

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Biosistemas

Actividad Antimicrobiana de Extractos de Chile (*Capsicum annuum* L.) Cultivado En
Invernadero Empleando Factores Inductores de Metabolitos (FIMs)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

L. B. Marcela Vargas Hernández

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

SINODALES

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Enrique Rico García

Secretario

M. En C. Adán Mercado Luna

Vocal

Dr. Rosalía V. Ocampo Velázquez

Suplente

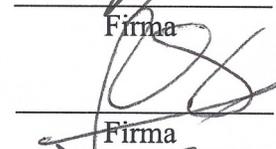
Dr. Andrés Cruz Hernández

Suplente

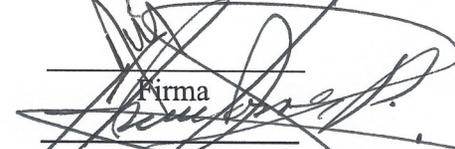
Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Postgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero 2014 México

AGRADECIMIENTOS

Los colaboradores agradecen a FOFI-UAQ-2012 por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

La Licenciada en Biotecnología Marcela Vargas Hernández agradece a CONACYT por la beca otorgada.

También se agradece a la M. en C. Beatriz Liliana Álvarez Mayorga por su colaboración.

RESUMEN

Capsicum annuum es la especie más cultivada chile en el mundo. Es una fuente importante de metabolitos secundarios los cuales poseen una amplia variedad de actividades biológicas como antioxidante, antimutagénica, antimicrobiana, antifúngica, entre otros. La producción de estos compuestos puede ser potenciada mediante la aplicación de Factores Inductores de Metabolitos (FIMs). El objetivo de este trabajo fue evaluar si la aplicación de FIMs en pimientos incrementa la actividad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos del área médica. Para lo cual se implementó un sistema de producción de pimiento bajo el efecto de 3 FIMs, Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Ácido salicílico (AS) y sequía al 50%. Se obtuvieron extractos metanólicos de fruto, se realizó la identificación y caracterización de metabolitos por HPLC. Se determinó la capacidad antioxidante por los métodos espectrofotométricos ABTS y DPPH. Por último la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutants*, *S. thyphimorium*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes*. En este estudio las concentraciones más altas de fenoles y flavonoides correspondieron a los tratamientos H₂O₂ 18 mM, AS 0.5 mM y sequía al 50% con 13.53, 15.06 y 15.66 GAE (miliequivalentes de ácido gálico)/g extracto para fenoles y 10.30, 9.53 y 9.53 RE (miliequivalentes de rutina)/g extracto para flavonoides respectivamente en comparación con el control 13.03 GAE/g y 9.288 RE/g extracto. Los tratamientos que mostraron más cantidad de taninos fueron AS 0.1 mM, H₂O₂ 6 mM y sequía al 50% con 11.92, 9.57 y 9.69 CE/g extracto, comparado con el control 7.346 CE/g extracto. La actividad antioxidante fue mayor para los tratamientos en los que se utilizaron FIMs a las concentraciones más altas de AS, H₂O₂ además de la sequía al 50% con 97.98, 98.47 y 96.04% de ARA para ABTS y 75.76, 83.19, y 75.18 % de ARA para DPPH. Por último, no se observó un significativo efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de SA 0.1 Y 0.5 mM contra *S. aueus*. La aplicación de Factores Inductores de Metabolitos en plantas de chile pimiento (*Capsicum annuum*) incrementan la cantidad de compuestos bioactivos en fruto e induce la actividad antimicrobiana de sus extractos.

Palabras clave: elicitador, estrés abiótico, ácido salicílico, FIMs, peróxido de hidrógeno, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

SUMMARY

Capsicum annuum is the most widely cultivated species of peppers worldwide. It is an important source of secondary metabolites which have a wide variety of biological activities such as antioxidant, antimutagenic, antimicrobial, and antifungal, among others. The production of these compounds can be enhanced by applying Metabolites-Inducer Factors (MIFs). The aim of this study was to evaluate whether the application of MIFs in pepper plants increases the antioxidant and antimicrobial activity against microorganisms. To which we implemented a pepper production system under the effect of three FIMs, hydrogen peroxide (H₂O₂), salicylic acid (SA) and 50% drought. Methanolic extracts were obtained to identify and characterize metabolites by HPLC. Antioxidant capacity was measured by spectrophotometric techniques DPPH and ABTS. Finally, the antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutants*, *S. thyphimorium*, *E. faecalis* and *L. monocytogenes*. In this study, the highest concentrations of phenols and flavonoids H₂O₂ treatments corresponded to 18 mM, 0.5 mM and drought AS 50% with 13.53, 15.06 and 15.66 GAE/g extract for phenols and 10.30, 9.53 and 9.53 RE/g extract for flavonoid content respectively compared with control 13.03 GAE /g RE 9.288 /g extract. High tannin concentration occur in AS 0.1 mM, H₂O₂ 6 mM and drought 50% with 11.92 , 9.57 and 9.69 CE /g extract respectively, compared with the control 7346 CE/g extract. The antioxidant activity was greater for the treatments that were used FIMs to the highest concentrations of AS, in addition to drought H₂O₂ 50% to 97.98, 98.47 and 96.04 % ARA for ABTS and 75.76, 83.19 and 75.18% ARA for DPPH. Finally there was no significant antimicrobial activity for methanol extracts 0.1 and 0.5 mM SA against *S. aureus*. It concludes that applying Metabolites-Inducer Factors (MIFs) to chilli pepper (*Capsicum annuum*) increase the amount of bioactive compounds in metanolic extracts and induces the antimicrobial activity.

Keywords: elicitor, abiotic stress, salicylic acid, hydrogen peroxide, MIFs, antimicrobial activity, antioxidant activity.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------------|
| RESUMEN | i |
| SUMARY | ii |
| ÍNDICE GENERAL | iii |
| ÍNDICE CUADROS | vi |
| ÍNDICE FIGURAS | vii |
| 1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA | 1 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 3. INTRODUCCION | 4 |
| 4. REVISION LITERARIA | 6 |
| 4.1 Generalidades | 6 |
| 4.2 Metabolitos secundarios | 8 |
| 4.2.1. Compuestos Fenólicos..... | 9 |
| 4.2.2 Capcinoides | 10 |
| 4.3 Respuesta inmune | 13 |
| 4.4 FIMs..... | 14 |
| 4.5 Bioactividad | 17 |
| 4.5.1 Antioxidante | 17 |
| 4.5.2 Antimicrobiana | 18 |
| 5. HIPÓTESIS | 19 |
| 6. OBJETIVO | 20 |
| 7 METODOLOGÍA | 21 |
| 7.1 Material..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 7.1.1 Material Químico..... | 21 |
| 7.1.2 Material Biológico..... | 21 |
| 7.2.2 Diseño experimental..... | 22 |
| 7.4 Determinación y caracterización de los compuestos fenólicos..... | 24 |
| 7.4.1 Fenoles Totales..... | 24 |
| 7.4.2 Flavonoides..... | 24 |
| 7.4.3 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides mediante HPLC..... | 25 |
| 7.4.4 Taninos condensados..... | 26 |
| 7.4.5 Antocianinas..... | 26 |
| 7.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos..... | 27 |
| 7.5.1 Método ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico))..... | 27 |
| 7.5.2 Técnica de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)..... | 27 |
| 7.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de estos extractos contra microorganismos de importancia médica..... | 28 |
| 7.6.1 Crecimiento del inóculo..... | 28 |
| 7.6.2 Actividad antimicrobiana..... | 28 |
| 7.6.3 Análisis estadístico..... | 28 |
| 7.2 Implementación de un sistema de producción de chile pimiento en invernadero en el que se incluyan 3 FIMs..... | 21 |
| 7.3 Obtener extractos de fruto de pimiento en etapa de cosecha..... | 23 |
| 8 RESULTADOS..... | 29 |
| 8.1 Implementación de un sistema de producción de chile pimiento en invernadero en el que se incluyan 3 Factores Inductores de metabolitos..... | 29 |
| 8.2 Condiciones ambientales..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 8.3 Variables medidas en la planta de pimiento bajo efecto de los FIMs | 30 |
| 8.3.1 Desarrollo de frutos | 30 |
| 8.3.2 Desarrollo de flores | 33 |
| 8.4 Altura de pimiento | 35 |
| 8.5. Variables medidas del pimiento | 37 |
| 8.5.1 Malformación de los frutos..... | 37 |
| 8.5.2. Altura de fruto | 38 |
| 8.5.3. Diámetro de los frutos | 38 |
| 8.6.1. Efecto de la aplicación de FIMs en la cantidad de metabolitos..... | 44 |
| 8.6 Extracción de compuestos fenólicos..... | 43 |
| 8.7 Perfil de compuestos fenólicos por HPLC | 47 |
| 8.8 Actividad antioxidante..... | 47 |
| 8.9 Actividad antimicrobiana | 51 |
| 9. CONCLUSIÓN | 52 |
| 10. PERSPECTIVAS | 53 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 54 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. . Cantidad de agua regada a los pimientos diariamente..... | 22 |
| Tabla 2. . Rendimiento de los extractos por cada 75 g de muestra. | 43 |
| Tabla 3. Contenido total de fenoles y flavonoides por gramo de extracto del tratamiento de ácido salicílico | 45 |
| Tabla 4. Contenido total de fenoles y flavonoides por gramo de extracto del tratamiento de peróxido de hidrógeno | 45 |
| Tabla 5. Contenido total de fenoles y flavonoides por gramo de extracto del tratamiento de sequía al 50%..... | 46 |
| Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos metanolicos del tratamiento de ácido salicílico..... | 47 |
| Tabla 7. Capacidad antioxidante de los extractos metanolicos del tratamiento de peróxido de hidrógeno | 48 |
| Tabla 8. Capacidad antioxidante de los extractos metanolicos del tratamiento de sequía al 50%..... | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución de <i>Capsicum annum</i> en México. | 6 |
| Figura 2. Participación de los principales países productores de los cultivares <i>Capsicum</i> de acuerdo a la FAOSTAT (2009). | 7 |
| Figura 3. Producción de <i>Capsicum</i> spp en México según la FAOSTAT, 2010. | 8 |
| Figura 4. Las estructuras químicas y el peso molecular de los capsaicinoides y DMBMO. 12 | |
| Figura 5. Modelo del guardián para el funcionamiento de la respuesta de defensa mediada por efectores en plantas. | 15 |
| Figura 6. Diseño experimental: T1= ácido salicílico, C1= 0.01 mM, C2= 0.1 mM, C3= 0.5 mM, T2= Peróxido de hidrógeno, C1= 6 mM, C2= 14 mM, C3= 18 mM, T3= Riego 50% | 23 |
| Figura 7. Comportamiento de la temperatura en el invernadero | 29 |
| Figura 8. Comportamiento de la humedad relativa en el invernadero | 30 |
| Figura 9. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el número de frutos a través del tiempo a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50% | 32 |
| Figura 10. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el número de flores a través del tiempo a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50% | 34 |
| Figura 11. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre la altura de la planta a través del tiempo a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50% | 36 |
| Figura 12. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre la altura del fruto de pimiento en la cosecha (103 días) a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50% | 39 |
| Figura 13. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el diámetro del fruto de pimiento en la cosecha (103 días) a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50% | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el peso del fruto de pimiento en la cosecha (103 días) a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50% | 42 |
| Figura 15. Actividad antimicrobiana de los extractos de chile a diferentes concentraciones del extracto. a) Control, b) <i>S. aureus</i> contra los extractos de ácido salicílico 0.01 mM b) <i>S. aureus</i> contra los extractos de ácido salicílico 0.5 mM. | 51 |

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El estilo de vida actual - el cambio demográfico de las personas de la tercera edad y la urbanización - demanda alimentos que garanticen la seguridad alimentaria. A pesar de que la agroquímica ha permitido soportar el problema de reducción de espacios de siembra y aumento de la población, así como el abasteciendo la alimentación humana, la aplicación de compuestos tóxicos perjudican tanto la salud como el equilibrio ambiental. La aplicación de agroquímicos inciden en la salud humana provocando algunos tipos de leucemias, afecciones pulmonares y de la piel, entre otros. Es por ello imprescindible el desarrollo de técnicas que presidan del uso de compuestos químicos. Sin embargo no es suficiente cubrir la disponibilidad de alimentos, sino que además la calidad es indispensable para cubrir las necesidades actuales del deterioro de la salud debida principalmente a la insuficiente actividad física y las practicas alimentarias. Los alimentos funcionales además de bridar características nutricionales, han sido desarrollados con el fin de proporcionar un efecto específico sobre la salud humana. La investigación se ha encaminado a la búsqueda, identificación y evaluación de compuestos los cuales son sintetizados por las plantas, y que les confieren actividades biológicas como antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-cancerígenos, anti-mutagénicos, antimicrobianos, antifúngicos, entre otros. La domesticación y las prácticas de cultivo de diversas especies vegetales pueden presentar una oportunidad para solventar problemas con la ayuda de herramientas biotecnológicas que permitan la producción de compuestos bioactivos. Algunos de los métodos utilizados son el cultivo *in vitro*, síntesis química a partir de precursores y entre los más simples se encuentran la aplicación de elicitores de metabolitos secundarios o condiciones de estrés ambiental, mejor conocidos por FIMs.

Las pérdidas en los cultivos se debe principalmente a la aparición de bacterias, parásitos y virus, algunas de las estrategias que se han adoptado es el desarrollo de cultivos resistentes, control biológico, rotación de cultivares y la aplicación de compuestos

químicos. Sin embargo aún falta por conocer sobre la interacción planta-patógeno en presencia de estos agentes protectores. Los metabolitos secundarios poseen la capacidad de proteger a la planta contra gran variedad de microorganismos, además de que poseen efectos inhibitorios sobre algunos microorganismos que pueden afectar la salud humana. El control biológico en el que los bioproductos que protegen a la planta sean enzimas, metabolitos primarios o secundarios que actúen como FIMs, puede ser una estrategia utilizada ya que algunas ventajas que posee son bajo costo, fácil aplicación y no son perjudiciales al medio ambiente.

A pesar de los enormes avances en el desarrollo de medicamentos de uso humano, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos, virus y parásitos siguen siendo una gran amenaza para la salud pública. Principalmente en países en desarrollo debido a la relativa falta de disponibilidad de medicamentos, el precio de los mismos y la aparición resistencia a los medicamentos generalizada. Durante las últimas dos décadas, el desarrollo de resistencia a los fármacos ha traído como consecuencia mortalidad y aumento de gastos, así como la aparición de efectos secundarios indeseables de ciertos antibióticos. En la actualidad las investigaciones se han encaminado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de plantas, para ser utilizados en la industria farmacéutica y agrícola, ya que no producen resistencia en bacterias por su gran diversidad de estructuras.

Las plantas son capaces de sintetizar diversos compuestos que podrían contrarrestar los problemas más importantes de salud pública. Las enfermedades crónico degenerativas y cardiovasculares, estas últimas la principal causa de muerte entre la población, son provocadas por el estrés oxidativo. Este tipo de estrés provoca el deterioro celular causado por los radicales libres, compuestos nocivos que son sintetizados por el mismo organismo y provenientes del ambiente externo. El consumo de compuestos antioxidantes, por sus propiedades químicas tienen la capacidad de contrarrestar el efecto nocivo de radicales que provocan daño celular.

2. JUSTIFICACIÓN

En México, el chile (*Capsicum annuum* L.) es el cultivo hortícola más importante, actualmente ha incrementado su popularidad de consumo debido a que se ha encontrado ser buena fuente de vitamina C y E, provitamina A, carotenoides y también varios fenoles y flavonoides. La capsaicina es uno de los compuestos más importantes del género *capsicum*, por su valor en la industria farmacéutica ya que ha sido probado como analgésico, anticancerígeno y antioxidante. Sin embargo se han encontrado otros compuestos importantes como la luteína, ácido p-cumárico, tocoferol, trigonelina, y zelaxantina.

Estos compuestos debido a su conformación estructural son capaces de presentar bioactividades como antioxidantes y antimicrobianos. Se han desarrollado propuestas que permiten obtener compuestos bioactivos de manera más eficiente y en mayor proporción. Algunos compuestos como el peróxido de hidrógeno y el ácido salicílico, así como factores abióticos, el estrés físico como sequía posee la capacidad de prender el sistema de defensa induciendo la expresión de genes de resistencia y por lo tanto inducen la síntesis de compuestos como son fenoles, terpenoides, alcaloides o proteínas relacionadas con patogénesis (PR).

El pimiento bajo la aplicación de FIMs se espera induzca el sistema de defensa, incrementando la cantidad de compuestos secundarios y en caso de que alguno de ellos posea actividad antioxidante o antimicrobiana, se pueda ver un incremento en su potencial biológico.

3. INTRODUCCIÓN

Existe a nivel mundial un creciente interés en contar con alimentos que además de nutrir al individuo también le proporcionen beneficios a su salud. El papel de la nutrición en la prevención de enfermedades se ha reconocido desde hace siglos. El término "nutracéuticos" se refiere a los alimentos con beneficios para la salud médica que junto con el tratamiento, ayuda a retrasar la progresión de la enfermedad, la mejora su gestión y la modificación eficaz de los factores de riesgo (Singh, 2012). Diversos alimentos como frutas, cereales, entre otros son fuente de fibra, metales, aceites esenciales y vitaminas importantes para mantener un buen estado de salud, que incluyen la prevención de enfermedades como el cáncer o diabetes (Ferrari, 2011).

Las plantas son capaces por sí solas de desarrollar métodos de defensa contra diversos microorganismos por medio de la síntesis de compuestos que funcionan como barrera de defensa para las plantas. El sistema de defensa puede ser inducido por factores externos tanto físicos como químicos, compuestos como el ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, quitosano, así como temperatura, sequía, etc., que provocan la síntesis de compuestos de defensa y además presentan gran variedad de actividades biológicas (Mejía-Teniente, *et al.* 2013).

Para las industrias farmacéuticas, la investigación encaminada a la búsqueda de agentes antimicrobianos ha sido poco a poco abandonada debido a los retos que se presentan. Uno de los principales retos a vencer es la resistencia desarrollada por los microorganismos. Es por eso que los nuevos estudios se han enfocado al desarrollo de fármacos de origen natural que ayuden a tratar algunas infecciones. Actualmente, diversas enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares, entre otras, son la principal causa de muerte entre la población. Los antioxidantes son compuestos capaces de prevenir dichas enfermedades previniendo la oxidación celular. La aplicación de FIMs como una herramienta para inducir la producción de metabolitos secundarios, puede ser una alternativa para preservar la salud humana y el medio ambiente.

La metabolómica nos permite conocer el funcionamiento de un sistema biológico a nivel molecular, identificando gran variedad de estructuras de los metabolitos, algunos de los cuales no han sido identificados. El estudio de estos compuestos permite diferenciar aquellos que poseen actividad biológica de todos los que son tóxicos. Esta herramienta nos permitirá conocer como el estrés inducido en plantas de Chile tiene una relación directa con su perfil metabólico.

4. REVISION LITERARIA

4.1. Generalidades

El género *Capsicum* L. (Fam. *Solaneae*, Subfamilia: *Capsaicinae*) comprende más de 30 especies, algunas con variedades de gran importancia económica de las cuales cinco son domesticadas: *Capsicum annum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum*. En México el género *Capsicum* es cultivado en las regiones tropicales, subtropicales y templadas. En los Estados de Puebla, Morelos y Querétaro se encuentra la mayor diversidad de chiles cultivados (De Teodoro-Pardo, 2007) (Figura 1).

Hierba arbustiva perenne, generalmente con crecimiento anual alcanzando 2 m de altura. Las hojas aovadas, pecioladas, solitarias o por pares, miden 3.4-15 x 1-5 cm, ápice agudo a acuminado, con base en forma de cuña, a menudo desigual, solo con una o rara vez 2 o 3 en el primer nodo, tallos que a menudo se engrosan en la fruta.

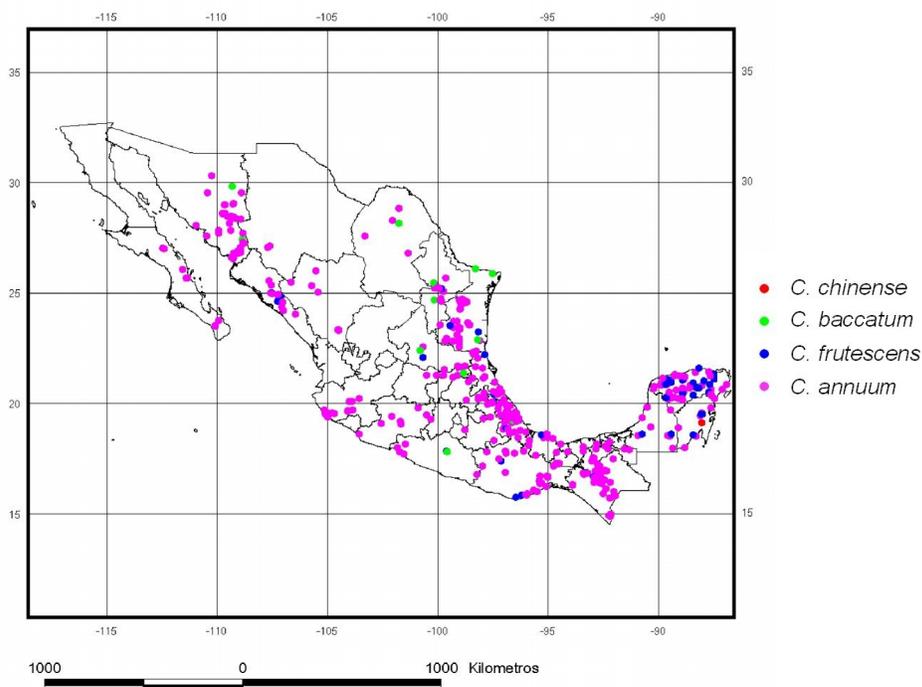


Figura 1. Distribución de (*Capsicum annum*) en México.

Las flores son solitarias o por grupos de unas pocas, erectas o algo péndulas y naciendo en el nudo de las hojas. Cáliz de 3-4 mm es acampanado y entero, con 5-7 costillas principales redondeadas terminadas en un diente, generalmente romo y unas cuantas costillas secundarias. Corola de 1.2 cm de diámetro, comporta 5-7 pétalos de color blanco y finísimamente denticulados en sus bordes. Semillas de 3 a 4 mm. El fruto puede tener una infinidad de formas, es una baya hueca con 2-4 tabiques incompletos que soportan las simientes, que son discoidales/espirales, muy comprimidas. Florece de mayo a agosto, y fructifica desde julio hasta noviembre.

La especie *Capsicum annum*.es la especie más cultivada de pimientos en el mundo (Misra, 2011). La producción mundial de pimiento asciende a 1.8 millones de hectáreas, con más de 28 millones de toneladas por año (Wahyuni *et al.* 2012). México es el segundo país productor de chiles después de China con 1,835,999 ton (FAOSTAT, 2010), además la producción va incrementando (Figura 2).

Participación de los principales países productores de los cultivares *Capsicum* (2009)

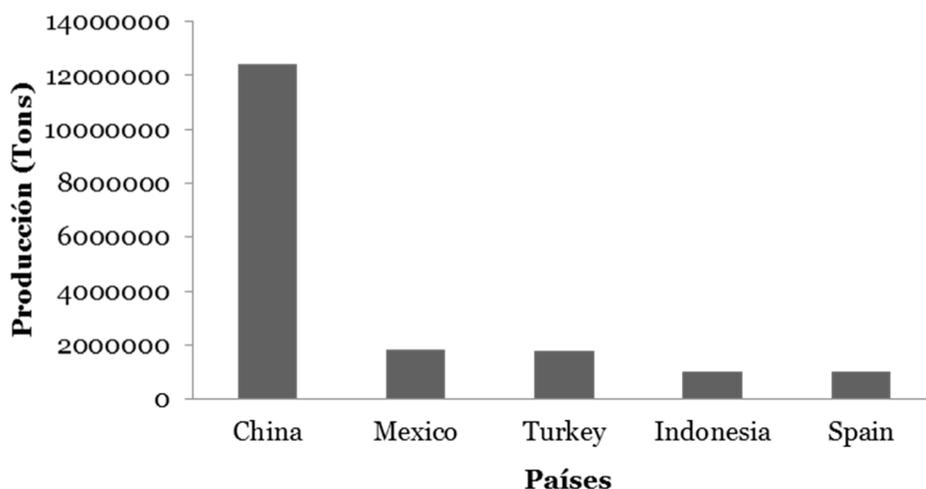


Figura 2. Participación de los principales países productores de los cultivares *Capsicum* de acuerdo a la FAOSTAT (2009).

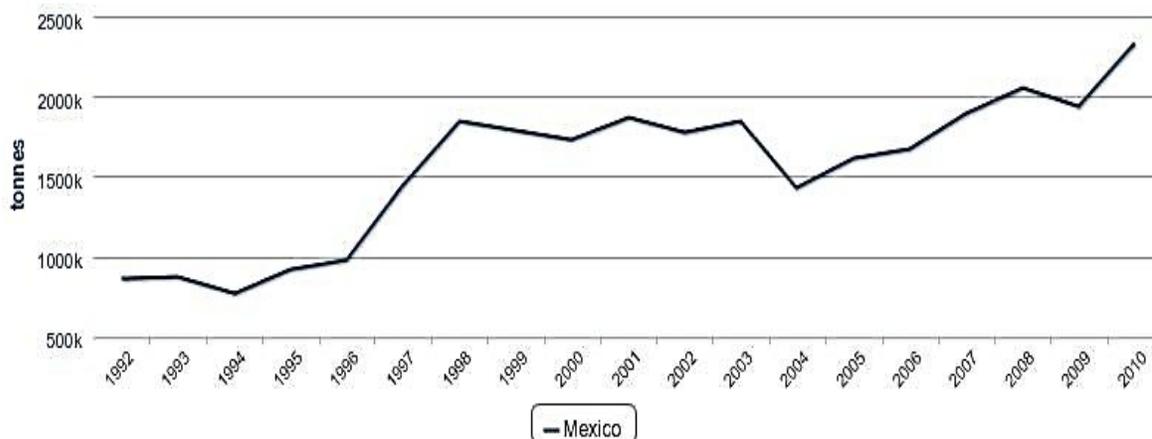


Figura 3. Producción de *Capsicum* spp en México según la FAOSTAT, 2010.

Los frutos de pimiento son fuente importante de compuestos derivados del metabolismo secundario como son ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (provitamina A), tocoferoles (Vitamina E), compuestos fenólicos, flavonoides y capsaicinoides (Wahyuni *et al.*, 2012). Una función de los metabolitos secundarios en plantas es proporcionar protección contra los cambios ambientales y el estrés biótico o abiótico (López-Gresa, 2011). Como el caso de diversos metabolitos secundarios la acumulación de estos compuestos puede ser controlada en parte, por la transcripción de genes de enzimas biosintéticas (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2012).

4.2. Metabolitos secundarios

Existe a nivel mundial un creciente interés en contar con alimentos que además de nutrir al individuo también le proporcionen beneficios a su salud. Los nutraceuticos es un término acuñado en 1979 por Stephen DeFelice. Se define "como un alimento o partes de los alimentos que proporcionen apoyo médico o de salud beneficios, incluyendo la prevención y tratamiento de la enfermedad". (Rajat *et al.*, 2012). Las plantas producen una gran variedad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener ninguna función directa en el

crecimiento y desarrollo, es decir que no tienen papeles generalmente reconocidos en el proceso de la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, asimilación de nutrientes y la diferenciación (Mazid, 2011). El papel de estos va desde la ecología a la defensa, la protección contra el estrés tanto biótico como abiótico, además de estar involucrados en las funciones ecológicas como atrayentes o repelentes, para los polinizadores y fitofagia respectivamente, colores y olores de los órganos reproductivos (flores y frutos) (Iriti *et al.*, 2009). La mayoría de los metabolitos secundarios de las hierbas y especias son comercialmente importantes ya que poseen un alto potencial de explotación y comercialización, por formar parte de compuestos activos de un importante número de compuestos farmacéuticos (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Existen tres grupos principales de metabolitos secundarios: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Mazid, 2011).

4.2.1. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de origen vegetal que constituyen uno de los grupos más abundantes de metabolitos naturales y forman parte importante de las dietas humanas y animales (Vattem, 2005); son sintetizados a través de la vía del ácido shikímico y corísmico. (Bochkov *et al.*, 2012). Los factores de estrés que afectan la adecuación de las plantas por medio de la síntesis de los compuestos secundarios, no sólo se derivan de fuentes naturales, tales como temperatura adversa y sus fluctuaciones (calefacción, refrigeración, congelación), la radiación (fotoinhibición, foto-oxidación), desequilibrio osmótico (salinidad, sequía), la hipoxia / anoxia (inundaciones), minerales (macro y micronutrientes) deficiencia, heridas, fitofagia y el ataque de patógenos, sino también de las actividades antropogénicas, estos últimos incluyen a los xenobióticos empleados en la agricultura (plaguicidas), contaminantes del medio ambiente (aire suelo y agua) y el aumento de radiación UV (Vattem, 2005). Estos compuestos debido a su estructura química, poseen actividades biológicas importantes como antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatorios, entre otros, (Friedman, 2007). Los radicales libres están implicados más de 80 enfermedades, incluyendo diabetes *mellitus*,

artritis, cáncer, envejecimiento, etc. En el tratamiento de esas enfermedades, la terapia antioxidante se ha ganado una gran importancia y la investigación se dirige ahora hacia la búsqueda de antioxidantes de origen vegetal (Ahmad, 2012). Los compuestos antioxidantes pueden funcionar como eliminadores de radicales libres, agentes complejantes de pro-oxidantes metales, agentes reductores y atenuadores de la formación de oxígeno libre, antes de que alcancen a reaccionar con otras moléculas como el ADN, proteínas, lípidos, entre otros (Kaur y Bilaspuri, 2010).

4.2.2. Capcinoides

Otro tipo de compuestos derivados del metabolismo secundario son los capsinoides, sintetizados por las plantas del género *Capsicum annum*, entre los más importantes se encuentran la capsaicina. Los compuestos más importantes en esta especie son los capsaicinoides, un grupo de amidas aromáticas derivadas de fenilalanina y leucina o valina. (Ben-Chaim *et al.*, 2006). Los capsaicinoides son alcaloides producidos por una condensación reacción entre un resto aromático y una cadena C9-C11 de ácido graso. El resto aromático es vanillilamina, una molécula derivada de fenilalanina. De cadena ramificada ácidos grasos se biosintetizados de la valina y la leucina, y en el caso de la capsaicina y dihidrocapsaicina aquellos ácidos difieren en el grado de insaturación de la 9-carbono graso de cadena lateral de ácido. Las vías que participan en la síntesis de la capsaicina son: la vía de los fenilpropanoides, que determina la estructura fenólica y el metabolismo de ácidos grasos, que determina los ácidos grasos de la molécula. (Reyes-Escogido *et al.*, 2011).

La capsaicina se utiliza actualmente para el tratamiento de la neuropatía diabética, la osteoartritis, neuralgia post-herpética y la psoriasis, así como repelentes insecticidas, insectos o animales, y los plaguicidas que contienen capsaicinoides (Wesołowska y Kaur, 2011). Esta molécula posee varias propiedades farmacéuticas, se ha utilizado como analgésico, es activo contra la inflamación neurogénica y ha mostrado un efecto anticancerígeno (Al *et al.*, 2011). La investigación dirigida a aumentar o mejorar la producción de compuestos picantes ha puesto de manifiesto que el estrés hídrico aumenta los niveles de capsaicinoides ya que el

déficit de agua afecta a la vía fenilpropanoides. El estrés hídrico aumenta también los niveles de capsaicina al aumentar la actividad de las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL), el ácido cinámico-4-hidroxilasa (C₄H) y capsaicina sintasa (CS), todos implicados en la biosíntesis de la capsaicina. La administración de los precursores de la capsaicina como ácido 8-metil-nonenico y vanililamina han demostrado que el ácido 8-metilnonenico es el sustrato limitante para la síntesis de la capsaicina por que se produce a niveles inferiores comparada con la vanililamina (Reyes-Escogido, 2011). Este grupo de compuestos son responsables del picor y se encuentran ubicados principalmente en el tejido de la placenta adyacente a las semillas. Otros compuestos encontrados en esta especie son los carotenoides los cuales son sintetizados en el pericarpio de los frutos *Capsicum* (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2012). Algunos intermediarios fenólicos pueden influir en la biosíntesis de capsaicinoides (Garceã S-Claver *et. al*, 2007).

El bajo contenido de capsaicina puede ser debido a la baja actividad de algunas enzimas que participan en la formación de la estructura fenólica de la capsaicina con es la amonio liasa (PAL) y el ácido cumárico *o*-metiltransferasa (COMT), una de las formas en que se puede promover su síntesis es mediante la aplicación de elicitores de metabolitos secundarios o condiciones de estrés ambiental, mejor conocidos por FIM's (Gutiérrez-Carbaja *et al.*, 2010). Es por esta razón que gran cantidad de investigación que permita su producción mediante manipulación de las condiciones de cultivo, síntesis química y enzimática u otros métodos alternativos como cultivo de celular. Capsaicinoides. Aunque más de 10 diferentes estructuras de capsaicinoides existen, la capsaicina (CAP) y la dihydrocapsaicina (DHCAP) son las más predominantes con al menos en 90% de todos los capsaicinoides (Aza-González *et al.*, 2011) (Figura 4).

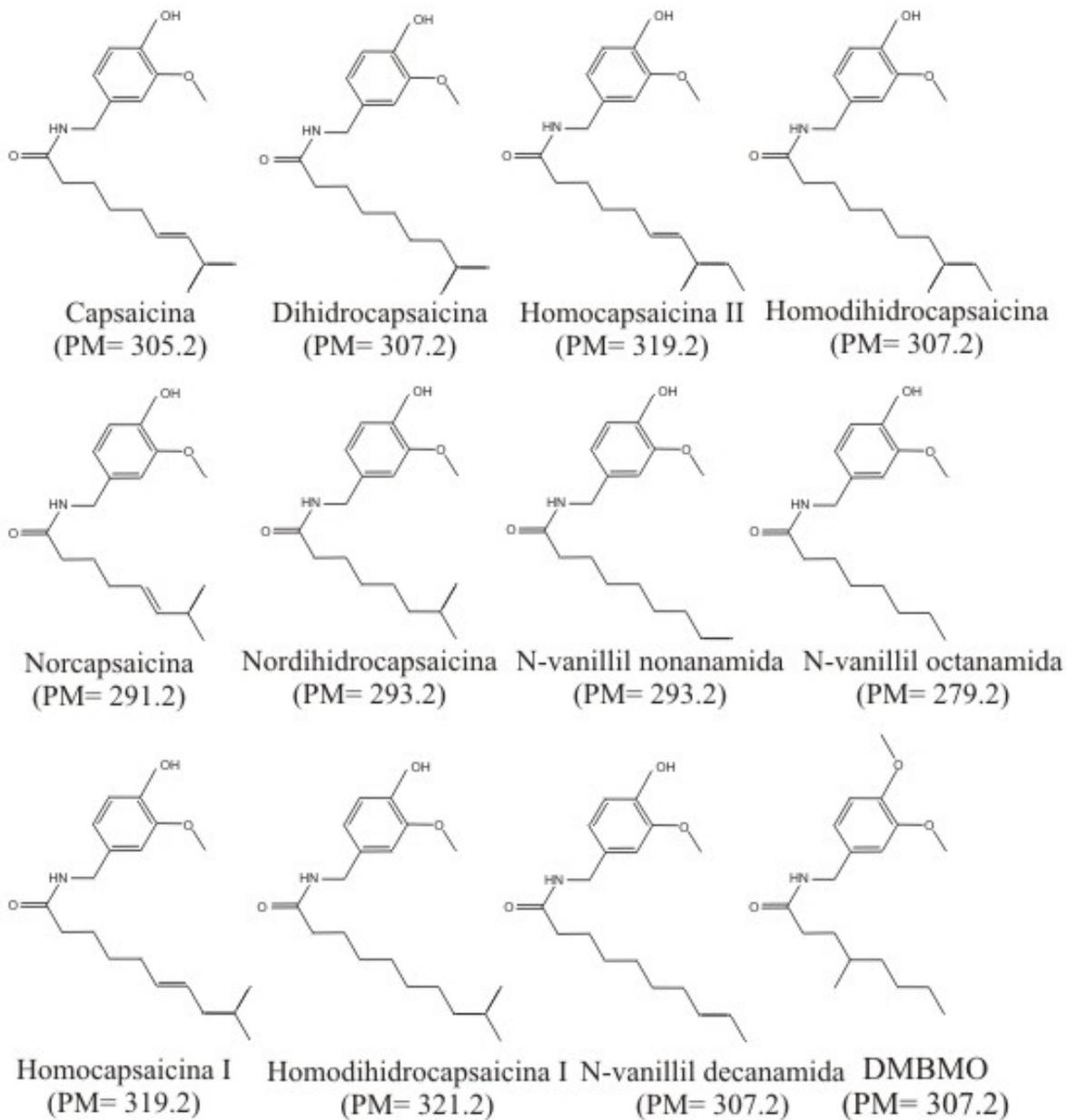


Figura 4. Las estructuras químicas y el peso molecular de los capsaicinoides y DMBMO (Aza-González *et al.*, 2011).

4.3. Respuesta inmune vegetal

Las plantas han desarrollado complejas estrategias de defensa debido a la falta de movilidad y ausencia de sistema inmune. Para detener la propagación de agentes patógenos, las plantas poseen una inmunidad innata que consiste en diferentes etapas de respuestas de defensa. Los metabolitos de defensa puede dividirse en a sustancias constitutivas, también llamadas fitoanticipinas y metabolitos inducidos conocidos como fitoalexinas los cuales frente a una infección se sintetizan gracias a la producción de enzimas de *novo*.

Uno de los mecanismos de resistencia a las enfermedades en las plantas es su capacidad para acumular compuestos de bajo peso molecular (metabolitos secundarios) con alta actividad antimicrobiana, tales como alcaloides, cumarinas, furanocumarinas, isoflavonoides, poliacetilenos, quinonas, taninos y terpenos (Reichling, 2010), ofreciendo una herramienta que les ayude a afrontar los problemas de estrés, adaptándose al ambiente y permitiendo su sobrevivencia (Edreva, 2008). Para detener la propagación de agentes patógenos, las plantas poseen una inmunidad innata que consiste en diferentes etapas de respuestas de defensa. Algunas de estas defensas están preestablecidas y otros se activan después del reconocimiento de elicitores de patógenos (González-Lamothe *et al.*, 2009). El modelo del guardián explica el funcionamiento de la respuesta de defensa mediada por efectores en plantas. Esto se explica en la figura 4 donde el Panel a, célula vegetal en estado “sin estrés” (ausencia de patógeno); la proteína R (RPM1 o RPS2) está inactiva y detecta una proteína de mantenimiento importante para la célula vegetal (RIN4); por tanto el sistema de defensa inducida por efectores está inactivo. Paneles b y c, la presencia de algún estrés por presencia de un patógeno que presente proteínas de avirulencia (efectores AvrB, Avrpm1 o Avrpt2) modifica la estructura de la proteína de mantenimiento RIN4 mediante fosforilación (mediada por RIPK que fosforila a RIN4, panel b), o ruptura (panel c); lo anterior ocasiona el encendido del sistema de defensa mediado por efectores. Las fitoalexinas son sustancias tóxicas y antimicrobianas producidas por las plantas después de la estimulación de varios tipos de microorganismos, daño químico o mecánico. Son producidas por las células sanas adyacentes de donde se produce el daño. Más de 30 de estos compuestos existen y tienen estructuras muy similares. Las fitoalexinas que producen las plantas depende mucho de la

familia por ejemplo las leguminosas producen isoflavonoides y la familia de las Solanaceas producen terpenoides. Algunas de las fitoalexinas más estudiadas son la faseolina en frijol, gliseolina en soya, alfalfa y clavo en papa se encuentra la risitina y el capsidiol es producido por el chile (Agrios, 2009).

4.4. FIMs

Otra forma de inducir el sistema de defensa de las plantas es mediante la aplicación de FIMs los cuales son moléculas que estimulan la defensa o las respuestas inducidas por estrés en las plantas e incluyen aquellas sustancias que se originan a partir del patógeno o aquellas que son expeditos por las mismas plantas. La exposición controlada de FIMs (Factores inductores del metabolismo) proporcionan o generan Patrones Moleculares Asociados a Estrés de Plantas (PMAEPs) que son reconocidos como “extraños” por la célula vegetal y encienden el arsenal de defensa de la planta (Torres-Pacheco *et al.* 2012). El ácido jasmónico (JA) y su equivalente volátil, el metil jasmonato (MeJa) son hormonas de las plantas que participan en las respuestas de defensa tanto químicas como fisiológicas (Fritz *et al.*, 2010). El jasmonato modula la expresión genética a nivel de traducción, procesamiento de RNA y transcripción. Este participa como un factor de transcripción o mediador de la señal entre el complejo del receptor y la activación de los genes responsable de inducción de las enzimas que sintetizan fitoalexinas como son: flavonoides, alcaloides, terpenoides, tioaminas, fenolpropanoides y polipéptidos (Kumar *et al.*, 2010).

Tanto el estrés biótico como abiótico, el ataque de patógenos, heridas y la exposición a la luz UV, inducen una respuesta de defensa. En relación con esta actividad, también se da el aumento de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y otras enzimas que participan en las vías metabólicas, tales como peroxidasa (Mohammad *et al.*, 2007). El “Sistema Inmune Vegetal (SIV)” que poseen las plantas responde a cambios o perturbaciones en la estructura celular ocasionados por microorganismos, la aplicación de sustancias químicas exógenas como elicitores, fertilización, o bien, a estrés de tipo abiótico. Los factores mencionados que generan esos cambios en la estructura de células vegetales se propone se denominen como “Factores Inductores de Metabolitos (FIMs)”. Los mecanismos de defensa se pueden

clasificar en constitutiva y resistencia inducida. Por ejemplo, en ácido jasmónico (JA) las respuestas mediadas se dirigen generalmente contra herbívoros y patógenos, mientras que con el ácido salicílico (SA) se media la resistencia sistémica adquirida contra patógenos biotróficos. (Liu *et al.*, 2011). Fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima clave para la síntesis de diversos fenilpropanoides como ligninas, cumarinas y flavonoides. Los productos de la actividad de PAL en las plantas según reportes, tiene influencia en la respuesta del hospedero contra las invasiones de patógenos como por ejemplo *Colletotrichum spp.* (Kim *et al.*, 2007), condiciones ambientales, daños físicos (Liu *et al.*, 2010). Dentro de las respuestas de defensa en las plantas también se incluyen la activación de la vía fenilpropanoides.

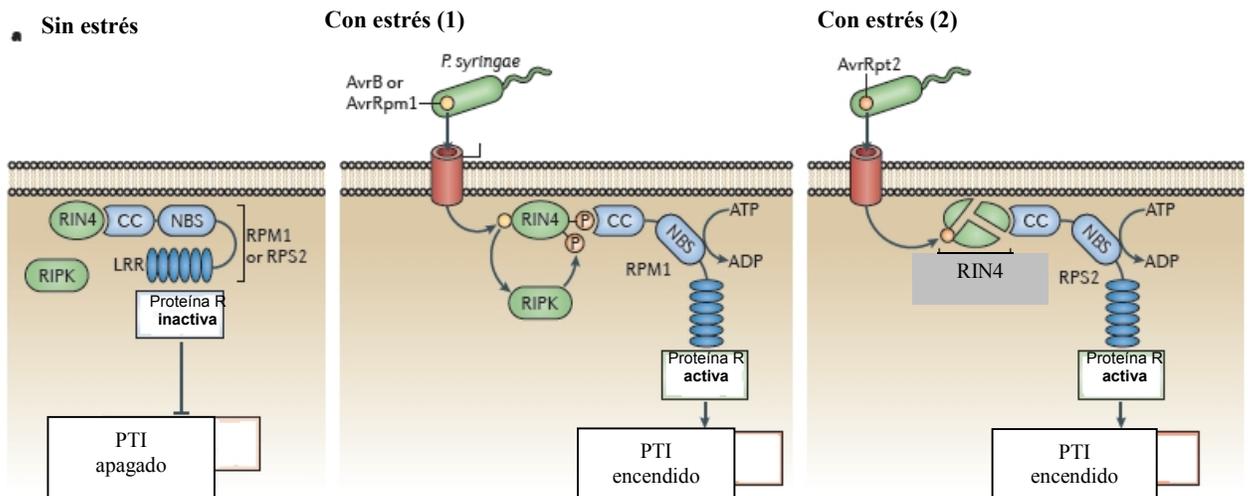


Figura 5. Modelo del guardián para el funcionamiento de la respuesta de defensa mediada por efectores en plantas (Torres-Pacheco *et al.*, 2012).

Se puede inducir el sistema de defensa de las plantas es mediante la aplicación de FIMs los cuales son moléculas que estimulan la defensa o las respuestas inducidas por estrés en las plantas e incluyen aquellas sustancias que se originan a partir del patógeno o aquellas que son expedidos por las mismas plantas. Estos FIMs pueden ser clasificados en bióticos o abióticos, los primeros son derivadas del patógeno o de la planta y los abióticos pueden ser factores físicos o químicos (Sharma *et al.*, 2011). Ejemplo de factores abióticos químicos

son: ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, ácido jasmónico, etileno, entre otros (Riedel *et al.*, 2012). Dentro de los físicos se encuentran: daño mecánico, radiación ultravioleta, salinidad, temperaturas extremas, sequia, altas presiones (Sharma *et al.*, 2011). El ácido jasmónico (JA) y su equivalente volátil, el metil jasmonato (MeJa) son hormonas de las plantas que participan en las respuestas de defensa tanto químicas como fisiológicas (Fritz *et al.*, 2010). El jasmonato modula la expresión genética a nivel de traducción, procesamiento de RNA y transcripción.

El desarrollo de la resistencia bacteriana es uno de los mecanismos naturales de adaptación en presencia de un agente antimicrobiano, el cual inhibe a aquel que es susceptible pero selecciona a aquellos que son resistentes. La resistencia a los compuestos antimicrobianos se da como resultado de tres estrategias principales que son la inactivación enzimática del compuesto, modificación de los sitios diana y la expulsión del compuesto afuera de la membrana por medio de bombas (Sibanda y Okoh, 2010). Se ha encontrado que los niveles de compuestos bioactivos en frutos de chile (*C. chinense*) se incrementan al aplicar peróxido de hidrógeno durante su cultivo en invernadero (Landeta-Riverol *et al.* 2011). Estudios indican que la aplicación exógena de metil-jasmonato (MeJA) y ácido salicílico (AS) también incrementan la cantidad de metabolitos en las plantas (Mohammad *et al.* 2007). La aplicación de MeJA y SA en plantas de frijol reduce las infestaciones de ácaros, además la mayoría de las concentraciones de estos elicitores mejoró significativamente la planta es decir, el crecimiento tuvo un impacto positivo sobre la altura de planta, número de ramas, peso seco y área foliar por planta y rendimiento del frijol (Farouk y Osman, 2011). En frutos de manzana se observó que la aplicación exógena de peróxido de hidrógeno reduce la caída de botones y además potencia el crecimiento del fruto el cual se ve reflejado en la cantidad de frutos, mayor tamaño, la biomasa y el rendimiento (Moneruzzaman *et al.* 2012). Sin embargo se cree que altas concentraciones de metabolitos secundarios podrían resultar en una planta más resistente aunque su producción se piensa que es costosa y reduce el crecimiento de las plantas y la reproducción (Mazid, 2011).

4.5. Bioactividad

Algunos de los compuestos sintetizados por las plantas son los compuestos fenólicos, que además de presentar capacidad antioxidante se les ha encontrado otras actividades biológicas tales como: antimutagénicas (Feregrino-Pérez *et al.*, 2011; Veloz-García *et al.*, 2010) y antimicrobianas de interés en medicina (Koffi-Nevry *et al.*, 2011; Keskin y Toroglu, 2011) y en Fitopatología (Veloz-García *et al.*, 2010; Tierranegra-García *et al.* 2011). Sin embargo, a pesar de que varios cientos de especies que han sido evaluadas por ejemplo como antimicrobianos, la mayoría no han sido estudiados adecuadamente (Mahesh *et al.*, 2008).

4.5.1. Antioxidante

Los radicales libres están implicados más de 80 enfermedades, incluyendo diabetes *mellitus*, artritis, cáncer, envejecimiento, etc. Los compuestos antioxidantes pueden funcionar como eliminadores de radicales libres, agentes complejantes de pro-oxidantes metales, agentes reductores y atenuadores de la formación de oxígeno libre, antes de que alcancen a reaccionar con otras moléculas como el ADN, proteínas, lípidos, entre otros (Kaur y Bilaspuri, 2010). Estos compuestos poseen propiedades neutraceuticas como antioxidantes (Daood *et al.*, 2006). Entre las vitaminas que muestran actividad antioxidante los chiles son vitamina C, E, y carotenos. Compuestos fenólicos son capaces de actuar como antioxidantes en diferentes maneras. Grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos son buenos donantes de hidrógeno: el hidrógeno donado de los antioxidantes pueden reaccionar con especies reactivas de reactivos de oxígeno y nitrógeno. Especies en una reacción de terminación, que se rompe el ciclo de la generación de nuevos radicales.

4.5.2. Antimicrobiana

Durante las últimas dos décadas, el desarrollo de resistencia a los fármacos, así como la aparición de efectos secundarios indeseables de ciertos antibióticos ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Los extractos de plantas se han estudiado con el objetivo de descubrir nuevas estructuras químicas, que permitan superar las desventajas anteriores (Arya *et al.*, 2010). Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa generales y específicos para protegerse de patógenos e insectos en la naturaleza (Smith *et al.*, 2009). Ya se han reportado que los extractos de *Capsicum annum* tienen efectos inhibidores contra las especies *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Santos *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de los fenoles contra los hongos puede ser fungistático en el que se detiene el crecimiento o fungicida en el que se mata al hongo (Veloz-García *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos presentan actividad antimicrobiana sobre los microorganismos ya que desintegran la membrana celular, desestabilizan la bomba de protones, flujo de electrones, unión a enzimas, transporte activo y coagulación del contenido celular (figura 8) (Silva y Fernández, 2010). La inhibición del crecimiento de patógenos se consigue normalmente mediante la utilización de conservantes químicos, sin embargo estos pueden ser dañinos a la salud. Por lo tanto, extractos de plantas medicinales ofrecen una considerable potencial para el desarrollo de nuevos agentes eficaces contra las infecciones difíciles de tratar (Alviano y Alviano 2009). Además, los metabolitos producidos para la defensa de la planta ante la aplicación de FIMs ya sean bióticos (Lee *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011) o abióticos, pueden presentar diversas bioactividades, como la acción antimicrobiana. También la aplicación de estos compuestos elicitores potencian la síntesis de fenoles potenciando la actividad antioxidante (Boué *et al.*, 2008).

El reciente interés sobre el desarrollo de bioprocesos para la producción y extracción de compuestos bioactivos de fuentes naturales ha incrementado en años recientes, así como su aplicación en la industria alimentaria, química y farmacéutica (Martinsa *et al.*, 2011). Una herramienta importante que permite la identificación y caracterización de todos los metabolitos en un sistema biológico es la metabolómica (Ellis, 2007).

5. HIPOTESIS

La aplicación de Factores Inductores de metabolitos en plantas de chile (*Capsicum annum*) incrementan la cantidad de compuestos bioactivos y por lo tanto se incrementará la actividad antimicrobiana de sus extractos vegetales.

6. OBJETIVO

General

Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos de chile (*Capsicum annum*) producido en invernadero empleando Factores Inductores de Metabolitos.

7. METODOLOGÍA

7.1. Material

7.1.1. Material Químico

(+)-catequina, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido p-cumárico, quercetina, nearingenina, kaempferol, rutina, reactivo Folin, persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Vainillina, Na_2CO_3 , HCl, KCl, metanol, DMSO (Dimetilsulfoxido), medio PDA, medio caldo soya tripticaseina, agar base sangre kanamicina, ampicilina, todos los reactivos descritos anteriormente fueron adquiridos por J.T. Baker y Sigma-Aldrich.

7.1.2. Material Biológico

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 51813, *Streptococcus mutants* ATCC 25175, *Salmonella thyphimorum* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* Scot A y aislado clínico de *Enterobacter faecalis* fueron proporcionados por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

7.2. Implementación de un sistema de producción de chile en invernadero en el que se incluyan 3 FIMs

7.2.1. Lugar y ubicación

El cultivo de chile pimiento se estableció en un invernadero de 108 m², localizado en el campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud y entre los 100° 09' y 100° 24' de longitud a 1 850 m SNM.

7.2.2. Diseño experimental

Los tratamientos consistieron en tres FIMs, dos elicitores químicos: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 6, 14 y 18 mM y ácido salicílico (SA) con una concentración de 0.01, 0.1 y 0.5 mM (Landeta-Riverol, 2011; Tierranegra-García *et al.* 2011). El tercer FIM fue estrés hídrico que consta de la mitad del riego aplicado diariamente al cultivo de pimiento en invernadero (Tabla 1).

Tabla 1. . Cantidad de agua regada a los pimientos diariamente

| Etapa | Tiempo Riego 100% (min) | Tiempo Riego 50% (min) | Número de riegos | Total riego 100% (ml) | Total riego 50% (ml) |
|----------------|-------------------------|------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| Vegetativa | 2 | 1 | 3 | 600 | 300 |
| Floración | 2 | 1 | 5 | 1000 | 500 |
| Fructificación | 2 | 1 | 6 | 1 200 | 600 |

Como controles experimentales se tuvieron plantas de chile pimiento con riego normal, para la prueba de estrés hídrico y plantas crecidas en invernadero sin aplicación de FIMs, para el ensayo de inductores químicos. Todas las soluciones fueron aplicadas de manera foliar hasta punto de rocío en intervalos de tiempo de 15 días. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con unidades experimentales de 6 plantas en 4 repeticiones (24 plantas en total por tratamiento en cada experimento) (Figura 6). Las variables a medir fueron: altura de planta, número de frutos y número de flores. Por otro lado en los frutos cosechados se midió altura, peso, perímetro ecuatorial y peso seco.

| | | | | | | | | |
|---------|---------|--------|----|----|--------|---------|---------|--------|
| Control | T1C3R4 | T1C1R3 | T3 | T3 | T1C1R1 | T1C3R1 | T1C2R2 | T1C2R4 |
| T1C3R3 | Control | T2C1R3 | T3 | T3 | T2C2R1 | T2C3R2 | T2C2R2 | T2C2R4 |
| T2C1R4 | T1C2R3 | T1C1R2 | T3 | T3 | T1C2R1 | T2C3R4 | T2C3R4 | T2C1R1 |
| Control | T2C3R1 | T2C3R3 | T3 | T3 | T2C1R2 | Control | Control | T1C3R2 |

6Figura 7. Diseño experimental: T1= ácido salicílico, C1= 0.01 mM, C2= 0.1 mM, C3= 0.5 mM, T2= Peróxido de hidrógeno, C1= 6 mM, C2= 14 mM, C3= 18 mM, T3= Riego 50%

7.3. Obtener extractos de fruto de chile en etapa de cosecha

A los 3 meses después del trasplante en invernadero (tiempo recomendado para cosecha de fruto con la variedad de pimiento a emplear), se procedió a realizar la recolección de frutos. Después se puso a congelar los pimientos con nitrógeno líquido y se molieron con hielo seco para obtener la materia fresca, se almacenara a -80 °C hasta su posterior utilización. La extracción de los compuesto se llevó a cabo mediante el método de maceración, empleando como solvente metanol en una relación 1:10 materia fresca y metanol respectivamente, de acuerdo a previos reportes en nuestro grupo con fines de evaluar actividades biológicas (Veloz-García *et al.*, 2010; Feregrino-Pérez *et al.*, 2011). La concentración de los extractos metanólicos se llevó a cabo en un rotavapor de la marca Heidolph a una temperatura de 40 °C con el fin de evitar la degradación de los compuestos.

7.4. Determinación y caracterización de los compuestos fenólicos

7.4.1. Fenoles Totales

Los compuestos fenólicos totales se determinarán según el método propuesto por Folin-Ciocalteu (Dewanto, *et al.*) 2003. La disolución empleada de los extractos para los ensayos fue: 10 mg extracto/mL, para esto se pesó 10 mg de extracto y se aforó con 1 mL de metanol grado reactivo. La curva de calibración se preparó a partir de una solución estándar de ácido gálico (0.1mg/mL) y se tomaron volúmenes de 0 a 160 μ l con intervalos de 20 μ L y se completó a un volumen de 500 μ l con agua destilada.

Brevemente en viales se colocan, 40 μ L de la muestra, se adiciono 460 μ L de agua destilada y se oxidaron con 250 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu (1 N), después de 5 min se adicionaron 1.25 mL de una solución de Na₂CO₃ al 20% para neutralizar, se incubo por 2 h sin agitación. En una placa de 96 pozos se adicionaran 200 μ L de cada muestra o metanol (blanco), Se midió la absorbancia contra el blanco a 760 nm en un lector de micoplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Las concentraciones se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por mL de extracto.

7.4.2. Flavonoides

La determinación de flavonoides se determinará por método descrito por Liu y colaboradores (2002) utilizando como estándar rutina. La curva de calibración consistió en una solución de rutina a las siguientes concentraciones: 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 μ g/ml. Para el ensayo en una placa de 96 pozos se colocan 50 μ L de cada una de las muestras, posteriormente se adiciona 200 μ L de una solución de 2-aminodifenilborato al 1%, como blanco se utiliza metanol. La absorbancia se determinará a 404 nm en un lector de micoplaca

Versa Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Las concentraciones se reportan como miligramos equivalentes de rutina por mL de extracto.

7.4.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides mediante HPLC

Los extractos metanólicos de los pimientos se sometieron a un análisis mediante un equipo de HPLC Waters System (Waters Corporation, Milford, MA, USA) el cual consiste en una bomba cuaternaria (modelo 600), un detector de arreglo de diodo (modelo 996), un desgasificador de vacío en línea (MetaChem Technologies Inc.) y un inyector Rheodyne (4793). El control del equipo, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se realizó con el programa Millennium (Waters).

Ambos extractos se filtraron a través de una membrana de 0.2 μ m y 20 μ L y se inyectaron dentro de la columna de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C18, 60 \AA , 5 μ m, 250x 4.6 mm). La fase móvil se compuso del solvente A (acetonitrilo) y el solvente B (ácido acético 0.0125 N), esto se llevó a cabo por triplicado de la siguiente manera: condiciones isocráticas de 0 a 2 min con 5% de A y 95% de B, un gradiente de condiciones a partir del minuto 2 al 5 empezando con 5% de A y terminando con 15%, un gradiente de condiciones del minuto 5 al 20 empezando con 15% de A y terminando con 50%, un gradiente de condiciones del minuto 20 al 25 empezando con 50% de A y terminando con 5%, condiciones isocráticas del minuto 25 al 35 con 5% de A y 95% de B. La absorbancia se midió a λ máx. 280 nm y se inyectaron 20 μ L de muestra. La cuantificación se realizó por la estandarización externa con ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido p-cumárico, quercetina, naringenina, catequina, kaempferol y rutina. Todas las curvas estándar fueron hechas con los mismos compuestos.

7.4.4. Taninos condensados

El método utilizado fue el de (+)-catequina-vainillina. Para la curva de calibración se utilizó una solución de catequina a 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/mL. En una placa de 96 pozos se colocaron 50 μ L de cada muestra, se adicionan 200 μ L de una solución 1:1 de HCl 8%-Vainillina 1%, como blanco se utiliza metanol y se lee a una λ 492 nm en un MULTISKAN.

7.4.5. Antocianinas

Pesar 1 g de muestra congelada en un tubo Falcon, adicionar 9.995 mL de metanol y acidificar con una solución de HCl al 0.05%. Agitar en la oscuridad 24 h a temperatura ambiente. Centrifugar la muestra a 1 300 rpm por 10 min. Se colocan 200 μ L de la muestra en una celda y se agregan 3 mL de KCl a pH 1.0 y Acetato de sodio a pH 4.5, se mide la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{max}=530$ nm) y a 707 nm.

La absorbancia final se determina con la siguiente formula:

$$(A) = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$$

Esta se sustituye en la siguiente fórmula para obtener las antocianinas monoméricas:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A) (PM)(FD)(1000)/\epsilon(1)$$

Donde:

PM: Peso molecular de la antocianina estándar

Cianidina 3-glu: 449.2 gr/mol

Delfinidina: 465.2 gr/mol

FD: Factor de dilución

ϵ : Absortividad

7.5. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos

7.5.1. Método ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico))

Este ensayo se realizará de acuerdo a la metodología descrita por Nenadis y colaboradores (2004). Para la curva estándar se utiliza una solución de Trolox a una concentración de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 μmolar . Para generar el radical ABTS $\bullet+$ se prepara una solución stock de ABTS 7 Mm se toman 5 mL de la solución acuosa, se le adicionan 88 μl de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 140 mM y se almacenó en oscuridad por 12 h. Después la solución que contiene el radical se mide a una $\lambda = 734 \text{ nm}$ y se diluyó en etanol (de 20 a 25 mL) hasta que el valor de la absorbancia alcanza un valor menor a 1.0. Posteriormente se prepararán las muestras en una placa de 96 pozos: al blanco se le adiciona a 20 μl de la muestra y 230 μl de etanol, para los controles se adiciona 20 μl de metanol (C1) y agua destilada (C2), finalmente se les adiciona 230 μl de ABTS $\bullet+$. La medición de la absorbancia se llevará a cabo a los 730 nm por un lapso de 0-6 min.

7.5.2. Técnica de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, primero se adicionaron: 20 μL de los extractos y posteriormente se adicionan 200 μL de DPPH \bullet al 80% de metanol, para el control positivo se utilizó Trolox y para el negativo todos los reactivos a excepción de los extractos. Se mide la absorbancia de 520 nm a diferentes tiempos (0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 min). Los resultados se reportan como % ARA (Capacidad antiradical).

$$\% \text{ Reducción del DPPH}\bullet = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestras}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

Donde:

A_{muestra} = absorbancia del extracto metanólico, ácido gálico o Trolox,

A_{control} = absorbancia del control (metanol)

7.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de estos extractos contra microorganismos de importancia médica

7.6.1. Crecimiento del inóculo

Las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *Streptococcus mutants* ATCC, *Salmonella thyphimorum* ATCC, *treptococcus faecalis* ATCC y *Listeria monocytogenes* ATCC, se activaron en medio caldo soya tripticaseina por 24 h a 37 °C. Después se estrió en agar soya agar soya tripticaseina y se incubó por 24 h a 37 °C. Por último fueron se fue aislada una clona y se transpaso a agar sangre, nuevamente fueron incubadas 24 h a 37 °C. Las cepas crecidas son las que se utilizaran para el ensayo antimicrobiano.

7.6.2. Actividad antimicrobiana

Las cepas crecidas en el agar sangre se inocularon en medio caldo soya tripticaseina hasta obtener una concentración de 1×10^7 UFC. Posteriormente se sembraron en cajas Petri con agar Muller Hilton y se colocaron discos con 20 µL del extracto a las concentraciones de 100, 200 y 400 mg/mL. El extracto de cada tratamiento se suspendió en DMSO. Como control positivo se agregaron antimicrobianos químicos. Se realizarán ensayos por triplicado.

7.7. Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XV.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Implementación de un sistema de producción de chile en invernadero en el que se incluyan 3 Factores Inductores de metabolitos

8.2. Condiciones ambientales

Se monitorearon las condiciones ambientales dentro del invernadero, la humedad relativa alcanzó un valor máximo de 88.2% y mínimo de 2%. La temperatura máxima fue de 52°C y la mínima de 2°C (Figura 7). La humedad relativa óptima para que se desarrolle el pimiento es de 50 a 70% (Figura 8) y la temperatura óptima va de 20 a 25°C (Rubatzky and Yamaguchi, 1999). Temperaturas arriba de los 33°C produce abscisiones en flores y en el polen puede disminuir su viabilidad (Erickson & Markhart, 2002). Incluso las temperaturas debajo de 16 °C da lugar a plantas sin frutos (Coertze & Kistner, 1994). Las condiciones ambientales dentro del invernadero no fueron las adecuadas, sin embargo la variedad cultivada Revolution se ha observado tiene gran rendimiento durante periodos de bajas temperaturas. (Santos *et al.*, 2013).

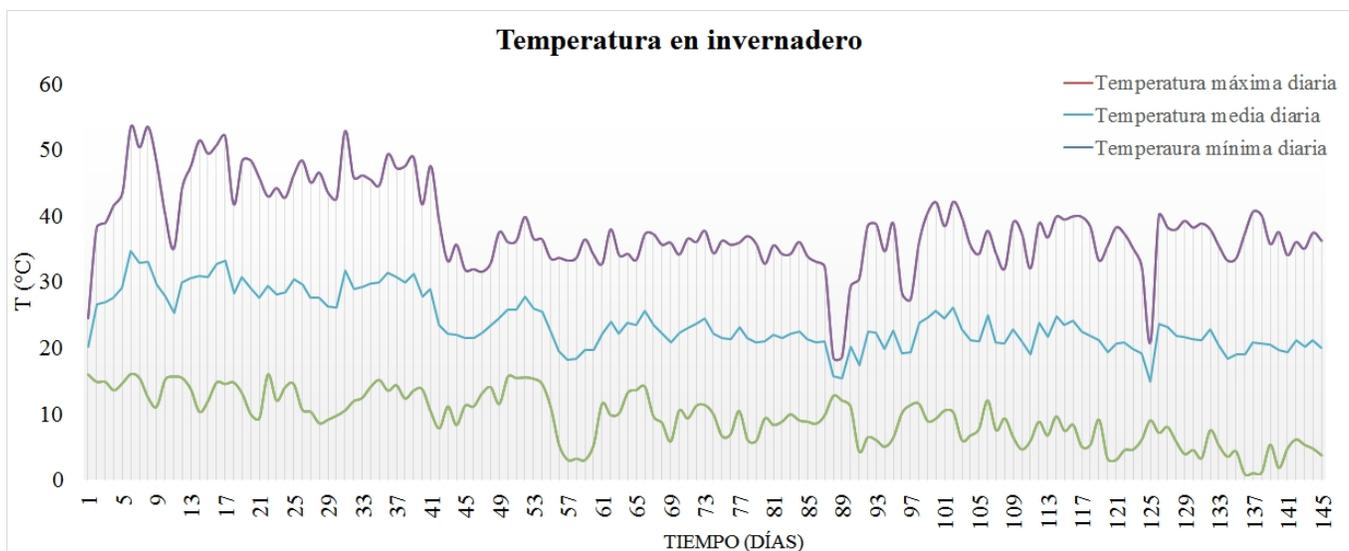


Figura 8. Comportamiento de la temperatura en el invernadero

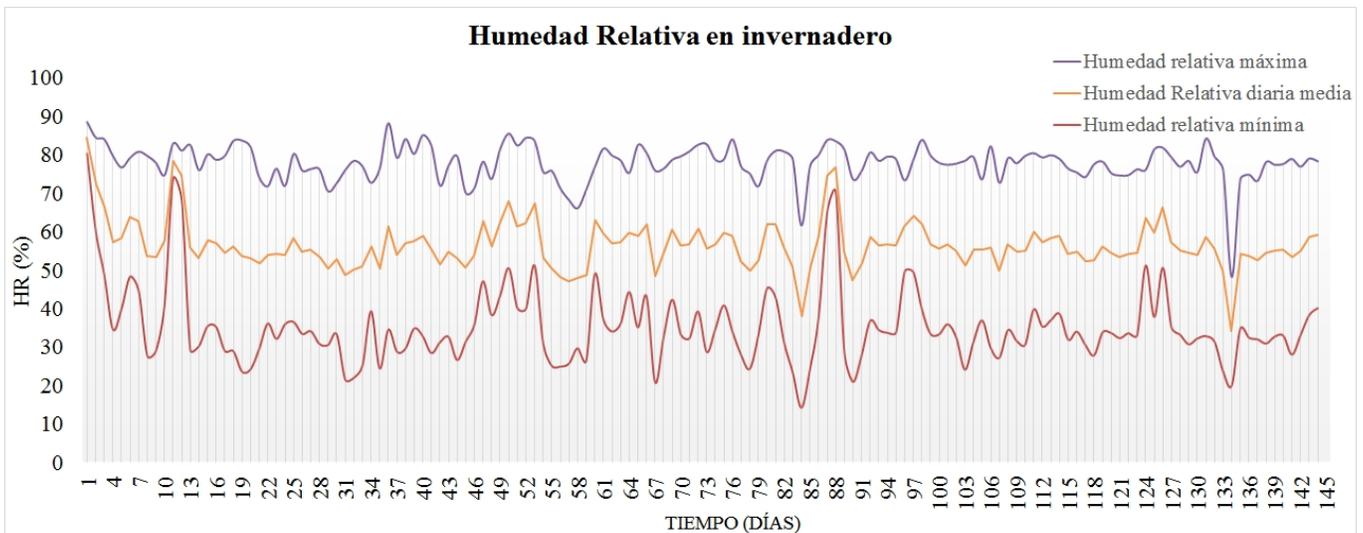


Figura 9. Comportamiento de la humedad relativa en el invernadero

8.3. Variables medidas en la planta de pimiento bajo efecto de los FIMs

8.3.1. Desarrollo de frutos

En la figura 9 se muestra el comportamiento de la aplicación de ácido salicílico en el número de frutos en plantas de chile pimiento a través del tiempo.

En el tratamiento donde se aplicó ácido salicílico de manera exógena se muestra mayor cantidad de frutos a la concentración más alta que fue 0.5 mM con 6.52 ± 0.32 frutos, en el día de cosecha (113 días) y además se observa un comportamiento dosis-dependiente a lo largo del tiempo en relación con la concentración del elicitor.

De acuerdo a los resultados se puede decir que la aplicación foliar de AS permite un mayor desarrollo, por su capacidad protectora contra agentes externos, es decir las altas y bajas temperaturas.

El ácido salicílico es un regulador de crecimiento exógeno que participa en la regulación de los procesos fisiológicos en las plantas. Este ha despertado un considerable interés por su

capacidad de proteger contra estrés de carácter abiótico, por ejemplo induciendo proteínas PR o proteínas de choque térmico (Sakhabutdinova *et al.* 2003).

Se ha observado que la aplicación foliar de algunos compuestos como ácido giberélico, cloruro de calcio y ácido salicílico en fresa promueven los parámetros de reproducción como son la aparición de flores, número de flores y número de frutos, sin embargo se observa que el ácido salicílico es el tratamiento que más retrasa la aparición de flores (Qureshi, *et al.* 2013).

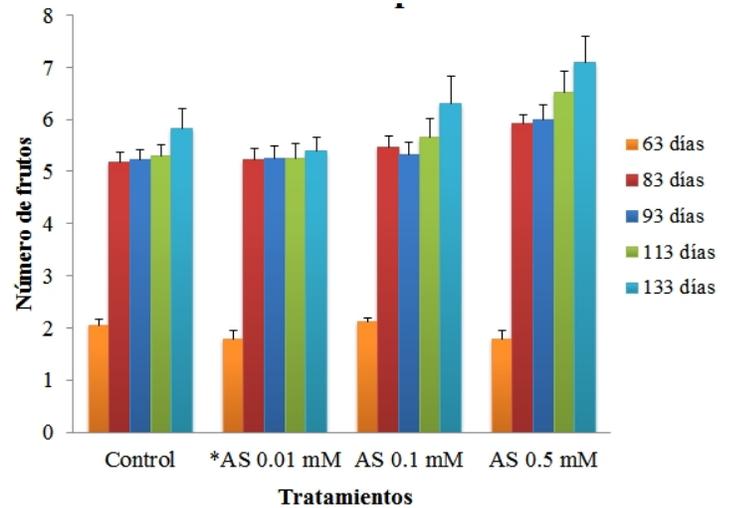
El peróxido de hidrógeno es un compuesto que en las plantas induce senescencia mediante la producción de ácido abscísico y al igual que el estrés hídrico fueron estos dos los primeros en desarrollar flores. Las aplicaciones de peróxido de hidrógeno a las diferentes concentraciones no tuvieron diferencia significativa con 5.75 ± 0.20^a , 5.81 ± 0.23^a y 5.12 ± 0.36^a a los 6, 14 y 18 mM respectivamente en comparación con el control 5.30 ± 0.11^a frutos, por lo cual la aplicación de peróxido de hidrógeno induce senescencia y no protege contra los factores externos a la planta.

El efecto de la escasez de agua en las plantas de pimiento tuvo un efecto negativo en la aparición de frutos ya que presentó 4.95 ± 0.04^b en comparación con el control siendo mejor este último con 5.30 ± 0.11^a frutos lo cual indica que se indujo mayor cantidad de abortos tanto por la falta de agua y la temperatura, aun así no hay diferencia significativa con el control.

De todos los FIMs aplicados en las plantas de pimiento aquel tratamiento con el cual se obtuvo mayor rendimiento fue el ácido salicílico a la concentración de 0.5 mM. Lo cual indica un posible efecto protector ante los factores externos.

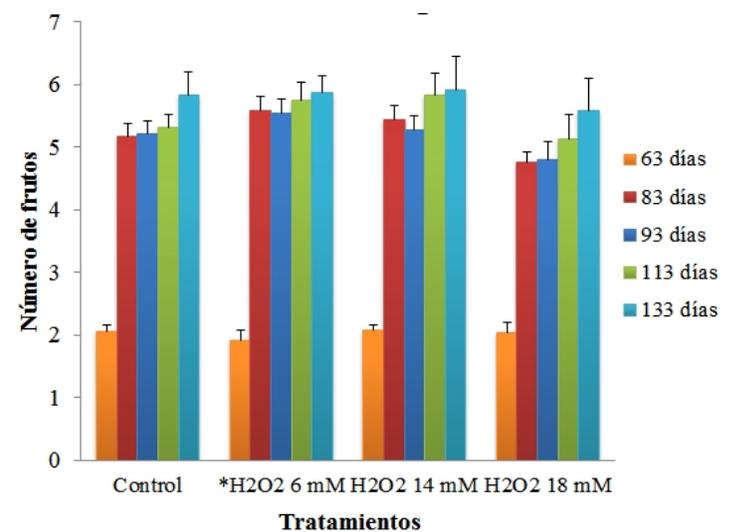
a)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | 5.21±0.24 ^b | 5.30±0.11 ^b | 5.82±0.26 ^b |
| AS 0.01 mM | 5.26±0.29 ^b | 5.26±0.13 ^b | 5.39±0.06 ^b |
| AS 0.1 mM | 5.33±0.22 ^{ab} | 5.66±0.35 ^{ab} | 6.30±0.22 ^{ab} |
| AS 0.5 mM | 6.00±0.21 ^a | 6.52±0.32 ^a | 7.08±0.07 ^a |



b)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | 5.21±0.24 ^{ab} | 5.30±0.11 ^a | 5.82±0.26 ^a |
| H ₂ O ₂ 6 mM | 5.54±0.18 ^a | 5.75±0.20 ^a | 5.8±0.11 ^a |
| H ₂ O ₂ 14 mM | 5.26±0.18 ^{ab} | 5.81±0.23 ^a | 5.90±0.08 ^a |
| H ₂ O ₂ 18 mM | 4.79±0.08 ^a | 5.12±0.36 ^a | 5.58±0.15 ^a |



c)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | 5.21±0.24 ^a | 5.30±0.11 ^a | 5.82±0.26 ^a |
| Sequía 50% | 5.17±0.06 ^b | 4.95±0.45 ^b | 5.04±0.14 ^b |

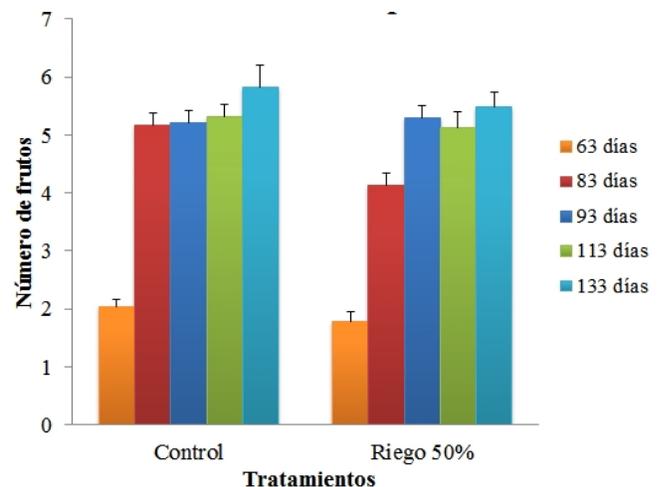


Figura 10. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el número de frutos a través del tiempo a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50%.

8.3.2. Desarrollo de flores

La figura 10 muestra el efecto de la aplicación de elicitores sobre el desarrollo de las flores en plantas de pimienta. No existe diferencia significativa entre los tratamientos con ácido salicílico y peróxido de hidrogeno contra el control en el día de cosecha, se observa el efecto hasta el día 133 siendo mejor el control 0.91 ± 0.26^a contra los tratamientos de ácido salicílico con 0.08 ± 0.06^b , 0.4 ± 0.22^b y 0.13 ± 0.07^b para 0.01, 0.1 y 0.5 mM respectivamente; y peróxido de hidrógeno con 0.37 ± 0.11^b , 0.18 ± 0.08^b y 0.5 ± 0.15^{ab} para las concentraciones de 6, 14, 18 mM respectivamente. En lo que respecta al tratamiento de sequía al 50% al principio la sequía induce la aparición de flores con la finalidad de completar su ciclo de reproducción siendo mejor que el control con 1.22 ± 0.06^a contra el control 1.13 ± 0.24^b . Al día de cosecha el número de flores de las plantas bajo estrés hídrico disminuye 0.04 ± 0.04^b , siendo mejor el control 0.34 ± 0.11^a flores.

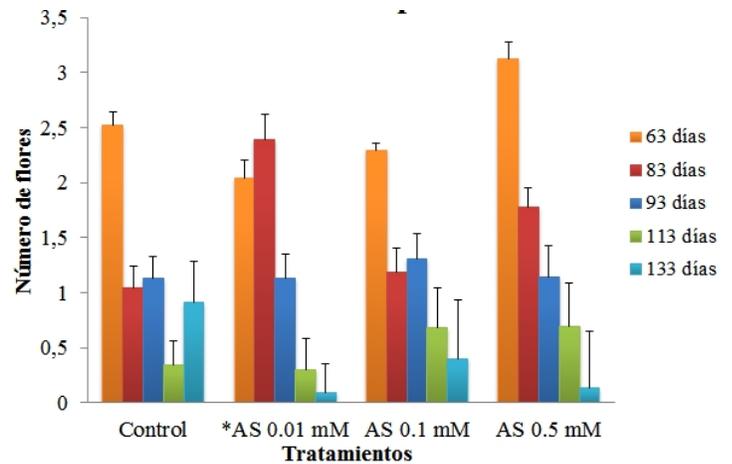
El proceso de floración en las plantas está regulado por factores externos, normalmente las plantas florecen en determinada estación, dependiendo de la duración del día o la temperatura (Martínez *et al.* 2004); también se puede observar floración precoz bajo estrés ejemplo disminuye el potencial hídrico de la planta y el turgor lo que dificultan las funciones fisiológicas normales en las plantas y esto se ve reflejado en menor número de flores. Nuevamente se observa que en este estudio aquellas plantas que tuvieron riego al 50%, presentaron una floración precoz, pero fue el tratamiento que menos cantidad de flores mostró, ya que tanto las altas temperaturas como la sequía inducen aborto de flores.

Cuando las plantas se estresan generan sustancias como ERO, ácido nítrico, ácido jasmónico, etileno, ácido salicílico y ácido abscísico, las cuales regulan la expresión de genes para la adaptación a esas condiciones. Entre estas sustancias se ha reportado que el ácido salicílico y el etileno inducen la floración.

El ácido salicílico se ha reportado induce el proceso de floración pero también acelera la aparición de frutos por tanto el número de flores disminuye. En el tratamiento con sequía al 50% se observa que el control tiene más número de flores p que el riego al 50% puede inducir mayor floración pero también la caída de flores y abortos (Figura 10).

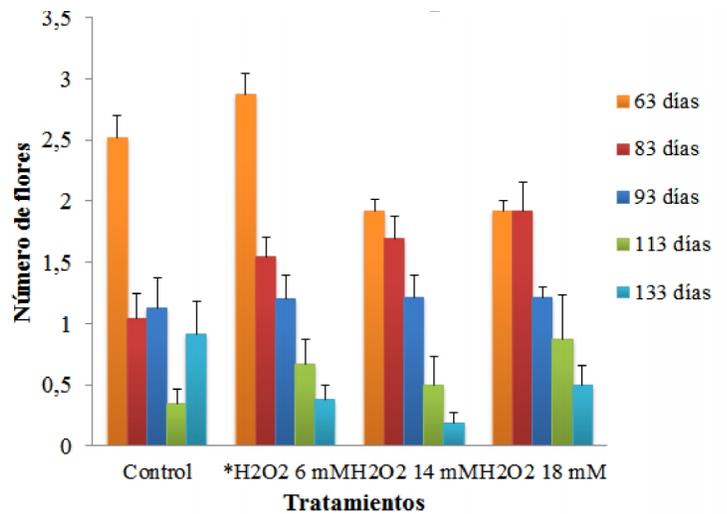
a)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | 1.13±0.24 ^a | 0.34±0.11 ^a | 0.91±0.26 ^a |
| AS 0.01 mM | 1.13±0.23 ^a | 0.30±0.13 ^a | 0.08±0.06 ^b |
| AS 0.1 mM | 1.30±0.22 ^a | 0.68±0.35 ^a | 0.4±0.22 ^b |
| AS 0.5 mM | 1.14±0.21 ^a | 0.69±0.32 ^a | 0.13±0.07 ^b |



b)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | 1.13±0.24 ^a | 0.34±0.11 ^a | 0.91±0.26 ^a |
| H ₂ O ₂ 6 mM | 1.20±0.18 ^a | 0.66±0.20 ^a | 0.37±0.11 ^b |
| H ₂ O ₂ 14 mM | 1.21±0.18 ^a | 0.50±0.23 ^a | 0.18±0.08 ^b |
| H ₂ O ₂ 18 mM | 1.21±0.08 ^a | 0.87±0.36 ^a | 0.5±0.15 ^{ab} |



c)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | 1.13±0.24 ^b | 0.34±0.11 ^a | 0.91±0.26 ^a |
| Sequía 50% | 1.22±0.06 ^a | 0.04±0.04 ^b | 0.41±0.14 ^b |

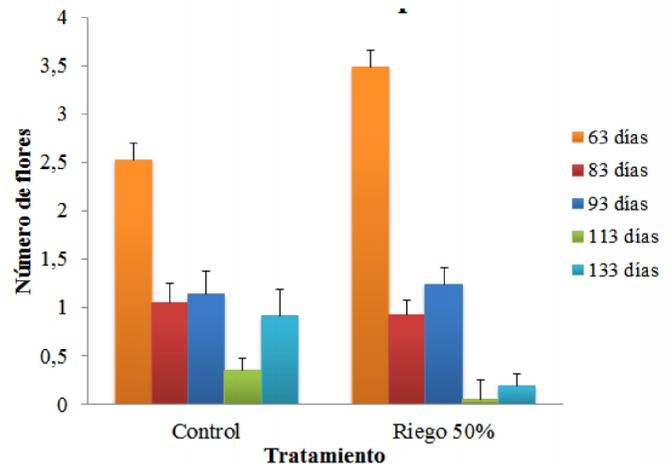


Figura 11. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el número de flores a través del tiempo a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50%.

8.4. Altura de pimiento

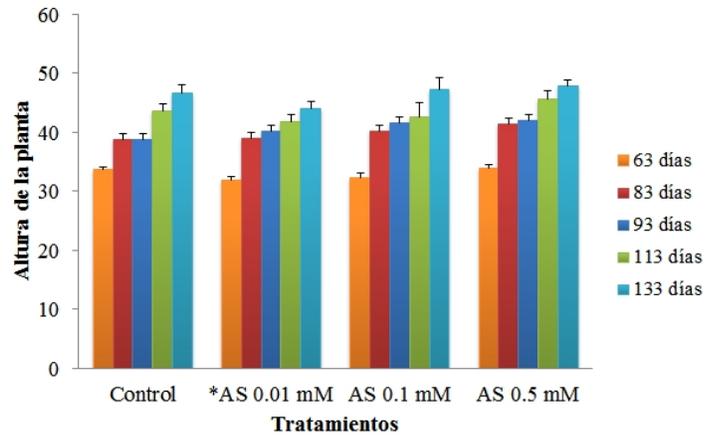
Se encontró que la aplicación de ácido salicílico a las concentraciones en el día 93 tiene un efecto positivo sobre la altura de la planta con 40.13 ± 1.07^{ab} , 41.57 ± 1.03^{ab} y 42.00 ± 1.03^a para 0.01, 0.1 y 0.5 mM respectivamente en comparación con el control 38.69 ± 1.01^c . Sin embargo no existe diferencia significativa para el día de cosecha. Un efecto similar se observa para el peróxido de hidrógeno no existe diferencia significativa en la altura de la planta en comparación con el control.

Por otro lado el estrés por sequía tiene un efecto negativo en la altura de la planta en todos los días con 36.60 ± 0.57^b , 37.27 ± 0.80^b , 38.5 ± 0.80^b para los días 93, 113 y 133 respectivamente en comparación con el control 38.69 ± 1.01^a , 43.52 ± 1.34^a , 46.69 ± 1.34^a a los días 93, 113 y 133 (Figura 11).

La sequía no sólo afecta a las relaciones hídricas de la planta a través de la reducción del contenido de agua, la turgencia y el total de agua, sino que también afecta cierre de los estomas, límites intercambio gaseoso, disminuye la transpiración y detiene la asimilación de carbono (fotosíntesis). Efectos negativos en la nutrición mineral - absorción y transporte de nutrientes - y el metabolismo conduce a una disminución en el área de la hoja y alteración en asimilar partición entre los órganos. Una disminución en la expansión de las células, el estrés hídrico disminuye o cesa y el crecimiento de la planta se retrasa (Seyed, 2012).

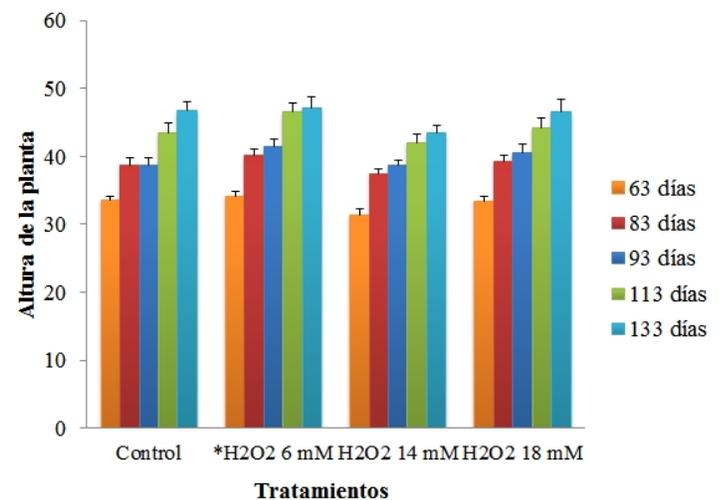
a)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|---------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Control | 38.69±1.01 ^c | 43.52±1.34 ^{ab} | 46.69±1.34 ^a |
| AS 0.01 mM | 40.13±1.07 ^{ab} | 41.78±1.21 ^b | 44.00±1.21 ^a |
| AS 0.1 mM | 41.57±1.03 ^{ab} | 42.59±2.37 ^{ab} | 47.35±2.37 ^a |
| AS 0.5 mM | 42.00±1.03 ^a | 45.56±1.46 ^{ab} | 47.78±1.46 ^a |



b)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Control | 38.69±1.01 ^a | 43.52±1.34 ^{ab} | 46.69±1.34 ^a |
| H ₂ O ₂ 6 mM | 41.45±1.05 ^a | 46.58±1.26 ^a | 47.12±1.26 ^a |
| H ₂ O ₂ 14 mM | 38.65±0.77 ^a | 42.04±1.24 ^b | 43.5±1.24 ^a |
| H ₂ O ₂ 18 mM | 40.54±1.13 ^a | 44.12±1.48 ^{ab} | 46.5±1.48 ^a |



c)

| Tiempo (días) | 93 | 113 | 133 |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | 38.69±1.01 ^a | 43.52±1.34 ^a | 46.69±1.34 ^a |
| Sequía 50% | 36.60±0.57 ^b | 37.27±0.80 ^b | 38.5±0.80 ^b |

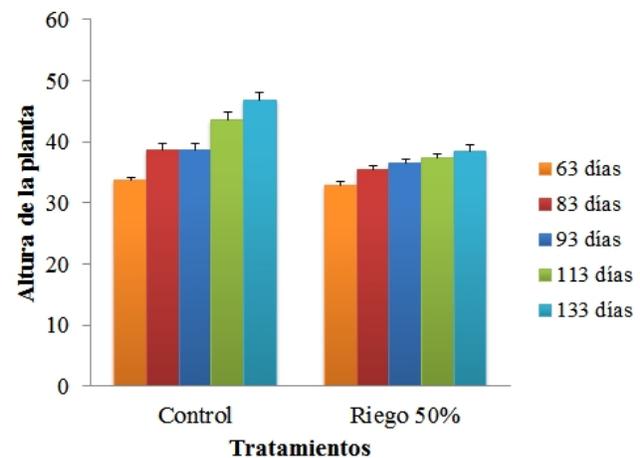


Figura 12. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre la altura de la planta a través del tiempo a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50%.

8.5. Variables medidas del pimiento

8.5.1. Malformación de los frutos

Se analizaron los frutos que presentaron algún tipo de anomalía en su forma, comparando con el control (25%), los frutos más deformes fueron los tratamientos de riego al 50%, ácido salicílico 0.5 mM y peróxido de hidrógeno 14 mM (33.3% para los tratamientos). El tratamiento de ácido salicílico 0.1 mM fue igual al control y aquellos que menos porcentaje de anomalía mostraron fueron ácido salicílico 0.01 mM (8.3%), peróxido de hidrógeno 6 mM (20.8%) y peróxido de hidrógeno 18 mM (8.3%). El estrés por sequía afecta el crecimiento y reproducción de algunos cultivares. Es evidente que la sequía induce anomalías estructurales, fisiológicas y moleculares en los procesos que conducen al desarrollo de los gametos. La sequía disminuye la viabilidad del polen e incrementa el aborto del ovario (Lisar *et al.* 2012). Lo anterior conduce a anomalías en el desarrollo de los frutos. Por otro lado altas temperaturas también inducen el desarrollo anormal de los frutos ya que al igual que el estrés hídrico juega un efecto muy importante en el correcto desarrollo del ciclo reproductivo. Las altas temperaturas dentro del invernadero podrían haber afectado el desarrollo de los frutos en aquellos tratamientos que presentaron mayor anomalía.

8.5.2. Altura de fruto

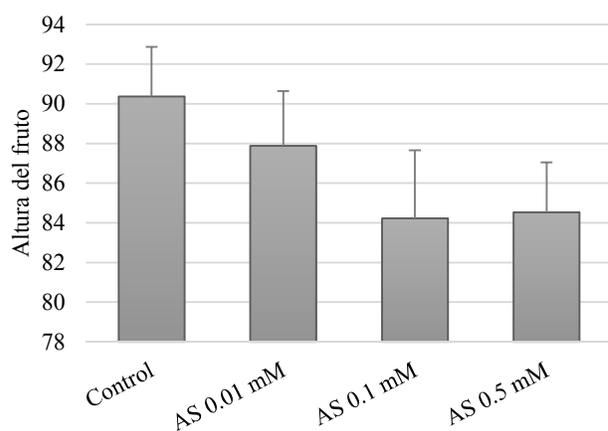
Se midieron algunos parámetros morfológicos del pimiento una vez que se realizó la cosecha.

Los frutos a los que se le aplicó el tratamiento de ácido salicílico presentan menor altura con 87.88 ± 3.43^{ab} , 84.22 ± 2.51^b y 84.53 ± 1.49^b cm comparados con el control 90.36 ± 2.50^a cm (Figura 12). No hay diferencias significativas entre el tratamiento de peróxido de hidrógeno 6 y 18 mM con 87.88 ± 1.63^a y 92.08 ± 1.94^a en comparación con el control 90.36 ± 2.50^a , el peor fue el de concentración de 14 mM con 82.48 ± 1.84^b . Tampoco existe diferencia significativa con el tratamiento de sequía al 50%.

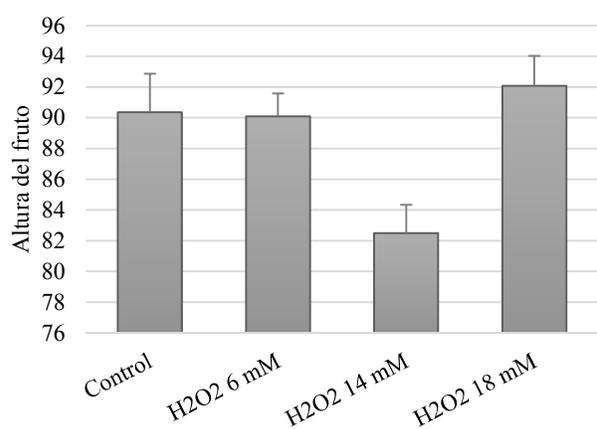
8.5.3. Diámetro de los frutos

En cuanto al diámetro, todos los tratamientos con FIMs químicos mostraron mayor diámetro en los frutos, muchos pimientos que presentaron anomalías poseían mayor diámetro, la aplicación de FIMs desarrollan más anomalías en la planta y se observa en el diámetro del fruto, como se muestra en la figura 13. Sin embargo, en el tratamiento de sequía al 50% no hubo diferencias significativas del tamaño de diámetro.

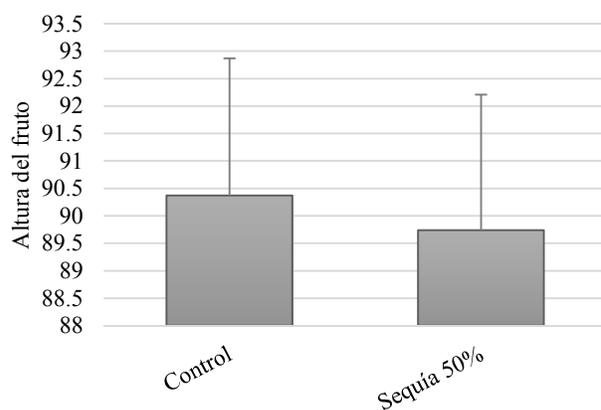
Aquellos frutos con mayor alargamiento fueron los que presentaron menor anomalía, pero los tratamientos como el ácido salicílico 0.5 mM y peróxido de hidrógeno 14 mM son los de menor altura y mayor cantidad de lóbulos. En la altura el control fue el mejor para todos los casos, pero también presentó un menor diámetro, se puede decir que el diámetro y la altura se tienen una relación negativa entre ellos, además de que los frutos más bajos presentan mayor anomalía.



| Control | AS 0.01 mM | AS 0.1 mM | AS 0.5 mM |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 90.36±2.50 ^a | 87.88±3.43 ^{ab} | 84.22±2.51 ^b | 84.53±1.49 ^b |

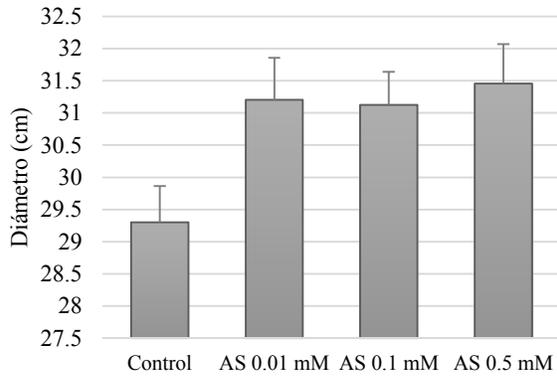


| Control | H ₂ O ₂ 6 mM | H ₂ O ₂ 14 mM | H ₂ O ₂ 18 mM |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 90.36±2.50 ^a | 87.88±1.63 ^a | 82.48±1.84 ^b | 92.08±1.94 ^a |

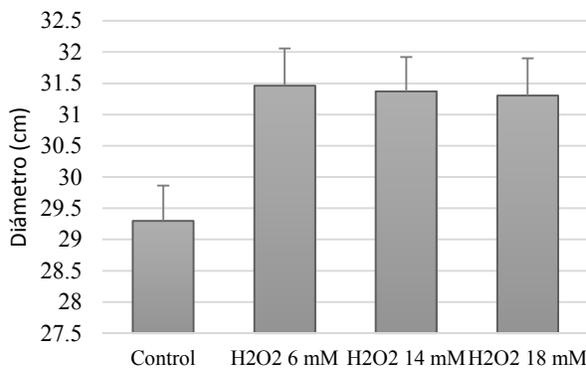


| Control | AS 0.1 mM |
|-------------------------|-------------------------|
| 90.36±2.50 ^a | 89.73±2.51 ^a |

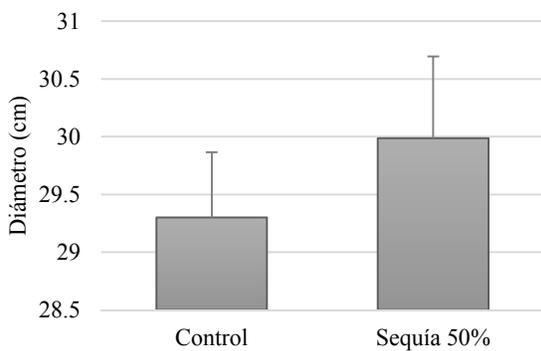
Figura 13. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre la altura del fruto de pimiento en la cosecha (103 días) a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50%



| Control | AS 0.01 mM | AS 0.1 mM | AS 0.5 mM |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 29.30±0.56 ^b | 31.20±0.65 ^a | 31.12±0.51 ^a | 31.45±0.61 ^a |



| Control | H ₂ O ₂ 6 mM | H ₂ O ₂ 14 mM | H ₂ O ₂ 18 mM |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 29.30±0.56 ^b | 31.46±0.59 ^a | 31.36±0.55 ^a | 31.30±0.59 ^a |



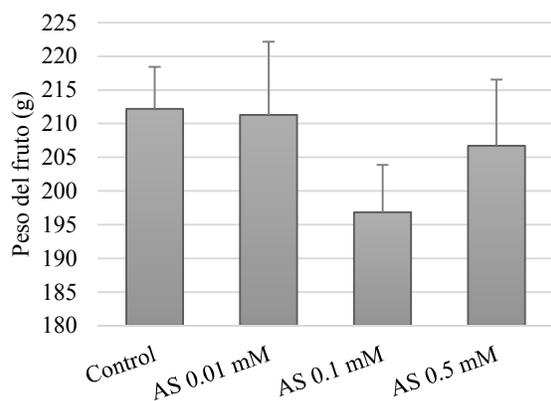
| Control | AS 0.1 mM |
|-------------------------|-------------------------|
| 29.30±0.56 ^b | 29.98±0.60 ^a |

Figura 14. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el diámetro del fruto de pimienta en la cosecha (103 días) a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50%.

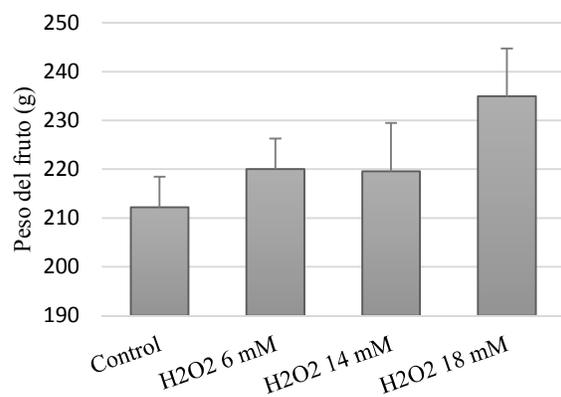
8.5.4. Peso de los frutos

En cuanto al peso, aquellos pimientos a los que se les aplicó ácido salicílico el ácido 0.1 mM y 0.5 mM poseen menor peso en comparación con el control con 211.28 ± 10.80^{ab} , 196.85 ± 7.04^b y 206.70 ± 9.83^{ab} para las concentraciones de 0.01, 0.1 y 0.5 mM respectivamente, y el control 212.18 ± 6.26^{ab} g, nuevamente estos tratamientos fueron los que menor altura tuvieron. La aplicación de peróxido de hidrógeno tiene un efecto dosis dependiente alcanzando para el tratamiento de 18 mM un peso de 234.99 ± 9.75^a , en comparación con el control 211.28 ± 10.80^b ; también se observa un incremento en el peso de los frutos que estuvieron bajo sequía sin embargo no es significativa la diferencia. Los tratamientos en los que aparecieron primero las flores, por lo que la edad fenológica de los frutos es mayor lo cual está relacionado con su peso (Figura 14).

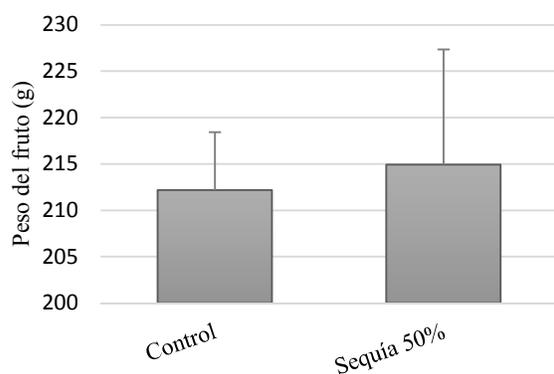
En resumen el mejor tratamiento para las características fenológicas fue el de peróxido de hidrógeno, ya que presentó los frutos más grandes en cuanto a altura y diámetro de fruto; además que el peso fue mayor.



| Control | AS 0.01 mM | AS 0.1 mM | AS 0.5 mM |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 212.18±6.26 ^a | 211.28±10.80 ^{ab} | 196.85±7.04 ^b | 206.70±9.83 ^{ab} |



| Control | H ₂ O ₂ 6 mM | H ₂ O ₂ 14 mM | H ₂ O ₂ 18 mM |
|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 212.18±6.26 ^b | 220.05±6.25 ^b | 219.59±9.89 ^{ab} | 234.99± 9.75 ^a |



| Control | AS 0.1 mM |
|--------------------------|---------------------------|
| 212.18±6.26 ^a | 214.92±12.41 ^a |

Figura 15. Efecto de los factores inductores de metabolitos sobre el peso del fruto de pimiento en la cosecha (103 días) a) tratamiento con ácido salicílico, b) tratamiento con peróxido de hidrógeno, c) tratamiento de sequía al 50%

8.6. Extracción de compuestos fenólicos

En el tabla 2 se muestra el rendimiento obtenido de los extractos por cada 75 g de muestra chile pimiento molido en cada uno de los 8 tratamientos. El tratamiento del cual se obtuvo mayor cantidad de extracto fue el control y el ácido salicílico 0.5 mM con 6.57 y 6.95 g respectivamente (Tabla 2). Existen diferentes metodologías y solventes para la obtención de extractos de una planta. En este estudio se obtuvo un tipo de metabolitos, los compuestos fenólicos, sin embargo por su estructura son más o menos susceptibles a extraerse dependiendo el solvente. Los rendimientos pueden variar dependiendo del tipo de solvente como pueden ser solventes orgánicos como metanol, etanol, agua o mezclas entre estos. El metanol y etanol son solventes ampliamente utilizados en varias especies de plantas y siguen siendo de los más eficaces (Sultana, 2009). Es por ello que se decidió utilizar metanol para la extracción de compuestos fenólicos.

Tabla 2. Rendimiento de los extractos por cada 75 g de muestra.

| Tratamiento | Peso extracto (g) | Rendimiento (%) |
|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Control | 4.93 | 6.57 |
| SA 0.01 mM | 3.23 | 4.31 |
| SA 0.1 mM | 3.89 | 5.19 |
| SA 0.5 mM | 5.21 | 6.95 |
| H ₂ O ₂ 6 mM | 4.35 | 5.80 |
| H ₂ O ₂ 14 mM | 3.87 | 5.16 |
| H ₂ O ₂ 18 mM | 3.87 | 5.16 |
| Sequía 50% | 4.27 | 5.70 |

8.6.1. Efecto de la aplicación de FIMs en la cantidad de metabolitos

La aplicación de ácido salicílico incremento significativamente la cantidad de fenoles y flavonoides en el tratamiento SA 0.5 mM con 13.54 ± 0.08^a GAE y 10.30 ± 1.05^a RuE en comparación con el control 13.03 ± 0.27^b GAE y 9.28 ± 1.05^{ab} RuE respectivamente. La concentración más alta de taninos fue para el tratamiento con SA 0.1 mM con 13.45 ± 0.85^a CE contra el control con 7.346 ± 0.64^c CE (Tabla 3). Se ha observado que los elicitores promueven la síntesis de la polifenol oxidasa la cual puede convertir a los taninos en o-quinonas (Mandal, 2013) y por tanto reducir el contenido de taninos en algunas especies es por ello que no se observa un incremento de estos compuestos cuando se aplica ácido salicílico. Un gran número de compuestos de bajo peso molecular son producidos por las plantas como un arma contra algunos de sus enemigos como son microorganismos, herbívoros y otras plantas. El estrés tanto biótico como abiótico ejercen un efecto similar al ataque de patógenos, muchas vías metabólicas que se prenden son iguales y tienen la finalidad de sintetizar compuestos que les permitan contrarrestar los efectos nocivos causados por el daño físico y de autodefensa. Estos compuestos denominados fitoanticipinas incluyen los grupos de saponinas, flavonoides, taninos, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos (Giardi, 2011). La importancia de los metabolitos surge de su actividad biológica como antioxidantes, antimutagénicos, antimicrobianos, anticancerígenos y anti-inflamatorios entre otros; los cuales pueden prevenir enfermedades cardiovasculares y crónico-degenerativas (Sultana, 2009). Con el fin de aumentar la producción de metabolitos secundarios, varias estrategias como aplicación de inductores y el estrés tanto bióticos como abióticos se han utilizado tanto en cultivo de células vegetales como en plantas intactas (Ferrari, 2010).

Se realizó también la medición de las antocianinas sin embargo la concentración fue demasiado baja para ser detectada, por lo tanto no se reportan los resultados.

Tabla 3. Contenido total de fenoles y flavonoides y taninos por gramo de extracto del tratamiento de ácido salicílico

| Tratamiento | * Fenoles | ** Flavonoides | *** Taninos |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Control | 13.03±0.27 ^b | 9.28±1.05 ^{ab} | 7.346±0.64 ^c |
| SA 0.01 mM | 11.45±0.22 ^c | 9.14±0.42 ^b | 11.92±0.75 ^{ab} |
| SA 0.1 mM | 13.27±0.10 ^b | 9.73±0.96 ^{ab} | 13.45±0.85 ^a |
| SA 0.5 mM | 13.54±0.08 ^a | 10.30±1.05 ^a | 10.38±1.02 ^b |

* Concentración de fenoles expresada en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto

** Concentración de Flavonoides en mg equivalentes de (+)-rutina (RuE)/g extracto

*** Concentración de Taninos en mg equivalentes de (+)-catequina (CE)/g extracto

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes ± SD.

Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.05$).

Tabla 4. Contenido total de fenoles y flavonoides y taninos por gramo de extracto del tratamiento de peróxido de hidrógeno

| Tratamiento | * Fenoles | ** Flavonoides | *** Taninos |
|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Control | 13.03±0.27 ^b | 9.28±1.05 ^a | 7.34±0.64 ^b |
| H₂O₂ 6 mM | 12.78±0.13 ^b | 7.79±1.07 ^b | 9.57±0.99 ^a |
| H₂O₂ 14 mM | 15.00±0.19 ^a | 9.31±0.61 ^a | 6.844±0.71 ^b |
| H₂O₂ 18 mM | 15.07±0.28 ^a | 9.53±0.53 ^a | 6.315±0.58 ^b |

* Concentración de fenoles expresada en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto

** Concentración de Flavonoides en mg equivalentes de (+)-rutina (CE)/g extracto

*** Concentración de Taninos en mg equivalentes de (+)-catequina (CE)/g extracto

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes ± SD. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.05$).

Al igual que el ácido salicílico, la aplicación de peróxido de hidrógeno a las plantas de chile pimienta incremento la cantidad de fenoles en los tratamiento de H₂O₂ 18 mM (Tabla 4) con 15.07±0.28^a GAE, para el control se reportan 13.03±0.27^b GAE, sin embargo para

flavonoides no existe diferencia significativa, nuevamente se observa que los taninos disminuyen ante la aplicación de FIMs químicos.

Las condiciones de estrés por sequía aumento la cantidad de fenoles 15.66 ± 0.74^a , también aumento la cantidad de flavonoides pero no hay diferencia significativa con el control (Tabla 5), sin embargo se observa un aumento de los taninos lo que significa que el FIM por sequía aumenta estos compuestos no siendo así para la aplicación de los FIMs químicos.

Tabla 5. Contenido total de fenoles y flavonoides y taninos por gramo de extracto del tratamiento de sequía al 50%.

| Tratamiento | * Fenoles | ** Flavonoides | *** Taninos |
|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| Control | 13.03 ± 0.27^b | 9.28 ± 1.05^a | 7.34 ± 0.50^{ab} |
| Sequía 50% | 15.66 ± 0.74^a | 9.53 ± 0.26^a | 9.69 ± 1.02^a |

* Concentración de fenoles expresada en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto

** Concentración de Flavonoides en mg equivalentes de (+)-rutina (RE)/g extracto

*** Concentración de Taninos en mg equivalentes de (+)-catequina (CE)/g extracto

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes \pm SD. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha=0.05$).

8.7. Perfil de compuestos fenólicos por HPLC

8.8. Actividad antioxidante

Se observa que los tratamientos en presencia de ácido salicílico 0.5 mM presenta mayor capacidad de reducir el ABTS en un 97.98% y 300.06 ± 1.24^a μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto contra 292.63 ± 4.00^b del control.

Para la prueba de DPPH el tratamiento de SA 0.5 mM también fue el que mayor actividad antioxidante mostro con 579.92 ± 18.39^a μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto y 73.33% de inhibición comparando con 571.76 ± 0.81^{ab} μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto del control (Tabla 6). Los tratamientos de ácido salicílico de 0.01 y 0.1 mM fueron más bajos que el control a estas concentraciones no se alcanza a ver un efecto del elicitor, tal vez la planta está en proceso de adaptación o la señal no es suficiente para encender la síntesis de metabolitos.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos del tratamiento de ácido salicílico

| Tratamiento | ABTS* | | DPPH** | |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| | μM de Trolox | %RAA | μM de Trolox | %RAA |
| Control | 292.63 ± 4.00^b | 95.57 ± 1.29^b | 571.76 ± 0.81^{ab} | 73.33 ± 0.11^{ab} |
| SA 0.01 mM | 290.13 ± 2.75^{bc} | 94.76 ± 0.89^{bc} | 509.47 ± 1.69^c | 64.65 ± 0.59^c |
| SA 0.1 Mm | 286.12 ± 3.39^c | 93.46 ± 1.10^c | 488.12 ± 4.14^c | 61.70 ± 0.82^c |
| SA 0.5 mM | 300.06 ± 1.24^a | 97.98 ± 0.40^a | 579.92 ± 18.39^a | 73.93 ± 2.15^a |

* La capacidad antioxidante del ABTS y DPPH se reporta como μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto y porcentaje de inhibición (% de actividad antirradical)

La aplicación de peróxido de hidrógeno para el caso del ABTS presento mayor capacidad antioxidante en todas las concentraciones del tratamiento 298.24 ± 3.15^a , 298.54 ± 3.14^a y

301.57 ±2.37^a μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto, para las concentraciones 6, 14 y 18 mM en comparación con el control 292.63±4.00^b μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto, sin embargo para el caso del DPPH solo el peróxido de hidrógeno 18 mM tuvo mayor actividad 643.64 ±3.76^a μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto siendo el control 571.767 ±0.81^{bc} μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto (Tabla 7).

La diferencia mostrada entre los métodos de ABTS y DPPH se debe a que el radical reacciona de manera diferente con los compuestos fenólicos debido a su estructura, además de que mientras el ABTS reacciona con los fenoles rápido el DPPH lo hace de una manera más lenta de 1 a 6 horas. También el ABTS tiene mayor flexibilidad a reaccionar a diferentes pHs y el radical es más estable (Shalaby, 2013).

Tabla 7. Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos del tratamiento de peróxido de hidrógeno

| Tratamiento | ABTS* | | DPPH** | |
|---|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | μM de Trolox | %ARA | μM de Trolox | %ARA |
| Control | 292.63±4.00 ^b | 95.57 ±1.29 ^b | 571.767 ±0.81 ^{bc} | 73.33 ±0.11 ^{bc} |
| H₂O₂ 6 mM | 298.24 ±3.15 ^a | 97.39 ±1.02 ^a | 486.56 ±16.77 ^d | 60.35 ±0.82 ^d |
| H₂O₂ 14 mM | 298.54 ±3.14 ^a | 97.49 ±1.01 ^a | 554.82 ±14.01 ^c | 71.82 ±2.62 ^c |
| H₂O₂ 18 mM | 301.57 ±2.37 ^a | 98.47 ±0.77 ^a | 643.64 ±3.76 ^a | 83.33 ±0.75 ^a |

* La capacidad antioxidante del ABTS y DPPH se reporta como μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto y porcentaje de inhibición (% de actividad antiradical)

Por último la sequía al 50% muestra actividad antioxidante mayor al control para el método de ABTS con 96.04% de inhibición pero no hay diferencia significativa. En cambio para el DPPH fue mayor la actividad antioxidante con 585,43 μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto y 58,0% de inhibición del radical (Tabla 8).

Tabla 8. Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos del tratamiento de sequía al 50%

| Tratamiento | ABTS* | | DPPH** | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | μM de Trolox | %ARA | μM de Trolox | %ARA |
| Control | 292.63 ±4.00 ^a | 95.57 ±1.29 ^a | 571.76 ±0.81 ^a | 73.33 ±0.11 ^a |
| Sequia 50% | 294.07 ±6.35 ^a | 96.04 ±2.06 ^a | 565.34 ±23.22 ^a | 71.49 ±6.05 ^a |

* La capacidad antioxidante del ABTS y DPPH se reporta como μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto y porcentaje de inhibición (% de actividad anti radical)

El trolox es un potente antioxidante comercial utilizado como control ya que es un derivado de la vitamina E, es por ello que se utilizó este para determinar la capacidad antioxidante y los resultados de la capacidad antioxidante se reportan como μmol equivalentes de Trolox (TE)/10 g de extracto.

Aquellas plantas que sufren un ataque muestran acumulación de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ERO), como resultado al ataque de patógenos o como mecanismo de defensa para restringir su crecimiento y su alimentación – en el caso de insectos-. El estallido oxidativo es una respuesta temprana común de las plantas en presencia del inductor, lo que induce el aumento de especies antioxidantes (Dong, 2010). Muchos de estos compuestos son de importancia en el área médica ya que son utilizados como aditivos o pueden ser utilizados como activos.

Los fenoles y flavonoides actúan como antioxidantes debido sus características estructurales, los grupos hidroxilo con electrones π del anillo fenil pueden capturar los radicales libres; la generación radicales libres es catalizada por metales, y esto se disminuye ya que quelan los iones metálicos; el ciclo de generar nuevos radicales se detiene a través de la donación de un protón a partir de los compuestos fenólicos a los radicales y además de que los polifenoles inhiben enzimas pro-oxidantes que generan radicales libres, tales como lipoxigenasas, ciclooxigenasas y xantina oxidasa (Michalak, 2006).

La actividad antioxidante de fenoles se relaciona con el número y la posición de los grupos hidroxilo presentes en su estructura química y su concentración relativa en la matriz (Rice-Evans *et al.*, 1996). Además de la actividad de sinergia aditiva o antagónica de los compuestos fenólicos para inhibir las especies reactivas de oxígeno (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009).

La aplicación de FIMs las concentraciones más altas aquí presentadas encienden la síntesis de metabolitos secundarios, lo cual se vio en la cantidad de fenoles y flavonoides. Estos tratamientos mostraron mayor actividad antioxidante. Pero además tienen un efecto sobre el desarrollo de la planta ya sea aumentando su crecimiento o mitigando el efecto de las extremas condiciones de temperatura y humedad.

8.9. Actividad antimicrobiana

El ácido salicílico (SA) desempeña un papel clave en el crecimiento de una planta, desarrollo, y la defensa, y está involucrado en alguna señal de los sistemas de transducción para inducir enzimas particulares. Como elicitor el ácido salicílico regula la actividad enzimática de PAL la cual biosintetiza compuestos de defensa. Estos compuestos pueden poseer actividad no solo contra microorganismos patógenos que atacan al huésped si no contra una gran biodiversidad de microorganismos.

Los ensayos mostraron nula actividad antimicrobiana contra los microorganismos gram+ *Streptococcus mutants* ATCC, y *Listeria monocytogenes* ATCC, también contra las gram- *Escherichia coli* ATCC, *Enterobacter faecalis* ATCC y *Salmonella thyphimorum* ATCC. Sin embargo *Staphylococcus aureus* ATCC, mostró una ligera zona de inhibición como se muestra en la figura.

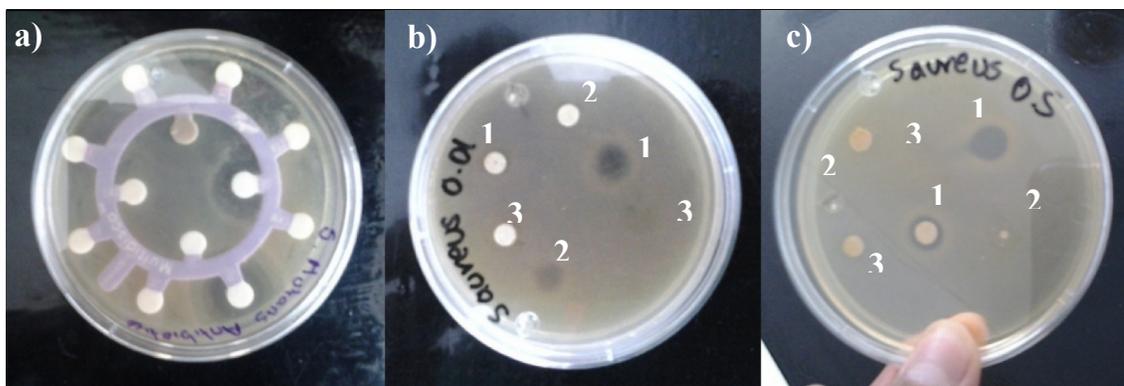


Figura 16. Actividad antimicrobiana de los extractos de chile a diferentes concentraciones del extracto. a) Control, b) *S. aureus* contra los extractos de ácido salicílico 0.01 mM c) *S. aureus* contra los extractos de ácido salicílico 0.5 mM. a) Control, se utilizó diferentes antibióticos, b) *S. aureus* contra los extractos de ácido salicílico 0.01 mM b) *S. aureus* contra los extractos de ácido salicílico 0.5 mM. Los números indican las concentraciones de extracto ya sea en la gota o en el disco de papel, 1) Concentración de 400 mg/mL, 2) Concentración 300 mg/mL, 3) Concentración de 200 mg/mL.

9. CONCLUSIÓN

La aplicación de Factores Inductores de Metabolitos en plantas de chile pimiento (*Capsicum annum*) incrementan la cantidad de compuestos bioactivos en fruto e induce la actividad antimicrobiana de sus extractos en esta investigación no se vio de manera significativa.

10. PERSPECTIVAS

Como perspectivas se propone evaluar la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de pimiento bajo el efecto de los FIMs y evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos empleando otros solventes.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. 2009. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier-Academic Press, San Diego, Calif, USA. ISBN-9780120445653.
- Ahmad, B., Elanchezhiyan, C., Sethupathy, S., Renju, V. C., Shoba, V., Hemalatha, S., Gowri, K., Ahmad, S., Ahmad, O., Suhasini. 2012. Evaluation of anti-diabetic activity of Helicters isora fruit extract in alloxan induced diabetic rats. Journal of Pharmacy Research. 5.
- Al, Z., Badjah, Y., Abdelaty, M., Abdel, A. 2011. Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. Molecules. 16:8919-8929.
- Alviano, D., Alviano, C. 2009. Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. 10:106-121.
- Arya, V., Yadav, S., Kumar, S., Yadav, J. 2010. Antimicrobial activity of *Cassia occidentalis* (leaf) against various human pathogenic microbes. Life Sciences and Medicine Research. 1:1-11.
- Aza-González, C., Núñez-Palenius, H., Ochoa-Alejo, N. 2011. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum spp.*). Plant Cell Reports. 30:695-706.
- Ben-Chaim, A., Borovsky, Y., Falise, M., Mazourek, M., Kang, B., Paran, I., Jahn, M. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in Capsicum. Theoretical and Applied Genetics. 113:1481-1490.
- Bochkov, D., Sysolyatin, S., Kalashnikov, A., Surmacheva, I. 2012. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. J Chem Biol. 5(1): 5-17.
- Boué, S., Shih, F., Shih, B., Daigle, K., Carter-Wientjes, C., Cleveland, T. 2008. Effect of biotic elicitors on enrichment of antioxidant properties and induced isoflavones in soybean. Journal of Food Science. 73:43-9.
- Coertze, A.F., Kistner, M.H. 1994. Oes en na-oeshantering van soetrissies, paprika en brandrissies, No. 11, Landbounavorsingsraad, Roodeplaat, Instituut vir Groente en Sierplante, Pretoria.
- Daood, H., Kapitány, J., Biacs, P., Albrecht, K. 2006. Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika and red pepper spice. Journal of the Science of Food and Agriculture. 86:2450-2457.

- De Teodoro-Pardo, C., García-Velázquez, A., Corona-Torres, T. 2007. Polimorfismo Cromosómico en *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) en Recolectas de Puebla, Morelos y Querétaro, México. *Agrociencia* 41: 873-881.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Liu, R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 50:3010-3014.
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktaş, L., Gesheva, E. 2008. Stress-Protective Role of Secondary Metabolites: Diversity of Functions and Mechanisms. *General and Applied Plant Physiology*. 34:67-78.
- Ellis, D., Dunn, W., Griffin, J., Allwood, J., Goodacre, R., 2007. Metabolomic ingeprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*. 8:1243-1266.
- Erickson, A.N., Markhart, A.H. 2002. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper to elevated temperature. *Plant Cell Environ*. 25(1):123-130.
- FAOSTAT, 2010.
- Farouk, S., Osman, M. A. 2011. The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 7(3).
- Feregrino-Pérez, A., Torres-Pacheco, I., Vargas-Hernández, M., Munguía-Fragozo, P., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., Ocampo-Velázquez, R., Rico-García, E., Guevara-González, R. 2011. Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 70: 859-864.
- Ferrari, S. 2010. Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 698:152-166.
- Ferrari, S. 2011. Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals. *Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Series: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 698.
- Font Quer, P.: *Plantas medicinales, el Dioscórides renovado*. Editorial Labor, Barcelona, 1980, p. 581-583.
- Friedman, M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51:116-134.
- Fritz, V. Justen, V. Bode, A. Schuster, T. 2010. Glucosinolate Enhancement in Cabbage Induced by Jasmonic Acid Application. *HortScience*. 45(8):1188-1191.

- Garcés-Claver, A., Arnedo-Andrés, M. S. Abadía, J., Gil-Ortega, R., Ivarez-Fernandez, A. 2007. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54(25):9303-11.
- Ghasemzadeh A, Jaafar H. 2011. Anticancer and antioxidant activities of Malaysian young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties grown under different CO₂ concentration. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5:3247-3255.
- Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B. 2011. Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors (Advances in Experimental Medicine and Biology). Landes Bioscience.
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., Bouarab, K. 2009. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J Mol Sci*. 10(8):3400-19.
- Gutiérrez-Carbajal, M., Monforte-González, M., Miranda-Ham, M., Godoy-Hernández, G., Vázquez-Flota, F. 2010. Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*. 54:430-434.
- Iriti, M., Faoro, F. 2010. Review Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution. *Molecules*. 15:8933-8952.
- Kaur, A., Bilaspuri, G. 2010. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*. 1:1-7.
- Keskin, D, Toroglu, S. 2011. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *Journal of Environmental Biology*. 32:251-256.
- Kim, I., Abd, A., Shin, H., Lee, H., Kim, I., Shim, J. 2007. Analysis of volatile compounds in fresh healthy and diseased peppers (*Capsicum annuum* L.) using solvent free solid injection coupled with gas chromatography-flame ionization detector and confirmation with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45:487-94.
- Koffi-Nevry, R., Manizan, A. L., Tano, K., Yue, Y. C., Oule, M., Koussemo, M. 2011. Assessment of the antifungal activities of polyhexamethylene-guanidine hydrochloride (PHMGH)-based disinfectant against fungi isolated from papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *African Journal of Microbiology Research*. 5:4162-4169.
- Kumar, D., Kumar, S., Singh, J., Narender, Rashmi., Vashistha, B., Singh, N. 2010. Free radical scavenging and analgesic activities of *Cucumis sativus* L. fruit extract. *J. Young Pharm*. 2:365-368.

- Landeta-Riverol, R. 2011. Evaluación del efecto de aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno sobre la producción de capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivado en invernadero. Tesis de especialidad en Ingeniería de Invernaderos. Facultad de Ingeniería, Campus amazcala. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Lee, B., Lee, S., Ryu, C. 2012. Foliar aphid feeding recruits rhizosphere bacteria and primes plant immunity against pathogenic and non-pathogenic bacteria in pepper. *Annals of Botany*. 110:281-90.
- Lisar, S., Mosharraf, R., Hossain, M., Rahman, I. 2012. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses, Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, InTech, DOI: 10.5772/39363.
- Liu, M., Qi, X., Weber, C., Yong, C., Brown, J., Hai, R. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 50:2926-2930.
- Liu, P., Von Dahl, C., Park, S., Klessig, D. 2011. Interconnection between Methyl Salicylate and Lipid-Based Long-Distance Signaling during the Development of Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis and Tobacco. *Plant Physiology*. 155:1762-1768.
- Liu, R., Xiong, K., Dai, X., Wang, L., Liu, Z., Xue, W. 2010. The effects of maturity on chilli pepper volatile components determined by SDE, GC-MS and HPLC. *Natural Product Communications*. 5:985-90.
- López-Gresa, M., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés J., Conejero, V. 2011. Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environmental and Experimental Botany*. 74:216-228.
- Mahesh, B., Satish, S., 2008. Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences* 4:839-843.
- Marín-Martínez, R., Veloz-García, R., Veloz-Rodríguez, R., Guzmán-Maldonado, S. H., Loarca-Pina, G., Cardador-Martínez, A., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., Torres-Pacheco, I., Pérez Pérez, C., Herrera-Hernández, G., Villaseñor-Ortega, F., González-Chavira, M., Guevara-Gonzalez, R. G. 2009. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. *Bioresource Technology*, 100:434-439.
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G., León, J. 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J*. 37(2):209-17.
- Martinsa, S., Mussatto, S., Martínez-Avilab, G., Montañez-Saenz, J., Aguilarb, C., Teixeira, J. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. 29:365–373.

- Mazid, M., Khan, T., Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 3:232-249.
- Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, F., Chapa-Oliver, A., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M., Ocampo-Velázquez, R., Guevara-González, R. 2013. Oxidative and Molecular Responses in *Capsicum annuum* L. after Hydrogen Peroxide, Salicylic Acid and Chitosan Foliar Applications. *Int J Mol Sci*. 14(5): 10178–10196.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. Environ. Stud.*, 15: 523-530.
- Misra, S., Lal, R., Darokar, M., S, Khanuja. 2011. Genetic Variability in Germplasm Accessions of *Capsicum annuum* L. *AJPS*. 2(5): 629-635.
- Mohammad. A, Eun-Joo, H. Kee-Yoeup, P. 2007. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor. *Molecules*. 12:607-621.
- Moneruzzaman, K. M., Boyce, A. N., and Normaniza, O. 2012. The Influence of Hydrogen Peroxide on the Growth, Development and Quality of Wax Apple (*Syzygium samarangense*, var. jambu madu) Fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*. 53:101-110.
- Okoh, A., Sibanda, T., Gusha, S. 2010. Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7: 2620-2637.
- Qureshi, K. M., Chughtai, S., Qureshi, U.S. Abbasi, N.A. 2013. Impact of Exogenous Application of Salt and Growth Regulators on Growth and Yield of Strawberry. *Pak. J. Bot.*, 45(4): 1179-1185.
- Rajat, S., Shar, M., Robin, S., Sunil, K. 2012. Nutraceuticals: a review. *International research journal of pharmacy*. 3:95-99.
- Reichling, J. 2010. Plant-Microbe Interactions and Secondary Metabolites with Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Annual plant reviews*. 39:214-317.
- Reyes-Escogido, M., Gonzalez-Mondragon, E., Vazquez-Tzompantzi, E. 2011. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules*. 16:1253-1270.
- Rodriguez-Uribe, L., Guzman, I., Rajapakse, W., Richins, R., O'Connell, M.A. 2012. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *J Exp Bot*. 63(1): 517–526.

- Rubatzky, V.E., M. Yamaguchi. 1999. World vegetables: Principles, production, and nutritive values. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD.
- Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D.R., Bezrukova, M. V., Shakirova, F.M. 2003. Salicylic Acid Prevents the Damaging Action of Stress Factors on Wheat Plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 314–319.
- Santos, B., McAvoy, E., Ozores-Hampton, M., Dittmar, P., Vallad, G., Webb, S., Olson, S. 2013. Vegetable Production Handbook. Florida University.
- Santos, M., Vieira-da-Motta, O., Vieira, I., Braz-Filho, R., Gonçalves, P., Maria, E., Terra, W., Rodrigues, R., Souza, C. 2012. Antibacterial activity of *Capsicum annum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. *Journal of Natural Medicines.* 66:354-6.
- Shalaby, A., Shanab, M. M. 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences (IJMS).* 42(5):556-564.
- Sharma. M., Sharma, A., Kumar, A., Kumar, S. 2011. Enhancement of secondary Metabolites in cultured Plant Cells through Stress Stimulus. *American Journal of Plant Physiology.* 6:50-71.
- Sibanda, t., Okoh, A. 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology.* 6:2886-2896.
- Silva, N.; Fernández, A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 16:402-413.
- Singh, S., Jarret, R., Russo, V., Majetich, G., Shimkus, J., Bushway, R., Perkins, B. 2009. Determination of capsinoids by HPLC-DAD in capsicum species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57:3452-7.
- Smith, J., De Moraes, C., Mescher, M. 2009. Plant hormone-mediated plant defense responses to parasitic plants and other antagonists. *Pest Management Science* 65:497-503.
- Spoel, H., Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology.* 12:89-100.
- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.* 14(6):2167-2180.
- Tierranegra-García, N., Salinas-Soto, P., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R., Rico-García, E., Mendoza-Díaz, S., Feregrino-Pérez, A., Mercado-Luna, A., Vargas-

- Hernández, M., Soto-Zarazúa, G., Guevara-González, R. 2011. Effect of foliar salicylic acid and methyl jasmonate applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*). *Phytoparasitica*, 39:137-144.
- Torres-Pacheco, I. Guevara-González, R. G., Mejía-Teniente, L., Chapa Oliver, A.M. 2012. Relación de la Inmunología Vegetal y la Producción de Alimentos. *CIENCIA@UAQ*. 5(1):1-7.
- Vattem, A., Ghaedian, R., Shetty, K. 2005. Review Article Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 14:120-130.
- Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Anaya-López, J., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A., Loarca-Piña, G., Guevara-González, R. 2010. Antimicrobial activities of cascote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial crops and products*. 31:134-138.
- Wahyuni, Y., Ballester, A., Tikunov, Y., de Vos, R., Pelgrom, K., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, R., Ovy, A. 2012. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum sp.*) biodiversity. *Metabolomics*.
- Wahyuni, Y., Ballester, AR., 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):1358-70.
- Wahyuni, Y., Ballester, AR., 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):1358-70.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FACTORES INDUCTORES DE METABOLITOS
(FIMs) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE
CHILE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.)**

**EVALUATION OF THE EFFECT OF METABOLITES INDUCING FACTORS
(FIMs) ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
BELL PEPPER (*Capsicum annuum* L.)**

Marcela Vargas-Hernández^a, Diego Vargas-Hernández^a, Israel Macias-Bobadilla^a, Adán Mercado-Luna^a, Oscar Alatorre-Jácome, Enrique Rico-García^a, Rosalía V. Ocampo-Velázquez^a, Ramón G. Guevara-González^{a,*}.
ramon.guevara@uaq.mx

^aC. A. de Ingeniería de Biosistemas. División de Investigación y Posgrado. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario Cerro de las Campanas, S/N, Col. Las Campanas. C.P 76010. Santiago de Querétaro, Qro. México.

Resumen

Capsicum annuum es la especie más cultivada de pimientos (chiles) en el mundo. Es una fuente importante de metabolitos secundarios los cuales poseen una amplia variedad de actividades biológicas como antioxidante, antimutagénica, antimicrobiana, antifúngica, entre otros. La producción de estos compuestos puede ser potenciada mediante la aplicación de Factores Inductores de Metabolitos (FIMs). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de FIMs sobre el desarrollo y producción de la planta de chile pimiento. Para lo cual se implementó un sistema de producción bajo invernadero con 3 FIMs en el que se midieron diferentes parámetros fisiológicos tanto en planta (altura, diámetro de tallo, número de flores y frutos) como en fruto (altura, peso y perímetro ecuatorial). Se encontró que las plantas a las cuales se les aplicó ácido salicílico 0.5 mM presentaron mayor número de frutos y altura. El tratamiento de peróxido de hidrógeno 18 mM tuvo mayor número de flores. Por último los tratamientos con ácido salicílico 0.1 mM y peróxido de hidrógeno 6 mM presentaron mayor diámetro de tallo. Los frutos cosechados también se evaluaron, encontrándose que el peróxido de hidrógeno 18 mM fue el que presentó frutos más altos y de mayor peso. Con lo anterior se concluye que los FIMs tienen un efecto sobre el desarrollo y producción de las plantas de pimiento.

Palabras clave: elicitor, estrés abiótico, ácido salicílico, peróxido de hidrógeno.

Summary

Capsicum annuum is the most widely cultivated species of peppers (chilies) in the world. It is an important source of secondary metabolites which have a wide variety of biological activities such as antioxidant, antimutagenic, antimicrobial, and antifungal, among others. The production of these compounds can be enhanced by applying Metabolites Inducing Factors (FIMs). The aim of this study was to evaluate the effect of the application of FIMs on development and production of the bell pepper plant. For this, we implemented a greenhouse production system with 3 FIMs in which different physiological parameters were measured in both plant (height, stem diameter,

number of flowers and fruits) and fruit (height, weight and equatorial circumference). It was found that the plants to which they are applied 0.5 mM salicylic acid showed greater height and number of fruits. Treatment of 18 mM hydrogen peroxide had increased number of flowers. Finally treatment with 0.1 mM salicylic acid and 6 mM hydrogen peroxide had increased stem diameter. The harvested fruits were also evaluated, finding that 18 mM hydrogen peroxide was presented the higher and heavier fruit. It concludes that the FIMs have an effect on the development and production of bell pepper plants.

Keywords: elicitor, abiotic stress, salicylic acid, hydrogen peroxide.

1. Introducción

Capsicum annuum es la especie más cultivada de pimientos (chiles) en el mundo (Misra, 2011). Esta especie pertenece a la familia *Solanaceae* y es nativa de Sudamérica (Santos *et al.* 2012). Mundialmente la producción de pimiento asciende a 1.8 millones de hectáreas, con más de 28 millones de toneladas por año (Wahyuni *et al.* 2012). México es el segundo país productor de chiles después de China con 1,835,999 tons (FAOSTAT, 2010). Los frutos de chile (*Capsicum* spp) son relevantes en la alimentación humana y se consumen en fresco y como condimento (Moran-Bañuelos *et al.* 2008). Además son fuente importante de nutraceuticos derivados del metabolismo secundario como son ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (provitamina A), tocoferoles (Vitamina E), flavonoides y capsaicinoides (Wahyuni *et al.* 2012), todos ellos con propiedades antioxidantes (Daood *et al.* 2006). Los niveles y actividades de metabolitos secundarios en plantas se sabe aumentan en respuesta al estrés (Makkar, 2009). Una manera de lograr el incremento de metabolitos secundarios en la planta es mediante la activación del sistema inmune vegetal. La exposición controlada de FIMs (Factores inductores del metabolismo) proporcionan o generan Patrones Moleculares Asociados a Estrés de Plantas (PMAEPs) que son reconocidos como “extraños” por la célula vegetal y encienden el arsenal de defensa de la planta (Torres-Pacheco *et al.* 2012). Se ha demostrado que los niveles de compuestos bioactivos en frutos de chile (*C. chinense*) se incrementan al aplicar peróxido de hidrógeno durante su cultivo en invernadero (Landeta-Riverol *et al.* 2011). Estudios indican que la aplicación exógena de metil-jasmonato (MeJA) y ácido salicílico (AS) también incrementan la cantidad de metabolitos en las plantas (Mohammad *et al.* 2007). La aplicación de MeJA y SA en plantas de frijol reduce las infestaciones de ácaros, además la mayoría de las concentraciones de estos elicitors mejoró significativamente la planta es decir, el crecimiento tuvo un impacto positivo sobre la altura de planta, número de ramas, peso seco y área foliar por planta y rendimiento del frijol (Farouk y Osman, 2011). En frutos de manzana se observó que la aplicación exógena de peróxido de hidrógeno reduce la caída de botones y además potencia el crecimiento del fruto el cual se ve reflejado en la cantidad de frutos, mayor tamaño, la biomasa y el rendimiento (Moneruzzaman *et al.* 2012). Sin embargo se cree que altas concentraciones de metabolitos secundarios podrían resultar en una planta más resistente aunque su producción se piensa que es costosa y reduce el crecimiento de las plantas y la reproducción (Mazid, 2011). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de FIMs sobre el desarrollo y producción de plantas de chile pimiento.

2. Materiales y métodos

2.1. Lugar y ubicación

El cultivo de chile pimiento se estableció en un invernadero de 108 m², localizado en el campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud y entre los 100° 09' y 100° 24' de longitud a 1 850 m SNM.

2.2. Implementación de sistema de producción de chile pimiento en invernadero

Las semillas de chile de la variedad Revolution se germinaron en charolas previamente desinfectadas, con una mezcla de peatmoss y vermiculita en una proporción de 4:1 respectivamente. Se pasaron a la cámara de germinación por un periodo de 8 días a una temperatura de 25°C. Posteriormente se mantuvieron las plántulas en el invernadero por 2 semanas hasta que la plántula desarrolló de 2-3 hojas verdaderas. Se procedió a su trasplante en sustrato tezontle en bolsas de plástico de 10 kg. La solución nutritiva utilizada para la fertilización fue la descrita por British Columbia Greenhouse Association (BCGGA, 1996), ajustándose acorde al desarrollo fenológico de las plantas. Se realizó diariamente el monitoreo de las condiciones ambientales empleando un Datalogger (Watch Dog Model 450, Spectrum® Technologies comercial). Durante el desarrollo del cultivo se revisó diariamente el estado de salud de las plantas para en su caso aplicar algún agroquímico correctivo.

2.3. Diseño experimental

Los tratamientos consistieron en tres FIMs, dos elicitores químicos: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 6, 14 y 18 mM y ácido salicílico (SA) con una concentración de 0.01, 0.1 y 0.5 mM (Landeta-Riverol, 2011; Tierranegra-García *et al.* 2011). El tercer FIM fue estrés hídrico que consta de la mitad del riego aplicado diariamente al cultivo de pimiento en invernadero (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de agua regada a los pimientos diariamente

| Etapa | Tiempo Riego 100% (min) | Tiempo Riego 50% (min) | Número de riegos | Total riego 100% (ml) | Total riego 50% (ml) |
|----------------|-------------------------|------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| Vegetativa | 2 | 1 | 3 | 600 | 300 |
| Floración | 2 | 1 | 5 | 1000 | 500 |
| Fructificación | 2 | 1 | 6 | 1 200 | 600 |

Como controles experimentales se tuvieron plantas de chile pimiento con riego normal, para la prueba de estrés hídrico y plantas crecidas en invernadero sin aplicación de FIMs, para el ensayo de inductores químicos. Todas las soluciones fueron aplicadas foliarmente hasta punto de rocío en intervalos de tiempo de 15 días.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con unidades experimentales de 6 plantas en 4 repeticiones (24 plantas en total por tratamiento en cada experimento). Las variables a medir fueron: altura de planta, número de frutos y número de flores. Por otro lado en los frutos cosechados se midió altura, peso y perímetro ecuatorial.

2.4. Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XV.

3. Resultados y discusión

3.1. Condiciones ambientales

Se monitorearon las condiciones ambientales desde el primer día de transplante. La humedad relativa se alcanzó un valor máximo de 88.2% y mínimo de 2%. La temperatura máxima fue de 52°C y la mínima de 2°C (Fig. 1). La humedad relativa óptima para que se desarrolle el pimiento es de 50 a 70%, por otro lado la temperatura óptima va de 20 a 27°C. Las condiciones ambientales dentro del invernadero no fueron las adecuadas, sin embargo la variedad tiene la capacidad de crecer y desarrollarse a bajas temperaturas.

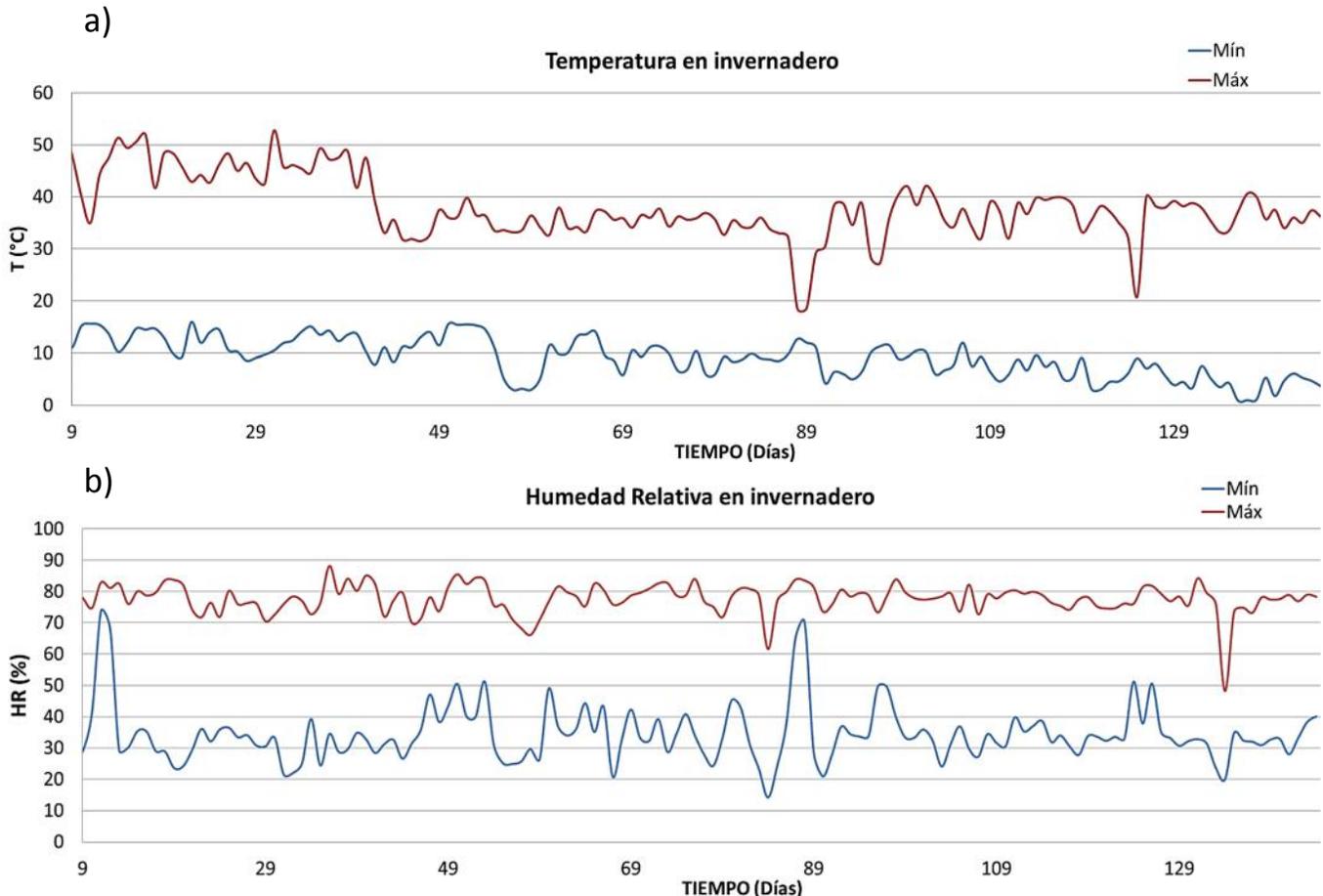


Figura 1. Condiciones ambientales dentro del invernadero: a) Temperatura, b) Humedad relativa.

3.2. Variables medidas en la planta de pimiento bajo efecto de los FIMs

El proceso de floración en las plantas está regulado por factores externos, normalmente las plantas florecen en determinada estación, dependiendo de la duración del día o la temperatura (Martínez *et al.* 2004). Sin embargo, también se puede observar floración precoz bajo estrés ambiental. La sequía por ejemplo disminuye el potencial hídrico de la planta y el turgor lo que dificultan las funciones fisiológicas normales en las plantas y esto se ve reflejado en menor número de flores. En este estudio se observó que aquellas plantas que tuvieron riego al 50%, presentaron una floración precoz, pero fue el tratamiento que menos cantidad de flores mostró, ya que tanto las altas temperaturas como la sequía inducen aborto de flores.

Por otro lado se observa que el tratamiento peróxido de hidrógeno 18 mM tuvo el mayor número de flores. El peróxido de hidrógeno es un compuesto que en las plantas induce senescencia y por tanto aparición de flores, aunque el efecto no provocó el aborto en las plantas.

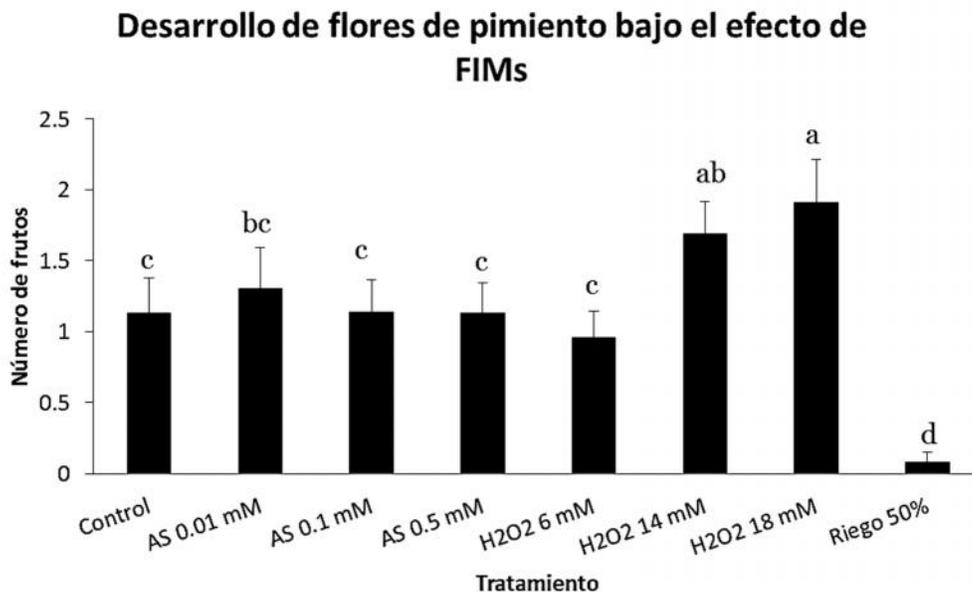


Figura 2. Efecto de la aplicación de FIMs en el número de flores de chile.

Las plantas ante estrés producen gran número de flores, pero no todas llegan a convertirse en frutos. Los resultados indican que la aplicación de ácido salicílico 0.5 mM incrementan el desarrollo de frutos (Figura 3). A pesar de que este tratamiento fue en el que menos cantidad de flores mostró. El riego al 50% tiene los mismos frutos que el control sin embargo en número de flores indujo más abortos.

El ácido salicílico es un regulador de crecimiento exógeno que participa en la regulación de los procesos fisiológicos en las plantas. Este ha despertado un considerable interés por su capacidad de proteger contra estrés de carácter abiótico, por ejemplo induciendo proteínas PR o proteínas de choque térmico (Sakhabutdinova *et al.* 2003). El efecto del ácido salicílico es diferente dependiendo del tipo de planta y la forma de aplicación. En este estudio se observó que la aplicación foliar de este compuesto permite un mayor desarrollo, por su capacidad protectora contra agentes externos, es decir las altas y bajas temperaturas.

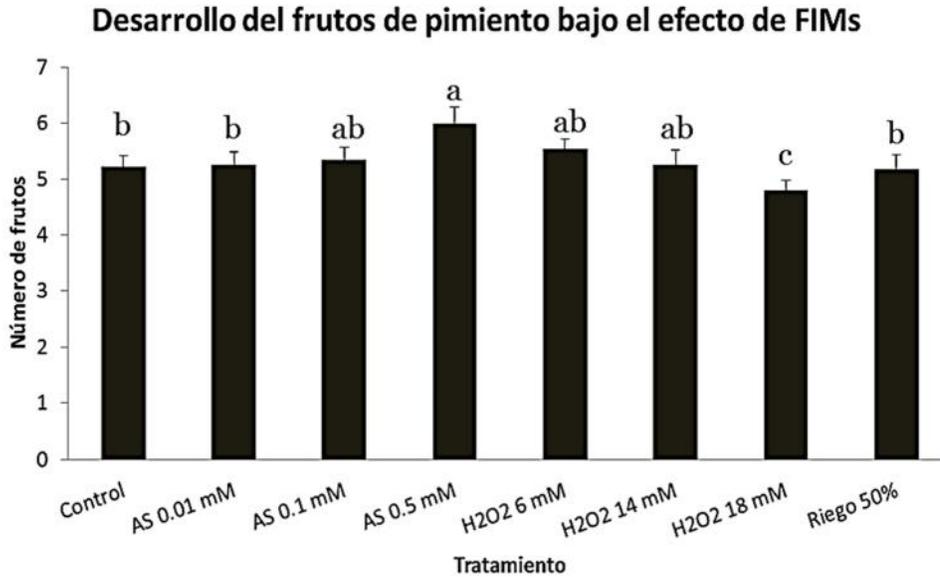


Figura 3. Efecto de la aplicación de FIMs en el número de flores de chile.

Por otro lado, los datos indican que tanto el riego como la aplicación de peróxido de hidrógeno son factores de estrés que afectan negativamente el crecimiento de la planta. Lo anterior se explica tomando en cuenta que el estrés hídrico en las plantas reduce el potencial hídrico y el turgor, eleva concentración de solutos en el citosol y produce graves problemas en la reproducción (Seyed *et al.* 2012).

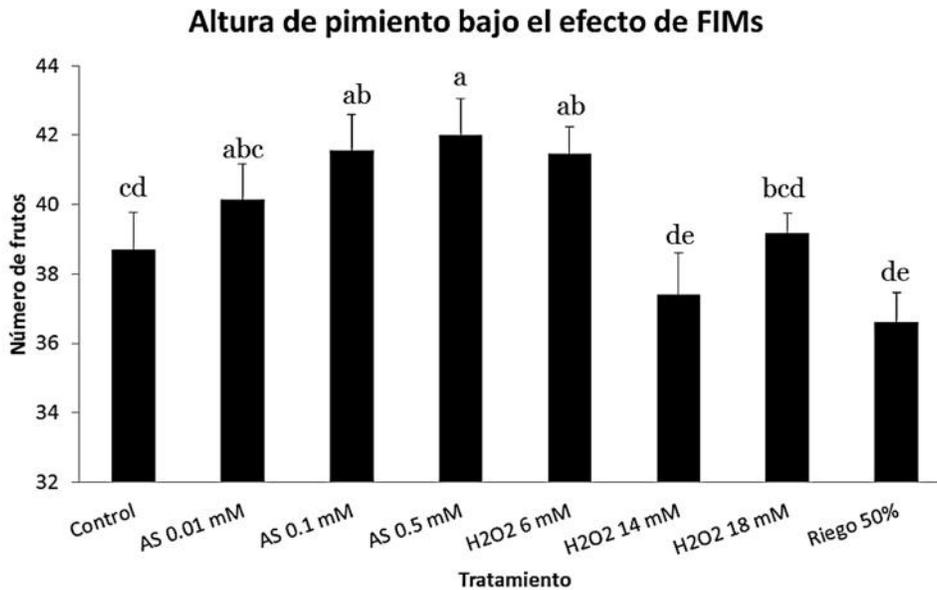


Figura 4. Efecto de la aplicación de los FIMs en la altura de chile

Por último se estudió el efecto que tiene la aplicación de FIMs en el desarrollo de la planta. Los datos indican que la aplicación de FIMs afecta positivamente el tamaño del diámetro del tallo, a excepción del riego al 50%. Tanto la pérdida de turgencia, el poco o nulo alargamiento de la

célula y la disminución en la fotosíntesis entre otros, decrece la biomasa en la planta por lo que no es raro observar diámetros más pequeños. Tanto el ácido salicílico como el peróxido de hidrógeno no sólo no presentan efecto negativo en el crecimiento del diámetro, sino que también se observa un incremento del mismo (Figura 5).

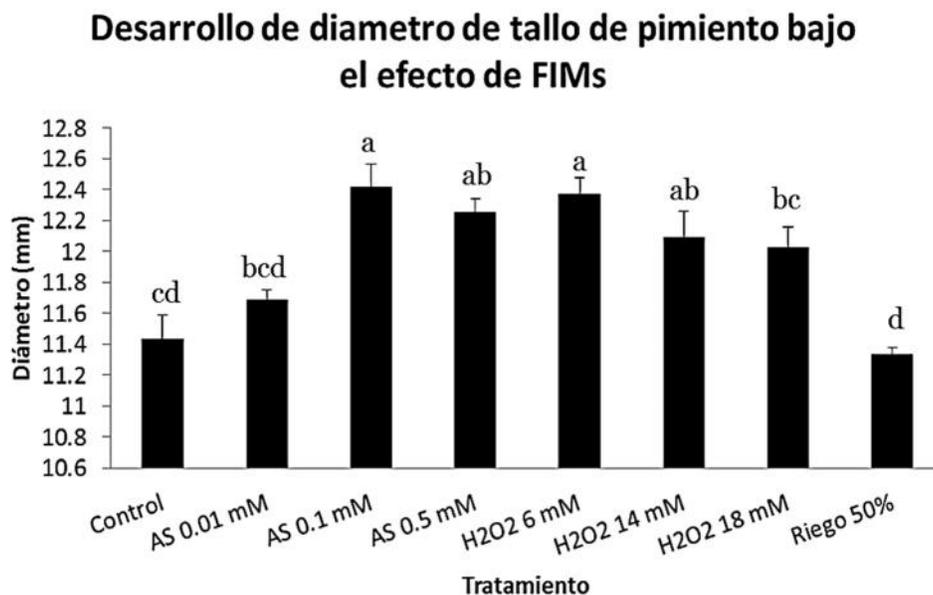


Figura 5. Efecto de la aplicación de los FIMs en el diámetro del tallo de chile

3.3. Variables medidas en el fruto de pimienta

Una vez que se realizó la cosecha a los 103 días se midieron altura, peso y perímetro ecuatorial en fruto.

Las plantas a las que se les aplicó peróxido de hidrógeno al 18 Mm tuvieron mayor altura y peso por lo que este fue el mejor tratamiento en cuanto a productividad del cultivo (Figura 6 y 7). Lo anterior indica que el peróxido de hidrógeno podría estar involucrado en la reproducción y el crecimiento celular. Cuando se hizo el estudio de perímetro ecuatorial no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

Visualmente se analizaron los frutos que presentaron algún tipo de anomalía en su forma, comparando con el control (25%), los frutos más deformes fueron los tratamientos de riego al 50%, ácido salicílico 0.5 mM y peróxido de hidrógeno 14 mM (33.3% para todos los tratamientos). El tratamiento de ácido salicílico 0.1 mM fue igual al control y aquellos que menos porcentaje de anomalía mostraron fueron ácido salicílico 0.01 mM (8.3%), peróxido de hidrógeno 6 mM (20.8%) y peróxido de hidrógeno 18 mM (8.3%), El estrés por sequía afecta el crecimiento y reproducción de algunos cultivares. Es evidente que la sequía induce anomalías estructurales, fisiológicas y moleculares en los procesos que conducen al desarrollo de los gametos. La sequía disminuye la viabilidad del polen e incrementa el aborto del ovario (Mofizur *et al.* 2012). Lo anterior conduce a anomalías en el desarrollo de los frutos.

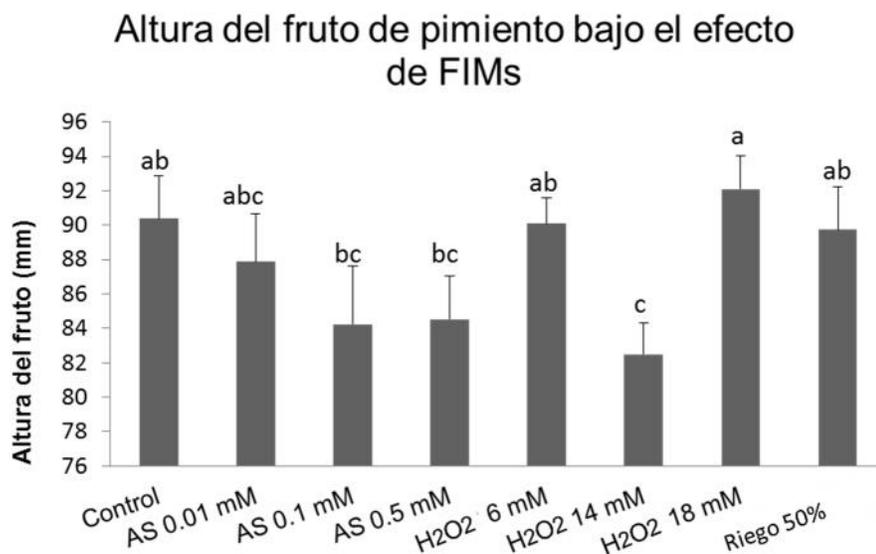


Figura 6. Comportamiento de la altura del fruto de pimiento bajo el efecto de los FIMs

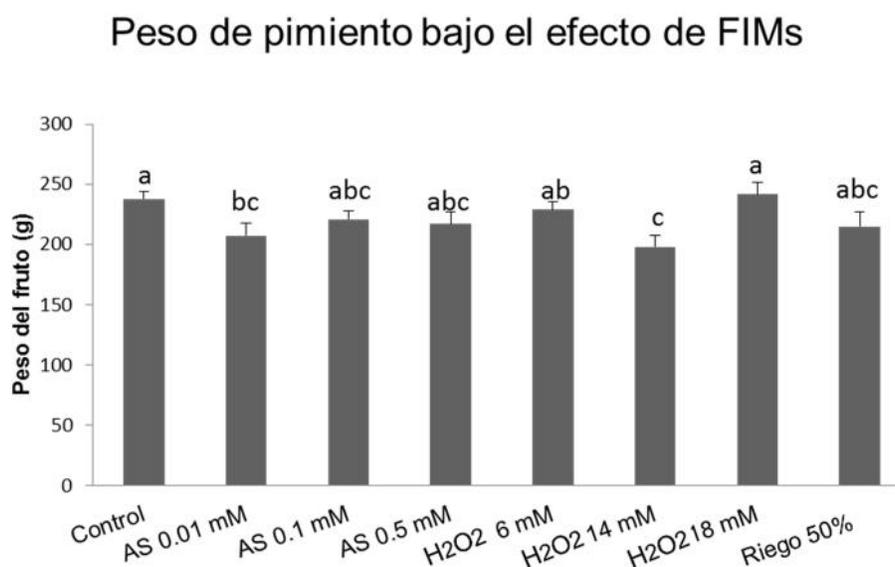


Figura 7. Comportamiento del peso de fruto de pimiento bajo efecto de los FIMs

Por otro lado altas temperaturas también inducen el desarrollo anormal de los frutos ya que al igual que el estrés hídrico juega un efecto muy importante en el correcto desarrollo del ciclo reproductivo. Las altas temperaturas dentro del invernadero podrían haber afectado el desarrollo de los frutos en aquellos tratamientos que presentaron mayor anomalía.

4. Conclusión

La implementación de un sistema de producción de pimiento en invernadero bajo la aplicación de FIMs, muestra un efecto significativo tanto en el desarrollo como en la productividad del cultivo.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a FOMIX-Qro 2008, PROMEP y FIFI-UAQ2009 por el apoyo para la realización de esta investigación. L.B. Marcela Vargas Hernández también agradece a CONACYT por el apoyo otorgado.

6. Referencias

Daood H. Kapitány J. Biacs P. Albrecht K., 2006, Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika and red pepper spice, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:2450-2457.

FAOSTAT, 2010.

Farouk S. Osman M., 2011, The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 05-22 ISSN 1997-0838.

Landeta-Riverol R., 2011, Evaluación del efecto de aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno sobre la producción de capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivado en invernadero. Tesis de especialidad en Ingeniería de Invernaderos, Facultad de Ingeniería, Campus amazcala, Universidad Autónoma de Querétaro.

Makkar H. Norvsambuu T. Lkhavatsere S. Becker K., 2009, Plant secondary metabolites in some medicinal plants of Mongolia used for enhancing animal health and production, *Tropicultura*, 27:159-167.

Martinez C. Pons E. Prats G. León J., 2004, Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant Journal*, 37:209-217.

Mazid M. Khan T. Mohammad F., 2011, Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and Medicine*, 3:232-249.

Misra S. Lal R.K. Darokar M. Khanuja S., 2011, Genetic variability in germplasm accessions of *Capsicum annuum* L, *American Journal of Plant Sciences*, 2:629-635.

Mofizur I. Hiroshi H., 2012, Water Stress. Rijeka, Croatia: InTech isbn:978-953-307-963-9 .

Mohammad A. Eun-Joo H. Kee-Yoep P., 2007, Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor, *Molecules*, 12:607-621.

Moneruzzaman M. Nasrulhaq A. Normaniza B., 2012. The influence of hydrogen peroxide on the growth, development and quality of wax apple (*Syzygium samarangense*, [Blume] Merrill & L.M. Perry var., *Plant Physiol Biochem*, 53:101.

Moran-Bañuelos., 2008, Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México, *Agrociencia*, 42:807-816.

Sakhabutdinova A. Fatkhutdinova D. Bezrukova M. Shakirova F., 2003, Salicylic Acid Prevents The Damaging Action Of Stress Factors On Wheat Plants, *Bulg. J. Plant Physiol*, 314–319.

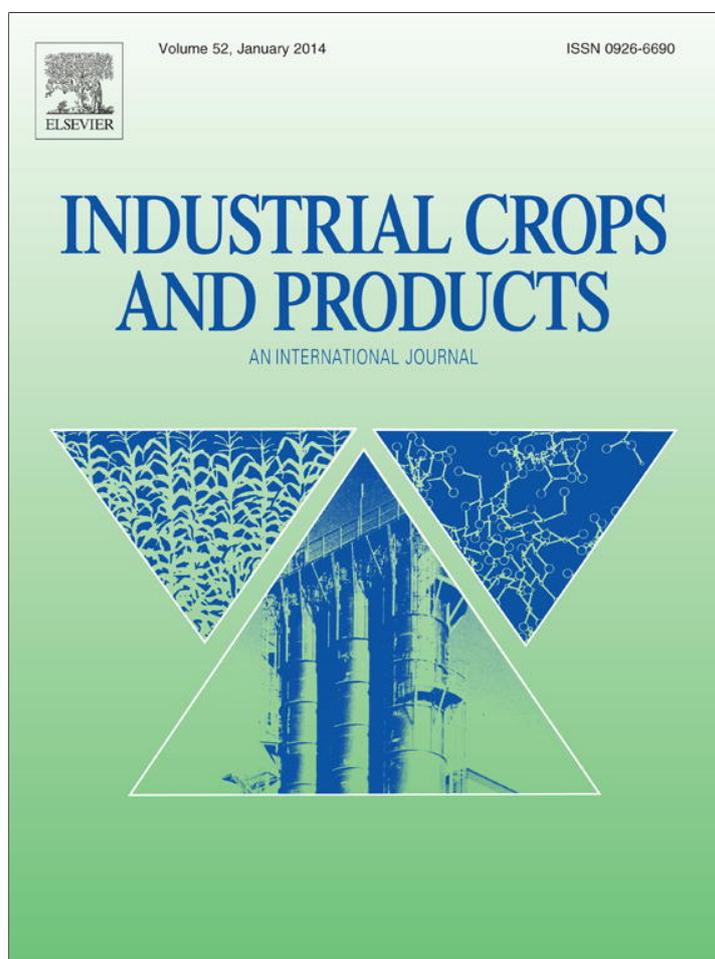
Santos M. Vieira-da-Motta O. Vieira I. Braz-Filho R. Gonçalves P. Maria E. Terra W. Rodrigues, R. Souza C., 2012, Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*, *Journal of Natural Medicines*, 66:354-6.

Tierranegra-García N. Salinas-Soto P. Torres-Pacheco I. Ocampo-Velazquez R. V. Rico-García E. Mendoza-Díaz S. O. Feregrino-Perez A. A. Mercado-Luna A. Vargas-Hernández M. Soto-Zarazúa G. M. Guevara-González R. G., 2011, Effect of foliar salicylic acid and methyl jasmonate applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*), *Phytoparasitica*, 39:137-144.

Torres-Pacheco I. Mejía-Teniente L. Chapa-Oliver A. M. Guevara-González R. G., 2012, Relación De la Inmunología Vegetal y la Producción de Alimentos, *Ciencia@uaq*, Año 5. No. 1. Enero - Junio de 2012.

Wahyuni Y. Ballester A. Tikunov Y. de Vos R. Pelgrom K. Maharijaya A. Sudarmonowati E. Bino R. Ovy A., 2012, Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity, *Metabolomics*.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

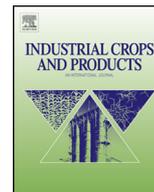
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Bioactivity and gene expression studies of an arbustive Mexican specie *Acaciella angustissima* (Timbe)



Marcela Vargas-Hernández^a, Perla V. Munguía-Fragozo^a, Andrés Cruz-Hernández^a, Brenda Z. Guerrero^c, Mario M. Gonzalez-Chavira^c, Ana A. Feregrino-Pérez^a, Sandra O. Mendoza-Díaz^b, Guadalupe Loarca-Piña^b, Irineo Torres-Pacheco^a, Marcelo Hernández-Salazar^{a,b}, Ramón G. Guevara-Gonzalez^{a,*}

^a C. A. de Ingeniería de Biosistemas, División de Investigación y Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario Cerro de las Campanas, S/N, Col. Las Campanas, C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro., Mexico

^b Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario Cerro de las Campanas, S/N, Col. Las Campanas, C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro., Mexico

^c Biotechnology Group, National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP), Celaya-San Miguel de Allende, km 6, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2013

Received in revised form

12 November 2013

Accepted 13 November 2013

Keywords:

Acaciella angustissima

Phenolic compounds

Antioxidant

Antimutagenic

Antimicrobial

SSH

ABSTRACT

Methanolic extracts of *Acaciella angustissima* pods (MEA) were analyzed in order to determine some biological activities such as antioxidant, antimutagenic and antimicrobial properties by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP), Kado micro-suspension assay and *in vitro* antimicrobial assays, respectively. Moreover, a transcriptomic study of Timbe grown in greenhouse conditions was also performed using subtractive suppression hybridization methodology (SSH). MEA presented significant antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP methods. The maximum concentration of MEA inhibited 80.33% and 77.39% of mutagenicity induced either by 4-nitro-O-phenylenediamine or sodium azide, respectively. MEA presented fungistatic activity against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. Moreover, a good *in vivo* protection against *P. capsici* was obtained in comparison to a commercial antifungal used toward this pathogen. Transcriptomic study displayed the expression of genes that have biological importance, such as protein TIC55, GATA transcription factor, maturase-like protein, and NAC domain protein. NAC domain protein might have some biotechnological or industrial application, because, NAC transcription factor plays an important role in responses to biotic and abiotic stress from some plants. Results suggest that Timbe might be useful in pharmaceutical, food and agro-industrial sectors.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acaciella angustissima is a specie which occurs widely from southern USA to Argentina, but most of those species occur only in Mexico, where they occupy a wide range of habitats from near sea-level to 2500 m (Rico-Arce and Bachean, 2006). The species are tolerant to a wide range of soil types, but they usually grow in shallow, calcareous, sandy, stony and well drained soils (Terrones-Rincon, 2006). There is an interest to use this specie in agroforestry systems due to its rapid grown and capacity of fixing nitrogen. Also *A. angustissima* has the ability to form islands of fertility increasing the content of soil organic matter, preventing erosion and being a refuge for flora and fauna (Rincón-Rosales and Gutiérrez, 2008). *A.*

angustissima belong to genus *Acacia*, which has been reported as a good source of phenolic compounds (Feregrino-Pérez et al., 2011). Phenolic compounds are effective preventing several diseases due to their biological activities such as antioxidants, antimutagenic, antidiabetic, anticancerigen and antiinflammatory, etc. (Feregrino-Pérez et al., 2011; Marín-Martínez et al., 2009; Veloz-García et al., 2010). In addition, they show antimicrobial, antifungal and antiviral activity that could be important in the agriculture field, because there is an rising worldwide consumer claim for organically produced food, and hence, there is also increasing interest in exploiting natural products (such as phenolic-containing extracts) that have antimicrobial activities against plant pathogens which then finally might be use in organic crop production (Veloz-García et al., 2010). It has been informed that phenolic-containing extracts from pods are a more sustainable exploiting than the traditional bark (Feregrino-Pérez et al., 2011).

On the other hand, plants grown in stress conditions, as for instance: drought, could express genes in response to this

* Corresponding author. Tel.: +52 01 442 19212 00;

fax: +52 01 442 192 12 00x6006.

E-mail address: ramon.guevara@uaq.mx (R.G. Guevara-Gonzalez).

stress (Rodríguez et al., 2005). In order to assess the differential expression of those genes in *A. angustissima*, subtractive suppression hybridization (SSH) was used. With this technique, differentially expressed genes can be identified without the need of previously cloning their complementary DNA, as well as the normalization and amplifications procedures permit isolation of the genes expressed at very low levels (Diatchenko et al., 1996). Through the study of the transcriptome of *A. angustissima* cultivated on greenhouse and open-air conditions, it will be possible to identify genes that present biological importance. Thus, the objective of this study was to carry out an assessment of the biological activities of methanolic extract of *A. angustissima* pods and a molecular study about differential gene expression to find out promising genes for industrial uses.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Timbe (*A. angustissima*) pods were collected in December 2011 from Parque Cimatario located in Queretaro 20° 31' 44" N, 100° 21' 42" O at 2379 m. Samples were deposited at Ethnobotanical Collection of Herbarium of QMEX, School of Natural Sciences, University of Querétaro.

2.2. Extracts preparation

Seed-free pods were air-dried and grounded to a 40-mesh powder (Scientific Apparatus, Philadelphia, PA, USA). Ground material was extracted with methanol by maceration and by Soxhlet (Loarca-Piña et al., 2010). The methanolic extract from *A. angustissima* (MEA) was evaporated to dryness in vacuum essentially as described (Veloz-García et al., 2010). All extracts were stored at 4 °C for further use. Quantification of total phenolic and flavonoid contents

Total phenolics of MEA were determined according to Folin-Ciocalteu colorimetric method (Dewanto et al., 2002). Dilutions of extracts (1 ml each, 1:10, 1:100, 1:1000) were oxidized with 1 N Folin-Ciocalteu reagent (250 µl). After 5 min, a 20% Na₂CO₃ solution (1.25 ml) was added to neutralize for 2 h. Absorbance was measured against a prepared blank at 760 nm. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of extract (GAE/g). Flavonoids were determined as reported Liu et al. (2002). Again, dilutions of extracts (1 ml each, 1:10, 1:100, 1:1000) were mixed with a 5% NaNO₂ solution (75 µl). After 6 min, a 10% AlCl₃·6H₂O solution (150 µl) was added, and mixture was allowed to stand for another 5 min. Then, 1 M NaOH (0.5 ml) and distilled water were added to a total volume of 2.5 ml. Solution was well mixed, and absorbance measured against a blank at 510 nm. Results were expressed as mg of (+)-catechin equivalents per g of extract (CE/g).

2.3. HPLC analysis

MEA were filtered through a 0.2 mm filter membrane and 20 µl were injected in triplicate into a reversed phase column (Zorbax Eclipse XDB-C18, 60 Å, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm), using a Waters HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) which consisted of a quaternary pump (model 600), a photodiode array (MetaChem Technologies Inc.), and a Rheodyne injector (4793). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by Millennium software program (Waters). Mobile phase was composed of solvent A (acetonitrile) and solvent B (0.0125 N acetic acid). Elution was as follows: isocratic conditions (0–2 min) with 5% A and 95% B; gradient conditions (2–5 min) starting with 5%

A and ending with 15%; gradient conditions (5–20 min) starting with 50% A and ending with 5%; and isocratic conditions (25–35 min) with 5% A and 95% B. Other parameters were: flow rate, 1 ml/min; absorbance (λ_{max}), 280 nm; and sample injected, 20 µl. Quantification was carried out by external standardization with protocatechuic, gallic, caffeic, rosmarinic, p-cumaric, acid, quercetine, naringenine, (+)-catechine, kaempferol, and rutin. Full standard curves were constructed with protocatechuic acid, gallic acid, (+)-catechin and luteoline (Feregrino-Pérez et al., 2011).

2.4. Antioxidant activity

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was performed according to the method of Loarca-Piña et al. (2010). All reactions were conducted in 96 well microplates (Nalge Nunc International, NY, USA). Aliquot (20 µl) of 80% methanolic solution at various concentrations (50, 100, 250, 500, 1000, 2500 and 5000 µg/ml of MEA) were mixed with 150 µM of DPPH (200 µl) in 80% methanol. Controls contained all reagents but extract or positive control substances [Trolox and Butylhydroxytoluene (BHT)]. After 30-min incubation at ambient temperature in darkness, absorbance was recorded at 520 nm in a Spectra Max Tunable Microplate Reader (SMTMR) (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Experiments were carried out by using a randomized design with three replications. Absorbance inhibition (%) was calculated as, Inhibition% = [(absorbance of control – absorbance of samples)/absorbance of control] × 100.

ABTS was performed using 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay as described by Dewanto et al. (2002) and then modified to be conducted in 96 well microplates (Nalge Nunc International, NY, USA). Aliquot (20 µl) of MEA (50, 100, 250, 500, 1000, 2500 and 5000 µg/ml) was mixed with previously prepared ABTS solution (230 µl). Controls contained all reagents but the extract, gallic acid or Trolox. Absorbance was recorded at 730 nm at 0 and 6 min in a SMTMR. RSA for DPPH and ABTS results were expressed as the median inhibitory concentration (IC₅₀), calculated from the log-dose inhibition curve obtained by a nonlinear regression algorithm (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA).

For FRAP values (Liu et al., 2002), 25 µl of MEA (50 µg/ml) were placed in quadruplicate in a 96 well microplate (Nalge Nunc International, NY, USA). Then freshly prepared (175 µl) and warm (37 °C) FRAP solution was added to three of the wells and the same volume of acetate buffer was added to the fourth one. Absorbance at 595 nm was monitored by a SMTMR at 0, 4, 10, 30 and 60 min. Blanks were prepared and a standard curve of FeSO₄ was obtained. Results were expressed as equivalents of FeSO₄ per g of extract at 30 min.

2.5. Mutagenicity and antimutagenicity tests

Kado microsuspension assay was used for testing mutagenic and antimutagenic activity of MEA (Kado et al., 1983, 1986). Tester strains (TA100 & TA98) of *Salmonella typhimurium* were provided by Molecular Toxicology Inc., of Bone NC (Annapolis, MD, USA). 4-Nitro-O-phenylenediamine (NOP) and sodium azide (NaN₃) were used as positive control for TA98 and TA100, respectively. For TA100 strain, 0.01 ml of NaN₃ (200 µg/ml) or 0.01 ml MEA (0.077, 0.155, 0.31, 0.625, 1.25, and 5.0 mg extract/ml) or 0.01 ml NaN₃ (200 µg/ml) + 0.01 ml MEA (0.077, 0.155, 0.31, 0.625, 1.25, and 5.0 mg extract/ml) were tested. For TA98, 0.01 ml of NOP (2 mg/ml) or 0.01 ml (0.077, 0.155, 0.31, 0.625, 1.25, and 5.0 mg extract/ml) or 0.01 ml of NOP (2 mg/ml) + 0.01 ml MEA (0.077, 0.155, 0.31, 0.625,

1.25, and 5.0 mg extract/ml) were tested. Samples were tested in triplicate for each independent experiment performed.

2.6. Antimicrobial activity

The antifungal properties of MEA was tested *in vitro* according to the poisoned-food technique by evaluating concentrations of 50, 100 and 200, 300 and 400 mg gallic acid equivalents/ml dissolved in potato dextrose agar (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) (Veloz-García et al., 2010). DMSO was used as a positive control. Three independent experiments with four replicates of each concentration were evaluated inoculating with 5 mm discs of fungus mycelium from *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*, incubated in the dark at 28 °C, and mycelia growth was measured after 7 days. The fungistatic–fungicidal nature of MEA was tested by observing revival of growth of the inhibited mycelial disk following its transfer to non-treated potato dextrose agar. In this sense, extract was classified as fungistatic if any mycelial growth was observed after 10 days. Benlate (ampule of 100 mg, active ingredient benomyl: methyl-1-butylcarbamoyl-benzimidazolecarbamato; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as control of usually fungicide used in field against *R. solani* and *F. oxysporum* (100 ppm, according to Veloz-García et al., 2010). Busan (100 ppm, active ingredient Benzothiazole 341 g/l; Pro-Agro, Jiutepec, Morelos, Mexico) was used as control for *P. capsici*. *In vivo* studies were carried out using 6 leaf-stage pepper plants (cv. Don Benito). Timbe MEA were applied every five days in the watering (5 ml of each one of the following concentrations: 300, 400 and 500 mg/ml). Plants were evaluated daily for symptoms presence.

2.7. Suppression subtractive hybridization (SSH)

2.7.1. RNA isolation

Seeds of timbe were germinated and cultured on greenhouse and open-air conditions, then were collected when reached 20 cm long. RNA extraction of leaves samples was according to the RNEASY protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). The integrity and size of RNA were analyzed by electrophoresis in agarose gels with formaldehyde. Quantification and purity were determined by means of the absorbance relation (260/280 nm).

2.7.2. Synthesis, amplification and purification of the complementary DNA (cDNA)

One microgram of total RNA from plants (problem and control) was used to synthesize the first chain of cDNA employing the Superscript II transcriptase reverse (Life Technologies, Rockville, MD, USA) according to the protocol for the synthesis of cDNA by the supplier (Clontech, Palo Alto, CA, USA). LD-PCR was carried out in order to amplify cDNA with 15, 18, 21, 24 and 27 cycles separately (Diatchenko et al., 1996). The products of the PCR reaction were analyzed by electrophoresis agarose gels 1.2% to identify the optimal number of cycles to have a suitable amount of PCR products for elaboration a cDNA library. As control, total RNA of placenta was used as recommended by the manufacturer (Clontech, High Wood, CA, USA). cDNA purification was made in CROMA-SPIN 1000 columns (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

2.7.3. SSH cDNA library

SSH technique was made using the kit of Clontech (Clontech PCR-Select TM cDNA subtraction kit, Clontech, High Wood, CA, and USA). The tester and driver cDNAs were digested with the restriction enzyme *Rsa* I. The mRNA from plants growing in greenhouse conditions were used as “testers” in the forward-subtracted cDNA library and mRNA from plants growing in open-air conditions were “testers” in the reverse-subtracted cDNA library. The tester cDNA was further subdivided into two portions, and each was ligated with

different cDNA adaptors 1 and 2. Further two hybridizations were performed: (1) in the first one, tester sample was mixed with an excess of driver, later denatured by heat and hybridized for 8 h at 68 °C (2). During the second hybridization, products derived from the first hybridization were mixed together without denaturing. Fresh denatured driver cDNA was added to further enrichment of fraction for differentially expressed sequences, and then hybridized overnight for 8 h at 68 °C. Later a PCR was done to selectively amplify the cDNA that represented differentially expressed genes. A second PCR was made with nested oligonucleotides (1R and 2R) to reduce the level of unspecific amplification (Clontech PCR-Select™ cDNA subtraction kit). The amplicons derived of the second PCR were analyzed by electrophoresis, those of 500, 750 y 1000 pb were cut from the agarose gel and purified by means of a protocol QIAEXII (Qiagen, Hilden, Germany).

2.7.4. Cloning and screening cDNA library

Two microliter of the subtracted target cDNAs were reacted with 1 µl of pcr 2.1 – TOPO according to the supplier protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Finally completed the reaction, 2 µl were transformed into 50 µl of chemically competent cells of *Escherichia coli* TOP 10. Cells were plated and incubated in Petri dishes containing Luria Bertani (LB)/kanamicine/IPTG/X-GAL, the white colonies were selected. Every white colony was cultivated in broth LB/kanamicine/ampiciline, grown to 37 °C and 250 rpm during 12 h, the plasmids were analyzed for the presence of insertions using *Eco* RI (Invitrogen, Karlovy Vary, CA, USA). Every colony with insertion was cultivated separately in the same conditions, and was stored at –80 °C.

2.8. Sequence of the cDNA and comparison with databases

The nucleotide sequences of genes (Expressed Sequence Tags, ESTs) were determined using ABI PRISM 310 (Gene Analyzer, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Sequences were analyzed first in the VecScreen and subsequently the comparison with databases was performed with the BLASTX algorithm (Altschul et al., 1990), National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.9. Statistical analyses

In all experiments, the size of samples was chosen according to previously established methodologies. For the *in vitro* antimicrobial, antimutagenic and antioxidant activities, the size of the sample and number of replicates was according to Hayashi (2005). Data were subjected to analysis of variance by the general linear models (GLM) procedure, means comparison by Tukey's test according to SAS methods (1990).

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic compounds and flavonoids

In order to find an efficient procedure to obtain phenolic compounds from timbe pods, Maceration (M) and Soxhlet (S) extraction methods were assessed, and results are shown in Table 1. Total phenolics and flavonoids, respectively, in MEA using M and S <extraction methods were found as follows: total phenolics, 88.87 (M), 99.10 (S) mg equivalent of gallic acid/g extract; and total flavonoids, 127.19 (M), 114.49 (S) mg equivalent of (+)-catechin/g extract. However, according to statistical test, the extraction methods did not affect the phenolic compounds content ($p < 0.05$).

Phenolics are present in rich amount in several plants, possessing antioxidant, antiinflammatory, antimutagenic, antimicrobial and other therapeutic properties (Falleh et al., 2008; Shalini, 2009). *A. angustissima* belong to Acacia' group that have been reported

Table 1
Phenol compounds content and antioxidant activity of methanol extract from *Acaciella angustissima* pods.

| Sample | Extraction method | Total phenols ^a | Total flavonoids ^b | ABTS ^c | DPPH ^d | FRAP ^e |
|-------------|-------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Timbe | Maceration (M) | 88.87 ± 5.65a | 127.19 ± 5.28a | 110.3 ± 1.09b | 349.1 ± 1.03b | 2.77 ± 0.08a |
| | Soxhlet (S) | 99.10 ± 7.82a | 114.49 ± 2.95a | 149.5 ± 1.09a | 364.6 ± 1.04a | 2.05 ± 0.04b |
| Gallic acid | | | | 15.39 ± 1.04d | 33.1 ± 1.03d | |
| TROLOX | | | | 43.90 ± 1.03c | 104.2 ± 1.02c | |

Results are average of three independent experiments ± SD. Different letters in each column indicated statically difference (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

^a mg of gallic acid equivalents per gram of extract (GAE/g).

^b mg of (+)-catechin equivalents per gram of extract (CE/g).

^c Half antioxidant activity (IC₅₀) expressed as $\mu\text{g/ml}$ for ABTS.

^d IC₅₀ expressed as $\mu\text{g/ml}$ for DPPH.

^e mmol FeSO₄/g extract.

to be a promising source of bioactive compounds, some species sensitize a large variety of secondary metabolites such as *Acacia pennatula*, *A. confuse*, *Acacia nilotica* (Jyh-Horng et al., 2005; Banso, 2009; Feregrino-Pérez et al., 2011).

Genus *Acacia* or *Acaciella* is a good source of natural phenolic compounds (Feregrino-Pérez et al., 2011). The flavonoids content found in this work is higher to those reported in *A. pennatula* pods (Feregrino-Pérez et al., 2011). Flavonoids are responsible of antifungal activity in crude methanolic extract, and are known to possess ability to scavenge free radicals, antimicrobial, antithrombotic, antimutagenic and anticarcinogenic activities (Feregrino-Pérez et al., 2011).

3.2. HPLC analysis

Based on comparisons of retention times and peak areas with those of standard phenolics used in both methods (Fig. 1B), only protocatechuic acid could be quantified, 197.33 (M) and 178.33 (S) $\mu\text{g/g}$, the values were significantly different. The other phenolic compounds were either absent or under limit of detection in this work.

Earlier studies in our laboratory in *A. pennatula* (acacia specie), HPLC analysis indicated the presence of gallic acid, (+)-catechin and luteoline in high concentrations (Feregrino-Pérez et al., 2011), which contrast with these results; however, taking into account the results of total phenolic and flavonoids, it could be suggested that Timbe contains other types of phenolic compounds, which were not employed as standards in HPLC analysis. However, in this study, the results of total phenolic and flavonoids were two times higher than those reported by Feregrino-Pérez et al. (2011), so further studies are needed to know the type and content of phenolic compounds that are present in *A. angustissima* pods, because MEA showed antioxidant, antimutagenicity and antimicrobial activities, as it will be discussed in next sections.

3.3. Antioxidant activity

Results of MEA with both methods (M and S), using DPPH, ABTS and FRAP assays are showed in Table 1. The values found by ABTS assay were 110.3 (M) and 149.5 (S) $\mu\text{g/g}$ and, 349.1 (M) and 364.6 (S) $\mu\text{g/g}$ were reported by DPPH assay. Scavenging of ABTS and DPPH methods, as expected, was found to be significantly higher than that of gallic acid and Trolox controls (Table 1).

FRAP, ABTS and DPPH are between the most common methods for analyze *in vitro* antioxidant activity. It is recommended that at least two methods to determine the antioxidant activity and provide comprehensive information about material in study, taking into account the pros and cons of each assay (Pérez-Jiménez et al., 2008). Methods can be divided according reaction mechanisms in HAT (quench free radicals by hydrogen donation) and SET (transfer one electron to reduce, metals, carbonyls, and radicals). ABTS

and DPPH assays use HAT and SET antioxidant mechanisms. The two mechanisms may occur at the same time but the one dominating will depend on the antioxidant structure, properties, and solubility of the compounds present in the extract as well as the partition coefficient and system solvent (Quezada and Cherian, 2012). Reducing ability of MEA for both methods was: M, 2.77 and S, 2.05 mmol FeSO₄ (FeII)/g (Table 1). FRAP uses a SET antioxidant mechanism and has been considered a reasonable screen for the ability to maintain redox status in cells or tissues. However, FRAP cannot detect compounds that act by radical quenching, especially thiols and proteins (Quezada and Cherian, 2012).

In general, the MEA showed significant antioxidant activity. In other studies with *Acacia* crude extracts have been reported results of IC₅₀ ranged at 1–500 $\mu\text{g/ml}$, which agree to this work. However, Feregrino-Pérez et al. (2011) reported values lower for *A. pennatula* pods by FRAP, which suggest a better reducing power of *A. angustissima* in this study.

3.4. Mutagenicity and antimutagenicity activities

Concentrations of CE/g from MEA tested for mutagenic activity were neither toxic nor mutagenic, because the number of revertant colonies was not significantly different ($p < 0.05$) to the number of spontaneous revertant colonies in negative control (DMSO) 100 ± 2.6 revertant colonies/plate (TA100) and (0.9% NaCl) 162 ± 2.58 revertant colonies/plate (TA98) (data not shown). MEA in TA98 showed a dose-dependent inhibition after third concentration and presented an inhibition of 3.70%, 46.74%, 63.33% and 71.73%, respectively. The maximum concentration (5 mg/ml) reached an inhibition of 80.33% (Table 2). In TA100, the same behavior was observed; the concentrations 0.31, 0.625, 1.25 mg/ml of extract presented an inhibition of 37.9, 55.62, and 63.56%, respectively. The last two concentrations (2.5 and 5.0 mg/ml) showed inhibition of 77.57% and 77.39%, respectively. The statistical test indicated that these differences were statistically significant ($p < 0.05$).

According to scientific literature, if the percent range of inhibition is 25–50%, the antimutagenic activity in sample is medium, but, when the antimutagenic activity in sample is higher than 40%, means that antimutagenic activity is strong, on the contrary if percent inhibition is lower than 25%, the antimutagenic activity in sample is negative (Entezari et al., 2009). Therefore, results indicated that MEA showed medium antimutagenic activity in concentrations 0.077, 0.155 and 0.31 mg/ml, while concentration 0.625–5 mg/ml antimutagenic activity was strong.

Previous studies in our laboratory in acacia specie (*A. pennatula*) showed slightly higher antimutagenic activity (Feregrino-Pérez et al., 2011). It has been reported the antimutagenic potential of (+)-catechin and gallic acid (Bhattacharya, 2011), and Romanova

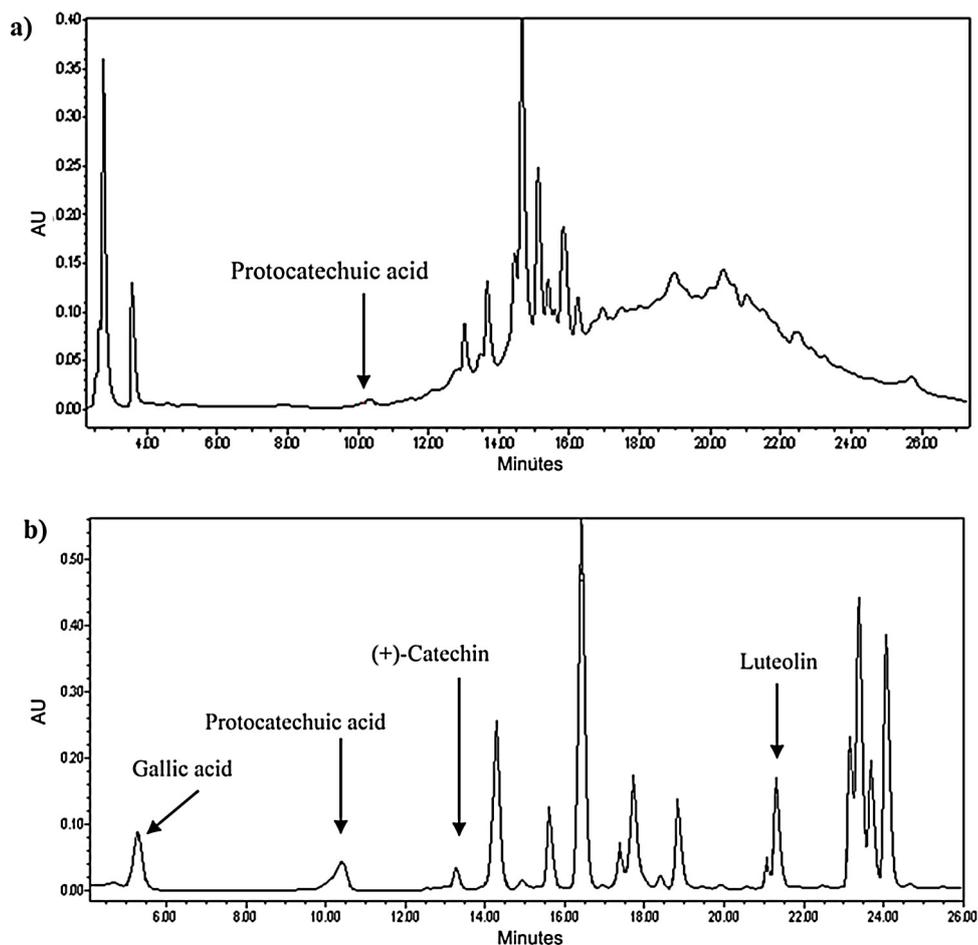


Fig. 1. Profile of compounds found in *Acaciella angustissima*: (a) HPLC separation of Timbe phenolics and (b) HPLC profile of phenolic standards (data were recorded at 280 nm).

et al. (2001) indicated that luteolin present higher antimutagenic activity than other flavonoids such as apigenin and quercetin. Nevertheless, in this work, HPLC test showed that *A. angustissima* did not contain detectable levels of gallic acid, (+)-catechin and luteolin like *A. pennatula*, which could be a contradiction. However the results of total phenolic and flavonoids content suggest the presence of other type of phenolic compounds that were not used

as standards, so it is likely to suggest that they could be responsible of this effect.

3.5. Antimicrobial activity

Table 3 shows results of antimicrobial activity. After concentration of 200 GAE/ml, methanolic extracts of pods showed

Table 2
Antimutagenic activity of methanol extract from *Acaciella angustissima* pods.

| Strain/mutagen | Dry extract mg/ml | Flavonoids ^a | No. Revertant colonies | Inhibition (%) |
|--------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| TA98/4-NOP | - | 651.0 | | |
| | 0.077 | 0.009 | 483.5a | 25.72 |
| | 0.155 | 0.019 | 492.0a | 24.42 |
| | 0.31 | 0.039 | 410.0ab | 37 |
| | 0.625 | 0.0795 | 346.67b | 46.74 |
| | 1.25 | 0.159 | 238.67c | 63.33 |
| | 2.5 | 0.318 | 184.0cd | 71.73 |
| | 5 | 0.636 | 128.0d | 80.33 |
| TA100/sodium azide | - | 761.0 | | |
| | 0.077 | 0.009 | 423.5a | 44.34 |
| | 0.155 | 0.019 | 423.5ab | 44.34 |
| | 0.31 | 0.039 | 472.5ab | 37.9 |
| | 0.625 | 0.0795 | 337.7bc | 55.62 |
| | 1.25 | 0.159 | 277.3cd | 63.56 |
| | 2.5 | 0.318 | 170.67d | 77.57 |
| | 5 | 0.636 | 172.0d | 77.39 |

Results are average of three independent experiments ± SD. Triplicate plates were tested per dose per experiment. Different letters from column indicated statistical difference (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

^a mg equivalents of (+)-catechin.

Table 3
Percentage of inhibition of mycelial growth *in vitro* against *F. oxysporum*, *R. solani* and *P. capsici* using methanolic extract from *Acaciella angustissima* pods.

| Phenolics concentration (mg GAE/ml) | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. capsici</i> | <i>R. solani</i> |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 25 | 0 ^d | 0 ^d | 0 ^d |
| 50 | 0 ^d | 0 ^d | 0 ^d |
| 100 | 0 ^d | 0 ^d | 0 ^d |
| 200 | 14.8 ^c | 0 ^d | 24.8 ^c |
| 300 | 17.9 ^b | 15.5 ^b | 47.9 ^b |
| 400 | 29.5 ^a | 28.0 ^a | 59.5 ^a |

Concentration of phenolics is expressed as mg equivalents of gallic per ml of extract (mg GAE/ml) of culture media (PDA). Results are the average of four replicates and three independent experiments. Different letters in each column mean significant difference ($p < 0.05$). Benlate 100 ppm (100 mg/ml) displayed a 100% of inhibition against *R. solani* and *F. oxysporum*; additionally, Busan (100 mg/l) displayed 100% inhibition against *P. capsici* (not shown in the table).

Table 4
Pepper mortality by *P. capsici* infections in different control treatments under climatic camera conditions.

| Treatment (mg GAE/ml) % | Plant mortality by <i>P. capsici</i> |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| 300 | 43.33b |
| 400 | 23.33bc |
| 500 | 10.033c |
| Busan ^a | 10.0c |
| Positive control ^b | 90.0a |
| Negative control ^c | 0c |

^a Busan was evaluated as chemical control normally used in field against *P. capsici* infections (100 mg/ml).

^b Positive control was plants inoculated with *P. capsici* and no chemical control used during the experiments.

^c Negative control consisted in pepper plants mock-inoculated with PDA disks without *P. capsici* colonies. Results are the mean of three different experiments using a total of 90 plants for each treatment (a total of 270 plants for each treatment).

antimicrobial activity in a dose-dependent manner against *F. oxysporum* and *R. solani*, reaching the highest activity at 400 µg GAE/ml (29.5%). In *A. angustissima* against *P. capsici* it was showed inhibition of 15.5% for 300 mg/ml of extract and the maximum concentration tested reached 28% of inhibition. *In vivo* crop protection studies were carried out with timbe MEA against the most important of these three plant pathogens, *P. capsici* in pepper plants. Our results when using 500 mg/ml MEA were similar to the ones obtained with Busan (100 mg/l), the antimicrobial commonly used in field against this pathogen (Table 4). The differences observed were statistically significant.

Different flavonoids are responsible of antifungal activity (Svetaz Tapia et al., 2004). Results indicated that *A. angustissima* phenolics displayed fungistatic activity, which suggest that these extracts were either unable or poorly absorbed by the pathogen cells and that corresponded to surface contact actions likely on several proteins, as reported for other phenolics (Veloz-García et al., 2010).

Table 5
Homology shown by 16 sequenced clones from the subtractive bank of cDNA of genes in *A. angustissima*.

| Clone no. | Gene with homology | Access number | E-value |
|-------------|---|----------------|----------|
| 1/1 1000 27 | hypothetical protein PGTDC60.1755 [<i>Porphyromonas gingivalis</i> TDC60] | YP_004510470.1 | 3.00E-08 |
| 1/1 750 19a | predicted protein [<i>Nematostella vectensis</i>] | XP_001636168.1 | 2.00E-04 |
| 2/1 750 2a | predicted protein [<i>Nematostella vectensis</i>] | XP_001637654.1 | 3.00E-08 |
| 1/1 1000 38 | NAC domain protein [<i>Medicago truncatula</i>] | XP_003608762.1 | 2.00E-04 |
| 1/1 1000 42 | PREDICTED: GATA transcription factor 12-like [<i>Glycine max</i>] | XP_003550120.1 | 3.00E-05 |
| 1/1 1000 52 | Protein TIC 55, chloroplastic [<i>Pisum sativum</i>] | O49931.1 | 7.00E-4 |
| 1/1 1000 54 | LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA [<i>Medicago truncatula</i>] | XP_003588942.1 | 4.00E-05 |
| 2/1 500 35 | hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i>] | WP_001231514.1 | 3.00E-05 |
| 1/1 500 9 | hypothetical protein PCYB.012290 [<i>Plasmodium cynomolgi</i> strain B] | XP_004220783.1 | 9.00E-3 |
| 1/1 1000 55 | maturase-like protein, partial (chloroplast) [<i>Fabaceae</i> environmental sample] | AFM08410.1 | 1.20E-2 |

3.6. Differential gene expression

Suppression subtractive hybridization (SSH) method allowed obtaining two cDNA libraries, containing 100 genes (ESTs) differentially expressed in each condition (greenhouse and open-air conditions). 51 clones were sequenced (14 represent transcriptomic profile of greenhouse condition and 35 represent open-air condition). Sequences were analyzed in Blastx algorithm in order to search those genes that present biological/industrial interest.

The proteins found in NCBI database were classified as predicted, hypothetical, functional, and unknown proteins. Functional proteins presented the highest percentage, 38%, while 36%, 24% and 16% belonged to unknown, hypothetical and predicted proteins, respectively (data not shown). Table 5 shows the homologies of found genes that presented a significant E-value and others that were found constantly such as maturase-like protein from chloroplast and GATA transcription factor 12-like, both from *Fabaceae* family; also, there were found other genes that belong to *Fabaceae* family and presented significant E-value (Table 5).

The SSH study showed the presence of the protein TIC 55. According to literature, that protein belongs to the redox regulon consisting of TIC32, TIC55 and TIC62. The redox regulon is involved in regulation of protein import *via* metabolic redox status of the chloroplast (Kovács-Bogdán et al., 2010).

GATA transcription factors are a protein family that has the characteristic of binding to DNA sequence "GATA" (Ko and Engel, 1993). In this study, it was found a gene with homology to the transcription factor GATA 12-like from *Glycine max* (soybean), but it is unknown its function. Other members of GATA family have been characterized in plants, for example, GNC (nitrate-inducible carbon-metabolism-involved) and CGA1 (cytokinin-responsive GATA1) (Chiang et al., 2012). GNC and CGA1 are master transcriptional regulators of chloroplast biogenesis, acting downstream of cytokinin and mediating the development of chloroplast from proplastids and enhancing chloroplast growth and division in specific tissues (Chiang et al., 2012).

Maturase-like protein from chloroplast was a sequence found often. That protein is encoded by the *matk* gene, which is assumed to be the splicing factor for group II introns in the chloroplast genome (Hirao et al., 2009). Although the maturase function of *Matk* is not clearly understood, in white barley its maturase-like function is indirectly associated with the mutant *albostrians*, which has a chloroplast ribosome deficiency that results in the loss of all chloroplast-encoded proteins including *Matk*. The group II intron-containing precursor transcripts of *trnK*, *trnA*, *trnI*, *rps12*, and *atpF* remain unspliced in *albostrians* plastids (Hirao et al., 2009). Barthet and Hilu (2007) suggested that *Matk* has an essential function as a posttranscriptional splicing factor at a particular developmental stage, and thus its function indirectly contributes to photosynthetic competency of the chloroplast (Hirao et al., 2009).

This study allowed finding a gene with homology to transcription factor named NAC domain protein. NAC proteins share a

common structure consisting of a conserved N-terminal region (the NAC domain) and a highly variable C terminus. The name is derived from three type members, no apical meristem (NAM) from petunia (*Petunia hybrida*) and the ATAF and cup-shaped cotyledon (CUC) genes from *Arabidopsis thaliana*. NACs possess roles as diverse as pattern formation in embryos, flower development, leaf senescence and auxin-dependent lateral foot formation (Selth et al., 2005). In addition to these developmental roles, NAC transcription factors play an important role in responses to biotic and abiotic stresses (Wang et al., 2013). Wang et al. (2013) isolated successfully a stress responsive gene from *Populus euphratica*, a salt-tolerant tree species growing in semi-arid saline areas, and named it PeNAC1, which encoded a protein containing a conserved NAC domain that belonged to the ATAF subgroup of the NAC protein family. Using Northern hybridization, Wang et al. (2013) showed that its expression was strongly induced by drought and salt stress in *P. euphratica*. Transgenic *Arabidopsis* overexpressing PeNAC1 showed enhanced tolerance to salt stress, with lower Na(+)/K(+) in the roots and leaves, and significantly inhibited expression levels of AtHKT1. The authors suggested that PeNAC1 plays a role in the plant response to salt stress by regulating Na(+)/K(+) homeostasis.

4. Conclusion

Methanolic extracts of *A. angustissima* pods displayed biological activity such as antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activity, which could be related to their phenolic compounds content; thus, these results suggest a potential use of *A. angustissima* pods in different industrial areas. SSH method showed the presence of genes with homology to NAC domain protein, maturase-like protein from chloroplast, GATA transcription factor-12 like and protein TIC55. These genes might have biological importance or they might be useful in biotechnological or industrial applications, mainly NAC domain protein, however, more studies are necessary in order to understand better its biological activity in *A. angustissima*.

Acknowledgments

Authors thank to FORDECYT (2012-02; clave 193512), FOMIX-Qro 2012, PROMEP and FOFI-UAQ 2012 for support provided of this research. L.B. Marcela Vargas-Hernández and Perla Munguía-Fragozo, also thank CONACYT for a grant provided.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Banso, A., 2009. Phytochemical and antibacterial investigation of bark extracts of *Acacia nilotica*. *J. Med. Plants Res.* 3, 082–085.
- Barthet, M.M., Hilu, K.W., 2007. Expression of matK: functional and evolutionary implications. *Am. J. Bot.* 94, 1402–1412.
- Bhattacharya, S., 2011. Natural antimutagens: a review. *J. Med. Plant Res.* 5, 116–126.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Liu, R., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010–3014.
- Chiang, Y.H., Zubo, Y.O., Tapken, W., Jung Kim, H., Lavanway, A.M., Howard, L., Pilon, M., Kieber, J.J., Schaller, G.E., 2012. Functional characterization of the GATA transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 332–348.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6025–6030.
- Entezari, M., Majd, A., Falahian, F., Mehrabian, S., Hashemi, M., Lajimi, A., 2009. Antimutagenicity and anticancer effects of citrus medica fruit juice. *Acta Med. Iran.* 47, 373–377.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourouai, N., Trabelsi, N., 2008. Phenolic composition of *Cyanara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331, 371–379.
- Feregrino-Pérez, A.A., Torres-Pacheco, I., Vargas-Hernández, M., Munguía-Fragozo, P., Loarca-Piña, V., Mendoza-Díaz, G.F., Ocampo-Velázquez, S.O., Rico-García, R.V., Guevara-González, E.R.G., 2011. Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *J. Sci. Ind. Res.* 70, 859–864.
- Hayashi, Y., 2005. Designing in vitro assay systems for hazard characterization. Basic strategies and related technical issues. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 227–232.
- Hirao, T., Watanabe, A., Kurita, M., Kondo, T., Takata, K., 2009. A frameshift mutation of the chloroplast *matK* coding region is associated with chlorophyll deficiency in the *Cryptomeria japonica* virescent mutant wogon-sugi. *Curr. Genet.* 55, 311–321.
- Jyh-Hong, W., Yu-Tang, T., Sheng-Yang, W., Lie-Fen, S., Yueh-Hsiung, K., Shang-Tzen, C., 2005. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confuse*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5917–5921.
- Kado, N.Y., Langley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25–32.
- Kado, N.Y., Guirgis, G.N., Flessel, C.P., Chan, R.C., Chang, K., Wesolowski, J.J., 1986. Mutagenicity of fine (<2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micropreincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.* 8, 53–56.
- Ko, L.J., Engel, J.D., 1993. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4011–4022.
- Kovács-Bogdán, E., Soll, J., Bölter, B., 2010. Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 740–747.
- Liu, M., Qi, X., Weber, C., Yong, C., Brown, J., Hai, R., 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2926–2930.
- Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramón-Gómez, M., Reynoso, R., 2010. Antioxidant, antimutagenic and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidioscolus chayamansa*. *J. Food Sci.* 75, 68–72.
- Marín-Martínez, R., Veloz-García, R., Veloz-Rodríguez, R., Guzmán-Maldonado, S., Loarca-Piña, G., Cardador-Martínez, A., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., Torres-Pacheco, I., Pérez, C., Herrera-Hernández, G., Villaseñor-Ortega, F., González-Chavira, M., Guevara-González, R., 2009. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. *Bioresour. Technol.* 100, 434–439.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* 41, 274–285.
- Quezada, N., Cherian, G., 2012. Lipid characterization and antioxidant status of the seeds and meals of *Camelina sativa* and flax. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 974–982.
- Rico-Arce, M.L., Bachean, S., 2006. A taxonomic revision of *Acaciella* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*). *An. Jardín Bot. Madrid* 63, 189–244.
- Rincón-Rosales, R., Gutiérrez, F.A., 2008. Características biológicas de *Acaciella angustissima* (mill.) Britton & Rose en su habitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México/Biological characteristics of *Acaciella angustissima* (mill.) Britton & Rose in its natural habitat and assessment of its bark potential in Chiapas, México. *Agrociencia* 42, 129–137.
- Rodríguez, M., Canales, E., Borrás-Hidalgo, O., 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnol. Appl.* 22, 1–10.
- Romanova, V., Vachálková, A., Cipák, L., Ovesná, Z., Rauko, P., 2001. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma* 48, 104–107.
- SAS Institute, Inc., 1990. SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W., Rezaiana, M.A., 2005. A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell* 17, 311–325.
- Shalini, S.R., 2009. Antifungal activity screening and HPLC analysis of crude extracts from *Tectona grandis*, *Shilpa jiti*, *Valeriana wallachi*. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 8, 218–229.
- Svetaz Tapia, A., Loá-Pez, S.N., Furlaá, R.L.E., Petenatti, E., 2004. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3297–3300.
- Terrones-Rincon, R., 2006. Arbustivas nativas de uso multiple. *Agricultural and Livestock Research (INIFAP)*, National Institute of Forestry, pp. 145–184.
- Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, F., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Anaya-López, J.L., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A.A., Loarca-Piña, G., Guevara-González, R.G., 2010. Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Ind. Crops Prod.* 31, 134–138.
- Wang, J.Y., Wang, J.P., He, Y., 2013. A *Populus euphratica* NAC protein regulating Na(+)/K(+) homeostasis improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 521, 265–273.