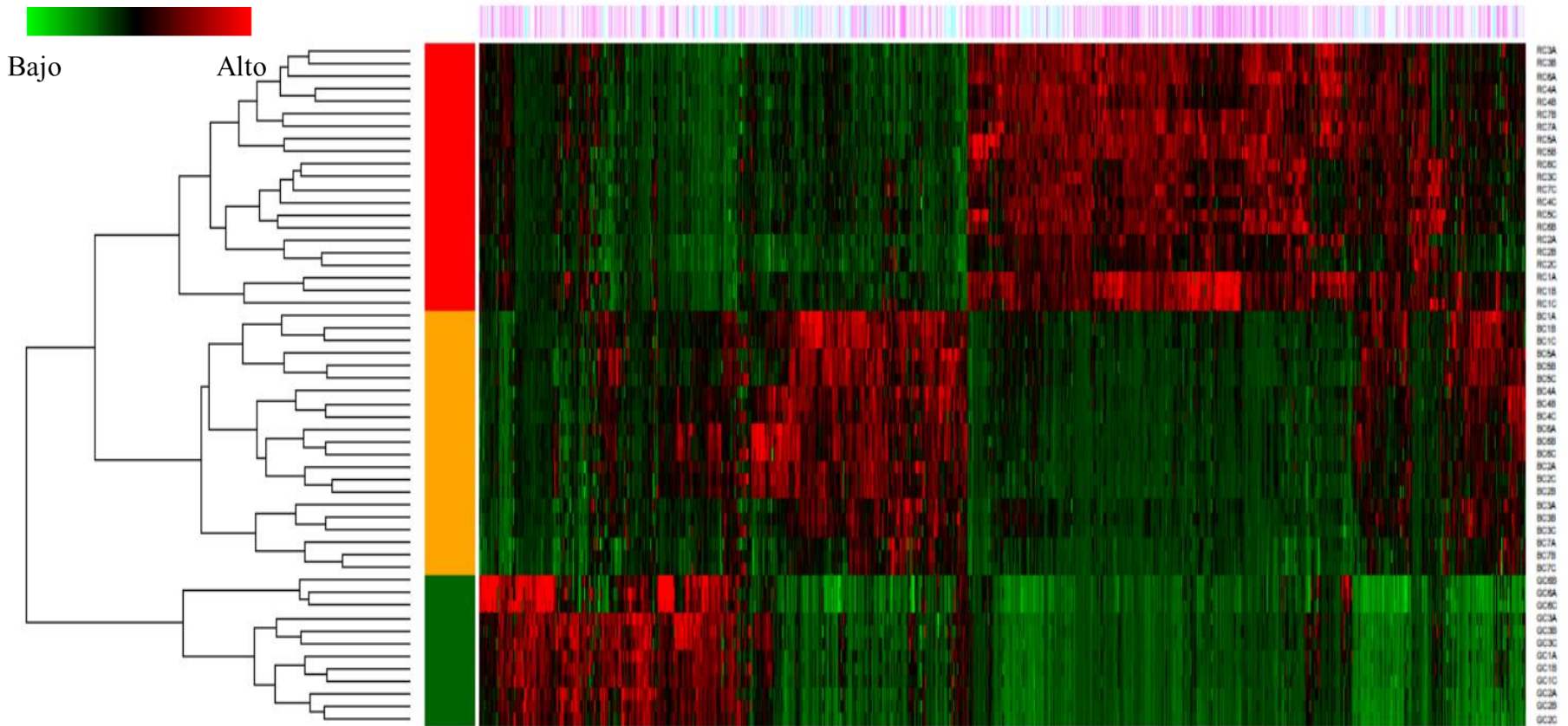


Figura 5-4 Mapa de calor de los picos significativos durante maduración, con agrupamiento jerárquico para los estados de maduración verde, rompiente y maduro (color verde, amarillo y rojo, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

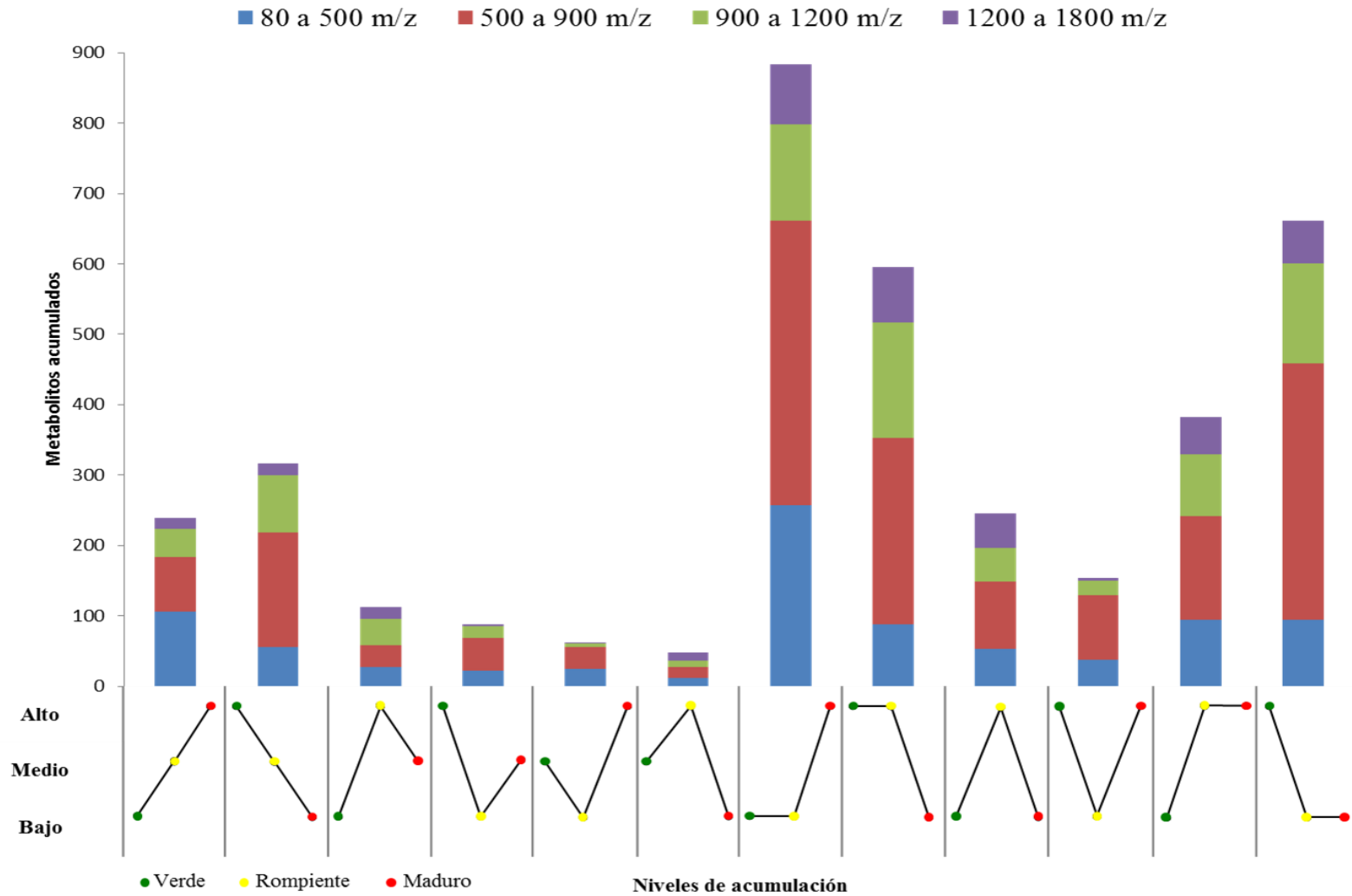


Figura 5-5 Patrón de acumulación durante maduración para frutos de tratamiento testigo, y la distribución de las m/z para cada patrón. En frutos testigo en estado de maduración verde, rompiente y maduro (puntos verdes, amarillos y rojo respectivamente).

5.5. Cambios en metaboloma por condiciones edáficas subóptimas

5.5.1. Análisis estadístico y multivariado

El análisis de componente principales (Figura 5-6 A) muestra que los principales componentes que agruparon los datos son determinados por su estado de maduración, la correlación de la varianza explicada por PC1 y PC2 fue en conjunto 74.7 %. El PCA también muestra que los picos correspondientes a la tercera inyección de los frutos maduros se separan en un grupo aparte (Figura 5-6-B), por lo que en los análisis sucesivos los datos correspondientes a la tercera inyección de los frutos maduros no fueron considerados.

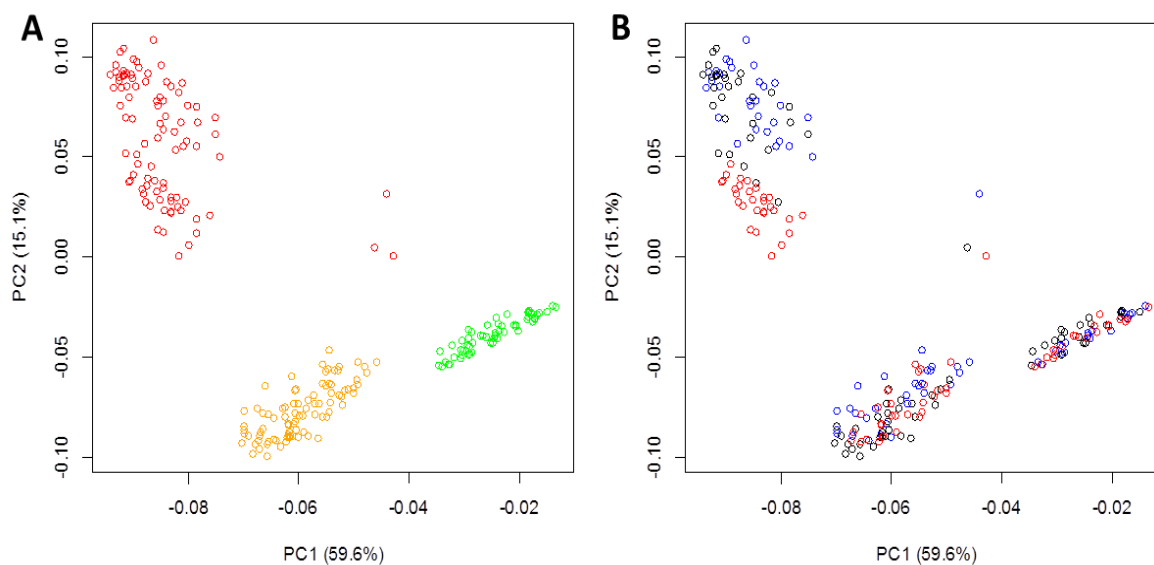


Figura 5-6 Análisis de componentes principales de picos identificados en pericarpio de frutos de chile habanero en tres estados de maduración, bajo tratamientos de déficit de macronutrientes y salinidad. A) colores verde, naranja y rojo corresponden a frutos en estado de maduración verde, rompiente y maduro, respectivamente. B) colores negro, azul y rojo corresponden a inyección 1, 2 y 3, respectivamente.

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas ocasionadas por los tratamientos en cada estado de maduración los resultados del procesamiento de datos en los que se detectaron los picos fueron analizados por medio de un modelo lineal de efectos mixtos (MLEM) en R. Para seleccionar las condiciones más restrictivas para los tres estados de maduración se evaluaron tres diferentes valores- p y tres diferentes valores- q (Tabla 4 1); con el fin de manejar un solo criterio se seleccionó como el más restrictivo el valor- $p \leq 0.001$, porque da el menor número de datos a un valor- $q \leq 0.1$, por lo que en adelante el análisis de significativos será de acuerdo con el valor- $p \leq 0.001$. Para salinidad el número de picos que cumplen el criterio de valor- $q \leq 0.1$ es muy pequeño para los frutos maduros y de cero para los frutos verdes por lo que para salinidad también se evaluaron a un valor- $p \leq 0.001$.

La distribución de densidad de los picos identificados como significativos a un valor- $p \leq 0.001$ para los diferentes tratamientos en los tres estados de maduración, muestra un gran número de picos en el rango entre 500 a 1500 m/z para rompiente y maduro, y mayor entre 500 y 900 m/z para los frutos verdes (Figura 5-7 A), concentrándose la mayoría de los picos de frutos verdes en los últimos 10 minutos de la separación cromatográfica (Figura 5-7 B). Lo anterior indica que en frutos verdes se acumulan de forma diferencial metabolitos de menor peso molecular y menor polaridad que en frutos rompientes y maduros, estos son resultados en general para todos los tratamientos, más adelante se verán de acuerdo con los tratamientos cómo se comportan los mismos parámetros.

Tabla 5-3 Número de picos significativos en pericarpio de frutos de chile habanero.

	Verde (4618)			Rompiente (6305)			Maduro (6806)		
	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$
Macronutrientes	1852	826	161	3443	1736	531	5285	3509	1976
$q \leq 0.1$	832	826	161	2048	1736	531	4884	3509	1976
$q \leq 0.05$	83	83	83	1199	1199	531	3851	3509	1976
$q \leq 0.01$	10	10	10	109	109	109	3851	2282	1976
Salinidad	766	223	31	2048	840	242	1474	528	118
$q \leq 0.1$	0	0	0	0	509	242	0	0	73
$q \leq 0.05$	0	0	0	0	240	220	0	0	6
$q \leq 0.01$	0	0	0	0	2	2	0	0	2

Nota: En paréntesis número de picos detectados

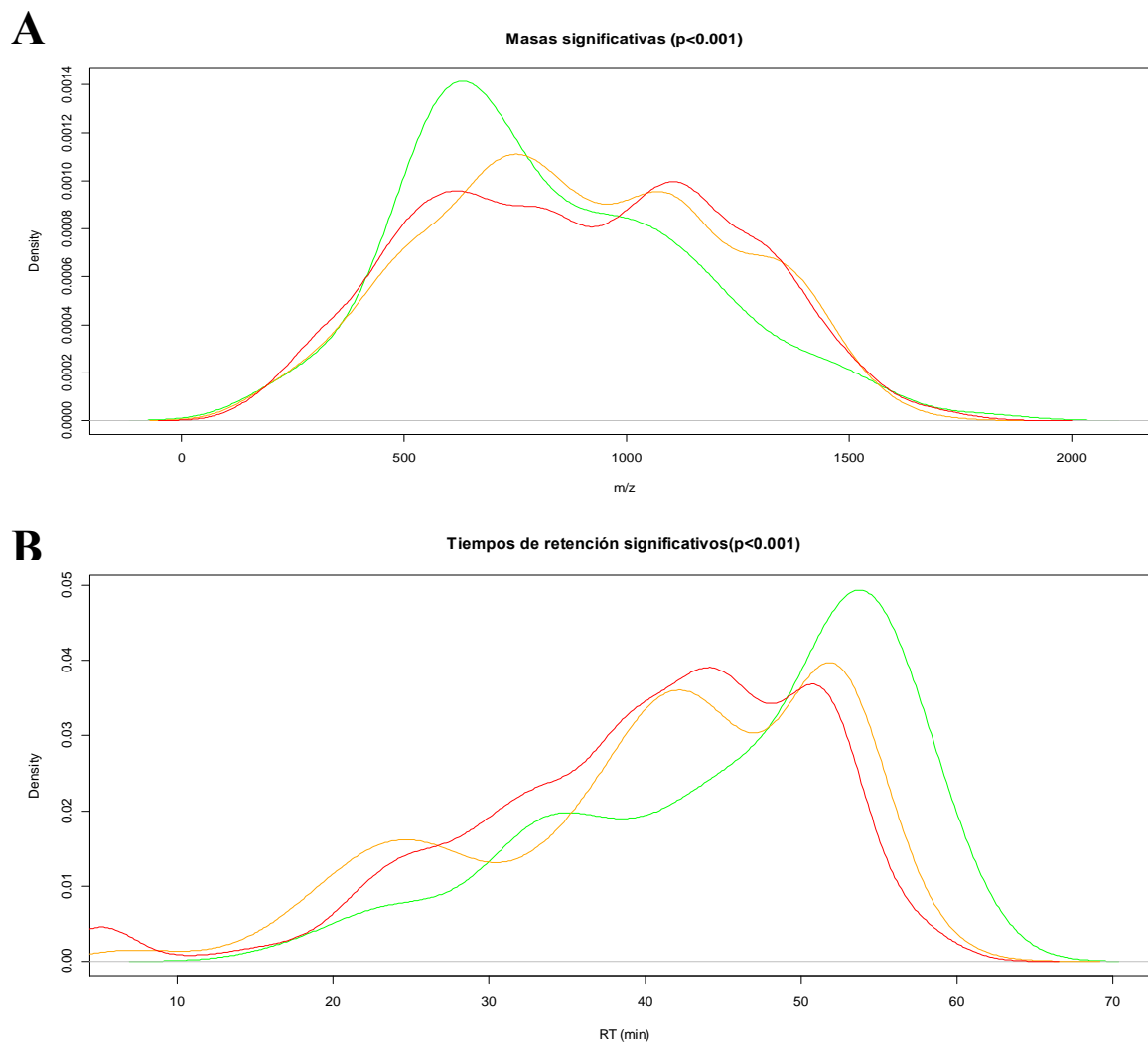


Figura 5-7 Distribución de densidad de los picos significativos a un valor- $p \leq 0.001$, detectados en pericarpio de frutos de chile habanero en estado verde, rompiente y maduro (color verde, amarillo y rojo respectivamente) para todos los tratamientos A) para m/z , B) para tiempo de retención.

Los mapas de calor de macronutrientes indican que en la mayoría de los picos identificados como significativos (valor- $p \leq 0.001$) en cada planta sí se deben al efecto del tratamiento, porque presentan agrupación jerárquica definida para cada tratamiento en cada estado de maduración (Figura 5-8 aFigura 5-13), y se forman diferentes grupos de picos que aumentan su acumulación en un tratamiento y disminuyen en testigo y viceversa. En general se ve una distribución de picos con diferente m/z que se sobre- y sub-acumulan por efecto de los diferentes tratamientos, en algunos casos sí se pueden ver grupos de masas que aumentan o disminuyen su acumulación, como por ejemplo al inicio del mapa de calor de frutos verdes (Figura 5-8 aFigura 5-10) donde un grupo de picos con m/z entre 1400 y 1800 que se sobre-acumulan en bajo P en comparación con los tratamientos testigo y bajo N, y al final un grupo de picos de m/z cercanas a 1800 que se sub-acumulan.

En los tratamientos de salinidad, se presenta una agrupación jerárquica definida principalmente para el tratamiento de $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figura 5-11 a *Figura 5-13*). Pero para el tratamiento de $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ se ven metabolitos que se sub-acumulan en la mitad de las plantas del tratamiento y en la otra mitad no por lo que podrían ser falsos positivos.

Los mayores cambios en la acumulación de metabolitos en los tratamientos de salinidad se dieron para $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ en el estado de maduración rompiente, donde el mayor cambio que se registró fue en la sub-acumulación de moléculas entre 500 a 900 m/z (Figura 5-12).

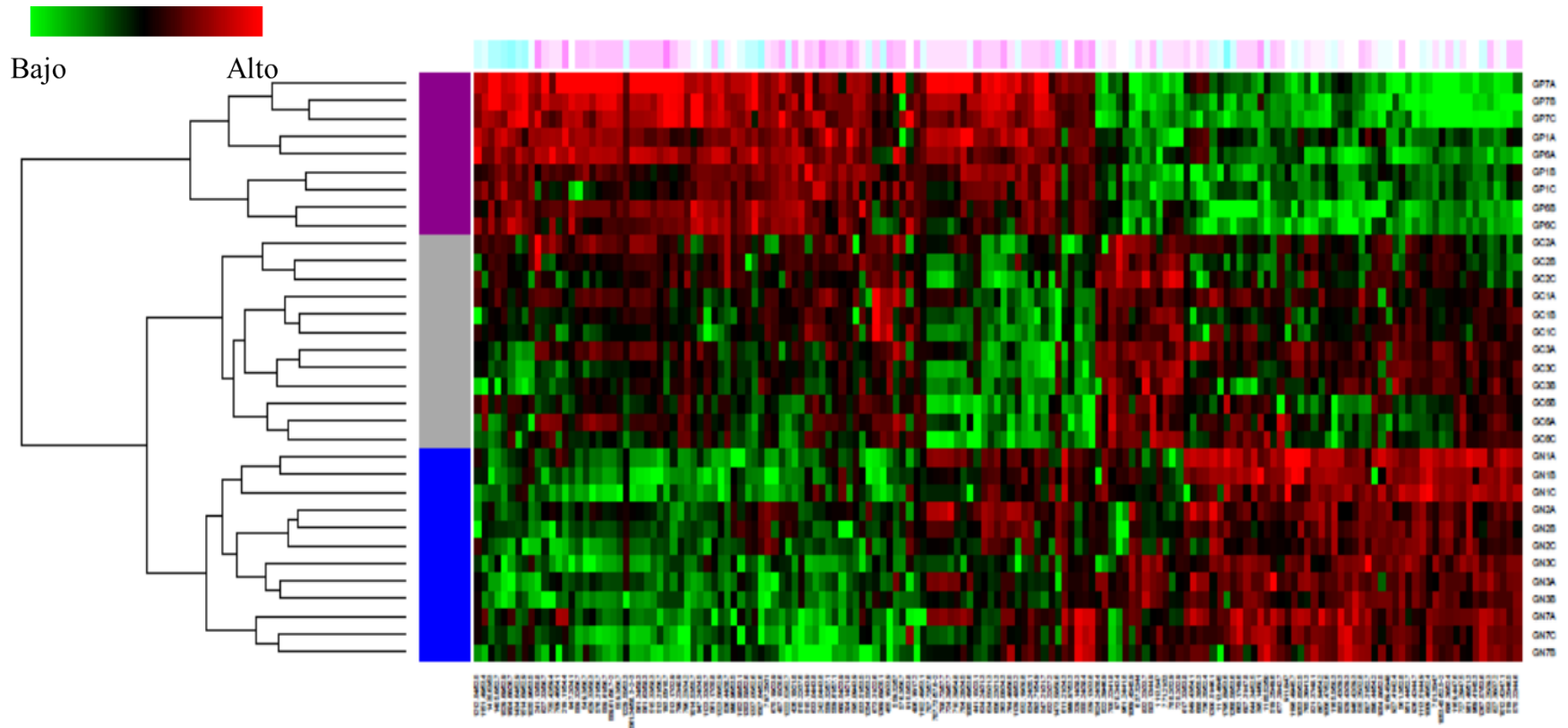


Figura 5-8 Mapa de calor de los picos significativos por déficit de macronutrientes en frutos verdes con agrupamiento jerárquico para los tratamientos de bajo P, bajo N y testigo (magenta, azul y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

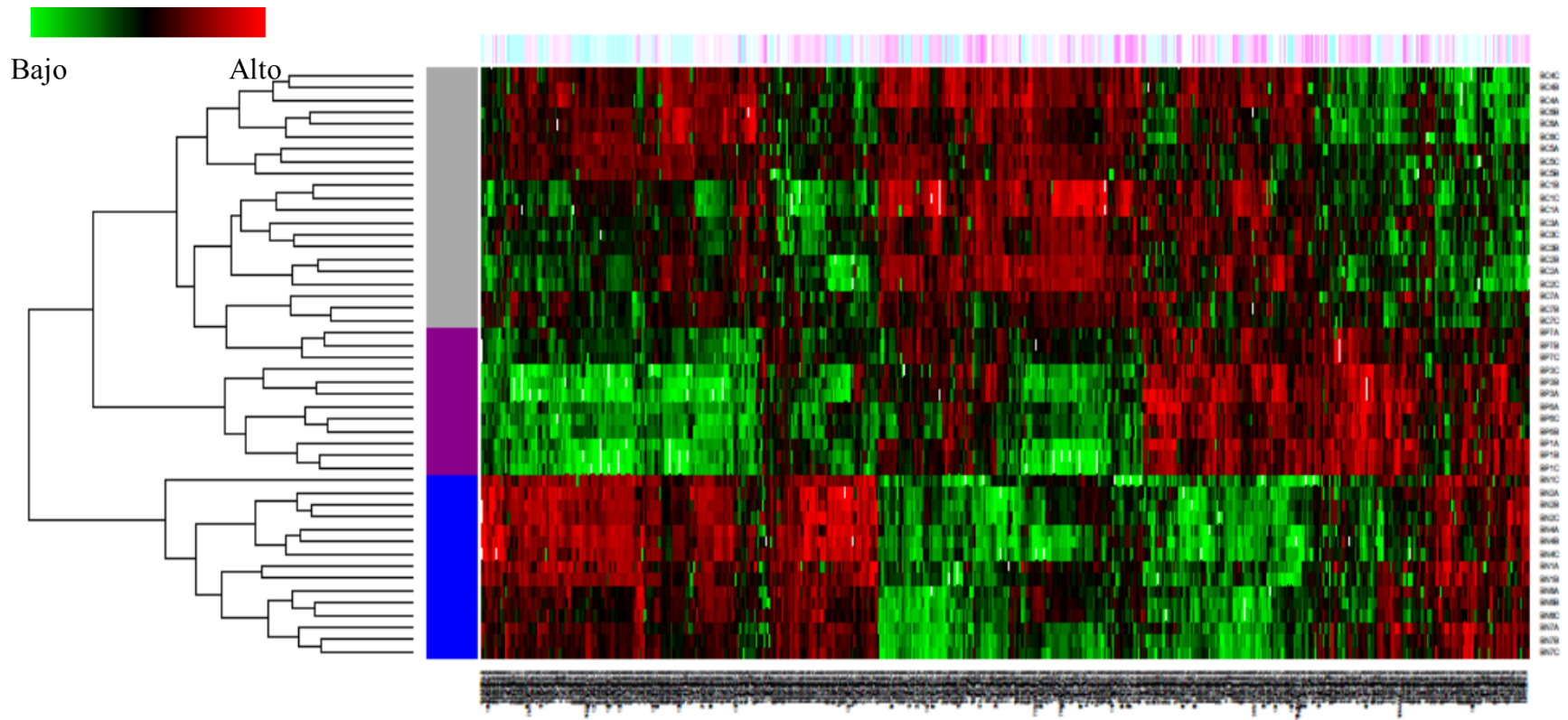


Figura 5-9 Mapa de calor de los picos significativos por déficit de macronutrientes en frutos en estado rompiente, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos de bajo P, bajo N y testigo (magenta, azul y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

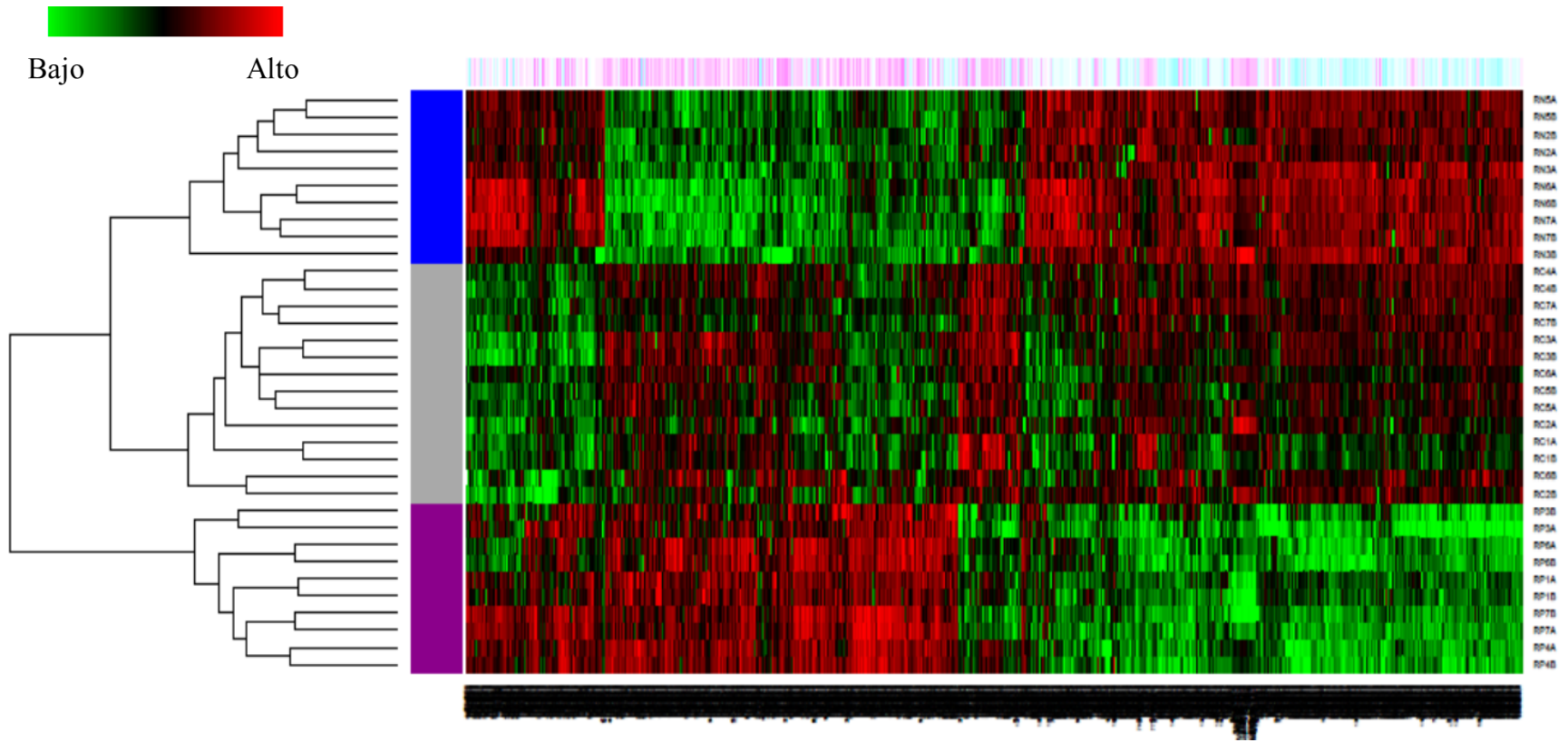


Figura 5-10 Mapa de calor de los picos significativos por déficit de macronutrientes en frutos maduros, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos de bajo P, bajo N y testigo (magenta, azul y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

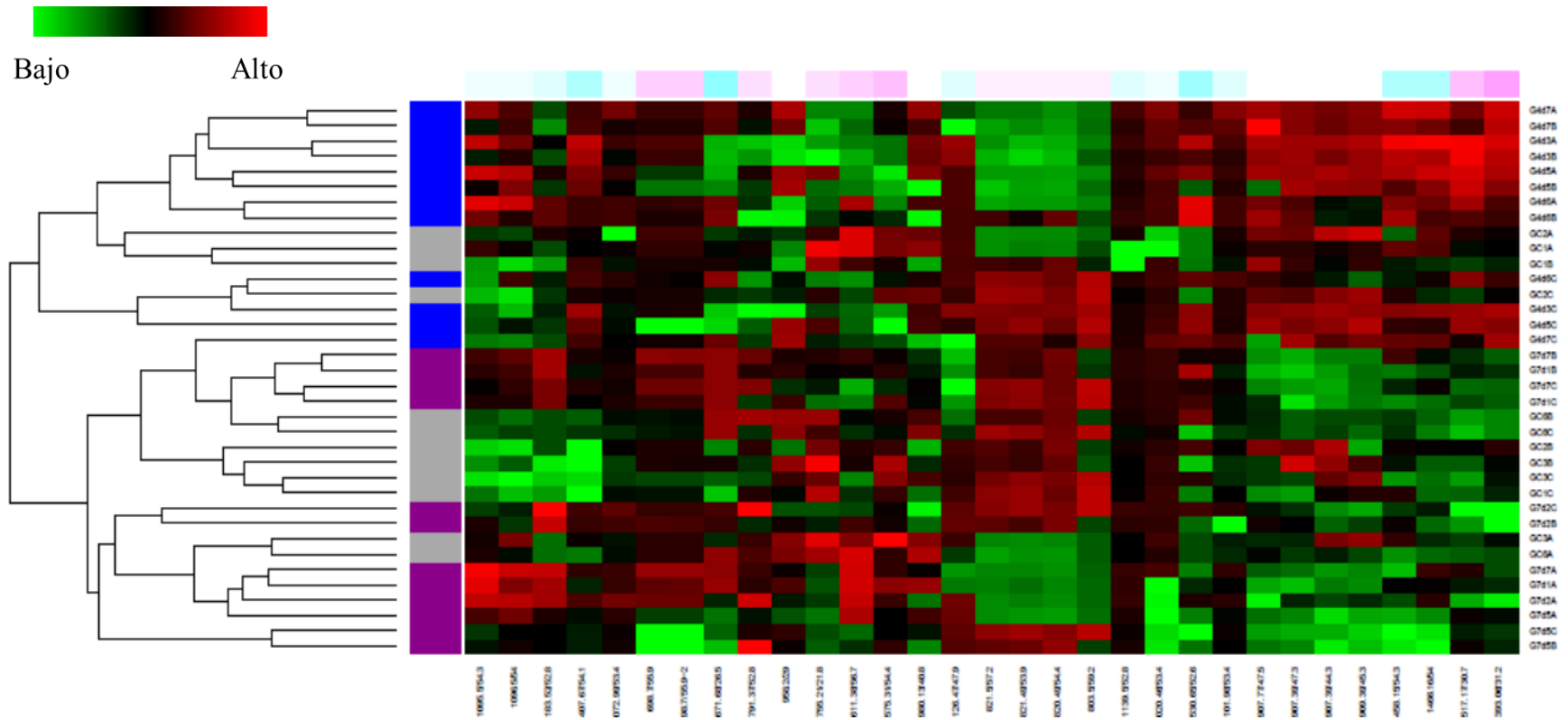


Figura 5-11 Mapa de calor de los picos significativos por salinidad en frutos verdes, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y testigo (azul, magenta y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

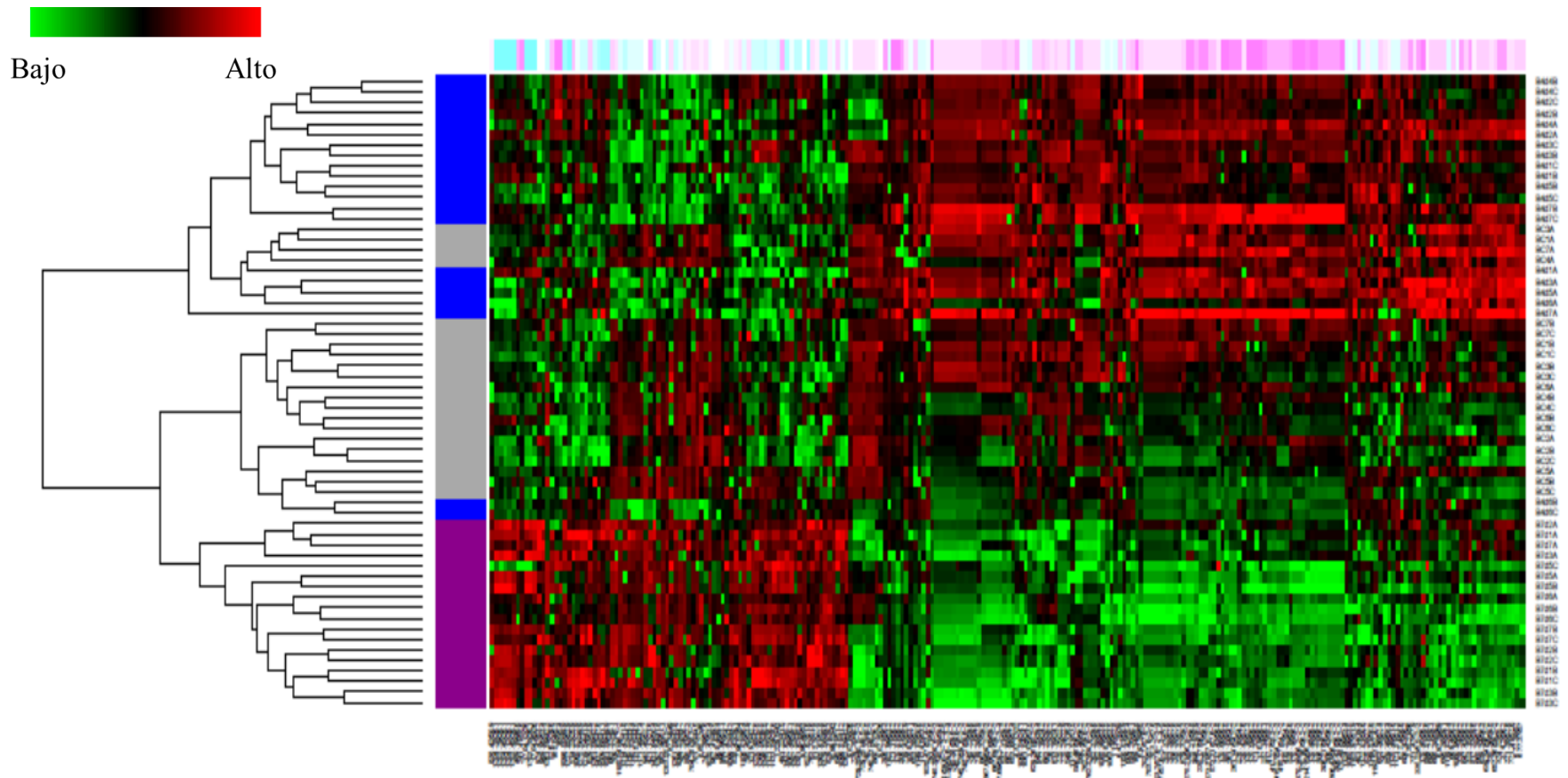


Figura 5-12 Mapa de calor de los picos significativos por salinidad en frutos en estado rompiente, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y testigo (azul, magenta y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3). La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

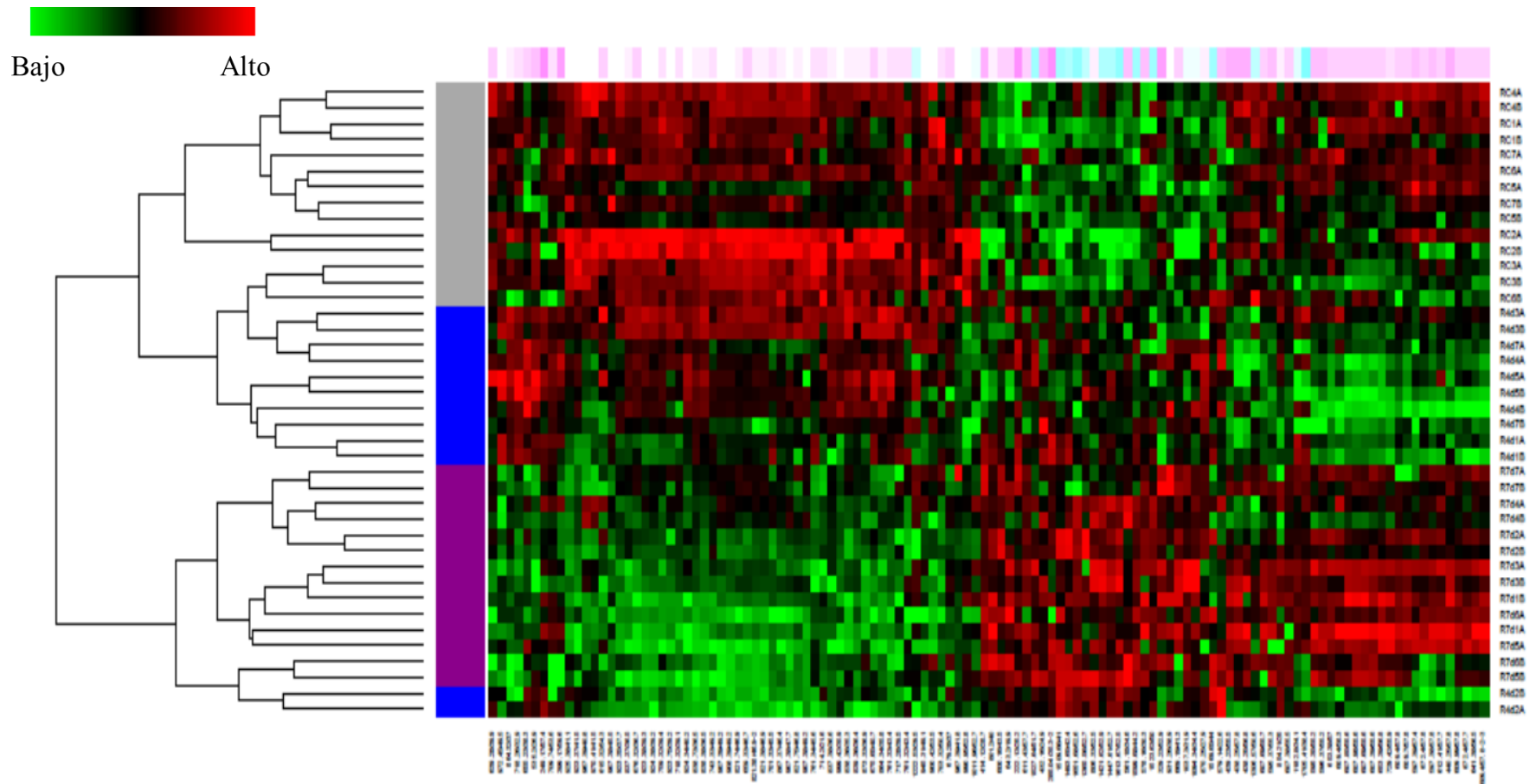


Figura 5-13 Mapa de calor de los picos significativos por salinidad en frutos maduros, con agrupamiento jerárquico para los tratamientos $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y testigo (azul, magenta y gris, respectivamente). La escala de las intensidades va de verde a rojo (-3 a 3) . La escala de m/z va de rosa-blanco-celeste (80 – 1000 – 1800 m/z).

El alto número de picos significativos (a valor- $p \leq 0.001$) hizo necesario delimitar la búsqueda a aquellos que presentaron una mayor magnitud de cambio, calculando el cociente de la intensidad promedio de un pico para un tratamiento dado contra la intensidad promedio en el testigo, se utilizó como umbral una magnitud de cambio ≥ 2 , por lo tanto los sobre-acumulados son aquellos cuya intensidad promedio es 2 veces mayor en el tratamiento que en el testigo, y los sub-acumulados corresponden a aquellos cuya intensidad es al menos dos veces menor a la correspondiente al testigo (Tabla 5-4 A-B).

El principal efecto de los tratamientos consistió en la sub-acumulación de metabolitos a los diferentes estados de maduración en tasas del 50 % al 89% del total de metabolitos que cambian por efecto del tratamiento en un estado de maduración determinado, a excepción del tratamiento de salinidad de $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ en estado maduro donde el 61.6 % corresponde a sobre-acumulación.

En total 12 metabolitos cambian su acumulación por efecto del tratamiento de salinidad de $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$; 26 por salinidad de $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$; 380 por bajo N; y 829 metabolitos cambian su patrón de acumulación por efecto del bajo P, situando al déficit de P como el principal tratamiento causante de cambios en la acumulación de metabolitos semi-polares en pericarpio de frutos de chile habanero.

El mayor número de picos significativos con magnitud de cambio ≥ 2 , se presentó en el tratamiento de bajo P. Estos resultados coinciden con los de la respuesta fisiológica, rendimiento y calidad de fruto (pungencia, sabor y antioxidantes) de chile habanero, presentados en el capítulo 4. Por lo anterior se decidió centrar la búsqueda de identificación de metabolitos diferencialmente acumulados en el tratamiento de bajo P.

Tabla 5-4 Metabolitos semi-polares significativamente acumulados en pericarpio de frutos de chile habanero

picos identificados	Fruto verde		Fruto rompiente		Fruto maduro	
	4618		6305		6806	
A) Macronutrientes	bajo P	bajo N	bajo P	bajo N	bajo P	bajo N
valor- $p \leq 0.001$	155		531		1976	
Sobre-acumulados M-C ≥ 2	18	8	24	36	163	124
Sub-acumulados M-C ≥ 2	27	10	170	118	676	256
B) Salinidad	4 dS·m ⁻¹	7 dS·m ⁻¹	4 dS·m ⁻¹	7 dS·m ⁻¹	4 dS·m ⁻¹	7 dS·m ⁻¹
valor- $p \leq 0.001$	31		242		118	
Sobre-acumulados M-C ≥ 2	2	2	2	8	5	16
Sub-acumulados M-C ≥ 2	2	6	17	34	7	10

Se elaboraron diagramas de Venn con los picos identificados en el procesamiento de datos y los significativos por MLEM para los tratamientos de macronutrientes (Figura 5-14A-B). Los diagramas de Venn representan el número de picos que se comparten entre un estado de maduración y otro. El mayor número de picos significativos se comparten entre el estado rompiente y maduro, y el menor número corresponde a los que se comparten entre los tres estadios de maduración (Figura 5-14 B). La mayoría de los picos no se comparten entre un estado de maduración y otro tanto en los identificados en el procesamiento de datos como los que tienen un cambio de acumulación estadísticamente significativo.

El rango de m/z más abundante entre los picos que se comparten para los análisis de macronutrientes fueron los de 500 a 900 m/z y para salinidad fueron 3 picos en el rango de 1200 a 1500 m/z (Figura 5-15)

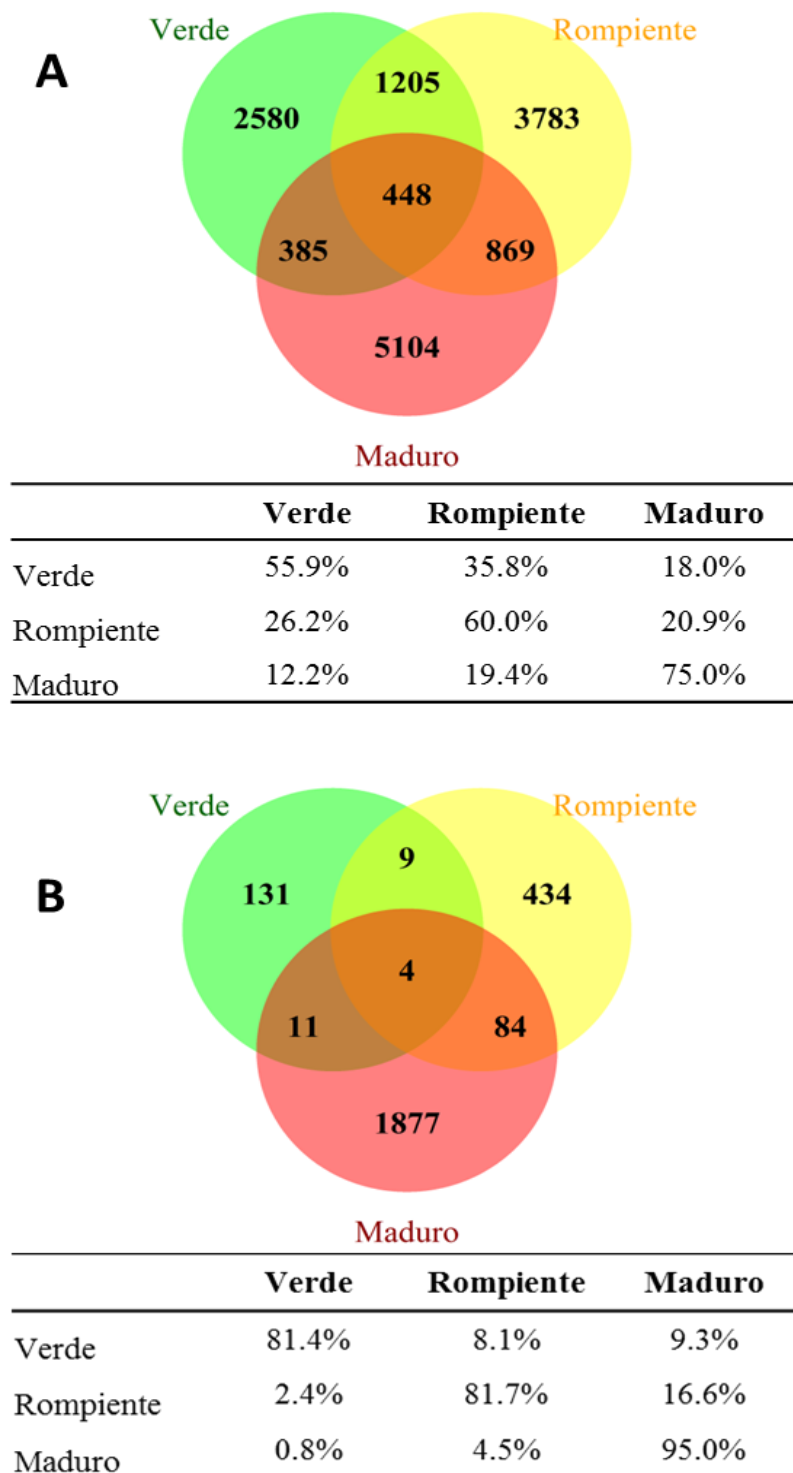
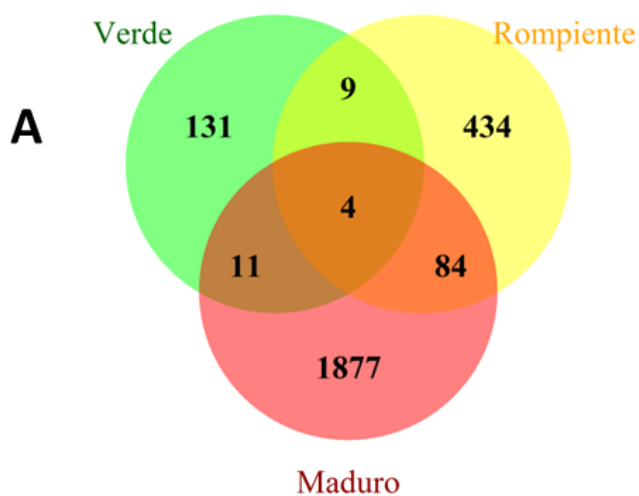


Figura 5-14 Diagrama de Venn para picos que se comparten en los tratamientos de macronutrientes en los diferentes estados de maduración de frutos de chile Habanero. A) picos totales identificados por procesamiento de datos. B) picos significativos valor- $p \leq 0.001$



<i>m/z</i>	V - R	V - M	R - M	Todos
500 a 900	2	9	31	1
900 a 1200	3	2	24	3
1200 a 1500	4	0	29	0

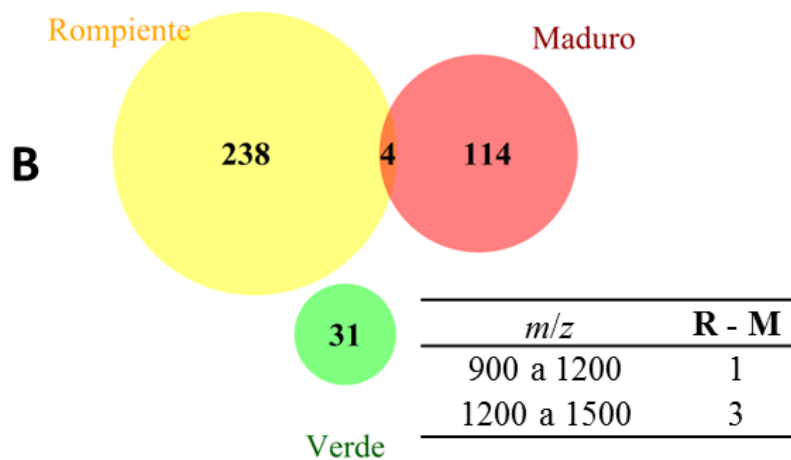


Figura 5-15 Diagrama de Venn para picos significativos (valor- $p \leq 0.001$) que se comparten en los tratamientos en los diferentes estados de maduración de frutos de chile Habanero. A) picos significativos para macronutrientes. B) picos significativos para salinidad. Tablas muestran rango de m/z de los picos compartidos.

Con los resultados de los metabolitos significativos para macronutrientes se elaboraron nubes de puntos (*Cloud-plots*), representaciones gráficas donde el eje X es el tiempo de retención, el eje Y es la m/z , al fondo se dibuja el cromatograma total de iones, y los metabolitos son representados por círculos donde la magnitud de cambio, y su valor- p es directamente proporcionales con el aumento en tamaño de los círculos e intensidad del color respectivamente (Figura 5-16 a Figura 5-21).

La mayoría de los metabolitos sobre-acumulados en bajo P en frutos verdes tienen m/z menores a 1000 y son más polares que los metabolitos que los que se sub-acumulan (Figura 5-16), los metabolitos de mayor m/z en frutos verdes correspondieron a dos mayores a 1500 a menos de 10 minutos del final de la separación cromatográfica. La magnitud de cambio de los metabolitos en estado verde es la menor observada en los tres estados de maduración, siendo mayor en los frutos en estado maduro en particular para los metabolitos sobre-acumulados en bajo P.

La diferencia en polaridad, de acuerdo con el tiempo de retención en la separación cromatográfica, de los metabolitos sobre- y sub-acumulados en frutos en estado rompiente no es tan marcada como lo es para los frutos verdes, la principal diferencia en rompiente es que los metabolitos sobre-acumulados son de m/z menores a 1000, mientras que los sub-acumulados tienen m/z menores y mayores de 1000 (Figura 5-17); la magnitud de cambio de la mayoría de los metabolitos en rompiente es un poco mayor que la observada para los metabolitos en estado verde.

Los mayores cambios se hacen evidentes en frutos en estado maduro (Figura 5-18), donde se da el mayor número de metabolitos significativos y donde se presentan mayores

magnitudes de cambio, en los metabolitos sobre-acumulados la mayoría tiene m/z menores a 1000 al igual que en verde y rompiente, pero sus magnitudes de cambio son las mayores observadas. El número de metabolitos sub-acumulados es el mayor en todo el estudio y al igual que en rompiente su proporción con los sobre-acumulados es mayor al 80 %.

La mayoría de los metabolitos sobre-acumulados en bajo N en frutos verdes tienen m/z menores a 1000 y son semi-polares (Figura 5-19), los metabolitos de mayor m/z en frutos verdes correspondieron a dos sobre-acumulados.

Para frutos en estado de maduración rompiente el mayor número de picos significativos con magnitud de acumulación ≥ 2 correspondieron a sub-acumulados con m/z menores a 1000 (Figura 5-20); los sobre-acumulados son en su mayoría menos polares que los sub-acumulados.

Los mayores cambios por efecto de N en frutos de Chile Habanero se hacen evidentes en frutos en estado maduro (Figura 5-21), donde se da el mayor número de metabolitos significativos y donde se presentan mayores magnitudes de cambio en los metabolitos sub-acumulados la mayoría m/z menores a 1000; los picos sobre-acumulados en cambio, tienen menores magnitudes de cambio.

5.6. Validación de resultados de metabolómica diferencial no dirigida

Con el fin de verificar la congruencia de los resultados previos de metabolómica dirigida con los de metabolómica no dirigida, se evaluaron los cambios en acumulación en metabolitos relacionados con pungencia. Por separado se inyectaron estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina en el HPLC-ESI-TOF bajo las mismas condiciones que se corrieron las muestras. El tiempo de retención y la masa monoisotópica de capsaicina y

dihidrocapsaicina ionizadas en modo negativo (304.4044 y 306.20735 m/z , respectivamente) fueron utilizados para seguir su acumulación durante maduración y en los diferentes tratamientos. Al final del estudio en ninguna de las muestras se detectaron cambios significativos (valor- $p \leq 0.001$, magnitudes de cambio ≥ 2) en la acumulación de capsaicina y dihidrocapsaicina.

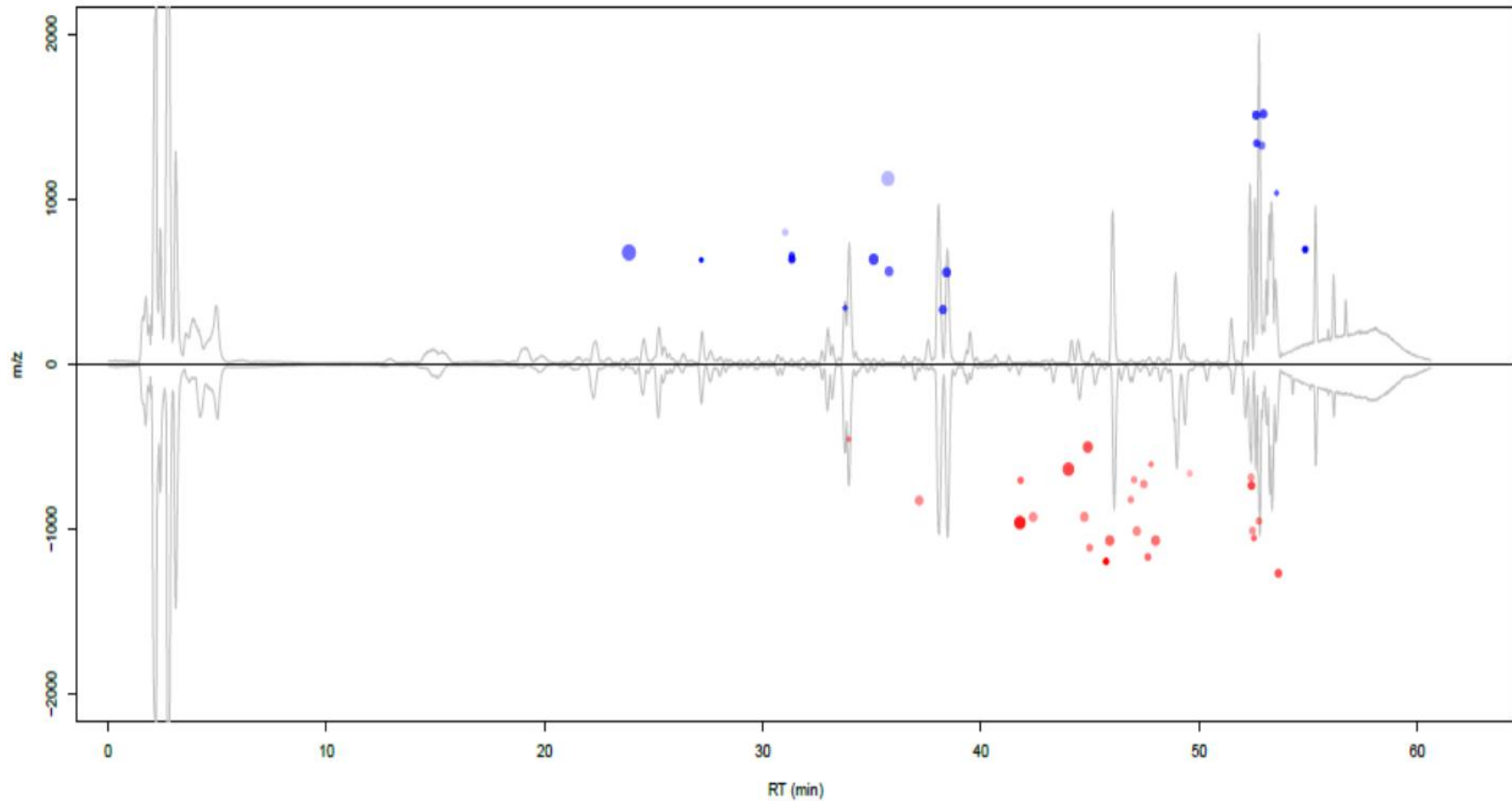


Figura 5-16 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente (valor- $p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo P en frutos verdes de chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

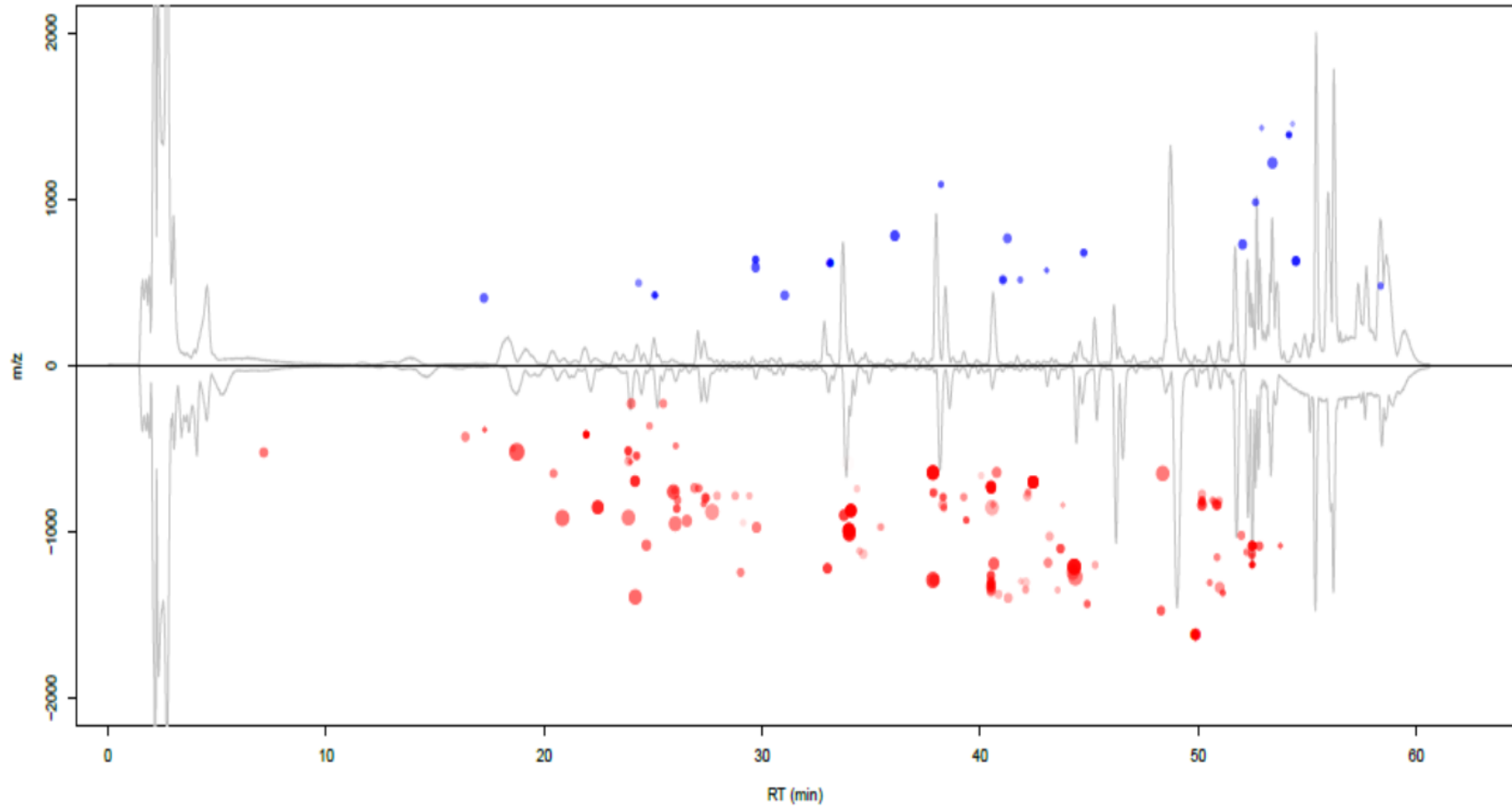


Figura 5-17 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente (valor- $p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo P en frutos en estado rompiente de Chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

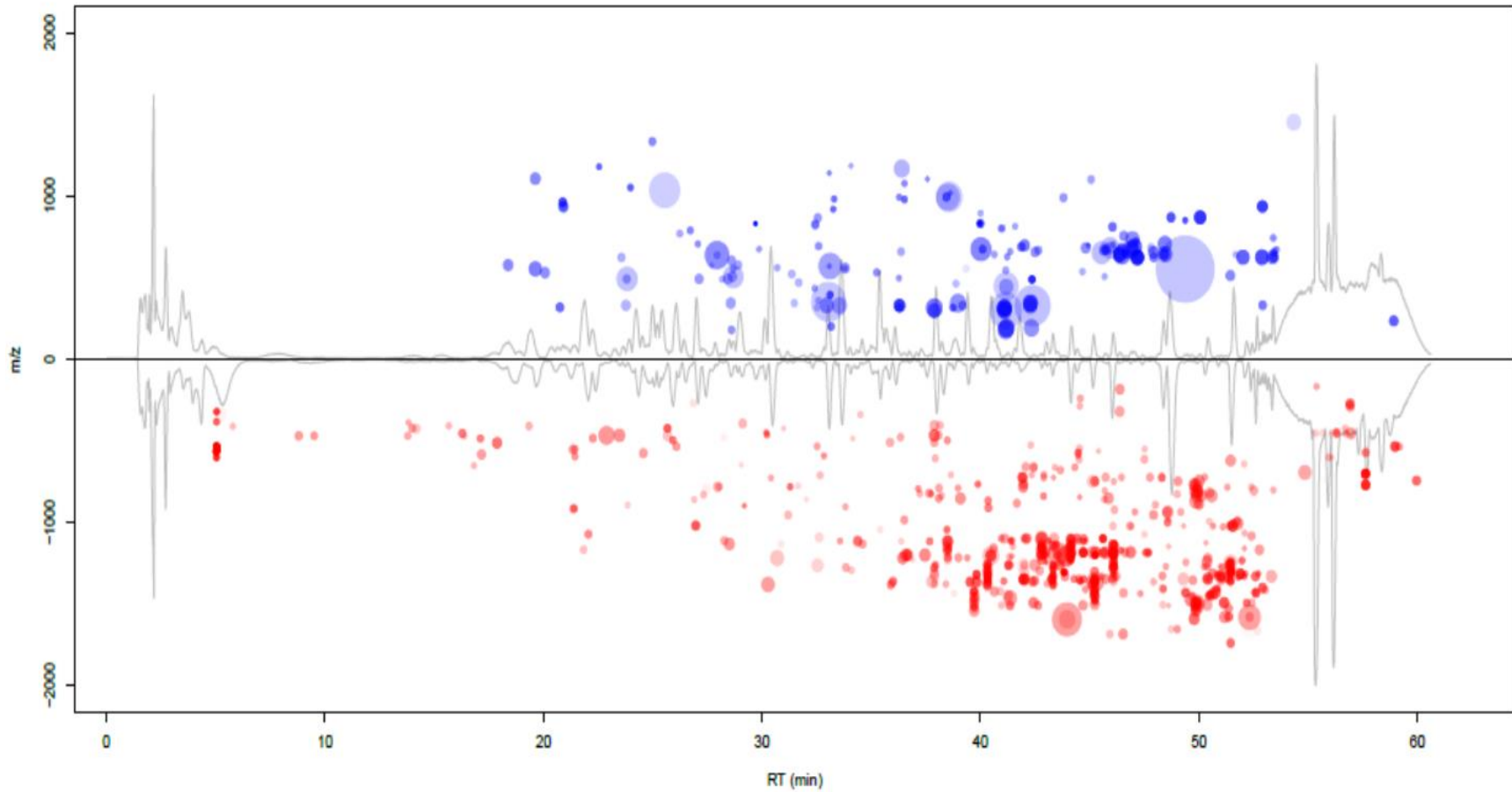


Figura 5-18 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo P en frutos maduros de chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al $\text{valor-}p$.

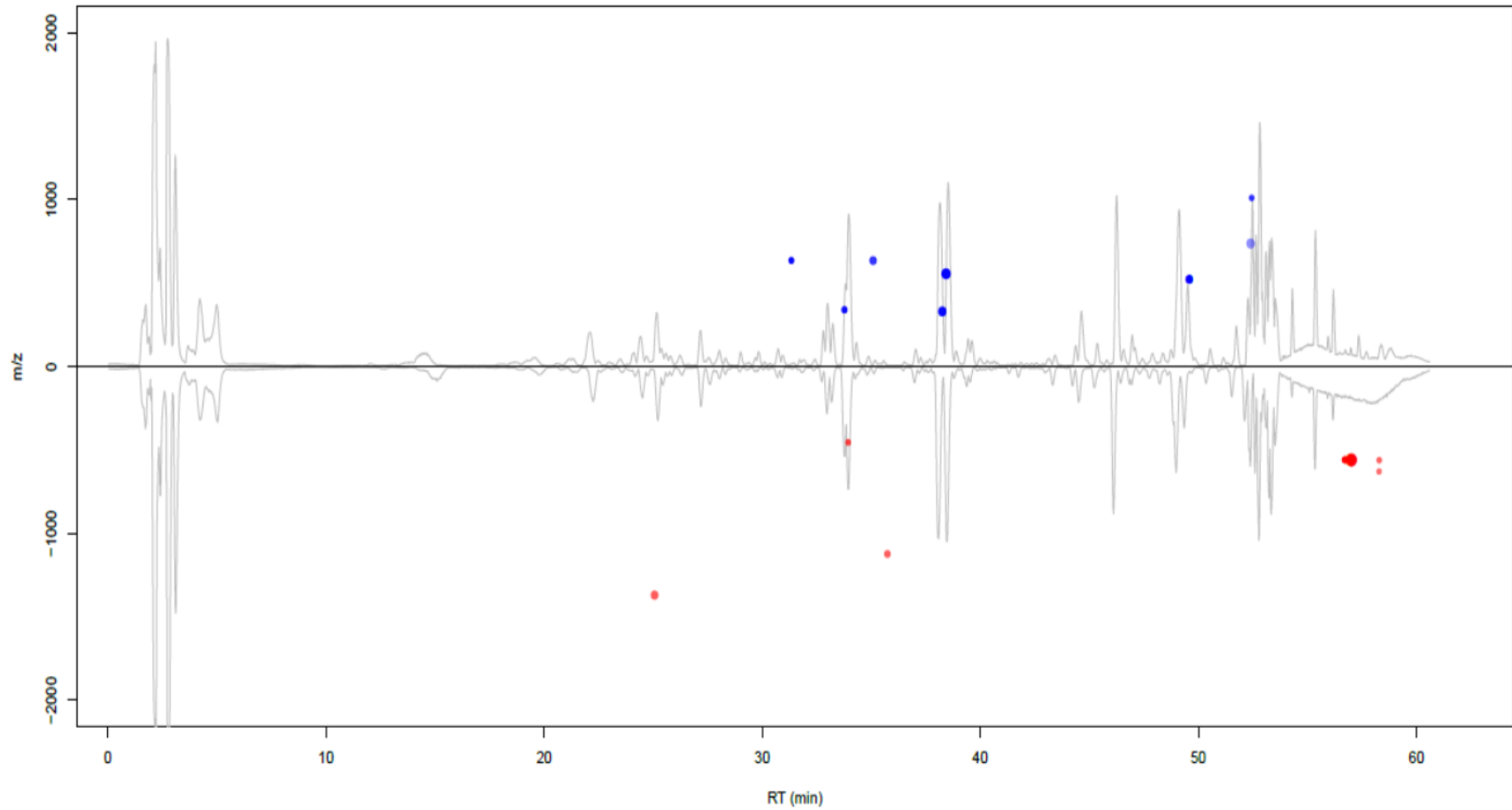


Figura 5-19 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente (valor- $p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo N en frutos verdes de Chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

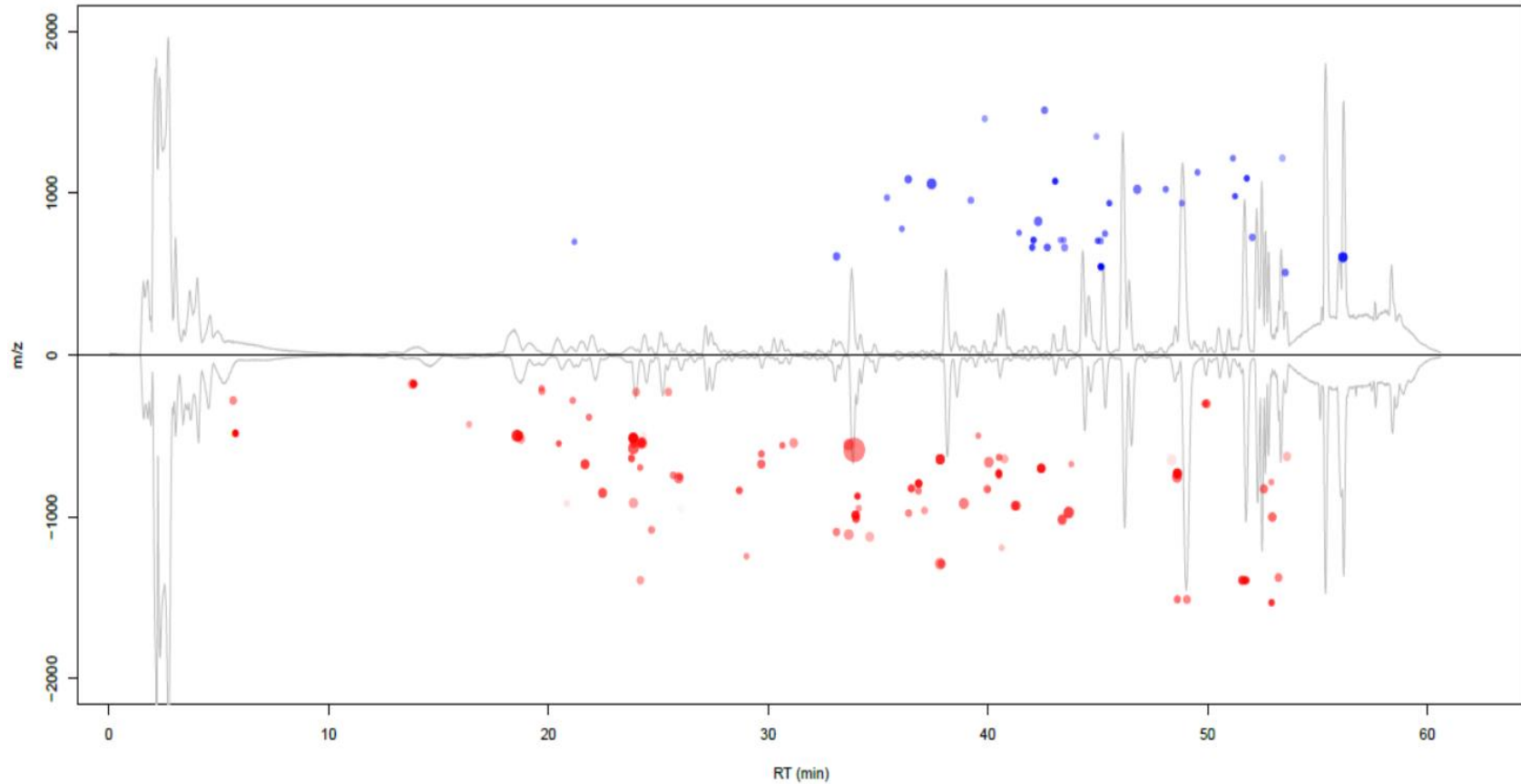


Figura 5-20 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente ($\text{valor-}p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo N en frutos en estado rompiente de Chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

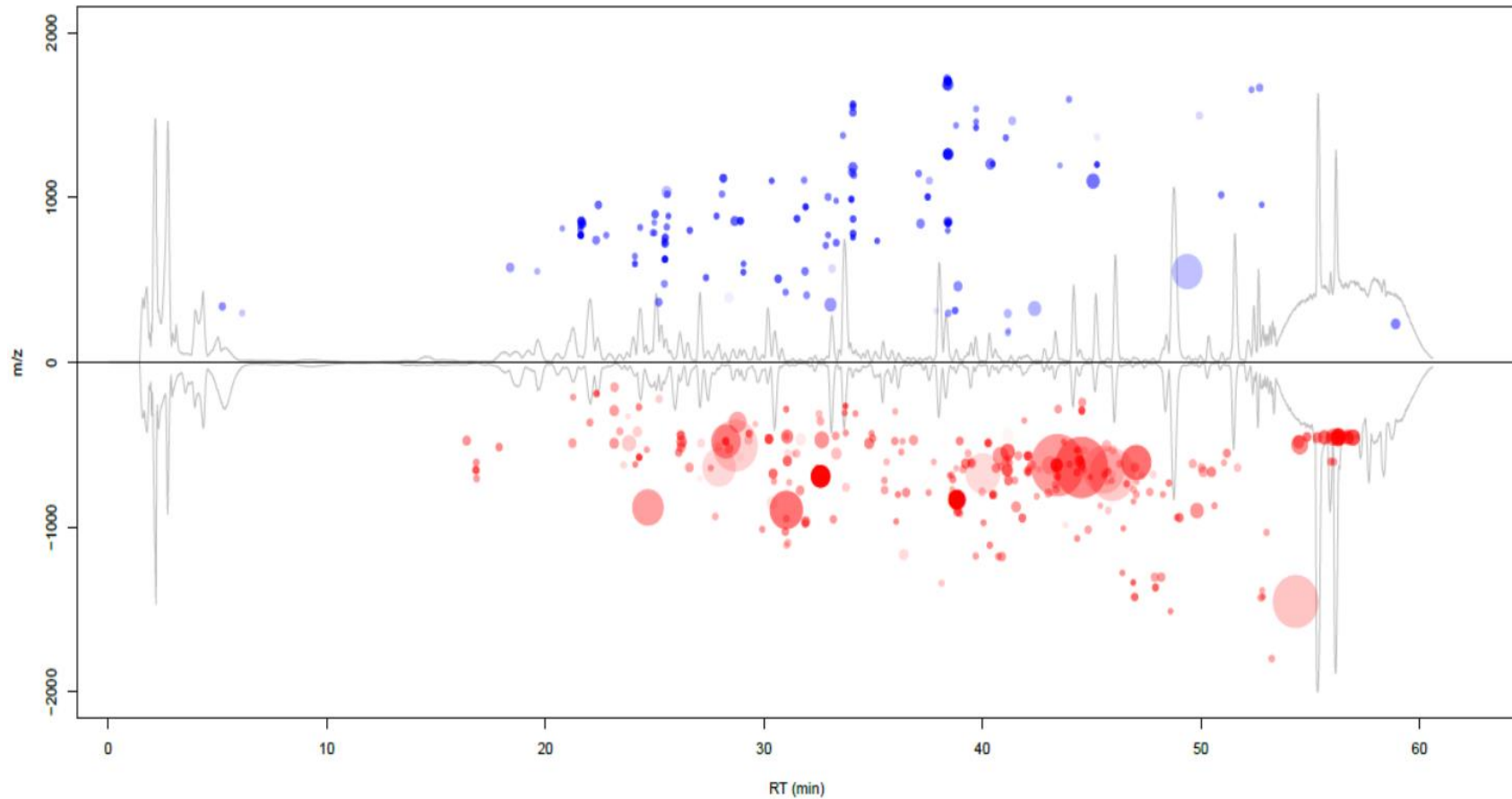


Figura 5-21 Nube de puntos (*Cloud-plot*) de picos que cambian su acumulación significativamente (valor- $p \leq 0.001$, magnitud de acumulación ≥ 2) por efecto de bajo N en frutos maduros de chile Habanero; sobre-acumulados (azul) y sub-acumulados (rojo). El tamaño de círculo es relativo a magnitud de cambio, y la intensidad del color relativa al valor- p .

5.7. Procedimiento para jerarquizar y delimitar picos potenciales para su identificación por MSⁿ

Debido al alto número de picos diferenciales encontrados en el tratamiento con bajo P, y a las limitaciones intrínsecas de los procedimientos analíticos, se establecieron una serie de requerimientos a cumplir para poder delimitar la búsqueda a los picos con mayor relevancia potencial y viabilidad de análisis. Por lo que los resultados significativos a un valor- $p \leq 0.001$ se filtraron para aquellos que cumplieran una magnitud de cambio ≥ 2 , correspondientes al efecto por déficit de P, que resultó ser la condición edáfica subóptima con mayor impacto en los parámetros medidos. De aquellos que cumplen estas condiciones se comparten 13 picos entre frutos de chile habanero rompiente y maduro y 1 pico entre frutos de chile habanero verde y maduro (Tabla 5-5), todos corresponden a metabolitos que se sub-acumulan en pericarpio de chile habanero por efecto del déficit de P.

En este estudio se utilizaron dos aproximaciones para avanzar en la identificación de los metabolitos, la primera utiliza los patrones isotópicos (M+1, M+2, M+3), y se obtuvieron de forma manual, extrayéndolos de los archivos crudos usando los datos de cinco corridas, ubicando la m/z o ion precursor y los isótopos (Figura 5-22), para generar posibles fórmulas moleculares mediante el programa *seven golden rules*, la segunda aproximación usa los patrones de fragmentación que involucra nuevas mediciones analíticas de los metabolitos identificados como significativos.

Tabla 5-5 Picos acumulados significativamente por efecto de bajo P compartidos durante maduración. A) rompiente y maduro, B) verde, y

<i>m/z</i>	tiempo de retención	valor- <i>p</i>	valor- <i>q</i>	Masa exacta neutralizada [Da]	Exactitud de masa [ppm]	Error abundancia isotópica [%]	Abundancia isotópica experimental		
							A+1 [%]	A+2 [%]	A+3 [%]
A									
767.37	42.2	0.0006	0.0208	768.39	6.00	2.85	36.21	14.79	2.12
821.43	50.2	0.0002	0.0119	822.44	5.40	0.82	40.41	14.80	2.70
831.87	27.3	0.0001	0.0100	832.87	4.95	5.07	72.31	40.74	19.07
838.42	50.2	0.0008	0.0229	839.43	4.61	2.47	39.14	14.84	5.87
1083.52	52.5	0.0003	0.0159	1084.55	3.67	3.15	57.58	20.78	5.94
1083.98	52.5	0.0002	0.0131	1084.96	3.29	1.23	63.81	27.16	11.51
1115.52	34.5	0.0009	0.0234	1116.53	5.27	2.17	55.83	22.14	6.34
1199.51	45.3	0.0007	0.0219	1200.52	3.99	1.54	58.24	33.47	15.12
1208.62	44.3	0.0006	0.0208	1209.62	3.61	2.96	58.48	30.67	10.19
1261.59	40.5	0.0003	0.0153	1262.60	3.60	1.39	61.29	28.09	9.14
1297.57	40.5	0.0004	0.0166	1298.59	5.96	4.84	72.39	53.53	37.16
1307.56	40.5	0.0008	0.0228	1308.61	3.48	5.79	58.70	34.75	6.63
1329.57	40.5	0.0002	0.0119	1330.59	3.69	6.33	62.31	19.88	7.05
B									
1113.46	45.0	0.0006	0.0510	1114.51	11.16	5.24	57.74	22.92	4.38

Sin embargo, ambas aproximaciones presentan limitaciones en particular relacionadas con la información disponible en bases de datos, en la primera aproximación aún con una exactitud de ≤ 1 ppm, no es posible la asignación de una única composición elemental, por lo que se pueden obtener varias fórmulas más no todas porque están limitadas a su existencia en las base de datos que utiliza el *seven golden rules*, una vez obtenidas las fórmulas deben ser evaluadas para verificar que puedan ser compuestos relacionados con la planta y tejido en cuestión. Estos pasos demandan tiempo, pero no son evidencia suficiente para asignar la identidad a un metabolito, por lo que la primera aproximación es dependiente de la segunda, mientras que la segunda no depende de la primera. En la búsqueda de los patrones isotópicos algunos correspondían a isótopos en lugar de a iones precursores, estos corresponden por tanto a falsos positivos.

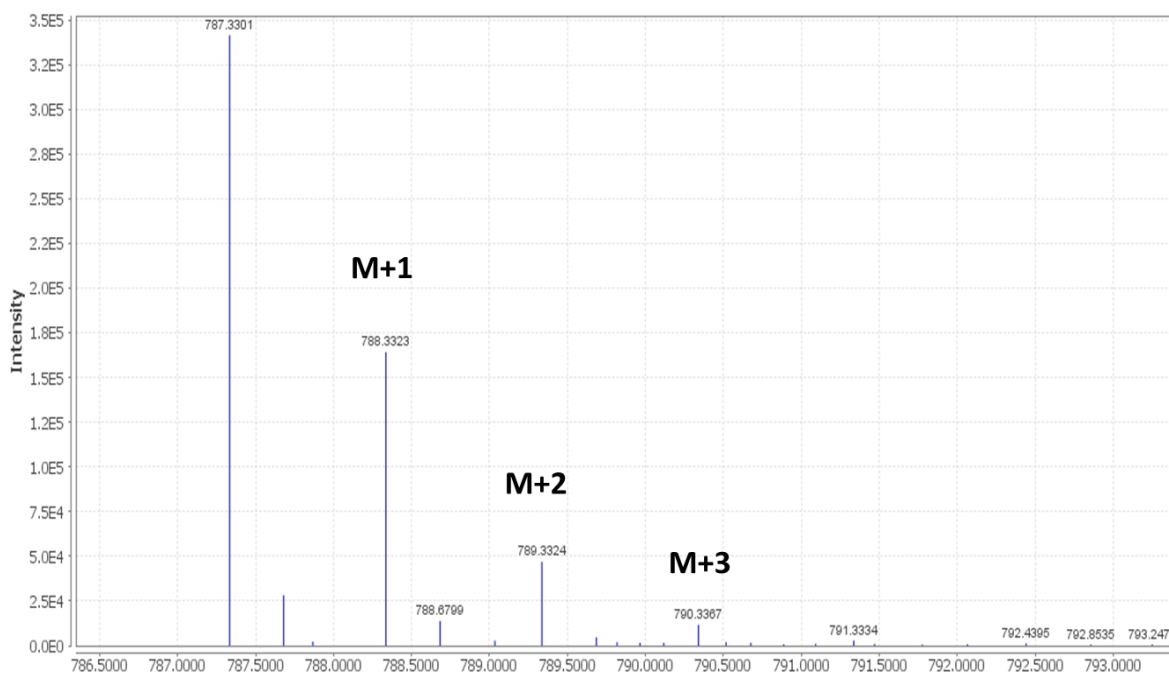


Figura 5-22 Ejemplo patrón isotópico (M+1, M+2, M+3).

La segunda aproximación utiliza los patrones de fragmentación, adquiridos mediante el uso de un trampa de iones, sin embargo, en nuestro laboratorio el MS-TOF y el trampa de iones son dos equipos independientes sin conexión, por lo que se debió recolectar fracciones a la salida de la columna cromatográfica, la eficiencia de esta operación disminuye conforme aumenta el número de metabolitos a recolectar, dado que es necesario pasar la muestra a través de la columna cromatográfica y la corrida completa dura 1 hora y el flujo es de $0.19 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; también disminuye cuando la concentración del metabolito es baja, porque se colecta una fracción por lo que se diluye la muestra; y cuando eluyen cerca m/z parecidas, porque resultaran patrones de fragmentación de más de una molécula.

Dadas las limitaciones anteriores, se lograron recolectar 15 fracciones correspondientes a igual número de metabolitos significativos y se inyectaron directamente sin pasar por columna en el detector de trampa de iones, los patrones de fragmentación (Tabla 5-6, ver Anexos) se usaron para buscar en bases de datos y en bibliografía, teniendo en cuenta que estos resultados son dependientes del equipo y de las condiciones de corrida, lo que dificulta la búsqueda.

Con la información de patrones de fragmentación se puede hacer asignaciones putativas de la identidad de los metabolitos, para la asignación de identidad definitiva se requiere análisis por resonancia nuclear magnética, el cual exige una cantidad en el orden de miligramos del compuesto con una pureza mayor al 85 %.

Tabla 5-6 *Patrones de fragmentación de metabolitos significativos bajo P vs testigo. A) sub-acumulados en frutos en estado rompiente, B) sub-acumulados en frutos en estado maduro*

<i>m/z</i>	tiempo de retención	valor- <i>p</i>	valor- <i>q</i>	Magnitud de cambio P vs Ctrl	Masa exacta neutralizada [Da]	Exactitud de masa [ppm]	Fragmentos (<i>m/z</i>)
A)							
609.18	33.11	2.2E-05	6.7E-03	2.98	610.1718	3.34	564 447 301 271 151
821.43	50.16	1.6E-04	1.2E-02	0.40	822.4447	5.40	775 706 639 629 595 518 499 484 394 359
1001.47	52.94	1.2E-04	1.0E-02	0.51	1002.9802	3.69	978 95 923 757 683 641 479
1083.52	52.46	3.4E-04	1.6E-02	0.34	1084.5508	3.67	1060 938 922 776 631 467
1129.53	52.46	9.7E-04	2.4E-02	0.35	1130.5585	4.46	1084 922 776 630 613 467
1261.59	40.49	2.9E-04	1.5E-02	0.36	1262.5976	3.60	1116 1100 954 740 613 483
B)							
312.12	37.89	7.6E-05	1.1E-03	11.60	313.1329	2.34	293 269 251 247 230 197 183 171 119
312.13	41.09	1.0E-05	3.0E-04	9.33	313.1332	3.83	296 266 242 197 183 123
328.12	36.28	2.1E-04	2.1E-03	4.63	329.1281	2.59	325 310 297 283 270 261 254 247 242 216 212 199 183 174 149
342.14	42.29	1.9E-04	2.0E-03	8.07	343.1439	3.24	327 273 267 259 225 190 185 160
703.36	57.63	2.4E-04	2.4E-03	0.31	704.3632	6.43	658 574 425 341 249 179 131
1099.52	45.06	1.2E-04	1.5E-03	2.69	1100.5199	5.35	954 938 792 776 647 627 542 484 413 305
1261.58	43.32	2.7E-04	2.5E-03	0.38	1262.5825	1.91	1100 938 792 647 484
1331.56	52.07	4.7E-06	1.8E-04	0.45	1332.5972	8.18	1246 1084 922 776 630 468
1347.59	44.28	3.2E-08	5.8E-06	0.40	1348.5914	7.09	1262 1244 1100 1082 938 792 774 630 484

5.8. Metabolitos semi-polares identificados

Se identificaron tentativamente 3 tipos de capsianósidos (Tabla 5-7) comparando el patrón de fragmentación obtenido en el trampa de iones con unos previamente reportados en literatura (Figura 5-23 A-C), ninguna de las bases de datos probadas arrojó resultados, evidenciando la dificultad del proceso de identificación dado lo demorado que puede resultar la búsqueda bibliográfica.

Tabla 5-7 Metabolitos identificados en pericarpio de chile habanero en tratamiento de déficit de P

Estado de maduración	Magnitud de cambio P vs Ctrl	<i>m/z</i>	error [ppm]	Hexosas	Deoxi-hexosas	Fórmula química	Identificación putativa	Referencia
rompiente	0.34	1083.52	3.67	3	2	C ₅₀ H ₈₄ O ₂₅	Capsianósido II	Lee, et al. 2006
maduro	0.38	1261.58	1.91	5	1	C ₅₆ H ₉₄ O ₃₁	Capsianósido X	Lee, et al. 2006
maduro	2.69	1099.52	5.35	3	2	C ₅₀ H ₈₄ O ₂₆	Capsianósido XV	Lee, et al. 2006

5.9. Discusión de resultados

Este trabajo evalúa la respuesta a nivel metabólico del fruto del chile habanero después de que la planta fue sometida de forma prolongada a distintas condiciones edafológicas subóptimas después de floración. Esta respuesta se caracterizó durante tres estadios de maduración: verde, rompiente y maduro.

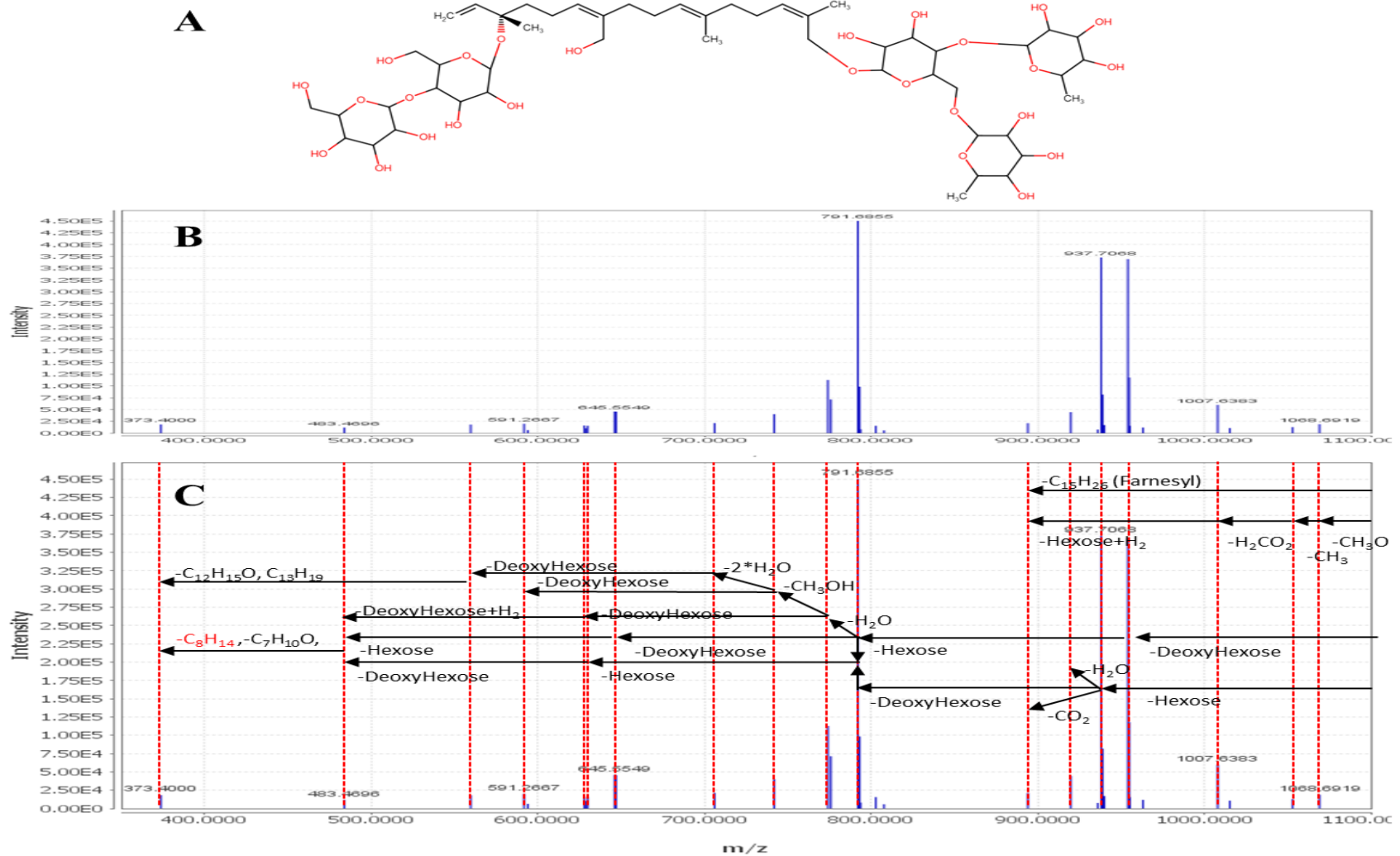


Figura 5-23 Análisis de patrones de fragmentación para identificar pérdidas neutrales y compararla con patrones de literatura. A) estructura de capsianósido XV ($C_{50}H_{84}O_{26}$) B) patrón de fragmentación obtenido del trampa de iones. C) cálculo de diferentes posibles pérdidas

5.9.1. Impacto de maduración en el metaboloma del fruto del chile habanero

Durante el proceso de maduración, un gran número de modificaciones tienen lugar a nivel bioquímico, fisiológico y estructural en el fruto; los principales cambios asociados con maduración incluyen color (degradación de clorofila e incremento de pigmentos no fotosintéticos), firmeza (ablandamiento por degradación de la pared celular), sabor (aumento de azúcares y disminución de ácidos orgánicos), y olor (producción de compuestos volátiles que proveen el aroma característico), y también metabolitos secundarios de importancia para la calidad de las frutas (vitaminas, volátiles, flavonoides, pigmentos, y hormonas, entre otros) (Seymour, Tucker, Poole, & Giovannoni, 2013). Así, es de esperarse que el metaboloma del fruto en maduración cambie drásticamente. En este estudio se midió el metaboloma del chile habanero en tres estadios de maduración, los picos de masas (valores m/z) detectados en cada estadio reflejan el aumento en la complejidad de los cambios producidos siendo el estado rompiente el de mayor cantidad de picos detectados (Tabla 5-2 Número de picos detectados por MZmine y filtrados por R para cada estado de maduración por separado y en maduración en frutos testigo.), en el estado rompiente hay una transición metabólica trascendental en el fruto, por lo que tiene congruencia encontrar en éste metabolitos remanentes del estado verde, los propios transitorios del rompiente, más los metabolitos que comienzan a ser sintetizados en maduración (Figura 5-5 y Figura 5-4). De los 4,206 picos que cambiaron su acumulación significativamente durante maduración, aproximadamente la mitad corresponde a picos cuya acumulación era menor en verde y luego aumentó por maduración. El número de picos de rango entre 500 a 900 m/z que presentan una tendencia a disminuir su acumulación de verde a rompiente es el doble de los que aumentan para el mismo rango de verde a rompiente; y los del rango de 1200 a 1800 m/z , que en todas las observaciones es el rango con menor número de picos, casi se duplicaron de verde a rompiente. En la tendencia de

acumulación de bajo en estado verde a alto en maduro se duplicó el número de picos, en el rango de 80 a 500 m/z , con relación al mismo rango que en verde era alto y bajo en maduro; mientras que en los demás rangos de m/z el número de picos disminuyó, siendo el rango de 900 a 1200 m/z , el de mayor disminución hasta casi la mitad. Lo que indica la acumulación de moléculas menos complejas a medida que el fruto va madurando.

En tomate, la sacarosa es el mayor fotoasimilado translocado al fruto, donde es utilizada para la síntesis de almidón en los primeros estadios de desarrollo del fruto (Luengwilai & Beckles, 2009; Wang, Sanz, Brenner, & Smith, 1993), el almidón a su vez aumenta la fuerza de vertedero para atraer azúcares al fruto (Petreikov et al., 2009). Durante la etapa de rompiente en adelante se importan azúcares en forma de monosacáridos, y se da una rápida degradación del almidón (Luengwilai & Beckles, 2010), que en conjunto se suman a las necesidades de carbono y energía de las células del fruto en maduración (D. M. Beckles, Craig, & Smith, 2001). En relación con lo anterior, el aumento de moléculas con m/z menor a 500 en frutos maduros, observado en este estudio, se podría correlacionar en parte por la hidrólisis de compuestos como polisacáridos a monosacáridos que tiene lugar en el proceso de maduración (Figura 5-5).

Otros trabajos han evaluado cambios en el metaboloma de frutos en maduración, tanto climatéricos como no climatéricos, esta diferenciación se hace ya que estos presentan respuestas y señalización distintas, los climatéricos presentan un aumento de su tasa respiratoria y una dependencia de la biosíntesis de etileno durante maduración (Ej. tomates, duraznos, y melones, entre otros); los no climatéricos por el contrario no presentan picos de respiración ni dependencia de la biosíntesis de etileno durante maduración (uvas, fresas, y limones, entre otros) (Giovannoni, 2001). El chile es un fruto no-climatérico y recientemente su metaboloma ha sido analizado a través de metabolómica dirigida evaluando contenidos de carotenos, tocoferoles, ácido ascórbico, capsaicinoides, glucósidos

de flavonoides en 32 accesiones diferentes con el fin de diferenciar genotipos, los resultados muestran que la composición y concentración de metabolitos en frutos varía enormemente entre accesiones y es independiente de la especie y ubicación geográfica (Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, Bino, & Bovy, 2011). En este estudio aportamos por otro lado información de los perfiles metabolómicos debidos a maduración, así como la respuesta durante maduración a condiciones edafológicas subóptimas (Figura 5-5, Figura 5-14, 5-15 A).

Nuestro trabajo es el segundo estudio de metabolómica no dirigida durante maduración en *Capsicum chinense*, después del de Osorio et al., (2012) en el que se evaluó el perfil transcriptómico y metabolómico utilizando GC-MS de frutos de chile habanero contra frutos de tomate durante maduración (no-climatérico vs climatérico), sus resultados sugieren que ambos frutos tienen similares componentes de señalización mediados por etileno; sin embargo, su regulación es diferente y puede reflejar una sensibilidad alterada al etileno o reguladores diferentes al etileno en chile. Los genes que participan en la biosíntesis de etileno no fueron inducidos en los frutos de chile habanero. Sin embargo, los genes aguas-abajo de la percepción del etileno, como los genes del metabolismo de pared celular, y biosíntesis de carotenos fueron inducidos en ambos. Recientemente en un estudio de secuenciación del genoma del chile, en donde se incluyó como genoma de referencia al chile habanero, se corroboró la observación de que las plantas de chile presentan patrones moleculares diferenciales de los reguladores de maduración y síntesis de etileno en comparación con las plantas de su familiar cercano; el tomate. Ahí, además, se encontró que el tamaño del genoma de *Capsicum* es cuatro veces más grande que el del tomate, y mediante comparación del transcriptoma del fruto en maduración del *C. annum* contra el fruto del tomate, es evidente que aunque hay similitud en algunas respuestas hay diferencias en la expresión de genes envueltos en la biosíntesis y reciclaje de ascorbato, que

causan una acumulación en chile de vitamina C de hasta diez veces más que en tomate (Kim et al., 2014).

Nuestro estudio es el primero realizado con separación por cromatografía líquida para estudiar el estatus metabólico de frutos de *Capsicum* durante maduración, por lo tanto la información generada es complementaria a los estudios recientes estudios existentes de maduración en *Capsicum* por GC-MS (Aizat et al., 2014; Osorio et al., 2012). Cada técnica analítica está limitada por el tipo de compuestos que puede separar y detectar, las actuales técnicas de perfilado de metabolitos cubren apenas una fracción de los más de 100,000 metabolitos secundarios que pueden sintetizar las plantas (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), por lo que la combinación de las técnicas existentes es indispensable para comprender de una forma más completa los cambios en el perfil metabólico. La técnica GC-MS es aplicada principalmente para compuestos polares o no-polares, como metabolitos primarios relacionados con el metabolismo del carbono, como azúcares, polialcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos, y poliaminas; GC-MS se limita a aquellos compuestos volátiles termalmente estables, de compuestos de bajo peso molecular (<1KDa), aunque el número de picos detectados es muchísimo más grande, la mayoría quedan sin detectar. Mientras que LC-MS se aplica para compuestos de polaridad media, (De Vos et al., 2007). El amplio uso de GC-MS se debe a que la asignación tentativa de las identidades se hace a partir de la comparación de los espectros de masas contra librerías, mientras que en LC-MS el patrón isotópico no da una certeza suficiente y debe hacerse más pasos analíticos como MS/MS y/o NMR.

En dos estudios previos de los perfiles metabólicos de maduración de frutos de durazno (*Prunus persica*) (Lombardo et al., 2011) y chile (*C. annuum* L. cv. Aries) (Aizat et al., 2014), climatéricos vs. no climatéricos obtenidos por GC-MS, coinciden en que los almidones y azúcares se modifican por efecto de la maduración como producto de la

translocación desde las hojas (Yamaki, 2010). Con la técnica utilizada en nuestro estudio no podemos obtener información de azúcares, pero las demás moléculas analizadas coinciden con los dos estudios anteriores en el sentido que los mayores cambios observados en el perfil metabolómico de los frutos de chile habanero se relacionan con el proceso de maduración, como se aprecia en los resultados del análisis de componentes principales (Figura 5-6 A) donde los tres estados de maduración explican tres cuartas parte del total de la variación. Lo mismo se observó durante maduración con los diferentes condiciones edafológicas subóptimas (Figura 5-6 A).

5.9.2. Impacto de condiciones edafológicas subóptimas en metaboloma en frutos de chile habanero durante maduración

El estudio del impacto de las condiciones bióticas y abióticas sobre el desarrollo y productividad de las plantas es un tema de interés creciente, el uso de las técnicas analíticas de MS permiten seguir un número relativamente grande de compuestos en uno o pocos análisis por ello se aplicó un enfoque de metabolómica no dirigida para el estudio del impacto de las condiciones edafológicas subóptimas en el estatus metabolómico de los frutos.

Salinidad. Aun cuando no se observaron cambios en el análisis dirigido en metabolitos directamente relacionados con la calidad del fruto del chile, se realizó un análisis no dirigido del metaboloma de los frutos de plantas sometidas a condiciones edafológicas subóptimas con el fin de profundizar en la caracterización de respuestas. Las condiciones de cultivo afectan la acumulación de metabolitos en los frutos, impactando sus propiedades organolépticas y nutricionales. La salinidad en los suelos, por ejemplo, puede ser responsable de cambios en metabolismo y fisiología del fruto que pueden impactar su calidad (Saito et al., 2008).

Nuestros resultados iniciales dirigidos concuerdan con lo observado anteriormente sobre el efecto de la salinidad en el contenido de azúcares en frutos. La exposición de plantas de tomate, a niveles moderados de salinidad, presentan un incremento en la biosíntesis de almidón en frutos verdes y un mayor contenido final de azúcares en frutos maduros (Petreikov et al., 2009). El tratamiento de elevada salinidad ($7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) ocasionó un aumento significativo en los contenidos de glucosa en fruto maduro, en un 21% con respecto al testigo y por tanto una probable mejoría en la percepción de su sabor (Fig.3 del Capítulo 4). Y a pesar que el mismo tratamiento presentó una reducción del 47.2% de la tasa fotosintética neta (Tabla 2 del Capítulo 4) no se vio comprometido el rendimiento o calidad de los frutos.

En el único estudio de metabolómica no dirigida de la respuesta en frutos a tratamientos de salinidad, dos variedades de tomates (*Solanum lycopersicum* cv. Edkawy, Simge F1) sometidos a tratamientos de salinidad de 0.4% w/v de NaCl adicionado a la solución nutritiva solufeed-F (entre 5 a 6 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$) en cultivo hidropónico (Johnson, Broadhurst, Goodacre, & Smith, 2003), el aumento en salinidad no tuvo efectos significativos en la tasa de crecimiento relativo, ni en la tasa de asimilación neta en la variedad Edkawy, por el contrario, en la variedad Simge F1 la tasa de crecimiento relativo sí disminuyó por efecto de la salinidad, pero la tasa de asimilación neta no. Al analizar por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier en exocarpio y mesocarpio, el método de agrupamiento no supervisado PCA no discriminó entre el testigo y el tratamiento de sal para ninguna de las variedades. Similares resultados se obtuvieron en nuestro estudio para chile habanero por efecto de la salinidad, usando incluso un nivel de salinidad mayor que el probado en tomate, al presentar el menor número de cambios significativos (valor- $p \leq 0.001$) en todo el estudio en general y para cada estado de maduración (Tabla 5-3). Al evaluar las señales de masas significativas con las mayores magnitudes de cambio ≥ 2 (Tabla 5-4) los resultados para salinidad son mucho menores que

los de macronutrientes en una proporción de veinte veces menos en frutos maduros. Lo cual puede implicar, como se observó en el análisis de metabolómica dirigida y de fisiología de la planta, que los cambios por efecto de los niveles de salinidad probados son mínimos.

Al igual que los resultados obtenidos en tomate, donde el tratamiento de salinidad no afectó de forma significativa la eficiencia fotosintética (Johnson et al., 2003), en éste estudio los niveles de salinidad probados no tuvieron efecto significativo sobre la eficiencia fotosintética, pero el tratamiento $7 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ sí afectó la tasa fotosintética neta (ver tabla 2 del Capítulo 4), principalmente ante radiación solar que incide en fotosíntesis $\geq 1,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde se disminuye a la mitad la asimilación fotosintética en comparación con las plantas testigo. Sin embargo, en términos generales los efectos de los tratamientos de salinidad aplicados en el rendimiento de las plantas; en la acumulación de metabolitos relacionados con calidad; y en los cambios en el perfil metabólico durante maduración son menores (Tabla 5-4 B). Esto nos indica, que aunque hubo efectos de salinidad en fotosíntesis, éste no afectó considerablemente el fotosintato dirigido al fruto (como en el caso del P y N), ya que los cambios observados fueron menores.

El chile habanero variedad naranja en este estudio no presentó sensibilidad a los tratamientos de salinidad $4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, ya que no se observaron efectos negativos significativos en los parámetros fisiológicos evaluados ni en el contenido de metabolitos relacionados con calidad de fruto (capsaicinoides, azúcares, fenólicos, ácido ascórbico y carotenoides), y tampoco en su perfil metabólico.

Estos resultados tienen implicaciones importantes en el cultivo de chile habanero, siempre y cuando se considere que estos resultados reflejan la respuesta de la planta al evaluar de forma controlada el efecto de la salinidad (las plantas se crecieron en sistemas hidropónicos, y la fertilización se suplementó con 10 mM de Ca^{2+} en forma de CaCl_2 para

evitar el déficit de calcio inducido por salinidad), por lo que su implementación se recomienda para cultivos de invernadero, más no para cultivos en campo donde el número de variables temporales y espaciales que pueden exacerbar los efectos de la salinidad sobre las plantas impedirían replicar los anteriores resultados. Los resultados obtenidos por los estudios metabolómicos dirigidos y no dirigidos, sumados a los estudios del efecto de la salinidad en tomate donde ésta es utilizada de manera extendida en su cultivo para mejorar el sabor por el aumento de azúcares (D.M. Beckles, 2012), indican que los cambios por salinidad en el fruto de chile habanero alteran su metabolismo probablemente mejorando sus propiedades organolépticas de forma inocua para el medio ambiente y los consumidores. Lo anterior es de gran importancia dada la escasa disponibilidad de aguas no salinas para el riego agrícola y por una mayor aceptación potencial de compra por los consumidores.

Bajo N. El N es un elemento esencial y se le considera el nutriente más limitante en el crecimiento y desarrollo de cultivos agrícolas. En este estudio el tratamiento de bajo N afectó la tasa fotosintética neta, y la partición de biomasa de la planta, pero no causó reducción en la productividad ni afectó significativamente parámetros de productividad (Tabla 3 del Capítulo 4); por el contrario causó un incremento significativo en los contenidos de fructosa (27% con respecto al testigo) (Fig. 3A del Capítulo 4). Estos resultados concuerdan con los presentados en frutos de tomate donde se ha observado una relación inversa entre la fertilización con N y la concentración de sólidos solubles totales (Parisi, Giordano, Pentangelo, & Villari, 2006); también coinciden con otro estudio en chile habanero donde no se observó efecto en actividad antioxidantes y polifenoles totales por cambios en fertilización de N (Nuñez-Ramirez, Gonzalez-Mendoza, Grimaldo-Juarez, & Cervantes Diaz, 2011).

La menor disponibilidad de N afecta el perfil del metaboloma durante maduración en frutos de chile habanero. El tratamiento de bajo N, al igual que el de $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, afectó la tasa fotosintética neta (ver tabla 2 del Capítulo 4). Sin embargo, éste efecto del bajo N sobre la asimilación fotosintética ante mayores valores de radiación solar ($\geq 1,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no se reflejó negativamente en el rendimiento de las plantas; en la acumulación de metabolitos relacionados con calidad; pero sí en los cambios en el perfil metabólico durante maduración, donde el número de picos que cambiaron su acumulación de forma significativa en frutos maduros fueron 14.6 veces más que los que cambiaron por efecto de $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ (Tabla 5-4 A). Al ser el fruto maduro un órgano completamente heterótrofo se observó que el efecto por el tratamiento de bajo N afecta otros metabolitos y no solo los relacionados con fotosíntesis.

El perfil metabólico de frutos en el tratamiento bajo N presentó cambios con respecto a los de las plantas testigo, en los tres estados de maduración (Tabla 5-4), a pesar que su rendimiento y los metabolitos relacionados con pungencia y antioxidantes, no disminuyeron significativamente. El principal cambio en el perfil del metaboloma se dio en el último estado de maduración evaluado, correspondiendo en su mayoría a moléculas que disminuyeron su acumulación por efecto del tratamiento. De estas moléculas subacumuladas más de la mitad tienen m/z ente 500 a 900 (Figura 5-21), rango de masas que puede corresponder a muchos compuestos en frutos de chile como almidón, β -carotenos, fenólicos, flavonoides, y terpenoides, entre otros (Wahyuni et al., 2013; Wahyuni et al., 2014). Estos cambios en el perfil metabólico no han sido reportados en ningún otro estudio, principalmente porque la mayoría usan enfoques dirigidos.

En plantas el proceso de maduración de frutos es un proceso único en el que el metabolismo está estrictamente regulado durante la transición de un órgano parcialmente fotosintético a uno enteramente heterotrófico (Carrari et al., 2006). En términos generales

de rendimiento y concentración de algunos metabolitos relacionados con calidad no hubo cambios por efecto del bajo N, sin embargo, su perfil metabolómico sí cambió significativamente, por lo que estos cambios podrían corresponder a las alternativas que siguió la planta para garantizar un desarrollo uniforme de los frutos, a pesar de las condiciones de fertilización.

Bajo P. El P es uno de los 17 nutrientes requeridos por las plantas para su crecimiento y se le considera el segundo más importante después del N. La importancia en varios aspectos del desarrollo de la planta quedó en evidencia en este estudio por la reducción de: desarrollo aéreo, producción de frutos, biomasa aérea y de raíz, así como la reducción significativa en el contenido de metabolitos relacionados con sabor en frutos maduros (fructosa) y una disminución, aunque no significativa, de metabolitos relacionados con la pungencia (capsaicina y dihidro-capsaicina).

Adicional al número y magnitud de cambios en planta y en ciertos metabolitos relacionados con calidad en fruto, el análisis de metabolómica no dirigida en frutos durante maduración reveló que el tratamiento de bajo P causó los mayores cambios de todo el estudio, los cuales al igual que en el tratamiento de bajo N se concentraron en su mayoría en frutos en estado maduro (Tabla 5-4). En comparación con los frutos de las plantas testigo el principal efecto del bajo P fue la disminución en la acumulación de moléculas, de las cuales, a diferencia de lo observado con la falta de N, más de la mitad correspondían a m/z ente 1200 a 1700 masas que pueden corresponder a diferentes moléculas en Chile como por ejemplo diterpeno acíclicos glicosilados, flavonoides glicosilados, entre otros (Figura 5-18). De las posibles moléculas que cambian por efecto de bajo P a lo largo de la maduración, solamente 13 se comparten entre rompiente y maduro, y 1 entre frutos en estado verde y maduro (Tabla 5-5), lo que puede significar que corresponden a metabolitos directamente relacionados con la deficiencia prolongada de P, que no tienen vías

alternativas para ser biosintetizados, y que debido a las estrategias de las plantas de administrar sus contenidos de P pueden tener funciones de las que pueden empezar a prescindir.

Los efectos devastadores del bajo P en la fisiología de las plantas de chile habanero ponen en evidencia su sensibilidad al déficit de P, constituyéndose éste en el primer estudio que documenta y evalúa en varios niveles dicha sensibilidad para *Capsicum chinense*.

El número de picos de masa identificados como significativos en los diferentes tratamientos en chile habanero están en el rango de 4 para el tratamiento $4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ en frutos verdes y 839 para el tratamiento de bajo P en frutos maduros (Tabla 5-4), estos valores dan una idea de la magnitud de cambios en metabolitos que suceden en el fruto por efecto de los tratamientos. En un estudio de metabolómica no dirigido en melón en el que se evaluaron las diferencias entre dos variedades, una climatérica y otra no, en dos temporadas de cultivo y dos prácticas de manejo agrícola, combinando múltiples técnicas analíticas avanzadas (FIE-MS, H-NMR, LC-QTOF-MS, GC-MS, ICP-MS), se obtuvieron 291 moléculas que diferencian a las variedades, 327 moléculas que discriminan entre las dos temporadas de cultivo, y 252 moléculas que discriminan entre las dos prácticas agrícolas (Bernillon et al., 2013). De esta manera, los resultados de este estudio en pericarpio de chile habanero están dentro del rango de cambios significativos observados en otros frutos. Asimismo, es evidente cómo impacta más el estrés de bajo P en el fruto, que el aumento en salinidad basándose únicamente en el número de picos diferenciales observados. La metabolómica no dirigida puede ser utilizada como una forma de obtener evidencias de impacto de tratamientos o cambios genéticos en el fruto. El desarrollo analítico generado en este trabajo, determina el tratamiento estadístico de datos que arrojan los espectros de masas cuando se analizan matrices de alta complejidad. Cabe señalar, que para la detección de picos y el análisis estadístico de los datos siempre se utilizó software de libre acceso.

En éste estudio de metabolómica no dirigida al evaluar la respuesta diferencial en la acumulación de metabolitos por efecto de los diferentes tratamientos se confirmaron los resultados previos obtenidos mediante el enfoque de metabolómica dirigida al hacer seguimiento de los metabolitos relacionados con pungencia. Tanto capsaicina como dihidrocapsaicina se detectaron en todas las muestras en los diferentes tratamientos y sus cambios en acumulación por efecto de los tratamientos no fue significativo con respecto al testigo. Esta coherencia de resultados con aquéllos de la metabolómica dirigida a análisis de capsaicinoides demuestra en general que los resultados obtenidos a través de la técnica no dirigida, en la cual se cuantifican metabolitos extraídos con una solución metanólica acidificada son un reflejo confiable del estado metabólico del fruto al tiempo de la toma de muestra.

Limitaciones en identificación de metabolitos. En metabolómica la identificación de metabolitos es tal vez el paso más complicado por varias razones, en este estudio las limitantes que se presentaron fueron la resolución de MS, la posibilidad de correr las muestras en forma simultánea en MS y MS/MS, y la disponibilidad de bases de datos. La resolución de MS permite la separación de dos o más picos espectrales de masas cercanas, y por tanto una mejor capacidad de distinguir iones de diferente composición elemental, el TOF-MS utilizado tiene una resolución reportada de 10000, lo que significa que para una señal de 1000 m/z se puede distinguir de otra de 1000.1 m/z , si la diferencia es menor no se tendrán picos separados, y por tanto se perderá información

En este estudio el análisis por MS/MS no se corrió de forma simultánea con las corridas del TOF-MS porque los equipos están por separado y el trampa de iones funciona con un dispositivo de separación cromatográfica con columnas en chip que utilizan flujos muy bajos (el nuestro 100 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$). Debido a esto, los picos significativos con señales intensas y una separación de por lo menos medio minuto entre m/z cercanas se

seleccionaron y recuperaron a la salida de la columna del HPLC-TOF-MS, juntando lo recuperado de varias corridas hasta 200 μ l, lo que demanda mucho tiempo y esfuerzo.

La tercera limitante se relaciona con la disponibilidad de bases de datos de espectros de masas de fragmentación, dada la estrecha cobertura de metabolitos del reino vegetal presentes en las bases de datos; adicionalmente los problemas inherentes de reproducibilidad de los experimentos de LC/MSn, que a diferencia del GC/MS, son dependientes de las condiciones de corrida y de los instrumentos (Figura 2-3), limitando el uso de las librerías existentes y por tanto haciendo el proceso de identificación menos eficiente (Bino et al., 2004; Rojas-Cherto et al., 2012).

Por las anteriores razones la identificación que se alcanzó en este estudio es una identificación tentativa basada en su masa exacta obtenida por TOF-MS y la comparación de los patrones de fragmentación obtenidos por MS/MS, con información disponible en artículos de caracterización de compuestos en Chile por MS y NMR, y de metabolómica de Chile.

Metabolitos tentativamente identificados. En general en frutos climatéricos como tomate y durazno, o no climatéricos como las fresas y uvas se observa un aumento en el contenido de fructosa, glucosa, y sacarosa durante maduración, con un mayor contenido de azúcares en las etapas avanzadas, sin embargo, en un estudio de maduración de Chile habanero con análisis integrado de transcriptómica y metabolómica (Osorio et al., 2012), se observó que este presenta un metabolismo diferente, ya que a partir del estado de maduración rompiente el contenido de azúcares, que hasta ese momento venía aumentando, empieza a decrecer levemente. Lo que pone de manifiesto las características de respuesta únicas de *Capsicum*, lo que concuerda con las características únicas de los metabolitos identificados tentativamente en nuestro estudio.

Las moléculas tentativamente identificadas en este estudio, a través de su masa exacta y la comparación de sus patrones de fragmentación con los reportados en la bibliografía, pertenecen a diterpenos acíclicos glicosilados, de estos dos disminuyeron su acumulación por efecto del tratamiento de bajo P, uno en rompiente y maduro, y el otro en frutos maduros; y uno aumento su acumulación en frutos maduros. Los diterpenos acíclicos glicosilados, hacen parte del grupo de los terpenoides, que con toda su diversidad estructural y funcional representan el mayor grupo de metabolitos secundarios (Degenhardt, Köllner, & Gershenzon, 2009). Los terpenoides en general participan en una gran cantidad de funciones fisiológicas como fotosíntesis, respiración, y crecimiento y desarrollo, muchos terpenoides tienen funciones ecológicas al mediar la interacción de la planta con factores bióticos y abióticos (Tholl & Lee, 2011). Por ejemplo, las plantas liberan terpenoides de bajo peso molecular para atraer polinizadores o para inducir una respuesta de defensa en plantas cercanas (Pichersky & Gershenzon, 2002), los terpenoides también pueden servir de fitoalexinas en defensa contra fitopatógenos y herbívoros (Hasegawa et al., 2010; Heiling et al., 2010).

Mediante estudios por NMR se han caracterizado diterpenos acíclicos glicosilados tanto en tejidos verdes, como en frutos de varias especies de la familia Solanácea; en el género *Capsicum* (*C. annuum* y *C. chinense*) se han reportado capsianósidos, en formas monoméricas de diterpenos glicosilados y diméricos de ésteres (Cho et al., 2014; Izumitani, Yahara, & Nohara, 1990; Lee et al., 2009); para el género *Lycium* se han reportado 9 lyciumosides para *L. chinense* (Yao et al., 2011); para *Nicotiana* se han reportado 7 nicotianosidos en *N. tabacum* (Heiling et al., 2010). Otro tipo de diterpenos, el Phytol (C₂₀H₄₀O), ha sido caracterizados en *C. annuum* y contribuyen a conferir resistencia contra *Liriomyza trifolii* al evitar la oviposición en hojas (Kashiwagi, Horibata, Mekuria, Tebayashi, & Kim, 2005); este tipo de diterpenos han sido encontrados también en frutos

principalmente en estado verde, participando en la inhibición de la peroxidación lipídica (Conforti, Statti, & Menichini, 2007).

La actividad de los capsianósidos se presume esté relacionada con actividad contra herbívoros, dado que los diterpenos acíclicos diglicosilados acumulados en tabaco presentes en grandes cantidades (>2.5% de su biomasa seca) presentan actividad herbicida, al reportar correlación negativa entre el contenido total y la masa ganada por larvas de lepidóptera (Lou & Baldwin, 2003). En un estudio realizado con capsianósidos aislados de Chile no se encontró actividad antioxidante (De Marino et al., 2006). A la vez que la maduración en los frutos en la mayoría genera atributos deseables de sabor, color, y textura, también conlleva el incremento en susceptibilidad a patógenos antes y después de la cosecha (Giovannoni, 2001). Por lo que no parece descabellado pensar que los capsianósidos tengan una actividad de defensa del fruto en *C. chinense*; para confirmarlo sería necesario evaluar la relación entre los contenidos en hojas y frutos, así como la vulnerabilidad a insectos herbívoros. Se puede especular que si la acumulación de capsianósidos bajó en el fruto, éste puede ser indicativo de una baja en la acumulación en el área foliar, lo cual podría conllevar a una susceptibilidad. De esta manera, la metabolómica no dirigida puede servir de primer indicador de posibles alteraciones metabólicas en la planta que puedan significar efectos negativos en la respuesta a estreses bióticos.

Con respecto a las posibles causas de esta disminución de diterpenos acíclicos en fruto como consecuencia de bajo P, se ha encontrado que ante el déficit de P las plantas responden con una serie de cambios para la optimización del poco disponible, uno de los principales mecanismos identificados de adaptación de las plantas al déficit de P es la remodelación de la membrana lipídica, reemplazando los fosfolípidos de membrana por glicerol-lípidos para reciclar el P para otros procesos (Andersson, Stridh, Larsson, Liljenberg, & Sandelius, 2003). En nuestro caso, el efecto observado del bajo P en

capsianósidos en fruto, su reducción podría deberse a un mecanismo de la planta para disminuir el uso del P, dado que para la síntesis de isopreno, precursor de los terpenoides, se demandan 20 ATP y 14 NADPH (Sharkey & Yeh, 2001). Esta disminución de compuestos de terpenos por efecto del déficit de P ya ha sido observada en hojas de *Pinus pinaster* donde la emisión de terpenos disminuyó en una magnitud de 5 veces (Blanch et al., 2012).

Por otro lado el aumento de uno de los diterpenos acíclicos glicosilados de hasta tres veces en frutos maduros podría indicar que el papel de estos compuestos capsianósidos sí es indispensable para la planta, por lo tanto pueden disminuir dos tipos de ellos pero no prescindir de ellos y por eso en compensación otro aumenta.

Los capsianósidos han sido identificados principalmente en *C. annuum* y también en *C. chinense*; en un estudio previo de metabolómica no dirigida con LC-*p*DA-QTOF-MS, los mismo capsianósidos, identificados en este estudio, fueron reportados en frutos maduros de plantas derivadas de la cruce entre una variedad de *C. annuum* como madre, seleccionada por su elevada pungencia, altos contenidos de capsianósidos, con una de *C. chinense* (café) como padre, seleccionada por sus altos contenidos de flavonoides y pungencia (Wahyuni et al., 2014). Previamente se había caracterizado por NMR la presencia del capsianósido XV en frutos de chile habanero (Lee et al., 2009). Hasta donde conocemos es la primera vez que se reporta en el Capsianósido II y el X en chile habanero.

Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo describe la respuesta fisiológica de chile habanero a nivel de planta y de fruto durante maduración, a un número común de condiciones abióticas en el medio de cultivo, caracterizadas a través de enfoques dirigidos y no dirigidos, con uso de diferentes técnicas analíticas. La metabolómica no dirigida arroja resultados más profundos sobre cambios a nivel de metaboloma al someter las plantas a condiciones de bajo P y bajo N y confirma que no hay efectos importantes para salinidad.

El tratamiento de bajo P fue el más devastador para el desarrollo y productividad de las plantas de chile habanero. El bajo P causó el mayor cambio en el perfil de metabolitos en pericarpio de frutos en estado verde, rompiente y maduro. El cambio observado tendió principalmente a la sub-acumulación por efecto del bajo P.

El tratamiento de bajo N tuvo efecto sobre la tasa de raíz:parte-aérea, y la tasa fotosintética neta; sin embargo, no tuvo efecto negativo sobre la productividad global de la planta. La menor disponibilidad de N afecta el perfil del metaboloma durante maduración en frutos de chile habanero, al igual que el tratamiento de bajo P, los mayores cambios se dieron en frutos maduros por efecto de la sub-acumulación.

De los tratamientos de salinidad, el de $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ no tuvo ningún efecto sobre las plantas de chile habanero, su productividad y la calidad de sus frutos. Mientras que el tratamiento de $7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ causó disminución de la tasa fotosintética neta, pero no afectó ningún otro parámetro, salvo un aumento en la acumulación de glucosa en pericarpio de frutos maduros. Ambos tratamientos de salinidad no tuvieron mayores efectos sobre los cambios en el perfil de acumulación de metabolitos durante maduración al compararlos con los cambios sufridos por el déficit de N y P.

Los niveles estudiados de salinidad y bajo N, tienen el potencial de usarse para la formulación de pautas de fertilización y manejo de las condiciones de salinidad en las zonas de producción hortícola, de forma técnica, económica y socialmente viable para el mejoramiento de propiedades organolépticas en frutos de chile habanero sin impacto en el rendimiento.

Éste estudio aporta información de los perfiles metabolómicos debidos a maduración en *Capsicum chinense*, siendo el segundo estudio de metabolómica no dirigida durante maduración en chile habanero y el primero con separación por cromatografía líquida por lo tanto aporta información complementaria a la de los estudios por GC-MS.

Este es el primer estudio de metabolómica no dirigida en frutos de chile habanero bajo condiciones edafológicas subóptimas y durante maduración, realizado por cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Aunque el proceso de maduración es parecido entre las diferentes plantas, cada una puede presentar características peculiares en el proceso, y en la manera cómo ajusta este proceso ante condiciones bióticas y abióticas, lo que puede brindar información de utilidad sobre estrategias biológicas para enfrentar el estrés que contribuyen a nuestro conocimiento de los sistemas biológicos y podrían usarse en estrategias biotecnológicas de mejoramiento vegetal. Lo que justifica la realización de estudios de maduración de frutos no solo en organismos modelo.

Esta sería la primera vez que se encuentran los capsianósidos II y X en frutos de chile habanero y también sería la primera vez que se observa efecto del déficit de P sobre estas tres metabolitos en plantas

La metodología instrumental y de análisis de datos seguida permitió evaluar el estatus metabolómico de muestras complejas, proveyendo la metodología básica para posteriores investigaciones, más enfocadas en el rol de varias moléculas en condiciones de estrés para la planta.

Dado el gran número de pasos de la metodología, cada uno de los cuales puede sumar negativamente error a los resultados, se presentan a continuación cuidados especiales que deben tenerse en varios pasos críticos, los cuales pueden emplearse al análisis del metaboloma de cualquier muestra compleja (Figura 6-1).

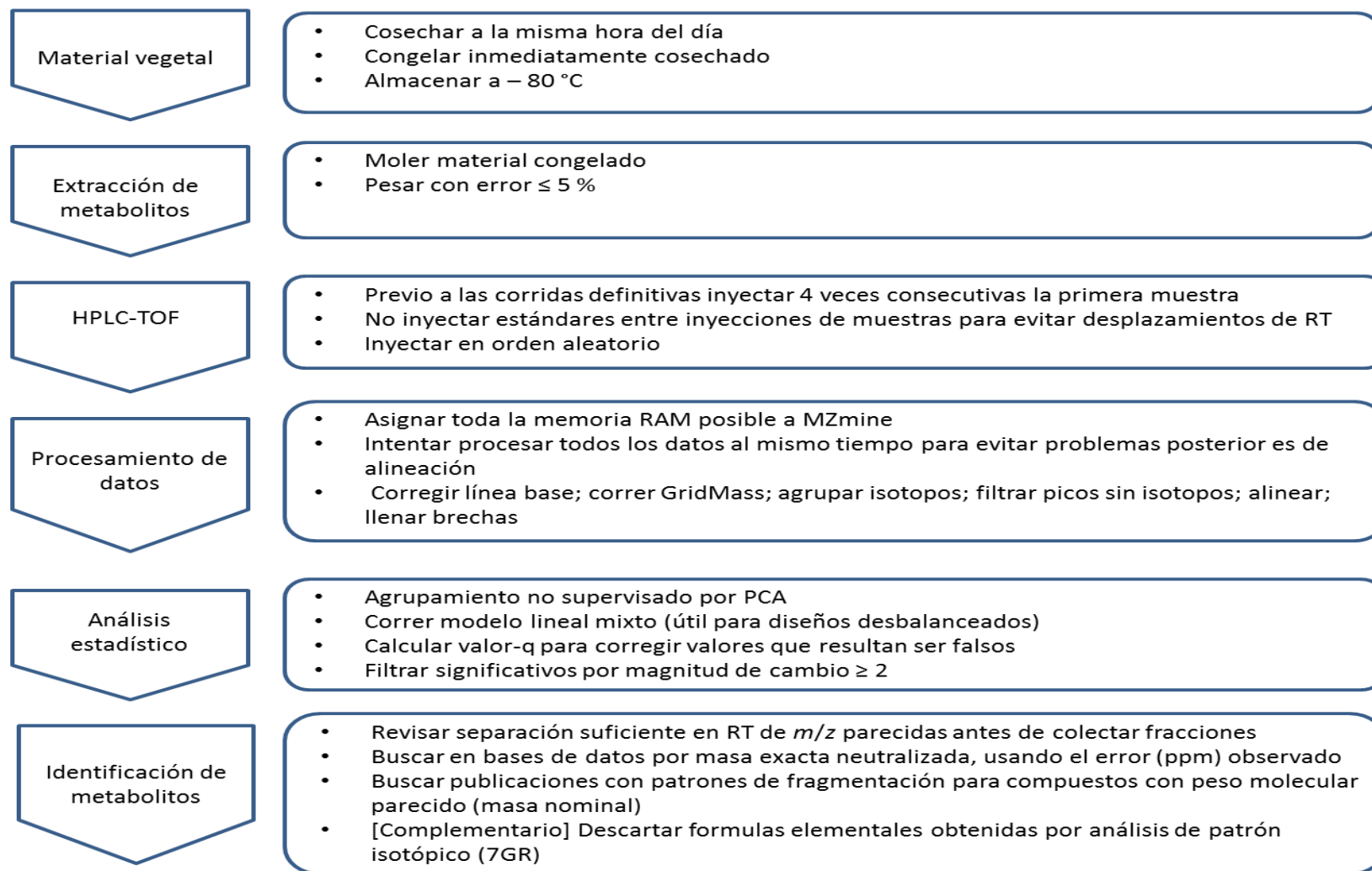


Figura 6-1 Pasos críticos en los análisis metabolómico de muestras vegetales complejas

6.1. Recomendaciones y futuros trabajos

La disminución de hasta tres veces de los capsianósidos II y VIII en chile habanero, y el aumento del capsianósido XV en frutos maduros por efecto del déficit de P, abre interrogantes acerca de su rol en los frutos, su regulación durante estrés, así como las posibles consecuencias que esto conlleva para el normal desarrollo y calidad de los frutos de chile habanero.

Se recomienda evaluar niveles más altos de salinidad en chile habanero para conocer su efecto sobre la acumulación de metabolitos y caracterizar mejor las estrategias de la planta ante condiciones edafológicas subóptimas. De igual forma se recomienda evaluar niveles más bajos de N.

La metodología instrumental y de análisis de datos implementada en éste estudio puede ser utilizada para explorar cambios en el perfil del metaboloma de muestras vegetales complejas, incluso evaluando no únicamente a nivel de órganos, sino también a nivel de tejidos, permitiendo obtener información de los cambios generales de una forma confiable y rápida.

El uso de MS en tándem también permite un mayor acercamiento a la identidad de los metabolitos que cambian su acumulación por efecto de los tratamientos evaluados, sin embargo, dadas las dificultades para comparar los resultados con los de otras bases de datos y el número limitado de metabolitos en esas bases de datos, una estrategia a seguir, cuando se decide trabajar sobre una muestra en particular, puede ser elaborar las propias bases de datos. Para ello algunas consideraciones que ayudarían serían: el uso de un PDA de forma simultánea con el MS; el uso de columnas monolíticas para mejorar separación de la muestra y evitar supresión de iones; un analizador de MS de mayor resolución que permita

la separación de picos con m/z cercanas; el uso en simultaneo del MS y el trampa de iones o en su defecto un MSD/MS en el que se puedan replicar las condiciones de separación de la muestra; contar con personal especializado en el análisis e interpretación de espectros de masas. La implementación de alguna o todas las anteriores dará información más precisa por un menor tiempo para la identificación de metabolitos en las muestras.

La identificación de los metabolitos que cambian significativamente en éste estudio también permitiría explotar los recientes resultados de secuenciación del genoma de chile habanero, así como correlacionar los resultados de transcriptómica disponibles para ganar conocimiento de las rutas afectadas por efecto de los tratamientos aplicados.

Bibliografía

- Afendi, F. M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., . . . Kanaya, S. (2012). KNAPSAcK Family Databases: Integrated Metabolite–Plant Species Databases for Multifaceted Plant Research. *Plant and Cell Physiology*, 53(2), e1. doi: 10.1093/pcp/pcr165
- Aizat, W. M., Dias, D. A., Stangoulis, J. C., Able, J. A., Roessner, U., & Able, A. J. (2014). Metabolomics of capsicum ripening reveals modification of the ethylene related-pathway and carbon metabolism. *Postharvest Biology and Technology*, 89, 19–31. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.11.004
- Aktas, H., Abak, K., & Cakmak, I. (2006). Genotypic variation in the response of pepper to salinity. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 260-266. doi: 10.1016/j.scienta.2006.07.017
- Aldana, M. E. (2005). *Effect of Phosphorus and Potassium Fertility on Fruit Quality and Growth of Tabasco Pepper (Capsicum frutescens) in Hydroponic Culture*. (Master of Science), Louisiana State University, Louisiana. Retrieved from <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-06232005-124454/> (etd-06232005-124454)
- Amtmann, A., & Sanders, D. (1998). Mechanisms of Na⁺ Uptake by Plant Cells. In J. A. Callow (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. Volume 29, pp. 75-112): Academic Press.
- Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C., & Sandelius, A. S. (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS letters*, 537(1), 128-132. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00109-1
- Andrews, J. (Ed.). (1995). *Peppers, the domesticated capsicums*. Austin: Springer New York.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Apse, M. P., & Blumwald, E. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2247-2254. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.014
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796-815. doi: doi:10.1038/35048692
- Auerswald, H., Schwarz, D., Kornelson, C., Krumbein, A., & Brückner, B. (1999). Sensory analysis, sugar and acid content of tomato at different EC values of the nutrient solution. *Scientia Horticulturae*, 82(3–4), 227–242. doi: 10.1016/S0304-4238(99)00058-8
- Azuma, R., Ito, N., Nakayama, N., Suwa, R., Nguyen, N. T., Larrinaga-Mayoral, J. Á., . . . Saneoka, H. Fruits are more sensitive to salinity than leaves and stems in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, *In Press*, *Corrected Proof*. doi: DOI: 10.1016/j.scienta.2010.04.006

- Azuma, R., Ito, N., Nakayama, N., Suwa, R., Nguyen Tran, N., Larrinaga-Mayoral, J. A., . . . Saneoka, H. (2010). Fruits are more sensitive to salinity than leaves and stems in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, *125*(3), 171-178. doi: 10.1016/j.scienta.2010.04.006
- Bates, D., Maechler, M., & Bolker, B. (2011). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. Retrieved from <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G., Loria, C. M., Vupputuri, S., Myers, L., & Whelton, P. K. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *76*(1), 93-99.
- Beckles, D. M. (2012). Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *63*(1), 129–140. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.05.016
- Beckles, D. M., Craig, J., & Smith, A. M. (2001). ADP-glucose pyrophosphorylase is located in the plastid in developing tomato fruit. *Plant Physiol*, *126*(1), 261-266.
- Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R. D., van der Meer, I. M., & Ric de Vos, C. H. (2005). Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J Agric Food Chem*, *53*(9), 3313-3320. doi: 10.1021/jf047880b
- Benard, C., Gautier, H., Bourgaud, F., Grasselly, D., Navez, B., Caris-Veyrat, C., . . . Genard, M. (2009). Effects of Low Nitrogen Supply on Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruit Yield and Quality with Special Emphasis on Sugars, Acids, Ascorbate, Carotenoids, and Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(10), 4112-4123. doi: 10.1021/jf8036374
- Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., Hansen, T. H., Husted, S., de Vos, R. C. H., Mumm, R., Jonker, H., . . . Moing, A. (2013). Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment - Springer. *Metabolomics*, *9*(1), 57-77. doi: 10.1007/s11306-012-0429-1
- Bieleski, R. L. (1973). Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annual Review of Plant Physiology*, *24*, 225-252. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.001301
- Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., . . . Sumner, L. W. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*, *9*(9), 418-425. doi: 10.1016/j.tplants.2004.07.004
- Blanch, J. S., Sampedro, L., Llusià, J., Moreira, X., Zas, R., & Peñuelas, J. (2012). Effects of phosphorus availability and genetic variation of leaf terpene content and emission rate in *Pinus pinaster* seedlings susceptible and resistant to the pine weevil, *Hyllobius abietis*. *Plant Biology*, *14*(s1), 66-72. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00492.x

- Blumwald, E., & Grover, A. (2006). Salt tolerance. In H. N. (Ed.), *Plant Biotechnology: Current and Future Applications of Genetically Modified Crops* (pp. 206-224). UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., & Jensen, R. G. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell*, 7(7), 1099-1111. doi: 10.1105/tpc.7.7.1099
- Bohnert, H. J., & Shen, B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), 237-260.
- Bosland, P. W., Votava, E. J., & Votava, E. M. (2012). *Peppers: vegetable and spice capsicums* (2 ed.). Wallingford: CABI.
- Botía, P., Navarro, J. M., Cerdá, A., & Martínez, V. (2005). Yield and fruit quality of two melon cultivars irrigated with saline water at different stages of development. *European Journal of Agronomy*, 23(3), 243–253. doi: 10.1016/j.eja.2004.11.003
- Brainerd, E., & Menon, N. (2014). Seasonal effects of water quality: The hidden costs of the Green Revolution to infant and child health in India. *Journal of Development Economics*, 107, 49–64. doi: 10.1016/j.jdeveco.2013.11.004
- Bray, E., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In W. Gruissem, B. Buchanan & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 1158-1249). Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2002). NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 567–584. doi: 10.1078/0176-1617-0774
- Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol*, 173(1), 11-26. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x
- Bundy, J. G., Davey, M. P., & Viant, M. R. (2009). Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 5(1), 3-21. doi: 10.1007/s11306-008-0152-0
- Byrne, S. L., Foito, A., Hedley, P. E., Morris, J. A., Stewart, D., & Barth, S. (2011). Early response mechanisms of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to phosphorus deficiency. *Annals of Botany*, 107(2), 243-254. doi: 10.1093/aob/mcq234
- Cabañero, F. J., Martinez, V., & Carvajal, M. (2004). Does calcium determine water uptake under saline conditions in pepper plants, or is it water flux which determines calcium uptake? *Plant Science*, 166(2), 443-450. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.010
- Carrari, F., Baxter, C., Usadel, B., Urbanczyk-Wochniak, E., Zanon, M. I., Nunes-Nesi, A., . . . Fernie, A. R. (2006). Integrated Analysis of Metabolite and Transcript Levels Reveals the Metabolic Shifts That Underlie Tomato Fruit Development and Highlight Regulatory Aspects of Metabolic Network Behavior. *Plant Physiology*, 142(2), 1380-1396. doi: 10.1104/pp.106.088534
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560. doi: 10.1093/aob/mcn125

- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239-264.
- Chavez, J. (2003). *Análisis de la diversidad dentro y entre especies de Capsicum: opciones para estimar la variación interpoblacional*. Paper presented at the Fundamentos genéticos y socioeconómicos para analizar la agrobiodiversidad en la región de Ucayali, Pucalpa, Perú.
- Cho, J. G., Lee, D. Y., Lee, J. W., Lee, D. G., Lee, Y. H., Kim, S. Y., . . . Baek, N. I. (2014). Acyclic Diterpenoids from the Leaves of *Capsicum annuum*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(2), 128-132. doi: 10.3839/jksabc.2009.024
- Colla, G., Roupahel, Y., Cardarelli, M., & Rea, E. (2006). Effect of salinity on yield, fruit quality, leaf gas exchange, and mineral composition of grafted watermelon plants. *HortScience*, 41(3), 622-627.
- Conforti, F., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*, 102(4), 1096–1104. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.047
- Correll, D. C. (1998). The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2), 261-266. doi: 10.2134/jeq1998.00472425002700020004x
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367-1372. doi: doi:10.1038/nbt.1511
- Cramer, G. R., Ergul, A., Grimplet, J., Tillett, R. L., Tattersall, E. A., Bohlman, M. C., . . . Cushman, J. C. (2007). Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics*, 7(2), 111-134. doi: 10.1007/s10142-006-0039-y
- Cramer, G. R., Läuchli, A., & Polito, V. S. (1985). Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the Plasmalemma of Root Cells. *Plant Physiology*, 79(1), 207-211. doi: 10.1104/pp.79.1.207
- Crespo, P., Bordonaba, J. G., Terry, L. A., & Carlen, C. (2010). Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. *Food Chemistry*, 122(1), 16–24. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.02.010
- Cuartero, J., & Fernandez-Munoz, R. (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), 83-125.
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*, 262(20), 9895-9901.
- De Livera, A. M., Zaloumis, S., & Simpson, J. A. (2014). Models for the analysis of repeated continuous outcome measures in clinical trials. *Respirology*, 19, 155-161. doi: 10.1111/resp.12217

- De Marino, S., Borbone, N., Gala, F., Zollo, F., Fico, G., Pagiotti, R., & Iorizzi, M. (2006). New Constituents of Sweet Capsicum *annuum* L. Fruits and Evaluation of Their Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7508-7516. doi: S0021-8561(06)01404-X
- De Vos, R. C. H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J. B., Bino, R. J., & Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, *2*(4), 778-791. doi: 10.1038/nprot.2007.95
- de-Groot, C. C., van-den-Boogaard, R., Marcelis, L. F. M., Harbinson, J., & Lambers, H. (2003). Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. *Journal of experimental botany*, *544*(389), 1957-1967. doi: 10.1093/jxb/erg193
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, *70*(15), 1621-1637. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.030
- DeWitt, D., & Bosland, P. W. (1996). *Peppers of the world : an identification guide*. Berkeley, Calif.: Ten Speed Press.
- Di Paolo, E., & Rinaldi, M. (2008). Yield response of corn to irrigation and nitrogen fertilization in a Mediterranean environment. *Field Crops Research*, *105*(3), 202-210. doi: 10.1016/j.fcr.2007.10.004
- Dionisio-Sese, M. L., & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, *135*(1), 1-9. doi: 10.1016/s0168-9452(98)00025-9
- Dixon, R. A., Gang, D. R., Charlton, A. J., Fiehn, O., Kuiper, H. A., Reynolds, T. L., . . . Seiber, J. N. (2006). Applications of metabolomics in agriculture. *J Agric Food Chem*, *54*(24), 8984-8994. doi: 10.1021/jf061218t
- Dordas, C. A., & Sioulas, C. (2008). Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. *Industrial Crops and Products*, *27*(1), 75-85. doi: 10.1016/j.indcrop.2007.07.020
- Doroszuk, A., Wojewodzic, M. W., & Kammenga, J. E. (2006). Rapid adaptive divergence of life-history traits in response to abiotic stress within a natural population of a parthenogenetic nematode. *Proc Biol Sci*, *273*(1601), 2611-2618. doi: 10.1098/rspb.2006.3602
- Dunn, W. B., & Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, *24*(4), 285-294. doi: 10.1016/j.trac.2004.11.021
- Ehret, D. L., Redmann, R. E., Harvey, B. L., & Cipywnyk, A. (1990). Salinity-induced calcium deficiencies in wheat and barley - Springer. *Plant and Soil*, *128*(2), 143-151. doi: 10.1007/BF00011103
- Elamin, E. A., Eltilib, M. A., Elnasikh, M. H., Ibrahim, S. H., Elsheikh, M. A., & Babiker, E. E. (2007). Influence of Phosphorus and Potassium Fertilization on Quality of

- Sugar of Two Sugarcane Varieties Grown on Three Soil Series of Sudan. *Agricultural journal*, 2(2), 216-221.
- Ericsson, T. (1995). Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil*, 168-169(1), 205-214. doi: 10.1007/978-94-011-0455-5_23
- Eshbaugh, W. (1993). Peppers: History and Exploitation of a Serendipitous New Crop Discovery. In J. J. a. J. E. Simon (Ed.), *New crops* (pp. 132-139). New York: Wiley.
- Eshbaugh, W. H. (1975). Genetic and biochemical systematic studies of chili peppers (Capsicum Solanaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club.*, 102.
- Evans, J. R., & Poorter, H. (2001). Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell & Environment*, 24(8), 755-767. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00724.x
- FAO. (2014). Food and Agricultural commodities production. *FAOSTAT*. Retrieved February 20, 2014, from <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- Ferrante, A., Spinardi, A., Maggiore, T., Testoni, A., & Gallina, P. M. (2008). Effect of nitrogen fertilisation levels on melon fruit quality at the harvest time and during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(4), 707-713. doi: 10.1002/jsfa.3139
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 48(1-2), 155-171.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C(3) plants. *Plant Biol (Stuttg)*, 6(3), 269-279. doi: 10.1055/s-2004-820867
- Flowers, T. J., & Dalmond, D. (1992). Protein synthesis in halophytes: The influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. *Plant and soil*, 146, 153-161.
- Flowers, T. J., Hajibagheri, M. A., & Clipson, N. J. W. (1986). Halophytes. *The Quarterly Review of Biology*, 61(3), 313-337.
- Flowers, T. J., Troke, P. F., & Yeo, A. R. (1977). The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28, 89-121.
- Forde, B., & Lorenzo, H. (2001). The nutritional control of root development. *Plant and Soil*, 232(1-2), 51-68. doi: 10.1023/A:1010329902165
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2), 35-59. doi: 10.1007/s11104-008-9833-8
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical *Arch Biochem Biophys* (Vol. 247, pp. 1-11). United States.
- Gagneul, D., Ainouche, A., Duhaze, C., Lugan, R., Larher, F. R., & Bouchereau, A. (2007). A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic

- plumbaginaceae *Limonium latifolium*. *Plant Physiol*, 144(3), 1598-1611. doi: 10.1104/pp.107.099820
- García-Sánchez, F., Carvajal, M., Porras, I., Botía, P., & Martínez, V. (2003). Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon. *19*(3), 427-437. doi: 10.1016/S1161-0301(02)00138-7
- Gaskell, S. J. (1998). Electrospray: principles and practice. *Mass Spectrometry*, 32(7), 677-688. doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199707)32:7<677::AID-JMS536>3.0.CO;2-G
- Gastal, F., & Lemaire, G. (2002). N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of experimental botany*, 53(370), 789-799. doi: 10.1093/jexbot/53.370.789
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gioseffi, E., de-Neergaard, A., & Schjoerring, J. K. (2012). Interactions between uptake of amino acids and inorganic nitrogen in wheat plants. *Biogeosciences*, 9(4), 1509-1518. doi: doi:10.5194/bg-9-1509-2012
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Reviews*, 52, 725-749. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.725
- Gong, Q., Li, P., Ma, S., Indu Rupassara, S., & Bohnert, H. J. (2005). Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 44(5), 826-839. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02587.x
- Grattan, S. R., & Grieve, C. M. (1999). Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), 127-157.
- Grieve, A. M., Prior, L. D., & Bevington, K. B. (2007). Long-term effects of saline irrigation water on growth, yield, and fruit quality of 'Valencia' orange trees. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(4), 342-348.
- Guilhaus, M., Mlynski, V., & Selby, D. (1997). Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 11(9), 951-962.
- Guo, K. M., Babourina, O., & Rengel, Z. (2009). Na(+)/H(+) antiporter activity of the SOS1 gene: lifetime imaging analysis and electrophysiological studies on *Arabidopsis* seedlings. *Physiol Plant*, 137(2), 155-165. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01274.x
- Guttman, A., Varoglu, M., & Khandurina, J. (2004). Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. *Drug Discovery Today*, 9(3), 136-144. doi: 10.1016/S1359-6446(03)02972-6
- Gómez, I., Navarro-pedreño, J., Moral, R., Iborra, M. R., Palacios, G., & Mataix, J. (1996). Salinity and nitrogen fertilization affecting the macronutrient content and yield of sweet pepper plants. *Journal of Plant Nutrition*, 19(2), 353-359. doi: Journal of Plant Nutrition, Vol. 19, No. 2, February 1996, pp. 353-359

- Hajiboland, R., Joudmand, A., & Fotouhi, K. (2009). Mild salinity improves sugar beet (*Beta vulgaris* L.) quality. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 59(4), 295-305. doi: Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science, Vol. 59, No. 4, July 2009, pp. 295–305
- Hall, R. D. (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, 169(3), 453-468. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x
- Halvin, J., Beaton, J., Tisdale, S., & Nelson, W. (2005). *Soil Fertility & Fertilizers* (7th Edition ed.). New Jersey: PEARSON EDUCATION.
- Harker, F. R., Gunson, F. A., & Jaaeger, S. R. (2003). The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28(3), 333–347. doi: 10.1016/S0925-5214(02)00215-6
- Haro, R., Banuelos, M. A., Senn, M. E., Barrero-Gil, J., & Rodriguez-Navarro, A. (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast *Plant Physiol* (Vol. 139, pp. 1495-1506). United States.
- Harrison, R., & Webb, J. (2001). A review of the effect of N fertilizer type on gaseous emissions. *Advances in Agronomy*, 73, 65–108. doi: 10.1016/S0065-2113(01)73005-2
- Hasegawa, M., Mitsuhashi, I., Seo, S., Imai, T., Koga, J., Okada, K., . . . Ohashi, Y. (2010). Phytoalexin Accumulation in the Interaction Between Rice and the Blast Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 23(8), 1000-1011. doi: 10.1094/MPMI-23-8-1000
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. B., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2003). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.*, 51, 463-499. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.463
- Haskins, W. E., Petritis, K., & Zhang, J. (2011). MRCQuant- an accurate LC-MS relative isotopic quantification algorithm on TOF instruments. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 74. doi: info:pmid/21406110
- Heiling, S., Schuman, M. C., Schoettner, M., Mukerjee, P., Berger, B., Schneider, B., . . . Baldwin, I. T. (2010). Jasmonate and ppHsystemin Regulate Key Malonylation Steps in the Biosynthesis of 17-Hydroxygeranylinalool Diterpene Glycosides, an Abundant and Effective Direct Defense against Herbivores in *Nicotiana attenuata*. *American Society of Plant Biologists*, 22(1), 273-292. doi: 10.1105/tpc.109.071449
- Higinbotham, N. (1973). Electropotentials of Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 25-46.
- Hoekenga, O. A. (2008). Using metabolomics to estimate unintended effects in transgenic crop plants: problems, promises, and opportunities. *J Biomol Tech*, 19(3), 159-166.
- Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (3rd ed.): John Wiley & Sons, Ltd.
- Holford, I. C. R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*, 35(2), 227-240.

- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., . . . Nishioka, T. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom*, *45*(7), 703-714. doi: 10.1002/jms.1777
- Horie, T., Karahara, I., & Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice*, *5*(1), 11. doi: 10.1186/1939-8433-5-11
- Howell, T. (2001). Enhancing Water Use Efficiency in Irrigated Agriculture. *Agronomy Journal*, *93*(2), 281-289.
- Huang, Y., Tang, R., Cao, Q., & Bie, Z. (2009). Improving the fruit yield and quality of cucumber by grafting onto the salt tolerant rootstock under NaCl stress. *Scientia Horticulturae*, *122*(1), 26-31. doi: 10.1016/j.scienta.2009.04.004
- Huhman, D. V., & Sumner, L. W. (2002). Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry*, *59*(3), 347-360.
- Hunziker, A. (1979). *South American Solanaceae: a synoptic survey*. (Vol. 7). Argentina: Universidad Nacional de Cordoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Izumitani, Y., Yahara, S., & Nohara, T. (1990). Novel acyclic diterpene glycosides, capsianosides A-F and I-V from *Capsicum* plants (Solanaceous studies. XVI). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *38*(5), 1299-1307.
- Jaynes, D. B., Colvin, T. S., Karlen, D. L., Cambardella, C. A., & Meek, D. W. (2001). Nitrate loss in subsurface drainage as affected by nitrogen fertilizer rate. *J Environ Qual*, *30*(4), 1305-1314.
- Johnson, C. D., & Decoteau, D. R. (1996). Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeno pepper plant growth, pod yield, and pungency. *Hortscience*, *31*(7), 1119-1123.
- Johnson, H. E., Broadhurst, D., Goodacre, R., & Smith, A. R. (2003). Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry*, *62*(6), 919-928. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00722-7
- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal Component Analysis*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Jones, H. G., & Jones, M. B. (1989). Plants under stress. Introduction: some terminology and common mechanisms. *Seminar series - Society for Experimental Biology*.
- Kafkafi, U., Valoras, N., & Letey, J. (1982). Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Plant Nutrition*, *5*(12), 1369-1385. doi: Journal of Plant Nutrition, Vol. 5, No. 12, 1982, pp. 1369-1385
- Kashiwagi, T., Horibata, Y., Mekuria, D. B., Tebayashi, S. I., & Kim, C. (2005). Ovipositional deterrent in the sweet pepper, *Capsicum annuum*, at the mature stage against *Liriomyza trifolii* (Burgess). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *69*(C), 739-742.
- Katajamaa, M., & Oresic, M. (2005). Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *Bmc Bioinformatics*, *6*. doi: 179

10.1186/1471-2105-6-179

- Katerji, N., van-Hoorn, J. W., Hamdy, A., & Mastrorilli, M. (2003). Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. *Agricultural Water Management*, 62(1), 37–66. doi: 10.1016/S0378-3774(03)00005-2
- Kaya, C., Kirnak, H., Higgs, D., & Saltali, K. (2002). Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Scientia Horticulturae*, 93(1), 65–74. doi: 10.1016/S0304-4238(01)00313-2
- Kellmann, M., Muenster, H., Zomer, P., & Mol, H. (2009). Full Scan MS in Comprehensive Qualitative and Quantitative Residue Analysis in Food and Feed Matrices: How Much Resolving Power is Required? , 20(8), 1464–1476. doi: 10.1016/j.jasms.2009.05.010
- Keutgen, A., & Pawelzik, E. (2008). Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *107(4)*, 1413–1420. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.071
- Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., . . . Choi, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in Capsicum species. *Nature Genetics*, 46, 270-278. doi: doi:10.1038/ng.2877
- Kim, S., Rodgers, R. P., & Marshall, A. G. (2006). Truly “exact” mass: Elemental composition can be determined uniquely from molecular mass measurement at ~0.1 mDa accuracy for molecules up to ~500 Da. *International Journal of Mass Spectrometry*, 251(Issues 2–3), 260–265. doi: 10.1016/j.ijms.2006.02.001
- Kind, T., & Fiehn, O. (2006). Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, 7, 234. doi: 10.1186/1471-2105-7-234
- Kind, T., & Fiehn, O. (2007). Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 105. doi: info:pmid/17389044
- Kind, T., & Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal Rev*, 2(1-4), 23-60. doi: 10.1007/s12566-010-0015-9
- Kok, E. J., Keijer, J., Kleter, G. A., & Kuiper, H. A. (2008). Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regul Toxicol Pharmacol*, 50(1), 98-113. doi: 10.1016/j.yrtph.2007.09.007
- Kronzucker, H. J., Glass, A. D. M., & Siddiqi, M. Y. (1999). Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. *Plant Physiology*, 120(1), 283-292. doi: 10.1104/pp.120.1.283
- Kusano, M., Redestig, H., Hirai, T., Oikawa, A., Matsuda, F., Fukushima, A., . . . Saito, K. (2011). Covering Chemical Diversity of Genetically-Modified Tomatoes Using Metabolomics for Objective Substantial Equivalence Assessment. *Plos One*, 6(2). doi: e16989

10.1371/journal.pone.0016989

- Laborde, C., & Pozo, C. (1984). *Presente y Pasado del Chile en México* (Vol. 85). México: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
- Lee, J. H., El-Aasr, M., Ikeda, T., Oda, K., Miyashita, H., Yoshimitsu, H., . . . Nohara, T. (2009). Two New Acyclic Diterpene Glycosides from Fruits of Habanero, *Capsicum chinense*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *57*(7), 730-733.
- Lemus, R., Charles Brummer, E., Lee Burras, C., Moore, K. J., Barker, M. F., & Molstad, N. E. (2008). Effects of nitrogen fertilization on biomass yield and quality in large fields of established switchgrass in southern Iowa, USA ☆. *Biomass and Bioenergy*, *32*(12), 1187-1194. doi: 10.1016/j.biombioe.2008.02.016
- Lenz, E. M., Bright, J., R., K., Wilson, I. D., & Major, H. (2004). Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation using high field NMR spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *35*(3), 599-608. doi: 10.1016/j.jpba.2004.02.013
- Li, X. L., Wang, C. R., Li, X. Y., Yao, Y. X., & Hao, Y. J. (2013). Modifications of Kyoho grape berry quality under long-term NaCl treatment. *Food Chemistry*, *139*(Issues 1-4), 931-937. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.038
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Everett, J. R. (1999). NMR Spectroscopy of Biofluids. In G. A. Webb (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Vol. Volume 38, pp. 1-88): Academic Press.
- Loaiza, F., Ritland, K., Laborde, J., & Tanksley, S. (2005). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, *165*, 159-188.
- Loaiza-Figueroa, F., Ritland, K., Laborde-Cancino, J. A., & Tanksley, S. D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, *165*, 159-188.
- Lombardo, V. A., Osorio, S., Borsani, J., Lauxmann, M. A., Bustamante, C. A., Budde, C. O., . . . Drincovich, M. F. (2011). Metabolic Profiling during Peach Fruit Development and Ripening Reveals the Metabolic Networks That Underpin Each Developmental Stage. *Plant Physiol*, *157*(4), 1696-1710. doi: 10.1104/pp.111.186064
- Lou, Y., & Baldwin, I. T. (2003). *Manduca sexta* recognition and resistance among allopolyploid *Nicotiana* host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100* Suppl 2, 14581-14586. doi: 10.1073/pnas.2135348100
- Luengwilai, K., & Beckles, D. M. (2009). Starch Granules in Tomato Fruit Show a Complex Pattern of Degradation. *American Chemical Society*, *57*(18), 8480-8487. doi: 10.1021/jf901593m
- Luengwilai, K., & Beckles, M. D. (2010). Climacteric ethylene is not essential for initiating chilling injury in tomato (*Solanum lycopersicum*) cv. Ailsa Craig. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, *1*(1), 1-8. doi: 4E630D18394

- Lugan, R., Niogret, M. F., Leport, L., Guegan, J. P., Larher, F. R., Savoure, A., . . . Bouchereau, A. (2010). Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J*, *64*(2), 215-229. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04323.x
- Luo, Q., Yu, B., & Liu, Y. (2005). Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *J Plant Physiol*, *162*(9), 1003-1012.
- Lynch, J. (1995). Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, *109*(1), 7-13.
- Lynch, J., & Läuchli, A. (1988). Salinity Affects Intracellular Calcium in Corn Root Protoplasts. *Plant Physiology*, *87*(2), 351-356. doi: 10.1104/pp.87.2.351
- Malamy, J. E., & Ryan, K. S. (2001). Environmental Regulation of Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *127*(3), 899-909. doi: 10.1104/pp.010406
- Malundo, T. M. M., Shewfelt, R. L., & Scott, J. W. (1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, *6*(1-2), 103-110. doi: 10.1016/0925-5214(94)00052-T
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., & Pang, E. (2012). Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future. In P. Ahmad & M. N. V. Prasad (Eds.), *Abiotic stress responses in plants* (pp. 1-19): Springer New York.
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of experimental botany*, *58*(9), 2297-2306. doi: 10.1093/jxb/erm066
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Currents Science*, *80*(6), 2001.
- Moco, S., Bino, R. J., Vorst, O., Verhoeven, H. A., de Groot, J., van Beek, T. A., . . . de Vos, C. H. R. (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*, *141*(4), 1205-1218. doi: 10.1104/pp.106.078428
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B. D., Bläsing, O., . . . S., W.-R. (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell & Environment*, *30*(1), 85-112. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, *25*(2), 239-250.
- Murray, K. K., Boyd, R. K., Eberlin, M. N., Langley, G. J., Li, L., & Naito, Y. (2013). Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry*, *85*(7), 1515-1609. doi: 10.1351/PAC-REC-06-04-06
- Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C., & Martinez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, *96*(1), 66-73. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.057

- Nielsen, K. L., Eshel, A., & Lynch, J. P. (2001). The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 329-339. doi: 10.1093/jexbot/52.355.329
- Niessen, W. M. A. (1998). Advances in instrumentation in liquid chromatography–mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *Journal of Chromatography A*, 794(Issues 1–2), 407–435. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01112-6
- Niu, G., Rodriguez, D. S., Crosby, K., Leskovar, D., & Jifon, J. (2010). Rapid Screening for Relative Salt Tolerance among Chile Pepper Genotypes. *Hortscience*, 45(8), 1192-1195.
- Niu, G. H., Rodriguez, D. S., Call, E., Bosland, P. W., Ulery, A., & Acosta, E. (2010). Responses of eight chile peppers to saline water irrigation. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 215-222. doi: 10.1016/j.scienta.2010.07.016
- Núñez-Ramirez, F., Gonzalez-Mendoza, D., Grimaldo-Juarez, O., & Cervantes Diaz, L. (2011). Nitrogen Fertilization Effect on Antioxidants Compounds in Fruits of Habanero Chili Pepper (*Capsicum chinense*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(5), 827-830.
- Oberg, A. L., & Mahoney, D. W. (2007). Linear Mixed Effects Models. In W. T. Ambrosius (Ed.), *Topics in Biostatistics* (Vol. 404, pp. 213-234). Totowa, N.J.: Humana Press.
- Oldeman, L. R. (1991). The global extent of soil degradation *ISRIC Bi-annual report 1991-1992* (pp. 36). Wageningen, the Netherlands: (s)ISRIC, Wageningen, the Netherlands.
- Oldeman, L. R. (1998). Soil Degradation: A Threat to Food Security? (pp. 15). Wageningen, the Netherlands.
- Oliveira, G. (1995). The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition Mineral Nutrition of Higher Plants. In H. Marschner (Ed.), *Mineral Nutrition of Higher Plants* (second edition ed., pp. 537-595). London UK: Academic Press.
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*, 16(9), 373-378.
- Ondrasek, G., Rengel, Z., Romic, D., & Savic, R. (2012). Salinity decreases dissolved organic carbon in the rhizosphere and increases trace elements phyto-accumulation. *European Journal of Soil Science*, 63(5), 685-693. doi: 10.1111/j.1365-2389.2012.01463.x
- Ondrasek, G., Romic, D., Rengel, Z., Romic, M., & Zovko, M. (2009). Cadmium accumulation by muskmelon under salt stress in contaminated organic soil. *Sci Total Environ*, 407(7), 2175-2182. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.12.032
- Osorio, S., Alba, R., Nikoloski, Z., Kochevenko, A., Fernie, A. R., & Giovannoni, J. J. (2012). Integrative Comparative Analyses of Transcript and Metabolite Profiles from Pepper and Tomato Ripening and Development Stages Uncovers Species-

- Specific Patterns of Network Regulatory Behavior. *Plant Physiol*, 159(4), 1713-1729. doi: 10.1104/pp.112.199711
- Owen, A. G., & Jones, D. L. (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4–5), 651–657. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00209-1
- Parisi, M., Giordano, I., Pentangelo, A., & Villari, G. (2006). Effects of different levels of nitrogen fertilization on yield and fruit quality in processing tomato. *Proceedings of the International Symposium Towards Ecologically Sound Fertilisation Strategies for Field Vegetable Production*(700), 129-132.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Visser, J., Lonhienne, T. G. A., & Schmidt, S. (2012). Past, present and future of organic nutrients. *Plant and Soil*, 359(1-2), 1-18. doi: 10.1007/s11104-012-1357-6
- Peleg, Z., Apse, M. P., & Blumwald, E. (2011). Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era*, 57, 405-443. doi: 10.1016/b978-0-12-387692-8.00012-6
- Petreikov, M., Yeselson, L., Shen, S., Levin, I., Schaffer, A. A., Efrati, A., & Bar, M. (2009). Carbohydrate Balance and Accumulation during Development of Near-isogenic Tomato Lines Differing in the AGPase-L1 Allele. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 134-140.
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 237–243. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00251-0
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 395. doi: info:pmid/20650010
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.R-project.org/>
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 665-693. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.665
- Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot*, 57(5), 1017-1023. doi: 10.1093/jxb/erj108
- Rischer, H., Oresic, M., Seppanen-Laakso, T., Katajamaa, M., Lammertyn, F., Ardiles-Diaz, W., . . . Goossens, A. (2006). Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14), 5614-5619. doi: 10.1073/pnas.0601027103
- Robinson, D. (1994). The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist*, 127(4), 635-674. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02969.x
- Rojas-Cherto, M., Peironcely, J. E., Kasper, P. T., van der Hooft, J. J., de Vos, R. C., Vreeken, R., . . . Reijmers, T. (2012). Metabolite Identification Using Automated

- Comparison of High-Resolution Multistage Mass Spectral Trees. *Analytical Chemistry*, 84(13), 5524-5534. doi: 10.1021/ac2034216
- Roy, S., Khan, M., & Pall, K. (2011). Nitrogen and phosphorus efficiency on the fruit size and yield of Capsicum. *Journal of experimental sciences*, 2(1), 32-37. doi: <http://jexpsciences.com/index.php/jexp/article/view/5389>
- Rubio, J. S., García-Sánchez, F., Rubio, F., & Martínez, V. (2009). Yield, blossom-end rot incidence, and fruit quality in pepper plants under moderate salinity are affected by K⁺ and Ca²⁺ fertilization. *Scientia Horticulturae*, 119(2), 79-87. doi: 10.1016/j.scienta.2008.07.009
- Rubio, J. S., Rubio, F., Martínez, V., & García-Sánchez, F. (2010). Amelioration of salt stress by irrigation management in pepper plants grown in coconut coir dust. *Agricultural Water Management*, 97(10), 1695-1702. doi: 10.1016/j.agwat.2010.05.026
- Ryan, M. H., & Graham, J. H. (2002). Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*, 244(1-2), 263-271. doi: 10.1023/A:1020207631893
- Saito, T., Fukuda, N., Matsukura, C., & Nishimura, S. (2009). Effects of Salinity on Distribution of Photosynthates and Carbohydrate Metabolism in Tomato Grown using Nutrient Film Technique. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(1), 90-96.
- Saito, T., Matsukura, C., Ban, Y., Shoji, K., Sugiyama, M., Fukuda, N., & Nishimura, S. (2008). Salinity stress affects assimilate metabolism at the gene-expression level during fruit development and improves fruit quality in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(1), 61-68. doi: 10.2503/jjshs1.77.61
- Saleh, L., & Plieth, C. (2013). A9C sensitive Cl⁻ - accumulation in *A. thaliana* root cells during salt stress is controlled by internal and external calcium. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6). doi: 10.4161/psb.24259
- Sanchez, D. H., Lippold, F., Redestig, H., Hannah, M. A., Erban, A., Kramer, U., . . . Udvardi, M. K. (2008). Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J*, 53(6), 973-987. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03381.x
- Sanchez, D. H., Siahpoosh, M. R., Roessner, U., Udvardi, M., & Kopka, J. (2008). Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. *Physiol Plant*, 132(2), 209-219. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00993.x
- Sanders, D. (1980). The mechanism of Cl⁻ transport at the plasma membrane of *Chara corallina* L. Cotransport with H⁺ - Springer. *The Journal of Membrane Biology*, 53(2), 129-141. doi: 10.1007/BF01870581
- Scheubert, K., Hufsky, F., & Böcker, S. (2013). Computational mass spectrometry for small molecules. *Journal of Cheminformatics*, 5(1), 1-24. doi: 10.1186/1758-2946-5-12

- Schulte auf'm Erley, G., Kaul, H. P., Kruse, M., & Aufhammer, W. (2005). Yield and nitrogen utilization efficiency of the pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat under differing nitrogen fertilization. *22*(1), 95–100. doi: 10.1016/j.eja.2003.11.002
- Seymour, G., Tucker, G. A., Poole, M., & Giovannoni, J. (2013). *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sharkey, T. D., & Yeh, S. (2001). Isoprene emission from plants. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.407>, *52*, 407-436. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.407
- Shen, B., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1997). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol*, *113*(4), 1177-1183.
- Silva, C., Martinez, V., & Carvajal, M. (2008). Osmotic versus toxic effects of NaCl on pepper plants. *Biologia Plantarum*, *52*(1), 72-79. doi: 10.1007/s10535-008-0010-y
- Smith, C. A., O'Maille, G., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., . . . Siuzdak, G. (2005). METLIN: a metabolite mass spectral database. *The Drug Monit*, *27*(6), 747-751.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*, *78*(3), 779-787. doi: 10.1021/ac051437y
- Smith, F. S. (2001). Sulphur and phosphorus transport systems in plants. *Plant and Soil*, *232*(1-2), 109-118. doi: 10.1023/A:1010390120820
- Steen, I. (1998). Phosphorus availability in the 21st Century: management of a non-renewable resource. *Phosphorus and Potassium*(217), 25-31.
- Storey, J. D., & Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, *100*(16), 9440-9445. doi: 10.1073/pnas.1530509100
- Sturm, M., Bertsch, A., Gröpl, C., Hildebrandt, A., Hussong, R., Lange, E., . . . Kohlbacher, O. (2008). OpenMS – An open-source software framework for mass spectrometry [Software]: BioMed Central Ltd. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/163>
- Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, *62*(6), 817-836.
- Syers, J. K., Johnston, A. E., & Curtin, D. (2008). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: reconciling changing concepts of soil phosphorus behavior with agronomic information. *Fertilizer and plant nutrition bulletin* (pp. 63). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Sze, H., Li, X. H., & Palmgren, M. G. (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, *11*(4), 677-689.
- Taiz, L. (1992). The plant vacuole. *J Exp Biol*, *172*(1), 113-122.

- Tautenhahn, R., Böttcher, C., & Neumann, S. (2008). Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 504. doi: info:pmid/19040729
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot*, *91*(5), 503-527.
- Tholl, D., & Lee, S. (2011). *Terpene Specialized Metabolism in Arabidopsis thaliana* (Vol. 9): American Society of Planta Biologists.
- Tolstikov, V. V., Lommen, A., Nakanishi, K., Tanaka, N., & Fiehn, O. (2003). Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal Chem*, *75*(23), 6737-6740. doi: 10.1021/ac034716z
- Urrea-López, R., Díaz de la Garza, R. I., & Valiente-Banuet, J. I. (2014). Effects of substrate salinity and nutrient levels on physiological response, yield and fruit quality of habanero pepper. *HortScience*, *49*(6), 1-7.
- Vaidyanathan, S., Kell, D. B., & Goodacre, R. (2002). Flow-injection electrospray ionization mass spectrometry of crude cell extracts for high-throughput bacterial identification. *I3*(2), 118-128. doi: 10.1016/S1044-0305(01)00339-7
- Van der Hooft, J. J., Vervoort, J., Bino, R. J., & de Vos, R. C. (2012). Spectral trees as a robust annotation tool in LC-MS based metabolomics. *Metabolomics*, *8*(4), 691-703. doi: 10.1007/s11306-011-0363-7
- Votava, E., Nabhan, G., & Bosland, P. (2004). Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an in situ population and ex situ accessions of chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics*, *3*, 123-129.
- Wagner, C., Sefkw, M., & Kopka, J. (2003). Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry*, *62*(6), 887-900. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00703-3
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & 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*(11-12), 1358-1370. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.03.016
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Tikunov, Y., de Vos, R. C., Pelgrom, K. T. B., Maharijaya, A., . . . Bovy, A. G. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, *9*(1), 130-144. doi: 10.1007/s11306-012-0432-6
- Wahyuni, Y., Stahl-Hermes, V., Ballester, A. R., de Vos, R. C., Voorrips, R. E., Maharijaya, A., . . . Bovy, A. G. (2014). Genetic mapping of semi-polar metabolites in pepper fruits (*Capsicum* sp.): towards unravelling the molecular regulation of flavonoid quantitative trait loci - Springer. *Molecular Breeding*, *33*(3), 503-518. doi: 10.1007/s11032-013-9967-0

- Wang, F., Sanz, A., Brenner, M. L., & Smith, A. (1993). Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiol*, *101*(1), 321-327.
- Wang, X., Sun, H., Zhang, A., Wang, P., & Han, Y. (2011). Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies. *J Sep Sci*, *34*(24), 3451-3459. doi: 10.1002/jssc.201100333
- Wang, Y., & Frei, M. (2011). Stressed food - The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture Ecosystems & Environment*, *141*(3-4), 271-286. doi: 10.1016/j.agee.2011.03.017
- Watkins, S. M., & German, J. B. (2002). Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(5), 512-516. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00363-4
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: A review. *Annals of Botany*, *88*(6), 967-988. doi: 10.1006/anbo.2001.1540
- Widodo, Patterson, J. H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A., & Roessner, U. (2009). Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J Exp Bot*, *60*(14), 4089-4103. doi: 10.1093/jxb/erp243
- Wolf-Rüdiger, S., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., . . . Stitt, M. (2004). Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of *Arabidopsis* in Response to Nitrogen. *Plant Physiology*, *136*(1), 2483-2499. doi: 10.1104/pp.104.047019
- Yamaki, S. (2010). Metabolism and accumulation of sugars translocated to fruit and their regulation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *79*(1), 1-15.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*, *208*(15), 2819-2830. doi: 10.1242/jeb.01730
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., . . . Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type IH⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, *5*(6), 735-745. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00281.x
- Yao, X., Peng, Y., Xu, L. J., Li, L., Wu, Q. L., & Xiao, P. G. (2011). Phytochemical and biological studies of *Lycium* medicinal plants. *Chemistry & biodiversity*, *8*(6), 976-1010. doi: 10.1002/cbdv.201000018
- Yin, Y.-G., Kobayashi, Y., Sanuki, A., Kondo, S., Fukuda, N., Ezura, H., . . . Matsukura, C. (2010). Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany*, *61*(2), 563-574. doi: 10.1093/jxb/erp333

- Zhang, Z., Wang, L., Huang, S., Xing, L., & Wang, L. (2010). *Effect of Cl-Stress on Photosynthetic, Chlorophyll Fluorescence Characters and Chloroplast Ultra-Structure of Watermelon Seedlings*. Paper presented at the IV International Symposium on Cucurbits.
- Zhu, B., Lu, Y. Q., Zhang, X. Z., Wang, Y., Liu, H. P., & Han, Z. H. (2014). Reduced late-season leaf potassium and phosphorus levels influence decreases in sugar contents of bagged apple fruit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1-8. doi: 10.1007/s11738-014-1533-9

ANEXOS

ANEXO. Sobre-expresión de AVP1 en plantas de chile habanero

Resumen

Se construyeron dos vectores binarios (pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1) para la sobre-expresión heteróloga del gen AVP1 en plantas, relacionado con el aumento de tolerancia a condiciones de estrés abiótico por sequía, salinidad y déficit de macronutrientes. Los cassettes de expresión se diseñaron y sintetizaron para permitir el estudio del efecto de la regulación de la expresión del gen AVP1 bajo condiciones de estrés (TsVP1_{Pro}) y sin ellas (UBQ10_{Pro}). Los cassettes fueron clonados en pCAMBIA1300, mediante el uso de diferentes técnicas de biología molecular y microbiología. La secuenciación de los cassettes arrojó disparidad en una base en la región del promotor de cada cassette, el análisis bioinformático de la secuenciación mostró la aparición de un *motivo* relacionado con respuesta y defensa a estrés en UBQ10_{Pro} que no se espera que afecte su expresión constitutiva. pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1 se clonaron en cepas de *Agrobacterium* EHA105 y se utilizaron para transformación *in planta* con vacío en plántulas de chile habanero var. Naranja. Sin embargo, la recalcitrancia del género *Capsicum* se hizo evidente en la baja supervivencia de plántulas al protocolo de transformación, 39 %, y en la no segregación del gen AVP1 en la generación T₁ obtenidas a partir de semillas de las plantas T₀.

Introducción

Los cultivos mejorados por ingeniería genética tienen el potencial de contribuir de forma decisiva en incrementar la producción de alimentos para satisfacer las necesidades del aumento de una población mundial, que durante el siglo XX se triplicó hasta 6,000 millones de habitantes, se proyecta aumente hasta 9,000 millones para el 2050 (UN, 2010),

y que según estimaciones de la FAO demandara un aumento en la producción de alimentos de hasta un 70 % en las dos siguientes décadas (FAO, 2009). Dicho aumento se deberá lograr en la misma extensión de tierras con aptitud agrícola disponibles en la actualidad, las cuales han sido sometidas por años a degradación antrópica (Oldeman, 1991), y han enfrentado condiciones de cambio climático y suministros de agua limitados, estos últimos factores abióticos que ejercen un importante efecto negativo sobre la agricultura (Battisti & Naylor, 2009).

La tolerancia de un estrés abiótico, como por ejemplo la sequía, está definida como la habilidad de la planta para crecer y reproducirse satisfactoriamente con suministro limitado de agua o bajo condiciones de déficit de agua (Turner, 1979), el objetivo de las diferentes aproximaciones de aumento de tolerancia a estrés abiótico buscan que bajo condiciones de estrés la planta continúe creciendo y produzca cosechas de alto rendimiento.

Con el fin de lograr cultivos tolerantes tanto a sequía como salinidad se han realizado esfuerzos a través de mejoramiento tradicional, y algunas aproximaciones biotecnológicas (Selección *in vitro*), los cuales han producido escasos resultados para tolerancia a salinidad en cultivos agrícolas (Flowers, 2004; Yamaguchi & Blumwald, 2005).

Diferentes estrategias de ingeniería genética se han probado para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés salino, entre ellas el uso de genes que participan en osmoregulación, en mitigación del daño oxidativo, en balance iónico, y en regulación y señalización (ver (Peleg, Apse, & Blumwald, 2011). También se han probado estrategias para aumentar la eficiencia en el uso de N (López-Arredono, Leyva-González, Alatorre.cobos, & Herrea-estrella, 2013; Xu, Fan, & Miller, 2012) y P (Ha & Tran, 2013).

En años recientes la fisiología vegetal y la genómica funcional han generado nuevo conocimiento y herramientas útiles en el mejoramiento vegetal permitiendo identificar y caracterizar genes que codifican proteínas con actividad enzimática, o funciones estructurales o reguladoras relacionadas con la respuesta de las plantas a condiciones de estrés (Amudha & Balasubramani, 2011), su expresión tanto en organismos modelo como en cultivos han permitido caracterizar su utilidad, y en algunos casos desarrollar productos que han aprobado rigurosos procesos de acreditaciones oficiales para llegar a su comercialización, como es el caso de una variedad de maíz transgénico tolerante a estrés hídrico, MON 87460 de Monsanto, obtenida mediante la expresión de una proteína de shock por frío, una chaperona molecular derivada de *Bacillus subtilis* (Castiglioni et al., 2008; Harrigan et al., 2009) y disponible desde finales de 2011, con lo que se da inicio a la segunda generación de cultivos transgénicos, detrás de los cultivos tolerantes a herbicidas y resistentes a insectos y algunos a virus.

En la actualidad, son pocos los casos exitosos de aplicaciones biotecnológicas de aumento en tolerancia a estrés con un incremento simultáneo en productividad, aunque las estrategias biotecnológicas presentan avances importantes en la identificación, caracterización y aplicación de diferentes genes en una amplia gama de plantas para aumentar la tolerancia a condiciones de estrés abiótico (ver (Reguera, Peleg, & Blumwald, 2012).

Las plantas ante episodios de estrés moderados presentan una reducción en su crecimiento (Skirycz et al., 2011), lo cual es perjudicial para la producción agrícola, en especial por la necesidad de satisfacer la demanda de una población cada vez mayor. Entre las aplicaciones biotecnológicas que reportan aumento en tolerancia a estrés y aumento en productividad hay tres para sequía: una en maíz (Castiglioni et al., 2008; Nelson et al., 2007), una en arroz (Hu et al., 2006; Kim & Kim, 2009) y una en cacahuete (Qin et al.,

2011); y dos para salinidad: una en maíz (B. Li, Wei, Song, Li, & Zhang, 2008) y una en algodón (Pasapula et al., 2011).

Los dos casos de tolerancia a salinidad se lograron mediante la sobre-expresión del gen codificante de la proteína de membrana V-H⁺-pPasa tipo 1 de *Arabidopsis* (AVP1), una de las cuatro diferentes tipos de bombas de H⁺ vegetal, cuya función es transportar H⁺ a través de membrana, usando pirofosfato (PP_i) como fuente de energía, para generar un gradiente electroquímico de protones que puede ser utilizado para energizar antiportadores (e.g., Na⁺/H⁺) (Gaxiola, Fink, & Hirschi, 2002), que confiere tolerancia a sequía y salinidad (Gaxiola et al., 2001), a déficit de P (Yang et al., 2007), y de N (Paez-Valencia et al., 2013).

El uso de AVP1 incrementa tolerancia a sequía y salinidad en plantas a través del ajuste iónico y osmótico, mediante el aumento de la concentración de iones (Gaxiola, Palmgren, & Schumacher, 2007) y azúcares (Shiratake, Kanayama, Maeshima, & Yamaki, 1997) en las vacuolas, lo que incrementa la presión osmótica vacuolar, disminuyendo el potencial hídrico y la concentración citoplásmica de Na⁺ (Gaxiola et al., 2001). La sobre-expresión de AVP1 aumenta la acumulación de solutos en vacuola resultando en un aumento en la retención de agua de las células, así como una mayor turgencia evidenciada a través de micrografías electrónicas en hojas de tabaco (Arif, Zafar, Arif, & Blumwald, 2013). AVP1 fue aislada en principio de tonoplasto (Maeshima, 2001), sin embargo, su localización se ha confirmado también en membrana plasmática (Alexandersson, Saalbach, Larsson, & Kjellbom, 2004).

La mayor tolerancia a condiciones de estrés por deficiencias de N y P, al sobre-expresar AVP1 se da por un aumento de la actividad de H⁺-ATPasa de membrana plasmática en la rizósfera (Paez-Valencia et al., 2013; Yang et al., 2007), que al acidificar

el suelo contribuye a la captación de los nutrientes. Adicionalmente AVP1 ha demostrado aumentar tolerancia a frío al sobre-expresarla en plantas de arroz, lo cual se sugiere puede estar relacionado con un incremento en la integridad de la membrana celular, la disminución en contenido de malondialdehído y una mayor acumulación de prolina (Zhang, Li, Wang, & Chen, 2011).

En *Arabidopsis* sobre-expresoras de AVP1 también aumenta la producción y área de las hojas (40 % a 60 %) como resultado de un incremento en el flujo de auxinas en un 50 % (Gonzalez et al., 2010), y un mayor número de células (Gonzalez et al., 2010; J. S. Li et al., 2005). Dicho aumento en cantidad y superficie de las hojas aumenta por consiguiente la absorción de luz solar y eficiencia fotosintética y se cree puede favorecer una mayor biomasa (Zhu, Long, & Ort, 2010).

Recientemente se ha propuesto que la mayor biomasa puede deberse a que una mayor actividad de AVP1 en membrana plasmática de tubos cribosos y células acompañantes contribuye a energizar el floema favoreciendo su recarga y el transporte a largas distancias de foto-asimilados desde la fuente hasta tejidos de reserva, facilitando de esta manera el crecimiento, la adquisición de nutrientes y el mantenimiento del balance hídrico (Fuglsang, Paez-Valencia, & Gaxiola, 2011; Paez-Valencia et al., 2011).

El efecto de AVP1 ya ha sido evaluado en pruebas de campo en plantas transgénicas de algodón durante dos años seguidos, resultando en una mayor tolerancia a sequía y salinidad, así como en mayor producción de fibra (Pasapula et al., 2011), lo cual da una muy buena impresión de su utilidad dadas las dificultades propias de las pruebas de campo como son el mayor número de variables temporales y espaciales (Rengasamy, 2006), lo que hace a AVP1 uno de los genes candidatos a ser utilizados en estrategias comerciales de tolerancia a estrés abiótico.

AVP1 ha demostrado no solamente ser útil en la protección de plantas a condiciones de estrés durante periodo vegetativo, sino también durante el periodo de fructificación. En plantas de tomate silvestres y sobre-expresoras de AVP1, estas últimas sobrevivieron a condiciones de alta salinidad (200 mM de NaCl) y produjeron frutos y semillas viables, aunque su número por planta y su peso se redujo en comparación a condiciones de No-estrés (Bhaskaran & Savithramma, 2011), y los frutos no tuvieron efectos negativos de acumulación de metales tóxicos (Park et al., 2005). En plantas de algodón sobre-expresoras de AVP1 la producción de fibra aumenta en un 20 % bajo condiciones de sequía en pruebas de campo, y bajo condiciones de No-estrés salino no presenta diferencias significativas con las silvestres en biomasa verde, biomasa seca, número de cápsulas y producción de fibra (Pasapula et al., 2011).

La sobre-expresión de AVP1 impacta positivamente los parámetros de rendimiento y calidad de los frutos de las plantas sometidas o no a estrés por deficiencia de P. En plantas de tomate aumenta el número de frutos además de biomasa aérea y radicular, sin afectar las plantas silvestres bajo condiciones óptimas de nutrientes (Yang et al., 2007). En plantas de arroz impacta positivamente el rendimiento al aumentar en un 50 % la producción de grano, y también la calidad nutricional al aumentar el contenido de P, hierro y zinc en los granos bajo condiciones óptimas de fertilización (Yang et al., 2007). Las V-H⁺-pPasas en frutos participan en la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos en la vacuola. (Venter, Groenewald, & Botha, 2006).

El problema de reducción de crecimiento en organismos transgénicos tolerantes a estrés abiótico, puede estar relacionado con el uso de promotores inadecuados (Kasuga, Liu, Miura, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 1999; Y. Wang et al., 2009). En las plantas diversos factores pueden influir en la expresión genética, pero es la región corriente arriba del inicio de transcripción (promotor), el primer regulador de la expresión genética a

nivel transcripcional, por lo que forma parte fundamental en la estrategia de ingeniería genética junto con el gen a sobre-expresar en plantas transgénicas.

El promotor más comúnmente utilizado para regular la expresión en organismos transgénicos de forma constitutiva es el promotor del gen del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S (Bhullar, Datta, & Burma, 2011), un promotor constitutivo fuerte que garantiza la transcripción continua y elevada del transgen (Odell, Nagy, & Chua, 1985), el cual presenta mayor actividad en plantas dicotiledóneas (Batraw & Hall, 1990; Benfey, Ren, & Chua, 1990), y mucho menor en monocotiledóneas (Christensen, Sharrock, & Quail, 1992; Weeks, Anderson, & Blechl, 1993).

Sin embargo, su uso puede impactar negativamente las plantas porque genera una elevada carga metabólica que demanda un alto consumo de energía (Hirayama & Shinozaki, 2010; Kasuga et al., 1999), que puede alterar la bioquímica y fisiología de la planta (Glick, 1995), y conducir a esterilidad, retraso en el desarrollo, morfología anormal, pérdida de rendimiento, cambios en composición de la semilla o silenciamiento del transgén (Kasuga et al., 1999; Liu, Srivastava, & Howell, 2008; Matzke, Mette, & Matzke, 2000; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005).

En la naturaleza las plantas controlan temporal y espacialmente la expresión de sus genes, mientras que en una aplicación biotecnológica con un promotor constitutivo no existe este control, por lo que al momento de caracterizar un gen se puede distorsionar la contribución individual de cada tipo de célula en el mecanismo de tolerancia, sobre todo si se considera que la respuesta a estrés es específica para el estado de desarrollo de la planta, tejido y tipo de célula (Hummel et al., 2010), más aún si se tiene en cuenta que las plantas tienen aproximadamente 40 tipos diferentes de células (Martin, Bhatt, & Baumann, 2001), las cuales varían en rol fisiológico, y abundancia (Galbraith & Birnbaum, 2006).

Un área de oportunidad de las estrategias biotecnológicas de tolerancia a estrés abiótico, es mejorar el control de expresión de los genes, por medio de la utilización de promotores específicos, o promotores inducibles (Umezawa, Fujita, Fujita, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 2006), que permitan controlar de una manera más fina su expresión temporal y espacial. Hasta la fecha solo se ha reportado un promotor híbrido que responde a diferentes estreses abióticos (Hou et al., 2012).

En soya se ha aumentado tolerancia a sequía sobre-expresando la L-Delta¹-pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR), regulada por un promotor inducible por calor (De Ronde, Cress, Krüger, Strasser, & Van Staden, 2004; De Ronde, Laurie, Caetano, Greyling, & Kerepesi, 2004). En *Thellungiella halophila*, una familiar cercana de *Arabidopsis* (Taji et al., 2008; Z. I. Wang et al., 2004), mediante la comparación de la respuesta a estrés por sal a nivel del transcriptoma, se han identificado diferentes genes regulados de forma diferencial, varios relacionados con el transporte de Na⁺ (Gao et al., 2006; Oh et al., 2009), entre ellos TsVP1 un ortólogo de AVP1.

La regulación diferencial de TsVP1 puede deberse a su promotor por lo que mediante el análisis de diferentes mutantes con deleciones en la región 5' del promotor de TsVP1 (TsVP1_{Pro}), con y sin estrés salino se identificaron elementos potenciadores de los niveles de expresión, así como una región responsable de la respuesta a estrés por sal (Sun, Gao, Zhao, Li, & Zhang, 2010), demostrando el potencial del TsVP1_{Pro} en la regulación de la expresión heteróloga de genes relacionados con el aumento de tolerancia a estrés salino.

Un objetivo de este trabajo fue el de transformar plantas de *Capsicum* con el gen AVP1, regulando su expresión por un promotor inducible a salinidad y otro constitutivo de nivel de expresión bajo, para caracterizar sus niveles de expresión y su respuesta fenotípica, bajo condiciones óptimas y condiciones de estrés abiótico (salinidad, deficiencia de P y N),

utilizando como prueba de concepto plantas de chile habanero mediante transformación *in-planta* con vacío.

Metodología

Construcción de cassettes de expresión de AVP1

Con el fin de caracterizar molecular y fenotípicamente el efecto de la expresión constitutiva AVP1 a un nivel bajo en chile habanero, versus su expresión inducida por salinidad, se diseñaron dos cassettes de expresión de AVP1 variando únicamente el promotor. El primer cassette (pUBQ10-AVP1), está compuesto por la secuencia del promotor de la ubiquitina 10 (UBQ10_{Pro}) un promotor constitutivo de nivel de expresión bajo, GenBank HQ693235.1 (Grefen et al., 2010); seguido por una secuencia consenso líder en plantas de 6 nucleótidos (TAAACA), antes del codón de inicio de AVP1 que ayuda a amplificar la expresión de la proteína recombinante (Koziel, Carozzi, & Desai, 1996); el marco abierto de lectura del gen AVP1, GenBank NM 101437 (Sarafian, Kim, Poole, & Rea, 1992); y un terminador correspondiente a la región no codificante 3'poliA de la nopalin sintasa, GenBank AF234312.1, un terminador utilizado en vectores pCAMBIA y usado en pruebas de caracterización de AVP1 (Sun et al., 2010).

Con el fin de tener la flexibilidad de mover los componentes del cassette se incluyó al inicio y final del promotor, al final de AVP1 y al final del terminador la secuencia de enzimas de restricción que producen bordes escalonados, definidos previamente con la herramienta de acceso libre NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze, Posfai, & Roberts, 2003), con la misma herramienta se definieron las endonucleasas necesarias así como los protocolos de digestión enzimática para retirar componentes, y tamizajes de los siguientes pasos. El cassette fue construido por síntesis química (proyecto

147582-2, GenScript, New Jersey, USA) y se recibió en el vector pUC57 con tolerancia a ampicilina (pUC57:UBQ10_{Pro}:AVP1:tnos) (Fig. 1A).

El segundo cassette (pTsVP1-AVP1), fue igualmente obtenido por síntesis química (proyecto 147582-1, GenScript, New Jersey, USA) a partir de la secuencia del promotor inducible por salinidad (TsVP1_{Pro}) identificado como promotor de un ortólogo de AVP1 en una especie halófila, GenBank GU253905 (Sun et al., 2010), este también fue recibido en el vector pUC57 (pUC57:TsVP1_{Pro}) (Fig.1B).

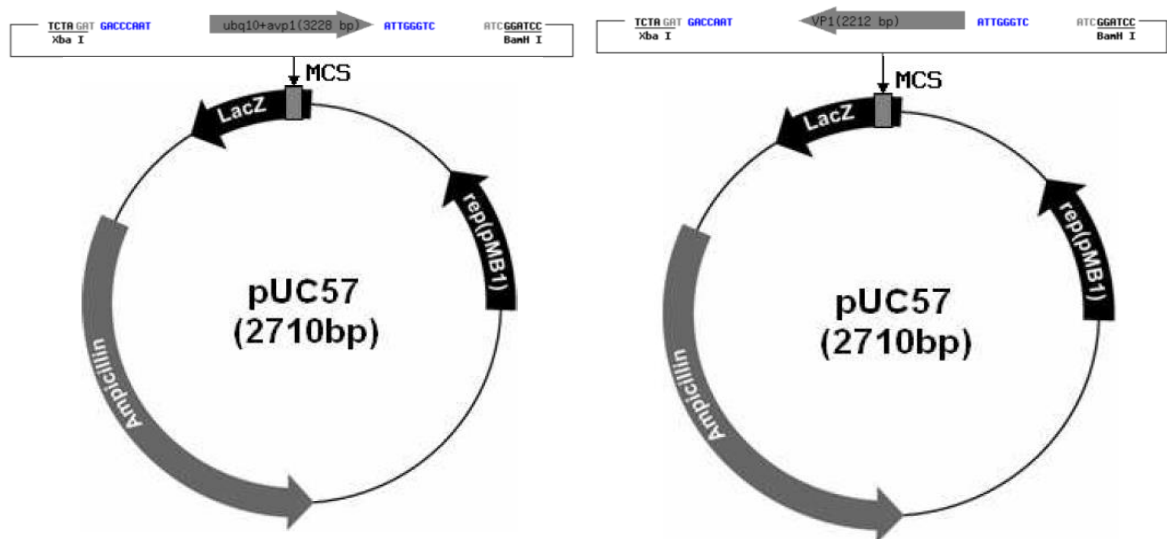


Fig. 1 Mapa de cassettes obtenidos por síntesis química (GenScript) pUC57:UBQ10_{Pro}:AVP1:tnos (A) y pUC57:TsVP1_{Pro} (B).

Durante todo el proceso siguiente de construcción y amplificación del vector se utilizó la bacteria *Escherichia coli* ElectroMAX Stbl4 (Invitrogen, California, USA), por su capacidad para integrar vectores de gran tamaño. *E. coli* fue crecida en medio de cultivo

Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) a 30 °C. Tanto para el cultivo bacteriano, como para la manipulación de DNA y purificación de plásmidos se usaron técnicas estándar (Sambrook & Russell, 2001).

Una vez recibidos los cassettes pUC57:UBQ10_{Pro}:AVP1:tnos y pUC57:TsVP1_{Pro} se resuspendieron por separado en agua libre de nucleasas y se clonaron por electroporación en *E. coli*, utilizando alícuotas frías de 50 µl de *E. coli* electrocompetentes que se mezclaron con 1 µl de ADN en celdas de 0,2 cm (cat. 165-2082 BioRad, California, USA), y se sometieron a un pulso eléctrico usando el Xcell Gene Pulser (cat. 165-2660 BioRad, California, USA), favoreciendo la distensión de la membrana y el ingreso del plásmido en las bacterias y usando protocolo preestablecido para bacteria (2500 V, 25 µF, 200 Ω). Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1ml de LB y se incubó con agitación por 1 h para favorecer la recuperación de las células; después se sembró en caja petri con LB-agar suplementada con ampicilina (50 µg·ml⁻¹), y se incubó por 16 h.

Las colonias crecidas se cultivaron en LB por 16 h para purificar ADN plásmidico, siguiendo protocolo de lisis alcalina de Miniprep de Sambrook; el ADN se sometió a digestión enzimática (New England Biolabs, Massachusetts, USA), para evaluar por patrón de bandeo del plásmido digerido, y separado de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio, usando foto-documentador (Chemidoc XRS, BioRad, California, USA), con el fin de identificar las colonias que integraron los plásmidos transferidos por electroporación. De las colonias identificadas se preparó un respaldo en glicerol que se almacenó a -80 °C y de este se amplificó el vector para los siguientes pasos.

Construcción de vectores pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1

Se utilizó el plásmido pCAMBIA1300 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>), vector binario derivado del vector pPZP (Hajdukiewicz, Svab, & Maliga, 1994), porque es un vector de selección mínimo que no tiene gen reportero, con sitio múltiple de clonación pUC18, que puede ser utilizado con *Agrobacterium* en estrategias de transformación vegetal. también cuenta con el gen de selección en plantas higromicina fosfotransferasa (*hpt*) que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Gritz & Davies, 1983) ante la imposibilidad de utilizar el gen de neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, dado que se ha observado que explantes de *Capsicum* exhiben resistencia intrínseca a kanamicina, mientras que el uso del gen *hpt* en Chile es más eficiente al reducir el número de falsos positivos (Ko, Soh, Kim, & Kim, 2007).

El cassette UBQ10_{Pro}:AVP1:tnos (inserto) fue transferido a pCAMBIA1300 (vector), para ello se empezó extrayendo el inserto de pUC57:UBQ10_{Pro}:AVP1:tnos usando las enzimas SalI y KpnI y linearizando el vector con las mismas enzimas; luego se trató el vector con fosfatasa alcalina (Cat.9PIM820, Promega, Wisconsin, USA), una enzima hidrolasa que desfosforila el extremo 5' de ADN evitando su religación; los productos de los cortes enzimáticos se separaron de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa y las bandas correspondientes al tamaño del inserto y del vector se purificaron con un kit (Cat. A9281, Promega, Wisconsin, USA), que utiliza columnas de afinidad de sílica a las que se une el ADN en presencia de sales caotrópicas.

El ADN del inserto y el vector purificados a diferentes proporciones de vector:inserto fueron sometidos a ligación con T4-ADN ligasa (Cat.M1801, Promega, Wisconsin, USA), una enzima que cataliza la formación de enlaces covalentes entre los extremos 5' y 3' de ADN, y se incubaron por 16 h a 14 °C. El producto de ligación se

corrió por electroforesis en gel de agarosa para verificar, de acuerdo a cambio en el patrón de bandeo, la actividad de la ligasa; las proporciones de vector:inserto que de acuerdo con el gel presentaron actividad de la ligasa, se clonaron en *E. coli* siguiendo protocolo de electroporación anteriormente descrito, cambiando a kanamicina ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) el antibiótico de selección.

Las colonias tolerantes a kanamicina fueron tamizadas para identificar aquellas que incorporaron adecuadamente el cassette (pUBQ10-AVP1), para ello se usaron diferentes endonucleasas evaluando el patrón de bandeo en gel de agarosa, como se describió anteriormente; también se evaluó la presencia del inserto mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando polimerasa GoTaq (Cat. M3005, Promega, Wisconsin, USA) y primers: UBQ10-UP (5'-ctttgcgtgtaaacaacgctca-3') y UBQ10-Down (5'-accttctcttctcgcattaga-3'). Para el diseño de los primers se utilizó el software de acceso libre OligoAnalyzer IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

De las colonias PCR positivas (PCR +) que incorporaron correctamente el cassette UBQ10_{Pro}:AVP1:tnos en pCAMBIA1300 (pUBQ10-AVP1 de aquí en adelante), se elaboró respaldo en glicerol y almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

A partir de pUBQ10-AVP1 se construyó el segundo vector binario pTsVP1-AVP1 reemplazando UBQ10_{Pro} por TsVP1_{Pro}, aplicando las mismas técnicas descritas anteriormente y utilizando para el tamizaje los primers TsVP1-UP (5'-gcacacacattgaatccctca-3') y TsVP1-Down (5'- ccaaagagagccatggaaga-3').

Finalmente se confirmó la secuencia de pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1 por pruebas de secuenciación (Eton-Biosciences, Inc., California, USA), dado que el proceso de secuenciación produce resultados confiables de extensión de 900 a 1000pb, se elaboraron

varios sets de primers de acuerdo a la secuencia predicha iniciando en pCAMBIA1300 corriente arriba al sitio SalI y terminando en pCAMBIA1300 corriente abajo del sitio KpnI, los resultados de las secuencias de las dos hebras de ADN se analizaron por alineamiento con el software de acceso libre MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988). Para confirmar datos sospechosos se revisaron los electroferogramas de cada segmento secuenciado con el software libre Chromas LITE (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

Transformación de Agrobacterium

La transformación utilizando *Agrobacterium* se llevó a cabo aprovechando la capacidad natural de esta bacteria de introducir una porción de su ADN (T-ADN) en el genoma nuclear de las plantas. La maquinaria necesaria para llevar a cabo esta transferencia reside en el plásmido inductor de tumores (Ti), el cual en las cepas silvestres incluye el T-ADN, flanqueado por 25 bp a cada lado conocidas como borde izquierdo y derecho (LB and RB, por sus siglas en inglés), y los ~35 genes de virulencia (*vir*), cuya acción coordinada permite la transferencia de T-ADN. El procedimiento de transformación se basa en una estrategia de vectores binarios utilizando una cepa de *Agrobacterium* desarmada, que conserva el plásmido Ti con la región *vir* pero carece de la región T-ADN, la cual se incorpora en un segundo plásmido (Hoekema, Hirsch, Hooykaas, & Schilperoort, 1983). En el caso de este estudio ese segundo plásmido T-ADN corresponde a pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1.

Para la transformación de las plantas se utilizó la cepa de *Agrobacterium* EHA105 (Hood, Gelvin, Melchers, & Hoekema, 1993), tolerante a rifampicina que contiene el plásmido desarmado Ti, el cual tiene la región *vir* que carece de la región T-ADN, y que ha

sido previamente utilizada en transformación *in planta* de *Capsicum* (Manoj, Reddy, Sreevathsa, Ganeshan, & Udayakumar, 2009).

La técnica de transformación de *Agrobacterium* se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata de la unidad de Biotecnología del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), durante el mes de mayo de 2012. Tanto para el cultivo bacteriano, como para la manipulación de DNA y purificación de plásmidos se usaron técnicas estándar (K. Wang, 2006). El *Agrobacterium* fue crecido en medio de LB (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en oscuridad, a 28 °C, porque a temperaturas más altas como 37 °C se corre el riesgo de perder el mega-plásmido que determina la virulencia (Hamilton & Fall, 1971).

Los vectores binarios pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1, por separado, se clonaron por choque térmico (K. Wang, 2006), en células competentes de *Agrobacterium* EHA105 usando alícuotas congeladas de 100 µl de EHA105 suspendidas en 20 mM de CaCl₂, a las que se les añadió 1 µg de ADN de pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1 por separado, se mezcló y se congeló sumergiendo el tubo en nitrógeno líquido por 5 min; se dejaron descongelar por 10min, se añadió 2 ml de medio de cultivo y se incubó con agitación por 4 h; se recuperaron las células por centrifugación (11,000 rpm, 1 min); se re-suspendieron en 100 µl de LB, se sembraron en caja Petri con rifampicina y kanamicina (50 µg·ml⁻¹ de cada uno) y se incubaron de 2 a 4 días hasta que aparecieron las colonias. Después esas colonias tolerantes fueron tamizadas por prueba de PCR y con primers anteriormente descritos. Una vez identificadas las cepas con el plásmido integrado se preparó un respaldo en glicerol y almacenó a -80 °C, para ser posteriormente usadas en la transformación vegetal.

Transformación de plantas de chile habanero

La técnica de transformación *in planta* con vacío se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Enrique Castaño de la Serna de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular del CICY, con ayuda de la técnica Ángela Kú González, durante el mes de mayo de 2012, con protocolo de transformación usado por ellos en plantas de chile habanero var. Naranja (Seminis, St. Louis, USA).

Se creció por separado 0.5 L de la cepa de *Agrobacterium* EHA105 con y sin pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1, en medio con antibióticos, hasta una densidad óptica entre 1.0 y 1.4 a 600 nm; se colectaron las células por centrifugación (5,000 rpm, 15 min, 4 °C); se re-suspendieron en 1.5 L de medio Murashige & Skoog (MS); en esta mezcla se sumergieron plántulas de chile habanero var. Naranja de hasta 5 pares de hojas verdaderas a las cuales el mismo día de la transformación se les removieron las hojas lo más cerca al tallo, con el fin de estimular el desarrollo de las yemas axilares; las plántulas deshojadas en co-cultivo se sometieron a vacío entre 300 a 450 mmHg por no más de 5 min, buscando causar una infiltración de la bacteria en los espacios con aire de los tejidos de la planta (Tague & Mantis, 2006); se liberó el vacío lentamente; se co-cultivaron por 3 h con agitación suave a 25 °C; se lavaron las plantas con NaCl 0.9 % en agitación suave por 15 min; se trataron con timentina $400\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en agitación suave por 15 min, para suprimir el *Agrobacterium* restante (Cheng, Schnurr, & Kapaun, 1998); se lavaron con abundante agua; y se sembraron cubriendo sus raíces con peat moss húmedo y se crecieron por 1 a 2 meses en cámara de cultivo con 16 h de luz ($40\text{--}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a condiciones controladas de temperaturas no inferiores a 24 °C (Koeda, Hosokawa, Kang, & Yazawa, 2009), regando con solución nutritiva Hoagland a 1/5 de su fuerza iónica (Hoagland & Arnon, 1950), hasta que hayan desarrollado suficientes hojas para transplantarlas a invernadero en bolsas de 8 L con peat moss.

Confirmación de transgenes por PCR

De hojas jóvenes se extrajo ADN genómico, siguiendo protocolo de (Tapia-Tussell, Quijano-Ramayo, Rojas-Herrera, Larque-Saavedra, & Perez-Brito, 2005), se empezó con la lisis de la pared y membrana celular por medio de ruptura mecánica en buffer de extracción con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que remueve cationes como el magnesio que son cofactores necesarios para la actividad de enzimas nucleasas; y con el detergente iónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) que destruye las membranas, al momento de moler el material vegetal, captura los lípidos y las proteínas permitiendo la liberación del ADN genómico (Csaikl et al., 1998); en solución buffer a 7.5 pH con Tris/HCl. Luego se separó el complejo CTAB y ADN de los polisacáridos, compuestos fenólicos y proteínas con ayuda de cloroformo que los desnaturaliza y facilita la separación de la fase orgánica y la acuosa donde queda el ADN, al final el ADN se libera del detergente y precipita con la ayuda de etanol.

Selección de líneas homocigotas

La integración estable de AVP1 se evaluó en plantas de la generación (T_1) obtenida a partir de semillas de las primeras plantas transformadas (T_0) auto polinizadas. Las semillas obtenidas de T_0 se germinaron en peat moss húmedo sin presión de selección de antibiótico y luego se trasplantaron a invernadero, con las mismas condiciones seguidas para las plantas después de transformación.

El análisis de integración del transgen debe hacerse en T_1 porque las T_0 son de naturaleza quimérica. La presencia del transgen en cada generación se caracterizó con prueba de PCR del ADN genómico. Dado que la integración del T-ADN en el genoma de la planta es un evento aleatorio se deben de crecer las plantas T_1 , de eventos de

transformación independientes, hasta completar su desarrollo para confirmar que su inserción no interfiere con ningún gen esencial para su normal crecimiento y desarrollo y que sus semillas son viables.

Resultados

Construcción de vectores pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1

El diseño flexible de los cassettes de expresión sintetizados químicamente, permitió el intercambio de sus componentes para construir dos vectores binarios, primero se obtuvo en *E. coli* stb14, un vector binario para la expresión constitutiva de AVP1 a un nivel bajo (pUBQ10-AVP1)(Fig. 2A, Anexo 1) confirmado por tolerancia a antibióticos, y por patrón y separado de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa, PCR del plásmido purificado. A partir de pUBQ10-AVP1 se construyó otro vector binario para la expresión de AVP1 inducido por estrés salino (pTsVP1-AVP1) (Fig. 2B, Anexo 2) intercambiando UBQ10_{Pro} por TsVP1_{Pro} y confirmando su correcta integración de la misma manera.

Se confirmó la secuencia de cada uno de los cassettes de expresión integrados en el vector pCAMBIA1300 por medio de secuenciación, con la que se detectó una mutación en la base 260 de UBQ10_{Pro}, del vector pUBQ10-AVP1, la cual se confirmó por medio de los electroferogramas (Fig. 3A). Con el fin de identificar el efecto de dicha mutación en los elementos reguladores del promotor se realizó un análisis, con la herramienta PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot et al., 2002), una base de datos de reguladores de la expresión genética (elementos-cis), y portal de herramientas para análisis in silico de secuencias de promotores en plantas; con la que se encontró que la mutación de la base 260 del UBQ10_{Pro} genera la aparición de un *motivo* (TC-Rich) (Fig. 3B), identificado previamente como un elemento relacionado con respuesta y defensa a

estrés del gen de peroxidasa anionica en *Nicotiana tabacum* (Klotz & Lagrimini, 1996). cuya aparición no se espera que altere la expresión constitutiva de UBQ10_{PRO}. En el vector pTsVP1-AVP1 también se identificó una mutación en la base 2196 de TsVP1_{PRO}, pero en el análisis con PlantCare, dicha mutación no parece alterar ningún *motivo* de los existentes en la base de datos.

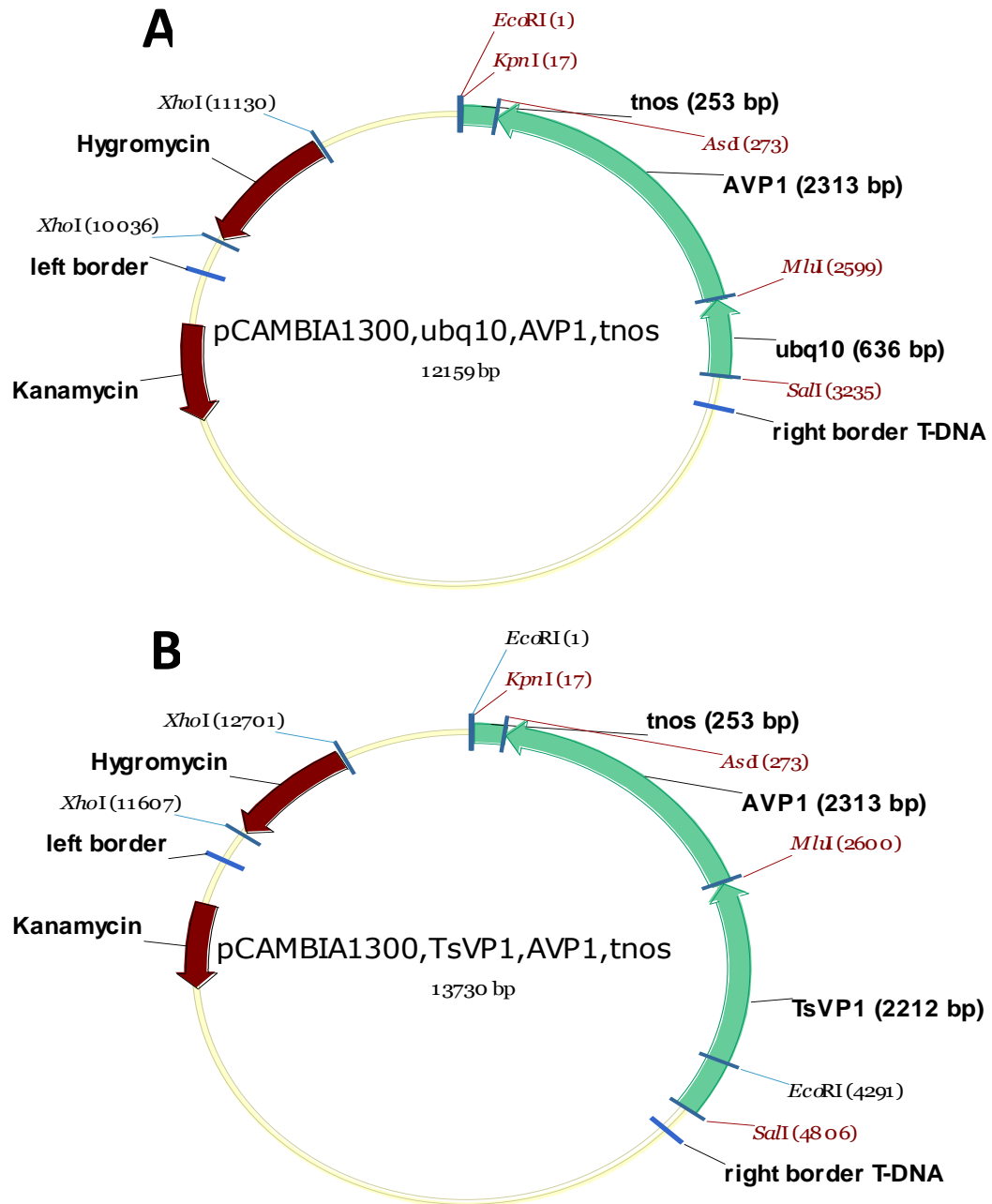


Fig. 2. Mapa de vectores binario pUBQ10-AVP1 (A), y pTsVP1-AVP1 (B).

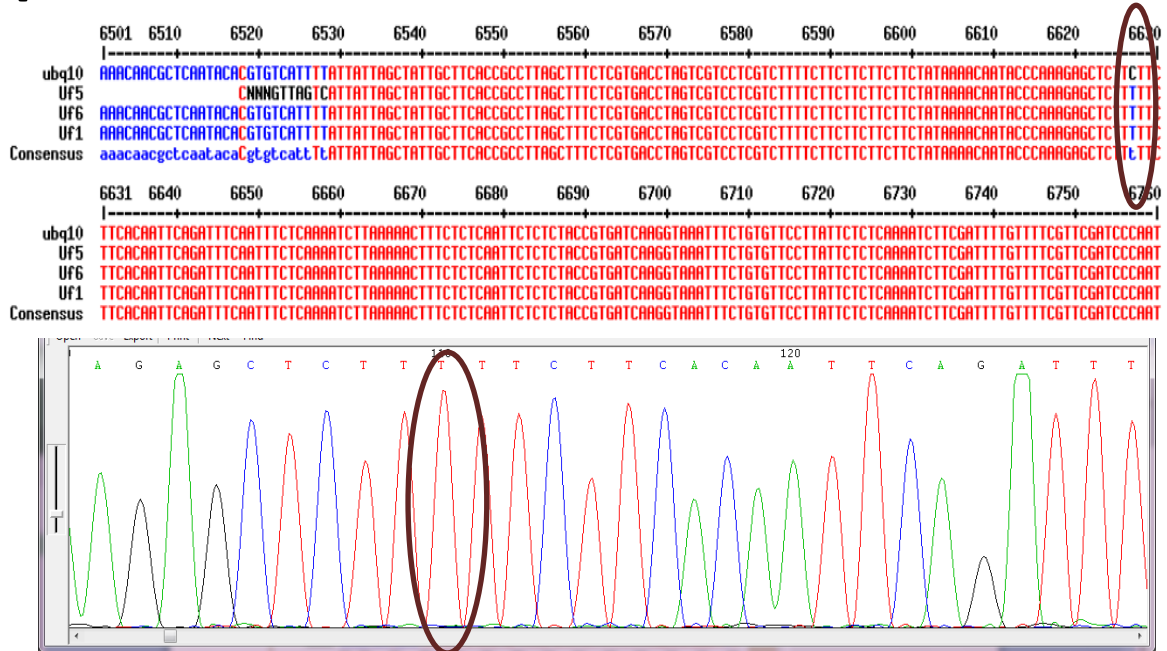
Transformación de plantas de chile habanero con Agrobacterium

Se clonó pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1 en la cepa EHA105 de *Agrobacterium* y se confirmó su integración por tamizajes de cultivo en antibiótico y por pruebas de PCR de plásmido purificado, y se prepararon respaldos en medio de cultivo con glicerol y se almacenaron a -80 °C.

La técnica aprendida en el CICY se estableció en el Laboratorio del Centro de Biotecnología-FEMSA del ITESM, donde se repitió en 3 ocasiones más (Tabla 1). Se transformaron plántulas de chile habanero mediante co-cultivo y aplicación de vacío, con *Agrobacterium* EHA105 sola y *Agrobacterium* EHA105 con pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1, por separado. Las plantas transformadas solamente con *Agrobacterium* EHA105, sin vector T-ADN, presentaron las mismas tasas de supervivencia que las transformadas con T-ADN. Todas las que sobrevivieron después del proceso de transformación, con los distintos vectores presentaron crecimiento normal.

Los porcentajes de supervivencia de T₀ fueron de apenas el 39 %, de estas apenas 9 brotes fueron positivas para el transgen en pruebas de PCR, se colectaron las semillas de los frutos de todas las plantas T₀, dada la baja supervivencia después de la transformación se decidió no tamizar usando higromicina, sino germinando todas las plantas y tamizarlas por prueba de PCR con primers UBQ10-UP (5'-ctttgcgtgtaaacaacgctca-3'), UBQ10-Down (5'-accttctcttctcgcgattaga-3'), TsVP1-UP (5'-gcacacacattgaatccctca-3') y TsVP1-Down (5'-ccaaagagagccatggaaga-3'), dependiendo del cassette utilizado para transformación. De estas la germinación en promedio fue del 60 %, pero no hubo segregación del gen en ninguna de las T₁ (Tabla 1).

A



B

+ TCGACGAGTC AGTAATAAAC GGCCTCAAAG TGGTTGCAGC CGGCACACAC GAGTCGTGTT TATCAACTCA
 - AGCTGCTCAG TCATTATTG CCGCAGTTTC ACCAACGTCG GCCGTGTGTG CTCAGCACAA ATAGTTGAGT

+ AAGCACAAT ACITTTTCCTC AACCTAAAA TAAGGCAATT AGCCAAAAAC AACTTTGCGT GTAAACAAGC
 - TTCGTGTTA TGAAAAGGAG TTGGATTTT ATTCCGTTAA TCGGTTTTG TTGAAACGCA CATTGTTGC

+ CTCAAATACAC GTGTCATTT ATTATTAGCT ATTGCTTAC CGCCTTAGCT TTCTCGTGAC CTAGTCGTC
 - GAGTTATGTG CACAGTAAA TAATAATCGA TAACGAAGT GCGGAATCGA AAGAGCCTG GATCAGCAGG

+ TCGTCTTTTC TTCTTCTCT TCTATAAAC AATACCCAAA GAGCTCTT TCTTCACAAT TCAGATTCA
 - AGCAGAAAAG AAGAAGAAGA AGATAATTTG TTATGGGTT CTCGAGAA AGAAGTGTA AGTCTAAAGT

TC-rich repeats

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence	function
TC-rich repeats	Nicotiana tabacum	257	+	9	ATTTTCTTCA	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness

Fig. 3. Mutación de la base 260 correspondiente al UBQ10_{Pro}, del pUBQ10-AVP1 (A), Análisis in silico de motivos presentes en UBQ10_{Pro} con herramienta PlantCare (B).

La técnica aprendida en el CICY se estableció en el Laboratorio del Centro de Biotecnología-FEMSA del ITESM, donde se repitió en 3 ocasiones más (Tabla 1). Se transformaron plántulas de chile habanero mediante co-cultivo y aplicación de vacío, con *Agrobacterium* EHA105 sola y *Agrobacterium* EHA105 con pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1, por separado. Las plantas transformadas solamente con *Agrobacterium* EHA105, sin vector T-ADN, presentaron las mismas tasas de supervivencia que las transformadas con T-ADN. Todas las que sobrevivieron después del proceso de transformación, con los distintos vectores presentaron crecimiento normal.

Los porcentajes de supervivencia de T₀ fueron de apenas el 39 %, de estas apenas 9 brotes fueron positivas para el transgen en pruebas de PCR, se colectaron las semillas de los frutos de todas las plantas T₀, dada la baja supervivencia después de la transformación se decidió no tamizar usando higromicina, sino germinando todas las plantas y tamizarlas por prueba de PCR con primers UBQ10-UP (5'-ctttgctgtaaacaacgctca-3'), UBQ10-Down (5'-accttctcttctcgcattaga-3'), TsVP1-UP (5'-gcacacacattgaatccctca-3') y TsVP1-Down (5'-ccaaagagagccatggaaga-3'), dependiendo del cassette utilizado para transformación. De estas la germinación en promedio fue del 60 %, pero no hubo segregación del gen en ninguna de las T₁ (Tabla 1).

El éxito de la transformación consiste en que el gen transferido por *Agrobacterium* se integre no necesariamente a un número muy alto de células, en su mayoría somáticas, sino en células germinales que son las precursoras de los gametos (Oosfera y polen), las cuales por medio de la reproducción sexual transferirán el gen a nuevas generaciones. La naturaleza quimérica de T₀ implica que los resultados del tamizaje por PCR en hojas no son un reflejo de la eficiencia del proceso de transformación, sirven de indicador de que el proceso de transformación aplicado está favoreciendo la transferencia del gen desde *Agrobacterium* hasta la planta, pero es hasta la generación T₁ que el tamizaje por PCR en

hojas pueden considerarse pruebas confiables de la segregación de AVP1. En trabajos previos de transformación *in planta* de *Capsicum* se han reportado eficiencias de transformación entre 10 % y 11 % en plantas quimeras T₀ (Manoj et al., 2009).

Tabla 1. Resultados de transformación *in planta* con vacío en plántulas de chile habanero var. Naranja con *Agrobacterium* EHA105 y pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1

transformación	# plantas transformadas	# plantas que sobrevivieron	# T ₀ (PCR +)	# T ₁ germinadas	# T ₁ (PCR +)
1	90	30	3	84	0
2	72	15	1	90	0
3	16	12	1	61	0
4	43	29	4	185	0
4	221	86	9	420	0

Discusión

Construcción de vectores pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1

Los vectores binarios construidos (pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1) son una herramienta útil e indispensable para la realización de investigaciones relacionadas con la

sobre-expresión de AVP1, no solo para el estudio acá propuesto sino para cualquier planta con y sin condiciones de estrés salino. Su disponibilidad en la cepa de *Agrobacterium* EHA105 permite la utilización de protocolos de transformación de células vegetales mediante la transferencia de la región T-ADN por el mecanismo natural de *Agrobacterium*. La secuencia T-ADN de los vectores también es útil para protocolos de transformación por tubo polínico con cassettes minimalistas en los cuales los bordes de T-ADN protegen de la degradación el ADN y facilitan su integración en el genoma de la planta (Wu et al., 2008).

Transformación de plantas de chile habanero

El género *Capsicum* presenta una severa naturaleza recalcitrante morfogénica, lo que se traduce en la inhabilidad de las células de la planta, tejido y órganos a responder al cultivo de tejidos (ver (Kothari, Joshi, Kachhwaha, & Ochoa-Alejo, 2010). Adicionalmente la regeneración de las plantas, de la mayoría de todas las familias botánicas, mediante cultivo in vitro tiene efectos indeseados como la generación de variaciones genéticas o variaciones somaclonales (Larkin & Scowcroft, 1981), las cuales también han sido observadas en *Capsicum* (Anu, Babu, & Peter, 2004).

La técnica de transformación *in planta* (Bechtold & Pelletier, 1998), es una alternativa potencial para superar esas dificultades del cultivo de tejidos en *Capsicum*, en la actualidad existe un reporte exitoso del uso de esta técnica en pimientos, *C. annuum* L. (Manoj et al., 2009).

La transformación vegetal por *Agrobacterium* requiere de procedimientos eficientes para la supresión de las bacterias después del co-cultivo y para reducir los efectos supresores de los antibióticos sobre el desarrollo de las plantas (Magdum, 2013). La baja tasa de supervivencia de las plantas después del proceso de transformación en este estudio

puede deberse a hipersensibilidad de la planta, ya que con el propósito de eliminar las bacterias, la planta genera especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) como mecanismo de defensa, situación que generalmente esta seguida de una respuesta hipersensible a patógenos causando una necrosis acelerada (Greenberg, Guo, Klessig, & Ausubel, 1994). Dadas las altas tasas de mortalidad de plantas después del proceso de transformación se hace necesario optimizar parámetros, como la concentración mínima de antibiótico bactericida y la fitotoxicidad del antibiótico.

Otras condiciones que se deben cumplir para tener un protocolo de transformación *in planta* exitoso son: 1) Contar con suficiente material vegetal sano, de desarrollo suficiente (más de 5 pares de hojas verdaderas), en este trabajo un inconveniente fue trabajar con una variedad descontinuada por la empresa proveedora, porque la consecución de semillas fue especialmente difícil y las que se consiguieron tenían bajo porcentaje de germinación; 2) Tener un sistema robusto de germinación y crecimiento de plántulas, dado que este protocolo tiene bajas eficiencias de transformación, se requiere trabajar con un número alto de plantas y se necesita espacio suficiente que cumpla con las condiciones necesarias para garantizar temperaturas óptimas para el desarrollo de las plantas, un adecuado y constante suministro de riego y fertilización, y una permanente supervisión y control fitosanitario, además que permita un estricto seguimiento al desarrollo fenotípico para identificar cambios aberrantes ocasionados por la inserción del transgen; 3) Disminuir el estrés en la planta durante el protocolo de transformación, mediante la optimización de un protocolo sin uso de vacío que permita el co-cultivo de solamente la parte aérea de plántulas en charolas, para evitar el innecesario estrés en raíces; 4), trasplantar a macetas grandes en invernadero lo más pronto posible las plántulas después de un breve tiempo de recuperación de la transformación ya que la luz natural del sol favorece su desarrollo y por tanto aumenta la posibilidad de producción de frutos.

Trabajos a futuro

Próximos trabajos que superen el proceso de transformación podrán continuar con los objetivos de caracterización molecular y fenotípica mediante las siguientes propuestas metodológicas:

Caracterización molecular de plantas transformadas

Crece por tres generaciones las plantas T₁ PCR+ para obtener plantas homocigotas para el transgen (Gaxiola et al., 2001). Los eventos de integración se deberán evaluar en plantas por la técnica de Southern blot, sometiendo a digestión por endonucleasas una muestra de ADN genómico de cada planta, separarla por electroforesis en gel de agarosa, transferirlo a membrana de nitrocelulosa con entrecruzamiento por UV. Hibridarlo con secuencias de ADN correspondientes al promotor híbrido y AVP1 marcados con sondas de digoxigenin (DIG), e inmunodetectadas por fosfatasa alcalina conjugada a un anticuerpo anti-DIG y visualizado utilizando activación enzimática por quimio-luminiscencia (McCabe, Power, deLaat, & Davey, 1997).

Cuantificar los niveles de transcripción de AVP1, en plantas homocigotas T₃ bajo condiciones óptimas y bajo estrés salino y de los macronutrientes nitrógeno (N) y fósforo (P), utilizando PCR tiempo real cuantitativo (PCR-TR), seleccionando un gen de referencia, mediante el uso de algoritmos estadísticos como geNORM (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen, Jensen, & Orntoft, 2004), aproximación ΔC_t (Silver, Best, Jiang, & Thein, 2006), e índice de estabilidad (Brunner, Yakovlev, & Strauss, 2004), con el fin de encontrar uno con nivel de expresión constante para la normalización de transcritos.

Evaluación de traducción de AVP1

Evaluar los niveles de traducción de AVP1, en plantas T₃ crecidas bajo condiciones óptimas y bajo estrés salino y por macronutrientes (N y P), utilizando prueba de Western blot, a partir de membranas celulares aisladas por centrifugación, usando anticuerpo de conejo anti-AVP1 (Cat. AS12_1849, Agrisera, Västerbotten, Suecia), usando procedimiento descrito por (Undurraga, 2006).

Caracterización fenotípica de plantas transformadas

Caracterizar respuesta de plantas T₃ bajo estrés salino y por macronutrientes (N y P), evaluando supervivencia, productividad, y biomasa (peso verde y seco) de las plantas, este último para calcular un índice de tolerancia a salinidad que considera la pérdida de rendimiento con base a su peso seco (total peso seco bajo estrés /total peso seco control) (Jha, Shirley, Tester, & Roy, 2010).

Los vectores pUBQ10-AVP1 y pTsVP1-AVP1 aquí elaborados tienen el potencial de ser utilizados en otras plantas para estudiar el efecto de la regulación diferencial de la expresión de AVP1 bajo condiciones de estrés, con el fin de explotar los beneficios que confiere AVP1 en aumentar la tolerancia de las plantas a las condiciones de estrés sin la presión metabólica de un promotor constitutivo.

Referencias Anexo AVP1

- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C., & Kjellbom, P. (2004). *Arabidopsis* Plasma Membrane Proteomics Identifies Components of Transport, Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Plant and Cell Physiology*, 45(11), 1543-1556. doi: 10.1093/pcp/pch209
- Amudha, J., & Balasubramani, G. (2011). Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 6(2), 31-58.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-0496
- Anu, A., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2004). Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 76(3), 261-267.
- Arif, A., Zafar, Y., Arif, M., & Blumwald, E. (2013). Improved Growth, Drought Tolerance, and Ultrastructural Evidence of Increased Turgidity in Tobacco Plants Overexpressing *Arabidopsis* Vacuolar Pyrophosphatase (AVP1). *Mol Biotechnol*, 54(2), 379-392. doi: 10.1007/s12033-012-9577-9
- Battisti, D. S., & Naylor, R. L. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323(5911), 240-244. doi: 10.1126/science.1164363
- Battraw, M. J., & Hall, T. C. (1990). Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol*, 15(4), 527-538.
- Bechtold, N., & Pelletier, G. (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*, 82, 259-266.
- Benfey, P. N., Ren, L., & Chua, N. H. (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J*, 9(6), 1677-1684.
- Bhaskaran, S., & Savithramma, D. L. (2011). Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na(+)/H(+) antiporter and *Arabidopsis* H(+)-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5561-5570. doi: 10.1093/jxb/err237
- Bhullar, S., Datta, S., & Burma, P. K. (2011). Delayed Trans-inactivation of Synthetic Domain A 35S Promoters by "Tobacco 271 Locus" due to Reduced Sequence Homology. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(1). doi: 10.1007/s11105-010-0202-4

- Brunner, A. M., Yakovlev, I. A., & Strauss, S. H. (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 4, 14. doi: 10.1186/1471-2229-4-14
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R. J., Anstrom, D. C., Harrison, J., Stoecker, M., . . . Heard, J. E. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol*, 147(2), 446-455. doi: 10.1104/pp.108.118828
- Cheng, Z.-M., Schnurr, J. A., & Kapaun, J. A. (1998). Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*, 17(8), 646-649. doi: 10.1007/s002990050458
- Christensen, A. H., Sharrock, R. A., & Quail, P. H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol*, 18(4), 675-689.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16(22), 10881-10890.
- Csaikl, U. M., Bastian, H., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., . . . Ziegenhagen, B. (1998). Comparative Analysis of Different DNA Extraction Protocols: A Fast, Universal Maxi-preparation of High Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16(1), 69-86. doi: 10.1023/A:1007428009556
- De Ronde, J., Cress, W., Krüger, G., Strasser, R., & Van Staden, J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1211-1224.
- De Ronde, J., Laurie, R., Caetano, T., Greyling, M., & Kerepesi, I. (2004). Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. *Euphytica*, 138(2), 123-132.
- FAO. (2009). *How to feed the world in 2050*. Paper presented at the High-level expert forum, Rome. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How to Feed the World in 2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
- Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot*, 55(396), 307-319. doi: 10.1093/jxb/erh003
- Fuglsang, A. T., Paez-Valencia, J., & Gaxiola, R. A. (2011). Plant proton pumps: Regulatory circuits involving H⁺ATPase and H⁺PPase. In G. Markus & V. Kees (Eds.), *Transporters and Pumps in Plant Signaling* (Vol. 7, pp. 378): Springer.
- Galbraith, D. W., & Birnbaum, K. (2006). Global studies of cell type-specific gene expression in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 451-475. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105302
- Gao, F., Gao, Q., Duan, X. G., Yue, G., Yang, A. F., & Zhang, J. R. (2006). Cloning of an H⁺-pPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to

- improve tobacco salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3259-3270. doi: 10.1093/jxb/erl090
- Gaxiola, R. A., Fink, G. R., & Hirschi, K. D. (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*, 129(3), 967-973. doi: 10.1104/pp.020009
- Gaxiola, R. A., Li, J. S., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., & Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11444-11449.
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., & Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *Febs Letters*, 581(12), 2204-2214. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.050
- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13(2), 247-261. doi: 10.1016/0734-9750(95)00004-a
- Gonzalez, N., De Bodt, S., Sulpice, R., Jikumaru, Y., Chae, E., Dhondt, S., . . . Inze, D. (2010). Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol*, 153(3), 1261-1279. doi: 10.1104/pp.110.156018
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F., & Ausubel, F. M. (1994). Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77(4), 551-563. doi: 10.1016/0092-8674(94)90217-8
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal*, 64(2), 355-365. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x
- Gritz, L., & Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. 25(2-3), 179-188. doi: 10.1016/0378-1119(83)90223-8
- Ha, S., & Tran, L. S. (2013). Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-15. doi: BBTN-783549
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., & Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 25(6), 989-994. doi: 10.1007/BF00014672
- Hamilton, R. H., & Fall, M. Z. (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia*, 27(2), 229-230. doi: 10.1007/BF02145913
- Harrigan, G. G., Ridley, W. P., Miller, K. D., Sorbet, R., Riordan, S. G., Nemeth, M. A., . . . Pester, T. A. (2009). The forage and grain of MON 87460, a drought-tolerant corn hybrid, are compositionally equivalent to that of conventional corn. *J Agric Food Chem*, 57(20), 9754-9763. doi: 10.1021/jf9021515

- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future *Plant J* (Vol. 61, pp. 1041-1052). England.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347, 1-32.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180. doi: doi:10.1038/303179a0
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2(4), 208-218. doi: 10.1007/BF01977351
- Hou, L., Chen, L., Wang, J., Xu, D., Dai, L., Zhang, H., & Zhao, Y. (2012). Construction of Stress Responsive Synthetic Promoters and Analysis of Their Activity in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-11.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., & Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(35), 12987-12992. doi: 10.1073/pnas.0604882103
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., . . . Muller, B. (2010). *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol*, 154(1), 357-372. doi: 10.1104/pp.110.157008
- Jha, D., Shirley, N., Tester, M., & Roy, S. J. (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant Cell Environ*, 33(5), 793-804. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02105.x
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17(3), 287-291.
- Kim, Y. S., & Kim, J. K. (2009). Rice transcription factor AP37 involved in grain yield increase under drought stress. *Plant Signal Behav*, 4(8), 735-736.
- Klotz, K. L., & Lagrimini, L. M. (1996). Phytohormone control of the tobacco anionic peroxidase promoter. *Plant Molecular Biology*, 31(3), 565-573. doi: 10.1007/BF00042229
- Ko, M. K., Soh, H., Kim, K. M., & Kim, Y. S. (2007). Stable production of transgenic pepper plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *HORTSCIENCE*, 42(6), 1425-1430.
- Koeda, S., Hosokawa, M., Kang, B. C., & Yazawa, S. (2009). Dramatic changes in leaf development of the native *Capsicum chinense* from the Seychelles at temperatures below 24 degrees C. *J Plant Res*, 122(6), 623-631. doi: 10.1007/s10265-009-0250-8

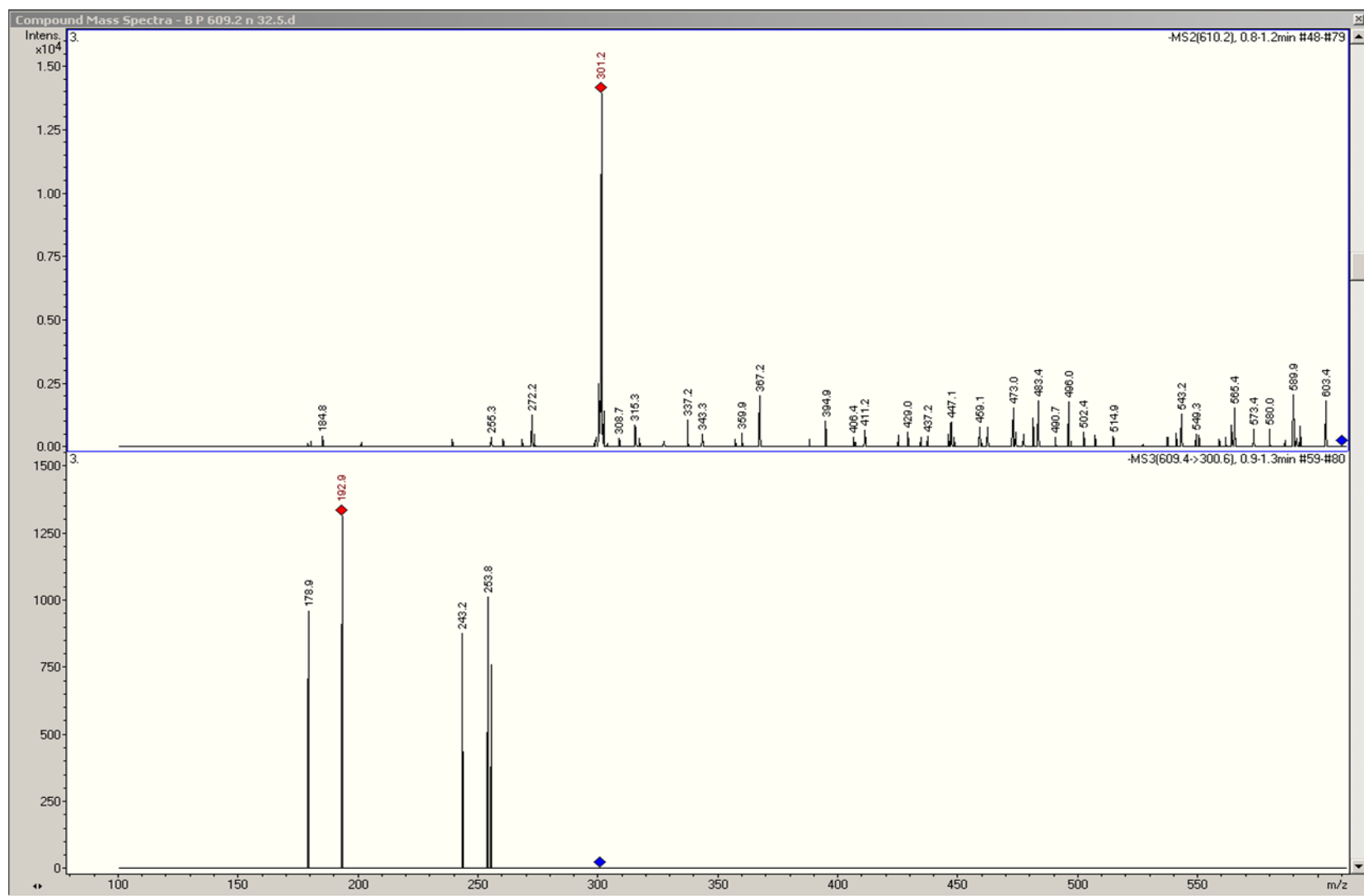
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers--a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnol Advances*, 28(1), 35-48. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.08.005
- Koziel, M. G., Carozzi, N. B., & Desai, N. (1996). Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol*, 32(1-2), 393-405.
- Larkin, P., & Scowcroft, W. (1981). Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *TAG, Theoretical and Applied Genetics*, 60(4), 197-214. doi: 10.1007/BF02342540
- Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., . . . Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30(1), 325-327.
- Li, B., Wei, A. Y., Song, C. X., Li, N., & Zhang, J. R. (2008). Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. *Plant Biotechnology Journal*, 6(2), 146-159. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00301.x
- Li, J. S., Yang, H. B., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., . . . Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H⁺-pPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310(5745), 121-125. doi: 10.1126/science.1115711
- Liu, J. X., Srivastava, R., & Howell, S. H. (2008). Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 31(12), 1735-1743. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01873.x
- López-Arredondo, D., Leyva-González, M. A., Alatorre-cobos, F., & Herrea-estrella, L. (2013). Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *International Journal of Developmental Biology*, 57, 595-610. doi: 10.1387/ijdb.130268lh
- Maeshima, M. (2001). Tonoplast transporters: Organization and Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 469-497. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.469
- Magdum, S. S. (2013). Effect of Agrobacterium Induced Necrosis, Antibiotic Induced Phytotoxicity and Other Factors in Successful Plant Transformation. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 9(3), 98-112.
- Manoj, A. K., Reddy, K. N., Sreevathsa, R., Ganeshan, G., & Udayakumar, M. (2009). Towards crop improvement in bell pepper (*Capsicum annuum* L.): Transgenics (*uid A::hpt II*) by a tissue-culture-independent *Agrobacterium*-mediated in planta approach. *Scientia Horticulturae*, 119(4), 362-370. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.034
- Martin, C., Bhatt, K., & Baumann, K. (2001). Shaping in plant cells. *Curr Opin Plant Biol*, 4(6), 540-549.
- Matzke, M. A., Mette, M. F., & Matzke, A. J. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol*, 43(2-3), 401-415.

- McCabe, M. S., Power, J. B., deLaat, A. M. M., & Davey, M. R. (1997). Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by nonradioactive southern blot analysis. *Molecular Biotechnology*, 7(1). doi: 10.1007/bf02821545
- Nelson, D. E., Repetti, P. P., Adams, T. R., Creelman, R. A., Wu, J., Warner, D. C., . . . Heard, J. E. (2007). Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(42), 16450-16455. doi: 10.1073/pnas.0707193104
- Odell, J. T., Nagy, F., & Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812. doi: doi:10.1038/313810a0
- Oh, D. H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S. M., Li, Y. Z., Quintero, F. J., . . . Bohnert, H. J. (2009). Loss of Halophytism by Interference with SOS1 Expression. *Plant Physiology*, 151(1), 210-222. doi: 10.1104/pp.109.137802
- Oldeman, L. R. (1991). The global extent of soil degradation *ISRIC Bi-annual report 1991-1992* (pp. 36). Wageningen, the Netherlands: (s)ISRIC, Wageningen, the Netherlands.
- Paez-Valencia, J., Patron-Soberano, A., Rodriguez-Leviz, A., Sanchez-Lares, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., . . . Gaxiola, R. (2011). Plasma membrane localization of the type I H(+)-pPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 181(1), 23-30. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.03.008
- Paez-Valencia, J., Sanchez-Lares, J., Marsh, E., Dorneles, L. T., Santos, M. P., Sanchez, D., . . . Gaxiola, R. A. (2013). Enhanced proton translocating pyrophosphatase activity improves nitrogen use efficiency in romaine lettuce. *Plant Physiol*, 161(3), 1557-1569. doi: 10.1104/pp.112.212852
- Park, S., Li, J. S., Pittman, J. K., Berkowitz, G. A., Yang, H. B., Undurraga, S., . . . Gaxiola, R. A. (2005). Up-regulation of a H+-pyrophosphatase (H+-pPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18830-18835. doi: 10.1073/pnas.0509512102
- Pasapula, V., Shen, G. X., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., . . . Payton, P. (2011). Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H+-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9(1), 88-99. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00535.x
- Peleg, Z., Apse, M. P., & Blumwald, E. (2011). Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era*, 57, 405-443. doi: 10.1016/b978-0-12-387692-8.00012-6
- Qin, H., Gu, Q., Zhang, J., Sun, L., Kuppu, S., Zhang, Y., . . . Zhang, H. (2011). Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (IPT) in peanut significantly improves

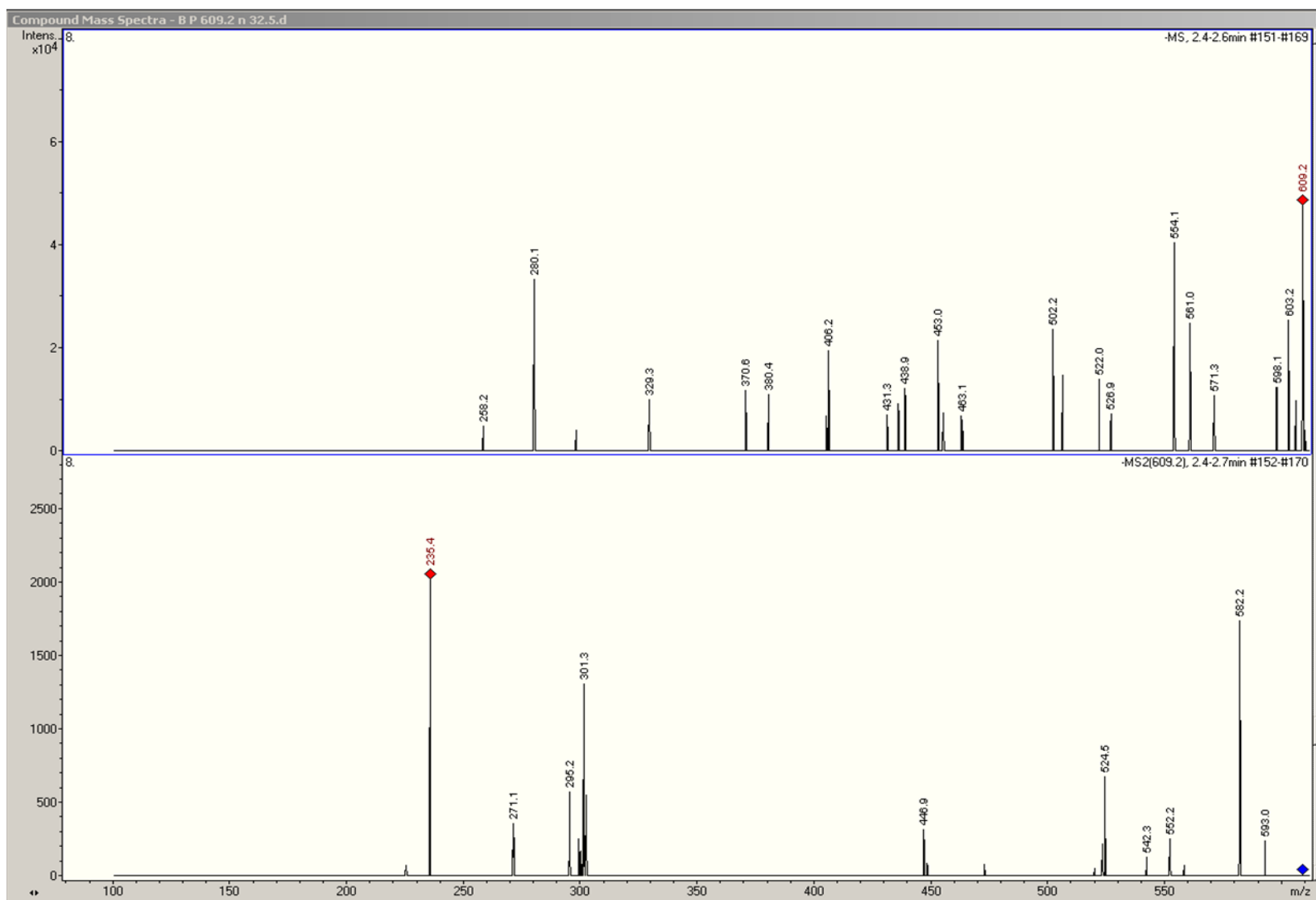
- drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Cell Physiol*, 52(11), 1904-1914. doi: 10.1093/pcp/pcr125
- Reguera, M., Peleg, Z., & Blumwald, E. (2012). Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biochim Biophys Acta*, 1819(2), 186-194. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.08.005
- Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot*, 57(5), 1017-1023. doi: 10.1093/jxb/erj108
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning* (3rd ed.): Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. J., & Rea, P. A. (1992). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5), 1775-1779.
- Shiratake, K., Kanayama, Y., Maeshima, M., & Yamaki, S. (1997). Changes in H⁺-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant and Cell Physiology*, 38(9), 1039-1045.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *Bmc Molecular Biology*, 7(1), 33. doi: 10.1186/1471-2199-7-33
- Skirycz, A., Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S., . . . Inze, D. (2011). Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnol*, 29(3), 212-214. doi: 10.1038/nbt.1800
- Sun, Q., Gao, F., Zhao, L., Li, K., & Zhang, J. (2010). Identification of a new 130 bp cis-acting element in the TsVP1 promoter involved in the salt stress response from *Thellungiella halophila* *BMC Plant Biol* (Vol. 10, pp. 90). England.
- Tague, B. W., & Mantis, J. (2006). In Planta Agrobacterium-Mediated Transformation by Vacuum Infiltration. In J. Salinas & J. J. Sanchez-Serrano (Eds.), *Methods in Molecular Biology: Arabidopsis protocols* (2nd ed., Vol. 323, pp. 215-223). Totowa, NJ: Humana Press.
- Taji, T., Sakurai, T., Mochida, K., Ishiwata, A., Kurotani, A., Totoki, Y., . . . Shinozaki, K. (2008). Large-scale collection and annotation of full-length enriched cDNAs from a model halophyte, *Thellungiella halophila*. *Bmc Plant Biology*, 8(1), 115-127. doi: 10.1186/1471-2229-8-115
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Rojas-Herrera, R., Larque-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2005). A fast, simple, and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. *Molecular Biotechnology*, 31(2), 137-139. doi: 10.1385/MB:31:2:137
- Turner, N. (1979). Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In H. Mussell & C. Staples (Eds.), *Stress physiology in crop plants* (pp. 343-372). New York: John Wiley & Sons.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock

- the future. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 113-122. doi: 10.1016/j.copbio.2006.02.002
- UN. (2010). World Population Prospects, the 2010 Revision. from United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2011): World Population Prospects: The 2010 Revision. http://esa.un.org/unpd/wpp/Analytical-Figures/htm/fig_2.htm
- Undurraga, S. F. (2006). *Interaction of the vacuolar hydrogen-pyrophosphatase AVP1 with the secondary transporters AtNHX1 and SOS1 in Arabidopsis thaliana: Implications in salt tolerance and mineral nutrition*. (Ph. D. Dissertations), University of Connecticut. Retrieved from <http://digitalcommons.uconn.edu/dissertations/AAI3234327/> (AAI3234327)
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-*p*CR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7). doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Venter, M., Groenewald, J. H., & Botha, F. C. (2006). Sequence analysis and transcriptional profiling of two vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms in *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Research*, 119(5), 469-478. doi: 10.1007/s10265-006-0009-4
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3688-3691.
- Wang, K. (2006). *Agrobacterium Protocols - Volume I* (K. Wang Ed. 2nd ed.). New Jersey: Humana Press Inc.
- Wang, Y., Beath, M., Chalifoux, M., Ying, J., Uchacz, T., Sarvas, C., . . . Huang, Y. (2009). Shoot-Specific Down-Regulation of Protein Farnesyltransferase (γ -Subunit) for Yield Protection against Drought in Canola. *Mol Plant*, 2(1), 191-200. doi: 10.1093/mp/ssn088
- Wang, Z. I., Li, P. H., Fredricksen, M., Gong, Z. H., Kim, C. S., Zhang, C. Q., . . . Zhang, H. (2004). Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant Science*, 166(3), 609-616. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.030
- Weeks, J. T., Anderson, O. D., & Blechl, A. E. (1993). Rapid Production of Multiple Independent Lines of Fertile Transgenic Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol*, 102(4), 1077-1084.
- Wu, W., Su, Q., Xia, X. Y., Wang, Y., Luan, Y. S., & An, L. J. (2008). The Suaeda liaotungensis kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica*, 159(1-2), 17-25. doi: 10.1007/s10681-007-9451-1
- Xu, G., Fan, X., & Miller, A. M. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 153-182. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105532

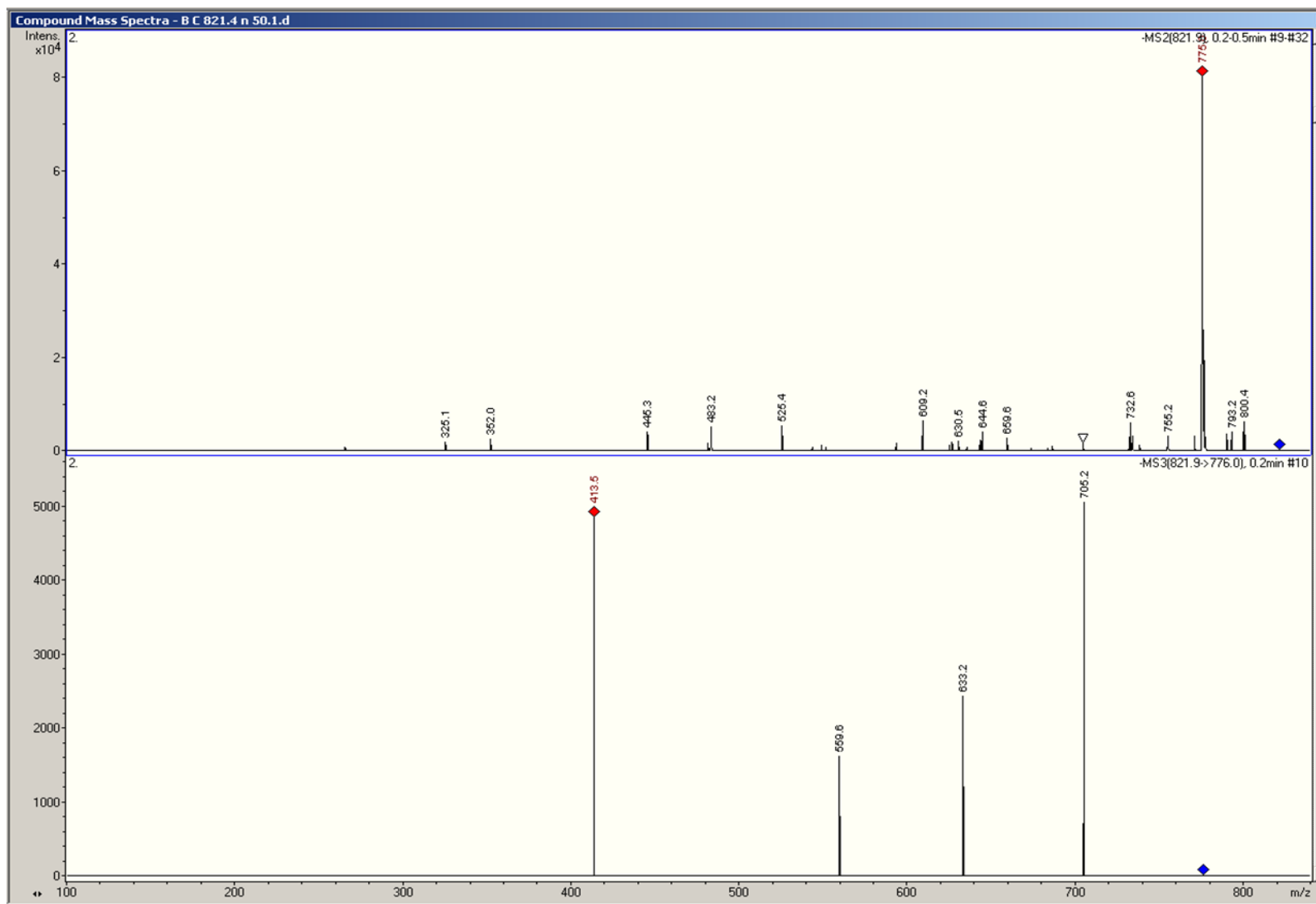
- Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci*, *10*(12), 615-620. doi: 10.1016/j.tplants.2005.10.002
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, *10*(2), 88-94. doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.012
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., . . . Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type H^+ -pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, *5*(6), 735-745. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00281.x
- Zhang, J., Li, J., Wang, X., & Chen, J. (2011). OVP1, a Vacuolar H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase (V-pPase), overexpression improved rice cold tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(1), 33-38. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.014
- Zhu, X. G., Long, S. P., & Ort, D. R. (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annu Rev Plant Biol*, *61*, 235-261. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112206



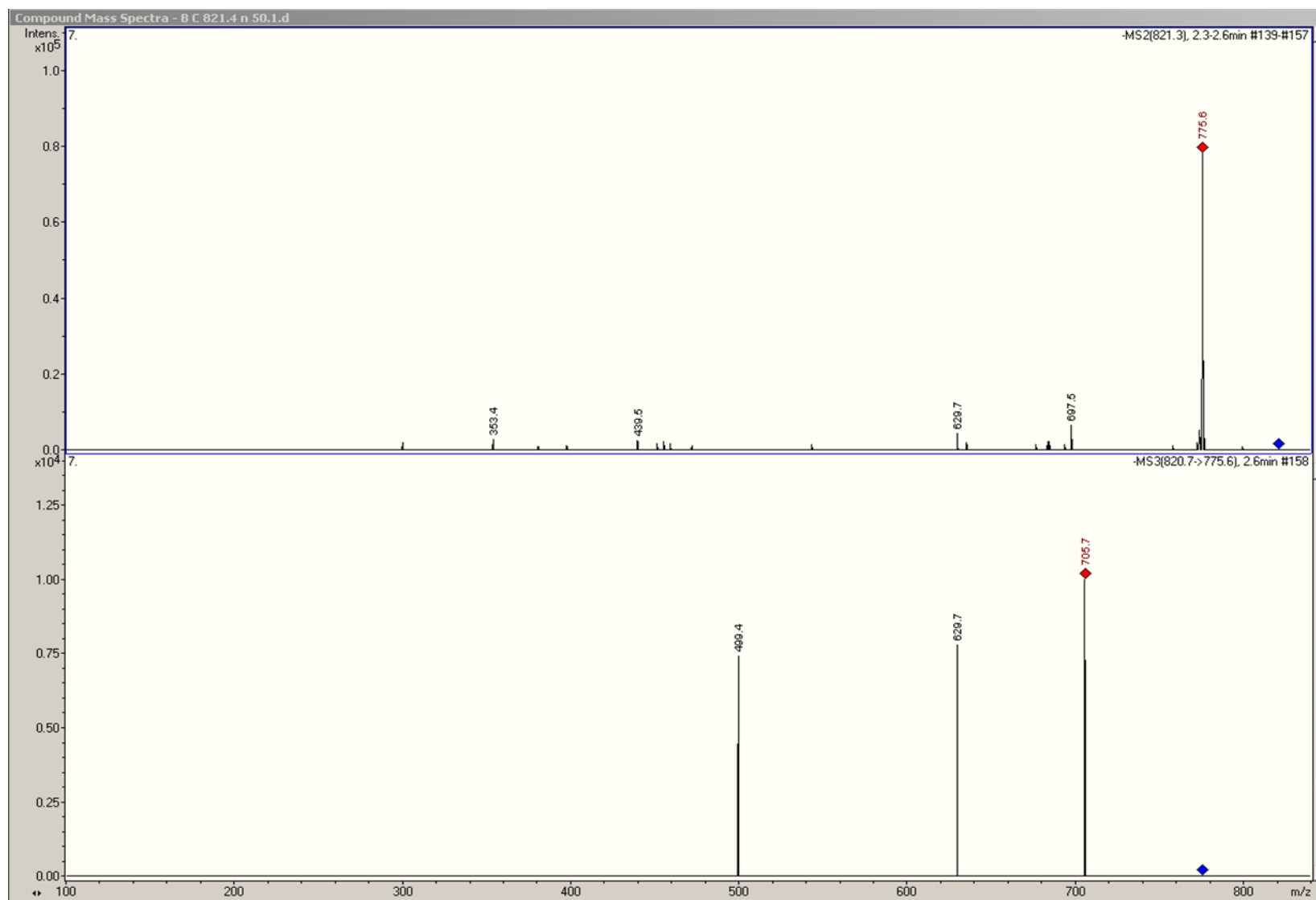
Anexo. Patrón de fragmentación para 609.2 m/z , 32.5 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



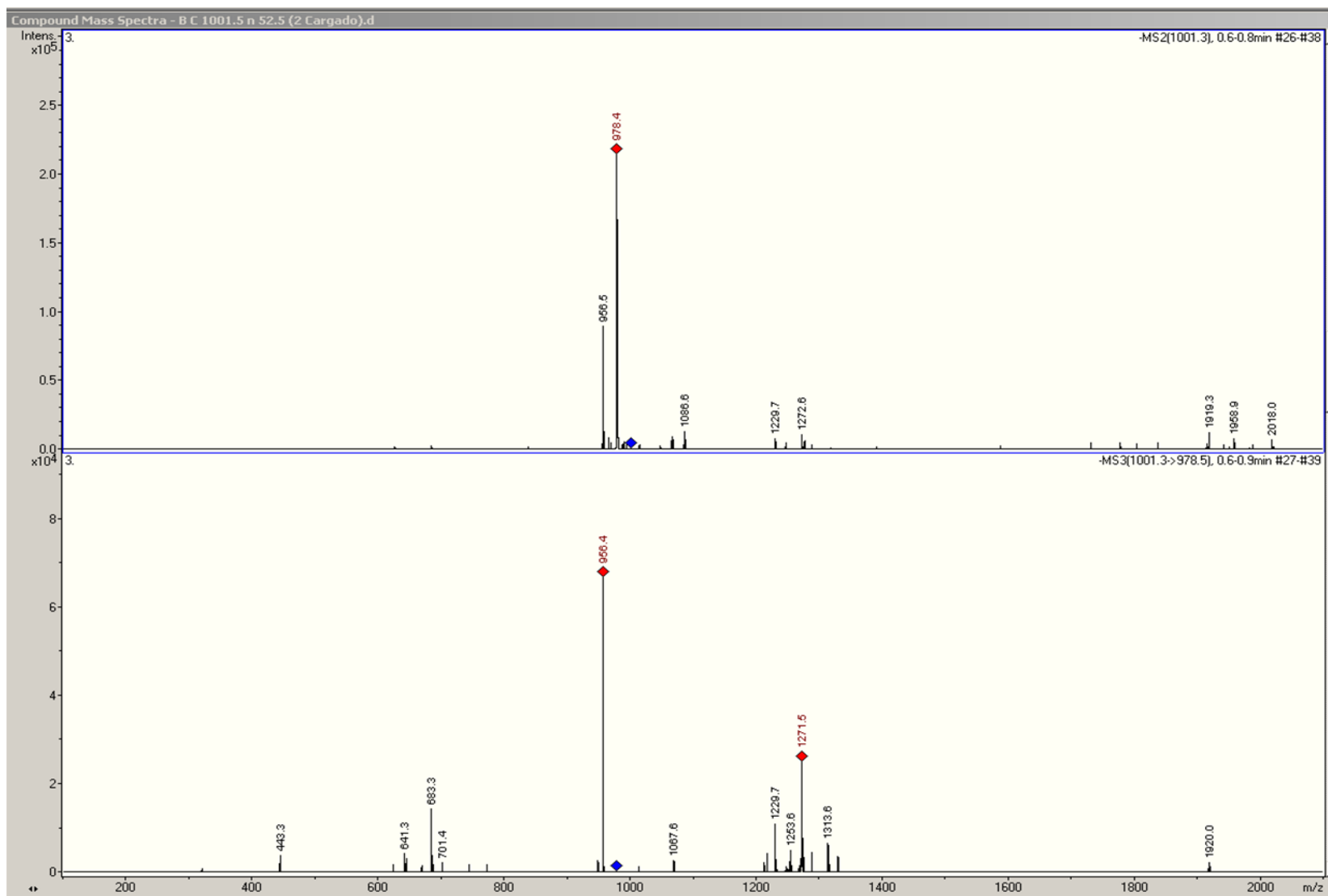
Anexo. Patrón de fragmentación para 609.2 m/z , 32.5 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



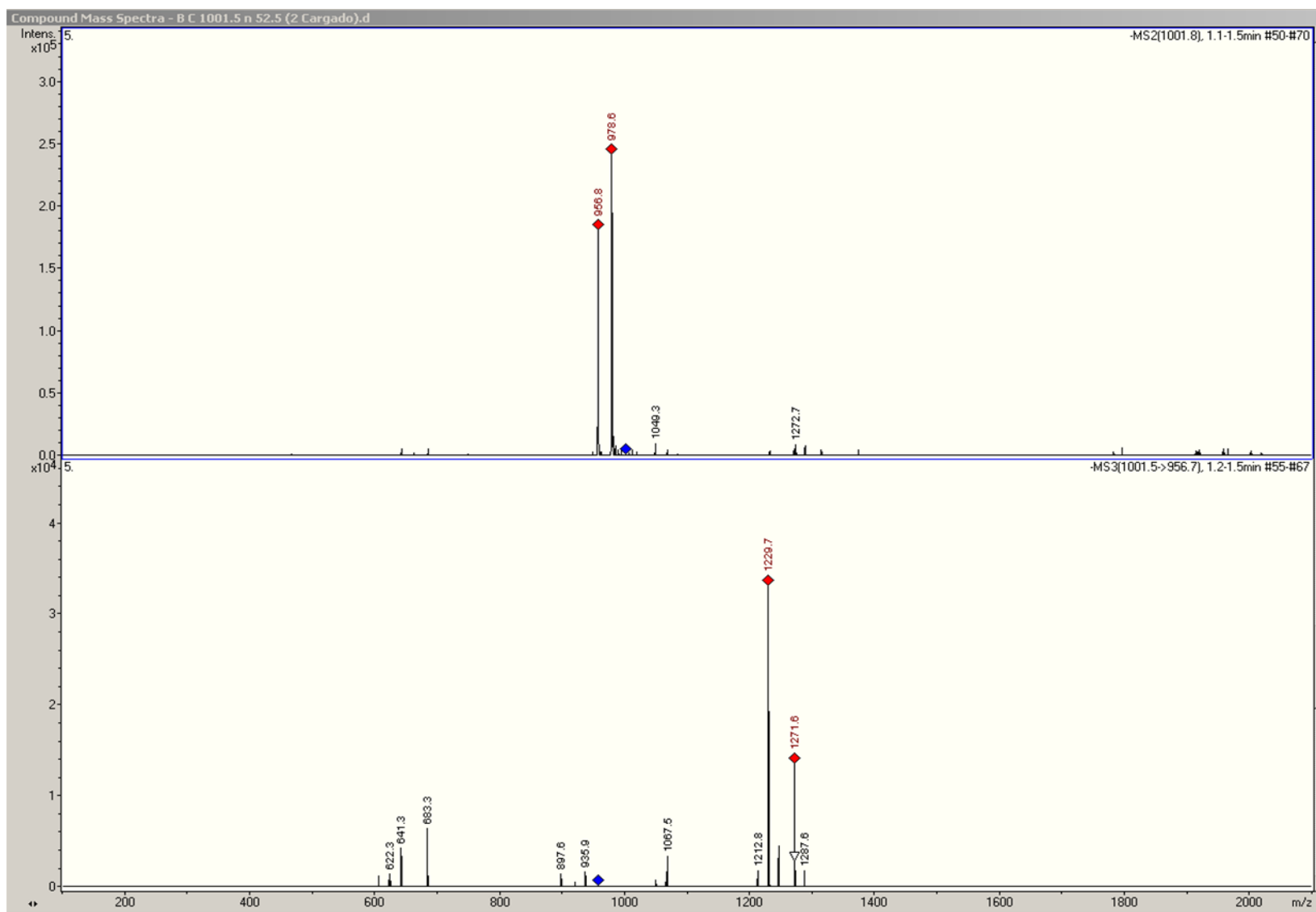
Anexo. Patrón de fragmentación para 821.4 m/z , 32.5 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



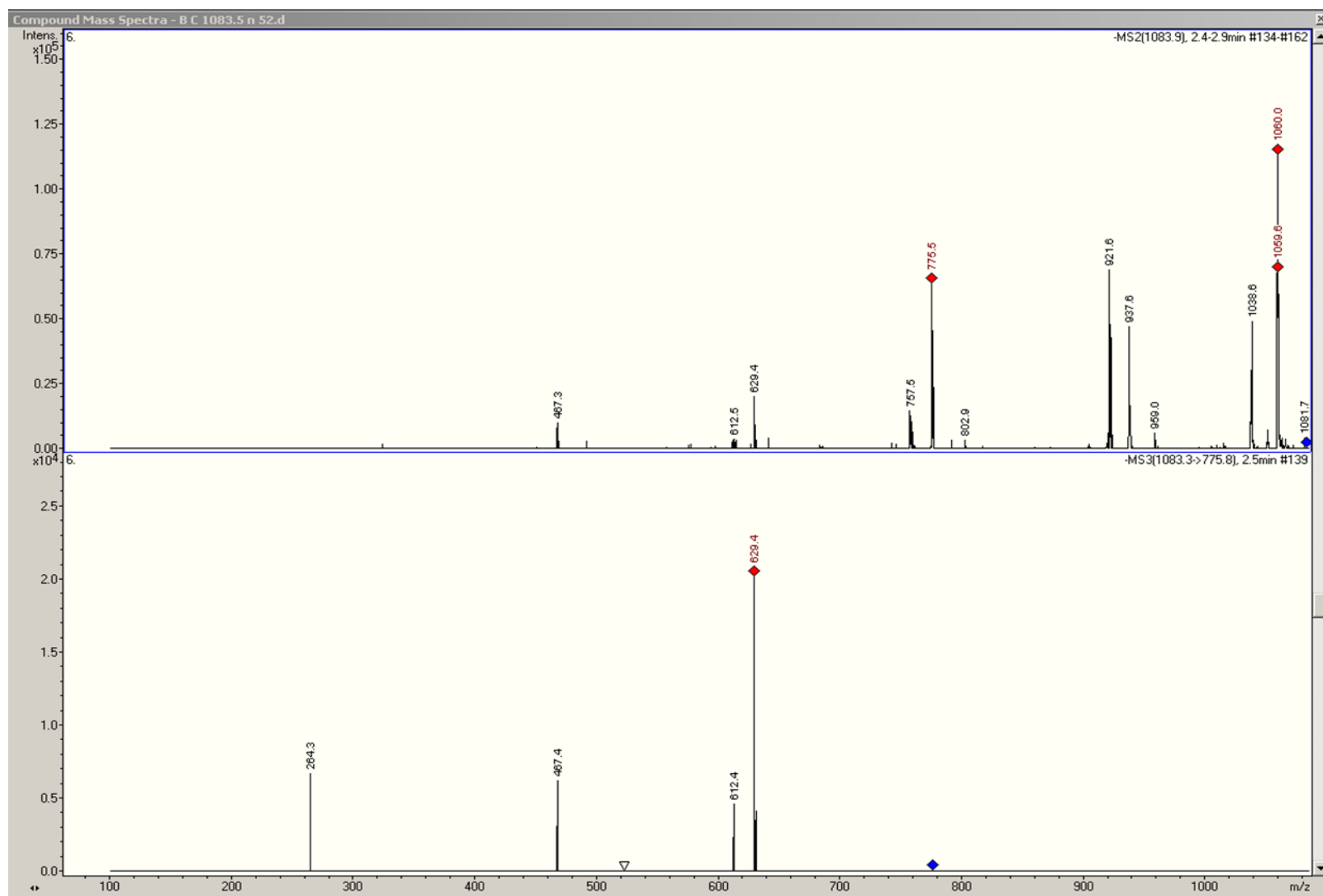
Anexo. Patrón de fragmentación para 821.4 m/z , 32.5 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



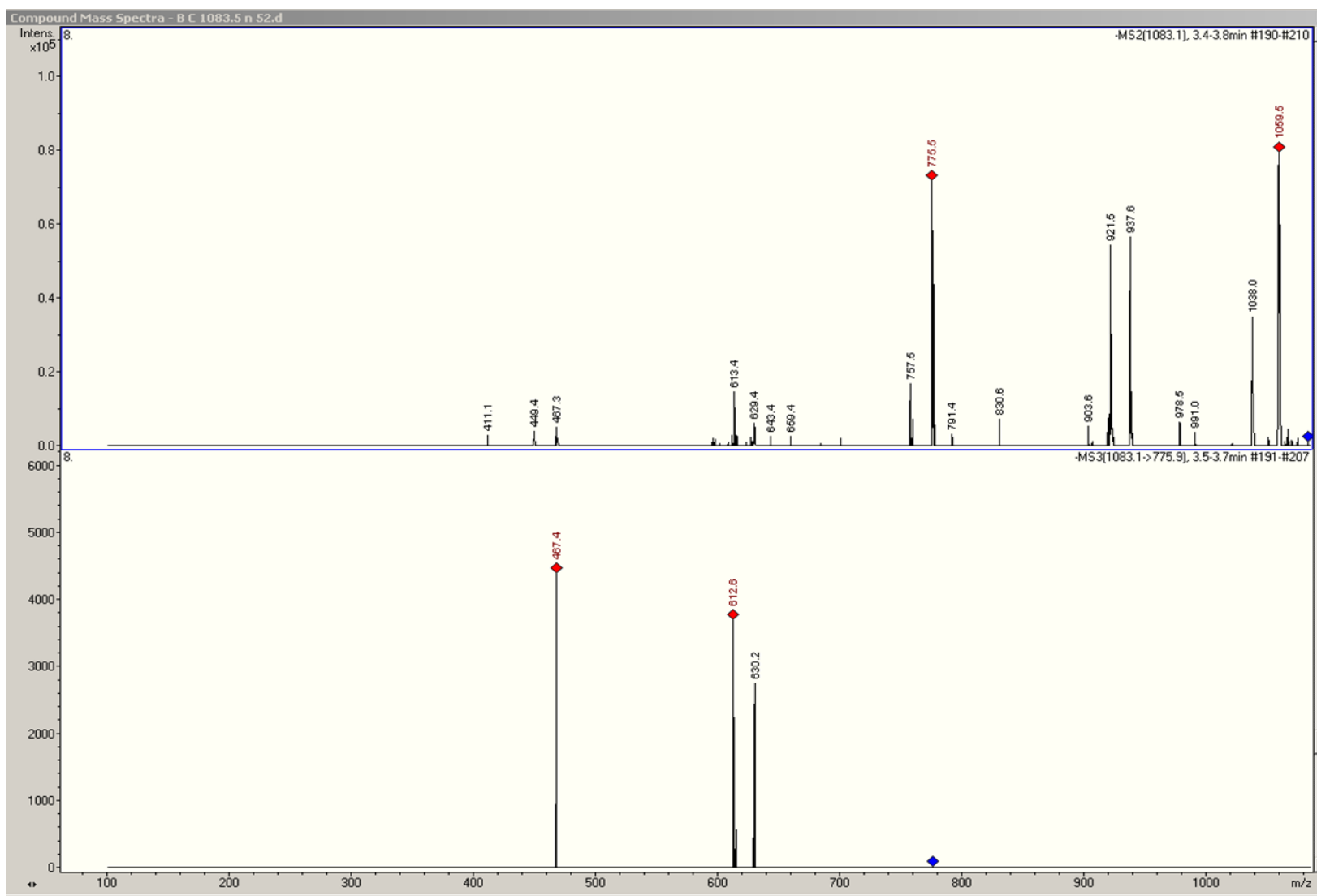
Anexo. Patrón de fragmentación para 1001.4 m/z , 52.5 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



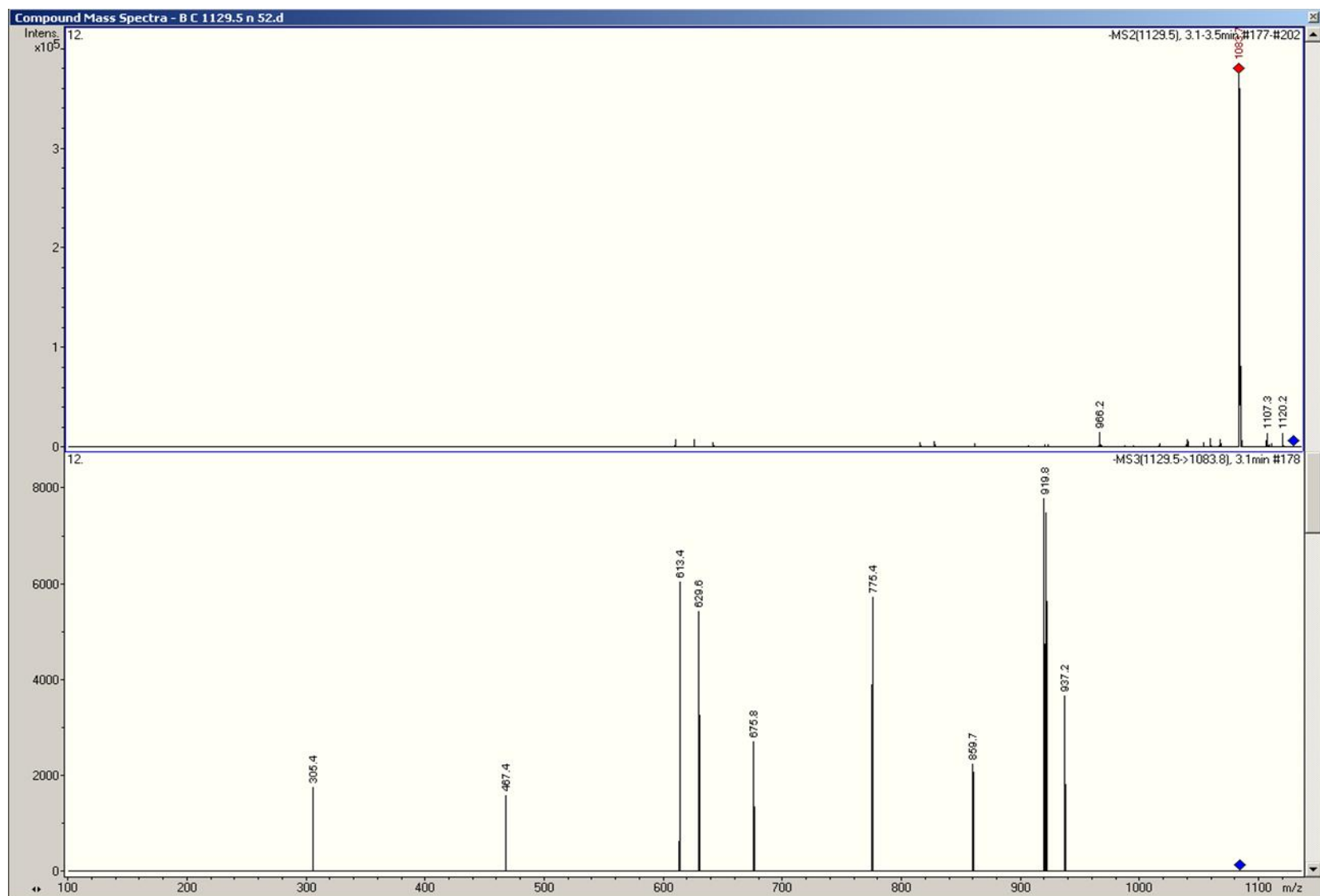
Anexo. Patrón de fragmentación para 1001.4 m/z , 52.5 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



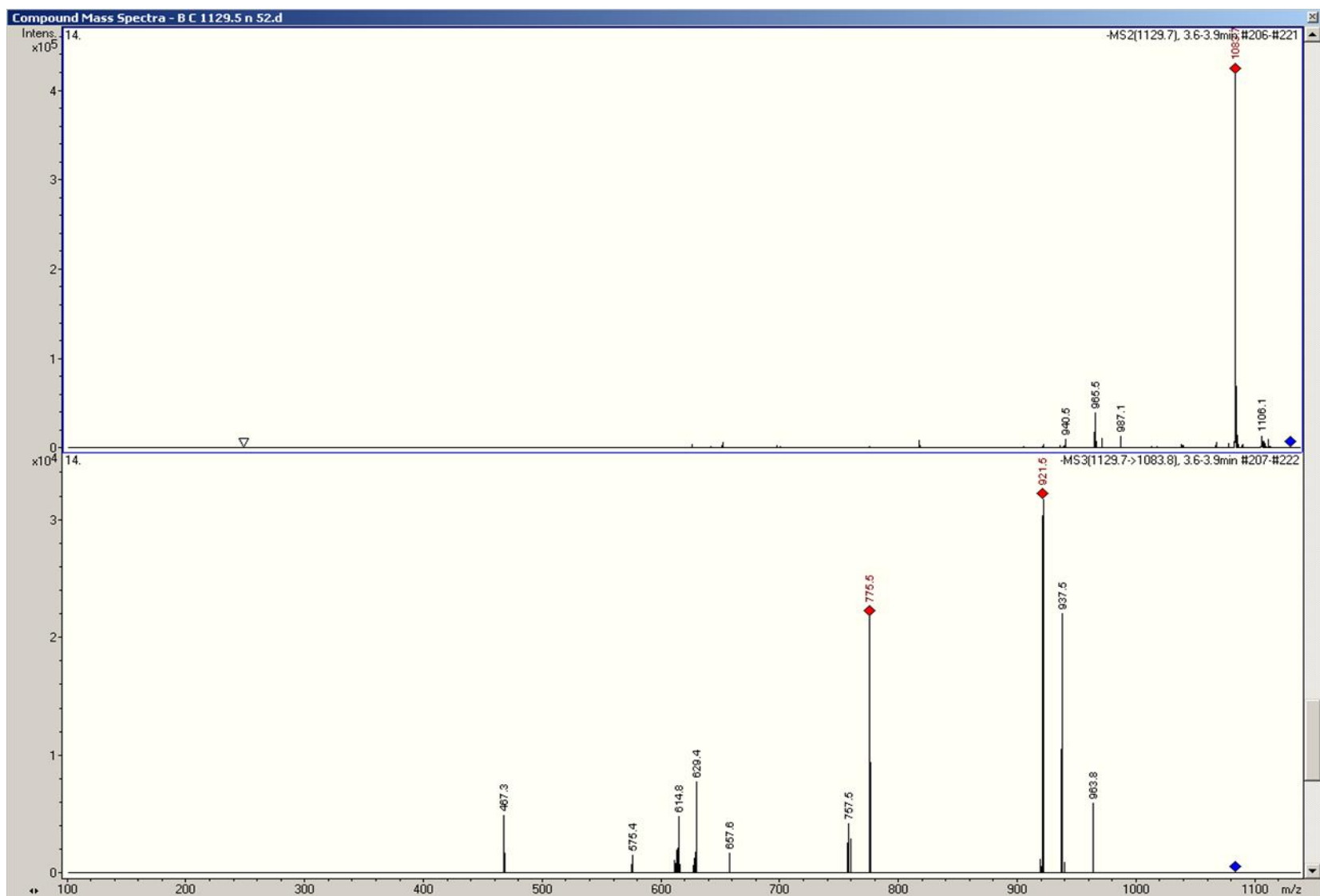
Anexo. Patrón de fragmentación para 1083.5 m/z , 52 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



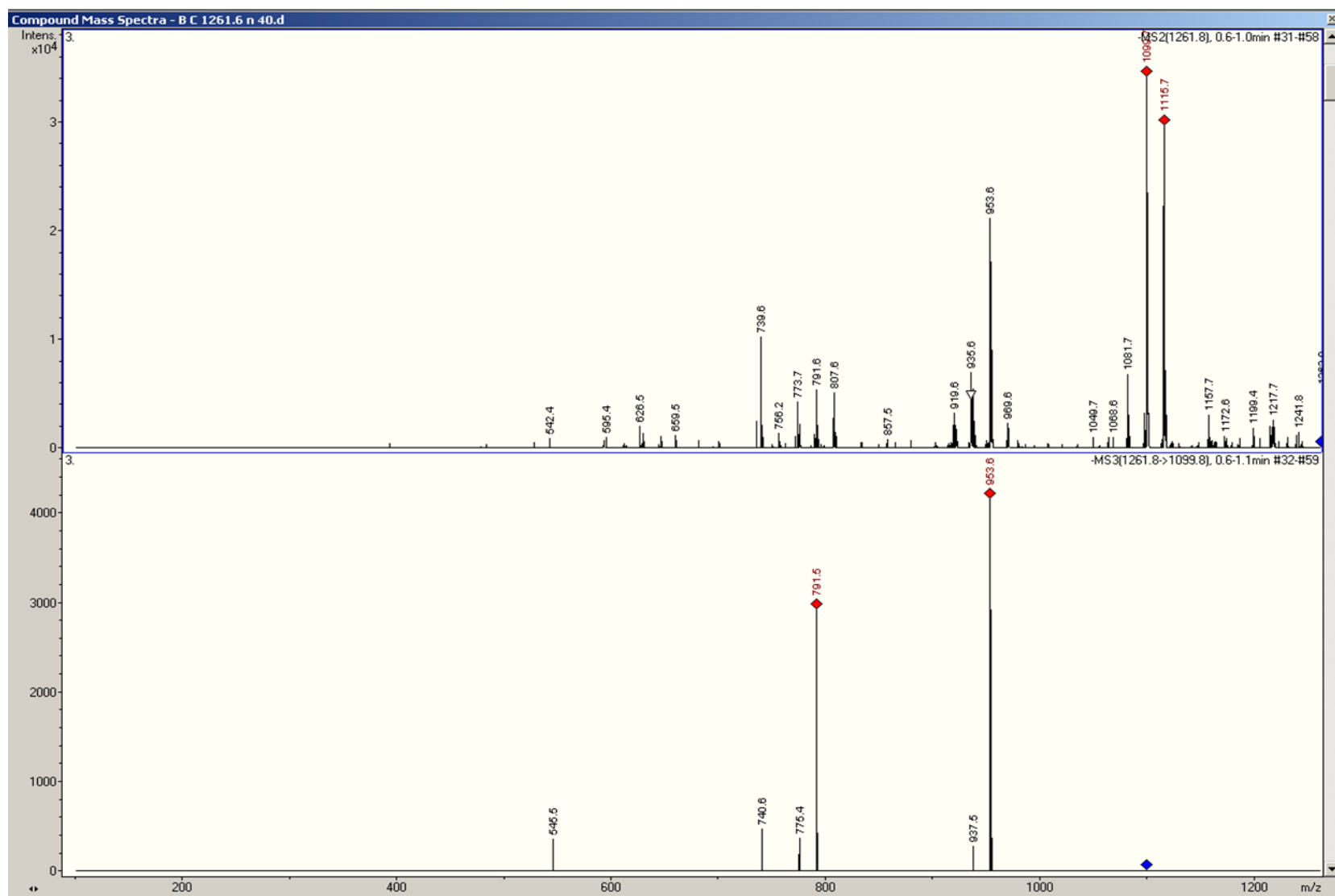
Anexo. Patrón de fragmentación para 1083.5 m/z , 52 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



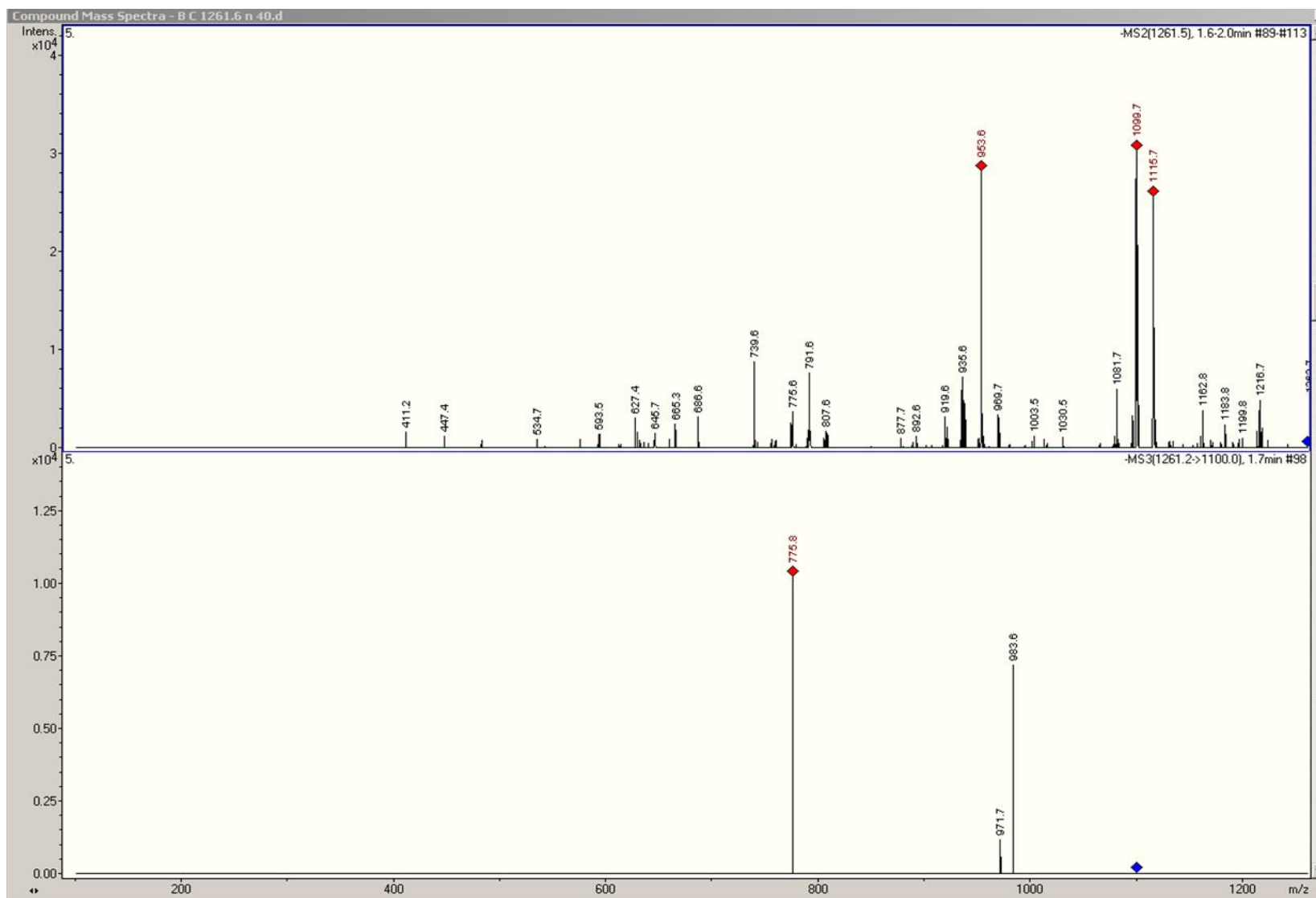
Anexo. Patrón de fragmentación para 1129.5 m/z , 52.46 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



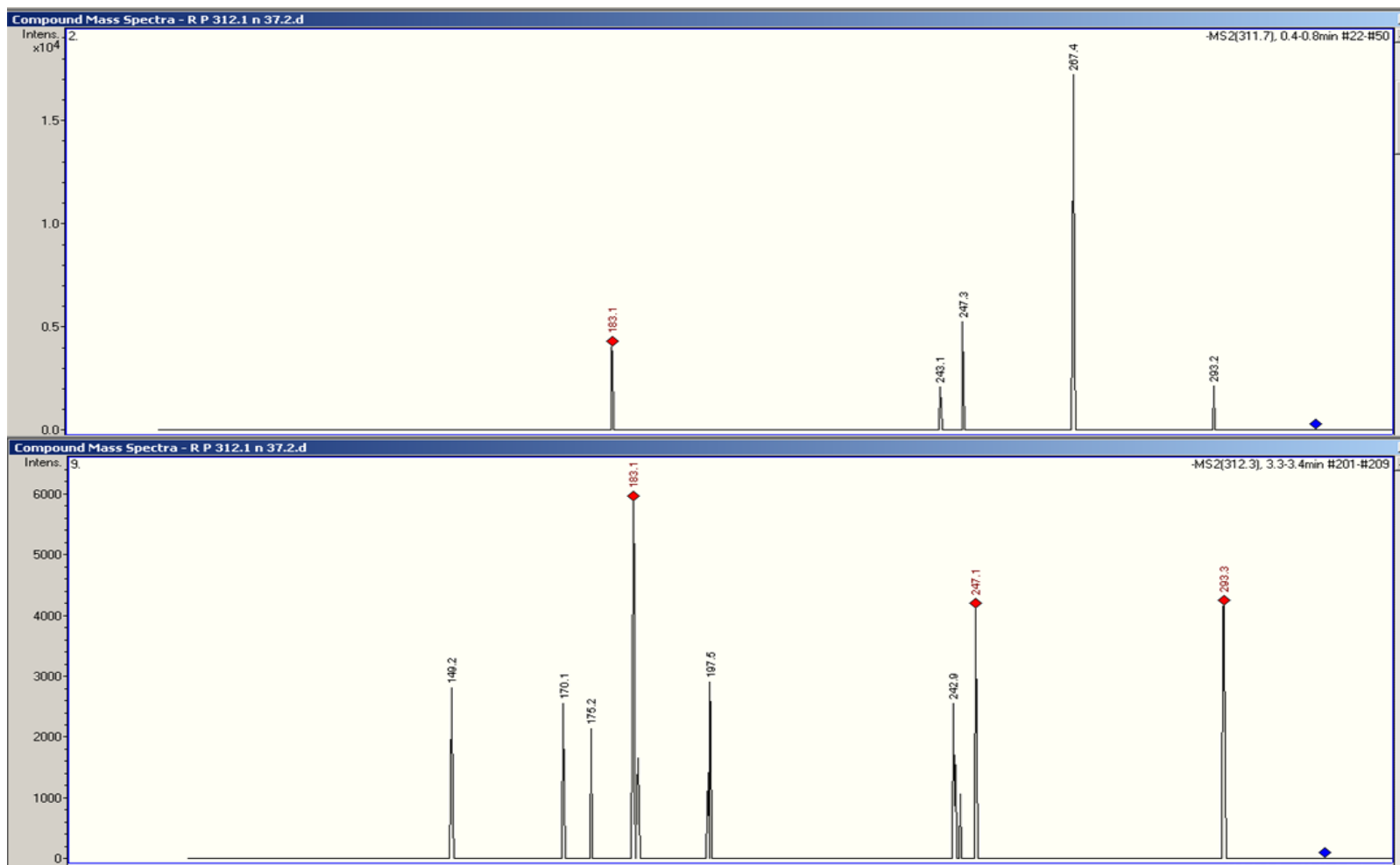
Anexo. Patrón de fragmentación para 1129.5 m/z , 52.46 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



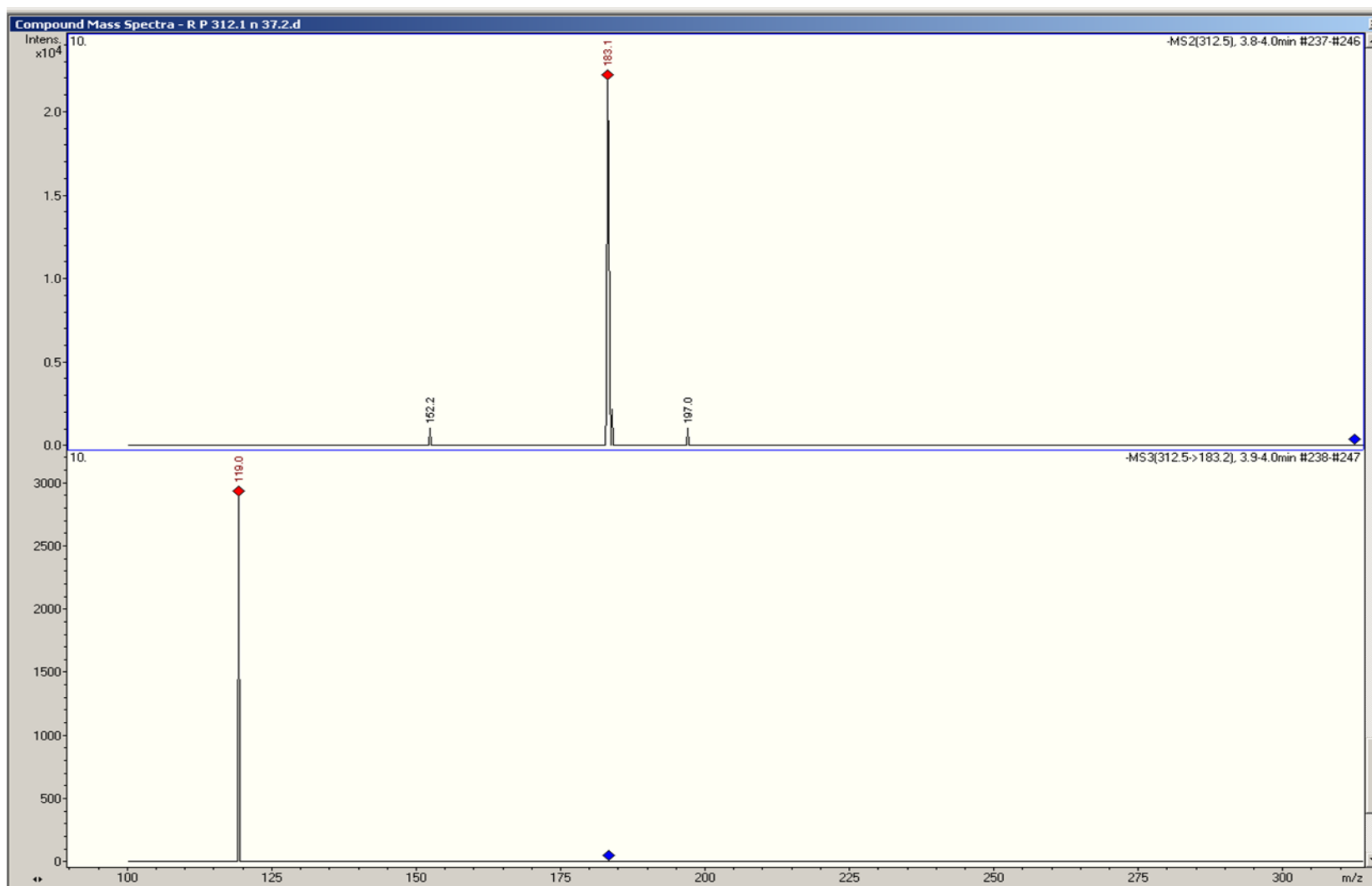
Anexo. Patrón de fragmentación para 1261.5 m/z , 40.5 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



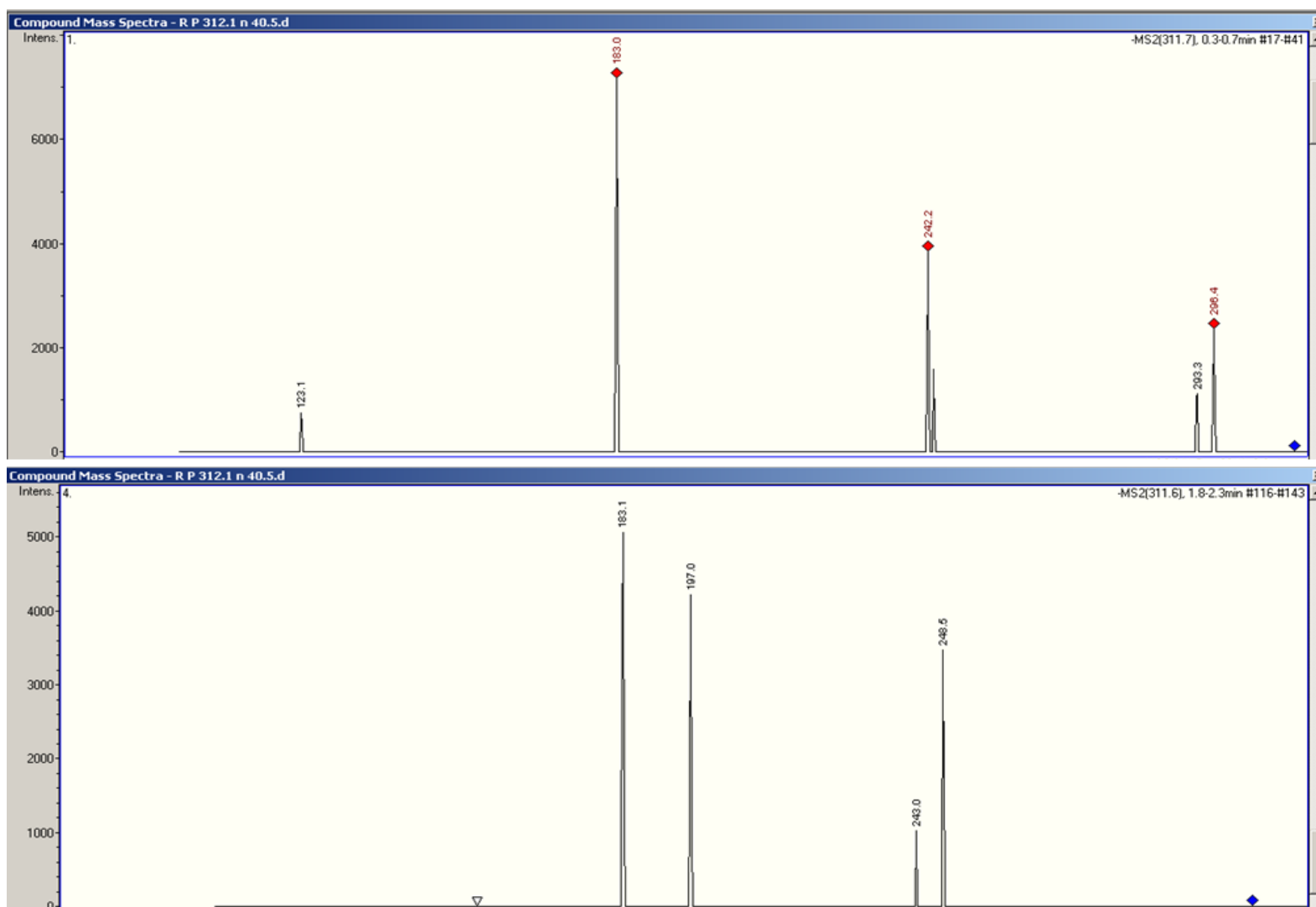
Anexo. Patrón de fragmentación para 1261.5 m/z , 40.5 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



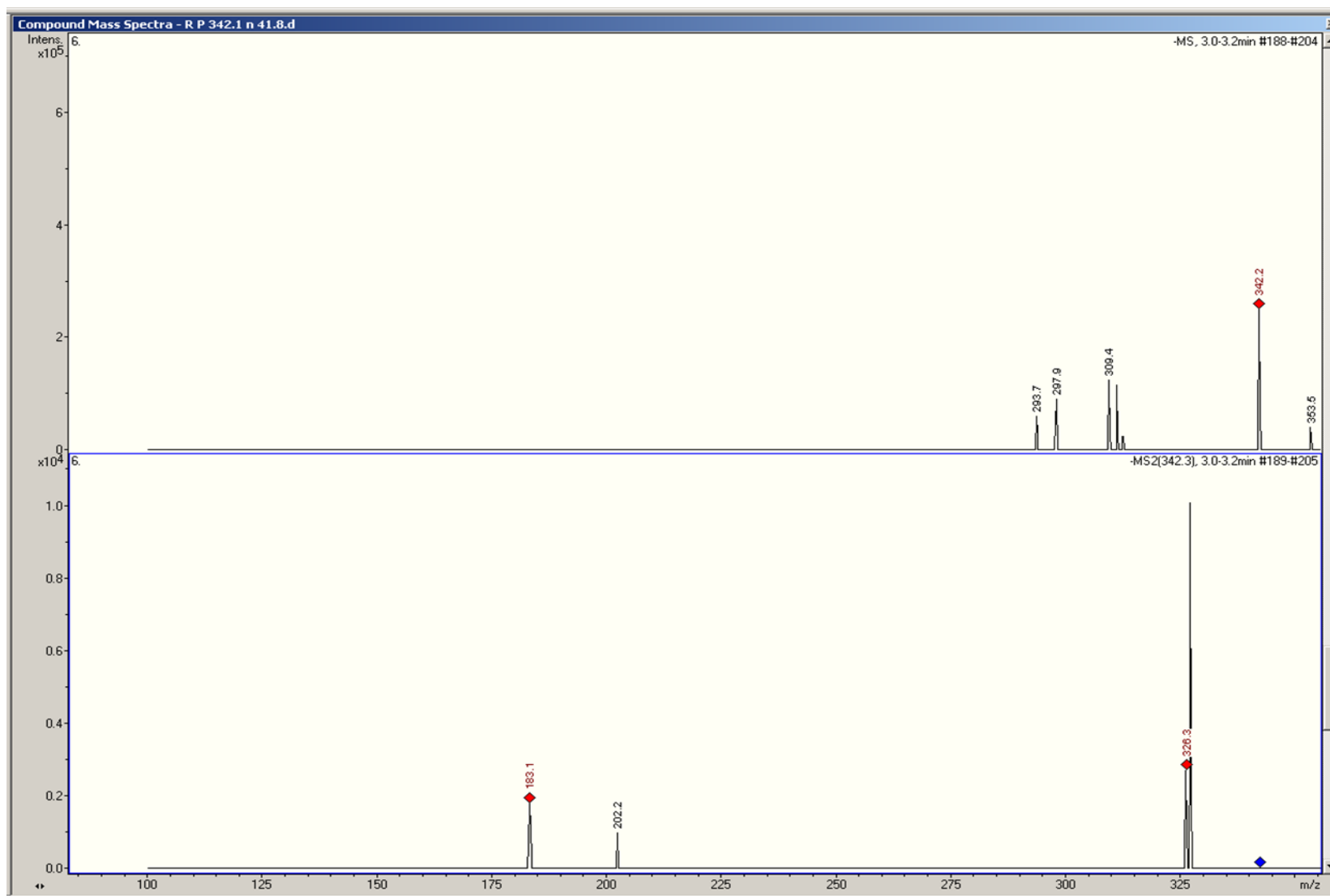
Anexo. Patrón de fragmentación para 312.1 m/z , 37.9 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



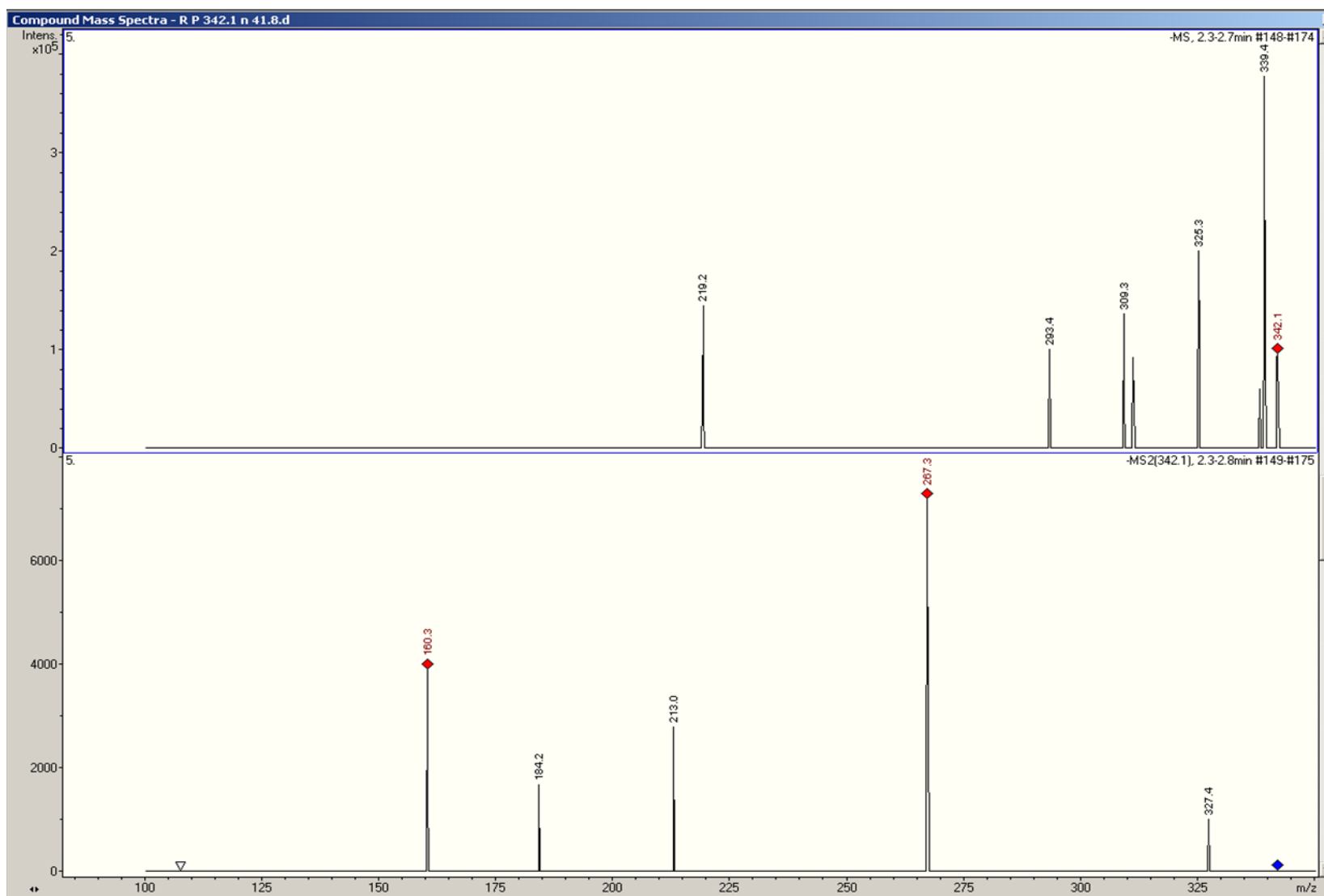
Anexo. Patrón de fragmentación para 312.1 m/z , 37.9 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



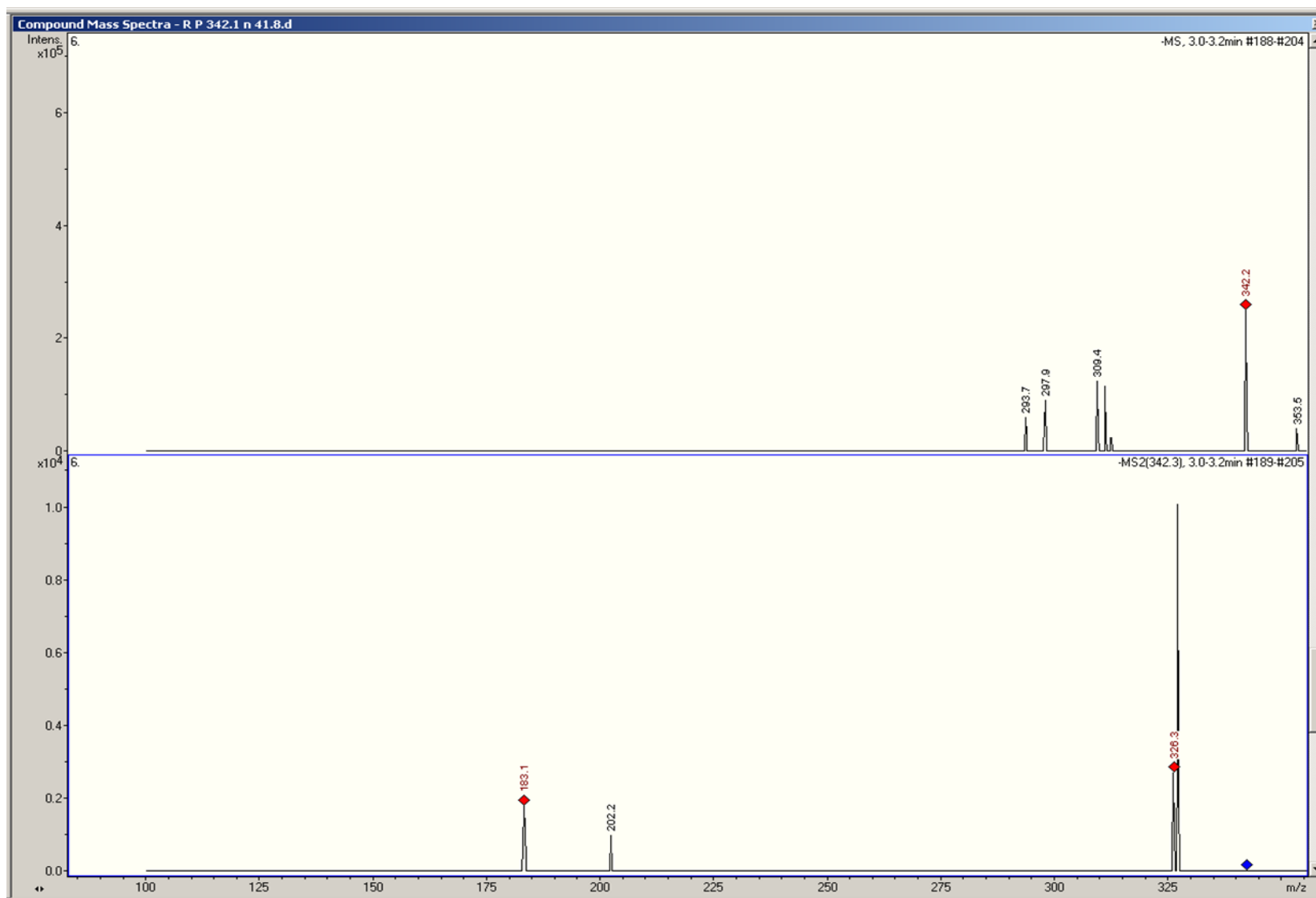
Anexo. Patrón de fragmentación para 312.1 m/z , 41.09 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



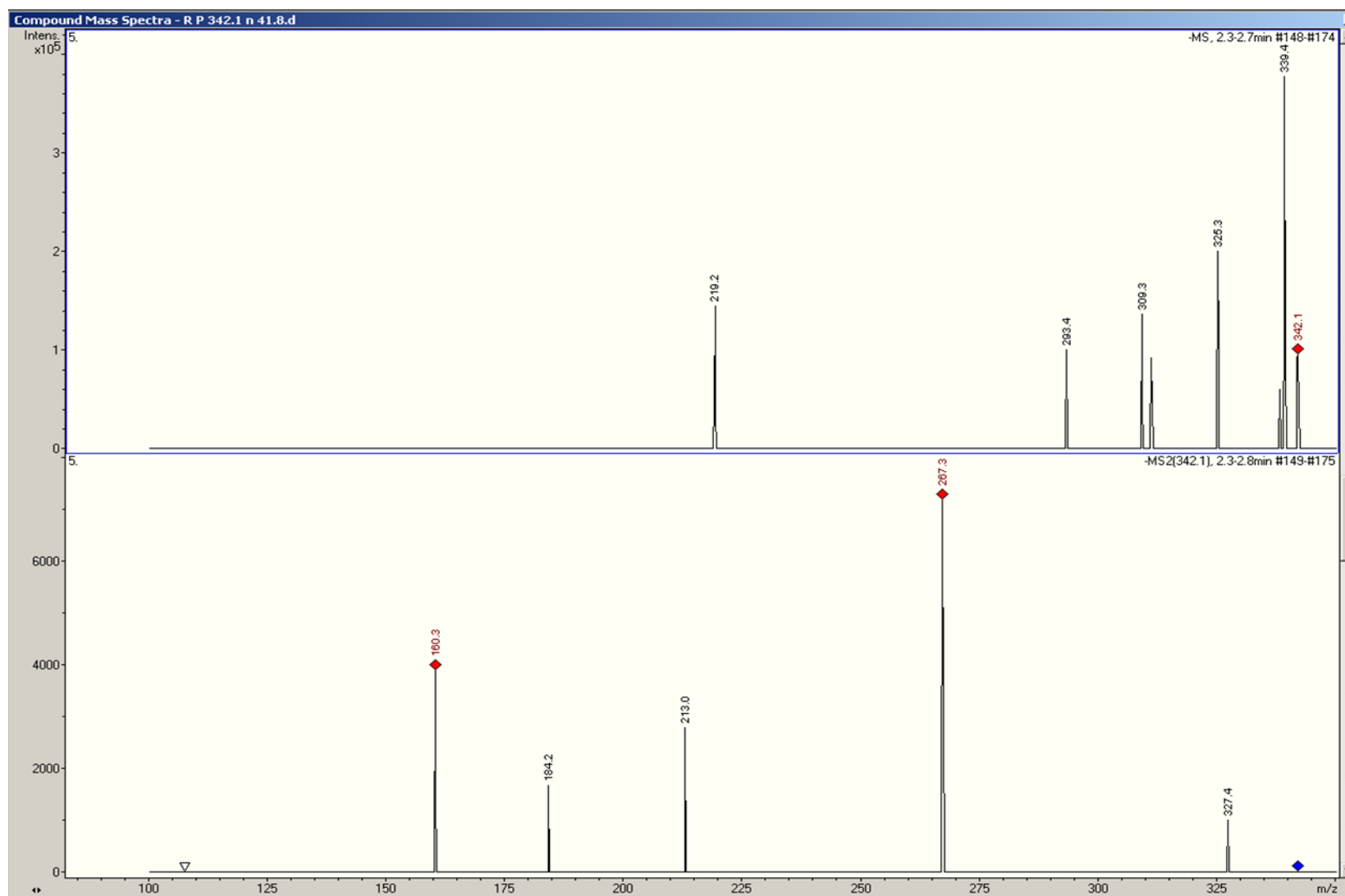
Anexo. Patrón de fragmentación para 328.1 m/z , 36.28 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



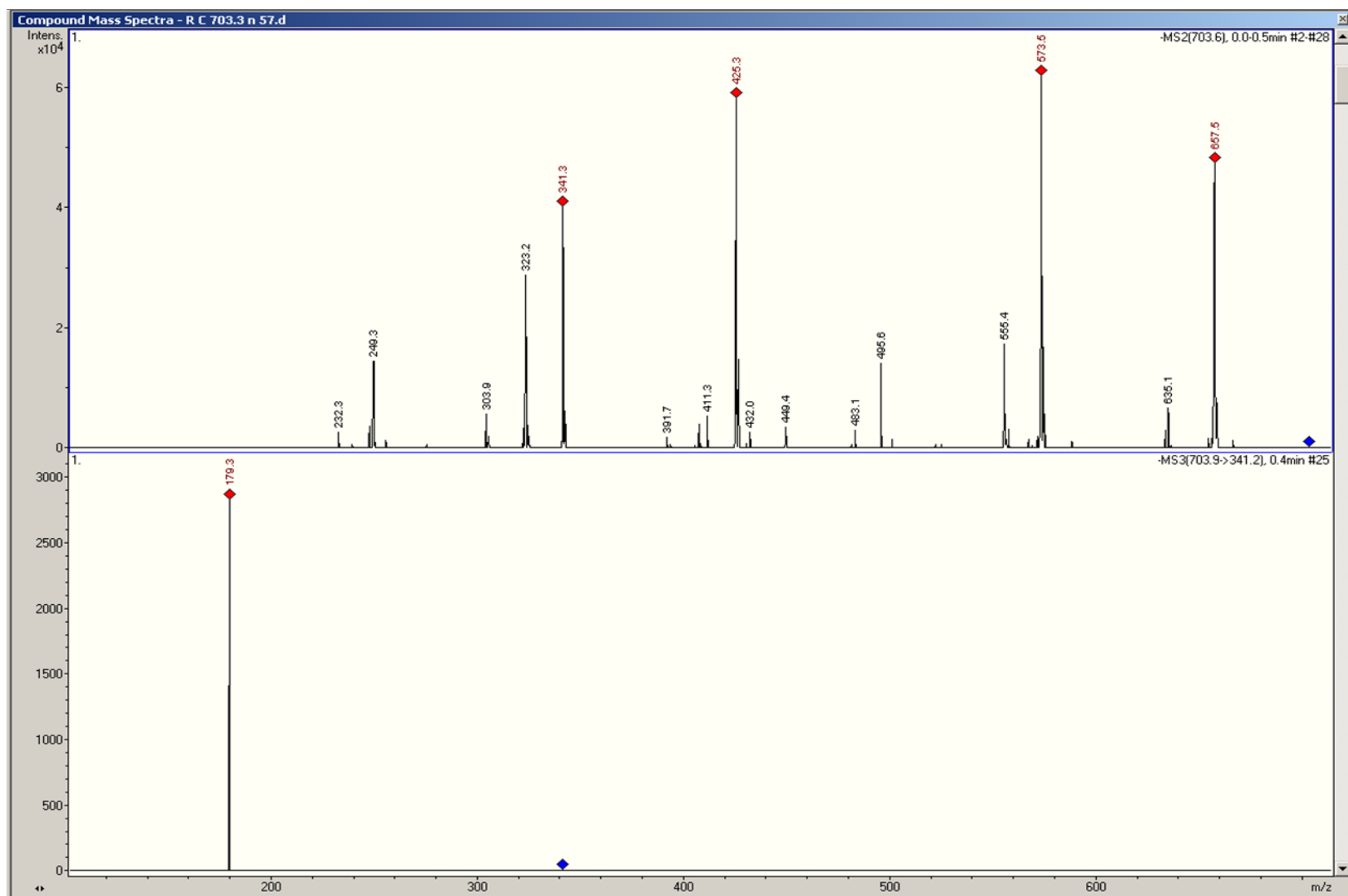
Anexo. Patrón de fragmentación para 328.1 m/z , 36.28 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



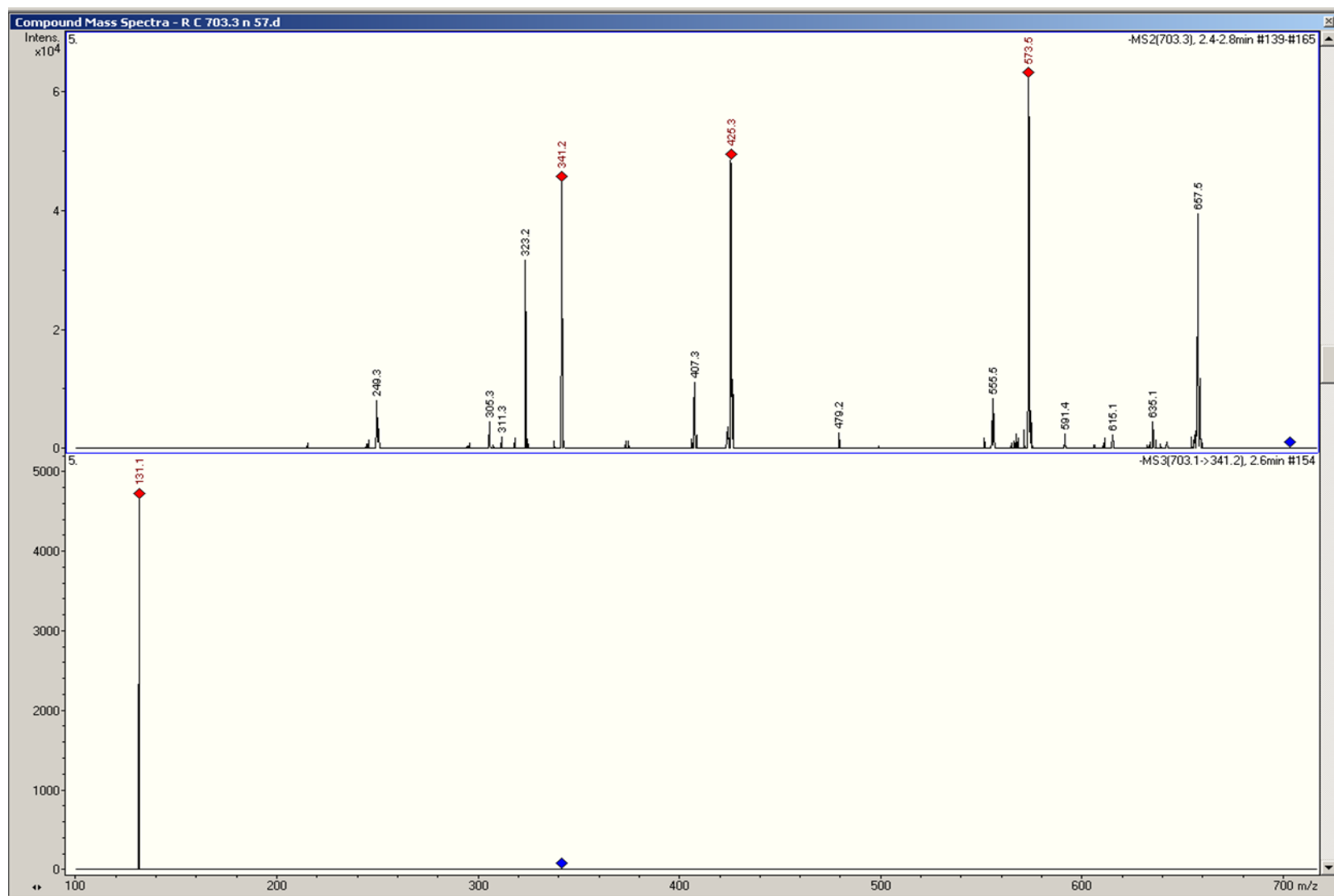
Anexo. Patrón de fragmentación para 328.1 m/z , 36.28 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



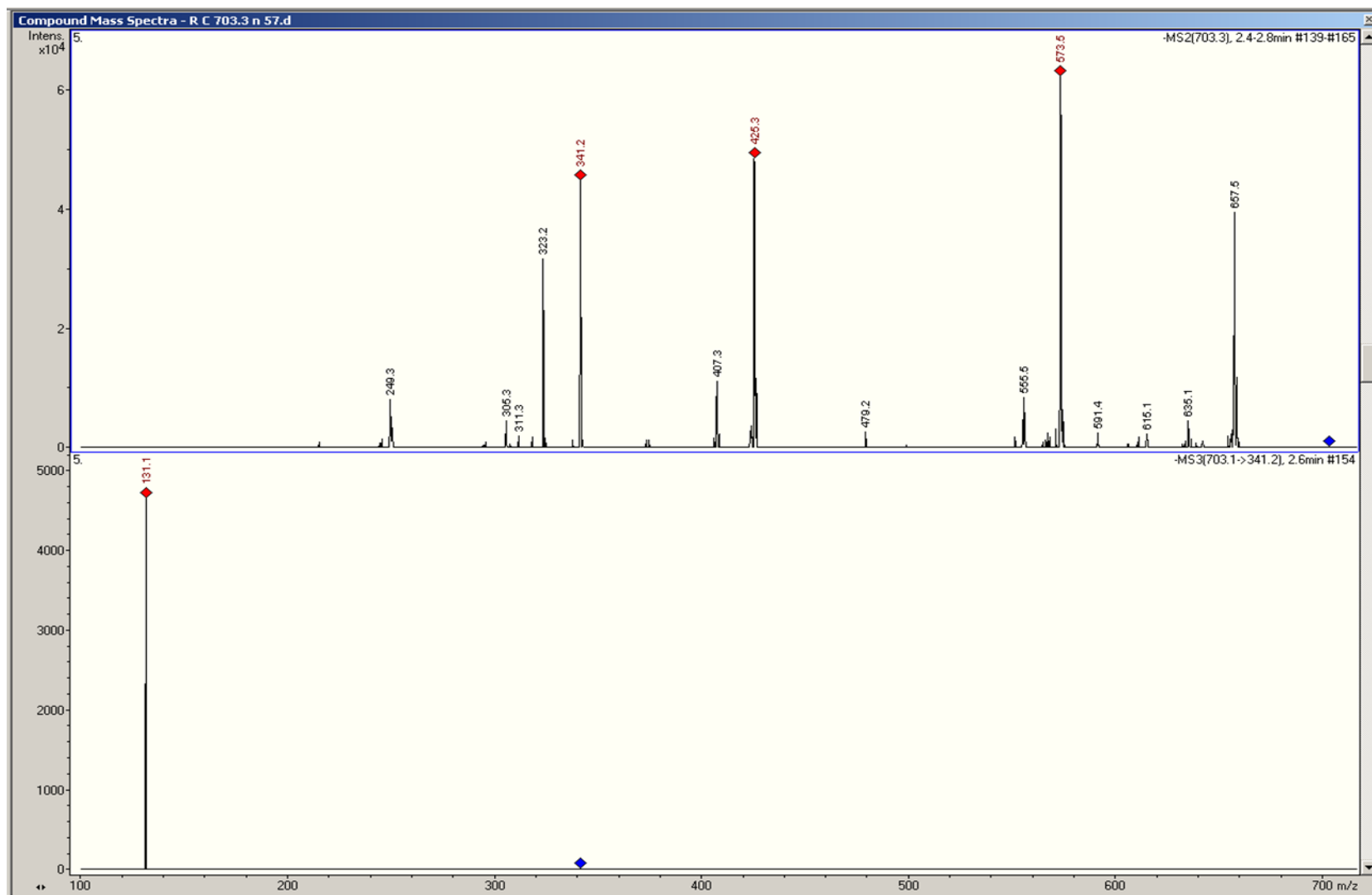
Anexo. Patrón de fragmentación para 328.1 m/z , 36.28 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



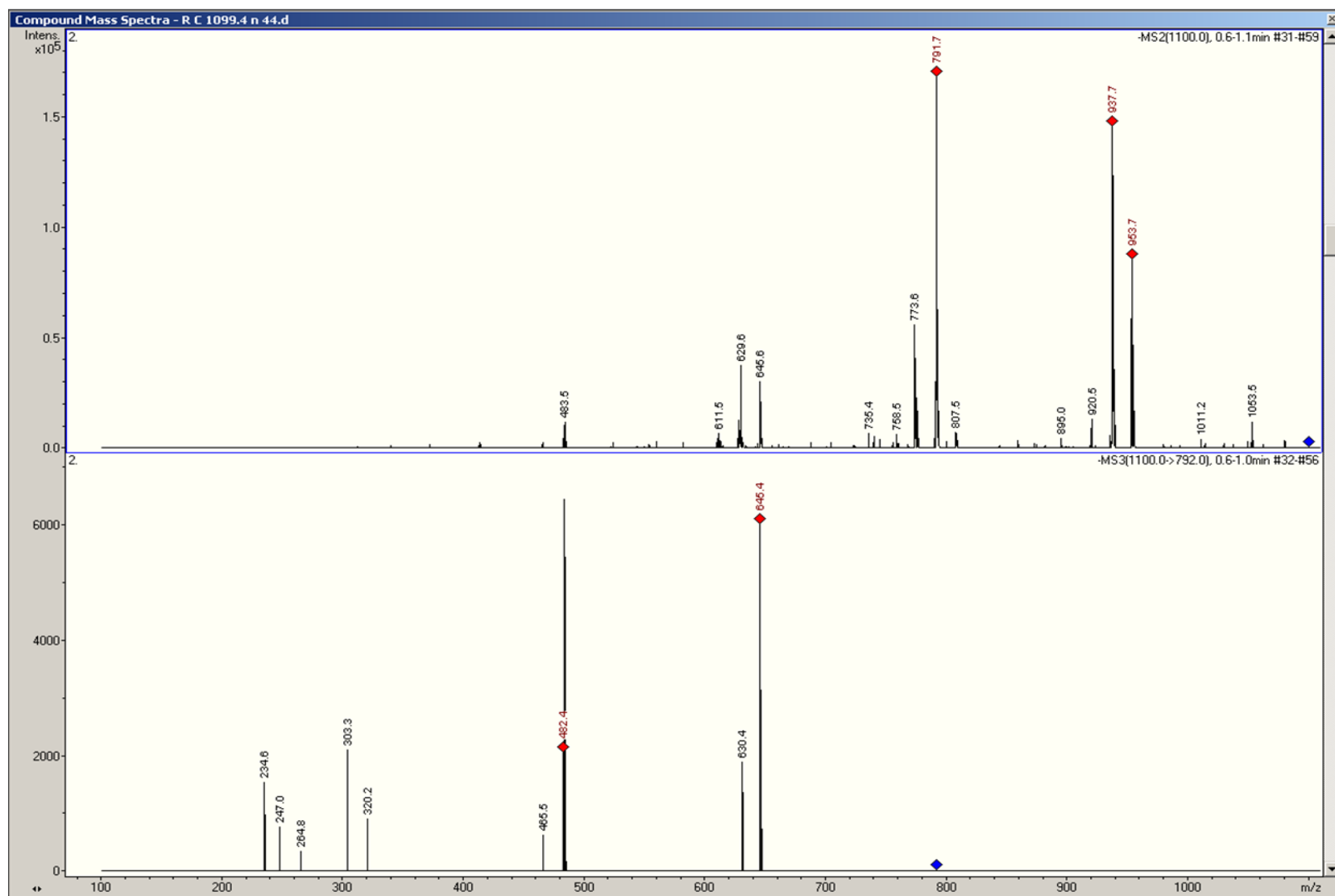
Anexo. Patrón de fragmentación para 703.3 m/z , 57.63 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



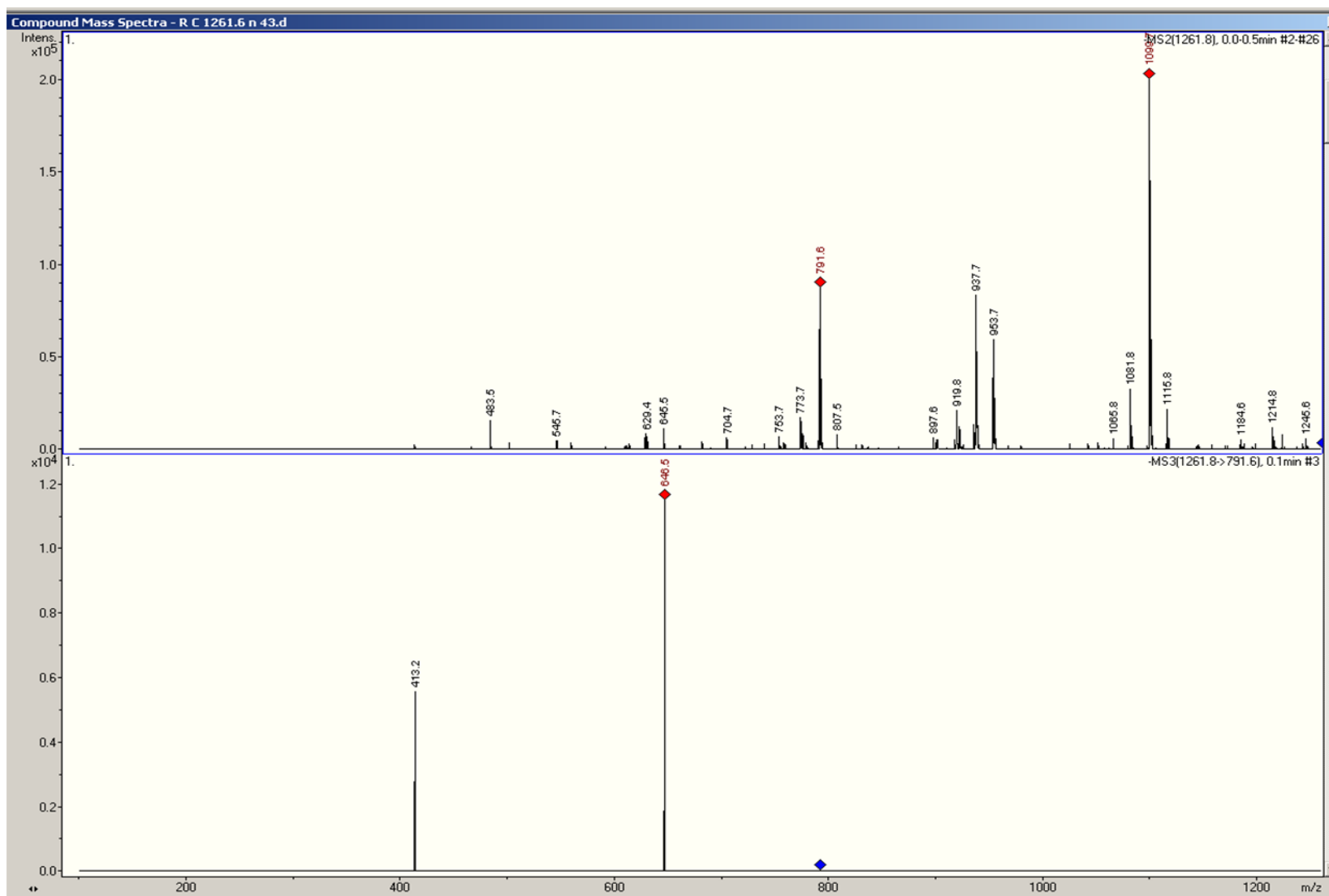
Anexo. Patrón de fragmentación para 703.3 m/z , 57.63 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



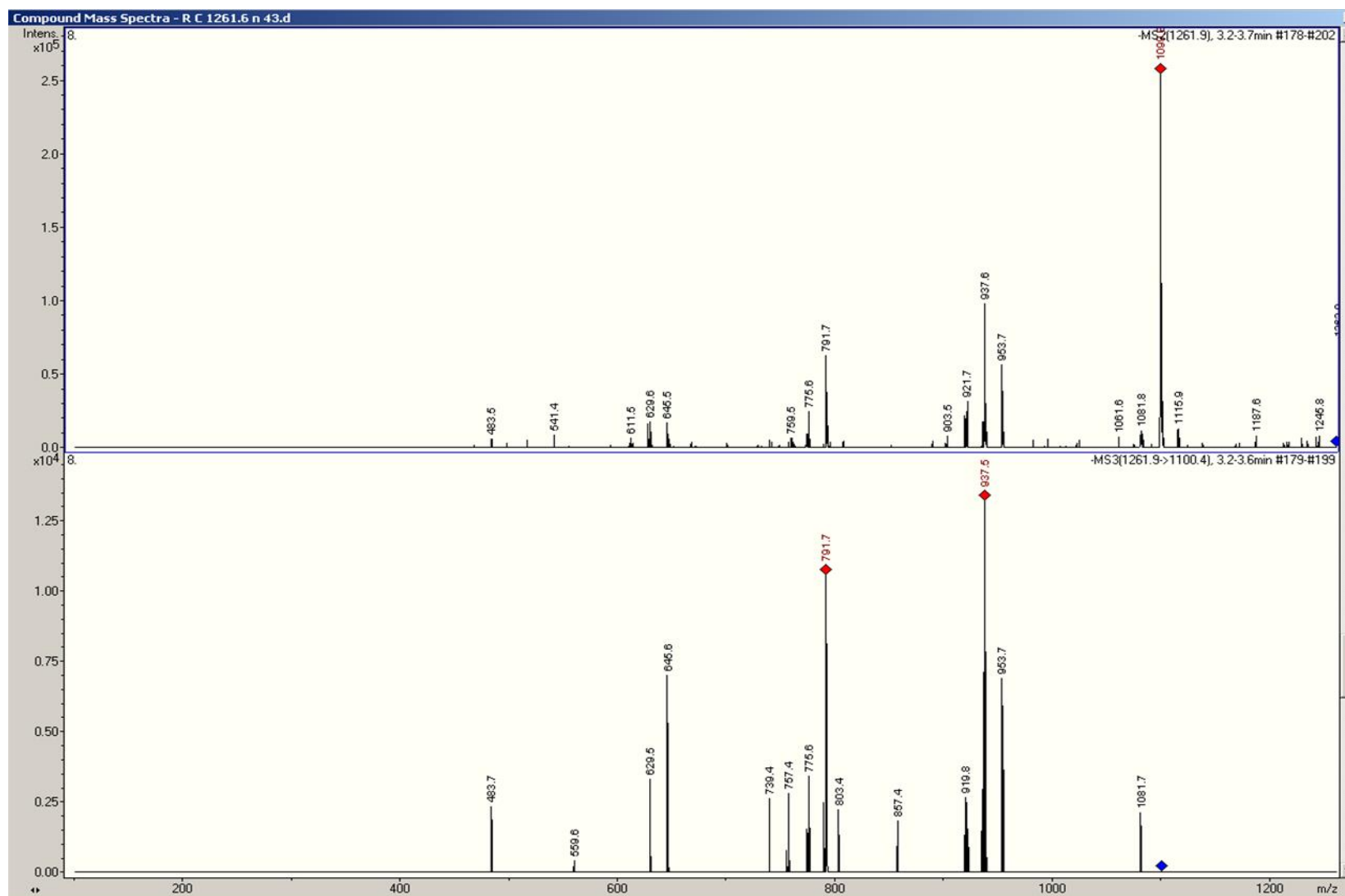
Anexo. Patrón de fragmentación para 1099.5 m/z , 45.06 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



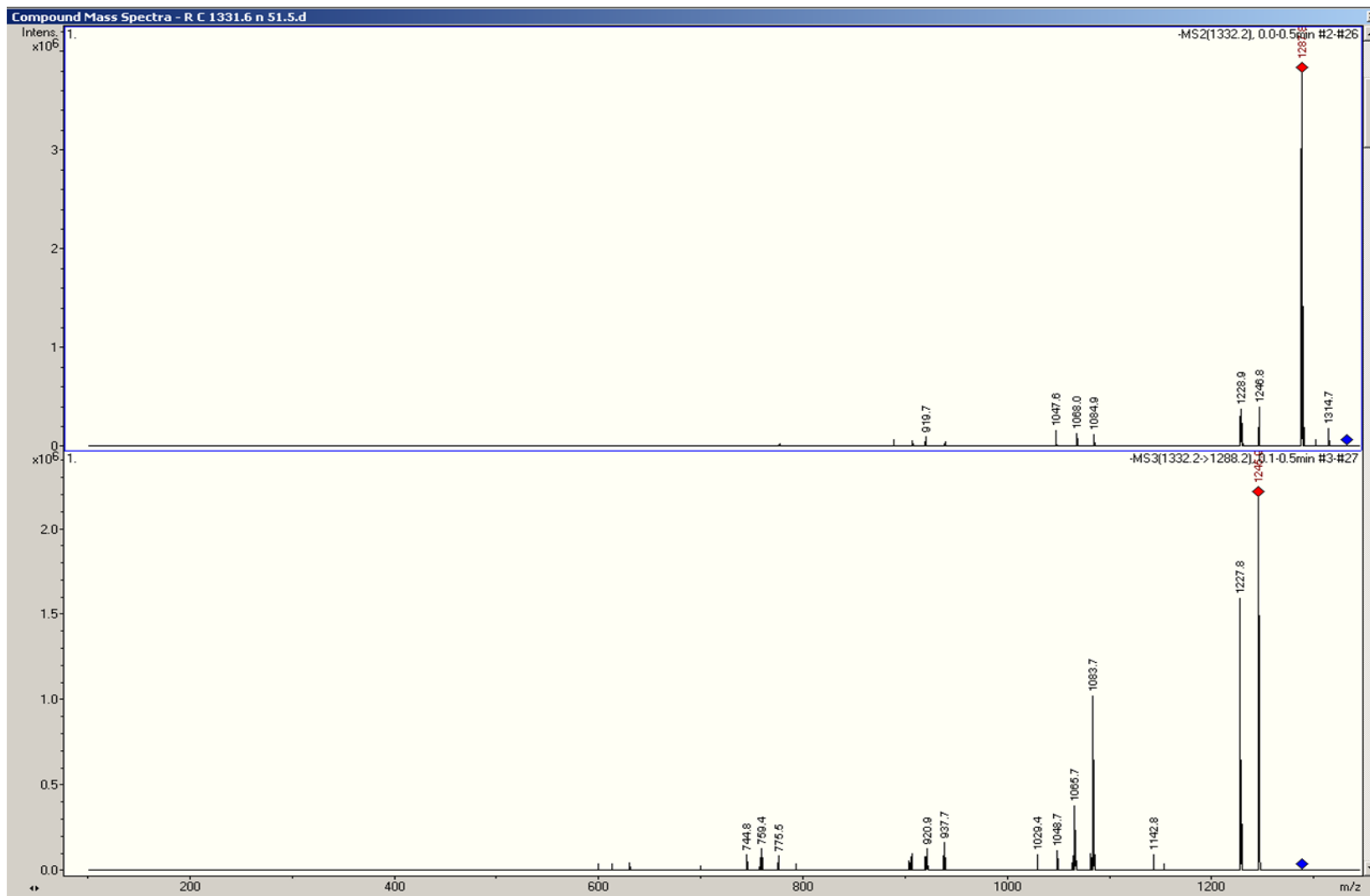
Anexo. Patrón de fragmentación para 1099.5 m/z , 45.06 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



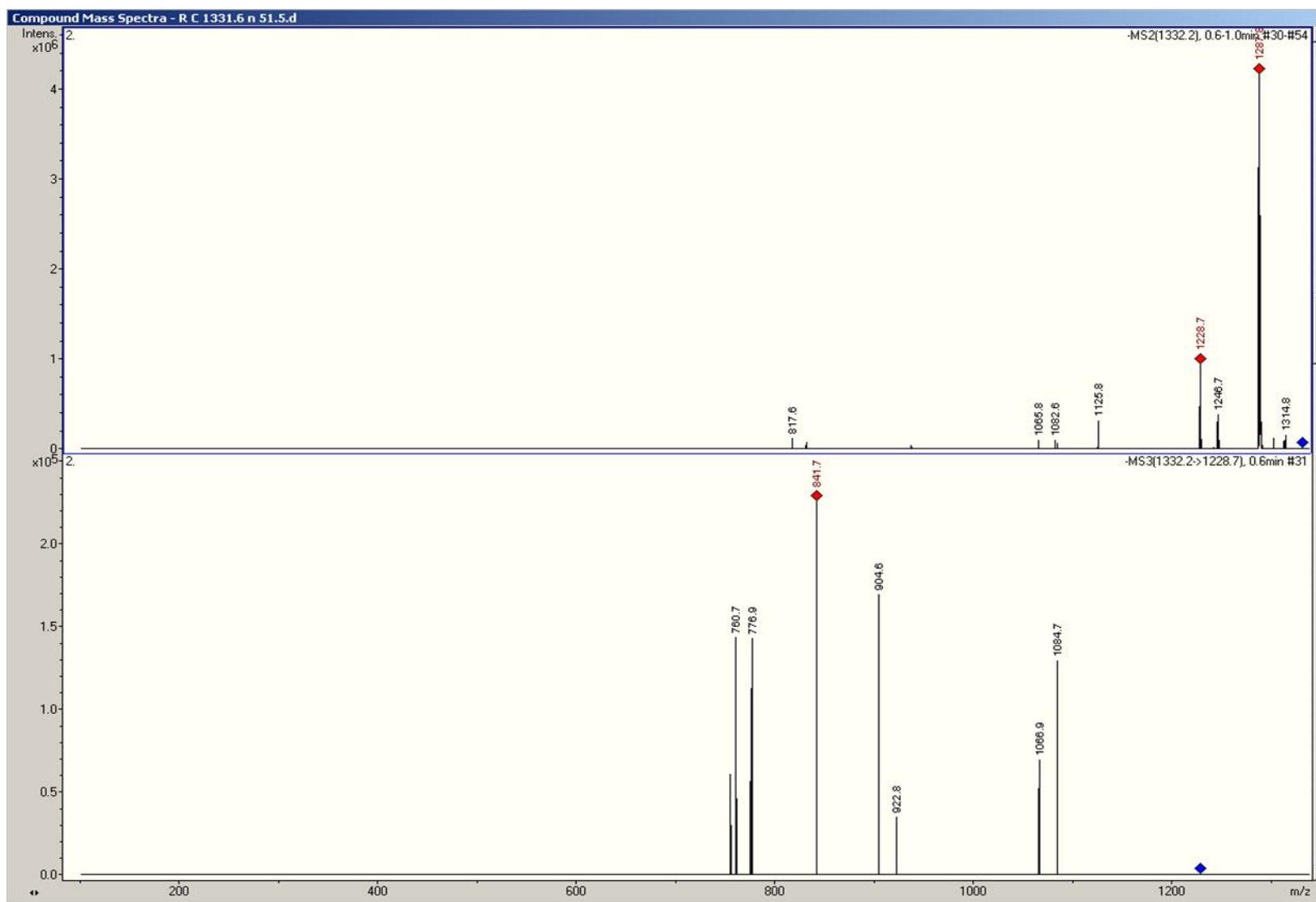
Anexo. Patrón de fragmentación para 1261.6 m/z , 43.32 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



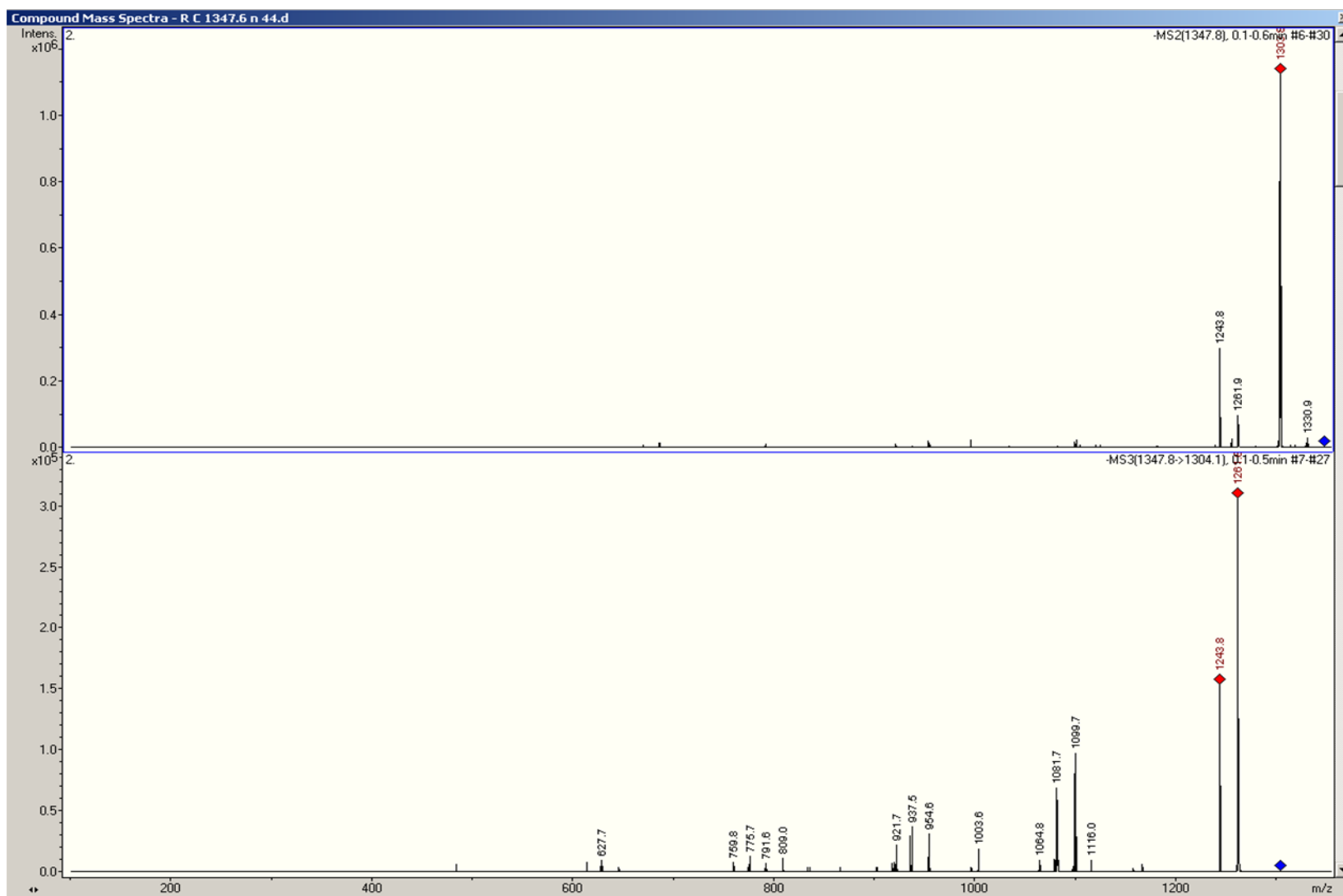
Anexo. Patrón de fragmentación para 1261.6 m/z , 43.32 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



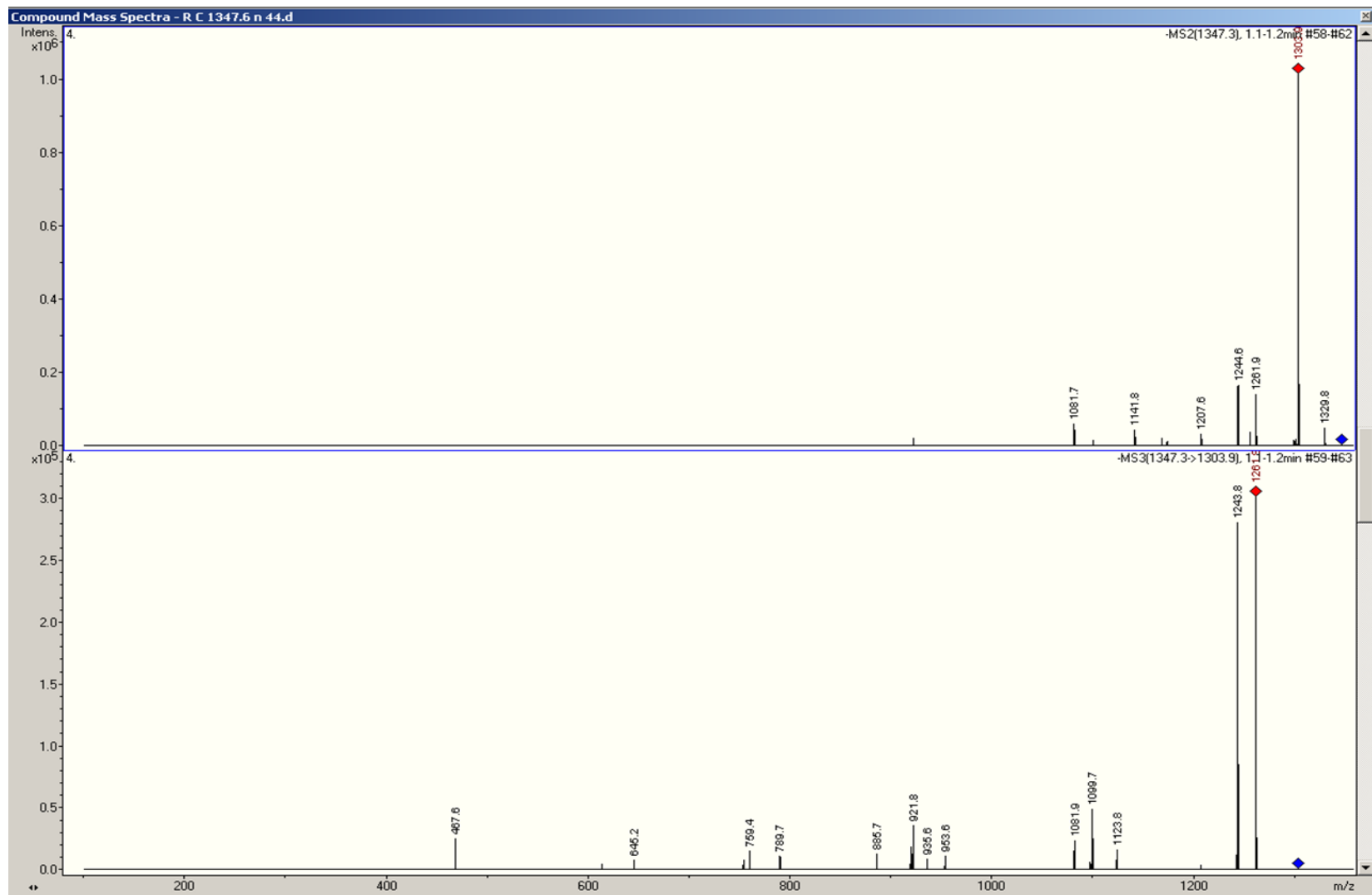
Anexo. Patrón de fragmentación para 1331.56 m/z , 52,07 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



Anexo. Patrón de fragmentación para 1331.56 m/z , 52,07 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.



Anexo. Patrón de fragmentación para 1347.59 m/z , 44.28 RT, obtenido en trampa de iones (primera parte). Ver Tabla 5-6.



Anexo. Patrón de fragmentación para 1347.59 m/z , 44.28 RT, obtenido en trampa de iones (segunda parte). Ver Tabla 5-6.