

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Diversidad Genética del Chile Habanero, Genes y Rutas Metabólicas que Regulan la
Síntesis de Capsaicinoides

Por:

ANSELMO DE LA CRUZ JUÁREZ

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Enero, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Diversidad Genética del Chile Habanero, Genes y Rutas Metabólicas que Regulan la
Síntesis de Capsaicinoides

Por:

ANSELMO DE LA CRUZ JUÁREZ

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:

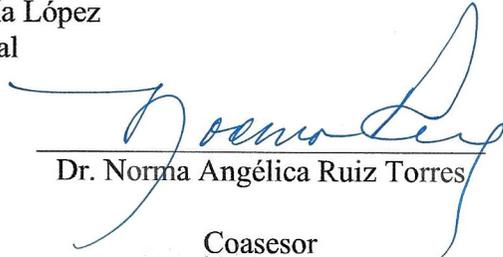


Dr. Josué Israel García López
Asesor Principal



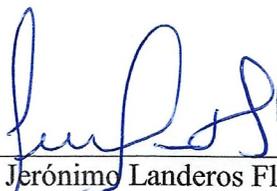
Dr. Perpetuo Álvarez Vázquez

Coasesor



Dr. Norma Angélica Ruiz Torres

Coasesor



Dr. Jerónimo Landeros Flores
Coordinador Interino de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Enero, 2023

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Anselmo De La Cruz Juárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la dicha y permitirme llegar a esta etapa de mi vida profesional.

Al Dr. Josué Garcia por apoyarme en mi formación académica y profesional.

A mi familia y padrinos que gracias a su apoyo incondicional hacia mi, esto se hizo posible, este logro no es solo mío si no también de ellos.

A los maestros gracias a sus enseñanzas, consejos y apoyo brindado.

A mi novia por apoyarme en todo momento, brindarme palabras de aliento cuando lo necesite.

A mis amigos gracias, ya que hicieron menos duro el estar lejos de mi familia, quienes se convirtieron en mis hermanos.

DEDICATORIAS

A mi madre: María Guadalupe Juárez

Sin ella no estaría aquí, gracias a su apoyo, comprensión, su sacrificio, a su esfuerzo y su infinito amor que hizo posible este logro en el trayecto de mi vida, gracias por el apoyo en todo este tiempo.

¡La amo!

A mi hermano

Quien me poyo con palabras de aliento cuando lo necesitaba, a su comprensión y admiración a mi.

A mis padrinos

Gracias a su apoyo, consejos y por creer que si era posible lograr este proyecto, fueron simientos indispensables en esta etapa de mi vida les agradezco mucho el apoyo hacia mi persona.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	III
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	1
3. OBJETIVOS.....	2
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
4.1 Diversidad genética del chile habanero	3
4.2 Ají Limo.....	4
4.3 Ají Panca.....	4
4.4 Bhut Jolokia	5
4.5 Chocolate Habanero.....	5
4.6 Datil	6
4.7 NuMex Suave Orange, NuMex Suave Red	7
4.8 Orange habanero	8
4.9 Red caribbean	9
4.10 Rocotillo.....	9
5. Número de cromosomas del chile habanero y cuál es el número de ploidia que presenta	
6. Concentración de capsaicinoides en chile habanero	13
6.1 Síntesis de capsaicinoides.....	17
6.2 Genes involucrados en la expresión de capsaicina	21
7. CONCLUSIONES	24
8. REFERENCIAS	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estructuras químicas y niveles de pungencia de derivados de capsaicinoides y capsinoidesa.	14
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variaciones de la vaina (<i>Capsicum</i> chino).....	3
Figura 2. <i>Capsicum</i> chino 'Ají Limo.'	4
Figura 3. <i>Capsicum</i> chino 'Ají Panca'	5
Figura 4. <i>Capsicum</i> chino 'Bhut Jolokia'	5
Figura 5. <i>Capsicum</i> chino 'Chocolate Habanero'	6
Figura 6. <i>Capsicum</i> chino 'NuMex Suave Orange'	7
Figura 7. <i>Capsicum</i> chino 'NuMex Suave Red'	8
Figura 8. <i>Capsicum</i> chino 'Orange Habanero'	8
Figura 9. <i>Capsicum</i> chino 'Red Caribbean'	9
Figura 10. <i>Capsicum</i> chino 'Rocotillo'	10
Figura 11. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género <i>Capsicum</i> . PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H, cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; pAMT, presunta aminotransferasa de la vainillina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados, IvDH α isovalerato deshidrogenasa; Kas β -cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS capsaicinoide sintasa (Vázquez-Flota et al., 2007).	18

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue documentar la diversidad genética del chile habanero, además de los genes genes y las rutas metabólicas que regulan la síntesis de capsaicinoides. Los chiles (*Capsicum* spp.) son frutos de las plantas de un género llamado *Capsicum*, la capsaicina y dihidrocapsaicina son los dos capsaicinoides principales que se encuentran en los chiles picantes (más del 90% del total de capsaicinoides), mientras que la nordihidrocapsaicina, la homodihidrocapsaicina y la homocapsaicina están presentes en cantidades más bajas.

Además, de los altos niveles de capsaicinoides, el chile hanaero concentra altas cantidades de carotenoides, compuestos fenólicos, vitamina C y A, y minerales, como hierro y calcio, que favorecen la salud humana. Las actividades antioxidantes de los capsaicinoides y la concentración de vitaminas los hacen atractivos para aplicaciones potenciales en alimentación y farmacología. En este documento, describimos brevemente parte de esas importantes propiedades.

Palabras clave: *Capsicum chinense* Jacq, diversidad genética; pungencia; genes, síntesis, rutas metabólicas.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* lo integran alrededor de 35 especies, dentro de las cuales las de mayor importancia por su domesticación y superficie cultivada son *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum pubescens* Ruiz. & Pavón, *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum chinense* Jacq. (Bosland y Votava, 2012; Carrizo et al., 2013). México es centro de origen y diversidad de *C. annuum* y además se encuentran presentes las especies *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. chinense*.

En este sentido Aguilar et al. (2010) reportan para México 56 tipos de chile entre cultivados, semicultivados y silvestres. Recientemente Vera-Sánchez et al. (2016) mencionan 64 tipos de chile (95 % de éstos pertenecen a *C. annuum*), los que se distribuyen principalmente en las zonas centro, sur y sureste de México. En México el chile es el octavo cultivo en cuanto a valor económico, con un volumen promedio de producción de 2.2 millones de toneladas anuales, de las cuales se exportan cerca de 900 mil en diferentes presentaciones (fresco, seco, polvo, entre otros) (SIAP, 2018). La importancia de este cultivo radica en su valor económico, alimenticio (especias y vegetales) y como generador de mano de obra. Es materia prima para la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética e industrial (Aza-González et al., 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

La demanda del chile habanero en el mercado nacional e internacional está en aumento, sin embargo, los problemas que enfrenta el cultivo para satisfacer esta demanda sigue siendo la baja tecnología de producción, y el uso de variedades degradadas en su pureza varietal y calidad de semilla. Por lo anterior, es importante conocer la diversidad genética de del chile habanero, además de los genes genes y las rutas metabólicas que regulan la síntesis de capsaicinoides, a fin de identificar recursos fitógentéticos que permitan el desarrollo de híbridos comerciales.

3. OBJETIVOS

Presentar la diversidad genética del chile habanero.

Documentar cual es el número básico de cromosomas del chile habanero y cuál es el número de ploidia que presenta

Documentar la síntesis de capsaicinoides, estructura química y niveles de pungencia.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Diversidad genética del chile habanero

Capsicum chinense, como todas las especies de *Capsicum*, se originó en el hemisferio occidental. Este cultivo es popular en todas las regiones tropicales y es la especie de chile más común que se cultiva en el Caribe. Las formas de los frutos son diversas, como lo son las de *C. annuum*. Las vainas pueden ser extremadamente picosas y aromáticas. Las plantas varían entre 1 y 2.5 m de altura, dependiendo de condiciones ambientales. Las hojas son de color verde, grandes y de textura arrugada.

Las flores tienen corolas blancas, anteras y filamentos morados. La planta genera de dos a seis frutas por nodo y el color de los frutos varía de verde en la rojo, naranja, amarillo o blanco. Aunque las variedades de *C. chinense* varían en color, la mayoría de los frutos tienen un promedio de entre 80,000 y 150,000 SHUs.



Figura 1. Variaciones de la vaina (*Capsicum chinense*).

Siendo un cultivo tropical las plantas de *C. chinense* crecen mejor en áreas con alta humedad y noches cálidas. Hay una gran cantidad de tipos de vainas dentro de *C. chinense*, pero las más importantes se mencionan a continuación; Ají Limo, Ají Panca', 'Bhut Jolokia, Cajamarca, Charapita' (salvaje), Chocolate Habanero, Datil, Fatalii, NuMex Suave Orange, NuMex Suave Red, Orange Habanero, Red Carribean y Rocotillo, enseguida se describen algunas de sus características.

4.2 Ají Limo

La vaina es pequeña y mide 1½ a 3 pulgadas de largo por 1 a 1¼ pulgadas de ancho, es muy picante y sus frutos miden de uno a 12 cm. Los frutos pueden adoptar formas esféricas o alargadas y cuando están maduras son de color rojo intenso, amarillo o naranja.



Figura 2. Capsicum chinense ‘Ají Limo.’

4.3 Ají Panca

La vaina tiene un grosor medio del pericarpio, y cuando madura es de color marrón burdeos y suave en intensidad de picor. La planta de ají panca presenta una altura de 45 a 80 cm, el tallo es erguido, ramoso y liso, con hojas ovado-lanceoladas de 10.5 cm de longitud, de color verde oscuro, presenta de 3 a 5 flores por nudo, los pedúnculos son corvados, cáliz no dentado, corola amarillo verdoso de 0.5 a 1 cm de longitud, el fruto es erguido, de color verde claro a un marrón oscuro, contiene numerosas semillas unidas al tejido placentario que se encuentra unido a la pared del fruto, el contenido de capsicinoides es entre 150 a 335 mg generando un grado de picor entre 1000 y 2500 unidades Scoville.



Figura 3. Capsicum chinense 'Ají Panca'

4.4 Bhut Jolokia

Las plantas crecen hasta alcanzar los 4 pies de altura y producen una profusión de flores, a veces hasta tres por nodo. Bhut Jolokia 'tiene una ascendencia única. El análisis de ADN conduce a la conclusión de que es un cultivar de *C. chinense*, pero en su pedigrí tiene un poco de *Capsicum frutescens*.

Esta variante con frutas de color chocolate llega a tener Unidades Scoville de hasta 800.000, el chile viene del noreste de la India, sobre todo de las zonas de Assam, Nagaland y Manipur. Las plantas tienen 57 hasta 129 cm de altura y los chiles son de 5 a 8.5 cm de largo y tienen un diámetro de 2.5 a 3 cm. El Bhut Jolokia tiene una larga temporada de crecimiento, el tiempo de cosecha es de por lo menos 100 días a 130 y la decoloración del fruto es de verde a oscuro.



Figura 4. Capsicum chinense 'Bhut Jolokia'

4.5 Chocolate Habanero

Este chile se llama "chocolate" no por su sabor sino por su color. Porque la vaina madura a un color marrón chocolate. Es uno de los tipos de habanero con más picor. El Chocolate Habanero produce vainas que alcanzan 2 pulgadas de largo y 1½ pulgadas de ancho. El tiempo de cosecha es de por lo menos 90 días y la decoloración del fruto es de verde a marrón. Chocolate Habanero se utiliza comunmente en la preparación de salsas sus unidades en escala Scoville son de 300.000/425.000.



Figura 5. Capsicum chinense ‘Chocolate Habanero’

4.6 Datil

"Datil" se cultiva en el área de St. Augustine, Florida, donde la mitología lo rodea. Se dice que un grupo de trabajadores contratados. Originario de la isla de Menorca lo trajo a San Agustín en 1777 de un asentamiento abandonado en New Smyrna, Florida. Algunos dicen que llevó las semillas desde España, pero los expertos creen que es improbable. David Nolan de San Agustín dice que "fue llevado a San Agustín, alrededor de 1880, de Chile, en América del Sur, por un fabricante de jalea llamado S. B. Valls. "Nunca ha visto ninguna referencia a "Datil" está en San Agustín antes de esa hora. El cree que fue adoptado por los residentes locales de Minorcan como parte de su cocina en lugar de que ser traído con ellos o recogido en el camino. Además, él dice que datil no es solo una palabra en español, sino que también es una palabra en la lengua quechua del imperio incaico, con un rango de 100.000 a 300.000 unidades Scoville, crecen hasta aproximadamente 8 cm de largo y maduran hasta alcanzar un tono amarillo anaranjado o rojo, dependiendo del tiempo que los dejemos madurar en la planta.

4.7 NuMex Suave Orange, NuMex Suave Red

La palabra suave es español para suave, suave o suave, y estos las vainas bajan suavemente, ya que son algunos de los habaneros más suaves alrededor, criado para aquellos que quieren disfrutar del fantástico sabor y aroma. De un habanero, pero no del calor. Las plantas crecen de 3 a 4 pies de alto en su totalidad. Sol o sombra parcial. Las vainas se parecen a las vainas de habanero estándar, y cada planta produce hasta cien de ellas. Las vainas tienen el mismo sabor y aroma como los chiles habaneros más potentes, pero que tiene una calificación de calor de solo 800 SHU. Las vainas tienen un sabor cítrico. Con un matiz anaranjado-limón y un aroma a albaricoque. El calor está en la parte posterior de la boca y la garganta y no en los labios y la lengua.



Figura 6. Capsicum chinense 'NuMex Suave Orange'



Figura 7. Capsicum chinense ‘NuMex Suave Red’.

4.8 Orange habanero

Habanero naranja podría considerarse el estándar de oro para habaneros Su vaina tiene forma de linterna, el habanero se cultiva en la península de Yucatán. México y en Belice, y la producción comercial se ha expandido a Costa Rica y los Estados Unidos. Es probablemente el primer chile “exótico”. Pimienta para ganar fama y aceptación entre la pimienta de chile apreciación pública en los Estados Unidos. Las vainas, que son 2½ pulgadas de largo y 1 pulgada de ancho en los hombros, comienzan en verde y luego maduran hasta convertirse en una naranja cerosa y brillante, pimiento arrugado de 100,000 – 300,000 unidades en la escala Scoville.

Las frutas se utilizan frescas en salsas, cocinado directamente en platos, o fermentado para hacer una salsa picante.



Figura 8. Capsicum chinense ‘Orange Habanero’

4.9 Red caribbean

Red Caribbean es dos veces más caliente que ‘Orange Habanero’, con un calor calificación de más de 400,000 a 450.000 Scoville, lo que lo hace más de ochenta veces ¡Más caliente que un jalapeño! Las plantas producen grandes rendimientos de arrugas ligeramente, vainas, 1¾ pulgadas de largo por 2 pulgadas de ancho. Las vainas cambian de verde claro al rojo brillante cuando maduran y tienen el mismo sabor distintivo como el habanero, los pequeños frutos de 4-6 cm de largo y 2-3 cm de ancho, la planta alcanza 80-120 cm de altura y se puede cultivar adentro, las vainas pueden usarse en salsas, adobos y, por supuesto, en salsa picante.



Figura 9. Capsicum chinense ‘Red Caribbean’

4.10 Rocotillo

En la isla de Puerto Rico y en las Indias Occidentales, el más común chile es ‘rocotillo’, que no debe confundirse con la variedad de *Capsicum baccatum* que lleva el nombre común de rocotillo. La vaina ‘Rocotillo’ tiene una forma similar a la del capo escocés, pero tiene un pedicelo largo. Su calor es considerablemente inferior al de la norma. Capo escocés, alrededor de 1000 SHUs. Las vainas cambian de verde a rojo durante un período de 150 días, haciendo de esta una variedad de temporada completa. Las plantas de "rocotillo" crecen de 3 a 4 pies de altura, un poco más altas que otros Chiles pimientos, y se convierten en un dosel grueso. Las plantas producen buenos rendimientos de vainas colgantes, que miden de 1 pulgada a 1½ pulgadas de largo por 1 pulgada a 1¼ pulgadas de ancho, que maduran de verde a rojo. Las vainas son perfectas para sazonando auténticos platos puertorriqueños.



Figura 10. *Capsicum chinense* 'Rocotillo'

5. Número de cromosomas del chile habanero y cuál es el número de ploidia que presenta

El género *Capsicum*, lo integran alrededor de 30 especies, dentro de las cuales las de mayor importancia por su domesticación y superficie cultivada son *Capsicum annum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum pubescens*, *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum chinense* Jacq. (Bosland y Votava, 2012; Carrizo *et al.*, 2013). Diversos autores, se han centrado en la taxonomía de este género (Hunziker, 1950; Heiser y Smith, 1953; Eshbaugh, 1979, 1980; Barboza y Bianchetti, 2005) y la investigación de diferentes campos ha contribuido al conocimiento de la diversidad genética en el género y las relaciones entre las especies, por ejemplo, los análisis morfológicos y los análisis citogenéticos moleculares (Pickersgill *et al.*, 1979; Scaldaferrero *et al.*, 2006).

Según la literatura consultada, se han realizado trabajos en el campo de la citogenética en el género *Capsicum*, y se ha establecido que son diploides con un número básico de $x=12$ como cifra constante que identifica al grupo (Alcorcés, 1994). Sin embargo, Pozzobon y Wittmann (2006) sugirieron dos líneas evolutivas diferentes en la diversificación de este género, que se muestra mediante separación entre las especies silvestres (número de base $x=13$) y las especies domesticadas ($x=12$).

Moscone *et al.* (2007), con el uso citogenética evaluaron la evolución de los chiles (*Capsicum*- *Solanácea*) y reportaron los números de cromosomas para 23 de las 30 especies reconocidas, distinguiendo dos grupos de especies: uno con $2n=2x=24$ (13 especies), dentro de los cuales se encuentran, *C. chinense*, *C. chacoense*, *C. galapagoense*, *C. annum*

(variedades *glabriusculum* y *annuum*), *C. frutescens*, *C. baccatum* (variedades *baccatum*, *pendulum* y *umbilicatum*), *C. praetermissum*, *C. eximium*, *C. cardenasii*, *C. pubescens*, *C. tovarii* y *C. flexuosum*. Lo anterior concuerda con lo reportado por Alcorcés-Guerra (2001), quien indicó que al evaluar cuatro selecciones de *C. chinense*, los cromosomas y los cariotipos de las cuatro selecciones estudiadas mostraron $2n=24$. Asimismo, Willame-Rodrigues *et al.* (2015) mencionaron que al determinar el número de cromosomas y el cariotipo de *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, obtuvieron un número de cromosomas $2n=2x=24$ para cada una de las especies estudiadas.

A diferencia de las siete especies que se mencionan a continuación; *C. mirabile*, *C. schottianum*, *C. pereirae*, *C. campylopodium*, *C. recurvatum*, *C. villosum* y *C. rhomboideum*, las cuales poseen $2n=2x=26$. La diferencia entre estas dos especies ($2n=24$ y $2n=26$), se debe a que las especies $2n=24$, tienen cariotipos comparativamente más simétricos, la mayoría con 11 m + 1 cromosomas St de tamaño bastante homogéneo en el complemento haploide. En contraste, las especies $2n=26$ tienen complementos más asimétricos, con un aumento numérico de sm (1 a 6) y cromosomas St (1 a 2). En general, son especies con genomas de mayor tamaño (Moscone *et al.*, 2007).

Las especies $2n=24$ (*C. chinense*, *C. chacoense*, *C. galapagoense*, *C. annum*, y *C. frutescens*), son taxones estrechamente relacionados según sus características de cariotipo. Tienen longitudes de cariotipo comparativamente pequeñas (bajo contenido de ADN), poca heterocromatina (menos del 6%) y patrones de bandas heterocromáticas simples compuestas principalmente por bandas terminales. Estas especies se colocan en el grupo de flores blancas, ya que tienen corolas uniformemente blancas, a veces de color crema en las últimas tres especies. Principalmente, producen frutos anaranjados y rojos de diferentes formas, con semillas color amarillo (Pickersgill, 1991).

Otro grupo de especies $2n=24$, está formado por *C. eximium*, *C. ardenasii*, *C. pubescens* y *C. tovarii*, con complementos cromosómicos bastante grandes y altos contenidos de ADN (Belletti *et al.*, 1998). Además, tienen altas cantidades de heterocromatina (más del 12%) y patrones de bandas complejas (excepto *C. eximium*). Estas especies forman el grupo de flores de color púrpura, en el que *C. pubescens* es el miembro central (Pickersgill, 1991). Sus flores

son color púrpura-violeta y tiene manchas de color blanco. La corola tiene forma de campana y los frutos que producen son de forma esférica de color rojo, excepto en *C. pubescens* donde la forma y el color de la fruta son variables, y las semillas son irregulares y de color negro (Park *et al.*, 2000; Walsh y Hoot, 2001). Las dos especies restantes (*C. parvifolium* and *C. tlexuosum*) con $2n=24$, tienen genomas que se encuentran entre los más grandes, con alto contenido de heterocromatina y un patrón de bandas más complejo en comparación con las especies anteriormente mencionadas. Ambos taxones producen frutos rojos con forma esférica, pero presentan distintos rasgos morfológicos. *C. parvifolium*, exhibe una corola blanca con manchas púrpuras y partes internas verdosas, con semillas de color marrón, mientras que *C. tlexuosum* produce semillas de color negro (Buso *et al.*, 2002).

Las especies con $2n=26$ tienen una gran variación cromosómica en el nivel intraespecífico, que hace que todo el grupo sea muy heterogéneo. En este caso, *C. recurvatuni* y *C. rhonhoideum* tienen bajas cantidades de heterocromatina (5%) y patrones de bandas simples con cromosomas muy pequeños. A diferencia de *C. rhomboideum* en las especies con $2n=26$, que presenta una corola de color amarillo, los taxones restantes tienen corolas blancas (Moscone, 1990).

De acuerdo con la forma, el color de los frutos y semillas las especies $2n=26$ se pueden clasificar en dos subgrupos. En el primer subgrupo se encuentran *C. lanceolatum* y *C. lanceolatum*, los cuales producen frutos esféricos de color rojo y semillas de color marrón. Mientras que en el segundo se encuentran *C. campvlopodium*, *C. cornutum* y *C. friburgense*, con frutos esféricos de color verde y semillas de color negro (Moscone *et al.*, 2007). En la evolución de los chiles y/o pimientos, la poliploidia no es un fenómeno relevante, ya que solo se ha encontrado una sola accesión de *C. annuum* var. *Glabriusculum* con $2n=4x=48$ (Pickersgill, 1977). No obstante, la presencia en el nivel diploide de citotipos intraespecíficos en la mitad de las especies, indican procesos muy activos de diversificación de cromosomas en las especies silvestres de *Capsicum*, particularmente aquellas con $2n=26$. Como se mencionó anteriormente, los números de cromosomas básicos ($x=12$) en el género *Capsicum*, es universal en el género de las solanáceas. En cambio, el número de cromosomas $x=13$ es muy raro en solanáceas. Por lo tanto, la literatura menciona que $x=12$ corresponde a la

condición ancestral de *Capsicum*, mientras que $x=13$ debe considerarse como una progresión filogenética (Moscone, 2007).

6. Concentración de capsaicinoides en chile habanero

La pungencia es una característica distintiva de los chiles y es causada por la acumulación de capsaicina (alcaloide) y sus análogos (Tanaka *et al.*, 2016). Los capsaicinoides son amidas producidas por especies de *Capsicum*, estos metabolitos secundarios son responsables del sabor y el picor de los frutos, también conocido como pungencia. Los capsaicinoides consisten en compuestos que difieren en la estructura del resto de los ácidos grasos ramificados (acilo) unidos al anillo de benceno de vainillilamina (Aza-Gonzalez *et al.*, 2011). Estos compuestos son capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, y homocapsaicina, cualquier variación en las estructuras químicas de los capsaicinoides, afecta el grado y el nivel de pungencia (Wang *et al.* 2011).

Los capsaicinoides se sintetizan en la placenta de los frutos por una condensación enzimática de vainillilamina y ácidos grasos de cadena ramificada de longitud media (Curry *et al.* 1999). La vainillilamina se origina a partir de la ruta fenilpropanoide y el ácido graso de cadena ramificada deriva del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (Mazourek *et al.*, 2009). La enzima clave que conduce a la producción de capsaicinoides es la capsaicina sintasa (CS), una enzima aciltransferasa involucrada en la condensación de vanililamina con el resto de ácidos grasos de cadena corta (Díaz *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2007).

Los capsaicinoides se acumulan en las células epidérmicas de la placenta y en los tejidos disépticos de la fruta de *Capsicum* (Iwai *et al.*, 1979). Estos compuestos se transportan fuera de las células epidérmicas y se almacenan en las vesículas de la placenta. Las semillas no producen capsaicina (Díaz *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2007; Aza-González *et al.*, 2011). Los capsaicinoides comienzan a acumularse cuando las frutas comienzan a madurar (Suzuki *et al.* 1980) aproximadamente 20 días después de la antesis (Iwai *et al.*, 1979). La presencia de capsaicinoides en esos órganos sugiere que los capsaicinoides se translocan desde la placenta al tejido del pericarpio a través de las paredes celulares de la capa epidérmica de la placenta (Broderick y Cooke, 2009).

La capsaicina y dihidrocapsaicina son los dos capsaicinoides principales que se encuentran en los chiles picantes (más del 90% del total de capsaicinoides), mientras que la nordihidrocapsaicina, la homodihidrocapsaicina y la homocapsaicina están presentes en cantidades más bajas (Cuadro 1) (Howard y Wildman, 2007). Los niveles de capsaicinoides totales se pueden convertir en unidades de picor Scoville (SHU), que es una medida de la pungencia (calor picante) de los chiles, que está en función de la concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina. La SHU se puede clasificar en: (1) no picante (0–700 SHU), (2) levemente picante (700–3000 SHU), (3) moderadamente picante (3000–25,000 SHU), (4) altamente picante (25,000–70,000 SHU) y (5) muy picantes (>80,000 SHU) (Zachariah y Gobinath, 2008).

Cuadro 1. Estructuras químicas y niveles de pungencia de derivados de capsaicinoides y capsinoidesa.

Compuesto	Cantidad Relativa	Unidades (SHU)	Estructura química
Capsaicina	69%	15,000,000	
Dihidrocapsaicina	22%	15,000,000	
Nordihidrocapsaicina	7%	9,100,000	
Homocapsaicina	1%	8,600,000	
Homodihidrocapsaicina	1%	8,600,000	

Las estructuras químicas y los niveles de pungencia de los análogos de capsaicinoides (Wahyuni et al., 2013).

Es importante mencionar, que en los últimos años, el chile habanero (*C. chinense*) se ha vuelto cada vez más importante como resultado de su amplia diversidad y su alto contenido de compuestos antioxidantes (capsaicinoides y compuestos fenolicos) en los frutos, con una demanda creciente en los mercados mexicanos e internacionales. Sin embargo, la acumulación de estos compuestos en los frutos de chile habanero depende de factores

ambientales, que incluyen el tipo de suelo, las propiedades osmóticas y nutrimentos aplicados durante el desarrollo del cultivo; este último es el menos estudiado (Soria-Fregoso *et al.*, 2002).

En la agricultura moderna, el nitrógeno (N) es considerado el nutriente comúnmente más deficiente seguido del fósforo (P) (Halvin *et al.*, 2005). En *Capsicum*, la deficiencia de N afecta el rendimiento de crecimiento de la planta y la acumulación de metabolitos secundarios, como la capsaicina (Medina-Lara *et al.*, 2008). Los cambios en los niveles de metabolitos secundarios tienen un impacto en las propiedades organolépticas y nutritivas de las plantas (Urrea-López *et al.*, 2014), y están implicados en la protección o la desintoxicación de altos niveles de salinidad y las condiciones de deficiencia de macronutrientes (Dixon y Paiva, 1995; Mansour, 2000).

Algunos autores mencionan, que el régimen de fertilización afecta las concentraciones de metabolitos secundarios como la capsaicina y compuestos fenólicos (Bryant *et al.*, 1987; Gerson y Kelsey 1999). Por ejemplo, en estudios realizados por Medina-Lara *et al.* (2008), la fertilización con nitrógeno (N) en plantas de chile habanero resultó en la producción de frutos con mayor contenido de capsaicina y en general mejoró la calidad de los frutos, mientras que la fertilización con potasio (K) no afectó el contenido de capsaicina por encima de los valores obtenidos en el tratamiento de control. De manera similar, el contenido de capsaicina también se incrementó en los frutos de *C. annum* var. Padrón, por la fertilización con 13N-40P-13K durante el período de crecimiento vegetativo (Estrada *et al.*, 1999).

Johnson y Decoteau (1996), mencionaron que no observaron ningún efecto de K sobre la pungencia en los frutos de *C. annum*, lo que sugiere que K aparentemente no interfiere en la metabolización de la capsaicina. A diferencia del N, que es requerido por los aminoácidos como la fenilalanina y la vainillilamina (principales precursores en la ruta de capsaicinas y compuestos fenilpropanoides) que requieren de un nivel óptimo de este elemento (N), para mejorar el rendimiento y la acumulación de compuestos bioactivos y nutraceuticos en los frutos de *Capsicum* (Mendes *et al.*, 2016).

Sin embargo, el efecto de la nutrición mineral y las condiciones de desarrollo del cultivo, sobre el contenido de capsaicinoides ha sido contrastante en diferentes estudios realizados. Por ejemplo, Dzib-Echeverría y Uribe Valle (2005), encontraron que las plantas de chile habanero cultivadas en condiciones controladas de riego y fertilización (agricultura protegida), producen frutos con menor cantidad de capsaicina, en comparación con plantas cultivadas en condiciones más estresantes. Harvell y Bosland (1997), mencionaron que la expresión fenotípica de la pungencia puede ser producida por la interacción de genotipo-ambiente. Urrea-López *et al.* (2014), al evaluar el desarrollo de plantas de chile habanero en condiciones de salinidad (4 y 7 dS mL⁻¹) con nitrógeno reducido y condiciones de fósforo (P), los niveles de capsaicina y dihidrocapsaicina fueron más altos para los tratamientos de alta salinidad (179.9 mg/100 g a 7 dS m⁻¹) y se redujeron en la concentración baja de P (66.4 mg / 100 g). Por su parte, Borges-Gómez *et al.* (2008), mencionaron que el contenidos de capsaicina y dihidrocapsaicina no se vió afectado en frutos de chile habanero provenientes de plantas que cultivadas con diferentes niveles nutrimentales de N, P₂O₅ y K₂O (240-240-240, 120-120-120 y 000-000-000).

La acumulación de capsaicinoides también ha sido Informados en otros generos de *Capsicum* bajo regímenes de fertilización. Los resultados obtenidos por Johnson y Decoteau (1996), indicaron mayores contenidos de capsaicinoides al aumentar N y K en chile jalapeño (*Capsicum annum* L.). Por el contrario, Velasco-Velasco *et al.* (2001) mencionaron que al incrementar el suministros de N, P y K en chile jalapeño (*C. annum* L.) la producción de capsaicina disminuyó.

Aunque se han realizado estudios para determinar el efecto de la nutrición con N, P y K en la producción de capsaicinoides en frutos de *C. chinense* (Dzib-Echeverría y Uribe Valle, 2005; Medina-Lara *et al.*, 2008; Urrea-López *et al.*, 2014), se recomienda continuar con estudios bioquímicos y a nivel molecular, que evalúen el efecto de la nutrición con diferentes fertilizantes (N, P y K), con el fin comprender de mejor manera el impacto que pueden ocasionar en la acumulación de importantes metabolitos secundarios en los frutos de *C. chinense*.

6.1 Síntesis de capsaicinoides

La vía biosintética general de los capsaicinoides se estableció a fines de la década de 1960, cuando se usaron estudios de marcadores radiactivos para investigar los precursores de los capsaicinoides, y se descubrió que la porción de vanilamina se sintetizó a partir de fenilalanina y que el ácido graso de cadena ramificada se derivó de la valina (Leete y Louden, 1968). La vía fenilpropanoide biosintética propuesta en ese momento involucraba la síntesis secuencial de fenilalanina, ácidos cinámicos, *p*-coumáricos, cafeico y ferúlicos, y luego la formación de vainillina y vanililamina (Bennett y Kirby, 1968).

Actualmente, se conocen más de 20 diferentes capsaicinoides cuya estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso (Suzuki *et al.*, 1981). La porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides. El ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina (Wahyuni *et al.* 2013). Las diferencias estructurales de los diversos capsaicinoides reside precisamente en la naturaleza de la cadena lateral, que puede ser de 9 u 11 carbonos de largo, con un número variable de enlaces dobles colocados en diferentes posiciones (Vázquez-Flota *et al.*, 2007; Figura 6).

La capsaicina generalmente representa alrededor del 70% del total de capsaicinoides (Sudha y Ravishankar, 2003). La vía principal de la síntesis de capsaicina según Mazourek *et al.* (2009), Incluye el metabolismo de fenilpropanoides y bencenoides, así como la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada de mediana longitud y el metabolismo de L-valina. Se predice que un total de 79 genes codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de la capsaicina (Zi-Xin *et al.*, 2016). Existen dos grupos de genes que se agruparon y cuyos patrones de expresión se correlacionaron con la acumulación de capsaicina, estos incluyen: fenilalanina amoniaco liasa (PAL), ácido 4-hidroxilasa (C4H), Acyl-CoA sintetasa (ACS), ácido O-metiltransferasa (Comt) y aciltransferasa (AT), y se expresan específicamente en el tejido placentario (Aza-González *et al.*, 2011).

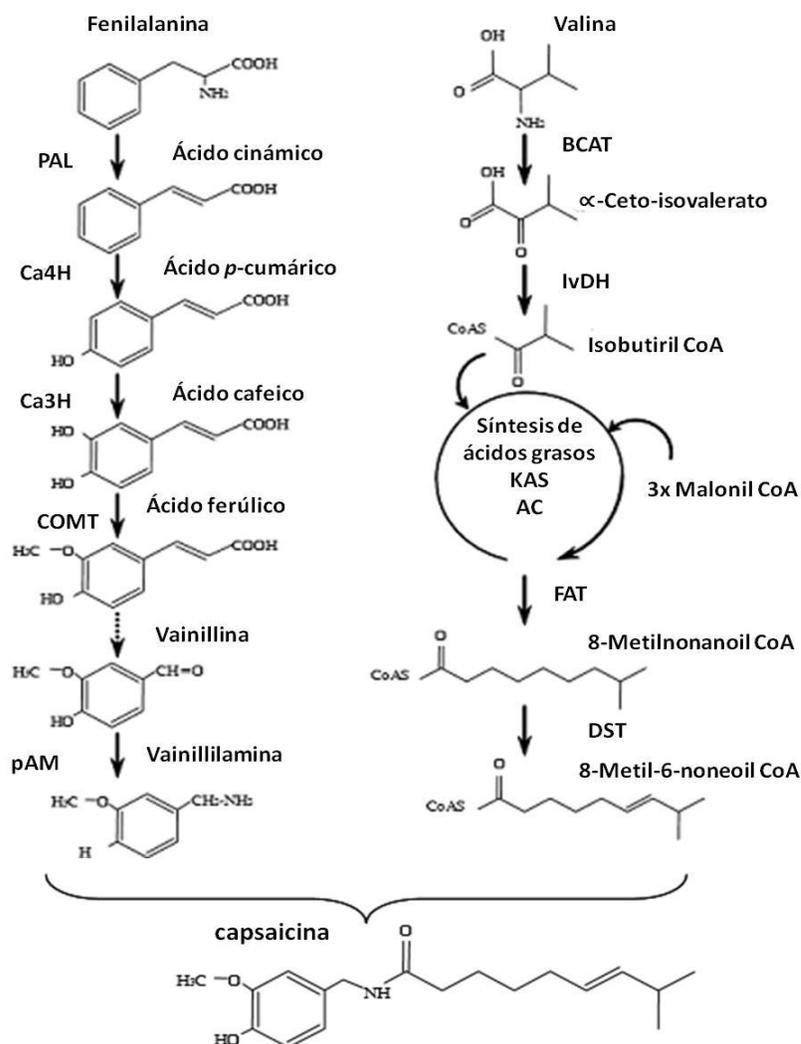


Figura 11. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinodos en el género *Capsicum*. PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; pAMT, presunta aminotransferasa de la vainillina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados, IvDH α-isovalerato deshidrogenasa; Kas β-cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS capsicinoide sintasa (Vázquez-Flota et al., 2007).

La vainillilamina se forma mediante conversiones sucesivas de la fenilalanina en los ácidos trans-cinámico, cumárico, cafeico y ferúlico, por acción de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H), cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H) y ácido cafeico metiltransferasa (COMT). La vainillina es un intermediario tardío que es aminado por acción de una transaminasa, para dar lugar a la vainillilamina la cual, por acción de una

aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (CS), se condensa con el derivado acil-graso para dar lugar a los CAP's. Se ha propuesto que el ácido graso se puede formar a partir de la leucina o la valina (García-Galindo *et al.*, 1995). La Figura 6 despliega la ruta propuesta para la síntesis de los capsaicinoídes, que una vez formados se almacenan en vesículas derivadas de las células epidermales de la placenta (Zamski *et al.*, 1987).

La primera enzima que dirige carbono del metabolismo primario a la síntesis de capsaicinoídes es la PAL. Esta enzima está codificada por una familia multigénica en diversas especies, con una regulación diferencial por condiciones ambientales, de desarrollo, o a través de los diferentes tejidos. Debido a la posición que ocupa en esta ruta de síntesis, PAL representa un blanco biotecnológico potencial para promover la biosíntesis de los capsaicinoídes (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001). En *C. chinense* esta enzima está codificada por una familia génica de entre tres y cuatro miembros que, en la placenta, se expresa principalmente en las etapas previas a la maduración del fruto. Al igual que PAL, Ca4H y COMT forman familias génicas que también se expresan principalmente en el tejido de placenta antes de la maduración del fruto.

A partir de una genoteca sustractiva, construida de ARN de placentas de *C. chinense*, se ha logrado aislar un ADNc con una alta homología a las aminotransferasas, denominada pAMT, que se propone podría participar en la aminación de vainillina para formar vainillilamina. La identidad de esta presunta aminotransferasa no se ha confirmado, pero sigue un patrón de expresión transcripcional específico para el tejido de placenta, similar al de otros genes involucrados en la síntesis de capsaicinoídes, lo que da apoyo a su posible intervención (Lee *et al.*, 2006).

En la formación de la cadena lateral de ácido graso, la síntesis de capsaicinoídes requiere de una cadena lateral acilo que se forma a partir de la valina o leucina. El primer paso involucra la desaminación de estos aminoácidos por acción de una aminotransferasa específica (BCAT, acrónimo del inglés para BranChed aminoacid AminoTransferase), para producir β -cetoisovalerato que posteriormente se transforma en isobutilil-CoA, con la participación de la isovalerato deshidrogenasa (IvDH). El ADNc correspondiente a una presunta BCAT ya ha sido aislado de chile habanero (Blum *et al.*, 2003). El isobutilil-CoA formado se convierte

en el 8-metil-6-nonenoil-CoA mediante la participación del complejo multienzimático de la ácido graso sintasa (FAS, por su acrónimo en inglés; Fatty Acid Synthase), que consiste de tres componentes: una β -ceto acil sintasa (KAS), una proteína acarreadora de grupos acilo (ACL) y una tioesterasa (FAT) (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Las reacciones catalizadas por este complejo involucran la condensación del isobutiril-CoA con grupos malonilo, catalizada por el componente KAS. El componente ACL es el encargado de transportar los grupos malonilo al isobutiril-CoA, y se pierde una molécula de CO₂ en cada ciclo de elongación. Después de tres ciclos sucesivos de elongación, el ácido graso final es liberado por acción de la tioesterasa. Los tres componentes de este complejo (KAS, ACL y FAT) han sido aislados de la genoteca referida (Aluru *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2003). Tanto ACL como FAT resultaron genes unicopia en *C. chinense* y en *C. annuum*, mientras que KAS está codificado por una familia de ocho miembros, dos de los cuales son específicos para placenta. Aunque solamente la identidad del ADNc para la KAS ha sido confirmada, todos los componentes del complejo FAS desplegaron un patrón de expresión transcripcional similar al de las enzimas involucradas en la formación de la vainillilamina, lo que sugiere su participación en la síntesis de los capsaicinoides (Aluru *et al.*, 2003).

La formación de los capsaicinoides por acción de la capsaicinoide sintasa es la reacción final en la síntesis de capsaicinoides, que es la condensación de la vainillilamina con la cadena lateral acilo catalizada por una aciltransferasa denominada capsaicinoide sintasa (CS). La actividad de esta enzima está relacionada directamente con el grado de picor de diferentes chiles, aunque puede llegar a detectarse aún en extractos proteicos obtenidos de chiles no picantes (Sutoh *et al.*, 2006).

En cuanto al catabolismo de los capsaicinoides, tanto en *C. annuum* como en *C. chinense*, la degradación de los capsaicinoides se produce mediante la participación de peroxidasas, cuya actividad aumenta al disminuir el contenido de los capsaicinoides, lo que normalmente ocurre al término del proceso de maduración del fruto (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Estas peroxidasas, principalmente del tipo básico, están localizadas en la vacuola de las células placentarias, al igual que los capsaicinoides (Bernal *et al.*, 1993). La localización de las enzimas requeridas para la formación de capsaicinoides se encuentran en el tejido placentario

de frutos inmaduros (Lindsey y Yeoman, 1984). El componente KAS del complejo FAS también se localiza en la placenta, específicamente en las células epiteliales (Aluru *et al.*, 2003), al igual que *csy1* (Prasad *et al.*, 2006) y *Pun1* (Stewart Jr *et al.*, 2007). Los capsaicinoides son acumulados con pequeñas vesículas o ampollas en las vacuolas de estas células epiteliales (Stewart Jr *et al.*, 2007; Zamski *et al.*, 1987).

6.2 Genes involucrados en la expresión de capsaicina

Como se mencionó anteriormente, los capsaicinoides se sintetizan a través de la combinación de dos rutas biosintéticas: la ruta del fenilpropanoide y la ruta de los ácidos grasos ramificados (Aza-Gonzalez *et al.*, 2011). La fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) es la primera enzima en la ruta de fenilpropanoides, en la que se forma ácido cinámico a partir de la fenilalanina 4, seguida de cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-Coumarate: Coenzima A Ligase (4CL), hidroxicinil transferasa (HCT), cumarate3-hidroxilasa (C3H), cafeína-CoA 3-O-etiltransferasa (CCoAOMT), y una aminotransferasa putativa (pAMT) para formar vanililamina (Stewart *et al.*, 2005).

En la ruta de síntesis de ácidos grasos ramificados, el precursor 8-metil-6-nonenoil-CoA se produce a través del ciclo de síntesis de ácidos grasos mediante una serie de varias reacciones enzimáticas (Suzuki *et al.*, 1981). Al final, la vainillilamina y 8-metil-6-nonenoil-CoA, que se producen como dos cadenas ramificadas, que se convierten en capsaicina por aciltransferasa (AT) (Sukrasno y Yeoman, 1993). La ruta de los ácidos grasos de cadena ramificada contribuye a la producción del aroma de frutos de chile picante, como es el caso de *C. chinense*, particularmente por los ésteres de ácidos grasos ramificados presentes en las accesiones picantes que pueden reflejar la actividad a través de la rama acilo de la ruta metabólica que conduce a la síntesis de capsaicinoides (Wahyuni *et al.* 2013).

La capsaicina generalmente representa alrededor del 70% del total de capsaicinoides (Ravishankar *et al.*, 2003). La vía principal de la síntesis de capsaicina según Mazourek *et al.* (2009), Incluye el metabolismo de fenilpropanoides y bencenoides, así como la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada de mediana longitud y el metabolismo de L-valina. Se predice que un total de 79 genes codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de la capsaicina (Zi-Xin *et al.*, 2016). Existen dos grupos de genes que se agruparon y cuyos

patrones de expresión se correlacionaron con la acumulación de capsaicina, estos incluyen: fenilalanina amoniaco liasa (PAL), ácido 4-hidroxilasa (C4H), Acyl-CoA sintetasa (ACS), ácido O-metiltransferasa (Comt) y aciltransferasa (AT), y se expresan específicamente en el tejido placentario (Aza-González *et al.*, 2011). El locus Pun1, anteriormente conocido como el locus C, codifica una aciltransferasa AT3 putativa, cuyo estado alélico funciona como un interruptor on-off para la pungencia en los chiles. Los cambios biológicos y morfológicos en la durante el desarrollo del fruto son acompañado por diferencias en los patrones de expresión génica (Wahyuni *et al.* 2013)

Los rasgos cuantitativos que controlan los procesos de desarrollo capsaicina en los frutos de *C. chinense*, están influenciados por muchos genes con pequeños efectos. Por ejemplo, la producción de ácido cinámico a partir de fenilalanina es catalizada por PAL, la formación y acumulación de PAL están involucrados en la biosíntesis de capsaicina, lo que sugiere que estos genes desempeñan un papel importante en la vía de síntesis de la capsaicina y contribuyen a la acumulación de capsaicinoides (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993)

ACS es la enzima que cataliza la etapa final en la ruta de los ácidos grasos de cadena ramificada, en la que se forma 8-metil6-nonenol-CoA a partir del ácido 8-metilpentanoico, estos genes pueden jugar un papel crucial en la regulación de la síntesis de capsaicina (Thiele *et al.*, 2008). La AT cataliza el paso final en la vía biosintética capsaicina, que es uno de los pasos más importantes, sus niveles de expresión pueden jugar un papel importante en la síntesis y el contenido de capsaicina (Díaz *et al.*, 2004). Por otra parte, el ácido ferúlico como un intermediario fenilpropanoide que se produce a partir de cafeína-CoA por la acción del enzima cafeína-CoA 3-O-metiltransferasa (CCoAOMT) se correlaciona positivamente con la acumulación de capsaicina (Abraham-Juárez *et al.*, 2008).

Numerosas enzimas están involucradas en la ruta de síntesis de ácidos grasos ramificados, incluyendo cetoacil-ACP sintasa I (KAS), malonil CoA-ACP transacilasa (MCAT), proteína transportadora de acilo (ACL), cetoacil-ACP reductasa (KR), hidroxiacil-ACP deshidratasa (DH), enoil-ACP reductasa (ENR) y tioesterasa (TE). Los estudios han demostrado que los genes de la sintasa de ácidos grasos *Acl1*, *FatA* y *Kas* se expresan diferencialmente en las

frutas de *Capsicum* y los niveles de transcripción de los tres genes están correlacionados positivamente con el grado de pungencia (Nishida, 2004).

7. CONCLUSIONES

En conclusión, con este documento tratamos de presentar de manera simple y concreta la diversidad genética del chile habanero.

Por otra parte, documentar cuáles son los principales componentes químicos como los capasaicinoides, además de los genes que regulan su síntesis, y las rutas metabólicas.

La demanda creciente del chile habanero, radica en la extracción de sus componentes químicos para su aplicación en la industria alimentaria.

8. REFERENCIAS

- Abraham-Juárez, M., Rocha-Granados, M. López, M.G. Rivera-Bustamante, R.F. Ochoa-Alejo, N. 2008. Virus-induced silencing of Comt, pAmt and Kas genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta* 227(3):681-695.
- Alcorcés-Guerra, N. 2001. Estudios cromosómicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. *Revista UDO Agrícola* 1(1):34-41.
- Aluru, M. R., Mazourek, M., Landry, L. G., Curry, J., Jahn, M., & O'connell, M. A. (2003). Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas, in *Capsicum* fruit. *Journal of experimental botany*, 54(388), 1655-1664.
- Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant cell reports*, 30(5), 695-706.
- Barboza, G.E. and Bianchetti, L.B. 2005. Three new species of *Capsicum* (*Solanaceae*) and a key to the wild species from Brazil. *Syst. Bot.* 30:863-871.
- Belletti, P., Marzachi, C. and Lanteri, S. 1998. Flow cytometric measurements of nuclear DNA content in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Plant Syst. Evol.* 209:85-91.
- Bennett, D. J., & Kirby, G. W. (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 442-446.
- Bernal, M. A., Calderon, A. A., Pedreno, M. A., Munoz, R., Ros Barceló, A., & Merino de Caceres, F. (1993). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (variety Annuum) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(7), 1041-1044.
- Blum, E., Mazourek, M., O'connell, M., Curry, J., Thorup, T., Liu, K., & Paran, I. (2003). Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(1), 79-86.
- Borges-Gómez, L., Cervantes-Cárdenas, L. Ruiz-Novelo, J. Soria-Fregoso, M. Reyes-Oregel, V. y Villanueva-Couoh, E. 2008. Capsaicinoides en chile habanero (*capsicum chinense* jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana* 28(1):36-41.
- Bosland, P.W. and Votava, E.J. 2012. Peppers: vegetable and spice *Capsicums*. crop production science in horticulture. 2nd edition. CABI Publishing. Wallingford, UK. 230 p.

- Bryant, J.P., Clausen, T.P. Reichardt, P.B. McCarthy, M.C. and Werner R.A. 1987. Effect of nitrogen fertilization upon the secondary chemistry and nutritional value of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) leaves for the large aspen tortrix [*Choristoneura conflictana* (Walker)]. *Oecologia* 73:513-517.
- Buso, G.S.C., Pedrosa-Souza, A. Bianchetti, L.B. and Ferreira, M.E. 2002. Análise de seqüências de DNA cloroplástico de especies do gênero *Capsicum*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 37 (Embrapa).
- Carrizo G. C., Sterpetti, M. Volpi, P. Ummarino, M. and Saccardo, F. 2013. Wild *Capsicums*: identification and in situ analysis of Brazilian species. In: Breakthroughs in the genetics and breeding of *Capsicum* and *Eggplant*. Proceedings of the XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and *Eggplant*, Torino, Italy. 2-4 September 2013. pp 205-213.
- Contreras-Padilla, M., & Yahia, E. M. (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2075-2079.
- Curry, J., Aluru, M. Mendoza, M. Nevarez, J. Melandrez, M. and O'Connell, M.A. 1999. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp.* *Plant Sci* 148:47-57.
- Díaz, J., Pomar, F. Bernal, Á. and Merino, F. 2004. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochem Rev* 3:141-157.
- Dixon, R.A. and Paiva N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Dzib-Echeverria, R. and G. Uribe Valle. 2005. La fertilidad de los suelos luvisoles ródicos y el uso de fuentes de fertilizantes en chile habanero. *Nutrition and water management. Second World Pepper Convention.* 2:205-209.
- Eshbaugh, W.H. 1979. Biosystematic and evolutionary study of the *Capsicum pubescens* complex. National Geographic Society Research Reports, Projects. National Geographic Society, Washington, USA. pp 143-162.
- Eshbaugh, W.H. 1980. The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). *Phytologia* 47:153-166.
- Estrada, B., Pomar, F. Díaz, J. Merino, F. and Bernal M. A. 1999. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Sci. Hortic.* 81: 385-396.

- García-Galindo, H., Ortega-Martínez, J., García-Rosales, M., Martínez, C., & Beristáin, C. (1995). La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia*, *46*, 84-102.
- Gerson, E.A. and Kelsey R.G. 1999. Piperidine alkaloids in nitrogen fertilized. *J. Chem. Ecol.* *25*:2027-2039.
- Halvin, J.L., Beaton, J.D. Tisdale, S.L. and Nelson, W.L. 2005. Soil fertility and fertilizers. 7th Ed. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.
- Harvell, P.K. and Bosland, P.W. 1997. The environment produces a significant effect on the pungency of chilies. *HortScience* *32*:1292.
- Heiser, C.B. and Smith, P.G. 1953. The cultivated *Capsicum* peppers. *Econ.Bot.* *7*:214-227.
- Howard, L.R. and Wildman, R.E.C. 2007. Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In: Wildman REC (ed) Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. 2nd edn. CRC Press, Boca Raton. pp 165-91.
- Hunziker, A.T. 1950. Estudios sobre Solanaceae. I. Sinopsis de las especies silvestres de *Capsicum* de Argentina y Paraguay. *Darwiniana* *9*:225-247.
- Iwai, K., Suzuki, T. Fujiwake, H. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogs, in *Capsicum annuum* var *annuum* Cv Karayatsubusa at different growth-stages after flowering. *Agric Biol Chem* *43*(12):2493-2498.
- Johnson, C. D. and Decoteau D.R. 1996. Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeño pepper plant growth, pod yield, and pungency. *HortScience* *3*:1119-1123.
- Lee, J. M., Kim, S., Lee, J. Y., Yoo, E. Y., Cho, M. C., Cho, M. R., & Bahk, Y. Y. (2006). A differentially expressed proteomic analysis in placental tissues in relation to pungency during the pepper fruit development. *Proteomics*, *6*(19), 5248-5259.
- Leete, E., & Loudon, M. C. (1968). Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *Journal of the American Chemical Society*, *90*(24), 6837-6841.
- Mansour, M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* *43*:491-500.
- Mazourek, M., Pujar, A., Borovsky, Y., Paran, I., Mueller, L., & Jahn, M. M. (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant physiology*, *150*(4), 1806-1821.

- Medina-Lara, F., Echevarría-Machado, I. Pacheco-Arjona, R. Ruiz-Lau, N. Adolfo Guzmán, A. and Martínez-Estevéz, M. 2008. Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience 43(5):1549-1554.
- Mendes, R.T., Resende, R.C. Pereira, A.M. Bento, R.U. Dias da Silva, R.C. Cruz, S.J.S. and Pelá. A. 2016. Foliar application of urea and bell pepper amino acids. African Journal of Agricultural Research. 11(19):1674-1678.
- Moscone, E.A. 1990. Chromosome studies on *Capsicum* (*Solanaceae*) I. Karyotype-analysis in *C. chacoense*. Brittonia 42:147-154.
- Moscone, E.A. 2006. Genomic characterization of the germplasm in peppers (*Capsicum-Solanaceae*) by fluorescent in situ hybridization. Plant Sci. (Sofia) 43:291-297.
- Moscone, E.A., Marisel, A. Scaldaferrò, M.G. Nicolás, M. Cecchini, Y. Sanchez-Garcia, R. Daviña, R. Ducasse, A. Barboza, E. and Friedrich, E. 2007. The evolution of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*): a cytogenetic perspective. Acta Hort 745 p.
- Nishida, I. 2004. Plastid metabolic pathways for fatty acid metabolism. Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles 543-564.
- Ochoa-Alejo, J.N. and Gómez-Peralta, E. 1993. Activity of enzymes Involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Plant Physiology 141(2):147-152.
- Ochoa-Alejo, N., & Gómez-Peralta, J. E. (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141(2), 147-152.
- Ochoa-Alejo, N., & Ramirez-Malagon, R. (2001). In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 701-729.
- Park, Y.K., Park, K.C. Park, C.H. and Kim, N.S. 2000. Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. Mol. Cells 10:18-24.
- Paul W. Bosland. 2009 .The complete chile pepper book, The Haseltine Building 133 S.W. Second Avenue, Suite 450 Portland, Oregon 97204-3527
- Pickersgill, B. 1977. Chromosomes and evolution in *Capsicum*. In: E. Pochard (ed.), *Capsicum 77*. Gompes Rendus Congrès Eucarpia Piment. Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon-Montfavet, France, 5-8 July. pp 27-37.

- Pickersgill, B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: T. Tsuehiya and P.K. Gupta (eds.), *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution*, Part B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp 139-160.
- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann M.T. and Bianchetti, L.B. 2006. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (*Solanaceae*) species: do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines? *Bot. J. Linn. Soc.* 151:259- 269.
- Prasad, B. C., Gururaj, H. B., Kumar, V., Giridhar, P., Parimalan, R., Sharma, A., & Ravishankar, G. A. (2006). Influence of 8-methyl-nonenoic acid on capsaicin biosynthesis in in-vivo and in-vitro cell cultures of *Capsicum* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1854-1859.
- Ravishankar, G.A., Suresh, B. Giridhar, P. Rao, S.R. and Johnson, T.S. 2003. Biotechnology studies on *Capsicum* for metabolite production and plant improvement. In: De AK (ed) *Capsicum: The genus Capsicum*, vol 33. Medicinal And Aromatic Plants–Industrial Profiles. Taylor & Francis, Ltd., London. pp 96-128.
- Soria-Fregoso, M.J., Trejo-Rivero, J.A. Tun-Suarez, J.M. and Teran-Saldivar, R. 2002. Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jack). Instituto Tecnológico de Mérida 2:3-74.
- Stewart Jr, C., Kang, B. C., Liu, K., Mazourek, M., Moore, S. L., Yoo, E. Y., & Jahn, M. M. (2005). The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal*, 42(5), 675-688.
- Stewart, C.J., Mazourek, M. Stellari, G.M. O'Connell, M. and Jahn, M. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *J Exp Bot* 58 (5):979-991.
- Stewart, C.Jr., Kang, B.C. Liu, K. Mazourek, M. Moore, S.L. Yoo, E.Y. Kim, B.D. Paran, I. and Jahn, M.M. 2005. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J* 42(5):675-688.
- Sudha, G., & Ravishankar, G. A. (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Current science*, 1212-1217.
- Sukrasno, N. and Yeoman, M.M. 1993. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* 32(4):839-844.
- Sutoh, K., Kobata, K., Yazawa, S., & Watanabe, T. (2006). Capsinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 sweet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(6), 1513-1516.

- Suzuki, T., Fujiwake, H. and Iwai, K. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid in *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiol* 21:839-853.
- Suzuki, T., Kawada, T. and Iwai, K. 1981. Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol* 22:23-32.
- Tanaka, Y., Nakashima, F. Kirii, E. Goto, T. Yoshida, Y. and Yasuba, K.I. 2016. Difference in capsaicinoid biosynthesis gene expression in the pericarp reveals elevation of capsaicinoid contents in chili peppers (*Capsicum chinense*). *Plant Cell Rep* 36:267-279.
- Thiele, R., Mueller-Seitz, E. and Petz, M. 2008. Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. *J. Agric. Food Chem* 56(11):4219-4224.
- Urrea-López, R., Díaz de la Garza, R. and Valiente-Banuet, J. 2014. Effects of substrate salinity and nutrient levels on physiological response, yield and fruit quality of habanero pepper. *HortScience* 49(6):812-818.
- Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, M. D. L., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., & Nieto-Pelayo, Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4).
- Velasco-Velasco, V.A., Alcántar-González, G. Sánchez-García, P. Estañol-Botello, E. Zavaleta-Mejía, E. Cárdenas-Soriano, R. Rodríguez-Montessoro y A. Martínez-Garza. 2001. Efecto de N, P y K en plantas de chile jalapeño infectadas con el virus jaspeado del tabaco. *Terra* 19: 117-125.
- Velasco-Velasco, V.A., Alcántar-González, G. Sánchez-García, P. Estañol-Botello, E. Zavaleta-Mejía, E. Cárdenas-Soriano, E. Rodríguez-Montessoro, R. y Martínez-Garza, A. 2001. Efecto de N, P y K en plantas de chile jalapeño infectadas con el virus jaspeado del tabaco. *Terra* 19:117-125.
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of natural products*, 76(4), 783-793.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.R. Sudarmonowati, E. Bino, R.J. and Bovy, A.G. 2013. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J Nat Prod* 76(4):783-793.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.R. Sudarmonowati, E. Bino, R.J. and Bovy, A.G. 2013. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J Nat Prod* 76(4):783-793.

- Walsh, B.M. and Hoot, S.B. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (*Solanaceae*) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. *Int. J. Plant Sci.* 162:1409-1418.
- Wang, J., Peng, Z. Zhou, S. Zhang, J. Zhang, S. Zhou, X. Zhang, X. and Peng B. 2011. A study of pungency of capsaicinoid as affected by their molecular structure alteration. *Pharmacol Pharm* 2(3):109-115.
- Willame-Rodrigues, N., Almeida-Lopes, A.C. Carvalho, R. Ferreira-Gomes, L. and Paula-Peron, A. 2015. Karyotypic characterization of *Capsicum* sp. accessions. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá* 37(2):147-153.
- Zachariah, T.J. and Gobinath, P. 2008. Paprika and chilli. In: Parthasarathy VA, Chempakam B, Zachariah TJ (eds) *Chemistry of Spices*. CAB International, London UK. pp 260-286.
- Zamski, E., Shoham, O., Palevitch, D., & Levy, A. (1987). Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Botanical Gazette*, 148(1), 1-6.
- Zamski, E., Shoham, O., Palevitch, D., & Levy, A. (1987). Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Botanical Gazette*, 148(1), 1-6.
- Zhang, Z. X., Zhao, S. N., Liu, G. F., Huang, Z. M., Cao, Z. M., Cheng, S. H., & Lin, S. S. (2016). Discovery of putative capsaicin biosynthetic genes by RNA-Seq and digital gene expression analysis of pepper. *Scientific reports*, 6, 34121.
- Zi-Xin, Z., Shu-Niu, Zhao. Gao-Feng, Liu. Zu-Mei, H. Zhen-Mu, C. Shan-Han, C. and Shi-Sen, L. 2016. Discovery of putative capsaicin biosynthetic genes by RNA-Seq and digital gene expression analysis of pepper. *Scientific Reports* 6:3412.