

Oreto Fayos Avellán

Desarrollo y aplicación de técnicas
analíticas y biotecnológicas para el
estudio de compuestos
nutracéuticos en pimiento
(*Capsicum* spp.) y cebolla (*Allium*
cepa L.)

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

GARCES CLAVER, ANA
MALLOR GIMÉNEZ, CRISTINA

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE TÉCNICAS
ANALÍTICAS Y BIOTECNOLÓGICAS PARA EL
ESTUDIO DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS EN
PIMIENTO (CAPSICUM SPP.) Y CEBOLLA (ALLIUM
CEPA L.)

Autor

Oreto Fayos Avellán

Director/es

GARCES CLAVER, ANA
MALLOR GIMÉNEZ, CRISTINA

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2019



**Universidad
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE TÉCNICAS
ANALÍTICAS Y BIOTECNOLÓGICAS PARA EL
ESTUDIO DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS EN
PIMIENTO (*Capsicum spp.*) Y CEBOLLA (*Allium cepa* L.)**

Memoria presentada por **Oreto Fayos Avellán**, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.
Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

Directoras

Dra. Ana Garcés Claver
Dra. Cristina Mallor Giménez

Tutora

Dra. María Luisa Peleato Sánchez

Zaragoza, octubre del 2018

Tesis Doctoral realizada en la Unidad de Hortofruticultura del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).



RELACIÓN DE PUBLICACIONES

La presente tesis doctoral se presenta en la modalidad de compendio de publicaciones, siguiendo la normativa establecida en el Título IV, Capítulo II del acuerdo del 17 de diciembre de 2008 aprobado por el Consejo de Gobierno de la Universidad de Zaragoza. A continuación, se muestra la relación de los trabajos que forman el cuerpo de la presente tesis doctoral:

1. Fayos Oreto, Mallor Cristina, Garcés-Claver Ana. Evolución del conocimiento sobre la pungencia de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del pimiento (*Capsicum* spp.): desde sus orígenes hasta el potencial nutracéutico actual. *ITEA*, (2018), 114(2): 99-118.
2. Fayos Oreto, de Aguiar Ana C, Jiménez-Cantizano Ana, Ferreiro-González Marta, Garcés-Claver Ana, Martínez Julián, Mallor Cristina, Ruíz-Rodríguez Ana, Palma Miguel, Barroso Carmelo G, Barbero Gerardo F. Ontogenetic variation of individual and total capsaicinoids in Malagueta peppers (*Capsicum frutescens*) during fruit maturation. *Molecules*, (2017), 22(5): 736.
3. Fayos Oreto, Barbero Gerardo F, Savirón María, Orduna Jesús, Durán Alexandra G, Palma Miguel, Molinillo José MG, Macías Francisco A, Barroso Carmelo G, Mallor Cristina, Garcés-Claver Ana. Synthesis of (±)-3, 4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF). *Open Chemistry*, (2018), 16: 87-94.
4. Fayos Oreto, Savirón María, Orduna Jesús, Barbero Gerardo F, Mallor Cristina, Garcés-Claver Ana. Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF). *Food chemistry*, (2019), 270: 264-272.
5. Fayos Oreto, Vallés María Pilar, Garcés-Claver Ana, Mallor Cristina, Castillo Ana María. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. *Frontiers in Plant Science*, (2015), 6: 384.

Oreto Fayos Avellán, con D.N.I. 20831811K

Expone:

Siendo la primera autora del artículo titulado “Evolución del conocimiento sobre la pungencia de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del pimiento (*Capsicum* spp.): desde sus orígenes hasta el potencial nutracéutico actual”, afirmo haber contribuido en todo el proceso de elaboración de este trabajo de investigación, incluyendo la redacción y corrección del manuscrito. Además, siendo el único autor de este artículo no poseedor del título de Doctor, este trabajo de investigación no formará parte de ninguna otra tesis en modalidad de compendio de publicaciones.

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo.: **Oreto Fayos Avellán**

Oreto Fayos Avellán, con D.N.I. 20831811K

Expone:

Siendo la primera autora del artículo titulado: “Ontogenetic variation of individual and total capsaicinoids in Malagueta peppers (*Capsicum frutescens*) during fruit maturation.”, afirmo haber contribuido en todo el proceso de elaboración de este trabajo de investigación, incluyendo la redacción y corrección del manuscrito. Además, siendo el único autor de este artículo no poseedor del título de Doctor, este trabajo de investigación no formará parte de ninguna otra tesis en modalidad de compendio de publicaciones.

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo.: **Oreto Fayos Avellán**

Oreto Fayos Avellán, con D.N.I. 20831811K

Expone:

Siendo la primera autora del artículo titulado “Synthesis of ($\pm$)-3, 4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF)”, afirmo haber contribuido en todo el proceso de elaboración de este trabajo de investigación, incluyendo la redacción y corrección del manuscrito. Además, siendo el único autor de este artículo no poseedor del título de Doctor, este trabajo de investigación no formará parte de ninguna otra tesis en modalidad de compendio de publicaciones.

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo.: **Oreto Fayos Avellán**

Oreto Fayos Avellán, con D.N.I. 20831811K

Expone:

Siendo la primera autora del artículo titulado “Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF)”, afirmo haber contribuido en todo el proceso de elaboración de este trabajo de investigación, incluyendo la redacción y corrección del manuscrito. Además, siendo el único autor de este artículo no poseedor del título de Doctor, este trabajo de investigación no formará parte de ninguna otra tesis en modalidad de compendio de publicaciones.

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo.: **Oreto Fayos Avellán**

Oreto Fayos Avellán, con D.N.I. 20831811K

Expone:

Siendo la primera autora del artículo titulado: “Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling”, afirmo haber contribuido en todo el proceso de elaboración de este trabajo de investigación, incluyendo la redacción y corrección del manuscrito. Además, siendo el único autor de este artículo no poseedor del título de Doctor, este trabajo de investigación no formará parte de ninguna otra tesis en modalidad de compendio de publicaciones.

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo.: **Oreto Fayos Avellán**

INFORME Y AUTORIZACIÓN DE LAS DIRECTORAS

La Dra. **Ana Garcés-Claver** y la Dra. **Cristina Mallor Giménez**, ambas investigadoras de la Unidad de Hortofruticultura del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA),

HACEN CONSTAR:

Que Dña. **Oreto Fayos Avellán** ha realizado bajo nuestra dirección, en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, el trabajo que presenta en esta memoria con el título “**Desarrollo y aplicación de técnicas analíticas y biotecnológicas para el estudio de compuestos nutraceuticos en pimiento (*Capsicum* spp.) y cebolla (*Allium cepa* L.)**”, para optar al Grado de Doctor, dentro del Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular, por la Universidad de Zaragoza.

Y autorizan la presentación de la misma para su defensa como compendio de publicaciones.

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo.: **Ana Garcés Claver**

Fdo.: **Cristina Mallor Giménez**

Dña. **María Luisa Peleato Sánchez**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

HACE CONSTAR:

Que Dña. **Oreto Fayos Avellán** ha realizado bajo mi tutela el trabajo que presenta en esta memoria con el título “**Desarrollo y aplicación de técnicas analíticas y biotecnológicas para el estudio de compuestos nutraceuticos en pimiento y cebolla**”, para optar al grado de Doctor, dentro del Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular, por la Universidad de Zaragoza, habiéndose realizado la investigación en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón bajo la dirección de la Dra. Ana Garcés-Claver y la Dra. Cristina Mallor Giménez.

Y para que conste a los efectos oportunos expido la presente autorización

En Zaragoza, a 16 de octubre del 2018

Fdo. Oreto Fayos Avellán

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Ana Garcés Claver y Cristina Mallor Giménez por su excelente labor de dirección, por su ayuda y dedicación constante en la realización de este trabajo y por haber confiado en mí para realizar esta tesis.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por financiar los proyectos de investigación, RTA2011-00118-C02-01 y RTA2015-00042-C02-01, que me han permitido llevar a cabo los experimentos de esta tesis y por concederme la beca predoctoral FPI que me ha permitido realizar este trabajo. Al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) por haberme permitido llevar a cabo en sus instalaciones todos los trabajos relacionados con esta tesis.

A las Dras. Ana María Castillo y María Pilar Vallés de la Estación Experimental de Aula Dei, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC) por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio, por enseñarme cada día cosas nuevas, por su ayuda y dedicación.

Al Dr. Jesús Orduna y la Dra. María Savirón del Servicio de Masas del Centro de Química y Materiales de Aragón (ICMA-CEQMA) de la Universidad de Zaragoza, por su apoyo, colaboración y asesoría, así como, facilitarme poder llevar a cabo los análisis en su laboratorio.

Al Dr. Gerardo Fernández Barbero de la Universidad de Cádiz por todo su apoyo y dedicación, por estar pendiente de mí cada día y confiar en mis posibilidades.

A la Dra. María Luisa Peleato por toda su labor como tutora de esta tesis.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega, investigador del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio – Cinvestav, Irapuato) por permitirme la estancia en su laboratorio y compartir sus conocimientos.

A todo el personal de la Unidad de Hortofruticultura por su buena acogida y relación durante estos años de trabajo, en especial a Elisa Fuertes y a Rita Navarro, por su ayuda incondicional, por su cariño y por enseñarme lo que vale un pimiento!!

A Beatriz Bielsa, por toda su ayuda y apoyo en los momentos difíciles, pero también por las risas y los buenos momentos.

A mis amig@s por los buenos momentos y los ánimos que me dais.

A mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano y a Sofía por el cariño y el apoyo incondicional

A Pablo, por ayudarme, quererme y aguantarme en los momentos críticos de la tesis.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Origen y domesticación del pimiento y la cebolla	3
1.2 Taxonomía y descripción botánica	4
1.2.1 <i>El pimiento</i>	4
1.2.2 <i>La cebolla</i>	6
1.3 El potencial nutraceutico del picante: desde la medicina tradicional al interés actual	8
1.3.1 <i>Propiedades saludables de CTOs/CAPS</i>	9
1.3.2 <i>Propiedades saludables de los SCs</i>	10
1.4 Importancia económica	11
1.5 Justificación	11
1.6 Objetivos	15
1.7 Tareas y aportaciones del doctorando	17

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA	21
2.1 Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de CTOs y CAPs en frutos de pimiento (<i>Capsicum</i> spp.)	21
2.1.1 <i>Compuestos químicos: síntesis de estándares de CTOs</i>	21
2.1.2 <i>Material vegetal</i>	24
2.1.3 <i>Extracción de CAPs y CTOs</i>	25
2.1.3.1 <i>Extracción de CAPs mediante ultrasonidos</i>	25
2.1.3.2 <i>Optimización del procedimiento de extracción de CTOs</i>	26
2.1.3.3 <i>Extracción de CTOs en frutos de pimiento (<i>Capsicum</i> spp.)</i>	27
2.1.4 <i>Métodos de análisis de CAPs y CTOs</i>	27
2.1.4.1 <i>Determinación de CAPs en frutos de pimiento 'Malagueta' mediante UHPLC-FL</i>	27
2.1.4.2 <i>Desarrollo y validación del método analítico HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) para la determinación de CTOs en frutos de pimiento (<i>Capsicum</i> spp.)</i>	29
2.2 Desarrollo de técnicas biotecnológicas en la determinación de la pungencia en cebolla (<i>A. cepa</i>)	31
2.2.1 <i>Material vegetal</i>	31
2.2.2 <i>Obtención de plantas dobles haploides de cebolla mediante ginogénesis in vitro</i>	32

CAPÍTULO 3. EVOLUCIÓN DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA PUNGENCIA DE LA CEBOLLA (*Allium cepa* L.) Y DEL PIMIENTO (*Capsicum* spp.): DESDE SUS ORÍGENES HASTA EL POTENCIAL NUTRACÉUTICO ACTUAL.

35

<u>CAPÍTULO 4. ONTOGENETIC VARIATION OF INDIVIDUAL AND TOTAL CAPSAICINOIDS IN MALAGUETA PEPPERS (<i>CAPSICUM FRUTESCENS</i>) DURING FRUIT MATURATION</u>	59
<u>CAPÍTULO 5. SYNTHESIS OF (±)-3, 4-DIMETHOXYBENZYL-4-METHYLOCTANOATE AS A NOVEL INTERNAL STANDARD FOR CAPSINOID DETERMINATION BY HPLC-ESI-MS/MS (QTOF).</u>	75
<u>CAPÍTULO 6. QUANTITATION OF CAPSIATE AND DIHYDROCPSIATE AND TENTATIVE IDENTIFICATION OF MINOR CAPSINOIDS IN PEPPER FRUITS (<i>Capsicum</i> spp.) BY HPLC-ESI-MS/MS (QTOF).</u>	89
<u>CAPÍTULO 7. DOUBLED HAPLOID PRODUCTION FROM SPANISH ONION (<i>Allium cepa</i> L.) GERMPLASM: EMBRYOGENESIS INDUCTION, PLANT REGENERATION AND CHROMOSOME DOUBLING</u>	109
<u>CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN GENERAL</u>	
DISCUSIÓN GENERAL	127
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139

RESUMEN

El pimiento (*Capsicum* spp.) y la cebolla (*Allium cepa* L.) son dos de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, tanto en producción como en superficie cultivada. Ambas especies han sido utilizadas durante miles de años por sus propiedades medicinales y terapéuticas. En la actualidad, estas propiedades nutraceuticas se atribuyen, en gran parte, a los compuestos responsables del picor en ambas especies; los capsinoides (CAPs) y capsinoides (CTOs) en pimiento y los sulfóxidos de cisteína (SCs) en cebolla.

El objetivo general de la tesis trató el carácter picante en el pimiento y en la cebolla según dos estrategias distintas; por una parte, la determinación y cuantificación de CAPs y CTOs mediante el desarrollo y la aplicación de métodos analíticos en pimiento y, por otra parte, la obtención de plantas dobles haploides de cebolla mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas, necesarias para el futuro desarrollo de poblaciones en las que identificar genes o regiones del genoma involucradas en la biosíntesis de los SCs.

Así, en este trabajo, se estudió la variación ontogenética del contenido total e individual de CAPs durante el desarrollo de los frutos del pimiento ‘Malagueta’ (*C. frutescens*). Los extractos de CAPs se obtuvieron por extracción asistida por ultrasonidos y se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC) acoplada a un detector de fluorescencia. La identificación de los 5 CAPs, capsicina dihidrocapsicina, nordihidrocapsicina, homocapsicina y homodihidrocapsicina se realizó por espectrometría de masas (MS). El perfil de CAPs individuales junto con el patrón de acumulación de CAPs totales han aportado información sobre la evolución de la biosíntesis de los CAPs, específica para cada variedad de pimiento.

En cuanto a la determinación de CTOs, por primera vez, se desarrolló y validó, un método de HPLC acoplada mediante una fuente de ionización por electrospray (ESI) a un detector de (MS) de alta resolución de tipo cuádruplo de tiempo de vuelo (Q-TOF), para la cuantificación de los CTOs mayoritarios, capsiato y dihidrocapsiato. Para el desarrollo y la validación de este método [HPLC-ESI-MS(QTOF)] fue necesaria la síntesis de un compuesto análogo (no natural) a los CTOs para su utilización como estándar interno [(±)-DMBO], ya que hasta el momento no se disponía de un compuesto que reuniera las características idóneas para ser un estándar interno que permitiera la cuantificación de los CTOs. La separación cromatográfica se realizó en fase reversa empleando un gradiente de metanol y agua, y permitió la separación de los 13 estándares

de CTOs de que se dispone. Para ambos compuestos, los límites de detección fueron de 0,02 μM y los de cuantificación de 0,05 μM , límites por debajo de los que hasta el momento había descritos. La aplicación de este método permitió la cuantificación de capsiato y dihidrocapsiato en diferentes genotipos de *Capsicum*. Además, los experimentos de ESI-MS/MS(QTOF) permitieron la determinación de dos nuevos CTOs, hasta ahora no identificados en frutos de pimiento. La aplicación de esta metodología para la determinación conjunta de CAPs y CTOs facilitará la determinación de estos compuestos en las distintas variedades de pimiento y asistirá a los mejoradores en la selección de variedades con perfiles de picor determinados.

En cebolla, la obtención de plantas haploides y su posterior duplicación del cromosoma es la única manera efectiva de obtener líneas parentales totalmente homocigotas con las que desarrollar poblaciones de mejora para el estudio de los genes o regiones del genoma involucradas en la biosíntesis de los SCs. La inducción de la ginogénesis mediante el cultivo *in vitro* de flores enteras es la técnica más eficaz y menos laboriosa para la inducción de la embriogénesis. En esta tesis doctoral se evaluó la capacidad de inducción de la ginogénesis de germoplasma de cebolla de origen español, ensayando diferentes medios de cultivo, reguladores de crecimiento, contenedores y tratamientos de duplicación. La combinación de reguladores de crecimiento del protocolo de dos pasos, el intercambio de gases favorecido por los contenedores Eco2box y la aplicación de 25 μM en medio sólido durante 24 h, produjeron el mayor número de plantas dobles haploides de cebolla. Además, se demostró que la embriogénesis somática a partir del cultivo *in vitro* de flores de plantas haploides y mixoploides es una técnica exitosa para la duplicación de cromosomas y, por consiguiente, para la producción de plantas dobles haploides.

ABSTRACT

Pepper (*Capsicum* spp.) and onion (*Allium cepa* L.) are two of the most important cultivars worldwide, in yield as well as in cultivated area. Both species have been used for thousands of years for its medical and therapeutic properties. Currently, these nutraceutical properties, are attributed mostly to the compounds responsible of pungency in both species; the capsaicinoids (CAPs) and capsinoids (CTOs) in pepper and the S-alk(en)yl cysteine sulfoxide (SCs) in onion.

The main objective of the thesis is focused on the pungency attribute of pepper and onion from two different strategies; on one side, the determination and quantification of CAPs and CTOs through the development and application of analytic methods in pepper, and on the other side, the production of double haploid onion plants, through the application of biotechnological techniques, necessary for the future development of inbred lines in which to identify genes or genome regions involved in the biosynthesis of the SCs.

Therefore, in this thesis, was studied the ontogenetic variation of the full and individual content of CAPSs during the development of ‘Malagueta’ (*C. frutescens*) pepper fruits. The CAPs extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction, and were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), coupled to a fluorescence detector. The identification of the 5 CAPSs, capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin and homodihydrocapsaicin was performed by mass spectrometry (MS). The individual CAPs profile, together with the accumulation pattern of total CAPs, has contributed to add information about the evolution of the CAPs biosynthesis, and they are unique for each pepper cultivar.

Regarding the CTOs determination, for the first time, was developed and validated, a high performance liquid chromatography (HPLC) method, coupled to a quadrupole/ time-of-flight mass spectrometer combined with an electrospray ionization source (ESI) for the quantification of capsate and dihydrocapsate. For the development and validation of the [HPLC-ESI-MS(QTOF)] method, was necessary the synthesis of an analogue (non- natural) compound to the CTOs, for its utilization as internal standard [(±)-DMBO], since until that moment, no suitable compound, gathering the optimal characteristics to be an internal standard, allowing the quantification of CTOs, was available. The chromatographic separation was performed in reversed phase, using a

gradient of methanol and water, which allowed the separation of the 13 CTOs available standards. For both compounds, the limit of detection was 0,02 μM and the limit quantification was 0,05 μM , limits below any previous description. The application of this method allowed the capsiate and dihydrocapsiate quantification of different *Capsicum* cultivars. Furthermore, the ESI-MS/MS(QTOF) experiments, allowed the determination of two new CTOs, never identified before in pepper fruit cultivars. The application of this methodology for the joint determination of CAPs and CTOs, will facilitate the determination of these compounds in the different pepper cultivars and will assist the breeders to manipulate capsinoid profiles more effectively.

In onion cultivars, the production of haploid plants for its following chromosome duplication, is the only effective way to obtain totally homozygous pure inbred lines, with which develop inbred lines for the gene study or identify genome regions involved in the SCs biosynthesis. The gynogenesis induction, through the *in vitro* cultivation of whole flower buds, is the most effective and less laborious technique for the embryogenesis induction. In this doctoral thesis was evaluated the capacity of gynogenesis induction of Spanish onion germplasm, assaying different culture media, growth regulators, containers and duplication techniques. The combination of growth regulators from the two-step protocol, together with the gas exchange favored by the ECO2box containers and the application of 25 μM in solid media for 24 hours, produced the greatest number of double haploid onion plants. Furthermore, was proved that the somatic embryogenesis from the *in vitro* of flower buds from haploid and mixoploid plants is a successful technique for chromosome duplication, and therefore, for the production of double haploid plants.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen y domesticación del pimiento y la cebolla

El pimiento fue uno de los primeros cultivos en domesticarse en el continente americano, hace aproximadamente unos 10.000 años. El origen más probable se sitúa en las regiones áridas de las montañas de los Andes, entre Perú y Bolivia, extendiéndose posteriormente hasta las regiones tropicales de tierras bajas de América (Aguilar-Meléndez y col., 2009). En diferentes sitios arqueológicos, distribuidos desde México y las Bahamas hasta Perú, se han encontrado restos de semillas de pimiento, confirmándose el uso de chiles silvestres como fuente de alimento posiblemente desde 8.000 años a.C. La evidencia más antigua de su domesticación fue encontrada en una cueva en el valle de Tehuacán, al centro-sur de México, datada en aproximadamente 5.000 – 6.000 años a.C. La importancia del cultivo de pimiento en tiempos precolombinos se puso de manifiesto en los escritos de los cronistas españoles en el siglo XVI. Un ejemplo son los escritos de Fray Bernardino de Sahagún sobre la gran diversidad de tipos de pimientos: verdes picantes, ahumados, carnosos y crujientes, pequeños, puntiagudos, picantes, aromáticos, etc., que podían encontrarse en los mercados aztecas de la época. El pimiento fue traído a Europa a través de los viajes de Colón y posteriormente se expandió, por las rutas de España y Portugal, hacia África, India, China, Japón y Corea, donde fue rápidamente incorporado a las cocinas tradicionales de dichas regiones (Aguilar-Melendez y col., 2009; Bosland y Votava, 2012).

La cebolla pertenece al género *Allium*. Este género está ampliamente extendido por las zonas cálidas, templadas y boreales, montañosas y tropicales del hemisferio norte, a excepción de la especie *A. dregeanum* Kth. la cual fue descrita, en Sudáfrica, en el hemisferio sur (Brewster, 2008). La cebolla ha sido cultivada desde hace más de 4.700 años, siendo probablemente domesticada en las regiones montañosas de Turkmenistán y norte de Irán, por la civilización Sumeria. En consecuencia, el principal centro de diversidad de la cebolla se sitúa al Sudeste Asiático y otras regiones como la cuenca del Mediterráneo son consideradas centros secundarios. Las primeras evidencias arqueológicas del cultivo de cebolla aparecen, en forma de grabados, en las paredes de las tumbas de las pirámides de los faraones de la tercera y cuarta dinastía del Imperio Antiguo (2.700 a.C.), evidenciando su importancia en la dieta de los egipcios. Durante los imperios griego y romano era común el cultivo de cebolla en jardines por sus

propiedades medicinales, expandiendo su cultivo desde el norte de los Alpes al oeste y centro de Europa. Además, la cebolla fue de los primeros cultivos que se llevaron desde Europa hacia América, empezando por los viajes de Colón en el Caribe hasta el siglo XVII en el que se exportaron hacia el norte de América. Finalmente, a lo largo del siglo XIX la cebolla se exportó desde Europa hacia el este de Asia, donde otras especies de cebolletas como *A. fistulosum* eran más comunes en la gastronomía popular (Fritsch y Friesen, 2002; Brewster, 2008).

1.2 Taxonomía y descripción botánica

1.2.1 El pimiento

El pimiento pertenece al género *Capsicum* spp., el cual se incluye junto con la patata, el tomate, la berenjena o el tabaco dentro de la familia de las Solanáceas. Actualmente, la clasificación taxonómica del pimiento es la siguiente: reino *Plantae*; división *Magnoliophyta*; clase *Magnoliopsida*; subclase *Asteridae*; orden *Solanales*; familia *Solanaceae*; subfamilia *Solanoideae*; tribu *Capsiceae*; subtribu *Capsicinae* y género *Capsicum* spp. (Bosland y Votava, 2012; USDA, 2018). El género *Capsicum* comprende unas 32 especies silvestres y 5 domesticadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* (Bosland y Votava, 2012). Si bien el pimiento se considera como un cultivo autógamo, la tasa de alogamia varía entre el 2% y el 90%, dependiendo de la especie (Bosland y Votava, 2012). Aunque todas las especies del género *Capsicum* son diploides ($2n$), no todas cuentan con el mismo número básico de cromosomas. Mientras que la mayoría de las especies cuenta con un número básico de cromosomas $x = 12$ ($2n = 2x = 24$), un pequeño grupo de especies silvestres, entre las que se encuentran *C. campylopodium*, *C. ciliatum*, *C. cornutum*, *C. lanceolatum*, *C. mirabile*, *C. schottianum* y *C. villosum*, presentan el número cromosómico de $x = 13$ ($2n = 2x = 26$), lo cual sugiere dos líneas de evolución diferentes (Bosland y Votava, 2012).

El pimiento es una planta dicotiledónea de germinación epigea que, pese a que es perenne en su hábitat natural, suele cultivarse como si fuese anual. Consta de un denso sistema radicular formado por una raíz principal pivotante y numerosas raíces laterales distribuidas de forma uniforme. El tallo es generalmente circular en su sección transversal, aunque en *C. baccatum* es cuadrado, puede ser glabro o pubescente como en *C. pubescens* o presentar antocianinas en toda su longitud. El crecimiento de la planta de

pimiento es variable, hay tipos indeterminados que crecen como enredaderas, y tipos semi-indeterminados en los que la planta desacelera su crecimiento a medida que produce frutos. Las hojas muestran variación en cuanto a tamaño, forma y color, pueden ser lisas o arrugadas y glabras o pubescentes. La flor es pentámera, hermafrodita e hipógina y varía en color, tamaño y forma en función de la especie. Aunque la mayoría de las especies de *Capsicum* tienen flores blanquecinas, las flores de *C. baccatum* presentan manchas amarillas en la corola, *C. frutescens* tiene una flor verdosa y *C. pubescens*, *C. cardenasii* y algunas accesiones de *C. eximium*, tienen flores de color púrpura (**Figura 1**). Las flores pueden ser erectas o algo pendulares y aparecer solitarias o en grupos de pocas flores en las axilas de las hojas con el tallo. Mientras que en *C. annuum* suelen ser solitarias, algunas especies como *C. chinense* tienen múltiples flores en los nudos (Bosland y Votava, 2012).



Figura 1. Variabilidad en cuanto a forma, tamaño, color y posición de las flores de *Capsicum*: A) *C. annuum*; B) *C. baccatum*; C) *C. cardenasii*; D) *C. eximium* y E) *C. pubescens*.

El fruto de pimiento es una baya comestible que varía en forma, tamaño y color. Pueden ser dulces o picantes y consumirse como ingrediente o especia, en fresco o procesado (**Figura 2**). Los frutos pueden tener dos o más lóculos divididos por la placenta que alberga las semillas, por lo general de color amarillo-pálido, a excepción de la especie *C. pubescens* que posee semillas de color negro.

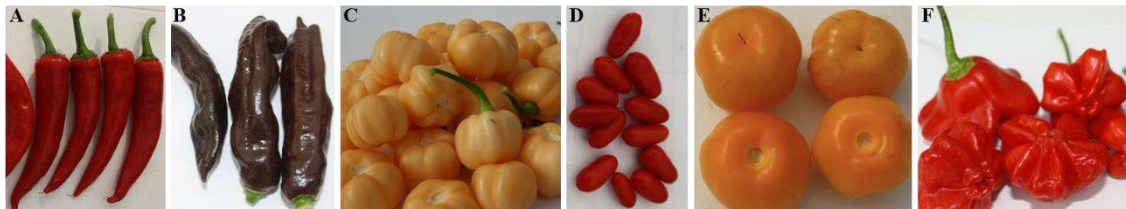


Figura 2. Variabilidad en cuanto a forma, tamaño y color de los frutos de pimiento: A) *C. annuum*; B y C) *C. chinense*; D) *C. chacoense*; E) *C. pubescens* y F) *C. baccatum* var. *pendulum*.

Los frutos de pimiento son ricos en compuestos con actividad antioxidante como las vitaminas C y E y provitamina A, carotenos y xantofilas; en minerales y en fibra. Otros compuestos bioactivos con numerosas propiedades nutraceuticas son los pertenecientes a las familias de los capsicinoides (CAPs) y de los capsinoides (CTOs), responsables del picor de los frutos de pimiento. Aunque en la mayoría de especies se encuentran cultivares con frutos picantes y dulces, los frutos de las especies silvestres *C. ciliatum* y *C. lanceolatum* nunca son picantes. El contenido en estos compuestos varía en función de la especie, el cultivar, las condiciones de crecimiento y la madurez del fruto. Hasta la fecha se han descrito más de 20 análogos naturales de los CAPs, siendo la capscina (Cap) y la dihydrocapsicina (dhCap) los mayoritarios. Por el contrario, sólo tres CTOs, capsiato (Cto), dihydrocapsiato (dhCto) y nordihydrocapsiato, han sido identificados en frutos de pimiento (Yazawa y col., 1989, Kobata y col., 1998,1999). A diferencia de los CAPs, los CTOs presentan un nivel de pungencia mucho menor (1000 veces menos), convirtiéndose en compuestos de gran atractivo para la industria farmacéutica y alimentaria.

1.2.2 La cebolla

La cebolla pertenece al género *Allium*, compuesto por más de 800 especies, entre las cuales cabe señalar, por su importancia económica, el ajo (*A. sativum* L.), el puerro (*A. ampeloprasum* var. *porrum* L. J. Gay), el cebollino (*A. schoenoprasum* L.) y la cebolleta (*A. fistulosum* L.). La jerarquía taxonómica actualmente aceptada para la cebolla es la siguiente: reino *Plantae*; división *Magnoliophyta*; clase Monocotiledóneas; orden *Asparagales*; familia *Amaryllidaceae*; subfamilia *Allioideae*; tribu *Allieae*; género *Allium* y especie *A. cepa* (Fritsch y Friesen, 2002; Brewster, 2008; APG III, 2009). La mayoría de las especies de *Allium* son diploides, con un número básico de cromosomas predominante de $x = 7$ y $x = 8$ (pero también $x = 9, 10$ y 11). La cebolla, la cebolleta y el ajo son diploides ($2n = 2x = 16$), mientras que algunas especies como el puerro son tetraploides ($2n = 4x = 32$) (Fritsch y Friesen, 2002; Brewster, 2008).

El género *Allium* está compuesto por un largo número de especies perennes, en su mayoría bulbosas y que comparten algunas características como: i) órganos de reserva subterráneos como bulbos rizomas o raíces engrosadas; ii) hojas basales que cubren con frecuencia el escapo floral; iii) de dos a varias brácteas, a menudo fusionadas en una espata; iv) inflorescencia fasciculada, en forma de umbela o similar, con un número de

flores variable (desde una o pocas hasta cientos); v) flores pediceladas, actinomorfas, hipóginas y trímeras; vi) tépalos diferenciados en dos verticilos; vii) estambres en dos verticilos a menudo conectados en la base; viii) ovario trilocular; ix) estilo simple con estigma capitado o trilobulado; x) y semillas negras con forma entre angular y globular (Rabinowitch y Currah, 2002). No obstante, entre especies existe gran variabilidad en cuanto a tamaño, forma, color y textura de rizomas, bulbos, raíces, hojas, escapos, espatas, inflorescencias, tépalos, estambres, ovarios y semillas (**Figura 3**).

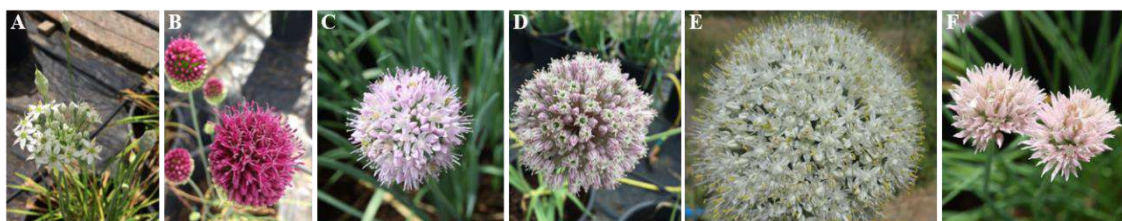


Figura 3. Inflorescencias de diferentes especies de *Allium*: A) *A. tuberosum*; B) *A. spaerocephalon*; C) *A. senescens*; D) *A. ampeloprasum*; E) *A. cepa* y F) *A. schoenoprasum*.

La cebolla es una planta monocotiledónea, bienal y principalmente alógama que se cultiva como anual para recolectar sus bulbos o bienal para obtener sus semillas. Por lo general, durante el primer año de cultivo tiene lugar la formación del bulbo y en el segundo año tiene lugar la fase reproductiva con la emisión de un escapo floral. Este escapo floral, hueco en su interior y de altura variable (hasta 1,8 m), culmina en la inflorescencia. La inflorescencia es de tipo umbela, presenta numerosas flores y con una espata corta persistente. Las flores, hermafroditas y de color blanco-verdoso, están formadas por 6 tépalos, 6 estambres y un gineceo tricarpelar sincárpico con ovario súpero y trilocular, con dos primordios seminales por cada lóculo. El fruto es una cápsula de aproximadamente 5 mm de largo que contiene semillas (hasta 6) de pequeño tamaño y de color negro. Además de la propagación por semillas, en cebolla se puede dar la reproducción asexual mediante la formación de bulbos o bulbillos en las inflorescencias. El sistema radicular está formado por numerosas raíces fasciculadas blancas. El tallo está representado por una masa caulinar aplastada con los entrenudos cortos y situada en la base del bulbo llamada disco. El bulbo está compuesto por numerosas capas de hojas insertadas sobre dicho disco. Mientras que las hojas de las capas exteriores adquieren una consistencia membranosa y actúan como túnicas protectoras, las hojas de las capas más internas se engrosan al acumular sustancias de reserva formando la parte comestible del

bulbo (Fritsch y Friesen, 2002). Los bulbos presentan variabilidad en cuanto a forma, tamaño y color (**Figura 4**).



Figura 4. Variabilidad de los bulbos de *Allium cepa* L. En cuanto a forma, tamaño y color.

Los bulbos de cebolla son ricos en vitaminas hidrosolubles del grupo B y vitamina C; en compuestos fenólicos, como ácidos málico, cítrico, succínico, fumárico y quínico; en fructanos y fructooligosacáridos, con efecto hipocolesterolemizante; en flavonoides, en especial la quercetina, un potente antioxidante y en compuestos azufrados, en concreto los sulfóxidos de cisteína (SCs), los cuales poseen numerosas propiedades nutraceuticas. Aunque en cebolla se han descrito hasta nueve SCs, los más abundantes son la isoaliina (PeSC), responsable del efecto lacrimógeno, la metiina (MeSC), la propiina (PCSO) y en menor proporción la aliina (ASC) (Jones y col., 2004). Además, el contenido en SCs determina el sabor y el aroma característicos de cada variedad de cebolla.

1.3 El potencial nutraceutico del picante: desde la medicina tradicional al interés actual

El pimiento y la cebolla han sido cultivados durante miles de años por sus propiedades profilácticas y terapéuticas. Al pimiento se le han atribuido cualidades espirituales y místicas, considerándose un regalo de los dioses. La popularidad y la esencia de espiritualidad que envuelven al pimiento están íntimamente ligadas con el picor de sus frutos. En consecuencia, los chamanes bebían el zumo de pimientos machacados para inducir el estado psíquico necesario para comunicarse con poderes sobrenaturales. También han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional maya y azteca para tratar afecciones como el asma, la tos o el dolor de garganta y mezclados con harina de maíz para producir ‘chilatolli’, un brebaje utilizado como cura para el

resfriado. Incluso hoy en día, el uso del pimiento sigue presente de forma significativa en la medicina tradicional de pueblos indígenas de la huasteca mexicana y de las regiones amazónicas de Colombia, Ecuador y Perú para tratar dolencias tan diversas como el dolor de dientes, flatulencia, fiebre, dolor de garganta, faringitis, picaduras de insectos, sarna, hemorroides, reumatismo o como preventivo frente a diferentes dolencias relacionadas con brujería (Bosland y Votava, 2012). Paralelamente, los *Alliums*, en concreto la cebolla y el ajo, han sido utilizados en la medicina tradicional de muchas culturas para tratar enfermedades estomacales, gusanos intestinales, infecciones de garganta, picaduras, dolor de cabeza y tumores. La cebolla, mezclada con miel se ha utilizado para tratar condiciones tan dispares como trastornos visuales o mordeduras de perro; en China, la infusionan con té para tratar la fiebre, el dolor de cabeza y algunas infecciones intestinales como cólera y disentería (Rose y col., 2005; Corzo-Martínez y col., 2007).

En la actualidad, algunas de estas propiedades beneficiosas asociadas con el pimiento se relacionan con el contenido en CTOs/CAPs. Asimismo, muchas de las propiedades medicinales de la cebolla se le atribuyen al alto y heterogéneo contenido en compuestos azufrados, en particular a los SCs y los compuestos derivados de su degradación enzimática.

1.3.1 Propiedades saludables de CTOs/CAPS

La Cap, contrariamente a la creencia popular, ejerce un potente efecto protector de la mucosa gastrointestinal frente a infecciones causadas por *Helicobacter pylori*, promueve la restitución del epitelio gástrico y ayuda a la digestión (Luo y col., 2011; Srinivasan, 2016; Szydelko y col., 2017). En la última década, se han publicado más de 700 trabajos relacionados con la Cap y su efecto protector contra el cáncer, consolidándose como un prometedor agente quimioterapéutico y/o quimiopreventivo por su baja toxicidad y alta especificidad sobre las células cancerosas. La Cap actúa deteniendo la proliferación y promoviendo la apoptosis de células cancerosas en diferentes tipos de cáncer como por ejemplo de piel, vejiga, páncreas, próstata, hígado, colon, pulmón o leucemia, entre otros (Szydelko y col., 2017). Si bien la mayoría de estudios se centran en el efecto bioactivo de la Cap; también la dhCap, el Cto, el dhCto y la nordihidrocapsicina (ndhCap) han demostrado propiedades anticancerígenas y antimutagénicas (Luo y col., 2011; Friedman y col., 2018). Los CTOs/CAPs mayoritarios exhiben propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y analgésicas

(Parvez, 2017; Szydelko y col., 2017). Además, en estudios con animales y humanos se ha demostrado que tanto los CTOs como los CAPs mejoran la tolerancia a la glucosa y producen un aumento de la temperatura corporal y del consumo de oxígeno, estimulando el metabolismo de la grasa y evitando su acumulación en el tejido adiposo (Ohyama y Suzuki, 2017; Zang y col., 2018). En este sentido, los CTOs/CAPs contribuyen a reducir el riesgo de padecer diabetes y enfermedades coronarias, además de ser una potente herramienta en tratamientos anti-obesidad (Srinivasan, 2016; Szydelko y col., 2017). A pesar de las evidentes bioactividades promotoras de la salud exhibidas por la Cap, su elevado grado de picor produce algunos efectos adversos tales como irritación o sensación de quemazón e incluso dolor, lo que limita su aplicación como agente terapéutico, sobretudo en tratamientos a largo plazo. No obstante, los CTOs poseen muchas de las propiedades nutraceuticas de los CAPs y, además, su bajo grado de picor los exime de los efectos irritantes, convirtiéndolos en compuestos realmente atractivos en el campo de la medicina y para las industrias farmacéutica y alimentaria.

1.3.2 Propiedades saludables de los SCs

La MeSC y los cepaenos y ajoenos han demostrado ser potentes antiplaquetarios y antitrombóticos (Rose y col., 2005; Corzo-Martínez, 2007; Beretta y col., 2017) y junto con la ASC y la alicina estimulan la producción y secreción de insulina en el páncreas, actuando como agentes hipocolesterolemiantes, hipolipemiantes e hipoglucemiantes, efectivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares y diabetes (Rose y col., 2005; Bisen y Emerald, 2016; Zhai y col., 2018). La ASC y algunos polisulfuros de alilo actúan como potentes antioxidantes (Rose y col., 2005; Kim y col., 2018); cepaenos y otros tiosulfatos han demostrado, en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, su eficacia como antiinflamatorios y antiasmáticos (Rose y col., 2005; Bisen y Emerald, 2016; Bahram-Parvar y Lim, 2018). También son numerosos los estudios en células, animales y humanas, que relacionan el efecto protector de los compuestos azufrados frente a diversos tipos de cáncer (Corzo-Martínez y col., 2007; Bahram-Parvar y Lim, 2018). Además, la alicina y los productos derivados de su degradación como ajoenos, mono-, di- y trisulfuros de dialilo son efectivos frente a un amplio espectro de bacterias y hongos patógenos; a infecciones, como la giardiasis o la amebiasis, causadas por parásitos y protozoos, y a ciertos virus como la gripe A y B, herpes simple tipo 1 y 2 o VIH (Rose y col., 2005; Corzo-Martínez, 2007; Bahram-Parvar y Lim, 2018).

1.4 Importancia económica

En la actualidad, la cebolla (*Allium cepa* L.) y el pimiento (*Capsicum* spp.) son dos de las especies hortícolas de mayor importancia económica a nivel mundial. El área destinada a su cultivo y/o la producción de ambas especies, son superadas únicamente por la patata y el tomate (FAOSTAT, 2018). Mientras que la mayor parte de la producción mundial de cebolla se destina para su consumo una vez seca, la de pimiento se dirige preferentemente para su consumo en fresco. Existe una amplia diversidad de cultivares y variedades autóctonas de cebolla, debido a la necesidad de adaptación a las temperaturas y fotoperiodos predominantes en las zonas de cultivo, así como a las preferencias culinarias locales (Brewster, 2008). A su vez, la producción de pimiento en fresco se divide en dos variantes, frutos picantes y no picantes, adaptándose a la demanda del consumidor. La demanda de los mercados europeos, cuyas preferencias se centran en los pimientos dulces del tipo ‘California’, ‘Lamuyo’ y ‘Dulce Italiano’ para su consumo en fresco, ha crecido espectacularmente. Teniendo en cuenta que España es el principal productor europeo de pimiento no picante en fresco, el aumento de la demanda ha producido el desarrollo del cultivo en invernaderos en el litoral mediterráneo español. Por otra parte, cabe señalar la relevancia del cultivo de cebolla en España, siendo el segundo país productor de la UE después de los Países Bajos.

1.5. Justificación

Los compuestos responsables del picor en pimiento, CAPs y CTOs, y en cebolla, SCs, poseen numerosas propiedades beneficiosas para la salud. Como consecuencia, el estudio del carácter picante constituye una de las líneas de trabajo que más importancia ha cobrado en estos últimos años en los programas de mejora genética en ambas especies. No obstante, el conocimiento de las rutas de biosíntesis de estos compuestos, del control genético de su biosíntesis, así como, de la variabilidad de sus contenidos en función de la variedad y estado de desarrollo del fruto es todavía escaso. Por ello, en este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento de estos compuestos mediante el desarrollo y la aplicación de metodologías analíticas y biotecnológicas. Dado que el pimiento y la cebolla son especies muy distantes y los compuestos de interés muy diferentes, se han seguido distintas estrategias.

Por un lado, la determinación de los contenidos de CAPs y CTOs en diferentes estados de desarrollo de los frutos de pimiento permitiría, tanto establecer el perfil de composición de estos compuestos en los frutos, como, en combinación con estudios de genómica y transcriptómica, identificar genes relacionados con el control genético de este carácter picante en pimiento. Sin embargo, mientras que para los CAPs se disponen de métodos analíticos capaces de cuantificarlos con precisión en diferentes estados de desarrollo del fruto (Capítulo 4), para los CTOs no se disponen de estas metodologías, por lo que es fundamental su desarrollo para una precisa cuantificación (Capítulo 6). En este sentido, la espectrometría de masas (MS) acoplada mediante ionización por electro-spray (ESI) a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es actualmente una herramienta analítica extraordinariamente prometedora para la identificación, caracterización y cuantificación de estos compuestos minoritarios. Sin embargo, para la cuantificación de los compuestos mediante esta metodología se requiere de los estándares de los compuestos que se quieran cuantificar, así como, de un estándar interno (SI) que ‘estandarice’ el efecto de ionización de las moléculas durante los análisis. El SI debe de reunir una serie de características: i) tener una naturaleza similar a la de los CTOs sin estar presente, de forma natural, en los frutos de pimiento; ii) tener propiedades químicas y espectroscópicas similares a las del analito de forma que la señal analítica del analito y del estándar interno cambien proporcionalmente cuando ocurren efectos de matriz; iii) ser suficientemente diferente al analito para poder ser distinguidos por el detector y ser cuantificados por separado y iv) tener un comportamiento de ionización similar al de los CTOs. Actualmente, no existe un compuesto que reúna estas características necesarias para cuantificar los CTOs mediante HPLC-ESI-MS, por tanto, la síntesis química de un nuevo SI sería necesaria (Capítulo 5).

Por otra parte, la obtención de poblaciones es esencial para llevar a cabo programas de mejora genética vegetal. Además, las poblaciones son una herramienta muy útil para el cartografiado de genes o regiones implicadas en el control de caracteres cuantitativos como la pungencia. Para el desarrollo de estas poblaciones, como las líneas recombinantes consanguíneas (Recombinant Inbred Lines, RIL) o las de retrocruces avanzados (Advanced Backcross Populations, AB), entre otras, es esencial la disponibilidad de parentales homocigotos. La cebolla es una especie alógama y presenta un alto grado de depresión por consanguinidad lo que dificulta en gran medida la obtención de parentales puros, mediante autofecundaciones forzadas. La optimización de metodologías biotecnológicas basadas en la inducción de la embriogénesis mediante el

cultivo *in vitro* de ovarios de cebolla y posterior duplicación cromosómica permitiría la obtención de plantas dobles haploides de cebolla (Capítulo 7), esenciales para acometer futuros trabajos direccionados a la búsqueda de genes asociados al carácter pungente de la cebolla.

1.6 Objetivos

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo y aplicación de técnicas analíticas y biotecnológicas para la determinación de los compuestos responsables del picor en pimiento y en cebolla. Y para ello, este objetivo general se divide en los siguientes subobjetivos:

1. Revisar el conocimiento científico actual y los aspectos más relevantes sobre el control genético y las rutas de biosíntesis de los compuestos responsables del picor en pimiento (*Capsicum* spp.) y en cebolla (*Allium cepa* L.), así como los métodos analíticos desarrollados para su determinación en matrices vegetales.
2. Evaluar el patrón de acumulación, tanto individual como total, del contenido de cinco capsinoides durante el desarrollo de los frutos de pimiento (*Capsicum frutescens* L.).
3. Sintetizar un estándar interno y validar su utilidad para la determinación de capsinoides mediante HPLC-ESI-MS(QTOF)
4. Desarrollar y validar un método analítico HPLC-ESI-MS(QTOF) para la determinación de capsinoides en frutos de pimiento (*Capsicum* spp.).
5. Estudiar los patrones de fragmentación de los capsinoides mediante HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) y su aplicación como herramienta en la caracterización e identificación de compuestos minoritarios análogos a los capsinoides.
6. Evaluar y optimizar la capacidad ginogenética del germoplasma español de cebolla mediante el cultivo *in vitro* de flores para la obtención de plantas dobles haploides de cebolla (*Allium cepa* L.).
7. Ensayar la embriogénesis somática como estrategia para la duplicación cromosómica de las plantas haploides y mixoploides.

1.7 Tareas y aportaciones del doctorando

A continuación, se especifican las aportaciones realizadas por la doctoranda en el diseño y desarrollo del plan de trabajo y, por consiguiente, para la consecución de los objetivos planteados:

- Revisión bibliográfica exhaustiva sobre el conocimiento científico existente del carácter picante del pimiento y de la cebolla, con especial énfasis en los trabajos centrados en la determinación analítica, las rutas de biosíntesis y el control genético de los compuestos responsables del picor en ambas especies.
- Diseño del experimento, seguimiento de la maduración de los frutos de pimiento y de su recolección a tiempos concretos después de la antesis de la flor. Las tareas realizadas abarcan desde la siembra hasta la recogida y procesado de los frutos. Cuantificación de los compuestos y análisis de los contenidos.
- Participación activa en la realización de los procedimientos de la síntesis química del estándar interno necesario para la cuantificación de CTOs mediante HPLC-ESI-MS.
- Diseño del experimento y desarrollo y la validación de un método analítico para la determinación de CTOs, en colaboración con el resto del equipo de investigación. Preparación de los analitos y sus diluciones, de las curvas de calibrado, límites de detección, límites de cuantificación, repetibilidad entre e inter-días y recuperaciones con los estándares de CTOs.
- Preparación de los extractos de pimiento para el análisis de CTOs, desde la siembra hasta la recolección y procesado de los frutos de pimiento. Optimización del protocolo de extracción de CTOs.
- Diseño y desarrollo del protocolo de obtención de plantas dobles haploides de cebolla en colaboración con el resto del equipo de investigación. Entre las tareas realizadas se incluye la recolección, esterilización y siembra de las flores, preparación de medios de cultivo, seguimiento de la evolución de la embriogénesis, aplicación de agentes diploidizantes, tinciones con DAPI, análisis de ploidía, microscopía, aclimatación de las plantas y polinizaciones.
- Tratamiento y análisis de los datos experimentales: creación de bases de datos para la gestión de los mismos, creación de gráficos y tablas, tratamientos

estadísticos (estudios de correlaciones, análisis de la varianza ANOVA, chi-cuadrado y diversas pruebas multiparamétricas).

- Interpretación de los resultados y preparación y redacción de las distintas publicaciones derivadas de la investigación, comunicaciones a congresos y artículos de revistas, incorporando todos aquellos comentarios, mejoras y sugerencias pertinentes aportadas por los coautores, revisores y editores.

Capítulo 2

METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1. Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de CTOs y CAPs en frutos de pimiento (*Capsicum* spp.)

2.1.1 Compuestos químicos: síntesis de estándares de CTOs

En la actualidad se dispone de estándares comerciales de los principales CAPs (Cap y dhCap) pero no de los CTOs, por ello se recurrió a la síntesis orgánica de los mismos. Esta parte del trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, siguiendo el procedimiento descrito por Barbero y col. (2010), con algunas modificaciones). Por una parte, se sintetizaron los estándares de los CTOs, incluyendo los mayoritarios (capsiato y dihidrocapsiato) y 15 lineales con diferente longitud de la cadena lateral (entre los 2C – 16 C). El procedimiento de síntesis de CTOs, consistente en la esterificación de un anillo de alcohol vanílico, derivado de la vainillina y común para todos ellos, con una cadena de ácidos grasos de longitud variable, se realizó en 4 etapas. En primer lugar, se protegió, por sililación, el grupo hidroxilo (-OH) de la vainillina y se dejó libre el grupo aldehído (-CHO) para esterificar con la cadena, obteniéndose la vainillina sililada. Una vez protegido el grupo hidroxilo, se redujo el grupo carbonilo (-CO) de la vainillina sililada hasta su correspondiente alcohol, obteniéndose la vainillina sililada reducida, que sirvió de sustrato para la formación de todos los CTOs. Por otro lado, los ácidos grasos, correspondientes a la cadena lateral, se transformaron en sus correspondientes cloruros de acilo y se esterificaron con la vainillina sililada reducida, obteniéndose los CTOs sililados. Por último, se eliminó el grupo protector de los CTOs sililados (**Figura 5**).

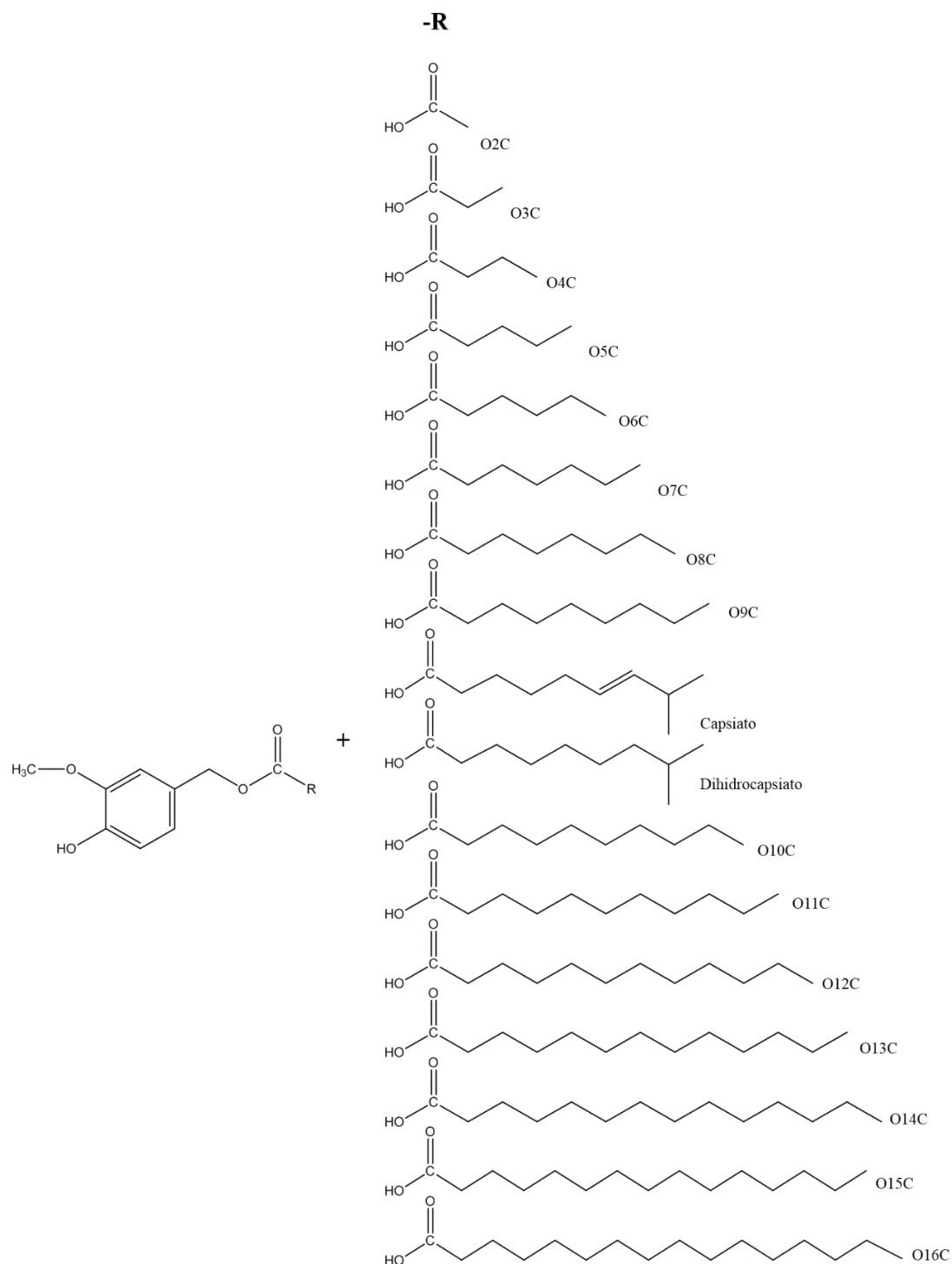


Figura 5. CTOs sintetizados: etanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O2C); propanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O3C); butanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O4C); pentanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O5C); hexanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O6C); heptanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O7C); octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O8C); capsiao [(E)-8-methyl-6-nonenoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo]; dihidrocapsiao (8-metilnonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo); nonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O9C); decanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O10C); undecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O11C); dodecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O12C); tridecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O13C); tetradecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O14C); pentadecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O15C); hexadecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (O16C).

Además de los 17 estándares de CTOs, se sintetizó el ($\pm$)-3,4-dimetoxibenzil 4-metiloctanoato (DMBO), un compuesto análogo (no natural) a los CTOs, para su aplicación como estándar interno en los análisis de HPLC-ESI-MS(QTOF). La síntesis del ($\pm$)-DMBO se realizó según el procedimiento de síntesis de CTOs (Barbero y col., 2010), con modificaciones; a diferencia del anillo de vainillina de los CTOs, que contiene un metilo y un alcohol, el anillo del ($\pm$)-DMBO posee dos grupos metilo que permiten la reducción directa del anillo (sin protección) en su correspondiente alcohol y su posterior esterificación con el cloruro de acilo de la cadena lateral.

Todas las reacciones se mantuvieron en agitación magnética (SM4, Stuart Scientific, Reino Unido), a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de argón; se concentraron en el rotavapor (Büchi R-114) y se siguieron por cromatografía en capa fina (CCF) en placas Alugram Sil G/UV254 (Merck) de 0,25 mm de espesor con indicador fluorescente, utilizando como fase móvil una mezcla de 20% acetato de etilo: 80% hexano (**Figura 6B**). El revelado de las placas de cromatografía se realizó con una lámpara de UV (longitud de onda de emisión: 254 y 360 nm), utilizando como reveladores oleum (ácido sulfúrico, agua y ácido acético (1:4:20) o anisaldehído (etanol (96 %) y después calentando a 150 °C. Los productos se purificaron por cromatografía en columna, en fase normal utilizando gel de sílice (Merck de tamaño de grano 0,06 – 0,2 mm) como fase estacionaria y mezclas de hexano y acetato de etilo como fase móvil (**Figura 6A**). Por último, la identificación y asignación de todos los compuestos sintetizados se confirmaron por resonancia magnética nuclear (RMN) mediante estudios de protón (^1H -RMN) y de carbono (^{13}C -RMN) (Varian, Gemini-300 e Inova-400) (**Figura 6C**).

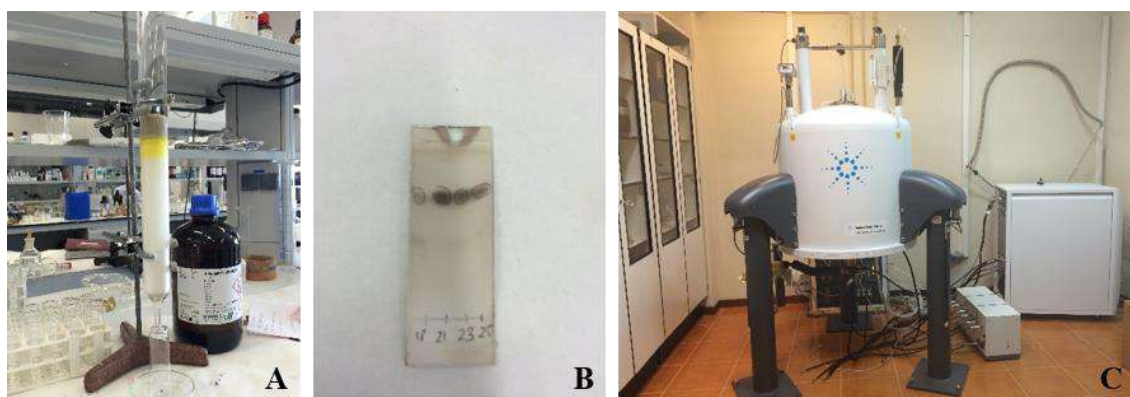


Figura 6. Instrumental utilizado en la síntesis de los CTOs: A) Cromatografía en columna; B) placa de CCF; C) equipo de RMN.

2.1.2 Material vegetal

El estudio de la evolución del contenido en CAPs durante la maduración de los frutos se realizó con la variedad de pimiento ‘Malagueta’ (*C. frutescens*). Las semillas se germinaron en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada y se mantuvieron en una incubadora a 30 °C hasta su germinación. Cuando se desarrollaron los cotiledones se sembraron en contenedores Jiffy-7 (Clause-Tezier Ibérica, Almería, España) hasta tener al menos tres hojas verdaderas y después, se trasplantaron a macetas de plástico negro, de 17 cm de diámetro (una planta por maceta), con una mezcla de sustrato de turba, arena, suelo franco arcilloso y sustrato Humin (Klasman-Deilmann, Geeste, Alemania) (1:1:1, en v) y 2g de fertilizante de liberación lenta (Osmocote 16N-4P-9K, Scotts, Tarragona, España). Las plantas se cultivaron, bajo condiciones controladas en invernadero, en las instalaciones del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Para el seguimiento de la maduración de los frutos se utilizaron 20 plantas de pimiento ‘Malagueta’. El procedimiento consistió en marcar las flores en la fecha de su antesis con etiquetas de diferentes colores, según la fecha, para facilitar su posterior identificación. Esta tarea se llevó a cabo dos días a la semana, desde mediados del mes julio hasta principios de septiembre de 2015. Para garantizar que todas las flores se marcaron en el momento de su antesis, los días anteriores al marcado de las flores se retiraron todas las que estaban abiertas. Finalmente, la tercera semana de septiembre se recolectaron los frutos de todas las plantas, obteniéndose una mezcla en todos los estados de maduración (desde los 12 a los 75 días después de la antesis).

Por otro lado, en la determinación de CTOs, incluyendo la optimización del procedimiento de extracción, el desarrollo y la validación del método de HPLC-ESI-MS(QTOF) y su aplicación en frutos de pimiento, se utilizaron las entradas ‘RU72-241’, ‘Mishme’, ‘Habanero rojo’ y ‘Bhut Jolokia’ de *C. chinense*; ‘Chile serrano’ y ‘Chile de árbol’ de *C. annuum* y ‘Tabasco’ y ‘RU72-7’ de *C. frutescens* para el desarrollo y la validación del método de HPLC-ESI-MS(QTOF). Para ello se cultivaron 5 plantas por entrada que se germinaron y cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los frutos (al menos 5 por planta) se recogieron completamente maduros, se liofilizaron durante 4 – 5 días (Virtis Genesis 25 EL) (**Figura 7A,B**), se molieron en un molinillo convencional y se guardaron en tubos Falcon hasta el momento de su análisis (**Figura 7C**).

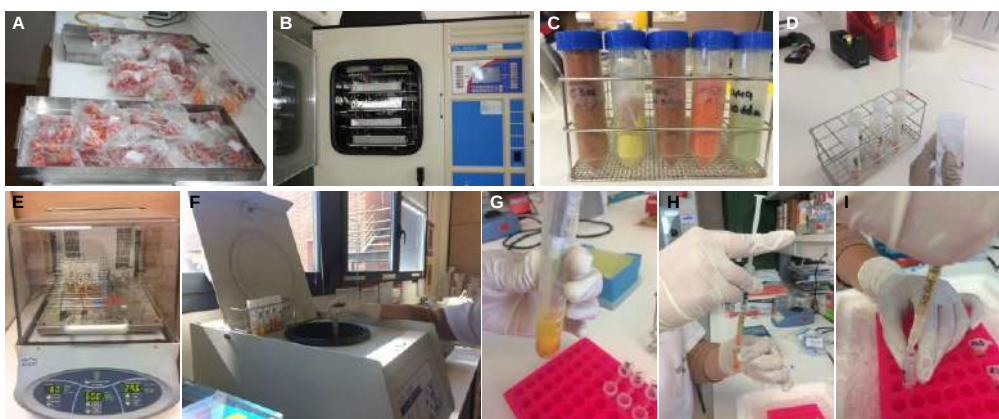


Figura 7. Procedimiento de extracción de CTOs: A) preparación de los frutos en las bandejas del liofilizador; B) equipo de liofilización; C) muestras liofilizadas y molidas preparadas para su conservación; D) adición del disolvente; E) extracción por maceración en el agitador orbital; F) centrifugación; G) transferencia del sobrenadante a microtubos; H) resuspensión del pellet; I) filtrado del extracto.

2.1.3 Extracción de CAPs y CTOs

2.1.3.1 Extracción de CAPs mediante ultrasonidos

La extracción de CAPs en los frutos de pimiento ‘Malagueta’ se realizó mediante el procedimiento de extracción asistida por ultrasonidos (EAU) descrito por Barbero (2008). Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz.

Para la EAU de los CAPs en frutos de pimiento ‘Malagueta’, la muestra (0,25 g) se disolvió en metanol (25 ml) y se sumergió en un baño de agua, con controlador de temperatura, a 50 °C (Frigiterm-10, JP Selecta, SA, Barcelona, España), al que se le acopló el sonicador UP200S sonifier (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania) (200 W de potencia, 24 kHz de frecuencia, ciclo de trabajo: 0,5 s), durante 10 minutos (**Figura 8A**). Por último, se filtraron los extractos a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,22 µm (Membrane Solutions, Dallas, TX, EE. UU.).

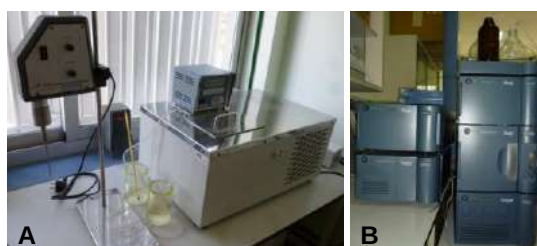


Figura 8. Instrumental utilizado en la determinación de CAPs en frutos del pimiento ‘Malagueta’: A) equipo de ultrasonidos y baño termostático; B) equipo de UHPLC.

2.1.3.2 Optimización del procedimiento de extracción de CTOs

Los CTOs y los CAPs son estructuralmente muy similares, sin embargo, las pequeñas diferencias entre ambas familias de compuestos convierten a los CTOs en compuestos más termolábiles y menos estables en disolventes polares que los CAPs (Sutoh y col., 2001). Por este motivo se optimizó el procedimiento de extracción de CTOs por maceración teniendo en cuenta la temperatura, la idoneidad del disolvente y el tiempo de extracción. Las primeras extracciones se realizaron con 50 mg del polvo liofilizado de las variedades de pimiento ‘Bhut Jolokia’, ‘Tabasco’ y ‘Chile de árbol’, siguiendo los protocolos descritos por Lang y col. (2009), Wahyuni y col. (2011) y Han y col. (2013), con modificaciones. Aunque no se observaron diferencias notables entre los tres protocolos de extracción, sí se observaron entre los extractos, obteniéndose mejores resultados con el extracto de ‘Bhut Jolokia’ para todos los métodos. En consecuencia, se decidió repetir el experimento con extractos más concentrados (300 mg de muestra) de ‘Bhut Jolokia’. En esta ocasión, además de los tres protocolos anteriores, se probó el protocolo descrito por Garcés-Claver y col. (2006). Las condiciones del proceso de extracción de cada uno de los protocolos de extracción se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones de extracción utilizados para la optimización del procedimiento de extracción de CTOs.

Muestra	Disolvente extracción	Técnica extracción	Metodología	Referencia
300 mg fruto liofilizado	3 ml acetato de etilo: acetona (60:40)	Maceración: agitación 24 horas 37 °C	centrifugar 5 min a 620g; evaporar 2 ml sobrenadante	Hang y col. 2013
300 mg fruto liofilizado	3 ml acetato de etilo, vortex 1min	Maceración: agitación 1 hora, 30 °C, 60rpm	centrifugar 5 min a 620g; evaporar 2 ml sobrenadante	Lang y col. 2009
300 mg fruto liofilizado	3 ml de metanol	Baño de ultrasonidos: 15 min, Tamb*	centrifugar 5 min a 620g; evaporar 2 ml sobrenadante	Wahyuni y col. 2011
300 mg fruto liofilizado	3 ml de acetonitrilo	Baño de ultrasonidos: 16 min, Tamb	centrifugar 15 min a 16000g; evaporar 2 ml sobrenadante	Garcés-Claver y col. 2006

*Tamb, temperatura ambiente.

Al analizar los extractos se observó que los peores resultados se obtuvieron con el método descrito por Wahyuni y col. (2011). Sin embargo, entre el resto de protocolos no se apreciaron diferencias significativas, por lo que se eligió el protocolo de Lang y col. (2009) por el tipo de disolvente (mayor afinidad y estabilidad) y el tiempo de extracción.

*2.1.3.3 Extracción de CTOs en frutos de pimiento (*Capsicum* spp.)*

Para la extracción de CTOs en frutos de pimiento se pesaron 300 mg del polvo liofilizado en un tubo de plástico de 13 ml (100 x 16 mm) (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemania) y se disolvieron en 3 ml de acetato de etilo puro (> 99,8% grado LC-MS, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) (**Figura 7D**). A cada extracto se adicionó una cantidad conocida del estándar interno, DMBO, (5 μ M) y se agitó durante 1 minuto en un mezclador Vortex ZX4 (Velp Scientifica, Usmate, Italia). La mezcla se maceró en un agitador orbital (Barnstead Max Q mini 4000 Lab-line E-class, Champaign, IL, EE.UU.) a 30 °C y 60 rpm, durante 1 hora (**Figura 7E**). A continuación, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 620 *g* y se transfirieron 2 ml del sobrenadante a microtubos (**Figura 7F,G**). Este sobrenadante se evaporó completamente en una centrífuga de vacío (miVac Duo Concentrator, Barnstead GeneVac, Ipswich, Reino Unido) y el sedimento resultante se resuspendió con 0,5 ml de una mezcla de metanol y agua ultrapura (60:40 v/v) (**Figura 7H**). Finalmente, el extracto se filtró a través de dos filtros de nailon desechables (Teknokroma Analítica S.A., Barcelona, España), primero con uno de 0,45 μ m y después con uno de 0,20 μ m (**Figura 7I**).

2.1.4 Métodos de análisis de CAPs y CTOs

2.1.4.1 Determinación de CAPs en frutos de pimiento 'Malagueta' mediante UHPLC-FL

La separación y cuantificación de los CAPs se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución UHPLC (ACQUITY UPLC H-Class, Waters, Milford, MA, EE. UU.), equipado con un sistema de bomba cuaternaria, un inyector automático, control de temperatura ajustado a 15 °C y compartimento de columna termostatzado, acoplado a dos detectores, por un lado, a un detector UV/Vis (ACQUITY UPLC® Photodiode Array, PDA) y por otro lado, a un detector de fluorescencia

(ACQUITY UPLC® Fluorescence, FLR) (**Figura 8B**). Para control del equipo y el procesamiento de datos se utilizó el software Empower3 (Waters). La separación cromatográfica de los CAPs se realizó en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula 1,7 μm), utilizando un método de gradiente para la separación cromatográfica con agua acidificada (ácido acético al 0,1%, solvente A) y acetonitrilo acidificado (ácido acético al 0,1%, solvente B). El gradiente empleado fue el siguiente: 0 min, 0% B; 0,50 min, 45% B; 1,60 min, 45% B; 1,95 min, 50% de B; 2,45 min, 55% de B; 2,80 min, 63% de B; 3,00 min, 63% B; 4,00 min, 100% B; 6,00 min, 100% B. La temperatura de la columna fue de 50 °C, el flujo de trabajo de 0,8 μl y el volumen de inyección de 3 μl . Las longitudes de onda empleadas para la detección por fluorescencia fueron 280 nm (excitación) y 305 nm (emisión). La cuantificación de los cinco CAPs se realizó a partir de las curvas de calibración obtenidas de las soluciones de estándares. Dado que solo están disponibles los estándares comerciales de Cap y dhCap, el resto de CAPs se cuantificaron a partir de las curvas de calibración de Cap y dhCap, en función de la similitud estructural con uno u otro.

La identificación de los cinco CAPs analizados se llevó a cabo en un sistema UHPLC acoplado a un detector de espectrometría de masas de alta resolución de tipo cuádruplo de tiempo de vuelo (QTOF) (Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), con fuente de ionización por electrospray (ESI). La separación cromatográfica se realizó en fase reversa, en una columna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 100 mm y tamaño de partícula de 1,7 μm). Los espectros de masas de obtuvieron en modo positivo mediante barrido automático en el rango de masas de m/z 100 – 600; 0,7 eV de voltaje del capilar; 20 V de voltaje del cono y 4 eV de energía de colisión de la trampa. La temperatura de la fuente fue de 150 °C y la de desolvatación de 500 °C. El flujo de gas del cono fue de 10 l h^{-1} y el del gas de desolvatación 850 l h^{-1} . La separación de los CAPs se logró utilizando como fase móvil agua (A) y metanol (B), ambos acidificados con 0,1% de ácido fórmico, un caudal de 0,5 ml min^{-1} y con el siguiente gradiente de elución: 0 min, 0% B; 0,85 min, 55% de B; 1,60 min, 55% de B; 1,95 min, 60% de B; 2,45 min, 63% de B; 2,80 min, 70% B; 3,00 min, 70% B; 6,00 min, 100% B; 8,00 min, 100% B. El volumen de inyección fue de 3 μl y el tiempo total de ejecución fue de 12 min, incluidos los 4 min para el equilibrado de la columna. Para los espectros MS/MS se eligieron como precursores los iones moleculares $[\text{M} + \text{H}]^+$ con valores de m/z 294 para la ndhCap, m/z 306 para la Cap, m/z 308 para la dhCap, m/z 320 para la hCap y m/z 322 para la hdhCap. En los espectros de MS/MS de estos cinco CAPs

se observó el ion producto de mayor intensidad a m/z 137, correspondiente al anillo de vainillina protonado, característico de la fragmentación de los CAPs. El software Masslynx, versión 4.1, se utilizó para controlar el equipo y para la adquisición y el tratamiento de datos.

*2.1.4.2 Desarrollo y validación del método analítico HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) para la determinación de CTOs en frutos de pimiento (*Capsicum spp.*)*

El desarrollo y la validación del método de detección de CTOs se realizaron en el Servicio de Masas del Centro de Química y Materiales de Aragón (ICMA-CEQMA) de la Universidad de Zaragoza, utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania), equipado con una bomba isocrática, un inyector automático y un compartimento de columna termostatzado, acoplado a un detector de espectrometría masas (MS) de alta resolución de tipo cuádruplo de tiempo de vuelo (QTOF), con una fuente de ionización por electrospray (ESI) (microToF-QTM Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (**Figura 9**). Los espectros de masas se adquirieron en modo positivo (en modo negativo no se ionizaron), utilizando nitrógeno como gas de colisión y 10 eV de energía de ionización, en un rango de m/z 50 – 800, durante toda la carrera cromatográfica. Los análisis de MS/MS fueron realizados de forma automatizada seleccionando como iones precursores los cinco más intensos y con una m/z en el rango de 200 – 400, que incluye las m/z de los iones $[M+Na]^+$ correspondientes a los CTOs conocidos. El eje de masas fue calibrado externamente utilizando aductos de acetato de sodio [10 mM NaOH, 2,5 % (v/v) de ácido acético y 50 % (v/v) 2-propanol]. Los programas micrOTOF Control v.2.3 y Hystar v.3.2 del software Bruker Daltonik (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) se utilizaron para el control del sistema HPLC-ESI-MS(QTOF), el Data Analysis v.4.0. (Bruker Daltonics) para el análisis de datos y el algoritmo Sigma Fit (Bruker Daltonik) para las asignaciones de las fórmulas moleculares de los iones producto.



Figura 9. Equipo de HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) utilizado para el desarrollo y la validación del método analítico de determinación de CTOs.

Los experimentos de ESI-MSn(QTOF) se realizaron mediante la inyección directa de soluciones individuales de los estándares de capsato y dihidrocapsato ($10\ \mu\text{M}$) y de ($\pm$)-DMBO ($20\ \mu\text{M}$) en metanol : agua (60:40, v/v), con una bomba de jeringa (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, EE. UU.), a un flujo de $4\ \mu\text{l min}^{-1}$, en el analizador de masas. Para los espectros MS/MS se eligieron como precursores los iones moleculares $[\text{M}+\text{Na}]^+$ con valores de m/z 329 para capsato y m/z 331 para dihidrocapsato y ($\pm$)-DMBO con un ancho de aislamiento de 4 unidades de m/z y una amplitud voltaje de 0,45 V. Los espectros de MS/MS obtenidos para los estándares de capsato y dihidrocapsato mostraron un ion producto más intenso a m/z 159 correspondiente al anillo sodiado y otro de menor intensidad a m/z 137 correspondiente al anillo protonado. En el espectro de MS/MS del ($\pm$)-DMBO se observó un ion producto a m/z 151, que corresponde al anillo protonado. La porción correspondiente a la cadena lateral no se ionizó. Estos datos permitieron el desarrollo y la optimización del método de HPLC.

La separación cromatográfica se realizó en fase reversa, con una columna analítica HPLC RP-C18 (Symmetry® C₁₈, 2,1 x 150 mm, tamaño de partícula esférica de $3,5\ \mu\text{m}$, Waters, Milford, MA, EE.UU.) acoplada en serie a una precolumna (Symmetry® C₁₈ 2,1 x 10 mm, tamaño de partícula esférica de $3,5\ \mu\text{m}$, Waters), una temperatura en la columna de $25\ ^\circ\text{C}$, un volumen de inyección de $5\ \mu\text{l}$ y un flujo de $0,2\ \mu\text{l min}^{-1}$. Las condiciones de la cromatografía se optimizaron utilizando una solución con todos los estándares de CTOs y del ($\pm$)-DMBO ($50\ \mu\text{M}$). Estas condiciones de trabajo fueron las siguientes: agua ultrapura tipo I (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) (solvente A) y metanol

(solvente B), ambos con 0,1% (v/v) de ácido acético como fase móvil y un gradiente de elución: 0–7 min, 60% B; 7–15 min, 60–70% B; 15–52 min, 70–100% B que se mantuvo hasta los 80 minutos para equilibrar la columna en las condiciones iniciales. Una vez establecidas las condiciones de la cromatografía se validó el método HPLC-ESI-MS(QTOF) para la determinación de los dos CTOs mayoritarios, Cto y dhCto. Todas las muestras se prepararon en metanol: agua (60:40, v/v), por triplicado y se corrigieron con la adición del estándar interno ($\pm$)-DMBO (5 μ M). En la validación se evaluó la linealidad mediante curvas de calibración (de 13 puntos), los límites de detección (cuando su señal excedió tres veces el ruido de fondo) y los de cuantificación (cuando su señal excedió diez veces el ruido de fondo), la repetibilidad (ensayos en un día), la precisión intermedia (ensayos entre días) y la exactitud (recuperaciones). Las recuperaciones se realizaron enriqueciendo los extractos de ‘Bhut Jolokia’ con diferentes concentraciones de Cto y dhCto.

La cuantificación del Cto y del dhCto se realizó a partir de las curvas de calibración, obtenidas de las soluciones de estándares de Cto y dhCto, trazando la relación del área del pico del analito, estandarizada con la relación del área del pico del estándar interno, frente a la concentración. La identificación de los CTOs se realizó por comparación del tiempo de retención, la relación m/z y el patrón de fragmentación con los estándares y por asignación de la fórmula elemental.

2.2 Desarrollo de técnicas biotecnológicas en la determinación de la pungencia en cebolla (*A. cepa*)

2.2.1 Material vegetal

En el ensayo de obtención de plantas de cebolla dobles haploides se utilizaron genotipos de cebolla ‘Fuentes de Ebro’, de gran interés por su baja pungencia, las variedades comerciales ‘Recas’ (Veronsa) y ‘Rita’, la entrada ‘BGHZ1354’, del Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas de Zaragoza, de interés por su elevada pungencia, y la población sintética ‘OH-1’, caracterizada por tener una alta frecuencia de inducción de embriones ginogenéticos, que se incluyó en el ensayo como control.

En 2012, el ensayo se realizó con los genotipos ‘Fuentes de Ebro’, ‘Recas’ y ‘Rita’, que se cultivaron en campo y en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h, temperatura entre 15 – 18 °C, una intensidad lumínica de 300 μ mol m⁻² s⁻¹ (Philips

Master SON-T, PIA Hg Free 150 W y Phillips Master TL_D 58 W/865) y una mezcla de turba (50%), coco (30%), arena (20%) y fertilizante N: P: K (14:16:18) con micronutrientes (Projar S.A., Valencia, España) como sustrato (**Figura 10A**). Esta mezcla de sustrato también se utilizó para las plantas del umbráculo. En 2013, se utilizaron los genotipos ‘Fuentes de Ebro’ ‘Recas’, ‘BGHZ1354’ y ‘OH-1’, que se cultivaron en campo (**Figura 10B**).

Las umbelas se recolectaron enteras cuando el 30% de las flores estaban entre tres y cuatro días antes de la antesis (**Figura 10C**) y se llevaron a la cabina de flujo laminar donde se cortó cada flor, con unas tijeras pequeñas, por la base. Las flores individuales se esterilizaron en tubos Falcon, primero con etanol al 70% durante 2 min y después con una solución de 16,5 g l⁻¹ de dicloroisocianurato de sodio y dos gotas de Tween 80 durante 10 – 12 min, finalmente se aclararon 4 – 5 veces con agua destilada estéril (**Figura 10D**).

La ploidía de las plantas aclimatadas se determinó por citometría de flujo en un citómetro PAS (Partec, Münster, Alemania), a partir de hojas jóvenes. Para ello, el tejido se troceó finamente, con una cuchilla, sobre una placa Petri (30 mm de diámetro) y se añadieron 2 ml de la solución Cystain UV Ploidy (Partec), que incorpora el tampón de extracción de núcleos y el fluorocromo DAPI que tiñe el ADN. Después se resuspendió la mezcla y se filtró con un filtro de nylon de 30 µm.

2.2.2 Obtención de plantas dobles haploides de cebolla mediante ginogénesis *in vitro*

Para la optimización del protocolo de obtención de plantas dobles haploides mediante ginogénesis *in vitro* se probaron los protocolos descritos por Jakše y Bohanec (2003) y Michalik y col. (2000). Este trabajo se realizó entre los años 2012 y 2014, en colaboración con el grupo de Biología de la Embriogénesis Gamética y Aplicaciones de la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD) de Zaragoza, donde se desarrolló toda la parte del cultivo *in vitro*.

El primer año se probó el protocolo de un solo paso (Jakše y Bohanec, 2003). La siembra de las flores se realizó en placas de Petri (90 mm) y se incubaron en una cámara de crecimiento a 24 °C, con fotoperiodo de 16 h y 100 µmol m⁻² s⁻¹ (Phillips Master TLD Super 80 58W/840 y OSRAM 30 W/2700 K) (**Figura 10E**). Tras 3 – 6 días de cultivo se abrieron las flores y a los 75 días emergieron los primeros embriones ginogenéticos (**Figura 10F**).

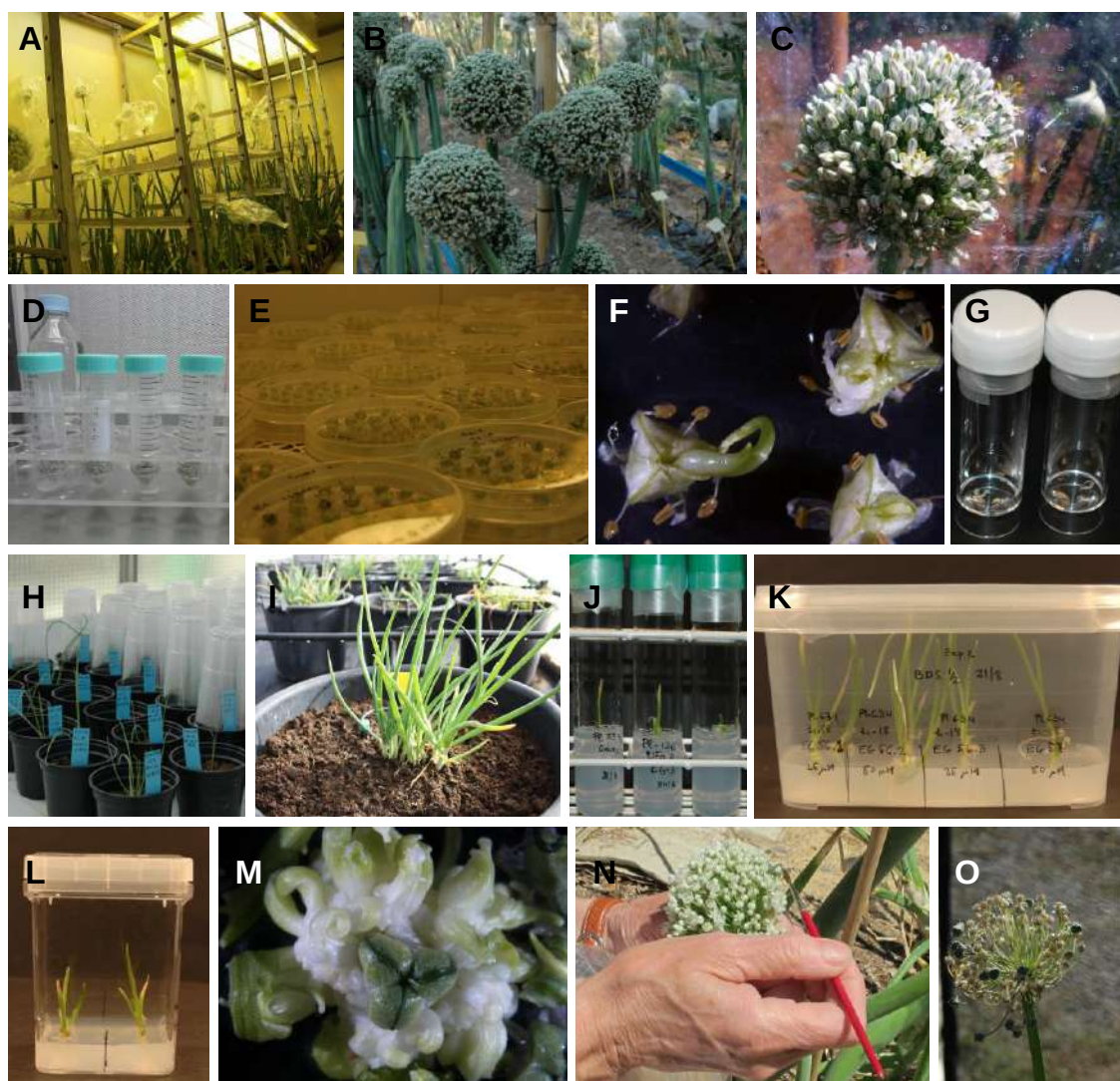


Figura 9. Procedimiento de obtención de plantas dobles haploides de cebolla mediante ginogénesis *in vitro*: A) plantas cultivadas en cámara de crecimiento; B) plantas cultivadas en campo; C) umbela en el estado óptimo para su recolección; D) esterilización de las flores; E) placas de Petri en la cámara de crecimiento; F) embriones emergiendo de los ovarios; G) tratamiento con APM; H) aclimatación de las plántulas en invernadero; I) aclimatación de las plantas en el umbráculo; J) tubos de cultivo; K) caja de aireación Eco2box; L) caja Magenta; M); embriogénesis somática; N) autofecundación de la umbela; O) umbela de una planta doble haploide son semillas.

Estos embriones se trataron con el agente de duplicación amiprofosmetilo (APM) (25 μM), que se aplicó en un medio de elongación líquido compuesto por BDS (x 1/2) con 15 g l⁻¹ de glucosa en el que se sumergieron los embriones durante 24 – 48 h y en oscuridad (**Figura 10G**). Después del tratamiento con APM, los embriones se enjuagaron con medio de elongación líquido y se transfirieron a un medio de elongación sólido, en tubos de vidrio con tapones de plástico (150 × 25 mm) (Steristophen Typ 20, Carl Roth GmbH + Co), para el desarrollo de la plántula. Transcurridas de 6 a 10 semanas en el

medio de elongación, las plantas sanas y enraizadas se transfirieron a macetas (110 mm de diámetro) con una mezcla de turba: vermiculita (3:2), como sustrato. La aclimatación de las plantas a las condiciones de invernadero se llevó a cabo cubriendo las macetas con vasos de plástico durante los primeros 10 días y regando con una solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) durante el primer mes (**Figura 10H**), después se trasplantaron a macetas de plástico de 50 l en el umbráculo (**Figura 10I**). Aunque se obtuvieron plantas haploides, dobles haploides y mixoploides los porcentajes de inducción de la ginogénesis y de plantas regeneradas fueron bajos.

Para mejorar las frecuencias de inducción, en 2013 se optimizó el protocolo de ginogénesis *in vitro* teniendo en cuenta factores clave como el genotipo, el medio de cultivo y el medio de elongación. Para ello se incluyeron, además de se compararon dos medios de cultivo, el protocolo de Jakše y Bohanec (2003) y el de Michalik y col. (2000) y se probó el efecto del contenedor, tubos de vidrio con tapón de plástico y cajas de polipropileno con un filtro de aireación (Eco2box-green filter-Model 80MM H, Duchefa), sobre el desarrollo de los embriones (**Figura 10J,K**). Además, el elevado número de embriones obtenidos de la población OH-1 permitió optimizar las condiciones para el tratamiento de duplicación cromosómica y de elongación ensayando distintas concentraciones (25 y 50 μM), tiempos de aplicación (24 y 72 h), métodos de aplicación del agente diploidizante (medio sólido y líquido) y diferentes contenedores para el medio de elongación (tubos con tapón de plástico, tubos con tapón de algodón, cajas Eco2box y cajas Magenta) (**Figura 10L**). durante el desarrollo de la plántula. Este año, de nuevo se obtuvieron plantas haploides, dobles haploides y mixoploides, la cuales se aclimataron en invernadero y después se transfirieron al umbráculo. Independientemente del nivel de ploidía, algunas plantas emitieron escapo floral y otras bulbificaron.

Finalmente, en 2014 se probó la duplicación cromosómica por embriogénesis somática con las umbelas de las plantas haploides y mixoploides procedentes del cultivo *in vitro* de 2013, siguiendo el protocolo descrito por Luthar y Bohanec (1999). Las flores se cultivaron en un medio de inducción de la organogénesis durante 7 – 8 días y luego se transfirieron a un medio de diferenciación. Tras 3 – 4 semanas de cultivo aparecieron las primeras estructuras embriogénicas globulares en la base de las flores (**Figura 10M**), y se transfirieron a cajas Magenta con medio sólido de elongación. Las plántulas se aclimataron en invernadero y las dobles haploides se trasplantaron en el umbráculo y se autofecundaron (**Figura 10N**). para obtener semillas (**Figura 10O**).

Capítulo 3

EVOLUCIÓN DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA PUNGENCIA DE LA CEBOLLA (*Allium cepa* L.) Y DEL PIMIENTO (*Capsicum* spp.): DESDE SUS ORÍGENES HASTA EL POTENCIAL NUTRACÉUTICO ACTUAL.

PUBLICACIÓN I

Título: Evolución del conocimiento sobre la pungencia de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del pimiento (*Capsicum* spp.): desde sus orígenes hasta el potencial nutracéutico actual.

Autores: Fayos O, Mallor C, Garcés-Claver A.



Tipo de publicación: Revisión bibliográfica

Año de publicación: 2018.

Revista: ITEA-Información Técnica Económica Agraria, 114(2): 99–118.

DOI: <https://doi.org/10.12706/itea.2018.007>.

Factor de impacto: 0,288 (en 2017).

Área temática y clasificación (según JCR):

Q4 en Agronomía.

En este trabajo se presenta una revisión exhaustiva sobre los compuestos responsables del carácter picante del pimiento (*Capsicum* spp.) y de la cebolla (*Allium cepa* L.) así como de las técnicas analíticas, moleculares y biotecnológicas que han permitido avanzar en el conocimiento de su biosíntesis y de su control genético.

La cebolla (*A. cepa* L.) y el pimiento (*Capsicum* spp.) han sido cultivados durante miles de años por sus propiedades medicinales y terapéuticas. En la actualidad, estas propiedades bioactivas promotoras de la salud se han atribuido, principalmente, a la acción de los compuestos responsables de la pungencia de la cebolla y del pimiento. El potencial nutracéutico de los SCs en cebolla y de los CTOs y CAPs en pimiento ha despertado especial interés en las industrias tanto farmacéuticas como agroalimentarias para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Además, el aumento de la demanda por los consumidores de alimentos frescos más saludables ha incentivado el desarrollo de nuevos programas de mejora de la calidad dirigidos a la obtención de variedades hortícolas con mayores contenidos en estos compuestos nutracéuticos. La presente revisión aborda estos aspectos desde el punto de vista de la complejidad de las rutas de

biosíntesis de los compuestos y cómo las técnicas analíticas modernas, más precisas y sensibles, se han convertido en una herramienta fundamental para el estudio del carácter picante.

Contribución de la doctoranda

La doctoranda realizó una exhaustiva revisión bibliográfica sobre aquellos estudios previos relacionados con el carácter picante en pimiento y cebolla, así como en la preparación de tablas y figuras. Asimismo, la doctoranda se encargó de la redacción de la publicación. El resto de autores colaboraron en la asesoría de la preparación y redacción del documento.

Evolución del conocimiento sobre la pungencia de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del pimiento (*Capsicum* spp.): desde sus orígenes hasta el potencial nutraceutico actual. Revisión bibliográfica

O. Fayos, C. Mallor y A. Garcés-Claver*

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Departamento de Hortofruticultura. Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, España

Resumen

La cebolla (*Allium cepa* L.) y el pimiento (*Capsicum* spp.) han sido cultivados durante miles de años por sus propiedades medicinales y terapéuticas. En la actualidad, estas propiedades bioactivas promotoras de la salud se han atribuido, principalmente, a la acción de los compuestos responsables de la pungencia de la cebolla y del pimiento. El potencial nutraceutico de los sulfóxidos de cisteína en cebolla y de los capsinoides y capsaicinoides en pimiento ha despertado especial interés en las industrias tanto farmacéuticas como agroalimentarias para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Además, el aumento de la demanda por los consumidores de alimentos frescos más saludables ha incentivado el desarrollo de nuevos programas de mejora de la calidad dirigidos a la obtención de variedades hortícolas con mayores contenidos en estos compuestos nutraceuticos. La presente revisión aborda estos aspectos desde el punto de vista de la complejidad de las rutas de biosíntesis de los compuestos y cómo las técnicas analíticas modernas, más precisas y sensibles, se han convertido en una herramienta fundamental para el estudio del carácter picante.

Palabras clave: Sulfóxidos de cisteína, capsinoides, capsaicinoides, alimentos funcionales, rutas de biosíntesis, HPLC.

Abstract

Evolution of the pungency of onion (*Allium cepa* L.) and pepper (*Capsicum* spp.) from its origin to the current nutraceutical potential

Onion (*Allium cepa* L.) and pepper (*Capsicum* spp.) have been cultivated for thousands of years due to their medicinal and therapeutic properties. Nowadays, these health-promoting properties have been attributed to the bioactive compounds responsible for the pungency of onion and pepper. The nutraceutical potential showed by cysteine sulfoxides in onion and by capsinoids and capsaicinoids in pepper has given rise to a special interest in the pharmaceutical and food industries for the development of novel functional foods. In addition, the increase in demand for consumers of healthy fresh foods has stimulated the development of breeding programs for obtaining new vegetable varieties with higher contents of nutraceutical compounds. The present review addresses these aspects from the point of view of the complexity of the biosynthesis pathways of such compounds, and as modern analytical techniques, more precise and sensitive, have become a fundamental tool for the study of the pungency.

Keywords: S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, capsinoids, capsaicinoids, functional foods, biosynthesis pathways, HPLC.

* Autor para correspondencia: agarces@cita-aragon.es
<https://doi.org/10.12706/itea.2018.007>

Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L.) y el pimiento (*Capsicum* spp.) han sido cultivados durante miles de años, tanto por su valor como especia o alimento como por sus propiedades profilácticas y terapéuticas. En la actualidad, gran parte de estas propiedades medicinales se han atribuido a la acción de los compuestos responsables de la pungencia (picor) de la cebolla, los sulfóxidos de cisteína (SCs), y del pimiento, los capsinoides y capsicinoides (CTOs/CAPs). Estos compuestos son considerados nutraceuticos por su bioactividad antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, antiasmática, antimicrobiana, antiplaquetaria, antitrombótica, antiobesidad, hipocolesterolemizante, hipolipemizante e hipoglucemizante (Rose et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007; Luo et al., 2011), convirtiéndose en compuestos de gran interés para las industrias tanto farmacéuticas como agroalimentarias enfocadas al desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Además, la creciente demanda de alimentos frescos más saludables ha incentivado el desarrollo de programas de mejora de la calidad de la cebolla y del pimiento con el objeto de obtener nuevas variedades con mayores contenidos en estos compuestos. El desarrollo de técnicas analíticas, cada vez más precisas, mejora la eficiencia del criterio de selección en dichos programas y contribuyen, junto con las herramientas de la genómica y la proteómica, al esclarecimiento de las rutas de biosíntesis y de los genes implicados en la pungencia de ambos cultivos. Estos aspectos se abordan en la presente revisión.

Compuestos responsables del picor

Los SCs y CTOs/CAPs son compuestos estructuralmente muy diferentes pero comparten una característica en común: la pungencia. Ambos grupos de compuestos son capaces de activar los receptores neuronales TRPV1 (re-

ceptor potencial transitorio vainilloide tipo 1) provocando las sensaciones de picor, calor o incluso dolor.

Sulfóxidos de cisteína: precursores del aroma, sabor y picor de la cebolla

En cebolla, el contenido en compuestos azufrados puede alcanzar hasta el 5% de su peso seco. La mayoría de estos compuestos se encuentran en forma de aminoácidos no proteicos, como los SCs (Lancaster y Shaw, 1989). Los SCs son los precursores no aromáticos de una amalgama de compuestos azufrados volátiles, inestables y altamente reactivos responsables de gran variedad de aromas y sabores y de la pungencia de los *Alliums* y de algunas brásicas (Thomas y Parkin, 1994; Kubec y Dadáková, 2008).

Los trabajos de Stoll y Seebeck (1947) fueron pioneros en el análisis de los (SCs) al identificar la aliina (sulfóxido de *S*-alil-L-cisteína; ASC) en ajo (*A. sativum*). Una década más tarde se identificaron en cebolla (*A. cepa*) otros tres SCs: la isoaliina (sulfóxido de *trans*-(+)-*S*-(1-propenil)-L-cisteína; 1-PeSC), la metiina (sulfóxido de *S*-metil-L-cisteína; MeSC) y la propiina (sulfóxido de *S*-propil cisteína, PSC) (Virtanen y Matikkala, 1959; Matikkala y Virtanen, 1967). Posteriormente, el desarrollo de técnicas analíticas más sensibles y precisas facilitó la determinación de otros SCs minoritarios como la etiina (sulfóxido de *S*-etil-L-cisteína, ESC) en cebolla y ajo entre otras especies de *Allium* (Kubec et al., 1999; Kubec et al., 2000), la butiina (sulfóxido de *S*-n-butil-L-cisteína, BSC) en bulbos de *A. siculum* (Kubec et al., 2002) y el sulfóxido de *S*-(3-pentenil)-L-cisteína en semillas de cebolla de la variedad local 'tropeana' (Dini et al., 2008). Recientemente, los sulfóxidos *S*-(3-pirrolil)-L-cisteína y *S*-(2-piridil)-L-cisteína se han identificado en bulbos de algunas especies de *Allium* pertenecientes al subgénero *Melanocrommyum* (Jedelská et al., 2008; Kusterer et al., 2010).

La hidrólisis de los SCs por acción de la enzima alinasa, (*S-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxido liasa*; EC 4.4.1.4), desencadena una serie de reacciones originando gran variedad de compuestos azufrados aromáticos (Schwimmer y Mazelis, 1963) (Figura 1). En tejidos vegetales

intactos, la alinasa se confina en las vacuolas celulares mientras que los SCs se encuentran en el citoplasma. Cuando la estructura celular se rompe al cortar, masticar o cocinar el tejido, se produce la hidrólisis de los SCs [R-SO-CH₂-CH(NH₂)COOH], donde -R representa

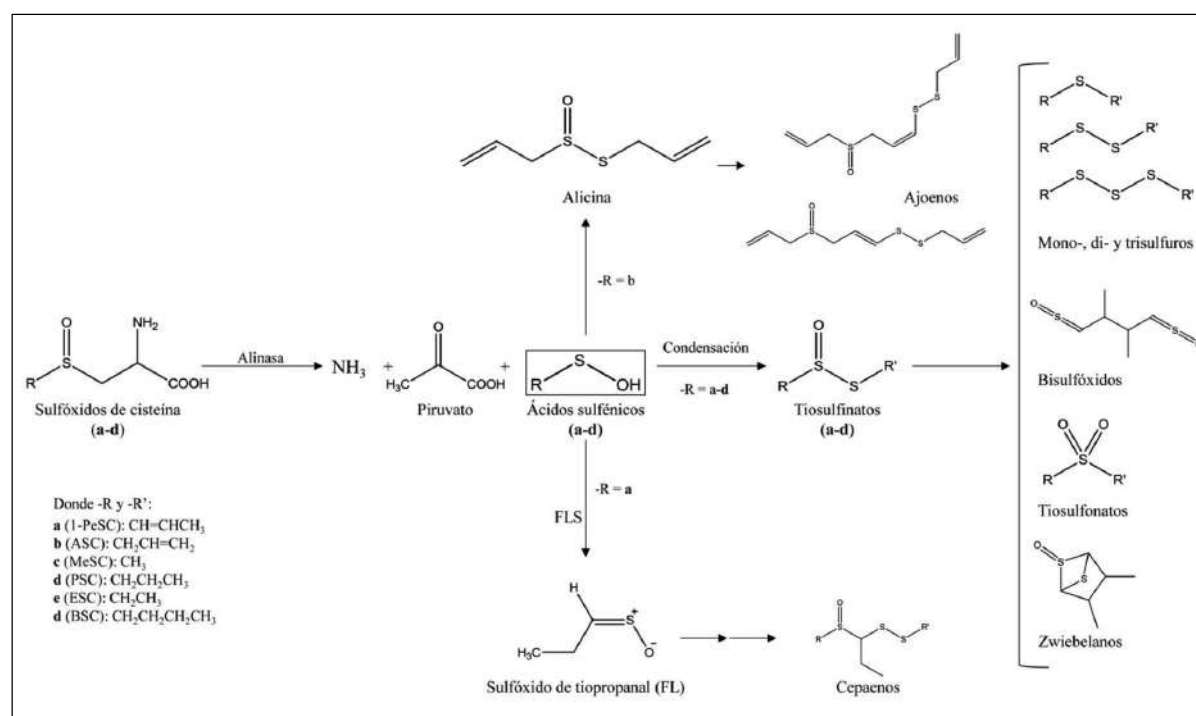


Figura 1. Reacciones químicas y compuestos generados a partir de la hidrólisis enzimática de los sulfóxidos de cisteína (modificado a partir de las rutas propuestas por Block et al., 1996; Rose et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007 y Block, 2013).

Figure 1. Chemical reactions and compounds generated from enzymatic hydrolysis of cysteine sulfoxides (modified from Block et al., 1996; Rose et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007; Block, 2013).

los grupos CH₃- (MeSC); CH₃-CH₂-CH₂- (PSC); CH₃-CH=CH- (1-PeSC) y CH₂=CH-CH- (ASC), originándose, en primer lugar piruvato, amoníaco y ácidos sulfénicos (Lancaster y Collin, 1981). Estos ácidos sulfénicos (R-S-OH), son compuestos volátiles altamente reactivos por lo que rápidamente se reorganizan y condensan en forma de tiosulfonatos (R-S-SO-R'). La heterogénea mezcla de tiosulfonatos resul-

tante es consecuencia de la naturaleza de los grupos -R y -R' de sus precursores y la proporción en la que se encuentren en la mezcla, determinará los aromas primarios, característicos de las distintas especies de *Allium*. A su vez, los tiosulfonatos son compuestos volátiles muy inestables por lo que rápidamente reaccionan entre ellos o con otros ácidos sulfénicos originando formas más estables como los tio-

sulfonatos (R-SO₂-S-R'); monosulfuros (R-S-R'); disulfuros (R-S-S-R'); trisulfuros (R-S-S-S-R') y otros tiosulfatos (Block et al., 1996; Rose et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007; Block, 2013).

La isoaliina (1-PeSC): precursor del factor lacrimógeno

En líneas generales, podemos considerar que en cebolla el SCs mayoritario es la 1-PeSC seguidamente de la MeSC y algo de PSC, aunque también se ha determinado ASC en algunas variedades (Edwards et al., 1994). En consecuencia, el ácido sulfénico mayoritario derivado de la 1-PeSC, por acción de la alinasa, es el ácido 1-propenesulfénico. Este ácido sulfénico se convierte en sulfóxido de tiopropanal, también conocido como factor lacrimógeno, por acción de una segunda enzima llamada *sinetasa factor lacrimógeno* (FLS; EC 5.3.-.-). Este factor es el responsable de la irritación y el lagrimeo ocular originados al cortar la cebolla (Imai et al., 2002).

Otros compuestos azufrados de interés

A partir de la hidrólisis enzimática de la 1-PeSC se origina el factor lacrimógeno así como una pequeña proporción de tiosulfatos, entre los que se incluyen los cepaenos, originados de forma no enzimática debido a la inestabilidad del ácido 1-propenesulfénico (Imai et al., 2002). Por otro lado, la hidrólisis de la ASC da lugar a la alicina (S-alil-2-propentiosulfato), originada por la condensación del ácido 2-propenesulfénico. La alicina es muy inestable por lo que reacciona con ella misma para formar sulfuros, trisulfuros y tiosulfatos como los ajoenos. Cepaenos y ajoenos son estructuralmente muy parecidos y ambos grupos de compuestos son de gran interés en el ámbito médico. Simultáneamente, los ácidos sulfénicos, derivados de la degradación de todos los SCs, originan una mezcla de tiosulfatos, bisulfóxidos y zwiebelanos, entre otros (Block et al., 1996; Rose et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007; Block, 2013).

Otros compuestos azufrados de gran interés son los γ -glutamil péptidos (γ GPs), que si bien no contribuyen directamente con el aroma, sabor y picor, actúan como reserva de nitrógeno y azufre durante la dormancia de los bulbos y como intermediarios en la ruta de biosíntesis de los SCs (Lancaster y Shaw, 1989).

La síntesis de unos compuestos azufrados en lugar de otros y la proporción en la que se encuentran están influenciadas por las características genéticas de la planta y las condiciones ambientales en las que crece y se desarrolla. La formación de unos compuestos u otros es el factor determinante para el desarrollo de unos determinados aromas y sabores característicos de cada especie, así como de las diferentes actividades biológicas (Yoo y Pike, 1998).

Capsinoides y capsinoides (CTOs/CAPs) responsables del picor en Capsicum

Los capsinoides y capsinoides (CTOs/CAPs) son exclusivos del género *Capsicum* y si bien no contribuyen en su valor nutritivo, son los causantes del picor y calor característico del pimiento al ser consumido. Los capsinoides (CAPs) han sido objeto de estudio desde principios del siglo XIX, sin embargo, la estructura química de la capsicina [(E)-N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metil-6-nonanamida; Cap] no se determinó hasta 1919 (Nelson, 1919). La Cap y la dihidrocapsicina [N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metilnonanamida; dhCap] son los mayoritarios, representando hasta el 90% del contenido total de CAPs (Aza-González et al., 2011). Aunque Cap, dhCap y nordihidrocapsicina [N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-7-metiloctanamida; ndhCap] son los tres CAPs más frecuentes, en la actualidad se han descrito, en frutos de pimiento, más de 20 análogos a la Cap (Bosland y Votava, 2012).

El descubrimiento de los capsinoides fue posterior; Yazawa et al. (1989) identificaron en los

frutos del cultivar 'CH19-Sweet' (*C. annuum*) un grupo de compuestos análogo a los CAPs a los que llamaron *capsaicinoid-like substances* (CLSs). Años más tarde Kobata et al. (1998) establecieron la estructura química de los CLSs y los renombraron como capsinoides (CTOs). Hasta la fecha se han descrito tres CTOs naturales, capsiato (4-hidroxi-3-metoxibenzil (*E*)-8-metil-6-nonanoato; Cto), dihidrocapsiato (4-hidroxi-3-metoxibenzil 8-metilnonanoato; dhCto) y nordihidrocapsiato (4-hidroxi-3-metoxibenzil 7-metiloctanoato; ndhCto), siendo los dos primeros los mayoritarios. No obstante, al igual que ocurre con los CAPs, podrían existir otros CTOs minoritarios.

Diferencias entre capsinoides (CTOs) y capsicinoides (CAPs)

Los CAPs se forman por la condensación de un anillo de vanillilamina, común a todos ellos, con una cadena de ácidos grasos, de longitud variable (C7-C13) mediante un enlace amida. A diferencia de los CAPs, los CTOs se forman por la condensación mediante un enlace éster, del alcohol vainillico, común a todos ellos, con cadenas de ácidos grasos similares a las que intervienen en la formación de CAPs. La longitud, la presencia de insaturaciones y/o ramificaciones en la cadena de ácidos grasos determinará el tipo de CTOs/CAPs biosintetizados y el grado de picor (Curry et al., 1999; Lang et al., 2006). La estructura química afecta a la intensidad del picor de cada compuesto, de este modo, los humanos somos capaces de percibir cada CAPs por separado; por ejemplo, la Cap y la dhCap son los más irritantes, la homodihidrocapsicina es muy irritante pero también penetrante y punzante y la ndhCap es la menos irritante (Bosland y Votava, 2012). A su vez, el picor de los CAPs es aproximadamente 1000 veces mayor que el de los CTOs (Tanaka et al., 2015).

Paralelamente a lo que ocurre con los SCs, las diferentes combinaciones de CAPs confieren unas características determinadas al picor de cada una de las variedades de pimiento. Por

otra parte, la baja pungencia de los CTOs en comparación con los CAPs ofrece una alternativa al desarrollo de nuevas variedades de pimiento poco picantes para consumo en fresco con altos contenidos en compuestos bioactivos. Conocer en profundidad la biosíntesis y el control genético de todos estos compuestos es esencial para el desarrollo de marcadores moleculares útiles en la selección, mediante programas de mejora, de nuevas variedades adaptadas a las preferencias del consumidor.

Biosíntesis de los compuestos relacionados con el picor

La genética de la pungencia de la cebolla y del pimiento lleva siendo objeto de estudio desde hace más de 50 años; sin embargo, ni las rutas de biosíntesis de estos compuestos ni los genes implicados en ellas se conocen en su totalidad. A continuación se detallan los conocimientos actuales sobre la biosíntesis y el control genético de los SCs y los CTOs/CAPs.

Ruta biosíntesis de los SCs

Actualmente existen dos rutas propuestas para la biosíntesis de SCs, mientras una propone a los γ GP como intermediarios (Lancaster y Shaw, 1989), la otra sugiere la serina como precursor de la biosíntesis de SCs (Granroth, 1970). La ruta de biosíntesis mayormente aceptada plantea la biosíntesis de los SCs por medio de la S-alqu(en)ilación de la cisteína en glutatión, seguido de una transpeptidación para eliminar una glicina y formar γ -glutamil cisteína, su oxidación en sulfóxido de γ -glutamil cisteína y finalmente, la eliminación del grupo γ -glutamil para producir el SCs. Por otra parte, la ruta biosintética alternativa excluye el glutatión a favor de la alqu(en)ilación directa de la cisteína o de la tioalqu(en)ilación de la o-acetil serina seguida por la oxidación en sulfóxido. Sin embargo,

la contribución de ambas rutas en la biosíntesis de SCs así como los genes implicados en cada una de ellas sigue aún sin conocerse en profundidad (Jones et al., 2004).

Control genético de la pungencia en cebolla (A. cepa)

La pungencia en cebolla es un carácter controlado por la acción de pocos genes (Owen, 1961). Sin embargo, el alto grado de alogamia, la depresión por consanguinidad y el carácter bienal que presentan las poblaciones de cebolla junto con el gran tamaño del genoma que incluye un elevado número de repeticiones, mucho mayor que el de otras especies de *Allium*, tomate o maíz, han dificultado la identificación de genes relacionados con la biosíntesis de los SCs así como de las rutas metabólicas en las que intervienen. Adicionalmente a la variabilidad genética, en numerosos estudios se ha documentado la influencia, sobre el contenido de SCs, de factores ambientales como el año de cultivo, la estación del año, la temperatura, el riego, la disponibilidad de azufre y nitrógeno en el medio de cultivo o el tiempo de almacenamiento (Simon, 1995; Randle et al., 1995; Mallor et al., 2011).

Mediante estudios de mapeo de QTLs (*locus* de un carácter cuantitativo, del inglés *quantitative trait loci*), se identificó, a partir del cruce entre los cultivares de cebolla 'BYG15-23' y 'AC43', un QTL localizado en el cromosoma 5 directamente correlacionado con el contenido total de materia seca y la pungencia (Galmarini et al., 2001). Dicho *locus* fue posteriormente confirmado en el cruce 'W202A' x 'Texas Grano 438' además de otro QTL mayor, directamente relacionado con el contenido en sólidos solubles y sin efectos pleiotrópicos, muy ligado a dos genes del cromosoma 3 codificantes para las enzimas ATP sulfúrilasa (EC 2.7.7.4) y la sulfito reductasa (ferredoxina; EC 1.8.7.1), implicadas en las reacciones de metabolismo del azufre y su incorporación a la cisteína, respectivamente (McCallum et al., 2007).

La heredabilidad en sentido amplio del carácter pungente de la cebolla se estima entre 0,5-0,71 y se correlaciona positivamente con el contenido en sólidos solubles y materia seca total (Mallor et al., 2011). Sin embargo, esta correlación se reduce significativamente tras las siguientes generaciones, obteniéndose en programas de mejora una buena respuesta a la selección de variedades dulces de cebolla, independientemente del contenido en sólidos solubles (Simon, 1995). La selección de cultivares con un amplio rango de adaptabilidad en cuanto a pungencia, capacidad de almacenamiento y cualidades para la industria alimentaria es un hito importante en los programas de mejora. En ese sentido, la determinación del contenido de SCs mediante técnicas analíticas precisas es fundamental, en mejora, para una buena selección de variedades de cebolla adaptadas a la demanda del consumidor.

La biosíntesis de los capsinoides y capsicinoides (CTOs/CAPs)

Como se ha comentado con anterioridad, el descubrimiento de los CTOs es mucho más reciente que los CAPs. Por ello, el conocimiento actual sobre la biosíntesis y el control genético de los CTOs, se basa en el conocimiento previamente establecido para los CAPs. La biosíntesis de los CTOs/CAPs se inicia a los 15-20 días después de la antesis (dda) hasta alcanzar su máximo a los 40 dda y se acumulan principalmente en vesículas celulares de la placenta, el pericarpio y las semillas (Iwai et al., 1979; Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2017). La base de la ruta de biosíntesis de los CAPs se estableció, por primera vez, a finales de los años 60 por Bennett y Kirby (1968) y por Leete y Loudon (1968) a partir de la combinación de otras dos rutas de biosíntesis (Figura 2). Por un lado, la ruta de los fenilpropanoides genera el anillo aromático de CTOS/CAPs a partir de la fenilalanina, y por otro lado, la ruta de los áci-

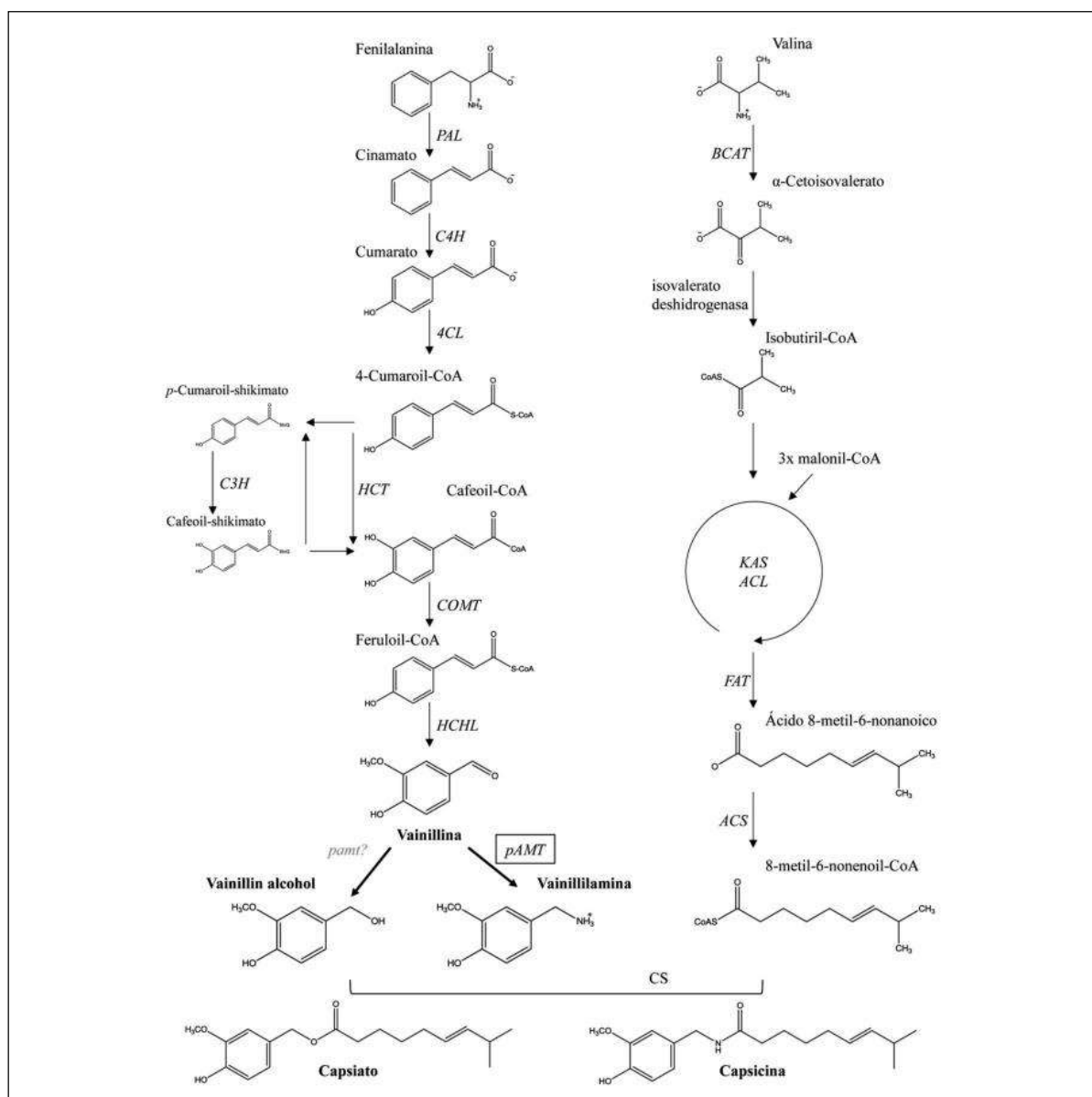


Figura 2. Ruta de biosíntesis de los capsicinoides. PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato CoA ligasa; HCT, hidroxycinamoil transferasa; C3H, cumarato 3-hidroxilasa; COMT, ácido cafeico-O-metiltransferasa; HCHL, hidroxycinamoil-CoA hidratasa/liasa; pAMT, aminotransferasa putativa; BCAT, transferasa de aminoácidos de cadena ramificada; KAS, b-cetoacil-ACP sintasa; ACL, proteína transportadora de grupos acilos; FAT, acil-ACP tioesterasa; ACS, Acil-CoA sintetasa; CS, capsaicina sintasa (modificada a partir de las rutas de biosíntesis propuestas por Stewart et al., 2005; Tanaka et al., 2010a,b y Aza-González et al., 2011).

Figure 2. Capsaicinoid biosynthesis pathway. PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumaroyl-CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl transferase; C3H, coumarate 3-hydroxylase; COMT, caffeic acid O-methyltransferase; HCHL, hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase; pAMT, putative aminotransferase; BCAT, branched-chain amino acid transferase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; ACL, acyl carrier protein; FAT, acyl-ACP thioesterase; ACS, acyl-CoA synthetase; CS, capsaicin synthase (modified from Stewart et al., 2005; Tanaka et al., 2010a,b y Aza-González et al., 2011).

dos grasos produce, a partir de los aminoácidos valina y leucina, las cadenas de ácidos grasos (Leete y Loudon, 1968; Sutoh et al., 2006).

El control genético del picante en Capsicum spp.

El uso de radiotrazadores en la identificación de compuestos precursores e intermedios y de técnicas de análisis de la expresión de genes como Northern Blot y RT-PCR han permitido establecer la participación de los genes fenilalanina amonio liasa (*PAL*), cinamato 4-hidroxilasa (*C4H* o también conocido como *Ca4H*), cumarato 3-hidroxilasa (*C3H*), ácido cafeico-*O*-metiltransferasa (*COMT* o *CCoAOMT*), 4-cumarato CoA ligasa (*4CL*), hidroxicinamoil transferasa (*HCT*), hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (*HCHL*) y amino-transferasa putativa (*pAMT*) en la ruta de los fenilpropanoides; así como, la de los genes transferasa de aminoácidos de cadena ramificada (*BCAT*), α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (*BCKDH*), β -cetoacil-ACP sintasa (*Kas*), proteína transportadora de grupos acilos (*AcI*), acil-ACP tioesterasa (*FatA*) y acil-CoA sintetasa (*ACS*) en la ruta de los ácidos grasos (Bennett y Kirby, 1968; Leete y Loudon, 1968; Stewart et al., 2005; Aza-González et al., 2011). Basándose en el conocimiento previo, varios autores determinaron correlaciones entre los niveles de transcritos de los genes *PAL*, *C4H*, *COMT* y *pAMT*, expresados en la placenta, y el grado de picor de los frutos (Curry et al., 1999; Aza-González et al., 2011). Sin embargo, según el estudio recientemente publicado por Tanaka et al. (2017), basado en la técnica qRT-PCR, no existe relación directa entre el nivel de expresión de los genes *PAL*, *C4H*, *4CL*, *HTC*, *C3H*, *COMT*, y la acumulación de CAPs; debido probablemente a la participación de dichos genes en otras rutas biosintéticas implicadas en la producción de múltiples metabolitos secundarios como flavonoides y ligninas (Tanaka et al., 2017). En este mismo estudio tampoco en-

cuentran una correlación directa y consistente de los genes *BCKDH*, *ACL*, *FAT* y *ACS* con la acumulación de CAPs pero sí para los genes *Pun1*, *pAMT*, *KAS* y *BCAT*. Dado que la diferencia esencial entre CAPs y CTOs reside en el anillo aromático derivado de la vainillina, los genes clave para la biosíntesis de CAPs y/o CTOs estarán involucrados en la ruta de los fenilpropanoides, en concreto de los genes *Pun1* y *pAMT*.

El gen Pun1 determina la presencia/ausencia del picor

El gen dominante *Pun1* (también conocido como locus *C*, *lov*, *Catf-1*) codifica para una enzima aciltransferasa (*AT3*), clave en la biosíntesis de CAPs y aparentemente, también de CTOs (Stewart et al., 2005; Lang et al., 2006; Han et al., 2013; Tanaka et al., 2017).

Por otro lado, la capsicina sintetasa (*CS*) es la última enzima de la ruta de biosíntesis de CAPs y es la responsable de la condensación del anillo aromático derivado de la vainillina con la cadena de ácidos grasos (Figura 2). Sin embargo, el gen que codifica para la *CS* así como la localización de la *AT3* en la ruta de biosíntesis aún no se conocen (Han et al., 2013).

En consecuencia, todas las plantas de pimiento con frutos picantes presentan el genotipo *Pun1Pun1* o *Pun1pun1* (Han et al., 2013). En la actualidad se han encontrado cuatro mutaciones distintas para este gen y todas ellas dan lugar a plantas con frutos no picantes. Inicialmente se identificó el alelo *pun1*¹, en los cultivares de *C. annuum* 'Jupiter', 'Maor' y 'Jalapeño Sweet 3575', el cual contiene una gran delección de 2,5 kb a lo largo de la región promotora y el primer exón que impide la transcripción a ARNm (Stewart et al., 2005). Poco después se descubrió el alelo *pun1*² en el cultivar 'NMCA 30036' (*C. chinense*), cuya delección de 4 pb en el primer exón, produce un cambio en el marco de lectura y por consiguiente, en la secuencia de

aminoácidos dando como resultado el truncamiento de AT3 (Stewart et al., 2007) y el alelo *pun1³* descrito en el cultivar PI594141 (*C. frutescens*) el cual presenta una delección de 70 aminoácidos en la región terminal de la AT3 (Stellari et al., 2010). Por último, el alelo *pun1⁴* se ha descrito recientemente en el cultivar japonés 'Nara Murasaki' (*C. annuum*) cuya mutación causada por la inserción de un nucleótido (A) en el segundo exón causa un cambio en el marco de lectura originando el truncamiento de la proteína (Kirii et al., 2017).

El gen pAMT responsable de la biosíntesis de CAPs y CTOs

El gen *pAMT* codifica para la enzima pAMT, una aminotransferasa encargada de la conversión de vainillina en vainillilamina (Curry et al., 1999). En la actualidad se han descrito ocho alelos mutados para el gen *pAMT* en un pequeño número de cultivares, produciéndose en todos ellos una mayor biosíntesis de CTOs en detrimento de CAPs. Por todo ello, *pAMT* ha sido propuesto como una pieza clave para la formación de CTOs durante la biosíntesis de CAPs. Los alelos *pamt¹* y *pamt²* fueron descritos en *C. annuum* (Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2010a). El alelo *pamt¹* del cultivar 'CH-19 Sweet' contiene una inserción (T) en la posición 1291, dicha mutación crea un nuevo codón de parada (TGA) y el alelo *pamt²*, identificado en el cultivar 'Himo', se caracteriza por la sustitución de una T por una C en la posición 775 pb afectando al dominio PLP de la proteína, ambas mutaciones ocasionan la pérdida de función de la enzima pAMT. Paralelamente, se han descrito otros cinco alelos mutados en la especie *C. chinense*: el alelo *pamt³* identificado en el cultivar 'Belize Sweet' contiene una inserción de 5 pb en el 8° exón; el alelo *pamt⁴* descrito en 'Zavory Hot' contiene una inserción de 2,3 kb en el 5° intrón; el alelo *pamt⁵* de

'Ají Dulce Strain2', 'No.2' y 'SNU11-001' se caracteriza por dos inserciones, una de 2,3 kb en 3° intrón y otra de 8 pb en el 6° exón (Tanaka et al., 2010b; Koeda et al., 2014; Jang et al., 2015); el alelo *pamt⁶* con una inserción de 7 pb en el 2° exón, se encontró en el cultivar 'Pimiento' (No.80) (Koeda et al., 2014) y el alelo *pamt⁷*, con una inserción de un fragmento de 2.8 kb en el 2° exón en los cultivares 'LP6' y 'LP12' (Tanaka et al., 2015). Los fragmentos de 2,3 kb de los alelos *pamt⁵* y *pamt⁶* y 2,8 kb del alelo *pamt⁷* corresponden a la inserción del transposón *Tcc* (transposón de *Capsicum chinense*). Todas las inserciones en *C. chinense* producen un cambio en el marco de lectura dando lugar a una proteína truncada, incluso las inserciones en regiones intrónicas de los alelos *pamt⁴* y *pamt⁵* ya que la inserción del *Tcc* cambia el patrón de *splicing* del gen *pAMT* por lo que parte del *Tcc* se transcribe (Tanaka et al., 2010b). Por último, el alelo *pamt⁸* descrito en el genotipo 'S3212' (*C. frutescens*) contiene una delección de 12 pb en el 7° exón y un polimorfismo de un solo nucleótido (o SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) de una T por una C en la posición 1089 pb (Park et al., 2015).

No obstante, ninguna de las mutaciones descritas en el gen *pAMT* ha sido capaz de bloquear completamente la ruta de biosíntesis de CAPs. Dado que en algunos cultivares muy picantes con *pAMT* no mutado se han detectado trazas de CTOs y en todos los cultivares descritos con *pamt* mutado se sintetizan pequeñas cantidades de CAPs, otros genes, además de *pAMT*, podrían estar controlando la biosíntesis de los CTOs (Han et al., 2013; Tanaka et al., 2015). La identificación de genotipos en los que se biosinteticen únicamente CTOs es esencial para determinar el control genético de los CTOs, y en consecuencia, fundamental en programas de mejora para el desarrollo de variedades poco picantes con altos contenidos en compuestos bioactivos.

Evolución de las técnicas analíticas en la determinación de los SCs en cebolla y de los CTOs/CAPs en pimiento

Durante décadas la determinación, directa o indirecta, de SCs en cebolla y de CTOs/CAPs en pimiento se ha llevado a cabo mediante métodos organolépticos, colorimétricos o de cromatografía en papel o en capa fina. Dada la poca precisión y especificidad de estos métodos, en la actualidad se han visto desplazados por técnicas analíticas más precisas y sensibles como la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía líquida de (ultra)alta resolución (U)HPLC.

Métodos analíticos en la determinación de SCs

La determinación de SCs en cebolla se ha llevado a cabo tanto por métodos directos como indirectos. Aunque los métodos basados en el contenido de ácido pirúvico, ácidos sulfénicos o tiosulfatos han sido ampliamente utilizados como medida indirecta del picor de la cebolla (Schwimmer y Mazelis, 1963; Rose et al., 2005; Randle et al., 1995; Kubec et al., 1999; Bacon et al., 1999; Mallor et al., 2011), en ocasiones es difícil establecer una relación significativa, y por lo general, se acaba subestimando el contenido real de SCs (Randle et al., 1995; Wang et al., 2007). Por ello, la determinación directa de los SCs ha evolucionado desde métodos cualitativos y semicuantitativos, mediante cromatografía en papel, analizadores de aminoácidos o cromatografía en capa fina (CCF) (Virtanen y Matikkala, 1959; Matikkala y Virtanen, 1967; Granroth, 1968; Lancaster y Kelly, 1983), hasta los más modernos y cuantitativos basados en técnicas más precisas y sensibles como la CG y la (U)HPLC.

Dada la extrema inestabilidad de los SCs, la mayoría de métodos analíticos publicados requieren de un paso de derivatización de la

muestra previo al análisis mediante CG y (U)HPLC. Los diferentes agentes de derivatización junto con la versatilidad de ambas técnicas han permitido el desarrollo de numerosos métodos analíticos para la determinación de SCs en cebolla y otras especies de *Allium*, originando gran disparidad de resultados (Tabla 1). La cuantificación de SCs mediante HPLC acoplada a detectores de fluorescencia (FL) no logró una adecuada separación de los picos (Thomas y Parkin, 1994), por lo que los detectores de absorbancia cobraron especial interés en la determinación de SCs. La HPLC acoplada a detectores ultravioleta (UV) se ha utilizado tanto para la identificación (Auger et al., 1993) como para la cuantificación de SCs en cebolla. Mientras que Edwards et al. (1994) desarrollaron un método de HPLC-UV, con gradiente y sin derivatización de la muestra, capaz de cuantificar PeSC, MeSC, PSC y por primera vez, ASC en cebolla, otros métodos de HPLC-UV menos sensibles no han sido capaces de detectar ASC y/o PSC (Randle et al. 1995; Yoo y Pike, 1998). Esta técnica ha sido utilizada como método de rutina en estudios de evolución del contenido de SCs en determinadas condiciones de almacenamiento o de abonado con azufre (Lancaster et al., 1998; Uddin y MacTavish, 2003). Sin embargo, ciertos métodos de CG con detección por espectrometría de masas (MS) mostraron mayor sensibilidad que los de HPLC-UV, especialmente en la determinación de SCs minoritarios (Tsuge et al., 2002; Wang et al., 2007), considerándose una buena alternativa a la HPLC. De hecho, Kubec et al. (2000) desarrollaron un método por CG-FID-MS capaz de cuantificar PeSC, MeSC, PSC, ASC y por primera vez, ESC en cebolla y otras 14 especies de *Allium*.

Otros detectores de absorbancia, utilizados en la determinación de SCs, acoplados a la HPLC son los de arreglo de diodos (DAD) y los de fotodiodos (PDA). A pesar de que la HPLC-DAD se ha utilizado con fines tan diversos

Tabla 1. Lista de métodos analíticos publicados para la determinación de sulfoxidos de cisteína en cebolla (*A. cepa*) y otras especies de *Allium*
 Table 1. List of published analytical methods used for cysteine sulfoxide determination in onion (*A. cepa*) and other *Allium* species

Referencia	Método Analítico	AD ¹	SCs detectados en <i>A. Cepa</i>	SCs detectados en otras especies de <i>Allium</i>
Virtanen y Matikkala, 1959	Analizadores aa _x	–	MeSC, PSC	
Matikkala y Virtanen, 1967	Analizadores aa _x	–	1-PeSC, MeSC, PSC	
Granroth, 1968	CCF	–	1-PeSC, MeSC, ASC, PSC	En <i>A. sativum</i> y <i>A. schoenoprasum</i> : 1-PeSC
Lancaster y Kelly, 1983	CCF	–	1-PeSC, MeSC, PSC	
	CG-MS	N-TFA	1-PeSC, MeSC	
Auger et al., 1993	HPLC-UV	OPA	1-PeSC, MeSC	En <i>A. sativum</i> : ASC, MeSC; en <i>A. schoenoprasum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC
	HPLC-UV	PITC*	1-PeSC, MeSC	En <i>A. sativum</i> : ASC, MeSC; en <i>A. schoenoprasum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC
Thomas y Parkin, 1994	HPLC-FL	FMOG	1-PeSC, MeSC	En <i>A. sativum</i> : ASC, MeSC, 1-PeSC; en <i>A. porrum</i> : 1-PeSC, MeSC
Edwards et al., 1994	HPLC-UV	–	1-PeSC, MeSC, ASC, PSC	En <i>A. sativum</i> : ASC, MeSC, 1-PeSC; en <i>A. porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC
Randle et al., 1995	HPLC-UV	PITC	1-PeSC, MeSC, PSC	
Yoo y Pike, 1998	HPLC-UV	Dns-Cl	1-PeSC, MeSC	En <i>A. sativum</i> , <i>A. ampeloprasum</i> , <i>A. tuberosum</i> , <i>A. schoenoprasum</i> : MeSC, ASC, 1-PeSC y en <i>A. fistulosum</i> : 1-PeSC, MeSC
Lancaster et al., 1998	HPLC-UV	PITC	1-PeSC, MeSC, PSC	
Bacon et al., 1999	HPLC-DAD	–	1-PeSC, MeSC	
Kopsell et al., 1999	HPLC-PDA	PITC	1-PeSC, MeSC, PSC	
Kubec et al., 2000	CG-FID-MS	ECF	1-PeSC, MeSC, PSC, ASC, ESC	En <i>A. schoenoprasum</i> , <i>A. porrum</i> , <i>A. nutans</i> , <i>A. ochotense</i> , <i>A. altynolicum</i> , <i>A. ursinum</i> , <i>A. altaicum</i> , <i>A. fistulosum</i> , <i>A. ampeloprasum</i> , <i>A. ascalonicum</i> , <i>A. chinense</i> , <i>A. longicauspis</i> 1-PeSC, MeSC, PSC, ASC, ESC; en <i>A. victorialis</i> : MeSC, PSC, ASC, ESC y en <i>A. aflatunense</i> : MeSC, ASC, 1-PeSC, ESC

Tabla 1. Lista de métodos analíticos publicados para la determinación de sulfoxidos de cisteína en cebolla (*A. cepa*) y otras especies de *Allium* (continuación)
 Table 1. List of published analytical methods used for cysteine sulfoxide determination in onion (*A. cepa*) and other *Allium* species (continuation)

Referencia	Método Analítico	AD ¹	SCs detectados en <i>A. Cepa</i>	SCs detectados en otras especies de <i>Allium</i>
Tsuge et al., 2002	GC-MS	TBDMs	1-PeSC*, MeSC, PSC	
	HPLC-UV	OPA	1-PeSC, MeSC, PSC	
Uddin y MacTavish, 2003	HPLC-UV	PITC	1-PeSC, MeSC, PSC	
Wang et al., 2007	CG-FID	MCF	1-PeSC, MeSC, ASC*	
	HPLC-UV	OPA	1-PeSC, MeSC, ASC	
Dini et al., 2008	HPLC-PDA	–	1-PeSC, MeSC, PSC, ASC, ESC, BSC, 3-PnSC	
Kubec y Dadáková, 2008	CCEM	FMOC	1-PeSC, MeSC	En <i>A. sativum</i> , <i>A. ascalonicum</i> , <i>A. schoenoprasum</i> y <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC, ASC
Mallor y Thomas, 2008	HPLC-DAD	–	1-PeSC, MeSC, PSC	
Kubec y Dadáková, 2009	HPLC-PDA	Dns-Cl*	1-PeSC, MeSC, PSC, ESC	En <i>A. sativum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, ESC; en <i>A. ascalonicum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, PSC y en <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC, ESC
		FMOC	1-PeSC, MeSC, PSC	En <i>A. sativum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC; en <i>A. ascalonicum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, PSC y en <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC, ESC
		OPA	1-PeSC, MeSC, PSC, ESC	En <i>A. sativum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, ESC; en <i>A. ascalonicum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, PSC y en <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC, ESC

Tabla 1. Lista de métodos analíticos publicados para la determinación de sulfóxidos de cisteína en cebolla (*A. cepa*) y otras especies de *Allium* (continuación)
 Table 1. List of published analytical methods used for cysteine sulfoxide determination in onion (*A. cepa*) and other *Allium* species (continuation)

Referencia	Método Analítico	AD ¹	SCs detectados en <i>A. Cepa</i>	SCs detectados en otras especies de <i>Allium</i>
	CG-FID-MS	ECF	1-PeSC, MeSC, PSC, ESC	En <i>A. sativum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, ESC; en <i>A. ascalonicum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC, PSC, ESC y en <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC, ESC
	EC-UV	FMOC	1-PeSC, MeSC	En <i>A. sativum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC; en <i>A. ascalonicum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC y en <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> : 1-PeSC, MeSC, PSC
Masamura et al., 2011	HPLC-DAD	PITC	1-PeSC, MeSC, ASC	En <i>A. fistulosum</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC
Kim et al., 2016	HPLC-ESI/MS2	–	1-PeSC, MeSC, PSC	
Feroli y D' Antuono, 2016	HPLC-DAD	OPA	1-PeSC, MeSC, ASC	En <i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i> y <i>A. oschaninii</i> : 1-PeSC, MeSC, ASC
Böttcher et al., 2017	UHPLC-ESI-QTOF/MS	–	1-PeSC, MeSC, PSC	
Mitrová et al., 2016	UHPLC-ESI-QqQ/MS2	–	1-PeSC, MeSC, PSC, ASC	

¹Agente de derivatización. *Mejor detección. Abreviaturas: aax, aminoácidos; CCF, cromatografía en capa fina; CG, cromatografía de gases; MS, espectrometría de masas; (U)HPLC, cromatografía líquida de (ultra)alta resolución; UV, fluorescencia; DAD, detector de arreglo de diodos; PDA, detector de fotodiodos; FID, detector de ionización de llama; CCEM, cromatografía capilar electrocromática micelar; EC electroforesis capilar; ESI, ionización por electrospray; MS2, espectrometría de masas en tándem; QTOF, detector cuadrupolo-tiempo de vuelo; QqQ, detector triple cuadrupolo; N-TFA, N-trifluoroacetil n-butil ésteres; OPA, o-ftalaldehído; PITC, fenilisotiocianato; FMOC, cloroformiato de metilo; MeSC, metiina; PSC, propiina; 1-PeSC, isoaliina; ASC, aliina; ESC, etiina; BSC: butiina; 3-PnSC: sulfóxido de S-(3-pentenil)-L-cisteína.

como el estudio de genes implicados en la ruta de biosíntesis de SCs en cebolletas de las especies *A. fistulosum* y *A. cepa* grupo *aggregatum* (Masamura et al., 2011), la caracterización de germoplasma en variedades locales de cebollas y chalotas de Italia y Ucrania (Ferioli y D'Antuono, 2016) y en la evaluación del contenido de SCs en función del genotipo, tejido y tiempo de almacenamiento (Bacon et al., 1999) o fotoperiodo (Mallor y Thomas, 2008), la sensibilidad de la técnica no permite la determinación de los minoritarios. Por otro lado, la mayor sensibilidad de la HPLC-PDA ha permitido la separación y cuantificación de SCs y algunos γ GP's simultáneamente (Kopsell et al., 1999; Kubec y Dadáková, 2009), así como la identificación de ESC, BSC y 3-PeSC además de los 4 principales, en semillas de *A. cepa* var. 'tropeana' (Dini et al., 2008), perfilándose como técnica prometedora en la determinación de SCs.

Simultáneamente, se desarrollaron otros métodos basados en la electroforesis capilar (EC) y cromatografía capilar electrocinética micelar, técnica híbrida entre la EC y la HPLC. Si bien la sensibilidad de estas técnicas es menor a la proporcionada por HPLC o CG, son una buena alternativa para análisis de rutina por su rapidez y bajo coste (Kubec y Dadáková, 2008 y 2009).

Por último, la (U)HPLC acoplada a detección por MS y MS/MS (en tándem) es la herramienta más potente que existe actualmente para la determinación de SCs en cebolla. La identificación inequívoca de los compuestos proporcionada por dicha técnica ha permitido su precisa cuantificación en estudios de caracterización de germoplasma (Mitrová et al., 2016), en el control de la evolución del contenido de SCs por efecto de la temperatura en diversos tratamientos culinarios (Kim et al., 2016) y en el análisis del perfil metabólico de la cebolla (Böttcher et al., 2017).

Determinación de CAPs y CTOs

Las primeras determinaciones del picor en pimiento se realizaron mediante el test organoléptico de Scoville (Scoville, 1912). En este test, un panel de catadores puntúa el nivel de picor, de una serie de diluciones de extractos de pimiento, en unidades Scoville (SHU, del inglés *Scoville Heat Units*). Aunque actualmente este método se sigue utilizando para evaluar el grado de picor, es un método subjetivo y poco preciso, viéndose desplazado por métodos analíticos de cromatografía por CG y (U)HPLC.

Si bien en la determinación de CAPs se han utilizado satisfactoriamente tanto la CG como la (U)HPLC, la inestabilidad de los CTOs ha condicionado su determinación exclusivamente por técnicas de (U)HPLC. La HPLC-UV es la técnica más utilizada, por su rapidez y sencillez, en la determinación de los principales CAPs y CTOs en frutos de pimiento, sobre todo en estudios focalizados en el control genético del picor (Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2010a,b; Tanaka et al., 2015; Tanaka et al., 2017). Simultáneamente, otros métodos de HPLC combinada con detectores (DAD/PDA) se han utilizado para la detección de los principales CTOs/CAPs en estudios de evaluación de la diversidad de metabolitos y caracterización de germoplasma (Singh et al., 2009; Wahyuni et al., 2011; Han et al., 2013; Coutinho et al., 2015; Jang et al., 2015). En comparación con los detectores de absorbancia, la detección por FL aporta un aumento de sensibilidad a la técnica de HPLC. La (U)HPLC-FL ha permitido la determinación de Cap y dhCap en diferentes alimentos y salsas picantes (Barbero et al., 2016) así como en la identificación y cuantificación de CAPs minoritarios en estudios de maduración en frutos de la variedad 'Malagueta' para evaluar el contenido individual y total de CAPs (Fayos et al., 2017).

Sin embargo, todas estas técnicas tienen limitaciones en cuanto a selectividad y sensibilidad, ya que tanto CTOs como CAPs emiten a la misma longitud de onda.

Por el contrario, la identificación inequívoca proporcionada por MS y MS/MS es fundamental para una determinación precisa de los compuestos minoritarios. La MS y MS/MS acoplada a la CG o a la (U)HPLC ha permitido la determinación de CAPs, mayoritarios y hasta 15 minoritarios en frutos y oleorresinas de pimiento, espráis de defensa, sangre y tejidos (Thompson et al., 2005; Garcés-Claver et al., 2006; Schweiggert et al., 2006). Además, la HPLC-MS/MS ha permitido el establecimiento de los patrones de fragmentación de CAPs (Reilly et al., 2001; Schweiggert et al., 2006) y de CTOs (Fayos et al., 2018).

Perspectivas futuras de la investigación del carácter picante

El carácter picante en *Capsicum*, considerado uno de los principales factores de calidad, incentiva el desarrollo de programas de mejora, enfocados a la obtención variedades de pimiento cada vez más picantes (Guzman y Bosland, 2017). No obstante, el picor del pimiento es un atributo no siempre deseable y apreciado por todos los consumidores. En consecuencia, un futuro objetivo de mejora deberá también enfocarse a la obtención de variedades poco picantes con altos contenidos en capsinoides y bajos o nulos contenidos de capsicinoides, adaptándose a la demanda de los mercados europeos (Silvar y García-González, 2017). Otras líneas de creciente interés son la mejora de la calidad en cebolla mediante la obtención de plantas doble haploides, utilizando ginogénesis *in vitro*, para la obtención de híbridos (Fayos et al., 2015) así como los programas de mejora específicos para la producción de cebollas tradicionales, como el tipo *calçot* (Simó et al., 2014), muy apreciada en algunas regiones de España.

No obstante, para alcanzar los objetivos de mejora de la calidad planteados a lo largo de esta revisión, es fundamental seguir investigando sobre la biosíntesis de capsinoides y capsicinoides en pimiento y de sulfóxidos de cisteína en cebolla. En este sentido, caben destacar los trabajos de Tanaka et al. (2017) y Han et al. (2013), relacionados con la identificación de genes responsables de la biosíntesis de capsinoides y capsicinoides, así como los llevados a cabo por Martínez-López et al. (2014), basados en la aplicación de herramientas genómicas para el desarrollo de transcritomas en *C. annuum*. Con respecto a la cebolla, hay que señalar la importante contribución de Block (2013) y Block et al. (1996) a la investigación de la biosíntesis de los sulfóxidos de cisteína en cebolla y otros *Alliums*.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA-FEDER (RTA2011-00118-C02-01 y RTA2015-00042-C02-01) y el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación A16). O. Fayos es beneficiaria de una beca predoctoral FPI-INIA.

Bibliografía

- Auger J, Mellouki F, Vannereau A, Boscher J, Cosson L, Mandon N (1993). Analysis of *Allium* sulfur amino acids by HPLC after derivatization. *Chromatographia* 36: 347-350.
- Aza-González C, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant cell reports* 30: 695-706.
- Bacon JR, Moates GK, Ng A, Rhodes MJC, Smith AC, Waldron KW (1999). Quantitative analysis of flavour precursors and pyruvate levels in different tissues and cultivars of onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry* 64: 257-261.

- Barbero GF, Liazid A, Azaroual L, Palma M, Barroso CG (2016). Capsaicinoid contents in peppers and pepper-related spicy foods. *International journal of food properties* 19: 485-493.
- Bennett DJ, Kirby GW (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal of the Chemical Society C: Organic* 4: 442-446.
- Block E, Bayer T, Naganathan S, Zhao SH (1996). *Allium* chemistry: synthesis and sigmatropic rearrangements of alk(en)yl 1-propenyl disulfide s-oxides from cut onion and garlic. *Journal of the American Chemical Society* 118: 2799-2810.
- Block E (2013). Fifty years of smelling sulfur. *Journal of Sulfur Chemistry* 34: 158-207.
- Bosland PW, Votava EJ (2012). Peppers: vegetable and spice *Capsicums*, 2nd Ed. CAB International, MA, USA. 230 pp.
- Böttcher C, Krähmer A, Stürtz M, Widder S, Schulz H (2017). Comprehensive metabolite profiling of onion bulbs (*Allium cepa*) using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics* 13: 35.
- Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* 18: 609-625.
- Coutinho JP, Barbero GF, Fayos O, Garcés-Claver A, Godoy HT, Palma M, Barroso CG (2015). Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. *Talanta* 134: 256-263.
- Curry J, Aluru M, Mendoza M, Nevarez J, Melen-drez M, O'Connell MA (1999). Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science* 148: 47-57.
- Dini I, Tenore GC, Dini A (2008). S-alkenyl cysteine sulfoxide and its antioxidant properties from *Allium cepa* var. *tropeana* (red onion) seeds. *Journal of Natural Products* 71: 2036-2037.
- Edwards SJ, Musker D, Collin HA, Britton G (1994). The analysis of S alk(en)yl L cysteine sulfoxides (flavour precursors) from species of *Allium* by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 5: 4-9.
- Fayos O, Vallés MP, Garcés-Claver A, Mallor C, Castillo AM (2015). Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germ-plasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. *Front. Plant Sci.* 6: 384.
- Fayos O, Aguiar AC, Jiménez-Cantizano A, Ferreira-González M, Garcés-Claver A, Martínez J, Mallor C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG, Barbero GF (2017). Ontogenetic variation of individual and total capsaicinoids in Malagüeta peppers (*Capsicum frutescens*) during fruit maturation. *Molecules* 22: 736.
- Fayos O, Barbero GF, Savirón M, Orduna J, Durán AG, Palma M, Molinillo JMG, Macías FA, Barroso CG, Mallor C, Garcés-Claver A (2018). Synthesis of (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF). *Open Chemistry* 16: 87-94.
- Feroli F, D'Antuono LF (2016). Evaluation of phenolics and cysteine sulfoxides in local onion and shallot germplasm from Italy and Ukraine. *Genetic resources and crop evolution* 63: 601-614.
- Galmarini CR, Goldman IL, Havey MJ (2001). Genetic analyses of correlated solids, flavour, and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 265: 543-551.
- Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés MS, Abadía J, Gil-Ortega R, Álvarez-Fernández A (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 9303-9311.
- Granroth B (1968). Separation of *Allium* sulfur amino acids and peptides by thin-layer electrophoresis and thin-layer chromatography. *Acta Chemica Scandinavica* 22: 3333-3335.
- Granroth B (1970). Biosynthesis and decomposition of cysteine derivatives in onion and other *Allium* species. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae A* 154: 71.
- Guzman I, Bosland PW (2017). Sensory properties of chile pepper heat - and its importance to food quality and cultural preference. *Appetite* 117: 186-190.

- Han K, Jeong HJ, Sung J, Keum YS, Cho MC, Kim JH, Kwon JK, Kim BD, Kang BC (2013). Biosynthesis of capsinoid is controlled by the *Pun1* locus in pepper. *Molecular breeding* 31: 537-548.
- Imai I, Tsuge N, Tomotake M, Nagatome Y, Sawada H, Nagata T, Kumagai H (2002). An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* 419: 685.
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979). Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agricultural and Biological Chemistry* 43: 2493-2498.
- Jang S, Han K, Jo YD, Jeong HJ, Siddique MI, Kang BC (2015). Substitution of a dysfunctional *pAMT* allele results in low-pungency but high levels of capsinoid in *Capsicum chinense* 'Habanero'. *Plant Breed and Biotechnology* 3: 119-128.
- Jedelská J, Vogt A, Reinscheid UM, Keusgen M (2008). Isolation and identification of a red pigment from *Allium* subgenus *Melanocrommyum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1465-1470.
- Jones MG, Hughes J, Tregova A, Milne J, Tomsett AB, Collin HA (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* 55: 1903-1918.
- Kim S, Lee S, Shin D, Yoo M (2016). Change in organosulfur compounds in onion (*Allium cepa* L.) during heat treatment. *Food Science and Biotechnology* 25: 115-119.
- Kirii E, Goto T, Yoshida Y, Yasuba K, Tanaka Y (2017). Non-pungency in a Japanese chili pepper landrace (*Capsicum annuum*) is caused by a novel loss-of-function *Pun1* allele. *The Horticulture Journal* 86: 61-69.
- Kobata K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T (1998). Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 46: 1695-1697.
- Koeda S, Sato K, Tomi K, Tanaka Y, Takisawa R, Hosokawa M, Doi M, Nakazaki T, Kitajima A (2014). Analysis of non-pungency, aroma, and origin of a *Capsicum chinense* cultivar from a Caribbean island. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 83: 244-251.
- Kopsell DE, Randle WM, Eiteman MA (1999). Changes in the S-alk(en)yl cysteine sulfoxides and their biosynthetic intermediates during onion storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 177-183.
- Kubec R, Svobodová M, Velíšek J (1999). Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *Journal of Chromatography A* 862: 85-94.
- Kubec R, Svobodová M, Velíšek J (2000). Distribution of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor: S-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 428-433.
- Kubec R, Kim S, McKeon DM, Musah RA (2002). Isolation of S-n-butylcysteine sulfoxide and six n-butyl-containing thiosulfonates from *Allium siculum*. *Journal of Natural Products* 65: 960-964.
- Kubec R, Dadáková E (2008). Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* 1212: 154-157.
- Kubec R, Dadáková E (2009). Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *Journal of Chromatography A* 1216: 6957-6963.
- Kusterer J, Vogt A, Keusgen M (2010). Isolation and identification of a new cysteine sulfoxide and volatile sulfur compounds from *Allium* subgenus *Melanocrommyum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 520-526.
- Lancaster JE, Collin HA (1981). Presence of allinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulfoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters* 22: 169-176.
- Lancaster JE, Kelly E (1983). Quantitative analysis of the S-alk(en)-yl-L-cysteine sulfoxides in onion (*Allium cepa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 1229-1235.
- Lancaster JE, Shaw ML (1989). γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavour precursors) in *Allium*. *Phytochemistry* 28: 455-460.

- Lancaster JE, Shaw ML, Randle WM (1998). Differential hydrolysis of alk(en)yl cysteine sulfoxides by alliinase in onion macerates: flavour implications. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 367-372.
- Lang Y, Yanagawa S, Sasanuma T, Sasakuma T (2006). A gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. *Breeding Science* 56: 55-62.
- Lang Y, Kisaka H, Sugiyama R, Nomura K, Morita A, Watanabe T, Tanaka Y, Yazawa S, Miwa T (2009). Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *The Plant Journal* 59: 953-961.
- Leete E, Loudon MCL (1968). Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *Journal of the American Chemical Society* 90: 6837-6841.
- Luo XJ, Peng J, Li YJ (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology* 650: 1-7.
- Mallor C, Thomas B (2008). Resource allocation and the origin of flavour precursors in onion bulbs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83: 191-198.
- Mallor C, Balcells M, Mallor F, Sales E (2011). Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. *Plant Breeding* 130: 55-59.
- Martínez-López LA., Ochoa-Alejo N, Martínez O (2014). Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. *BMC Genomics* 15: 143.
- Masamura N, Yaguchi S, Ono Y, Nakajima T, Masuzaki SI, Imai S, Yamauchi N, Shigyo M (2011). Characterization of amino acid and S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide production in Japanese bunching onion carrying an extra chromosome of shallot. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 80: 322-333.
- Matikkala EJ, Virtanen AI (1967). On the quantitative determination of the amino acids and γ -glutamyl peptides of onion. *Acta Chemica Scandinavica* 21: 2891-2897.
- McCallum J, Pither-Joyce M, Shaw M, Kenel F, Davis S, Butler R, Scheffer J, Jakse J, Havey MJ (2007). Genetic mapping of sulphur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 815-822.
- Mitrová K, Hrbek V, Svoboda P, Hajšlová J, Ovesná J (2016). Antioxidant activity, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide and polyphenol content in onion (*Allium cepa* L.) cultivars are associated with their genetic background. *Czech Journal of Food Sciences* 34: 127-132.
- Nelson EK (1919). The constitution of capsaicin, the pungent principle of *Capsicum*. *Journal of the American Chemical Society* 41: 1115-1121.
- Owen EW (1961). The inheritance of dry matter in onion bulbs. M.S. Thesis. Univ. Idaho, Moscow, Idaho. 35 pp.
- Park YJ, Nishikawa T, Minami M, Nemoto K, Iwasaki T, Matsushima K (2015). A low-pungency S3212 genotype of *Capsicum frutescens* caused by a mutation in the putative aminotransferase (*p-AMT*) gene. *Molecular genetics and genomics* 290: 2217-2224.
- Randle WM, Lancaster JE, Shaw ML, Sutton KH, Hay RL, Bussard ML (1995). Quantifying onion flavor compounds responding to sulfur fertility-sulfur increases levels of alk(en)yl cysteine sulfoxides and biosynthetic intermediates. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 1075-1081.
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA (2001). Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 912: 259-267.
- Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ (2005). Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural product reports* 22: 351-368.
- Schweiggert U, Schieber A, Carle R (2006). Effects of blanching and storage on capsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili peppers (*Capsicum frutescens* L.). *Innovative food science & emerging technologies* 7: 217-224.

- Schwimmer S, Mazelis M (1963). Characterization of Alliinase of *Allium cepa* (onion). Archives of Biochemistry and Biophysics 100: 66-73.
- Scoville WL (1912). Note on *Capsicums*. Journal of Pharmaceutical Sciences 1: 453-454.
- Silvar C, García-González CA (2017). Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. Scientia Horticulturae 218: 249-257.
- Simó J, Pascual L, Cañizares J, Casanas F (2014). Spanish onion landraces (*Allium cepa* L.) as sources of germplasm for breeding calçots: a morphological and molecular survey. Euphytica 195:287-300.
- Simon PW (1995). Genetic analysis of pungency and soluble solids in long-storage onions. Euphytica 82:1-8.
- 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: 3452-3457.
- Stellari GM, Mazourek M, Jahn MM (2010). Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. Heredity 104: 460-471.
- Stewart JC, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM (2005). The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. The Plant Journal 42: 675-688.
- Stewart JC, Mazourek M, Stellari GM, O'connell M, Jahn M (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. Journal of Experimental Botany 58: 979-991.
- Stoll A, Seebeck E (1947). Alliin, the pure mother substance of garlic oil. Experientia 3: 114-115.
- Sutoh K, Kobata K, Yazawa S, Watanabe T (2006). Capsinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 sweet. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 70: 1513-1516.
- Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T, Yazawa S (2010a). Newly mutated putative-aminotransferase in nonpungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogues. Journal of agricultural and food chemistry 58: 1761-1767.
- Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T, Yazawa S (2010b). Novel loss-of-function putative aminotransferase alleles cause biosynthesis of capsinoids, nonpungent capsaicinoid analogues, in mildly pungent chili peppers (*Capsicum chinense*). Journal of agricultural and food chemistry 58: 11762-11767.
- Tanaka Y, Sonoyama T, Muraga Y, Koeda S, Goto T, Yoshida Y, Yasuba K (2015). Multiple loss-of-function putative aminotransferase alleles contribute to low pungency and capsinoid biosynthesis in *Capsicum chinense*. Molecular Breeding 35: 142.
- Tanaka Y, Nakashima F, Kirii E, Goto T, Yoshida Y, Yasuba KI (2017). Difference in capsaicinoid biosynthesis gene expression in the pericarp reveals elevation of capsaicinoid contents in chili peppers (*Capsicum chinense*). Plant cell reports 36: 267-279.
- Thomas DJ, Parkin KL (1994). Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42: 1632-1638.
- Thompson RQ, Phinney KW, Welch MJ, White E (2005). Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry 381: 1441-1451.
- Tsuge K, Kataoka M, Seto Y (2002). Determination of S-methyl-, S-propyl-, and S-propenyl-L-cysteine sulfoxides by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butyldimethylsilylation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 4445-4451.
- Uddin MM, MacTavish HS (2003). Controlled atmosphere and regular storage-induced changes in S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and alliinase activity in onion bulbs (*Allium cepa* L. cv. Hy-sam). Postharvest Biology and technology 28: 239-245.
- Virtanen AI, Matikkala EJ (1959). The isolation of S-methyl-L-cysteine sulfoxide and S-n-propyl-

- L-cysteine sulfoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta chemica scandinavica* 13(9): 1898-1900.
- Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72: 1358-1370.
- Wang H, Li J, Wang Z, Zhang X, Ni Y (2007). Modified method for rapid quantitation of S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide in yellow onions (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5429-5435.
- Yazawa S, Suetom N, Okamoto K, Namiki T (1989). Content of capsaicinoids and capsaicinoid-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrids made with 'CH-19 Sweet' as a parent. *Journal of the Japanese society for horticultural science* 58: 601-607.
- Yoo KS, Pike LM (1998). Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Scientia Horticulturae* 75: 1-10.
- (Aceptado para publicación el 1 de diciembre de 2017)

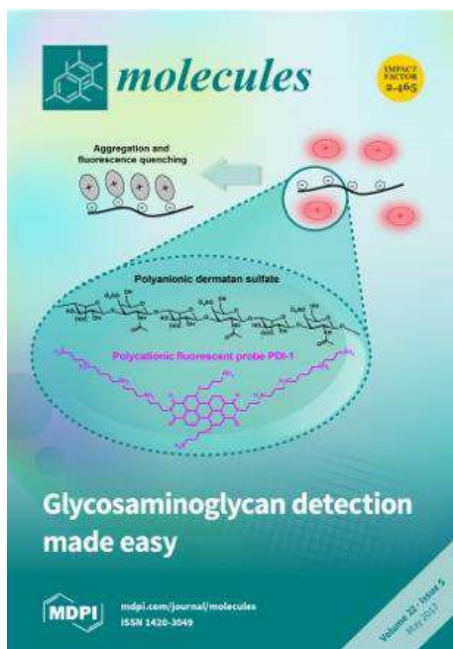
Capítulo 4

ONTOGENETIC VARIATION OF INDIVIDUAL AND TOTAL CAPSAICINIDS IN MALAGUETA PEPPERS (*Capsicum frutescens*) DURING FRUIT MATURATION

PUBLICACIÓN II

Título: Ontogenetic variation of individual and total capsaicinoids in Malagueta peppers (*Capsicum frutescens*) during fruit maturation

Autores: Fayos O, de Aguiar AC, Jiménez-Cantizano A, Ferreiro-González M, Garcés-Claver A, Martínez J, Mallor C, Ruíz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG, Barbero GF.



Tipo de publicación: artículo científico

Año de publicación: 2017

Revista: *Molecules*, 22(5): 736.

DOI: doi:10.3390/molecules22050736

Factor de impacto: 3,098 (en 2017).

Área temática y clasificación (según JCR): Q2 en química multidisciplinar.

En este trabajo se ha estudiado la variación ontogenética del contenido total e individual de los 5 CAPs (ndhCap, Cap, dhCap, hCap y hdhCap) presentes en el pimiento ‘Malagueta’ (*Capsicum frutescens*). Las plantas del pimiento ‘Malagueta’ se cultivaron en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Los CAPs se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido (UAE) y los extractos se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC) con detección de fluorescencia. Durante los primeros 12 – 33 días se observó un aumento significativo en el contenido total de CAPs. Entre los días 33 y 40 hubo una ligera reducción en el contenido total de CAPs (disminución del 3,3%). La Cap fue el CAPs principal, seguido de la dhCap, la ndhCap, la hCap y la hdhCap. Al analizar la evolución de los CAPs con los valores estandarizados, se verificó que ndhCap, dhCap y hdhCap (capsicinoides similares a la dihidrocapsicina) presentan un patrón de comportamiento similar, mientras que hCap y Cap (capsicinoides similares a la capsicina) muestran patrones de evolución diferentes.

Contribución de la doctoranda

La doctoranda colaboró en la planificación de la metodología. Realizó la preparación y obtención del material vegetal necesarias para cumplir con los objetivos propuestos, con la supervisión de Garcés-Claver A, Mallor C y Barbero GF. Además, la doctoranda analizó los resultados obtenidos en el análisis y participó en la redacción del manuscrito

Article

Ontogenetic Variation of Individual and Total Capsaicinoids in Malagueta Peppers (*Capsicum frutescens*) during Fruit Maturation

Oreto Fayos ¹, Ana Carolina de Aguiar ², Ana Jiménez-Cantizano ³, Marta Ferreiro-González ⁴, Ana Garcés-Claver ¹, Julián Martínez ², Cristina Mallor ¹, Ana Ruiz-Rodríguez ⁴, Miguel Palma ⁴, Carmelo G. Barroso ⁴ and Gerardo F. Barbero ^{4,*}

¹ Agrifood Research Centre of Aragón (CITA), Montañana Avenue, 930, 50059 Zaragoza, Spain; ofayos@cita-aragon.es (O.F.); agarces@cita-aragon.es (A.G.-C.); cmallor@aragon.es (C.M.)

² Department of Food Engineering, College of Food Engineering, University of Campinas, DEA/FEA/UNICAMP, Campinas 13083-862, SP, Brazil; aguiarea@gmail.com (A.C.d.A.); julian@fea.unicamp.br (J.M.)

³ Department of Chemical Engineering and Food Technology, Faculty of Sciences, University of Cádiz, Agrifood Campus of International Excellence (CeIA3), IVAGRO, P.O. Box 40, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain; ana.jimenezcantizano@uca.es

⁴ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cádiz, Agrifood Campus of International Excellence (CeIA3), IVAGRO, P.O. Box 40, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain; marta.ferreiro@uca.es (M.F.-G.); ana.ruiz@uca.es (A.R.-R.); miguel.palma@uca.es (M.P.); carmelogarcia@uca.es (C.G.B.)

* Correspondence: gerardo.fernandez@uca.es; Tel.: +34-956-016355

Academic Editor: Isabel C. F. R. Ferreira

Received: 30 March 2017; Accepted: 30 April 2017; Published: 3 May 2017

Abstract: The ontogenetic variation of total and individual capsaicinoids (nordihydrocapsaicin (n-DHC), capsaicin (C), dihydrocapsaicin (DHC), homocapsaicin (h-C) and homodihydrocapsaicin (h-DHC)) present in Malagueta pepper (*Capsicum frutescens*) during fruit ripening has been studied. Malagueta peppers were grown in a greenhouse under controlled temperature and humidity conditions. Capsaicinoids were extracted using ultrasound-assisted extraction (UAE) and the extracts were analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UHPLC) with fluorescence detection. A significant increase in the total content of capsaicinoids was observed in the early days (between 12 and 33). Between day 33 and 40 there was a slight reduction in the total capsaicinoid content (3.3% decrease). C was the major capsaicinoid, followed by DHC, n-DHC, h-C and h-DHC. By considering the evolution of standardized values of the capsaicinoids it was verified that n-DHC, DHC and h-DHC (dihydrocapsaicin-like capsaicinoids) present a similar behavior pattern, while h-C and C (capsaicin-like capsaicinoids) show different evolution patterns.

Keywords: capsaicinoids; *Capsicum frutescens*; Malagueta pepper; ontogenetic variation; pepper ripening; UHPLC

1. Introduction

Hot peppers are widely used as a flavoring and a spice throughout the world due to their color, aroma and characteristic pungency [1,2]. Peppers are the only plants that are able to produce alkaloids belonging to the capsaicinoid family and these compounds are responsible for the characteristic pungency. Capsaicinoids are nonvolatile alkaloids that are acid amides of C₉–C₁₁ branched-chain fatty acids and vanillylamines [3]. Capsaicin (C) and dihydrocapsaicin (DHC) are the predominant molecules and they represent up to 90% of total capsaicinoids. Some other related compounds, such as

nordihydrocapsaicin (n-DHC), homocapsaicin (h-C) and homodihydrocapsaicin (h-DHC), are also present in minor amounts [4,5] (Figure 1). In *Capsicum* plants these compounds are synthesized naturally in the placenta of the pepper fruit, where they accumulate in vesicles, by enzymatic condensation of vanillylamine and different-sized fatty acid chains that are elongated by a fatty acid synthase [6].

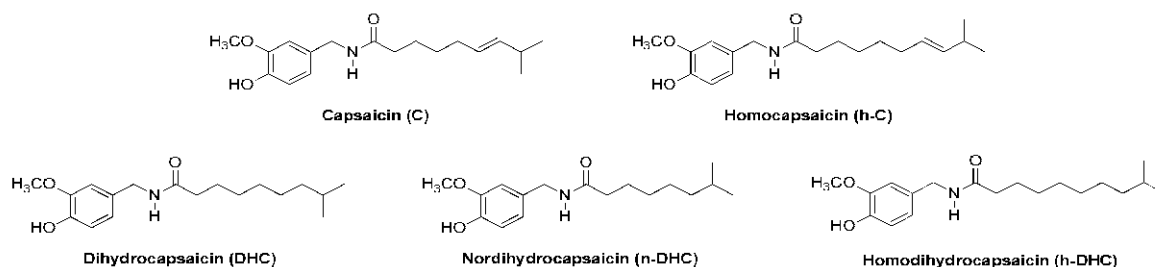


Figure 1. Chemical structures of the major capsaicinoids capsaicin, homocapsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin.

Capsaicinoids have attracted a great deal of attention in recent years due to their proven strong pharmacological properties. They can be used in pain relief, cancer prevention and weight reduction, and they also have gastrointestinal and cardiovascular benefits [7–10].

It has been demonstrated that capsaicinoids are synthesized and accumulated in the placenta of peppers [11,12]. In general, the results of studies carried out to elucidate the process of accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* fruits over the maturation period indicate that these compounds begin to accumulate in the early stages of fruit development and then continue to accumulate until they reach a maximum, which is usually found after 40–60 days of ripening [13–18]. Beyond this point the trend reverses due to the degradation of capsaicinoids associated with the action of peroxidases, which are highly capable of degrading C and DHC [19,20]. In some studies there are certain varieties of peppers (Peter Pepper) in which this decrease in the total content of capsaicinoids was not observed over time [21]. Capsaicinoid accumulation and the activity of the corresponding biosynthetic enzymes are sensitive to environmental conditions such as the availability of water, the stage of fruit development [15,22,23], mineral nutrition [24,25] and any infections suffered by the pepper plants [26]. Furthermore, it is known that the capsaicinoid content of peppers can vary between different fruits within the same plant, even when they are harvested at the same time after flowering [27], and in peppers that have different node positions [28]. Something similar happens with various compounds in plants of the family *Molluginaceae* [29]. The most widely used technique for the analysis of capsaicinoids is reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [4,30–33]. In recent years, reversed phase-ultra-performance liquid chromatography (RP-UHPLC) has become a more effective and more rapid alternative for the analysis of capsaicinoids in peppers [34–37].

Capsicum peppers have a high economic importance in Brazil since this country is a center of genetic diversity and one of the world's largest pepper producers [38]. In 2005, *Capsicum* peppers were the second-most exported vegetable from Brazil, with an export volume of 9222 tons. Malagueta pepper (*Capsicum frutescens*) is one of the most popular domestic varieties that is cultivated in the Brazilian territory [together with Dedo-de-Moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) and Murupi (*Capsicum chinense*) peppers] [39,40]. Malagueta pepper is also widely consumed in Portugal, Angola and Mozambique. It is a small, tapered green pepper of about 5 cm in length that turns red as it matures. Two sizes are seen in markets and these sometimes are given different names: the smaller ones are called “malagueta” in Brazil and “piri piri” in Portugal and Mozambique, and the larger ones are called “malagueta” in Brazil and Portugal. This pepper is used to season many regional dishes and sauces, including poultry dishes in Portugal [41–43].

The aim of the work described here was to evaluate the accumulation of individual and total capsaicinoids (n-DHC, C, DHC, h-C and h-DHC) during the ripening of Malagueta peppers. One of the most important parameters in commercial Malagueta peppers is the capsaicinoid content. In this way, farmers would be able to collect Malagueta peppers according to their capsaicinoid content.

2. Results and Discussion

2.1. Evolution of the Total Capsaicinoid Content in Malagueta pepper

Malagueta pepper plants began to produce peppers in the second week of July. The peppers were harvested on September 30 (11 weeks later). The monitoring was carried out during maturation starting 12 days after the appearance of the first pepper and was continued to a state of over-ripeness (S-10, Table 1). In the state of over-ripeness, peppers showed water loss (dehydration) and a very intense red coloration. The visual states of the peppers at harvest are described in Table 1.

Table 1. Malagueta pepper status at the time of harvest.

Code	Start of Fruit Development	Days Till Harvest	Visual State at Harvest
S-1	18/09	12	Green color
S-2	11/09	19	Green color
S-3	04/09	26	Green color
S-4	28/08	33	Green color
S-5	21/08	40	Green/red color
S-6	14/08	47	Red color
S-7	07/08	54	Red color
S-8	31/07	61	Red color
S-9	24/07	68	Red color
S-10	17/07	75	Over-ripeness

It can be seen from Figure 2 that the total capsaicinoid content in Malagueta pepper increased from the first point of harvest at 12 days (0.829 mg capsaicinoid g⁻¹ FW) up to 33 days, where it reached a concentration of 2.119 mg capsaicinoid g⁻¹ FW. Between days 33 and 40 there was a slight reduction in the total capsaicinoid content (3.3% decrease). From day 40 there was a slight increase in the total capsaicinoid content until day 54 (2.328 mg capsaicinoid g⁻¹ FW). From day 54 a slight reduction in the total capsaicinoid content was again observed until day 61 (2.2% decrease). Finally, a further increase was observed in the total content of capsaicinoids due to the loss of water. In a global context, the total capsaicinoids content in Malagueta pepper rises from the first point of harvest at 12 days until 75 days, at which point there is a concentration of 2.568 mg capsaicinoid g⁻¹ FW, which corresponds to an increase of over 300% compared to the initial capsaicinoid content.

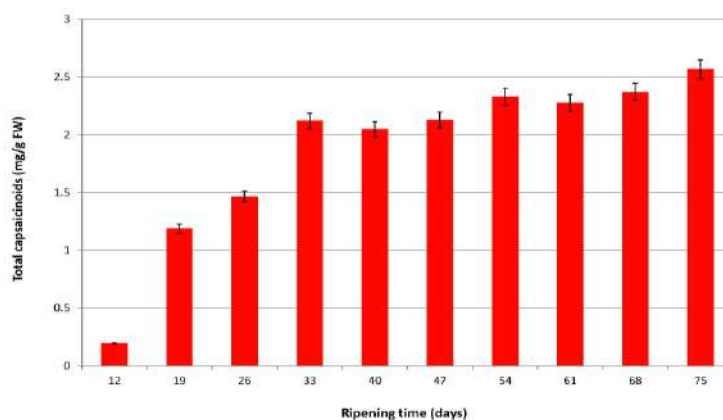


Figure 2. Total capsaicinoids (mg g⁻¹ FW) in Malagueta pepper during fruit ripening (*n* = 3).

Generally, studies on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* fruits have shown a concentration increase in these compounds during the early stages of fruit development, and this is maintained during ripening until a maximum value is reached, usually between days 40 and 60 [13–16,18]. After this time there is a reverse in the trend and a marked reduction in the capsaicinoid content is observed. This change is associated with the presence of peroxidases that are capable of degrading C and DHC, as evidenced by the results of in vitro experiments performed by Bernal et al. [19,20].

In the study reported here, two perceptible decreases were observed in the amount of capsaicinoids during the maturation period: a decrease of approximately 3.3% was observed between days 33 and 40 and a reduction of 2.2% was verified between days 54 and 61. We consider that this second decrease in the capsaicinoid content could be due to both the action of the peroxidases and the reduced synthesis of capsaicinoids in the pepper due to the cultivation conditions in the greenhouse. The final increase in the total content of capsaicinoids is because of the loss of water by overripening of the peppers. As a consequence, it cannot be stated that a marked reduction in the levels of capsaicinoids occurs in the Malagueta pepper during the ripening time, a finding in contrast to that obtained in other accumulation studies available in the literature. Furthermore, the onset of the decrease in the total capsaicinoid content was observed at day 33 of ripening. The onset of this decrease is also more rapid when compared to those in the aforementioned studies [13–16,18]. In the actual study, in contrast to what is generally observed in the literature a significant increase in the content of capsaicinoids is observed in the early days (between 12 and 33), followed by two more modest increase to the end of the maturation process of the peppers. It is believed that this behavior may be due to the growing conditions in the greenhouse, where temperature, humidity, irrigation and fertilization were all controlled. A similar trend has been observed in Peter Pepper when it was grown under controlled conditions in a greenhouse [21]. According to these results it can be observed that in this variety of pepper a notable decrease in the total capsaicinoid content as happens with other varieties did not occur. Therefore, peppers could be collected (if so desired) from day 33, to harvest them with a high concentration of capsaicinoids, since from this moment on the total capsaicinoid concentration remains practically constant.

2.2. Evolution of the Individual Contents of Capsaicinoids in Malagueta pepper

Five capsaicinoids—n-DHC, C, DHC, h-C and h-DHC—were identified in Malagueta peppers at different ripening stages. The concentration of each individual capsaicinoid (expressed as mg capsaicinoid g^{−1} FW) in Malagueta pepper during fruit ripening is shown in Table 2. C was the major capsaicinoid, followed by DHC, n-DHC, h-C and h-DHC. The capsaicinoid profile is consistent with that reported by Aguiar et al. [44], with values of 1.02 mg g^{−1} FW for C and 0.496 mg g^{−1} FW for DHC from Malagueta obtained in a study of native peppers from Brazil. In this variety of pepper, capsaicin is the major capsaicinoid throughout maturation, unlike other pepper varieties, like Cayenne pepper, in which the major capsaicinoid switches between C and DHC during fruit ripening [13].

Table 2. Individual capsaicinoids (mg capsaicinoid g^{−1} FW) in Malagueta pepper during fruit ripening.

Day	n-DHC	C	DHC	h-C	h-DHC
12	0.035 ± 0.001	0.530 ± 0.021	0.229 ± 0.012	0.023 ± 0.001	0.013 ± 0.001
19	0.059 ± 0.002	0.761 ± 0.013	0.315 ± 0.017	0.033 ± 0.001	0.018 ± 0.001
26	0.078 ± 0.002	0.903 ± 0.043	0.430 ± 0.023	0.057 ± 0.002	0.025 ± 0.001
33	0.112 ± 0.006	1.268 ± 0.035	0.609 ± 0.022	0.086 ± 0.004	0.043 ± 0.002
40	0.105 ± 0.004	1.266 ± 0.065	0.574 ± 0.016	0.061 ± 0.003	0.041 ± 0.001
47	0.098 ± 0.003	1.350 ± 0.046	0.554 ± 0.019	0.084 ± 0.001	0.040 ± 0.002
54	0.104 ± 0.005	1.465 ± 0.021	0.615 ± 0.040	0.089 ± 0.003	0.048 ± 0.001
61	0.125 ± 0.006	1.384 ± 0.043	0.631 ± 0.032	0.085 ± 0.004	0.053 ± 0.002
68	0.117 ± 0.006	1.493 ± 0.054	0.630 ± 0.014	0.082 ± 0.004	0.048 ± 0.001
75	0.150 ± 0.009	1.589 ± 0.077	0.680 ± 0.030	0.090 ± 0.002	0.060 ± 0.005

Results are presented as mean ± SD, *n* = 3.

An overall increase in the concentration of all capsaicinoids can be observed with ripening (Table 2). The major capsaicinoids C and DHC increased by approximately 300%, whereas the minor capsaicinoids n-DHC, h-C and h-DHC increased by 430%, 390% and 470%, respectively. Regarding the decrease in total capsaicinoids that occurs between days 33 and 40 of fruit ripening, a decrease was observed with respect to individual capsaicinoids between days 33 and 40 for C and h-C (capsaicin-like capsaicinoids) and a decrease between days 33 and 47 for n-DHC, DHC and h-DHC (dihydrocapsaicin-like capsaicinoids).

The percentages of capsaicinoids found in Malagueta pepper are represented in Figure 3. A very slight variation can be observed between the different percentages of individual capsaicinoids over the ripening period. C and DHC were the major capsaicinoids and they correspond to around 90% of total capsaicinoids throughout the maturation period. This finding is in contrast to the behavior found in other varieties such as Cayenne pepper, in which the variability during fruit ripening is much more marked [13]. Capsaicin and dihydrocapsaicin have very similar biological and spicy properties. Capsaicin has 16,000,000 Scoville heat units (SHU) while dihydrocapsaicin 15,000,000 (SHU). There are only small differences between them. The other three capsaicinoids have lower pungency values, 9,100,000 SHU for n-DHC and 8,600,000 SHU for h-C and h-DHC [45–47]. In this case it is tested that the two main capsaicinoids in the Malagueta pepper are the ones that present greater pungent and biological properties.

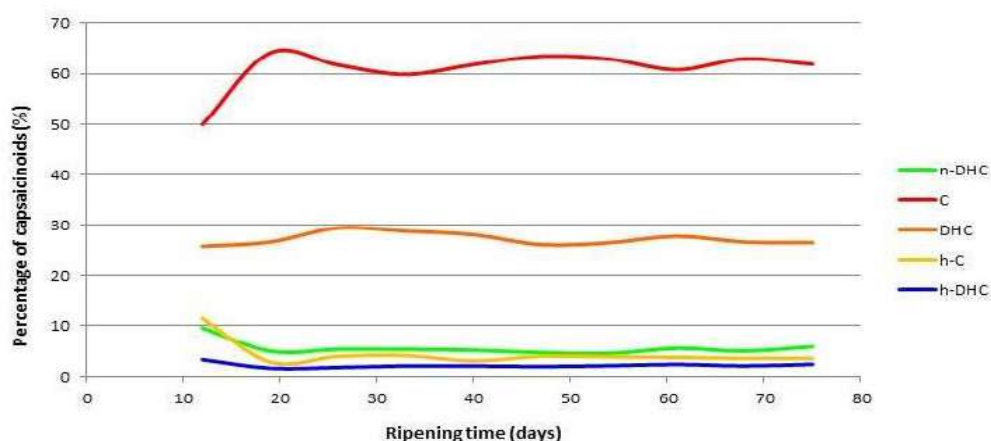


Figure 3. Percentages of individual capsaicinoids in Malagueta pepper during fruit ripening ($n = 3$).

The concentration of C ranged from 60% (33rd day) to 64% (19th day), whereas for DHC the lowest concentration of 26% was observed after 47 days and 29% after 26 days. Lower percentages were found for the minor capsaicinoids at the first harvest time (12 days) (4.21% for n-DHC, 2.76% for HC and 1.54% for h-DHC) and higher percentages were determined in the later period (75 days) (n-DHC, 5.83%; h-DHC, 2.33%), with the exception of h-C, which had the highest concentration at 33 days (4.08%).

2.3. Evolution of the Standardized Values of Capsaicinoids in Malagueta Pepper

On considering the evolution of standardized values of the five major capsaicinoids present in Malagueta pepper, it can be seen from Figure 4 that n-DHC, DHC and h-DHC (dihydrocapsaicin-like capsaicinoids) have a similar pattern of behavior whereas h-C and C (capsaicin-like capsaicinoids) show different evolution patterns.

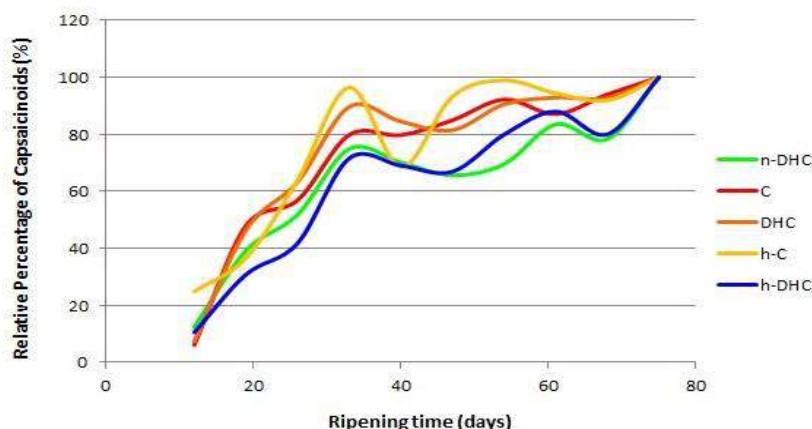


Figure 4. Relative percentages of individual capsaicinoids (standardized values) in Malagueta pepper during fruit ripening ($n = 3$).

The relative percentages of all capsaicinoids increase until the 33rd day of ripening and after this point they experience their first decrease in concentration. From this time, C and h-C show different behavior to the other capsaicinoids and they also differ from one another. h-C showed a marked decrease of 27.8%, whereas the decreases for DHC, n-DHC and h-DHC were less marked, corresponding to 5.1%, 4.7% and 2.5%, respectively. The concentration of C was practically constant at 79%.

With the exception of C and h-C, all capsaicinoids reached a minimum at 47 days of ripening, followed by an increase in concentration until the 61st day. Between days 61 and 68 there was a further drop in the relative concentrations of the capsaicinoids, once again with the exception of C. From this point (68 days → over-ripening of peppers) there was an increase in the relative percentage of capsaicinoids as the fruit dried out and the maximum concentration was reached for all capsaicinoids.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Capsaicinoid reference standards, i.e., capsaicin (97%) and dihydrocapsaicin (90%), were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Water was obtained from a Milli-Q water deionization system (Millipore, Bedford, MA, USA). Glacial acetic acid and the methanol used for both the extraction of capsaicinoids and for the chromatographic separation were HPLC grade and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

3.2. Pepper Crops

This study was conducted during the spring-summer season (April 2015–September 2015) in an automated greenhouse at the Agrifood Research Centre of Aragón (CITA-Zaragoza, Zaragoza, Spain). Average day/night greenhouse temperatures during the study period were 24/14 °C during spring and 27/19 °C during summer. Seeds were germinated in Petri dishes and, when cotyledons had developed, each plant was placed in a Jiffy-7 pot (Clause-Tezier Iberica, Almería, Spain). When the plants had three true leaves [six-week-old seedlings of Malagueta pepper cultivar (*Capsicum frutescens*)], each Jiffy pot was planted into a black plastic pot (one plant per pot; top diameter, 23 cm; bottom diameter, 17 cm; height, 18 cm). Plants were watered daily to maintain optimum growth.

3.3. Fertilization of the Plants

Plants were grown in a random distribution in a climatized greenhouse with a substrate mixture of peat, sand, clay-loam soil and Humim Substrat (Klasman-Deilmann, Geeste, Germany) (1:1:1:1, v/v).

Two grams of Osmocote 16N-4P-9K slow-release fertilizer (The Scotts Miracle-Gro Co., Godalming, UK) were top-dressed on each pot at the beginning of growth.

3.4. Monitoring of the Ripening and Harvesting of Peppers

The evolution of individual and total contents of the five major capsaicinoids present in Malagueta peppers was studied. Peppers were marked at the end of flowering and hence the age of each pepper at the time of collection was known. Plants began to flower in mid-July. From this date, the new peppers that grew were marked with a temporal spacing of 7 days. The peppers were collected in the last week of September (plant $\approx$ 6 months old) and, from this date, the plant stopped producing peppers and sampling was therefore discontinued.

3.5. Plant Material

The Malagueta pepper variety (*Capsicum frutescens*) was employed in this study. Peppers were selected from 20 pepper plants cultivated in a greenhouse. Samples of different ages were obtained from all of the plants. The total amounts of peppers collected were in the range 232–346 g for different ages in order to avoid any particular effects from individual pepper fruit, as reported previously in the literature [27]. The stems and seeds of the peppers were discarded prior to analysis. Pericarp and placenta were subsequently ground together in a conventional mill to obtain a completely homogeneous sample. Aliquots of this sample were used for subsequent analyses. Once the peppers had been milled, they were frozen at $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

3.6. Extraction Procedure

The extracts from the pepper samples were obtained using an ultrasound-assisted extraction technique according to our previously developed method [48]. Ultrasonic treatment was carried out using a UP200S sonifier (200 W, 24 kHz) (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany), with the sample immersed in a water bath coupled to a temperature controller (Frigiterm-10, J.P. Selecta, S.A., Barcelona, Spain). The capsaicinoids were extracted in a process with the following parameters: extraction solvent: methanol; temperature: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$; output amplitude was the nominal amplitude of the transducer: 100% (200 W); duty cycle: 0.5 s; solvent volume: 25 mL; extraction time: 10 min; amount of sample: 0.25 g. The extracts were filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ nylon syringe filter (Membrane Solutions, Dallas, TX, USA) prior to chromatographic analysis.

3.7. UHPLC-Fluorescence Analysis

The separation and quantification of capsaicinoids were carried out on a UHPLC (ACQUITY UPLC H-Class, Waters, Milford, MA, USA) system equipped with an ACQUITY UPLC Quaternary Pump System, an ACQUITY UPLC Auto Sampler with temperature control adjusted to $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, a column oven set at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the chromatographic separation, an ACQUITY UPLC[®] Photodiode Array (PDA) Detector and an ACQUITY UPLC[®] Fluorescence (FLR) Detector. Empower 3 software (Waters) was used to control the equipment and for data acquisition.

Capsaicinoids were analyzed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column ($50\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ I.D., particle size $1.7\text{ }\mu\text{m}$). A gradient method was employed for the chromatographic separation with acidified water (0.1% acetic acid, solvent A) and acidified acetonitrile (0.1% acetic acid, solvent B) working at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The gradient employed was as follows: 0 min, 0% B; 0.50 min, 45% B; 1.60 min, 45% B; 1.95 min, 50% B; 2.45 min, 55% B; 2.80 min, 63% B; 3.00 min, 63% B; 4.00 min, 100% B; 6.00 min, 100% B. The wavelengths employed for fluorescence detection were 280 nm (excitation) and 305 nm (emission). The injection volume was $3\text{ }\mu\text{L}$. A typical chromatogram of Malagueta pepper is shown in Figure 5.

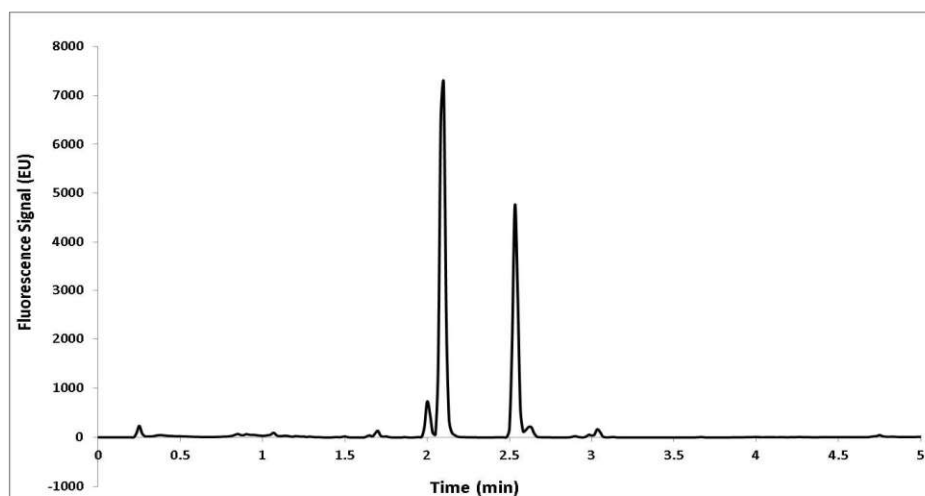


Figure 5. UHPLC chromatogram of Malagueta pepper extract. Fluorescence detection: excitation 280 nm; emission 305 nm. 1. Nordihydrocapsaicin; 2. Capsaicin; 3. Dihydrocapsaicin; 4. Homocapsaicin; 5. Homodihydrocapsaicin.

3.8. Identification of Capsaicinoids by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry

The five major capsaicinoids present in Malagueta peppers (n-DHC, C, DHC, h-C and h-DHC) were identified by ultra-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Q-ToF-MS) (Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA, USA). The injection volume was set to 3 μ L. The chromatographic separation was performed on a reverse-phase C18 analytical column (Acquity UPLC BEH C18, Waters, 2.1 mm $\times$ 100 mm and 1.7 μ m particle size). Masslynx software, version 4.1, was used to control the equipment and for the acquisition and treatment of data. The molecular ions $[M + H]^+$ for the capsaicinoids identified had the following m/z ratios: nordihydrocapsaicin, 294; capsaicin, 306; dihydrocapsaicin, 308; homocapsaicin, 320; and homodihydrocapsaicin, 322. In the mass spectra of these five capsaicinoids (Figure 6), the m/z peak (137) that is characteristic of the fragmentation of capsaicinoids [49] was clearly observed.

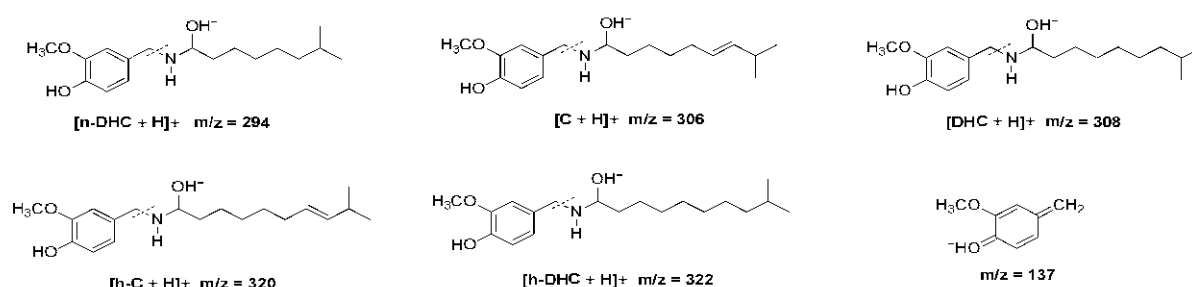


Figure 6. Proposed fragmentation pattern of protonated major capsaicinoids $[M - H]^+$ with tentative structure for the product ion $m/z = 137$.

The identification of capsaicinoids was achieved using water (0.1% formic acid) and methanol (0.1% formic acid) as mobile phases at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} . The elution gradient employed was as follows: 0 min, 0% B; 0.85 min, 55% B; 1.60 min, 55% B; 1.95 min, 60% B; 2.45 min, 63% B; 2.80 min, 70% B; 3.00 min, 70% B; 6.00 min, 100% B; 8.00 min, 100% B. The total run time was 12 min, including 4 min for re-equilibration. The determination of the analytes was carried out using an electrospray source operating in positive ionization mode under the following conditions:

desolvation gas flow = 850 L h⁻¹, desolvation temperature = 500 °C, cone gas flow = 10 L h⁻¹, source temperature = 150 °C, capillary = 0.7 eV, cone voltage = 20 V and trap collision energy = 4 eV. Full-scan mode was used (m/z = 100–600).

3.9. UHPLC Calibration

The UHPLC method was used to obtain calibration curves for C and DHC ($y = 1962318.42x + 64612.54$ for C and $y = 2147922.05x + 48033.91$ for DHC), which are the two capsaicinoid standards that are commercially available. Regression equations and correlation coefficients (r^2) were calculated using the ALAMIN software [50] (0.9997 for C and 0.9998 for DHC). The limits of detection (0.066 mg L⁻¹ for C and 0.050 mg L⁻¹ for DHC) and quantification (0.221 mg L⁻¹ for C and 0.166 mg L⁻¹ for DHC) were also calculated using the ALAMIN software.

3.10. Quantification of the Capsaicinoids Present in Malagueta Peppers

The five major capsaicinoids present in Malagueta peppers (n-DHC, C, DHC, h-C and h-DHC) were quantified. C and DHC were quantified from the calibration curves obtained from the standard solutions. Commercial standards of n-DHC, h-C and h-DHC are not available and these compounds were quantified from the calibration curve of DHC (for n-DHC and for h-DHC) and from the calibration curve of C (for h-C), given the structural similarities between these molecules. All analyses were carried out in triplicate.

4. Conclusions

Five capsaicinoids were identified in Malagueta peppers at different ripening times: n-DHC, C, DHC, h-C and h-DHC. An analysis of total capsaicinoids revealed a significant increase in the content of capsaicinoids in the early days of ripening (between 12 and 33). From this day on small ups and downs on the total concentration of capsaicinoids are observed. Therefore, from day 33 peppers could be collected if it is desired to harvest the peppers with a high capsaicinoid concentration. C was the major capsaicinoid, followed by DHC, n-DHC, h-C and h-DHC. A very slight variation was observed between the different percentages of individual capsaicinoids over the ripening period. Capsaicin and dihydrocapsaicin have very similar biological and spicy properties [46]. In this case it is verified that the two main capsaicinoids in the Malagueta pepper are the ones that present greater pungent and biological properties. On considering the evolution of standardized values of the capsaicinoids it was verified that n-DHC, DHC and h-DHC (dihydrocapsaicin-like capsaicinoids) show a similar pattern of behavior while h-C and C (capsaicin-like capsaicinoids) show different evolution patterns. The individual relationship of capsaicinoids can give an idea of the variety of pepper that has been used to make a spicy food. The time of harvest of Malagueta pepper with the aim of optimizing the total capsaicinoids content should be as late as possible. In any case, harvesting should be performed before over-ripening of the fruit is observed.

Acknowledgments: This work forms part of the (RTA2011-00118-C02 and RTA2015-00042-C02-00) project funded by the National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA) and has been co-financed by the European Fund for Regional Development (FEDER). O. Fayos is the beneficiary of an INIA fellowship programme (RTA2011-00118-C02-01). Also, it was supported for GA-A16.

Author Contributions: G.F.B., M.P. and C.G.B. conceived and designed the research; O.F., A.G.-C. and C.M. cultivated Malagueta peppers. A.C.d.A., A.J.-C. and M.F.-G. performed extractions and analyzed the extracts. O.F., A.C.d.A. and G.F.B. wrote the manuscript. J.M. and A.R.-R. perfected language and contributed to the corrections. M.P., C.G.B., A.J.-C., A.G.-C. and C.M. contributed with reagents, materials and analysis tools. All authors discussed, edited and approved the final version.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Barbero, G.F.; Liazid, A.; Azaroual, L.; Palma, M.; Barroso, C.G. Capsaicinoid Contents in Peppers and Pepper-Related Spicy Foods. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*, 485–493. [[CrossRef](#)]
- Giuffrida, D.; Dugo, P.; Torre, G.; Bignardi, C.; Cavazza, A.; Corradini, C.; Dugo, G. Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in powder of red chili peppers during one year of storage. *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 163–170. [[CrossRef](#)]
- Díaz, J.; Pomar, F.; Bernal, Á.; Merino, F. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 141–157. [[CrossRef](#)]
- Giuffrida, D.; Dugo, P.; Torre, G.; Bignardi, C.; Cavazza, A.; Corradini, C.; Dugo, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* **2013**, *140*, 794–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Laskaridou-Monnerville, A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin by micellar electrokinetic capillary chromatography and its application to various species of *Capsicum*, *Solanaceae*. *J. Chromatogr. A* **1999**, *838*, 293–302. [[CrossRef](#)]
- Stewart, C.; Mazourek, M.; Stellari, G.M.; O’Connell, M.; Jahn, M. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 979–991. [[PubMed](#)]
- Luo, X.J.; Peng, J.; Li, Y.J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *650*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chapa-Oliver, A.M.; Mejía-Teniente, L. Capsaicin: From plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules* **2016**, *21*, 931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fattori, V.; Hohmann, M.; Rossaneis, A.; Pinho-Ribeiro, F.; Verri, W. Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules* **2016**, *21*, 844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chopan, M.; Littenberg, B. The Association of Hot Red Chili Pepper Consumption and Mortality: A Large Population-Based Cohort Study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fujiwake, H.; Suzuki, T.; Iwai, K. Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiol.* **1980**, *21*, 1023–1030.
- Iwai, K.; Suzuki, T.; Fujiwake, H. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *Annuum* cv. *karayatsubusa* at different growth stages after flowering. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*, 2493–2498.
- Barbero, G.F.; Ruiz, A.G.; Liazid, A.; Palma, M.; Vera, J.C.; Barroso, C.G. Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food Chem.* **2014**, *153*, 200–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Barrera, J.A.; Hernández, M.S.; Melgarejo, L.M.; Martínez, O.; Fernández-Trujillo, J.P. Physiological behavior and quality traits during fruit growth and ripening of four Amazonic hot pepper accessions. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 847–857. [[CrossRef](#)]
- Contreras-Padilla, M.; Yahia, E.M. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2075–2079. [[CrossRef](#)]
- Estrada, B.; Bernal, M.A.; Díaz, J.; Pomar, F.; Merino, F. Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6234–6239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Estrada, B.; Bernal, M.A.; Díaz, J.; Pomar, F.; Merino, F. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in Relation to fruiting. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1188–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mueller-Seitz, E.; Hiepler, C.; Petz, M. Chili pepper fruits: Content and pattern of capsaicinoids in single fruits of different ages. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 12114–12121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bernal, M.A.; Calderón, A.A.; Pedreño, M.A.; Muñoz, R.; Barceló, A.R.; de Cáceres, F.M. Dihydrocapsaicin Oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) Peroxidase. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 611–613. [[CrossRef](#)]
- Bernal, M.A.; Calderón, A.A.; Pedreño, M.A.; Muñoz, R.; Barceló, A.R.; Merino De Cáceres, F. Capsaicin Oxidation by Peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. *annuum*) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *41*, 1041–1044. [[CrossRef](#)]

21. Barbero, G.F.; de Aguiar, A.C.; Carrera, C.; Olachea, Á.; Ferreiro-González, M.; Martínez, J.; Palma, M.; Barroso, C.G. Evolution of Capsaicinoids in Peter Pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) During Fruit Ripening. *Chem. Biodivers.* **2016**, *13*, 1068–1075. [[PubMed](#)]
22. Harvell, K.P.; Bosland, P.W. The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience* **1997**, *32*, 1292.
23. Zewdie, Y.; Bosland, P.W. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* **2000**, *111*, 185–190. [[CrossRef](#)]
24. Estrada, B.; Pomar, F.; Díaz, J.; Merino, F.; Bernal, M.A. Effects of mineral fertilizer supplementation on fruit development and pungency in “Padron” peppers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **1998**, *73*, 493–497. [[CrossRef](#)]
25. Gibbs, H.A.A.; O’Garro, L.W. Capsaicin content of West Indies hot pepper cultivars using colorimetric and chromatographic techniques. *HortScience* **2004**, *39*, 132–135.
26. Tahboub, M.B.; Sanogo, S.; Bosland, P.W.; Murray, L. Heat level in chile pepper in relation to root and fruit infection by *Phytophthora capsici*. *HortScience* **2008**, *43*, 1846–1851.
27. Kirschbaum-Titze, P.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 2. Heterogeneity of capsaicinoid content in individual fruits from one plant. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1264–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zewdie, Y.; Bosland, P.W. Pungency of Chile (*Capsicum annuum* L.) fruit is affected by node position. *HortScience* **2000**, *35*, 1174.
29. Thulin, M.; Moore, A.J.; El-Seedi, H.; Larsson, A.; Christin, P.A.; Edwards, E.J. Phylogeny and generic delimitation in *molluginaceae*, new pigment data in *caryophyllales*, and the new family *corbichoniaceae*. *Taxon* **2016**, *65*, 775–793. [[CrossRef](#)]
30. Barbero, G.F.; Liazid, A.; Palma, M.; Barroso, C.G. Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1276–1282. [[CrossRef](#)]
31. Garcés-Claver, A.; Gil-Ortega, R.; Álvarez-Fernández, A.; Arnedo-Andrés, M.S. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6951–6957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. González-Zamora, A.; Sierra-Campos, E.; Luna-Ortega, J.G.; Pérez-Morales, R.; Ortiz, J.C.R.; García-Hernández, J.L. Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules* **2013**, *18*, 13471–13486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Al Othman, Z.A.; Ahmed, Y.B.H.; Habila, M.A.; Ghafar, A.A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules* **2011**, *16*, 8919–8929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Alothman, Z.A.; Wabaidur, S.M.; Khan, M.R.; Ghafar, A.A.; Habila, M.A.; Ahmed, Y.B.H. Determination of capsaicinoids in *Capsicum* species using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 2892–2896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Usman, M.G.; Rafii, M.Y.; Ismail, M.R.; Malek, M.A.; Latif, M.A. Capsaicin and dihydrocapsaicin determination in chili pepper genotypes using ultra-fast liquid chromatography. *Molecules* **2014**, *19*, 6474–6488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sganzerla, M.; Coutinho, J.P.; de Melo, A.M.T.; Godoy, H.T. Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 718–725. [[CrossRef](#)]
37. Barbero, G.F.; Liazid, A.; Ferreiro-González, M.; Palma, M.; Barroso, C.G. Fast Separation of Capsaicinoids from Peppers by Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography: Comparison with Traditional High-Performance Liquid Chromatography Methods. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*, 984–992. [[CrossRef](#)]
38. Bogusz Junior, S.; Tavares, A.M.; Filho, J.T.; Zini, C.A.; Godoy, H.T. Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum* spp.) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 98–107. [[CrossRef](#)]
39. Rêgo, E.R.; Finger, F.L.; Rêgo, M.M. Consumption of pepper in brazil and its implications on nutrition and health of humans and animals. In *Peppers: Nutrition, Consumption and Health*; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2012; Chapter 7; pp. 159–170.

40. Santos, P.; Aguiar, A.C.; Barbero, G.F.; Rezende, C.A.; Martínez, J. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *22*, 78–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Nascimento, P.L.A.; Nascimento, T.C.E.S.; Ramos, N.S.M.; Silva, G.R.; Gomes, J.E.G.; Falcão, R.E.A.; Moreira, K.A.; Porto, A.L.F.; Silva, T.M.S. Quantification, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolics Isolated from Different Extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). *Molecules* **2014**, *19*, 5434–5447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Abud, H.F.; Araujo, E.F.; Araujo, R.F.; Araujo, A.V.; Pinto, C.M.F. Physiological quality of “malagueta” and “biquinho” pepper seeds during ontogeny. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2013**, *48*, 1546–1554. [[CrossRef](#)]
43. Rebouças, T.N.; Valverde, R.M.; Teixeira, H.L. Bromatology of fresh and processed chili pepper. [Bromatologia da pimenta malagueta in natura e processada em conserva]. *Hortic. Bras.* **2013**, *31*, 163–165. [[CrossRef](#)]
44. De Aguiar, A.C.; Sales, L.P.; Coutinho, J.P.; Barbero, G.F.; Godoy, H.T.; Martínez, J. Supercritical carbon dioxide extraction of *Capsicum* peppers: Global yield and capsaicinoid content. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *81*, 210–216. [[CrossRef](#)]
45. Chinn, M.S.; Sharma-Shivappa, R.R.; Cotter, J.L. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food Bioprod. Process.* **2011**, *89*, 340–345. [[CrossRef](#)]
46. Suzuki, T.; Iwai, K. Chapter 4 Constituents of Red Pepper Species: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology, and food Science of the Pungent Principle of *Capsicum* Species. *Alkaloids Chem. Pharmacol.* **1984**, *23*, 227–299.
47. Barbero, G.F.; Molinillo, J.M.G.; Varela, R.M.; Palma, M.; Macías, F.A.; Barroso, C.G. Application of hansch’s model to capsaicinoids and capsinoids: A study using the quantitative structure-activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3342–3349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Barbero, G.F.; Liazid, A.; Palma, M.; Barroso, C.G. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* **2008**, *75*, 1332–1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Liu, A.; Han, C.; Zhou, X.; Zhu, Z.; Huang, F.; Shen, Y. Determination of three capsaicinoids in *Capsicum annuum* by pressurized liquid extraction combined with LC-MS/MS. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 857–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. García Campaña, A.M.; Cuadros Rodríguez, L.; Alés Barrero, F.; Román Ceba, M.; Sierra Fernández, J.L. ALAMIN: A chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology. *Trends Anal. Chem.* **1997**, *16*, 381–385. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

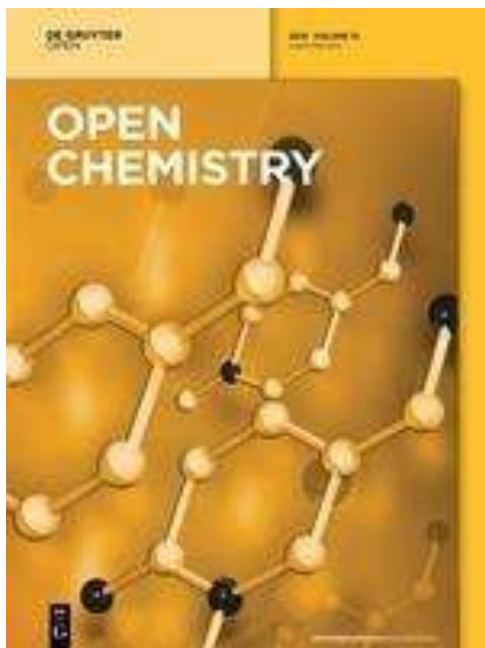
Capítulo 5

SYNTHESIS OF (±)-3, 4-DIMETHOXYBENZYL-4-METHYLOCTANOATE AS A NOVEL INTERNAL STANDARD FOR CAPSINOID DETERMINATION BY HPLC-ESI-MS/MS (QTOF).

PUBLICACIÓN III

Título: Synthesis of ($\pm$)-3, 4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF).

Autores: Fayos O, Barbero GF, Savirón M, Orduna J, Durán AG, Palma M, Molinillo JMG, Macías FA, Barroso CG, Mallor C, Garcés-Claver A



Tipo de publicación: Artículo científico

Año de publicación: 2018

Revista: *Open Chemistry*, 16: 87-94.

DOI: <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0007>

Factor de impacto: 1,425 (en 2017)

Área temática y clasificación (según JCR):

Q3 en química multidisciplinar.

Los CTOs se han convertido en compuestos bioactivos de gran interés por sus múltiples propiedades promotoras de la salud, tanto para el sector agroalimentario como en el ámbito médico. Los CTOs son compuestos minoritarios presentes en concentraciones relativamente altas solo en unos pocos cultivares de pimiento. En este sentido, es importante disponer de técnicas que permitan su cuantificación y de este modo, poder identificar y seleccionar cultivares con mayores contenidos en CTOs. La HPLC acoplada a espectrometría de masas (MS) con fuente de ionización por electrospray (ESI) es una técnica precisa y selectiva, capaz de cuantificar pequeñas concentraciones de CTOs. Sin embargo, para la correcta cuantificación mediante HPLC-ESI-MS(QTOF) es necesario la utilización de un estándar interno. En este trabajo, se describe el método de síntesis de un nuevo compuesto, análogo a los CTOs, el ($\pm$)-3,4-dimetoxibencil-4-metiloctanoato [($\pm$)-DMBO], el cual podría ser útil en la determinación de CTOs por ESI-MS. El ($\pm$)-DMBO mostró propiedades químicas y físicas similares a las de los estándares de CTOs y se mantuvo estable durante los análisis. La aplicación de

este estándar interno en la determinación de CTOs mediante ESI-MS proporcionará una precisa cuantificación facilitando así la selección en los programas de mejora de pimiento, y una mejor comprensión de la ruta de biosíntesis de los CTOs.

Contribución de la doctoranda

La doctoranda participó en el diseño de la metodología de síntesis del compuesto. Llevó a cabo el procedimiento de síntesis del nuevo compuesto, para cumplir el objetivo propuesto. Asimismo, la doctoranda se encargó de la preparación y redacción del manuscrito.

Research Article

Open Access

O Fayos, GF Barbero, M Savirón, J Orduna, AG Durán, M Palma, JMG Molinillo, FA Macías, CG Barroso, C Mallor, A Garcés-Claver*

Synthesis of (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF)

<https://doi.org/10.1515/chem-2018-0007>

received October 19, 2017; accepted December 15, 2017.

Abstract: Capsinoids exhibit health-promoting properties and are therefore compounds of interest for medical and food sciences. They are minor compounds present in relatively high concentrations in only a few number of pepper cultivars. It is desirable to quantify capsinoids to provide selected cultivars with high capsinoid contents, which can then be employed as health food product. Quantifying low concentrations of capsinoids from pepper fruit requires a precise and selective analytical technique such as HPLC coupled to electrospray ionization - mass spectrometry, with development of an internal standard essential. In this work, the synthesis method of a novel compound analogue of capsinoids, the (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate, which could be a suitable internal standard for capsinoid determination by electrospray ionization - mass spectrometry is described.

(±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate was stable under the analysis conditions and exerted chemical and physical properties similar to those of capsinoids. This internal standard will provide an accurate capsinoid determination by electrospray ionization - mass spectrometry, thus facilitating the pepper breeding programs, screening pepper cultivars and a better understanding of capsinoid biosynthetic pathway.

Keywords: Capsiate; dihydrocapsiate, DMBO, fragmentation pattern, HPLC-MS/MS, internal standard, synthesis method

1 Introduction

Capsinoids are analogues to capsaicinoids, these are the main compounds responsible for pungency in pepper fruits (*Capsicum* spp.), and both are exclusively produced by fruits of this genus [1-7]. Although capsinoids also contribute to this effect, they are approximately 1,000 times less pungent than capsaicinoids [7]. Capsinoids are similar in structure to capsaicinoids, with the exception of an ester bond in the place of an amide bond found in capsaicinoids [8]. Until now, three capsinoids have been identified in nature: capsiate, dihydrocapsiate, and nordihydrocapsiate, with the first two the most common [8,9]. Both, capsaicinoids and capsinoids are powerful biocompounds with health-promoting properties, such as anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-obesity, and analgesic activities [10-13]. They are also used in arthritis treatments, digestive disorders or in some diseases like cancer, among others [14-17]. The advantage of capsinoids over capsaicinoids is that these do not present side effects like irritancy or a burning feeling [18,19]. Therefore, capsinoids could have a greater application range both in medical field and in food sciences, in the development of new drugs for long-term treatments or functional foods. In this regard, identifying pepper cultivars with high capsinoid content becomes

*Corresponding author: A Garcés-Claver: Departamento de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain, E-mail: agarces@cita-aragon.es

O Fayos, C Mallor: Departamento de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain

GF Barbero, M Palma, CG Barroso: Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). Campus Universitario del Río San Pedro, 11510, Puerto Real (Cádiz), Spain

M Savirón, J Orduna: Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA-CEQMA). Facultad de Ciencias, CSIC-Universidad de Zaragoza, C/ Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza, Spain

AG Durán, Molinillo, FA Macías: Grupo de Aleopatía, Departamento de Química Orgánica, Instituto de Biomoléculas (INBIO), Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3), Campus Universitario del Río San Pedro, 11510, Puerto Real (Cádiz), Spain

really attractive for human consumption, pharmaceutical purposes and pepper breeding programs.

The analytical techniques used, routinely in laboratories, for capsinoid determination are high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to UV or PDA/DAD detectors [2-4,20]. Since capsinoids and capsaicinoids are measured at the same wavelength (280 nm), their concentration could be overestimated by these techniques, which are based only on retention time and UV spectra, and could assign erroneously a peak to a given capsinoid. A promising high-resolution detection technique such as electrospray ionization (ESI)-mass spectrometry (MS) in combination with HPLC, would enable a more accurate, precise, and sensitive analysis of these compounds. This technique allows an unequivocal identification of compounds by exact mass-to-charge ratio (m/z), molecular formula and fragmentation pattern, all of them distinctive features for each compound [21-24]. Nevertheless, the addition of an internal standard (IS) to the sample is of crucial importance in order to improve the analytical parameters, avoid ionization fluctuations of analytes, and correct errors in detection [21-27]. Currently, there are not any commercially available internal standards for capsinoid analysis by HPLC-ESI-MS. Isotope-labeled analogues could be the internal standards. However, they have disadvantages, such as their scarce availability and high price. Thus, chemical synthesis is an interesting alternative to isotopic labelling for obtaining new synthetic analogues to capsinoids [22, 28].

In this report, we describe for first time a simple synthesis approach of the ($\pm$)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate (($\pm$)-DMBO), a novel synthetic analogue to capsinoids, and their potential use as IS for capsiate and dihydrocapsiate determination by HPLC-ESI-MS(QTOF).

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

For ($\pm$)-DMBO synthesis: 3,4-dimethoxybenzaldehyde (99%) (**1**), and ($\pm$)-4-methyloctanoic acid (98%) (**3**), and di-isobutyl aluminium hydride (1 mol L⁻¹ in toluene) (DIBAL) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sodium sulphate anhydrous (99%), dehydrated pyridine (99%), and tetrahydrofuran (THF) (99.5%) were purchased from Panreac Química S.L.U. (Barcelona, Spain). Ethyl acetate, methanol, and hexane, all of them HPLC grade, were procured from Scharlab S.L.

(Barcelona, Spain). Thionyl chloride (SOCl₂) (99%) was purchased from Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Germany). Capsiate and dihydrocapsiate standards were supplied by the Department of Organic Chemistry at the University of Cádiz, Spain. All standard solutions were prepared with analytical grade type I water (Milli-Q Synthesis, Millipore, Bedford, MA).

2.2 General experimental procedures

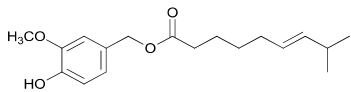
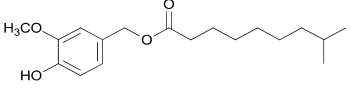
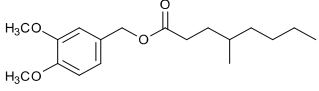
The synthesis of ($\pm$)-DMBO (**5**) was accomplished in three stages: reduction of the 3,4-dimethoxybenzaldehyde (**1**) carbonyl group, chloride formation from ($\pm$)-4-methyloctanoic acid (**3**) and esterification of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (**2**) with ($\pm$)-4-methyloctanoyl chloride (**4**).

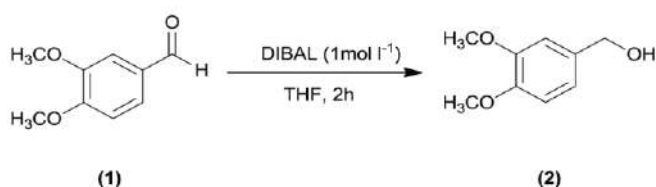
The ($\pm$)-DMBO purity was determined by ¹H NMR and ¹³C NMR analysis. ¹H and ¹³C spectra were recorded using deuterated chloroform (CDCl₃) (99.8%, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA) as the solvent, on an Agilent INOVA spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at 499.719 and 125.654 MHz, respectively. The resonances of residual chloroform for ¹H and ¹³C were set to δ_H 7.25 ppm and δ_C 77.00 ppm, respectively, and used as internal reference. UV-Vis spectra were obtained by using a Varian Cary 50 BIO spectrophotometer (Agilent Technologies) with chloroform as the solvent. General IR spectra (KBr) were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 2 spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel (F245 Merck plates).

2.3 HPLC-ESI-MS and ESI-MS/MS(QTOF) analysis

Individual standard solutions in 60% methanol (20 μ mol L⁻¹ for ($\pm$)-DMBO and 10 μ mol L⁻¹ for capsiate and dihydrocapsiate) were introduced by direct injection with a syringe pump (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA) operating at 4 μ L min⁻¹, in a Quadrupole Time-of-Flight (QTOF) mass spectrometer equipped with an Electrospray Ionization Source (ESI) (MicroTOF-Q, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). ESI-MS(QTOF) and ESI-MS/MS(QTOF) analysis were carried out in positive-ion mode, with capillary and endplate offset voltages of 4500 and -500 V, respectively, and using N₂ as the collision gas. The collision cell energy was set to 10 eV, with an isolation width for the precursor ion of 2 mass-to-charge ratio (m/z)

Table 1: Common name, chemical formula, molecular weight, and $[M+Na]^+$ of capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate.

Common Name	Chemical Structure	Chemical Formula	Molecular Weight	Measured $[M+Na]^+$
Capsiate		$C_{18}H_{26}O_4$	306.3966	329.1678
Dihydrocapsiate		$C_{18}H_{28}O_4$	308.4125	331.1879
(±)-DMBO		$C_{18}H_{28}O_4$	308.4125	331.1855

**Figure 1:** Step 1 of the synthesis procedure of (±)-DMBO. Reduction of 3,4-dimethoxybenzaldehyde (1) to 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (2).

column (Symmetry® C_{18} , 2.1 mm i.d. x 10 mm length, 3.5 μ m spherical particle size, Waters). The HPLC conditions were methanol (solvent A) and Milli-Q water acidified with 0.1% (v/v) acetic acid (solvent B) as eluents, 0.2 μ L min⁻¹ as flow rate, 25 °C as column temperature, and 5 μ L as injection volume. The elution program was set according to the following gradient: 0-7 min, 60% B; 7-15 min, 60-70% B; 15-52 min, 70-100% B.

Ethical approval: The conducted research is not related to either human or animals use.

units. The nebulizer gas (N_2) pressure, the drying gas (N_2) flow rate and the drying gas temperature were 1.6 bar, 8.0 L min⁻¹ and 200 °C, respectively. Spectra were acquired in the m/z 50–800 range. The mass axis was calibrated by using Na-formate adducts [10 mmol L⁻¹ NaOH, 2.5% (v/v) formic acid and 50% (v/v) 2-propanol] that were introduced through a divert valve at the beginning of each direct injection. For MS/MS spectra the $[M+Na]^+$ ions with m/z values of 329 and 331 m/z for capsiate and dihydrocapsiate and (±)-DMBO, respectively, were chosen as precursors, with an isolation width of 4 m/z units and an amplitude voltage of 0.45 V. The structures of capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate are shown in Table 1. Bruker Daltonik software packages micrOTOF Control v.2.3 and HyStar v.3.2 were used to control the system. Data Analysis v.4.0 was used to process data. Capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate standards were detected by coupling the HPLC instrument to the QTOF mass spectrometer. Chromatographic separation was performed on an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with an isocratic pump, an autosampler, and a thermostated column compartment. The column used was an analytical HPLC C_{18} column (Symmetry® C_{18} , 2.1 x 150 mm; 3.5 μ m spherical particle size, Waters, Milford, MA, USA) protected by a guard

3 Results and discussion

3.1 (±)-DMBO Synthesis procedure (5)

3.1.1 Reduction of the 3,4-dimethoxybenzaldehyde (1) carbonyl group

The initial reaction stage involved the reduction of the carbonyl group of 3,4-dimethoxybenzaldehyde (1) to its corresponding alcohol (2) (Figure 1). The reduction of the carbonyl group was performed by using DIBAL (1 mol L⁻¹ in toluene). The compound (1) (3.0042 g, 0.0181 mol) was dissolved in 40 mL of dry THF. Subsequently, 2 equivalents of DIBAL (1 mol L⁻¹ in toluene) were added slowly, with a syringe, in an ice bath, and the reaction mixture was stirred, under argon, at ambient temperature, for 2 h. The reaction was monitored by TLC (eluent: 20% ethyl acetate, 80% hexane; chromogenic reagent: anisaldehyde). Then, the reaction was stopped with water and after purification of the reaction mixture, by column chromatography (eluent: 20% ethyl acetate, 80% hexane; chromogenic reagent: anisaldehyde), and (2) was obtained with a yield of 77.16%.

3.1.2 Chloride formation from (±)-4-methyloctanoic acid (3)

The (±)-4-methyloctanoic acid (3) was transformed into (±)-4-methyloctanoyl chloride (4), in order to subsequently perform the acylation of this compound (2) (Figure 2). To do so, 2 equivalents of (3) (4.4307 g, 0.028 mol) were placed in a 50-mL round-bottom flask into which argon was introduced. An amount of SOCl_2 , sufficient to dissolve the acid, was added very slowly, dropwise from a syringe, and stirred magnetically. After the addition of SOCl_2 , the reaction mixture was heated at 60 °C for 1 h. Subsequently, the excess of SOCl_2 excess was eliminated in vacuo, and the transparent oil of (4) was obtained. This compound (4) was dissolved in dry THF for the subsequent acylation with compound (2).

3.1.3 Esterification of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (2) with (±)-4-methyloctanoyl chloride (4)

The (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate ((±)-DMBO) (5) was prepared by the acylation of the 3,4-dimethoxybenzyl alcohol ring (2) using a (±)-4-methyloctanoyl chloride chain (4) (Figure 3). The final product (±)-DMBO (5) is a racemic mixture since the synthesis has been started from the racemic product (±)-4-methyloctanoic acid (3) and the proposed synthesis is not stereoselective. Compound (2) (2.3321 g, 0.0140 mol) was dissolved in 20-25 mL of dry pyridine in a 50-mL round-bottom flask under a protective atmosphere

with argon. Then, 2 equivalents of (4) were added slowly to this solution and agitated for 18 h. The reaction was monitored by TLC (eluent: 20% ethyl acetate, 80% hexane; chromogenic reagent: anisaldehyde) up to the reaction's completion.

The (±)-DMBO esterification step was simpler than that reported for capsinoid and capsaicinoids standards synthesis [29]. Through this synthesis procedure, (±)-DMBO (5) was obtained, after purification of the reaction mixture, with a yield of 95% and a purity $\geq 98\%$. The overall yield obtained for the synthesis of (±)-DMBO starting from the initial material has therefore been 73.15%. This yield was higher than those obtained by other synthesis procedures previously reported for capsinoid and capsaicinoid standards [12,29-33]. Thus, this procedure would be an efficient alternative to other synthesis methodologies for capsinoid derivatives, such as enzymatic catalysis or labeled compound synthesis, due to its lower cost and higher yield.

3.2 Chemical characterization of (±)-DMBO (5)

The formation of (±)-DMBO was confirmed by ^1H NMR and ^{13}C NMR analysis. Since (±)-DMBO (5) (Figure 4) has never been previously described in the bibliography, its chemical characterization is presented below:

Yellow oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) (Assignments with identical superscripts are interchangeable) (S1_Figure): 6.91 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 6), 6.87 (bd, 1H, $J = 1.9$ Hz, 2), 6.83 (bd, 1H, $J = 8.1$ Hz, 5), 5.03 (s, 2H, 8), 3.87 (s^a , 3H, 7), 3.86 (s^a , 3H, 7'), 2.38-2.26 (m, 2H, 2''), 1.69-1.63 (m, 1H, 3a''), 1.47-1.41 (m, 1H, 3b''), 1.41-1.35 (m, 1H, 4''), 1.30-1.17 (m, 1H, 5a''), 1.30-1.17 (m, 2H, 7''), 1.30-1.17 (m, 2H, 6''), 1.12-1.07 (m, 1H, 5b''), 0.86 (t, 3H, $J = 6.4$ Hz, 8''), 0.84 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 9''); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 173.98 (1''), 148.99^b (4), 148.91^b (3), 128.59 (1), 121.17 (6), 111.70 (2), 110.94 (5), 66.14 (8), 55.85^c (7), 55.81^c (7'), 36.27 (5''), 32.31 (4''), 32.12 (2''), 31.85 (3''), 29.09 (6''), 22.87 (7''), 19.24 (9''), 14.05 (8''); IR (cm^{-1}): 2956, 1735,

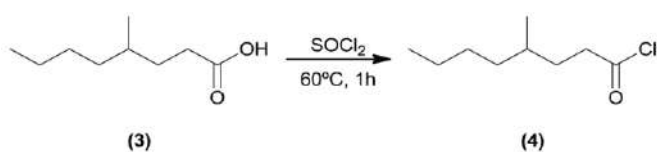


Figure 2: Step 2 of the synthesis procedure of (±)-DMBO. Preparation of (±)-4-methyloctanoyl chloride (4) from (±)-4-methyloctanoic acid (3).

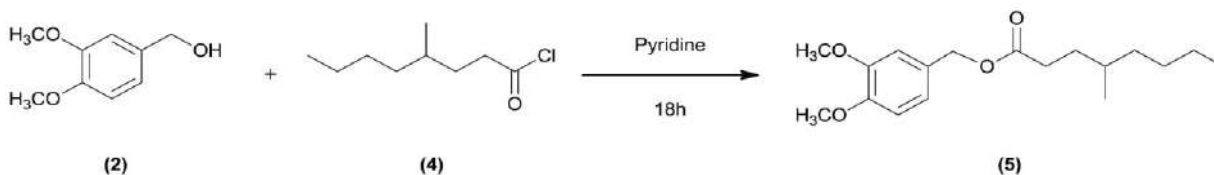


Figure 3: Step 3 of the synthesis procedure of (±)-DMBO. Procedure for the preparation of (±)-DMBO (5) from the acylation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (2) with (±)-4-methyloctanoyl chloride (4).

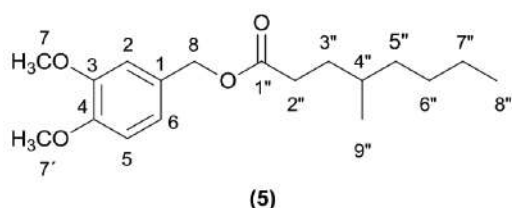


Figure 4: Chemical structure of (±)-DMBO (5). Chemical characterization of (±)-DMBO by ^1H NMR and ^{13}C NMR analysis.

1519, 1162; λ_{max} (nm) 279.9; ϵ ($\text{L/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) 338; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 331.1879, found: 331.1884.

3.3 HPLC-ESI-MS(QTOF) and HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) analysis of capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate standards

In order to evaluate the suitability of (±)-DMBO as an IS for capsinoid determination by ESI-mass spectrometry, its retention time and ionization behaviour were determined by HPLC-ESI-MS(QTOF) and HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) and compared to those of capsiate and dihydrocapsiate standards.

The MS spectra of capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate were acquired, in positive ion mode, by direct injection of the standard solutions on the QTOF mass analyser. The major peaks observed in the MS spectra corresponding with the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ions were at the m/z 329.1678 for capsiate, 331.1879 for dihydrocapsiate and 331.1855 for (±)-DMBO (Table 1). These molecular ions were in agreement with the calculated m/z 329.1723 for capsiate and 331.1880 for (±)-DMBO and dihydrocapsiate; therefore, they were selected as precursors for ESI-MS/MS experiments. Figure 5 shows the MS/MS spectra obtained for capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate. For both capsinoid standards, the most intense peak was observed at m/z 159.0375 for capsiate and 159.0418 for dihydrocapsiate, in accordance with the calculated m/z 159.0417, corresponding to sodiated vanillyl ring. Other minor product ions detected at m/z 137.0570 and 137.0605, in conformity with the calculated m/z 137.0597, corresponding to the protonated vanillyl ring of capsiate and dihydrocapsiate, respectively, and generated by the cleavage of the C7-O8 bond of these molecules (Figure 5, A and B). On (±)-DMBO MS/MS spectrum, the most intense peak was observed at m/z 151.0750 (Figure 5C), in agreement with the calculated m/z 151.0754 for the expected vanillyl-type ring resulting from fragmentation at the ester bond. The ionization behaviour and break site of (±)-DMBO molecules were similar to those

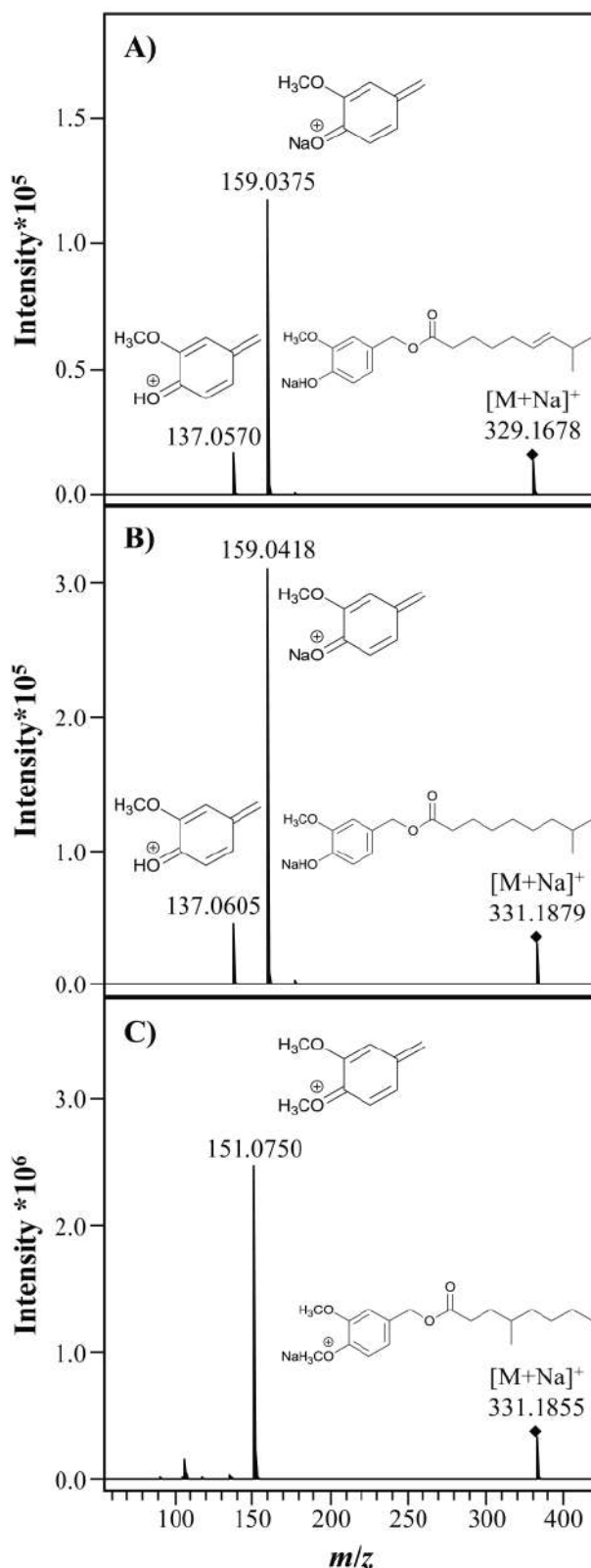


Figure 5: ESI-MS/MS spectra in positive ion mode of capsiate, dihydrocapsiate and (±)-DMBO. The individual standard solutions in 60% methanol of $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ capsiate (A) and dihydrocapsiate (B), and $20\ \mu\text{mol L}^{-1}$ (±)-DMBO (C) were acquired by direct injection on the QTOF mass analyser.

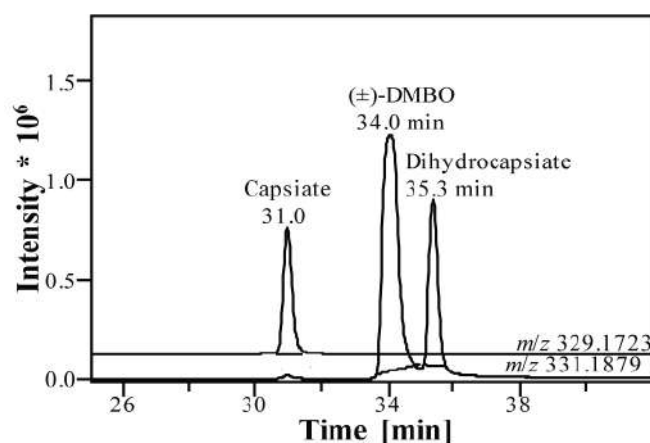


Figure 6: HPLC-ESI-MS(QTOF) chromatograms of capsiate, (±)-DMBO and dihydrocapsiate standards. Ion chromatograms were extracted for the exact m/z values corresponding to the $[M+Na]^+$ species of capsiate, (±)-DMBO and dihydrocapsiate.

shared by capsinoid standards. MS/MS spectra obtained for (±)-DMBO, capsiate, and dihydrocapsiate matched well with the typical fragmentation pattern for capsinoids [34] and capsaicinoids [35].

Ion chromatograms were extracted for the exact m/z values corresponding to the $[M+Na]^+$ species of capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate (Figure 6). The peaks of the capsiate, (±)-DMBO, and dihydrocapsiate standards showed their elution times at 31.0, 34.0, and 35.3 min, respectively. Since the chromatogram traces corresponding to m/z 331 were extracted for (±)-DMBO and dihydrocapsiate, the resolution (R_s) of these two compounds was calculated in order to confirm the correct separation of both compounds. The R_s of dihydrocapsiate and (±)-DMBO (defined as 2 times the separation between peaks divided by the sum of the peak base widths) was 1.2, a value that can be considered as adequate.

The potentiality of using (±)-DMBO as IS in capsinoid determination by ESI-mass spectrometry was supported by the following facts i) it is a capsinoid analogue not occurring naturally in *Capsicum* species, ii) the ionization behaviour of (±)-DMBO in ESI mass is similar to that of capsiate and dihydrocapsiate, and iii) its retention time is similar to that of capsiate and dihydrocapsiate, (±)-DMBO eluting between the two analytes but being able to be separated from dihydrocapsiate.

4 Conclusion

In this study, a (±)-DMBO synthesis procedure has been described. The synthesis procedure developed is simple,

economical, and achievable in any basic chemistry laboratory, and it also allows the obtaining of yields greater than 95%.

(±)-DMBO could be a potential IS for capsinoid determination because: (i) it is not present in pepper fruits; (ii) it is stable under analysis conditions; (iii) it elutes between capsiate and dihydrocapsiate; (iv) its chemical structure is closely related to that of capsinoids; (v) and its ionization behaviour and fragmentation pattern is shared by capsiate and dihydrocapsiate.

As far as we know, there is not any other IS available for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) analysis. Synthetic analogues have already been successfully used as IS for another compound determination by ESI-MS techniques [36-37]. We have described for first time a simple synthesis approach of a capsinoid analogue suitable for IS. The development of a new IS will allow an accurate quantification of capsinoid by HPLC-ESI-MS, a useful tool for screening and selecting of cultivars containing capsinoids in pepper breeding programs and for gaining understanding of the metabolism of capsinoids.

Acknowledgments: This study was supported by the National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA) and has been co-financed by the European Fund for Regional Development (FEDER) (grant number RTA2011-00118-C02 and RTA2015-00042-C02-00). Also, it was supported for Aragon Government-A16. Author O. Fayos has received research grants from INIA (RTA2011-00118-C02-01).

Conflict of interest: Authors state no conflict of interest.

References

- [1] Yazawa S., Suetom N., Okamoto K., Namiki T., Content of capsaicinoids and capsaicinoid-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrids made with 'CH-19 Sweet' as a parent, *Journal of the Japanese Society for Hort. Sci.*, 1989, 58, 601-607.
- [2] Tanaka Y., Hosokawa M., Otsu K., Watanabe T., Yazawa S., Assessment of capsiconinoid composition, nonpungent capsaicinoid analogues, in *Capsicum* Cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 5407-5412.
- [3] Wahyuni Y., Ballester A.R., Sudarmonowati E., Bino R.J., Bovy A.G., Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding, *Phytochemistry*, 2011, 72, 1358-1370.

- [4] Han K., Jeong H.J., Sung J., Keum Y.S., Cho M.C., Kim J.H., et al., Biosynthesis of capsinoid is controlled by the *Pun1* locus in pepper, *Mol. Breed.*, 2013, 31, 537-548.
- [5] Jang S., Han K., Jo Y.D., Jeong H.J., Siddique M.I., Kang B.C., Substitution of a dysfunctional *pAMT* allele results in low-pungency but high levels of capsinoid in *Capsicum chinense* 'Habanero', *Plant Breed. Biotech.*, 2015, 3, 119-128.
- [6] Jarret R.L., Bolton J., Perkins L.B., 509-45-1, a *Capsicum annuum* pepper germplasm containing high concentrations of capsinoids, *HortScience*, 2014, 49, 107-108.
- [7] Tanaka Y., Yoneda H., Hosokawa M., Miwa T., Yazawa S., Application of marker-assisted selection in breeding of a new fresh pepper cultivar (*Capsicum annuum*) containing capsinoids, low-pungent capsaicinoid analogs, *Sci. Hortic.*, 2014, 165, 242-245.
- [8] Kobata K., Todo T., Yazawa S., Iwai K., Watanabe T., Novel capsaicinoid-like substances, capsate and dihydrocapsate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 1695-1697.
- [9] Kobata K., Sutoh K., Todo T., Yazawa S., Iwai K., Watanabe T., Nordihydrocapsate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*, *J. Nat. Prod.*, 1999, 62, 335-336.
- [10] Rosa A., Deiana M., Casu V., Paccagnini S., Appendino G., Ballero M., et al., Antioxidant activity of capsinoids, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 7396-7401.
- [11] Faraut B., Giannesini B., Matarazzo V., Le Fur Y., Rougon G., Cozzzone P.J., et al., Capsate administration results in an uncoupling protein-3 downregulation, an enhanced muscle oxidative capacity and a decreased abdominal fat content in vivo, *Int. J. Obes.*, 2009, 33, 1348-1355.
- [12] He G.J., Ye X.L., Mou X., Chen Z., Li X.G., Synthesis and antinociceptive activity of capsinoid derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, 44, 3345-3349.
- [13] Mueller M., Hobiger S., Jungbauer A., Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices, *Food Chem.*, 2010, 122, 987-996.
- [14] Deal C.L., Schnitzer T.J., Lipstein E., Seibold J.R., Stevens R.M., Levy M.D., et al., Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double blind trial, *Clin. Ther.*, 1991, 13, 383-395.
- [15] Evangelista S., Novel therapeutics in the field of capsaicin and pain, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2015, 8, 373-375.
- [16] Macho A., Lucena C., Sancho R., Daddario N., Minassi A., Muñoz E., et al., Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper. Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential, *Eur. J. Nutr.*, 2003, 42, 2-9.
- [17] Luo X.J., Peng J., Li Y.J., Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids, *Eur. J. Pharmacol.*, 2011, 650, 1-7.
- [18] Reyes-Escogido M.R., Gonzalez-Mondragon E.G., Vazquez-Tzompantzi E., Chemical and pharmacological aspects of capsaicin, *Molecules*, 2011, 16, 1253-1270.
- [19] Sasahara I., Furuhashi Y., Iwasaki Y., Inoue N., Sato H., Watanabe T., et al., Assessment of the biological similarity of three capsaicin analogs (capsinoids) found in non-pungent chili pepper (CH-19 Sweet) fruits, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2010, 74, 274-278.
- [20] Singh S., Jarret R., Russo V., Majetich G., Shimkus J., Bushway R., et al., Determination of capsinoids by HPLC-DAD in *Capsicum* species, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 3452-3457.
- [21] Niessen W.M.A., Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening, *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000, 413-436.
- [22] Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., et al., Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.*, 2003, 24, 3-12.
- [23] Chace D.H., Kalas T.A., A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing, *Clin. Biochem.*, 2005, 38, 296-309.
- [24] Mi S., Zeng-Ping C., Yao C., Jing-Wen J., Multiplicative effects model with internal standard in mobile phase for quantitative liquid chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, 2014, 125, 347-351.
- [25] Vanhaecke F., Vanhoe H., Dams R., Vandecasteele C., The use of internal standards in ICP-MS, *Talanta*, 1992, 39, 737-742.
- [26] Annesley T.M., Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.*, 2003, 49, 1041-1044.
- [27] Hiatt M.H., Internal standards: a source of analytical bias for volatile organic analyte determinations, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 498-503.
- [28] Wieling J., LC-MS-MS experiences with internal standards, *Chromatographia*, 2002, 55, S107-S113.
- [29] Barbero G.F., Molinillo J.M.G., Varela R.M., Palma M., Macías A., Barroso C.G., Application of Hansch's Model to capsaicinoids and capsinoids: a study using the quantitative structure-activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 3342-3349.
- [30] Kobata K., Kawaguchi M., Watanabe T., Enzymatic synthesis of a capsinoid by the acylation of vanillyl alcohol with fatty acid derivatives catalyzed by lipases, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2002, 66, 319-327.
- [31] Ishihara K., Kwon S., Masuoka N., Nakajima N., Hamada H., One-procedure synthesis of capsate from capsaicin by lipase-catalyzed dynamic transacylation, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 26, 1337-1340.
- [32] Kobata K., Mimura M., Sugawara M., Watanabe T., Synthesis of stable isotope-labeled precursors for the biosyntheses of capsaicinoids, capsinoids, and capsinoninoids, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2011, 75, 1611-1614.
- [33] Ivić J.T., Milosavić N., Dimitrijević A., Jankulović M.G., Bezbradica D., Kolarski D., et al., Synthesis of medium-chain length capsinoids from coconut oil catalyzed by *Candida rugosa* lipases, *Food Chem.*, 2017, 218, 505-508.
- [34] Fayos O., Savirón M., Orduna J., Mallor C., Barbero G.F., Garcés-Claver A., Detection of capsinoids by ESI-mass analysis, In: Lanteri S., Rotino G.L., (Ed.). Breakthroughs in the Genetics and Breeding of *Capsicum* and *Eggplant*, Proceedings of the XV EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and *Eggplant* (2-4 September 2013, Torino, Italy), 2013, 685-688.
- [35] Schweiggert U., Carle R., Schieber A., Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2006, 557, 236-244.
- [36] Cooper T.H., Guzinski J.A., Fisher C., Improved high-performance liquid chromatography method for the

determination of major capsaicinoids in *Capsicum* oleoresins, J. Agric. Food Chem., 1991, 39, 2253-2256.

- [37] Garcés-Claver A., Arnedo-Andrés M.S., Abadía J., Gil-Ortega R., Álvarez-Fernández A., Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry, J. Agric. Food Chem., 2006, 54, 9303-9311.

Supplemental Material: The online version of this article offers supplementary material (<https://doi.org/10.1515/chem-2018-0007>).

Supplementary Information

Open Access

O Fayos, GF Barbero, M Savirón, J Orduna, AG Durán, M Palma, JMG Molinillo, FA Macías, CG Barroso, C Mallor, A Garcés-Claver*

Supplement: Synthesis of (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsinoid determination by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF)

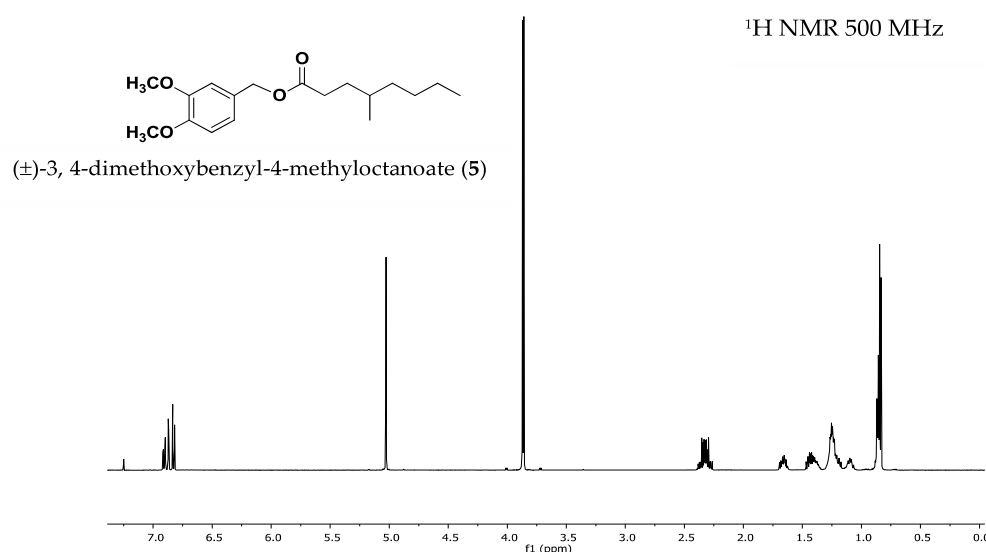


Figure S1: ¹H-NMR and ¹³C-NMR Spectroscopy of (5) (¹H NMR 500 MHz and ¹³C NMR 125 MHz, CDCl₃).

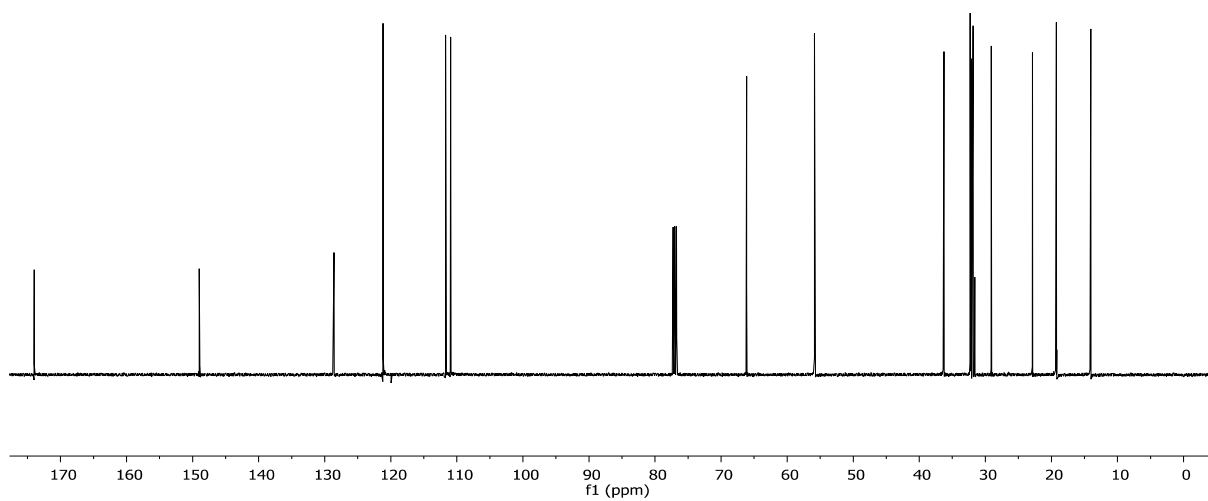
***Corresponding author: A Garcés-Claver:** Departamento de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain, E-mail: agarc@cita-aragon.es

O Fayos, C Mallor: Departamento de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain

GF Barbero, M Palma, CG Barroso: Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). Campus Universitario del Río San Pedro, 11510, Puerto Real (Cádiz), Spain

M Savirón, J Orduna: Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA-CEQMA). Facultad de Ciencias, CSIC-Universidad de Zaragoza, C/ Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza, Spain

AG Durán, Molinillo, FA Macías: Grupo de Alelopatía, Departamento de Química Orgánica, Instituto de Biomoléculas (INBIO), Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3), Campus Universitario del Río San Pedro, 11510, Puerto Real (Cádiz), Spain

^{13}C NMR 125 MHz

Continued **Figure S1:** ^1H -NMR and ^{13}C -NMR Spectroscopy of (5) (^1H NMR 500 MHz and ^{13}C NMR 125 MHz, CDCl_3).

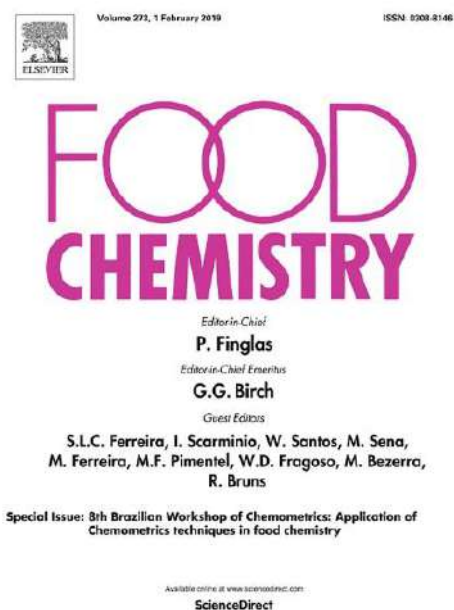
Capítulo 6

**QUANTITATION OF CAPSIATE AND
DIHYDROCAPSIATE AND TENTATIVE
IDENTIFICATION OF MINOR CAPSINOIDS IN PEPPER
FRUITS (*Capsicum* spp.) BY HPLC-ESI-MS/MS (QTOF).**

PUBLICACIÓN IV

Título: Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF).

Autores: Fayos O, Savirón M, Orduna J, Barbero GF, Mallor C, Garcés-Claver A.



Tipo de publicación: Artículo científico.

Año de publicación: 2019

Revista: Food chemistry, 270: 264-272.

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.112>

Factor de impacto: 4,946 (en 2017)

Área temática y clasificación (según JCR):

Q1 en ciencia y tecnología de los alimentos.

En este trabajo se ha desarrollado y validado por primera vez, un método analítico sensible y selectivo para la determinación de Cto y dhCto utilizando HPLC-ESI/MS (QTOF). Para ambos CTOs, los límites de detección y de cuantificación LOD y LOQ fueron 0,02 y 0,05 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectivamente. Los valores de repetibilidad intra- e interdías (RSD%) fueron 0,26 – 0,41 % para el tiempo de retención y 2,25 – 2,11% para el área pico. Las recuperaciones fueron hasta del 98% para Cto y hasta del 97 % para dhCto. Este método se aplicó con éxito para cuantificar el capsiato y el dihidrocapsiato en frutos de ocho accesiones de pimiento. Los CTOs se encontraron en el rango de 1,21 – 544,59 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco (PS) para capsiato y de 0,61 – 81,95 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS para dihidrocapsiato. En la entrada de pimiento ‘Tabasco’ se cuantificaron capsiato y dihidrocapsiato por primera vez, encontrándose en los rangos de 3,09 a 58,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS y de 1,80 a 6,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, respectivamente. Además, los análisis mediante ESI-MS/MS(QTOF) han permitido la identificación tentativa de otros dos CTOs menores, por masa exacta y patrón de fragmentación, en la entrada ‘Bhut Jolokia’.

Contribución de la doctoranda

La doctoranda realizó el diseño y planificación de la preparación de las muestras necesarias para cumplir con los objetivos propuestos, con la supervisión del resto de coautores. Realizó los análisis de laboratorio para el desarrollo y la validación del método analítico para cumplir con los objetivos planteados. Además, la doctoranda se encargó de la preparación y redacción del manuscrito.



Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF)



Oreto Fayos^a, María Savirón^b, Jesús Orduna^b, Gerardo F. Barbero^c, Cristina Mallor^a, Ana Garcés-Claver^{a,*}

^a Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain

^b Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA-CEQMA), Facultad de Ciencias, CSIC-Universidad de Zaragoza, C/ Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

^c Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). IVAGRO. Campus Universitario del Río San Pedro, P.O. Box 40, 11510 Puerto Real (Cádiz), Spain

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
Capsiate (PubChem CID: 9839519)
Dihydrocapsiate (PubChem CID: 9873754)

Keywords:
Capsicum
Capsinoids
Capsiate
Dihydrocapsiate
Liquid chromatography
Mass spectrometry
Fragmentation pattern

ABSTRACT

A highly sensitive, selective method has been developed and validated for determination of capsiate and dihydrocapsiate for the first time using HPLC-ESI/MS(QTOF). For both capsinoids, LODs and LOQs were 0.02 and 0.05 µmol/L, respectively. The intra- and interday repeatability values (RSD %) were 0.26–0.41% for retention time, and 2.25–2.11% for peak area. Recoveries were up to 98% and 97% for capsiate and dihydrocapsiate, respectively. This method was successfully applied to quantify capsiate and dihydrocapsiate in eight pepper fruit accessions. Capsinoids were found in the range of 1.21–544.59 µg/g DW for capsiate and of 0.61–81.95 µg/g DW for dihydrocapsiate. In the ‘Tabasco’ accession, capsiate and dihydrocapsiate were quantified for the first time, ranging from 3.09 to 58.76 and 1.80 to 6.94 µg/g DW, respectively. Additionally, the ESI-MS/MS(QTOF) analysis has allowed the tentative identification of two other minor capsinoids by exact mass and fragmentation pattern, in the ‘Bhut Jolokia’ accession.

1. Introduction

Capsinoids, a group of compounds analogous to capsaicinoids, were first reported in pepper fruits from the low-pungent cultivar ‘CH-19 Sweet’ (*C. annuum*) (Kobata, Todo, Yazawa, Iwai & Watanabe, 1998). Capsinoids and capsaicinoids are odourless, tasteless and responsible for pungency in pepper fruits (*Capsicum* spp.) (Bosland & Votava, 2012, chap. 6). Both have similar chemical structures except for their central linkage (Supplementary material, Fig. S1); capsaicinoids are amides of vanillylamine with branched-chain fatty acids (from 7 to 13 carbons in length), whereas capsinoids are esters of vanillyl alcohol with fatty acids, similar to those of capsaicinoids (Kobata et al., 1998; Sutoh, Kobata, Yazawa & Watanabe, 2006; Singh et al., 2009). This structural

difference could be responsible for the lower stability of capsinoids and, therefore, for their lower pungency, assessed to be about 1000 times lower than that of capsaicinoids (Tanaka et al., 2015). In spite of their lower pungency, capsinoids exhibit similar health-promoting properties to capsaicinoids, such as being analgesic, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory, but without such side effects as irritation or a burning sensation (Evangalista, 2015; Friedman et al., 2018). Besides, capsinoids protect the gastric mucosa from injuries (Li et al., 2012), improve glucose metabolism (Kwon et al., 2013), and increase thermogenesis and body energy expenditure, thus becoming an effective tool for anti-obesity treatments (Zsiborás et al., 2017).

Up to date, three capsinoids (capsiate, dihydrocapsiate, and nordihydrocapsiate) have been isolated from pepper fruits (Kobata et al.,

Abbreviations: DAD, diode array detector; DW, dry weight; ESI, electrospray ionization; FL, fluorescence; FW, fresh weight; HPLC, high performance liquid chromatography; LC, liquid chromatography; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; PDA, photo-diode array; QTOF, quadrupole time-of-flight; RSD, relative standard deviation; RT, retention time; RP-HPLC, reversed-phase HPLC; UHPLC, ultra-high performance liquid chromatography; UV, ultraviolet; UV/Vis, ultraviolet/visible

* Corresponding author.

E-mail addresses: ofayos@cita-aragon.es (O. Fayos), msaviron@unizar.es (M. Savirón), jorduna@unizar.es (J. Orduna), gerardo.fernandez@uca.es (G.F. Barbero), cmallor@cita-aragon.es (C. Mallor), agarcés@cita-aragon.es (A. Garcés-Claver).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.112>

Received 1 February 2018; Received in revised form 19 June 2018; Accepted 17 July 2018

Available online 18 July 2018

0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1998; Kobata et al., 1999). However, as in the case of capsaicinoids, in which more than twenty analogues have been reported, several minor capsinoids not yet described could exist (Bosland & Votava, 2012, chap. 6). The number of side chain carbons, the presence or absence of an unsaturation, and the methyl branches located in different positions along the chain (straight, iso- or anteiso-), determine the structure of capsaicinoids and capsinoids and, consequently, their bioactivity and pungency degree (Bosland & Votava, 2012, chap. 6). Usually, capsinoids have been reported in hot and super-hot pepper cultivars, although in medium to low concentrations compared to capsaicinoids. For instance, capsinoids were found in ‘Habanero’, ‘Bhut Jolokia’, ‘Trinidad Moruga Scorpion’, and ‘7-Pot’ cultivars in a range from 151 to 915 µg/g dry weight (DW), whereas capsaicinoids ranged from 5063 to 23,303 µg/g DW, their concentrations being up to 50-fold higher than those of capsinoids (Jang et al., 2015; Tanaka et al., 2015). Although hot peppers are used worldwide in cuisine, some markets, like the European, prefer non-pungent pepper cultivars for fresh consumption (FAOSTAT, 2013). Thus, the development of new non-pungent *Capsicum* cultivars with high levels of capsinoids (and low or null of capsaicinoids), through breeding programs, has gained importance in recent years. To do so, it is necessary to have certain genetic control of the compounds responsible for pungency, as well as of the biosynthesis process of both capsinoids and capsaicinoids. Although some genes have been proposed as responsible for pepper pungency, several authors suggest that the *pAMT* gene plays a key role in capsinoid biosynthesis. This gene encodes a putative aminotransferase (*pAMT*) which catalyses the formation of vanillylamine from vanillin in the capsaicinoid biosynthetic pathway. Mutations in the *pAMT* gene resulted in a loss of the *pAMT* enzyme functionality, and consequently, an increase of capsinoid biosynthesis over that of capsaicinoids (Lang et al., 2009; Tanaka, Hosokawa, Otsu, Watanabe & Yazawa, 2009, 2010a, 2010b; Tanaka et al., 2015). These mutations have been reported in some low-pungent pepper cultivars from *C. annuum*, e.g. in cultivar ‘CH-19 Sweet’ capsinoids reached from 1332 to 5825 µg/g DW being up to 50-fold higher than capsaicinoids (Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Tanaka et al., 2010a). Similarly, in a few mildly pungent pepper cultivars from *C. chinense*, such as ‘Belize Sweet’, ‘Zavory Hot’, ‘Ají Dulce Strain2’, ‘No. 80’, ‘SNU11-001’, ‘LP1-LP12’, and ‘No. 4034’ high contents of capsinoids, ranging from 415 to 7441.81 µg/g DW, were found whereas capsaicinoids were found only in trace amounts (Tanaka et al., 2010a; Jang et al., 2015; Tanaka et al., 2015), or even undetectable levels (Tanaka, Fukuta, Koeda, Goto, Yoshida & Tanaka, 2018). Furthermore, recently, in the low pungent ‘S3212’ genotype from *C. frutescens* up to 607.6 µg/g DW of capsinoids and capsaicinoids have been described in trace amounts (Park et al., 2015). In this regard, the accurate identification and quantification of capsinoids and capsaicinoids, through precise analytical techniques, is essential to allow a better understanding of the genetic control of pepper pungency.

Until now, few analytical methods have been developed for capsinoid determination in pepper fruit samples, and all of them are based on HPLC and UHPLC techniques. The HPLC coupled with fluorescence (FL), ultraviolet (UV) and UV/Vis diode-array detection has been applied both for the identification of genes related to capsinoid biosynthesis (Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2010a, 2010b; Tanaka et al., 2015; Han et al., 2013; Jang et al., 2015), and for the characterization of metabolite diversity in pepper (*Capsicum* spp.) germplasm (Tanaka et al., 2009; Singh et al., 2009; Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, Bino & Bovy, 2011). Even a UHPLC-DAD method was validated and optimized to separate 17 capsinoid standards (Coutinho et al., 2015). However, the sensitivity of some of these methods is limited, particularly for the minor capsinoids, allowing only the detection of capsiate. Moreover, capsinoids are measured in FL and UV-Vis detectors at the same wavelengths as those of capsaicinoids and other organic compounds (Tanaka et al., 2009), and their quantification could be overestimated. This would occur when identification and quantification of a relatively large number of capsaicinoids and capsinoids, known or even

unknown analogues, present in a pepper extract is based only on retention time and UV spectra, while co-elution of minor compounds was happening. Conversely, HPLC in combination with high resolution mass spectrometry (MS) detection would allow: i) a selective identification of capsinoids by exact molecular masses (m/z); ii) a higher sensitivity (LODs and LOQs for capsinoids) than that of most HPLC-UV methods; iii) and more information obtained for each peak (Barbero, Liazid, Azaroual, Palma & Barroso, 2016; Stipcovich, Barbero, Ferreiro-González, Palma & Barroso, 2018; Fayos, Mallor, & Garcés-Claver, 2018). As far as the authors know, there are no previous reports of capsinoids being determined in pepper fruits using HPLC-MS. Therefore, the aim of this study is to develop and validate an HPLC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [(HPLC-ESI-MS(QTOF))] method, which allows an accurate quantification of the two major capsinoids, capsiate and dihydrocapsiate, and a selective identification of minor capsinoids that have not been identified by previous methods. This method would be suitable for an exhaustive analysis of capsinoids in pepper fruit matrices, both in genetic studies and breeding programs.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All samples were prepared in a mixture (60:40 v/v) of methanol (> 99.9% LC-MS grade, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) and analytical grade type I water (Milli-Q Synthesis, Millipore, Bedford, MA). Synthetic capsinoid standards: (O7C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl heptanoate; (O8C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl octanoate; (O9C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl nonanoate; (O10C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl decanoate; (O11C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl undecanoate; (O12C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl dodecanoate; (O13C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl tridecanoate; (O14C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl tetradecanoate; (O15C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl pentadecanoate; (O16C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl hexadecanoate; (capsiate) (*E*)-8-methyl-6-nonenoate and (dihydrocapsiate) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl 8-methylnonanoate were synthesized in the Department of Organic Chemistry at the University of Cadiz, Spain (Barbero et al., 2010). The ($\pm$)-3,4-dimethoxybenzyl 4-methyloctanoate (DMBO) was chemically synthesized and used as internal standard in all experiments (Fayos, Barbero, et al., 2018). The chemical structure, molecular formula, molecular weight and mass data of all the standards used in this work are shown in the Supplementary material, Table S1.

2.2. Preparation of the standard solutions

The stock solutions (1100 and 1000 µmol/l) of all capsinoid standards were prepared in three series and preserved in methanol at -20°C until use. These stock solutions were used to prepare the dilutions for all experiments in a mixture of methanol:water (60:40, v/v).

2.3. Plant material

Eight pepper accessions were used in the present study belonging to three of the domesticated *Capsicum* species: ‘RU72-241’, ‘Mishme’, ‘Red Habanero’, and ‘Bhut Jolokia’ belonging to *C. chinense*; ‘Chile Serrano’ and ‘Chile de Árbol’ to *C. annuum*; and ‘Tabasco’ and ‘RU72-7’ to *C. frutescens*. All accessions were supplied by the Vegetable Germplasm Bank of Zaragoza at the CITA of Aragón (Zaragoza, Spain). Three plants per genotype were grown in a greenhouse in black plastic pots, of 17 cm in diameter (one plant per pot), containing a substrate mixture of peat, sand, clay-loam soil, and Humin substrat (Klasman-Deilmann, Geeste, Germany) (1:1:1, in v). Two grams of a slow-release fertilizer (Osmocote 16N-4P-9K, Scotts, Tarragona, Spain) were used as a top-dressing in each pot. Plants were watered daily to maintain optimum growth, and the average maximum and minimum temperatures in the

greenhouse during the growth period were 28 °C and 18 °C, respectively.

2.4. Capsinoid extraction

Five ripe pepper fruits per plant were harvested and pooled. Fresh fruits were dried in a freeze-drier (Virtis Genesis 25 EL) during 4–5 days, and then bulked fruits were ground in a blender. Three hundred milligrams of pepper powder were extracted with 3 ml of pure ethyl acetate (> 99.8% LC-MS grade, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain), and stirred for 1 min in a vortex. Ethyl acetate was selected to be the most suitable solvent for capsinoid extraction compared to ethyl acetate:acetone, methanol and acetonitrile (Fayos et al., 2015). In each extract, a known amount of DMBO was added, as an internal standard, being 5 µmol/l the final concentration. The pepper powder suspension was shaken constantly at 30 °C for 1 h operating at 60 rpm (orbital shaker from Velp Scientifica, Usmate Velate, Lombardia, Italy). The mixture was centrifuged for 5 min at 620g, and 2 ml of the supernatant was collected in microtubes. This supernatant was completely evaporated in a vacuum centrifuge (miVac Duo Concentrator, Barnstead GeneVac, Ipswich, UK). The resulting pellet was resuspended with a 0.5 ml mixture of methanol and ultrapure water (60:40 v/v). Finally, the mixture was filtered through two disposable nylon filters, first with a 0.45 µm filter and then with a 0.20 µm one (Teknokroma Analítica S.A., Barcelona, Spain).

2.5. HPLC-ESI-MS(QTOF) and HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) analysis

Individual standard solutions in 60% methanol (20 µmol/l for DMBO and 10 µmol/l for capsate and dihydrocapsate) were detected by direct injection with a syringe pump (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA) operating at 4 µl/min, in a Quadrupole Time-of-Flight (QTOF) mass spectrometer equipped with an Electrospray Ionization Source (ESI) (MicroTOF-Q, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). HPLC-MS and MS/MS experiments were carried out using N₂ as collision gas with collision cell energy of 10 eV and an isolation width for the precursor ion of 2 mass-to-charge ratio (*m/z*) units. The nebulizer gas (N₂) pressure, the drying gas (N₂) flow rate and the drying gas temperature were 1.6 bar, 8.0 L/min, and 200 °C, respectively. Spectra were acquired in the *m/z* 50–800 range. The mass axis was calibrated by using Na-formate adducts [10 mmol/l NaOH, 2.5% (v/v) formic acid and 50% (v/v) 2-propanol] that were introduced through a divert valve at the beginning of each direct injection. For MS/MS spectra the molecular ions [M+Na]⁺ with values of *m/z* 329 for capsate and *m/z* 331 for dihydrocapsate and DMBO were chosen as precursors, with an isolation width of 4 *m/z* units and an amplitude voltage of 0.45 V. The MS/MS technique was also applied to ‘Bhut Jolokia’ extract for fragmentation the precursor ions *m/z* 329 and *m/z* 331 and to confirm those peaks that corresponded with capsinoids. Bruker Daltonik software packages microTOF Control v.2.3 and HyStar v.3.2 were used to control the system. Data Analysis v.4.0 was used to process the data. The Sigma Fit (Bruker Daltonik) algorithm was used for the molecular formula determination.

Chromatographic separation was performed on an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an isocratic pump, an autosampler, and a thermostated column compartment. The column used was an analytical HPLC RP-C₁₈ column (Symmetry® C₁₈, 2.1 × 150 mm; 3.5 µm spherical particle size, Waters, Milford, MA, USA) protected by a guard column (Symmetry® C₁₈ 2.1 mm i.d. × 10 mm length, 3.5 µm spherical particle size, Waters). The HPLC conditions were Milli-Q water (solvent A) and methanol (solvent B) acidified with 0.1% (v/v) acetic acid as eluents, 0.2 µl/min as flow rate, 25 °C as column temperature, and 5 µl as injection volume. The elution program started according to the following gradient: 0–7 min, 60% B; 7–15 min, 60–70% B; 15–52 min, 70–100% B; and was maintained for 80 min to equilibrate and return to the initial

concentrations.

The validation of the HPLC-ESI-MS(QTOF) method was carried out with several parameters, including linearity (calibration curves consisting of 13 points), limits of detection [LOD, signal-to-noise (S/N) ratio of 3], limits of quantification [LOQ, S/N ratio 10], repeatability (intraday assays), intermediate precision (interday assays), and accuracy (recoveries). Recoveries were performed using an extract of pepper fruits from the ‘Bhut Jolokia’ accession. This cultivar was selected because its fruits inherently contain capsate and dihydrocapsate (Tanaka et al., 2015). All of these experiments were corrected by adding DMBO as an internal standard, being 5 µmol/l its final concentration.

3. Results

3.1. ESI-MS(QTOF) and ESI-MS/MS(QTOF) analysis of capsate, dihydrocapsate, and DMBO standards

Capsate, dihydrocapsate, and DMBO mass spectra were optimized in positive-ion mode by direct injection of the individual standards in the QTOF mass analyzer using ESI-MS(QTOF) in the *m/z* 200–400 range during the whole chromatographic run. In negative ion mode ionization, no compounds were detected. Optimal values leading to maximum signal intensity for every compound were 4500 V and –500 V for capillary and endplate offset, respectively. The major peaks observed in the ESI-MS spectra were the [M+Na]⁺ molecular ions at *m/z* 329.1731 for capsate, *m/z* 331.1885 for dihydrocapsate, and *m/z* 331.1888 for DMBO (Fig. 1). These molecular ions were selected as precursors for the MS/MS experiments. The MS/MS spectra obtained for capsate and dihydrocapsate standards showed the most intense product ion at *m/z* 159.0417 and 159.0419, respectively, corresponding to the sodiated aromatic ring moiety. Besides, in both MS/MS spectra another less intense product ion could be observed at *m/z* 137.0605 for capsate and *m/z* 137.0623 for dihydrocapsate, corresponding to the protonated vanillyl ring. The MS/MS spectra of both capsinoid standards were similar, since the ionized fragments corresponding to the aromatic ring moiety are common to all capsinoids. On the other hand, the MS/MS spectrum of DMBO showed a major peak at *m/z* 151.0750, corresponding to the protonated vanillyl-type ring. The portion corresponding to the branched-chain fatty acid of the three standards did not ionize. These data have enabled the development and optimization of the HPLC method.

3.2. HPLC method for capsinoid standards

This chromatographic method was established with the purpose to allow the separation of all capsinoid standards currently available. The chromatographic separation of all capsinoid standards was carried out in approximately 55 min, and the peaks were neat and well-resolved (Fig. 2). The HPLC method permitted to resolve adequately thirteen capsinoid standards, including capsate, DMBO, and dihydrocapsate with retention times of 31.0, 34.0, and 35.3 min, respectively. DMBO, dihydrocapsate and the isomer 4-hydroxy-3-methoxybenzyl decanoate (O10C), all of them with an *m/z* ratio of 331, were completely separated.

3.3. Validation of the HPLC-ESI-MS(QTOF) method

The HPLC-ESI-MS(QTOF) method was developed for the simultaneous quantification of capsate and dihydrocapsate, and the qualitative detection of the rest of capsinoids from pepper fruits extracts. Calibration curves, LODs and LOQs, intra- and interday repeatability, and recovery assays, corrected by internal standardization, were performed to complete the validation of the HPLC-ESI-MS(QTOF) method.

LODs, characterized as the amount of analyte giving a signal-to-noise (S/N) ratio of 3, were 0.006 µg/ml for capsate and dihydrocapsate standards (corresponding to a concentration of 0.02 µmol/

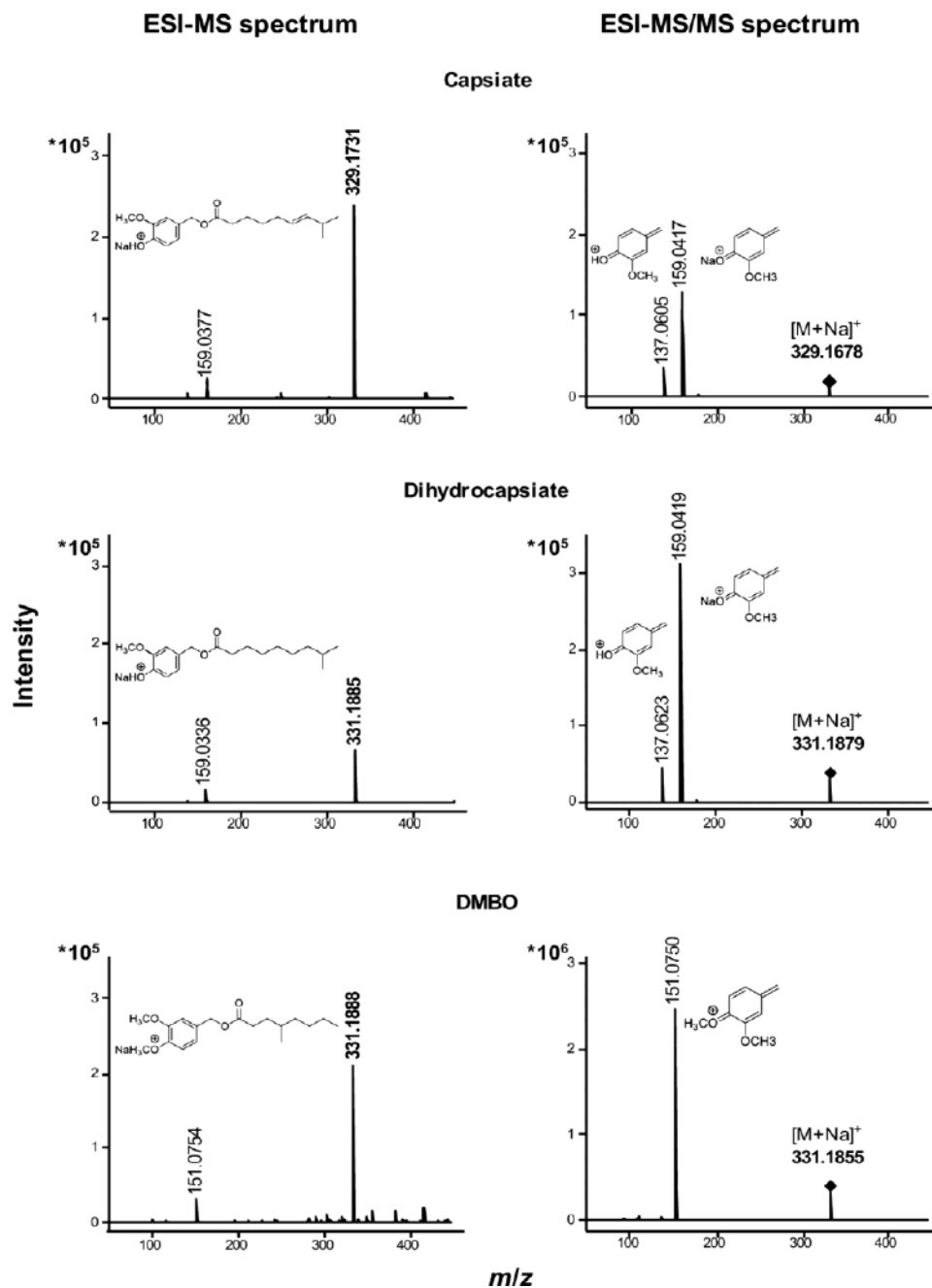


Fig. 1. Positive-ion mode ESI-MS and ESI-MS/MS spectra of capsiate, dihydrocapsiate, and DMBO acquired by direct injection on QTOF mass analyzer of individual standard solutions in 60% methanol (10 $\mu\text{mol/l}$ for capsiate and dihydrocapsiate and 20 $\mu\text{mol/l}$ for DMBO).

l), and LOQs, defined as the amounts giving an S/N ratio of 10, were 0.015 $\mu\text{g/ml}$ (0.05 $\mu\text{mol/l}$) for both. Calibration curves were used to evaluate the linearity of the method. Blank samples were spiked with standard solutions of capsiate and dihydrocapsiate in thirteen concentration levels corresponding to 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{mol/l}$, and adding a fixed concentration of 5 $\mu\text{mol/l}$ DMBO, in triplicate. The resulting calibration curves were obtained by plotting the analyte peak area ratio (A_A), standardized with the peak area ratio of the internal standard (A_{IS}), versus the concentration of the analyte. For both compounds, the data fitted well into a linear equation from LOQs to 100 $\mu\text{mol/l}$, being R^2 equal to 0.997 for capsiate ($y = 0.172x - 0.118$), and R^2 equal to 0.999 for dihydrocapsiate ($y = 0.248x - 0.144$). The intraday repeatability for retention time (RT) and peak area ratio (A_A/A_{IS}) was calculated by the relative standard deviation of 10 consecutive injections with two concentration

levels, low (5 $\mu\text{mol/l}$) and high (50 $\mu\text{mol/l}$), for each analyte. The intermediate precision was calculated by the relative standard deviation of one injection of the same standard solutions on 10 consecutive days. The RSD values for RT were less than 0.26% and 0.41% for the intraday repeatability and intermediate precision, respectively. The RSD values for peak area ratio were in the ranges from 1.83 to 2.25% for intraday repeatability and from 1.33 to 2.11% for intermediate precision (Supplementary material, Table S2). Recoveries were performed in triplicate by spiking fruit extracts of the ‘Bhut Jolokia’ accession with solutions containing known amounts of capsiate, dihydrocapsiate and DMBO standards. Recovery was calculated by subtracting the crude extract from the sample spiked with the standards, and dividing it by the average of the standards. Capsiate and dihydrocapsiate were recovered in the ranges of 98.0–92.7% and 89.6–97.6%, respectively (Supplementary material, Table S2).

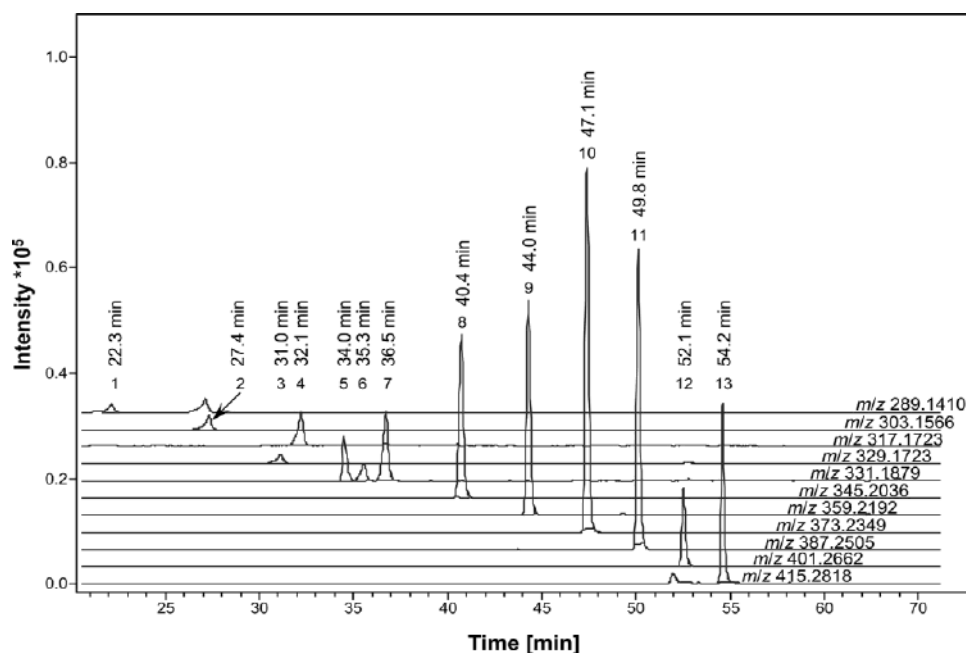


Fig. 2. Chromatogram obtained by HPLC-ESI-MS (QTOF) in positive ion mode of a combined standard solution in 60% methanol, containing the thirteen capsinoid standards at a concentration of 50 $\mu\text{mol/l}$: (1) O7C; (2) O8C; (3) Capsiate; (4) O9C; (5) DMBO; (6) Dihydrocapsiate; (7) O10C; (8) O11C; (9) O12C; (10) O13C; (11) O14C; (12) O15C; (13) O16C.

3.4. Capsiate and dihydrocapsiate analyses in pepper fruit extracts by HPLC-ESI-MS(QTOF)

The HPLC-ESI-MS(QTOF) validated method was applied to the analysis of pepper fruit extracts from the eight pepper accessions selected. Peak assignment and identification of capsiate, dihydrocapsiate, and DMBO were based on comparison of the RT and m/z data with those of the standards. The quantitative analysis of capsiate and dihydrocapsiate was performed by plotting analyte peak area ratio, standardized with the peak area ratio of internal standard, against concentration. Capsiate and dihydrocapsiate were found in all the pepper accessions in the ranges of 1.21–544.59 $\mu\text{g/g}$ DW and 0.61–81.95 $\mu\text{g/g}$ DW, respectively (Table 1). In all accessions, the detected amounts of capsiate were higher than those of dihydrocapsiate. The capsiate/dihydrocapsiate ratio was higher in the ‘Red Habanero’, ‘Bhut Jolokia’, and ‘Chile Serrano’ accessions, where the capsiate amounts detected were up to 64-fold higher than the dihydrocapsiate’s.

3.5. Capsinoid identification in ‘Bhut Jolokia’ by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF)

The HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) method was used to confirm the identity of the capsinoids and when no standards were available, the fragmentation pattern and the assignment of the most accurate elemental formulae were carried out with the Data Analysis software (Table 2). This method was applied for capsinoid identification in the

‘Bhut Jolokia’ accession and its chromatogram is shown in Fig. 3. Three out of the five peaks detected were identified as capsinoids: capsiate (peak 2), DMBO (peak 4), and dihydrocapsiate (peak 5) at 31.0 (m/z 329.1731), 34.0 (m/z 331.1888), and 35.3 min (m/z 331.1885), respectively (Fig. 3B and D). Peak 1 at 27.4 min (m/z 301.1409) could be putatively attributed to the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion of any of the O8C isomers, 4-ene-5-methyl normoncapsiate, 4-ene-6-methyl normoncapsiate or vanillyl 5-octanoate [(*E*)-4-hydroxy-3-methoxybenzyl 5-octenoate] (Fig. 3A; Supplementary material, Table S3), according to its fragmentation pattern with MS/MS product ions at m/z 137.0578 and 159.0405 and the accurate elemental formulae assigned to both product ions and parent ion (Table 2). Peak 3 at 31.7 min (m/z 317.1693) could be putatively attributed to the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion of any of the O9C isomers, 6-methyl nordihydrocapsiate or 7-methyl nordihydrocapsiate (Fig. 3C; Supplementary material, Table S3). The vanillyl nonanoate [4-hydroxy-3-methoxybenzyl nonanoate] isomer was rejected because this standard eluted at a larger retention time (32.1 min). Based on the exact mass to charge ratio (m/z), fragmentation pattern (product ions at m/z 137.0580 and 159.0407) and the most likely elemental formulae for product and parent ions (Table 2), the structures for the putative O9C isomers were proposed (Supplementary material, Table S3).

The capsiate fragmentation pattern displayed in Fig. 4A allowed the capsinoid fragmentation pattern to be proposed. Fragmentation of the molecular ion $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at m/z 329 (capsiate) produced product ions at m/z 159.0417 as base peak and at m/z 137.0605, corresponding to sodiated and protonated vanillyl ring moiety, respectively. This

Table 1

Concentrations of capsiate and dihydrocapsiate found in pepper fruit extracts from different accessions determined by the HPLC-ESI-MS(QTOF) method developed. Values are showed as [means $\pm$ SE ($n = 3$)].

Accession Name	Accession Number	Specie	Capsiate		Dihydrocapsiate		
			($\mu\text{g/g}$ DW)		($\mu\text{g/g}$ DW)		
RU72-241	C-83	<i>C. chinense</i>	38.46	$\pm$	32.53	$\pm$	2.52
Mishme	C-276		1.21	$\pm$	1.06	$\pm$	0.56
Red Habanero	C-401		156.97	$\pm$	6.11	$\pm$	0.87
Bhut Jolokia	C-449	<i>C. annuum</i>	440.90	$\pm$	253.22	$\pm$	3.73
Chile Serrano	C-141		61.04	$\pm$	94.31	$\pm$	5.81
Chile de Árbol	C-204		5.00	$\pm$	2.97	$\pm$	0.27
Tabasco	C-103	<i>C. frutescens</i>	20.62	$\pm$	33.07	$\pm$	2.91
RU72-7	C-163		544.59	$\pm$	245.71	$\pm$	40.35

Table 2

Characterization of capsinoids found in pepper fruits extract from the ‘Bhut Jolokia’ accession including retention time (RT), elemental formula of parent and product ions, measured and calculated m/z of parent and product ions, mass error in mDa and Sigma Fit™ values.

Compound	RT (min)	Parent Ion Formula	Measured m/z	Calculated m/z	Product Ions Formula	Measured m/z	Calculated m/z	error mDa	Sigma Fit™
4-ene-5-methyl normoncapsiate, 4-ene-6-methyl normoncapsiate or vanillyl 5-octenoate	27.4	$C_{16}H_{22}NaO_4$	301.1409	301.1410				0.1	0.05
					$C_8H_9O_2$	137.0578	137.0597	1.9	n.a.
Capsiate	31.0	$C_{18}H_{26}NaO_4$	329.1731	329.1723	$C_8H_8NaO_2$	159.0405	159.0417	1.2	n.a.
								-0.7	0.04
					$C_8H_9O_2$	137.0605	137.0597	-0.8	0.78
					$C_8H_8NaO_2$	159.0417	159.0417	1.0	0.02
					$C_7H_6O_2$	122.0357	122.0362	0.5	n.a.
					$C_8H_{10}NaO_3$	177.0555	177.0522	-3.3	n.a.
6-methyl nordihydrocapsiate or 7-methyl nordihydrocapsiate	31.7	$C_{17}H_{26}NaO_4$	317.1693	317.1723	$C_{10}H_{18}NaO_2$	193.1187	193.1199	1.2	n.a.
								3.0	0.10
Dihydrocapsiate	35.3	$C_{18}H_{28}NaO_4$	331.1885	331.1880	$C_8H_9O_2$	137.0580	137.0597	1.7	n.a.
					$C_8H_8NaO_2$	159.0407	159.0417	1.0	n.a.
								-0.5	0.03
					$C_8H_9O_2$	137.0623	137.0597	-2.5	0.78
					$C_8H_8NaO_2$	159.0419	159.0417	-0.3	0.05
					$C_7H_6O_2$	122.0358	122.0362	0.4	n.a.
					$C_8H_{10}NaO_3$	177.0558	177.0522	-3.6	n.a.
					$C_{10}H_{20}NaO_2$	195.1334	195.1356	2.2	n.a.

fragmentation occurred from the cleavage of the C_7-O_8 bond and subsequent rearrangement of the double bonds of the vanillyl ring moiety. Similar product ions at m/z 159.0417 and at m/z 137.0580 were observed during the fragmentation of dihydrocapsiate (Table 2). The fragmentation pattern of capsiate showed additional product ions from the fragmentation of the aromatic ring moiety, while the fragments at m/z 122.0357 were produced by a rapid dissociation of the methylene moiety from product ions at m/z 137, and the fragments at m/z 177.0555 were originated by the cleavage of the O_8-C_9 bond and subsequent rearrangement of the double bond of the vanillyl ring moiety (Fig. 4B; Table 2). The fragmentation pattern of dihydrocapsiate showed similar product ions at m/z 122.0358 and at m/z 177.0558. Moreover, product ions were produced at m/z 193.1187 for capsiate (and at m/z 195.1334 for dihydrocapsiate), showing the acyl residue of the molecule obtained from the cleavage of the benzylic carbon bond C_1-C_7 .

4. Discussion

Since ancient times, hot peppers have been widely used, not only as food, spice or colourants, but also for medical purposes. Nowadays, their health properties are well known and have been attributed to capsaicinoids and capsinoids (Fayos, Mallor, et al., 2018). Due to the increasing interest in capsinoids, a new HPLC-ESI-MS(QTOF) analytical method has been developed and validated for a sensitive and precise quantification of capsiate and dihydrocapsiate in pepper fruit extracts. In addition, the ESI-MS/MS analysis provides an accurate identification of major and minor capsinoids, by means of their fragmentation pattern and exact mass. To the authors' knowledge, this is the first time that capsinoids have been determined by HPLC-ESI/MS(QTOF) and ESI-MS/MS(QTOF). This method can be useful in breeding programs, for exhaustive analysis of metabolite diversity and to manipulate capsinoid profiles more effectively. The finest selection of *Capsicum* cultivars with high capsinoid contents would improve the nutritional value of pepper fruits and would be adapted to meet the consumers' demand.

In this work, for the capsinoid separation by reverse chromatography (C-18), samples were prepared in aqueous methanol (60% MeOH) and were chromatographed using a gradient program (60% MeOH–100% MeOH). This elution program provided an efficient separation of thirteen capsinoid standards, two of them being isomers (dihydrocapsiate and 4-hydroxy-3-methoxybenzyl decanoate).

Acetonitrile and most of the time, methanol (MeOH) combined with water at different concentrations (50%–80% for MeOH and 50–60% for acetonitrile) have usually been used for capsinoid separation in reverse chromatography (Sutoh, Kobata, & Watanabe, 2001; Lang et al., 2009; Singh et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Barbero et al., 2010; Han et al., 2013; Kobata, Sugawara, Mimura, Yazawa, & Watanabe, 2013; Tanaka et al., 2015). In addition, a gradient elution program has previously been used to separate the major capsinoids (Wahyuni et al., 2011; Kobata et al., 2013) and 15 capsaicinoid analogues (Schweiggert, Carle, & Schieber, 2006).

The HPLC-ESI/MS(QTOF) method developed has some advantages over the other analytical methods previously reported. The LODs and LOQs obtained, both for capsiate and dihydrocapsiate, were 0.010 and 0.026 $\mu\text{g/g}$, respectively (equivalent to a concentration of 0.02 and 0.05 $\mu\text{mol/l}$ in the extract), and the method was linear from LOQs to 100 $\mu\text{mol/l}$. The sensitivity of this method is better than the one reported using a UHPLC-PDA method validated for capsinoids, in which LODs and LOQs were > 10-fold higher (Coutinho et al., 2015), and also better than the LC-MS methods used for capsaicinoid determination (Garcés-Claver, Arnedo-Andrés, Abadía, Gil-Ortega, & Álvarez-Fernández, 2006; Allothman et al., 2012). In addition, the MS(QTOF) provides higher selectivity than UV/Vis detectors for capsinoid quantification in pepper fruits, in which capsinoids are measured at the same wavelength as capsaicinoids, and their quantification can be overestimated (Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2009; 2010a, 2010b; Tanaka et al., 2015; Coutinho et al., 2015). In contrast, capsinoid-like compounds are identified by exact mass on the MS(QTOF) analyzer, allowing their quantification in trace amounts. In this regard, the developed HPLC-ESI/MS(QTOF) method could assist the metabolomic studies in association with genetic and transcriptomic advances to elucidate part of the capsinoid biosynthesis pathways. The repeatability and intermediate precision of the method, expressed as RSD for the peak area, were in the range of 1.83–2.25% for intraday and 1.33–2.11% for interday assays, similar to those reported using UHPLC-PDA, which were in the range of 0.91–1.92% and of 2.03–3.92%, respectively (Coutinho et al., 2015). On the other hand, the accuracy of the analytical method was evaluated using recovery tests. Recoveries were obtained, by spiking fruit extracts of the ‘Bhut Jolokia’ accession, for the first time for capsiate and dihydrocapsiate in the range of 92.7–98.0% and of 89.6–97.3%, respectively. These recoveries were somewhat higher than those found for capsaicinoids using LC-MS

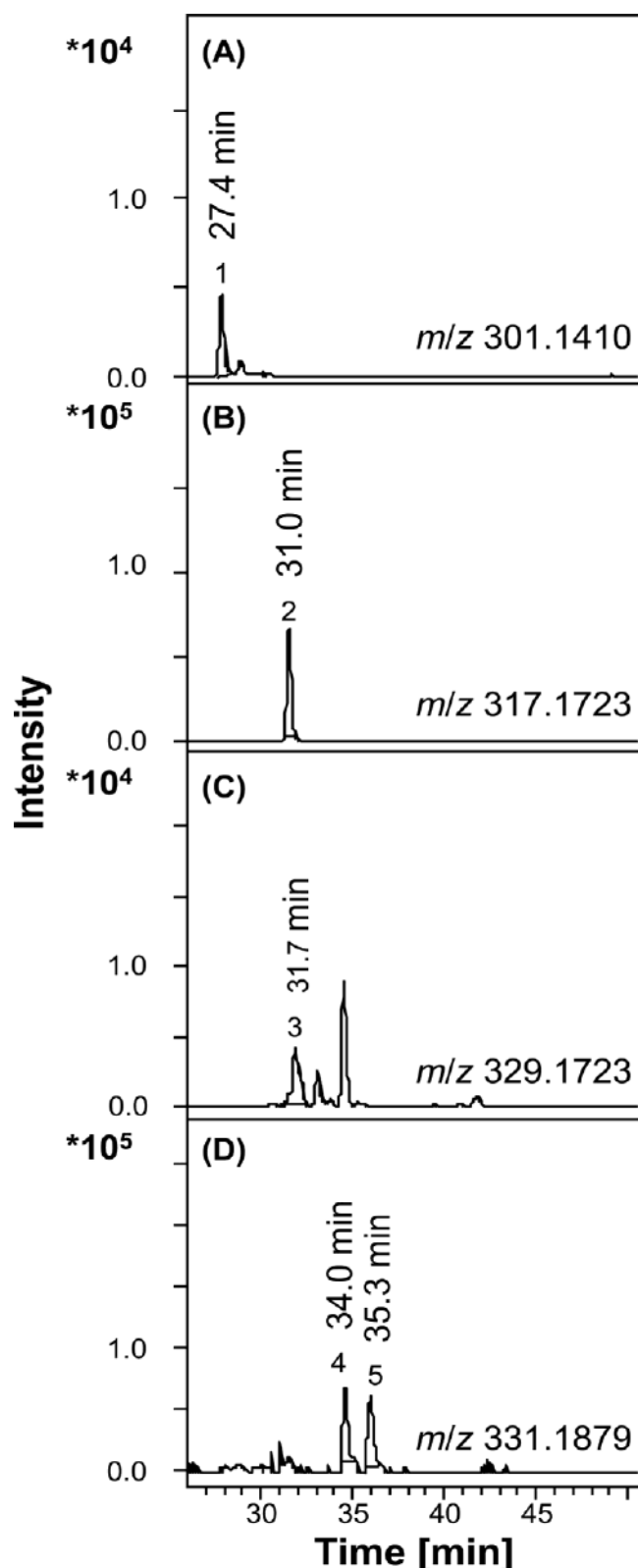


Fig. 3. HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) chromatogram of capsinoids found in fruit extracts of ‘Bhut Jolokia’ accession: (A) isomer of O8C; (B) capsiate; (C) isomer of O9C; (D) DMBO and dihydrocapsiate. The chromatogram traces correspond to the $[M + Na]^+ \pm 0.02 m/z$ of each capsinoid.

methods, which were found in the range of 79–95% (Garcés-Claver et al., 2006; Allothman et al., 2012).

Furthermore, the ESI-MS/MS(QTOF) analysis provided significant

information of capsinoid $[M + Na]^+$ molecular ions and of their product ions at exact m/z , valuable for the characterization of the capsinoid fragmentation pattern. All capsinoids shared a similar fragmentation pattern, differing only in the fragments corresponding to the branched-chain fatty acids. These fragmentation patterns were in turn similar to those of capsaicinoids (Singh et al., 2009; Schweiggert et al., 2006). Thus, in ‘Bhut Jolokia’, besides capsiate and dihydrocapsiate, two other putative isomers of O8C and O9C atoms in the acyl chain were tentatively identified based on their exact mass-to-charge ratio (m/z), fragmentation pattern, and assignment of the most likely elemental formulae for parent and product ions. Even though the occurrence of the 7-methyl nordihydrocapsiate and its isolation from fruits of the ‘CH-19 Sweet’ cultivar has already been reported (Kobata et al., 1999), the assignment of the O9C isomer as 7-methyl nordihydrocapsiate has not been possible, since its standard is not available. In the case of the putative isomer O8C, the identification of such a compound in pepper fruit extracts has been reported for the first time in this study. There is previous knowledge and identification of these isomers for capsaicinoids-type compounds from pepper fruit extracts (Schweiggert et al., 2006); however, an unequivocal identification will depend on the availability of standards for these capsinoids.

An additional advantage of the method developed in the present study was the use of DMBO as an internal standard in all capsinoid analysis. DMBO is an analogue to capsiate and dihydrocapsiate, not present in natural *Capsicum* fruits, stable under analysis conditions, and with a chemical structure closely related to that of capsinoids (Supplementary material, Fig. S1). Moreover, the ionization and fragmentation behaviour of DMBO is similar to that of capsinoids (Fayos, Barbero, et al., 2018). The chromatographic conditions were designed to separate DMBO from dihydrocapsiate, because both compounds have the same m/z (331). None of the previous analytical methods aforementioned used internal standards for capsinoid quantification, and thus, the HPLC-ESI-MS(QTOF) method provided a more accurate quantification of capsiate and dihydrocapsiate without any matrix effects.

The method developed was successfully applied to determine capsinoids in eight *Capsicum* accessions. Capsiate and dihydrocapsiate were quantified in all of them in a broad range; from 1.21 up to 544.59 $\mu\text{g/g}$ DW and from 0.61 up to 81.95 $\mu\text{g/g}$ DW, respectively. The differences in the capsinoid contents within pepper accessions may be attributed to fruit variability (Singh et al., 2009; Schweiggert et al., 2006). Overall, the capsiate and dihydrocapsiate contents found here are in line with those found in the literature (Singh et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Wahyuni et al., 2011). For instance, in ‘Red Habanero’ and ‘Bhut Jolokia’, two well-know pungent pepper cultivars, 296 $\mu\text{g/g}$ DW and 308 $\mu\text{g/g}$ DW of capsiate plus dihydrocapsiate, respectively had previously been reported (Tanaka et al., 2015). Considering that DW is approximately 10% of FW, the values reported for the ‘RU 72-241’ accession were in agreement with those found by Wahyuni et al. (2011). Furthermore, the higher sensitivity, selectivity and accuracy of this method have allowed the quantification of capsinoids in the ‘Tabasco’ accession (3.09–58.76 $\mu\text{g/g}$ DW of capsiate and 1.80–6.94 $\mu\text{g/g}$ DW of dihydrocapsiate), which had not been previously detected for this accession (Tanaka et al., 2009; Wahyuni et al., 2011).

5. Conclusions

In summary, an improved HPLC-ESI-MS(QTOF) method has been developed and validated to analyze the major capsinoids, capsiate and dihydrocapsiate, in extracts of *Capsicum* fruits. Moreover, the application of this method to capsinoid determination from pepper fruit extracts has allowed, for the first time, the identification of two minor capsinoid analogues by exact m/z , molecular formula and fragmentation pattern. The method developed would be particularly suitable for the exhaustive analysis of all capsinoids present in pepper fruit samples. Its applicability range is wide, for instance, in breeding programs to

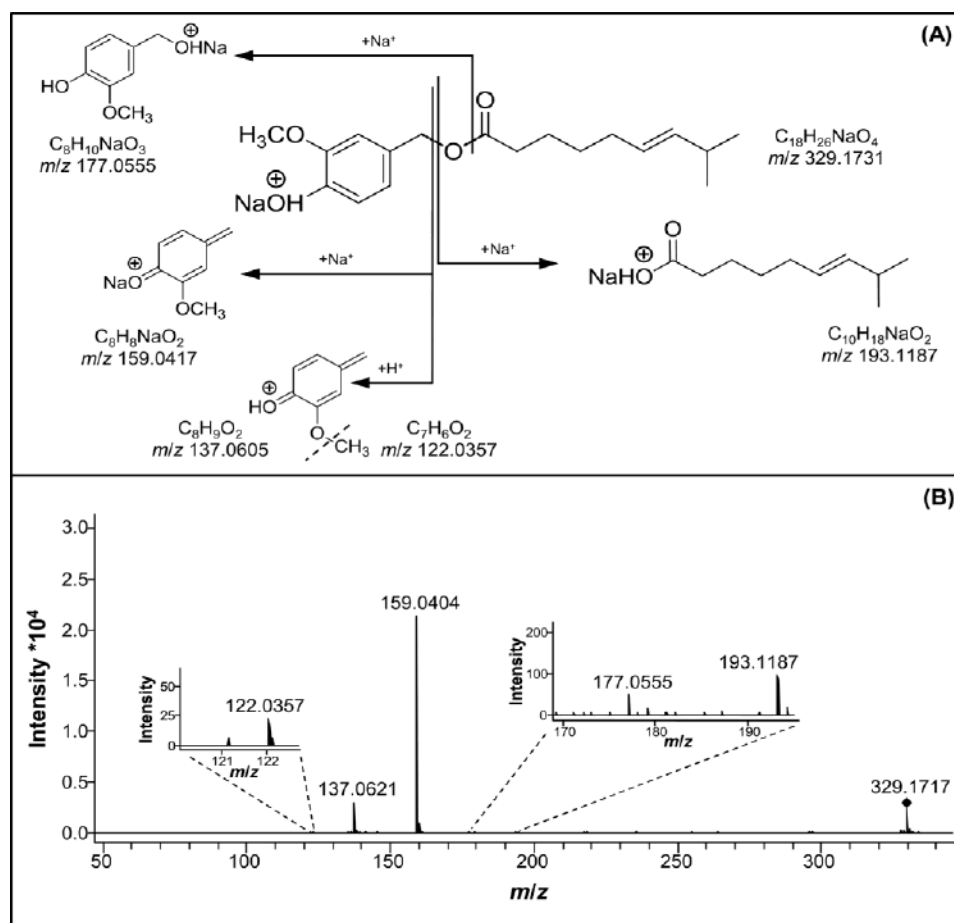


Fig. 4. Fragmentation pattern proposed for capsinoids: (A) Schematic representation of the capsate fragmentation pattern, (B) High resolution MS/MS spectrum of the capsate in positive ionization mode. The peaks corresponding to m/z 122.0357, 177.0555 and 193.1187 are shown in insets.

select genotypes with certain capsinoid contents, which meet the demands of the consumer market and food industry, and in studies of gene expression aimed to identify the genes involved in capsinoid biosynthesis.

Acknowledgments

This work forms part of the project RTA2015-00042-C02-01, funded by the National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA, Spain) and co-financed by the European Fund for Regional Development (FEDER, Spain). It was also supported for GA-A16 and OT2017/032 (University of Cadiz, Spain). O. Fayos is the beneficiary of an INIA fellowship programme (RTA2011-00118-C02-01).

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.112>.

References

Allothman, Z. A., Wabaidur, S. M., Khan, M. R., Ghafar, A. A., Habila, M. A., & Ahmed, Y. B. H. (2012). Determination of capsaicinoids in *Capsicum* species using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35, 2892–2896.

Barbero, G. F., Liaizid, A., Azaroual, L., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016). Capsaicinoid contents in peppers and pepper-related spicy foods. *International Journal of Food Properties*, 19, 485–493.

Barbero, G. F., Molinillo, J. M. G., Varella, R. M., Palma, M., Macías, A., & Barroso, C. G. (2010). Application of Hansch's Model to capsaicinoids and capsinoids: A study using the quantitative structure–activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3342–3349.

Bosland, P. W., & Votava, E. J. (2012). *Peppers: Vegetable and spice Capsicums* (2nd ed.). Wallingford, UK: CAB Intl.

Coutinho, J. P., Barbero, G. F., Fayos, O., Garcés-Claver, A., Godoy, H. T., Palma, M., & Barroso, C. G. (2015). Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. *Talanta*, 134, 256–263.

Evangelista, S. (2015). Novel therapeutics in the field of capsaicin and pain. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 8, 373–375.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP/> Accessed 17.04.01.

Fayos, O., Barbero, G. F., Savirón, M., Orduna, J., Durán, A. G., Palma, M., ... Garcés-Claver, A. (2018). Synthesis of (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate as a novel internal standard for capsate and dihydrocapsate determination by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF). *Open Chemistry*, 16, 1–8.

Fayos, O., Savirón, M., Mallor, C., Barbero, G. F., Orduna, J., & Garcés-Claver, A. (2015). Optimización del método de extracción de capsinoides a partir de frutos de pimiento. In 8th Congress of CYTA-CESIA, Badajoz-Spain, Book of Abstract p. 41. <http://hdl.handle.net/10532/2903>.

Fayos, O., Mallor, C., & Garcés-Claver, A. (2018). Evolución del conocimiento sobre la pungencia de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del pimiento (*Capsicum* spp.): Desde sus orígenes hasta el potencial nutraceutico actual. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 114, 99–118.

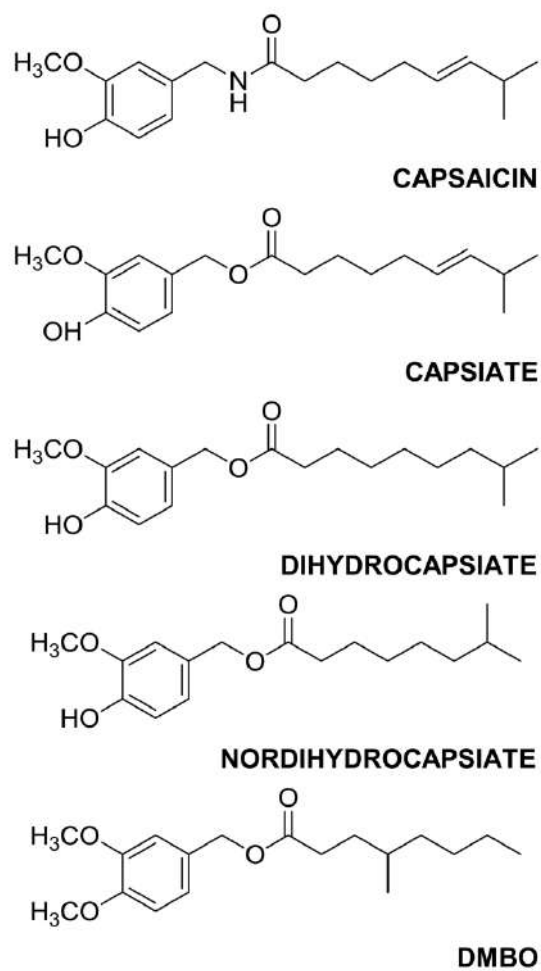
Friedman, J. R., Nolan, N. A., Miles, S. L., Brown, K. C., Akers, A. T., Colclough, K. W., ... Dasgupta, P. (2018). Anti-cancer activity of natural and synthetic capsaicin analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 364, 462–473.

Garcés-Claver, A., Arnedo-Andrés, M., Abadía, J., Gil-Ortega, R., & Álvarez-Fernández, A. (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9303–9311.

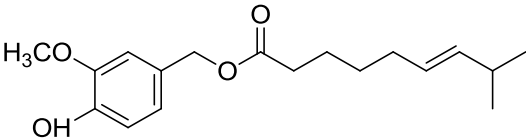
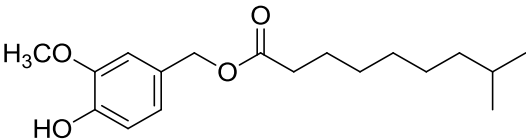
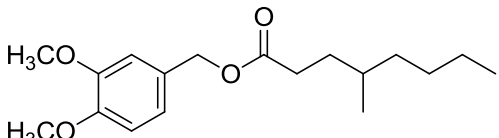
Han, K., Jeong, H. J., Sung, J., Keum, Y. S., Cho, M. C., Kim, J. H., ... Kang, B. C. (2013). Biosynthesis of capsinoid is controlled by the *Pun1* locus in pepper. *Molecular*

- Breeding*, 31, 537–548.
- Jang, S., Han, K., Jo, Y. D., Jeong, H. J., Siddique, M. I., & Kang, B. C. (2015). Substitution of a dysfunctional pAMT allele results in low-pungency but high levels of capsinoid in *Capsicum chinense* 'Habanero'. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3, 119–128.
- Kobata, K., Sugawara, M., Mimura, M., Yazawa, S., & Watanabe, T. (2013). Potent production of capsaicinoids and capsinoids by *Capsicum* peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11127–11132.
- Kobata, K., Sutoh, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., & Watanabe, T. (1999). Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products*, 62, 335–336.
- Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., & Watanabe, T. (1998). Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1695–1697.
- Kwon, D. Y., Kim, Y. S., Ryu, S. Y., Cha, M. R., Yon, G. H., Yang, H. J., ... Park, S. (2013). Capsiate improves glucose metabolism by improving insulin sensitivity better than capsaicin in diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1078–1085.
- Lang, Y., Hiroaki, K., Ryuji, S., Kenzo, N., Akihito, M., Tatsuo, W., ... Tetsuya, M. (2009). Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *The Plant Journal*, 59, 953–961.
- Li, N. S., Luo, X. J., Dai, Z., Liu, B., Zhang, Y. S., Yang, Z. C., & Peng, J. (2012). Beneficial effects of capsiate on ethanol-induced mucosal injury in rats are related to stimulation of calcitonin gene-related Peptide release. *Planta Medica*, 78, 24–30.
- Park, Y. J., Nishikawa, T., Minami, M., Nemoto, K., Iwasaki, T., & Matsushima, K. (2015). A low-pungency S3212 genotype of *Capsicum frutescens* caused by a mutation in the putative aminotransferase (p-AMT) gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 290, 2217–2224.
- Schweiggert, U., Carle, R., & Schieber, A. (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 557, 236–244.
- 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, 3452–3457.
- Stipcovich, T., Barbero, G. F., Ferreira-González, M., Palma, M., & Barroso, C. G. (2018). Fast analysis of capsaicinoids in Naga Jolokia extracts (*Capsicum chinense*) by high-performance liquid chromatography using fused core columns. *Food Chemistry*, 239, 217–224.
- Sutoh, K., Kobata, K., & Watanabe, T. (2001). Stability of capsinoid in various solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4026–4030.
- Sutoh, K., Kobata, K., Yazawa, S., & Watanabe, T. (2006). Capsinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 Sweet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1513–1516.
- Tanaka, Y., Hosokawa, M., Otsu, K., Watanabe, T., & Yazawa, S. (2009). Assessment of capsiconinoid composition, nonpungent capsaicinoid analogues, in *Capsicum* cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5407–5412.
- Tanaka, Y., Fukuta, S., Koeda, S., Goto, T., Yoshida, Y., & Yasuba, K. (2018). Identification of a novel mutant pAMT Allele responsible for low-pungency and capsinoid production in chili pepper: accession 'No. 4034' (*Capsicum chinense*). *The Horticulture Journal*, 87, 222–228.
- Tanaka, Y., Hosokawa, M., Otsu, K., Watanabe, T., & Yazawa, S. (2010b). Newly mutated putative-aminotransferase in nonpungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoids analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1761–1767.
- Tanaka, Y., Hosokawa, M., Otsu, K., Watanabe, T., & Yazawa, S. (2010a). Novel loss-of-function putative aminotransferase alleles cause biosynthesis of capsinoids, non-pungent capsaicinoid analogues, in mildly pungent chili peppers (*Capsicum chinense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11762–11767.
- Tanaka, Y., Sonoyama, T., Muraga, Y., Koeda, S., Goto, T., Yoshida, Y., & Yasuba, K. (2015). Multiple loss-of-function putative aminotransferase alleles contribute to low pungency and capsinoid biosynthesis in *Capsicum chinense*. *Molecular Breeding*, 35, 142.
- Wahyuni, Y., Ballester, A., Sudarmonowati, E., Bino, R., & Bovy, A. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72, 1358–1370.
- Zsiborás, C., Mátyás, R., Hegyi, P., Balaskó, M., Pétervári, E., Szabó, I., ... Solymár, M. (2017). Capsaicin and capsiate could be appropriate agents for treatment of obesity: A meta-analysis of human studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1–9.

Supplementary material, Fig. S1. Chemical structures of capsaicin, capsiate, dihydrocapsiate, nordihydrocapsiate, and DMBO, the internal standard used in this study.



Supplementary material, Table S1. Compound name, molecular formula, chemical structure, molecular weight, and [M+Na]⁺ mass data of all capsinoid standards used in this study. All compounds have been chemically synthesized: (capsiate) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl (*E*)-8-methyl-6-nonenoate; (dihydrocapsiate) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl 8-methylnonanoate; (DMBO) (±)-3,4-dimethoxybenzyl-4-methyloctanoate; (O7C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl heptanoate; (O8C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl octanoate; (O9C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl nonanoate; (O10C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl decanoate; (O11C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl undecanoate; (O12C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl dodecanoate; (O13C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl tridecanoate; (O14C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl tetradecanoate; (O15C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl pentadecanoate; (O16C) 4-hydroxy-3-methoxybenzyl hexadecanoate. The linear standards were named according to acyl chain carbon number.

Compound	Molecular Formula	Chemical Structure	Molecular Weight	[M+Na] ⁺
Capsiate	C ₁₈ H ₂₆ O ₄		306.3966	329.3864
Dihydrocapsiate	C ₁₈ H ₂₈ O ₄		308.4125	331.4023
DMBO	C ₁₈ H ₂₈ O ₄		308.4125	331.4023

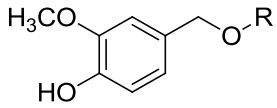
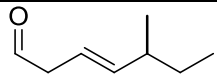
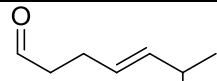
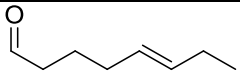
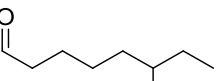
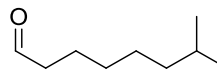
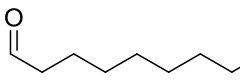
Compound	Molecular Formula	Chemical Structure	Molecular Weight	[M+Na] ⁺
O7C	C ₁₅ H ₂₂ O ₄		266.3328	289.3226
O8C	C ₁₆ H ₂₄ O ₄		280.3594	303.3492
O9C	C ₁₇ H ₂₆ O ₄		294.3859	317.3757
O10C	C ₁₈ H ₂₈ O ₄		308.4125	331.4023
O11C	C ₁₉ H ₃₀ O ₄		322.4391	345.4289
O12C	C ₂₀ H ₃₂ O ₄		336.4657	359.4555
O13C	C ₂₁ H ₃₄ O ₄		350.4923	373.4821

Compound	Molecular Formula	Chemical Structure	Molecular Weight	[M+Na] ⁺
O14C	C ₂₂ H ₃₆ O ₄		364.5188	387.5086
O15C	C ₂₃ H ₃₈ O ₄		378.5454	401.5352
O16C	C ₂₄ H ₄₀ O ₄		392.5720	415.5618

Supplementary material, Table S2. Repeatability (intraday assays) and intermediate precision (interday assays) of the HPLC-ESI/MS(QTOF) method developed were calculated by Relative Standard Deviation (RSD %) of retention time (RT) and peak area ratios (A_A/A_{IS}) for capsiate and dihydrocapsiate. Recoveries were obtained by spiking an extract of 'Bhut Jolokia' accession with solutions containing the analyte standards.

Analyte	RDS %					Recoveries [Mean $\pm$ SE (n = 3)]		
	Concentration (μ M)	Intraday (n = 10)		Interday (n = 10)		Amount added (μ mol/L)	Amount found (μ mol/L)	Recovery (%)
		RT (min)	A_S/A_{IS}	RT (min)	A_S/A_{IS}			
Capsiate	5	0.01	1.83	0.32	1.54	0	13.8 $\pm$ 0.3	
	50	0.26	2.21	0.35	1.33	12.8 $\pm$ 0.2	26.4 $\pm$ 0.4	98.0 $\pm$ 4.9
						62.5 $\pm$ 8.0	71.7 $\pm$ 1.9	92.7 $\pm$ 2.6
Dihydrocapsiate						0	3.4 $\pm$ 0.1	
	5	0.09	2.15	0.28	2.11	9.2 $\pm$ 0.1	11.6 $\pm$ 0.5	89.6 $\pm$ 5.5
	50	0.24	2.25	0.41	1.94	59.0 $\pm$ 6.0	60.8 $\pm$ 0.7	97.3 $\pm$ 1.1

Supplementary material, Table S3. Putative isomers of capsinoids classified according to their acyl chain carbon number and the methyl position in the acyl chain (anteiso-, iso- or straight): (1) 4-ene-5-methyl nornorcapsiate; (2) 4-ene-6-methyl nornorcapsiate; (3) vanillyl 5-octanoate; (4) 6-methyl nordihydrocapsiate; (5) 7-methyl nordihydrocapsiate; (6) vanillyl nonanoate. Structures for the putative O8C and O9C isomers were proposed.

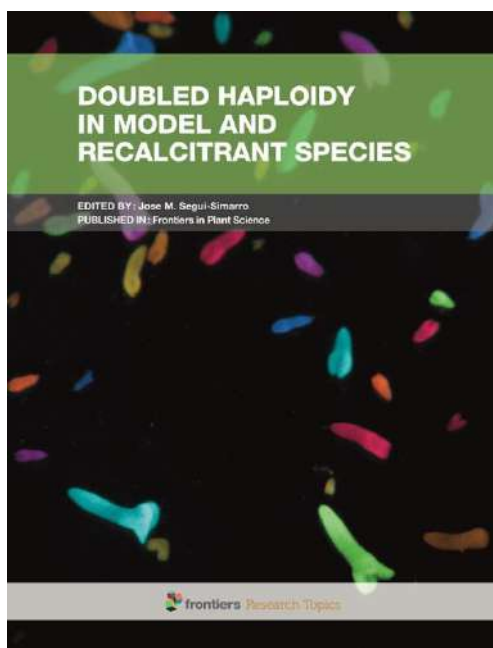
						
#C	R			Molecular Formula	Molecular Weight	[M+Na] ⁺
	Anteiso	Iso	Straight			
O8C	 (1)	 (2)	 (3)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.1513	301.1410
O9C	 (4)	 (5)	 (6)	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294.1825	317.1723

**DOUBLED HAPLOID PRODUCTION FROM SPANISH
ONION (*Allium cepa* L.) GERMPLASM: EMBRYOGENESIS
INDUCTION, PLANT REGENERATION AND
CHROMOSOME DOUBLING**

PUBLICACIÓN V

Título: Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling

Autores: Fayos O, Vallés MP, Garcés-Claver A, Mallor C, Castillo AM



Tipo de publicación: artículo científico

Año de publicación: 2015

Revista: Frontiers in Plant Science, 6: 384

DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00384>.

Factor de impacto: 3,678 (en 2017).

Área temática y clasificación (según JCR): Q1
en ciencia de las plantas.

La obtención de plantas dobles haploides en cebolla se ve limitada a la baja eficiencia de ginogénesis de esta especie. En este trabajo se evaluó y se optimizó la capacidad de ginogénesis en germoplasma español de cebolla, incluyendo el cultivar dulce ‘Fuentes de Ebro’, la variedad local BGHZ1354 y las dos variedades comerciales de tipo valenciana ‘Recas’ y ‘Rita’. La población ‘OH-1’, caracterizada por tener una alta frecuencia de inducción de la ginogénesis, se utilizó como control. Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes se probaron con un protocolo de un solo paso, obteniéndose porcentajes de inducción de la embriogénesis ligeramente mayores en las plantas de campo que en las de la cámara de crecimiento. El protocolo de un paso se comparó con el protocolo de dos pasos para la inducción de la embriogénesis. El germoplasma español produjo un porcentaje de embriogénesis 2 a 3 veces mayor con el protocolo de dos pasos, obteniéndose los porcentajes más altos en la cebolla ‘Recas’ (2,09%) y en ‘Fuentes de Ebro’ el más bajo (0,53%). Estos porcentajes fueron significativamente más bajos que los de la población OH-1, con un promedio del 15% independientemente del protocolo. También se probó el efecto de diferentes contenedores

en la regeneración de la planta, utilizando ambos protocolos. Mientras que el mayor porcentaje de plantas aclimatadas se obtuvo con el protocolo de dos pasos en combinación con contenedores Eco2box (70%), el porcentaje más bajo se observó con tubos de vidrio en ambos protocolos (20 – 23%). Para la duplicación cromosómica de los embriones ginogenéticos se aplicaron diferentes tratamientos con amiprofosmetilo (APM). Aunque se recuperó un número similar de plantas haploides duplicadas con 25 μ M o 50 μ M de APM en medio líquido, la aplicación de 25 μ M en medio sólido durante 24 h produjo el mayor número de plantas dobles haploides. Como método alternativo de duplicación cromosómica, se utilizó con éxito la embriogénesis somática a partir de las flores de las plantas haploides y mixoploides, obteniéndose plantas dobles haploides de todas las líneas regeneradas. En este estudio, se obtuvieron plantas dobles haploides de los cuatro cultivares españoles, sin embargo, es necesario seguir investigando para mejorar la eficiencia del procedimiento de ginogénesis.

Contribución de la doctoranda

La doctoranda realizó el diseño y planificación de la preparación del experimento para cumplir con los objetivos propuestos, con la supervisión del resto de coautoras. Realizó el trabajo de laboratorio, el análisis y la interpretación de los resultados, así como la preparación y la redacción del manuscrito.

Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling

Oreto Fayos¹, María P. Vallés², Ana Garcés-Claver¹, Cristina Mallor¹ and Ana M. Castillo^{2*}

¹ Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, Spain,

² Departamento de Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC), Zaragoza, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Jose M. Seguí-Simarro,
Universitat Politècnica
de València, Spain

Reviewed by:

Borut Bohanec,
University of Ljubljana, Slovenia
Ali R. Alan,
Pamukkale University, Turkey

*Correspondence:

Ana M. Castillo,
Estación Experimental de Aula Dei,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (EEAD-CSIC), Avda
Montañana,
1005 Zaragoza, Spain
amcast@eead.csic.es

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Biotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 19 March 2015

Accepted: 13 May 2015

Published: 29 May 2015

Citation:

Fayos O, Vallés MP, Garcés-Claver A,
Mallor C and Castillo AM (2015)
Doubled haploid production from
Spanish onion (*Allium cepa* L.)
germplasm: embryogenesis induction,
plant regeneration and chromosome
doubling. *Front. Plant Sci.* 6:384.
doi: 10.3389/fpls.2015.00384

The use of doubled haploids in onion breeding is limited due to the low gynogenesis efficiency of this species. Gynogenesis capacity from Spanish germplasm, including the sweet cultivar Fuentes de Ebro, the highly pungent landrace BGHZ1354 and the two Valenciana type commercial varieties Recas and Rita, was evaluated and optimized in this study. The OH-1 population, characterized by a high gynogenesis induction, was used as control. Growing conditions of the donor plants were tested with a one-step protocol and field plants produced a slightly higher percentage of embryogenesis induction than growth chamber plants. A one-step protocol was compared with a two-step protocol for embryogenesis induction. Spanish germplasm produced a 2–3 times higher percentage of embryogenesis with the two-step protocol, Recas showing the highest percentage (2.09%) and Fuentes de Ebro the lowest (0.53%). These percentages were significantly lower than those from the OH-1 population, with an average of 15% independently of the protocol used. The effect of different containers on plant regeneration was tested using both protocols. The highest percentage of acclimated plants was obtained with the two-step protocol in combination with Eco2box (70%), whereas the lowest percentage was observed with glass tubes in the two protocols (20–23%). Different amiprophos-methyl (APM) treatments were applied to embryos for chromosome doubling. A similar number of doubled haploid plants were recovered with 25 or 50 μ M APM in liquid medium. However, the application of 25 μ M in solid medium for 24 h produced the highest number of doubled haploid plants. Somatic regeneration from flower buds of haploid and mixoploid plants proved to be a successful approach for chromosome doubling, since diploid plants were obtained from the four regenerated lines. In this study, doubled haploid plants were produced from the four Spanish cultivars, however further improvements are needed to increase their gynogenesis efficiency.

Keywords: onion, gynogenesis, Spanish germplasm, flower bud, embryogenesis, Eco2box, chromosome doubling

Introduction

Onion (*Allium cepa* L.) is a valuable crop for food and medicinal purposes, ranking second after tomato in the list of vegetables cultivated worldwide, with production of over 90 million tons on 4.7 million ha (FAO, 2013). Onion is an important crop in Spain, which is the third largest producer in Europe, after Russia and Netherlands. The onion production in Spain is over 1.2 million tons, ranking second among crop vegetables. Onion is an allogamous species and therefore both open pollinated cultivars and hybrids are cultivated. Hybrids have many advantages, including higher productivity, genetic uniformity and seed production for commercial use (Campion et al., 1995; Foschi et al., 2009). Uniform highly inbred lines are needed for hybrid production, but they are difficult to obtain through conventional methods of plant breeding (between 10 and 12 years) due to severe inbreeding depression and their biennial cycle (Jakše et al., 2010). Haploid onion plant production and subsequent chromosome doubling offers a time-saving approach to obtain pure inbred lines (Dunwell, 2010; Chen et al., 2011). Onion breeding programs based on DH are being conducted at different public institutions such as Cornell University (Hyde et al., 2012), Wisconsin University in collaboration with Ljubljana University (Duangjit et al., 2013), Texas A&M University (Walker et al., 2006), INTA (Dr. Galmarini, personal communication), the Agricultural University of Kraków in collaboration with private companies (Adamus, personal communication), and Pamukale University (Alan et al., 2014; Celebi-Toprak et al., 2015).

Of the different methods for *in vitro* onion haploid production, only gynogenesis has been reported to be successful. Haploid onion plants have been produced from ovules, ovaries or whole flower buds (Muren, 1989; Campion and Alloni, 1990; Keller, 1990; Campion et al., 1992; Bohanec et al., 1995; Geoffriau et al., 1997; Michalik et al., 2000). Of the three aforementioned *in vitro* techniques, ovule culture was the least efficient. Ovary or flower bud culture showed similar results concerning embryo induction, but flower bud culture was less laborious (Bohanec et al., 1995; Bohanec and Jakše, 1999).

The main bottlenecks of gynogenesis in onion are the low rates of embryogenesis induction, plant survival and chromosome doubling from most of the materials (Geoffriau et al., 1997). Several aspects, including genotype and growing conditions of donor plants, culture medium and chromosome doubling procedure, need to be considered to achieve successful rates of gynogenesis (Bohanec, 2009; Chen et al., 2011). Material genotype and genetic structure are the most important factors (Jakše et al., 2010). Thus, low rates of gynogenesis induction have been reported in open-pollinated populations (0–3%) (Geoffriau et al., 1997; Bohanec and Jakše, 1999). Nevertheless, higher rates were achieved in specific synthetic populations, hybrid F1s, and inbred lines (10–33%) (Geoffriau et al., 1997; Bohanec and Jakše, 1999; Michalik et al., 2000; Bohanec et al., 2003).

Temperature stress treatment of donor plants, inflorescences, flowers or isolated ovules can trigger the switch from the gametophytic to the sporophytic pathway in different species (for review see Chen et al., 2011). In onion, the growth of donor plants at low temperatures with high illumination increased

embryogenesis percentages (Puddephat et al., 1999; Michalik et al., 2001). However, the application of temperature stress treatment to flower buds or pre-growth on starvation medium did not enhance the rate of gynogenesis (Bohanec, 1998).

The first studies on onion gynogenesis were performed with ovary or ovule culture. In most cases, a two-step protocol was used including a pre-culture of the flower buds before ovary or ovule isolation. In these reports the basal media B5 (Gamborg et al., 1968), MS (Murashige and Skoog, 1962) and BDS (Dunstan and Short, 1977) were used (Muren, 1989; Campion and Alloni, 1990; Keller, 1990; Campion et al., 1992). Afterwards, flower bud culture protocols were developed based at first on those used for ovary and ovule culture with some modifications of the culture media, including growth regulators (Bohanec et al., 1995; Martínez et al., 2000; Michalik et al., 2000), and later on a simplified one-step protocol, consisting of culturing the whole flower bud in an induction medium until the embryo stage (Bohanec and Jakše, 1999; Jakše and Bohanec, 2003).

A low rate of spontaneous chromosome doubling has been described in onion gynogenesis and is below 10% in most cases (Alan et al., 2003; Jakše et al., 2010). Therefore, anti-mitotic agents have been applied to different explants to increase this rate, including small bulbs (Campion et al., 1995), plantlets during micropropagation (Geoffriau et al., 1997; Alan et al., 2004, 2007), and embryos (Jakše and Bohanec, 2000; Grzebelus and Adamus, 2004). Embryos have several advantages over other explants, including shortening the time needed for plant acclimation and avoiding the step of excision and regrowth of the bulb and/or plant (Jakše and Bohanec, 2000). A comparison of colchicine, trifluralin, orizalin and amiprofos-methyl (APM) treatments showed that colchicine was the least efficient in chromosome doubling and trifluralin and orizalin resulted in higher hyperhydricity (Grzebelus and Adamus, 2004). Alan et al. (2007) compared different strategies for ploidy level manipulation in onion gynogenesis, reporting that somatic regeneration of spontaneous DH plants from flower buds of haploid and mixoploid plants was the most reliable. This strategy was applied later by Jakše et al. (2010).

The main objective of this study was to evaluate the gynogenesis capacity of Spanish onion germplasm using flower bud culture and to optimize the percentage of acclimated doubled haploid (DH) plants. Two gynogenesis induction protocols, previously described in the literature, different plant containers for plant regeneration, and APM treatments for chromosome doubling, were assayed. Somatic regeneration was also tested as an alternative approach for chromosome doubling of haploid (H) gynogenetic plants.

Materials and Methods

Material

Research was carried out from 2012 to 2014 in experimental plots in a shade house located at 41°39'N latitude. In 2012, two Valenciana type commercial varieties Recas (Veronsa) and Rita (kindly provided by Ramiro Arnedo S.A.) were used, as well as a half-sib family from the breeding program carried out

with the cultivar Fuentes de Ebro, a landrace known for its mild and sweet flavor (Mallor et al., 2011a; Mallor and Sales, 2012). Fuentes de Ebro has a high commercial value due to its differentiated quality, provided by the Protected Designation of Origin (PDO)¹ label, according to Regulation (EEC) 1146/2013 of the European Union. In 2013, the cultivars Fuentes de Ebro, Recas, and BGHZ1354, and the population OH-1 were used. BGHZ1354 is a landrace provided by the Vegetable Germplasm Bank of Zaragoza (BGHZ, Zaragoza, Spain) characterized by a high level of pungency (Mallor et al., 2011b). OH-1 is a synthetic population specially designed for high gynogenesis induction, obtained with inbred lines B2923B and B0223B (Havey and Bohanec, 2007).

Growing Conditions of Donor Plants

In February 2011, seeds of donor plants (Fuentes de Ebro, Rita and Recas) were sown in polystyrene trays in a greenhouse with a substrate mixture of peat (50%), coconut (30%), sand (20%), and N:P:K (14:16:18) with micronutrient fertilizer (Projar S.A., Valencia, Spain). In April, the plantlets were transplanted directly to soil in the field under natural conditions and bulbs were collected for repose in September. In order to obtain flower heads, the bulbs were planted in November in plastic pots (4 l) and grown in the field under natural conditions. One month before bolting, some bulbs were transferred to a growth chamber exposed to 16 h photoperiod at a continuous temperature of 15–18°C and an illumination of 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by Philips Master SON-T, PIA Hg Free 150 W and Phillips Master TL-D 58 W/865. The rest of the bulbs were kept in the field under natural conditions.

In February 2012, seeds of donor plants from Fuentes de Ebro, BGHZ1354, Recas, and OH-1 were sown, grown and harvested as described previously. In November 2012, the bulbs were transplanted directly to soil in the field under natural conditions for inflorescence development in 2013. Whole umbels were harvested from mid-May to the end of June.

Sterilization

The whole umbel was harvested when 30% of the flowers were at three to 4 days before anthesis (Figure 1A). Flowers of 3.5–4.5 mm in length were selected (Figure 1B) from each umbel and sterilized in ethanol 70% for 2 min and 16.5 g l⁻¹ dichloroisocyanuric acid disodium salt with two drops of Tween 80 for 10–12 min and followed by 4–5 rinsed with sterile distilled water.

Culture Media

Two different protocols were assayed for gynogenesis induction. In 2012, the protocol described by Jakše and Bohanec (2003) (Protocol A) was followed. Flower buds were cultured on an induction medium consisting of BDS medium (Dunstan and Short, 1977) with some modifications (Supplemental Table S1) and were kept in the same medium until embryo production (one-step protocol). In 2013, a two-step protocol described by

Michalik et al. (2000) (Protocol B) was also used. In this protocol, flower buds were plated on A₁ medium (Muren, 1989) for 1 month and later transferred to R₁ medium (Michalik et al., 2000) (Supplemental Table S1) until embryo production. For protocol comparison, flower buds from the same umbel were randomly distributed in each protocol. Thirty flowers were inoculated in each 90 mm Petri dish.

Chromosome Doubling

Embryos were used as explants for chromosome doubling. The duplication agent amipropos-methyl (APM) was applied in liquid or solid elongation medium and consisted of BDS (x1/2) with 15 g l⁻¹ glucose (Supplemental Table S1). In 2012, 25 μM APM was applied for 24–48 h in liquid medium. In 2013, concentrations of 25 and 50 μM APM were applied for 24 h in liquid elongation medium in a first experiment. In a second experiment, APM (25 μM) was applied in liquid medium for 24 h or in solid medium for 24 or 72 h. Good quality embryos from the “OH-1” population were randomly distributed in different treatments. APM treatment was performed in the dark and afterwards embryos were rinsed with liquid elongation medium.

Plant Regeneration, Acclimation and Bulb and Seed Production

In 2013, two experiments were performed. In the first, glass tubes were sealed with plastic or cellulose plugs (Steristophen Typ 20, Carl Roth GmbH+Co). In the second, glass tubes with plastic plugs were compared with Magenta boxes and polypropylene boxes with an aeration filter (Eco2box-green filter-Model 80MM H, Duchefa). Two to three plants were plated in each Magenta box and 4–6 plants in the Eco2box. Good quality embryos from the OH-1 population were randomly distributed in different containers.

In 2012, APM treated embryos were cultured in solid elongation medium in individual glass tubes with plastic plugs (150 × 25 mm). In 2013, glass tubes with plastic glass and Eco2boxes were used for plant regeneration from Spanish germplasm.

Culture Conditions

Flower buds and plantlets were incubated in a growth chamber at 24°C with 16 h photoperiod and 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by Phillips Master TLD Super 80 58 W/840 and OSRAM 30 W/2700 K.

After 6–10 weeks in elongation medium, rooted, healthy plants were transferred to 110 mm Ø pots containing soil (3:2 peat:vermiculite), covered with a plastic glass for 10 days and planted in a greenhouse. Plants were watered with Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) for the first month. For bulb and seed production, all H, mixoploid and DH plants were transplanted to 50 l plastic pots in the shade house with the same substrate mixture that had been used for donor plant growing.

Somatic Regeneration

Flower buds from H and mixoploid lines obtained in 2013 that bolted in July 2014 were harvested at the same stage as

¹Commission Implementing Regulation (EU) No. 1146/2013 of 5 November 2013 on entering a name in the register of protected designations of origin and protected geographical indications [Cebolla Fuentes de Ebro (PDO)].



FIGURE 1 | Production of doubled haploid onion plants by gynogenesis. (A) Onion umbels at the time of harvest. **(B)** Optimal stage of flower bud development for culture (3.5–4.5 mm length, flowers tagged with an asterisk). **(C)** Flower after 7 days of culture. **(D)** Flowers from cultivar Recas after 45 days of culture. **(E)** Gynogenetic embryo from

Fuentes de Ebro emerging from the ovary at 90 days of culture. **(F)** Isolated embryo from Rita. **(G)** Onion embryo treated with APM in liquid medium. **(H)** OH-1 plant regeneration in Eco2box. **(I)** Plants during acclimation in greenhouse. **(J)** Bulb formation in a shade house. **(K)** Seed production from Rita.

for gynogenesis induction, and cultured following the protocol described by Luthar and Bohanec (1999). Flower buds were inoculated in induction medium (I) for 7–8 days and then transferred to differentiation medium (R₂) (Supplemental Table S1). Shoot clumps were transferred to Magenta boxes containing solid elongation medium.

Ploidy Analysis

Ploidy was estimated by flow cytometry from acclimated plants. Young leaves were chopped in 2 ml Cystain UV ploidy solution (Partec) and filtered through a 30 μm nylon filter. Samples were analyzed in a PAS cytometer (Partec). Leaves from young seedlings were used as control.

Statistical Analysis

The following variables were calculated: percentage of gynogenesis induction (number of embryos or calli/100 flowers), percentage of embryogenesis induction (number of embryos/100 flowers), percentage of acclimated plants

(number of acclimated plants/100 embryos), percentage of hyperhydricity (number of hyperhydrated plants/100 embryos), percentage of H, mixoploid (n/2n), DH and tetraploid as the number of plants/100 acclimated plants. All experiments were established in a completely randomized design. Percentages of gynogenesis induction, embryogenesis induction, acclimated plants, hyperhydricity, ploidy levels and globular structures were analyzed using the Chi Square test by the FREQ procedure.

Results

Effect of Donor Plant Growing Conditions on Gynogenesis Induction and Plant Production

Bulbs from Fuentes de Ebro, Recas, and Rita were grown in the field and in a growth chamber. A total number of 9934 flower buds from the three cultivars were grown in 2012 following the protocol described by Jakše and Bohanec (2003) (Protocol A) (Table 1). Flowers opened after 3–6 days of culture (Figure 1C),

TABLE 1 | Spanish germplasm gynogenesis following the protocol described by Jakše and Bohanec (2003) (Protocol A) in 2012.

Cultivar	Growing conditions	Flowers	Gynogenesis induction		Embryogenesis induction		Acclimated plants	
			Calli + Embryos	Calli+Embryos/ Flowers (%)	Embryos	Embryos/ Flowers (%)	Plants Plants	Plants/ Embryos (%)
Fuentes de Ebro	F*	1206	9	0.75a***	8	0.66a***	1	12.5a***
	GC**	1688	7	0.41a	6	0.36a	0	0.0b
Recas	F	1998	30	1.50a	28	1.40a	0	0.0b
	GC	1062	16	1.51a	14	1.32a	1	7.1a
Rita	F	2966	49	1.65a	42	1.42a	2	4.8b
	GC	1014	11	1.08a	8	0.79a	2	25.0a

*F, Field; **GC, Growth Chamber; ***Values followed by the same letter within the cultivar are not significantly different ($P < 0.05$).

stayed green during the first month of culture and progressively turned yellow as the culture progressed. Some flowers from Recas and Fuentes de Ebro developed small calli on the flower base after 30–40 days of culture (**Figure 1D**). Gynogenetic embryos emerged directly from the ovules rupturing the ovary wall after 70–150 days of culture (**Figure 1E**). The percentage of gynogenesis induction and the percentage of embryogenesis were quite similar, as calli were rarely formed (**Table 1**). Both variables depended on the cultivar and the growing conditions of the donor plants. The highest percentage of embryogenesis induction was produced from Recas, followed by Rita and Fuentes de Ebro. No statistically significant differences were found in percentages of gynogenesis and embryogenesis induction between the two growing conditions for all cultivars. However, field plants of Fuentes de Ebro and Rita rendered an 80% higher percentage of embryogenesis than growth chamber plants.

Well-developed gynogenetic embryos (**Figure 1F**) were treated with APM in elongation medium (**Figure 1G**). Then embryos were transferred to a solid elongation medium for plant development (**Figure 1H**), and afterwards the plants were transplanted to plastic pots into the greenhouse for acclimation (**Figure 1I**) and bulb and seed production (**Figures 1J,K**). A high proportion of embryos developed abnormal or hyperhydrated plants, up to 50% in Fuentes de Ebro and 21% in Recas (data not shown), leading to a low percentage of acclimated plants. A higher percentage of acclimated plants was obtained from field plants in Fuentes de Ebro (12.5%) and from growth chamber plants in Recas and Rita (7.14 and 25%, respectively). Two plants obtained from Fuentes de Ebro and Recas were DH and H, respectively, and those from Rita were one DH and two mixoploids ($n/2n$) (data not shown).

Effect of Culture Protocol on Gynogenesis Induction and Plant Production

Since low percentages of embryogenesis induction and acclimated plants were obtained in 2012, the two-step protocol described by Michalik et al. (2000) (protocol B) was compared with protocol A. The OH-1 population was included in order to determine whether the frequencies of gynogenesis induction obtained were within the predicted range. The gynogenesis capacity of landrace BGHZ1354, was also evaluated. Plants were grown in the field, since in 2012 the percentage of embryogenesis

induction was slightly higher in 2 out of the 3 cultivars in this growing condition, and also the number of plants that can be grown is not limited by the growth chamber capacity. A total number of 10,767 flowers from Fuentes de Ebro, Recas, BGHZ1354, and OH-1 was cultured (**Table 2**). Different rates of embryogenesis induction were obtained with the two protocols, depending on the material. Spanish germplasm produced 2–3 times higher percentages of embryogenesis with protocol B, Recas showing the highest percentage (2.09%), followed by BGHZ1354 with 1.28% and Fuentes de Ebro with 0.53%. Recas and BGHZ1354 had statistically significant differences between protocols but not the lowest responding cultivar. The percentage of embryogenesis from Spanish germplasm was significantly lower than those obtained from the OH-1 population, where no differences for percentage of embryogenesis between protocols were observed (around 15%).

The percentage of acclimated plants from both protocols also varied depending on the cultivar (**Table 2**). In BGHZ1354 and Recas, protocol B gave rise to a 2- and 3-fold increase, respectively, in comparison to protocol A. However, no differences in percentage of acclimated plants between protocols were observed in Fuentes de Ebro. Although the percentage of acclimated plants from OH-1 rose from 34 to 47% with protocol B, these differences were not statistically significant.

Furthermore, differences in percentages of embryogenesis induction and plant acclimation were also observed between plants from the same cultivar. Only 2 out of 9 plants from Fuentes de Ebro produced embryos, the highest percentage of embryogenesis being 3.3% with protocol B and 2.0% with protocol A. In OH-1, this percentage varied from 0 up to 93% with protocol B and from 0 to 76% with protocol A (data not shown).

Effect of the Container During Plant Regeneration

In order to reduce plant hyperhydricity, two experiments were performed to assay containers with different levels of ventilation, using OH-1 embryos obtained with both induction protocols (**Table 3**). In the first, glass tubes sealed with plastic and cellulose plugs were assayed. No statistically significant differences in percentages of hyperhydricity and acclimated plants were observed between plastic and cellulose plugs, independently of

TABLE 2 | Spanish germplasm gynogenesis following protocol described by Jakše and Bohanec (2003) (Protocol A) and described by Michalik et al. (2000) (Protocol B) and the population OH-1 (Havey and Bohanec, 2007).

Cultivar	Protocol	Flowers	Embryogenesis induction		Acclimated plants		Ploidy level of acclimated plants		
			Embryos	Embryos/Flowers (%)	Plants	Plants/Embryos (%)	n	n/2n	2n
Fuentes de Ebro	A	1125	3	0.27a*	1	33.3a*	1	–	–
	B	1127	6	0.53a	2	33.3a	1	–	1
Recas	A	1149	10	0.87b	1	10.0b	1	–	–
	B	1149	24	2.09a	8	33.3a	3	3	1
BGHZ1354	A	1486	6	0.40b	1	16.7b	–	1	–
	B	1481	19	1.28a	6	31.5a	4	1	1
OH-1	A	1624	244	15.00a	84	34.5a	ND	ND	ND
	B	1626	250	15.42a	118	47.2a	ND	ND	ND

*Values followed by the same letter within the cultivar are not significantly different ($P < 0.05$).

TABLE 3 | Effect of plant container during plant regeneration in gynogenesis of OH-1 population.

Experiment	Protocol	Treatment	Embryos	Hyperhydricity		Acclimated plants	
				Plants	Plants/Embryos (%)	Plants	Plants/Embryos (%)
Glass tube plugs	A	Plastic	40	5	12.5a*	12	30.0a*
		Cellulose	43	5	11.6a	16	37.2a
	B	Plastic	30	7	23.3a	13	43.3a
		Cellulose	24	5	20.8a	8	33.3a
Container	A	Glass+plastic	35	6	17.1a	7	20.0b
		Eco2box	28	3	10.7a	7	25.0ab
		Magenta	16	3	18.8a	6	37.5a
	B	Glass+plastic	26	9	34.6b	6	23.1c
		Eco2box	24	1	4.2a	17	70.8a
		Magenta	23	8	34.8b	12	52.2b

*Values followed by the same letter within the cultivar are not significantly different ($P < 0.05$).

the protocol used. The percentage of hyperhydricity almost doubled in plants obtained with protocol B than with protocol A.

In the second experiment, different types of plant containers were compared; glass tube with plastic plug, Eco2box and Magenta box (Table 3). An interaction between container and protocol was observed for percentages of hyperhydricity and acclimated plants. The lowest percentage of hyperhydricity (4.17%) and the highest percentage of acclimated plants (up to 70%) were obtained with Eco2box and protocol B. In protocol A, no significant differences for hyperhydricity percentages were observed between the different types of container, but Magenta boxes produced the highest percentage of acclimated plants (37.5%). In both protocols glass tubes rendered the lowest percentage of acclimated plants (20–23%). As in the previous experiment, protocol B rendered higher percentages of hyperhydricity and acclimated plants than protocol A, except when Eco2 boxes were used.

Effect of APM Application on Chromosome Doubling

Two concentrations of APM were applied in liquid medium to OH-1 embryos to optimize the percentage of chromosome doubling (Table 4). No significant differences in the percentages of acclimated plants and diploid plants were observed between

the two concentrations. However, the percentage of acclimated plants decreased from 55 to 37% when the concentration of APM was raised from 25 to 50 μ M, and the percentage of DH plants increased up to 38%. As a consequence, a similar number of DH plants were produced with both concentrations. Two plants with higher ploidy levels (4n) were also obtained with the lower concentration of APM.

In a second experiment, APM application was compared in solid and liquid media. No significant differences in the percentage of acclimated plants were observed between the application of APM for 24 h in solid and liquid media, but there was a slight increase in the solid medium (from 27 to 40%). APM application in solid medium for 72 h slightly decreased plant survival and produced the lowest percentage of haploid and diploid plants, but up to 57% of mixoploid plants. The highest percentage (35%) and number of DH plants was reached when 25 μ M APM was applied in solid medium for 24 h.

Plant Production from Spanish Germplasm in 2013

Plant production for the onion breeding program was carried out in parallel with experiments described above for the optimization of DH plant production. Protocol A was followed and embryos were treated with 25 μ M APM in liquid medium for 24 h as

TABLE 4 | Effect of APM application on chromosome doubling in OH-1 embryos.

Experiment	Treatment	Embryos	Acclimated plants		Ploidy level of acclimated plants			
			Plants	Plants/Embryos (%)	n (%)	n/2n (%)	2n (%)	4n (%)
APM concentration	25 μ M APM	69	38	55.1a*	17 (44.7a*)	8 (21.1a*)	11 (28.9a*)	2 (5.3*)
	50 μ M APM	70	26	37.1a	9 (34.6a)	6 (23.1a)	10 (38.5a)	0 (0.0)
Medium support	25 μ M APM liq (24 h).	44	12	27.2a	6 (50.0a)	3 (25.0b)	3 (25.0ab)	0 (0.0)
Application time	25 μ M APM sol (24 h)	42	17	40.5a	10 (58.8a)	1 (5.9c)	6 (35.3a)	0 (0.0)
	25 μ M APM sol (72 h)	41	14	34.2a	3 (21.4b)	8 (57.1a)	2 (14.3b)	1 (7.1)

*Values followed by the same letter within the cultivar are not significantly different ($P < 0.05$).

TABLE 5 | Gynogenesis induction from Spanish germplasm in 2013 following Protocol (A) from Jakše and Bohanec (2003) with some modifications.

Cultivar	Flowers	Embryogenesis induction		Acclimated plants		Ploidy level of acclimated plants		
		Embryos	Embryos/Flowers (%)	Plants	Plants/Embryos (%)	n (%)	n/2n (%)	2n (%)
Fuentes de Ebro	6998	18	0.25d*	3	16.67b*	2 (66.7a*)	0 (0.0b*)	1 (33.3b*)
Recas	3227	24	0.74bc	4	16.67b	2 (50.0b)	0 (0.0b)	2 (50.0a)
BGHZ1354	3819	40	1.05b	13	32.50ab	5 (50.0b)	3 (30.0a)	2 (20.0c)
OH-1	4533	826	18.22a	302	36.60 a	–	–	–

*Values followed by the same letter within the cultivar are not significantly different ($P < 0.05$).

performed in 2012, but embryos were transferred to Eco2boxes or glass tubes for plant elongation. A total number of 15,064 flower buds from plants grown in the field from Fuentes de Ebro, Recas, BGHZ1354 and OH-1 were inoculated (Table 5). Great differences were observed between cultivars in the percentage of embryogenesis induction. As expected, OH-1 produced the highest percentage of embryogenesis (18.2%), obtaining a significantly lower rate with the Spanish germplasm. BGHZ1354 showed the highest percentage of embryogenesis (1.05%), and Fuentes de Ebro the lowest (0.52%). These percentages are higher than those obtained with a smaller number of flowers in the experiment to compare protocols (Tables 2, 5). However, similar percentages of embryogenesis were produced from the Recas cultivar.

As for the Spanish germplasm, BGHZ1354 showed the highest percentage of acclimated plants (32.5%), with close rates to those obtained from OH-1. Fuentes de Ebro and Recas reached almost 17%. These percentages were significantly higher than those obtained in 2012 (Tables 1, 5). Different rates of DH plants were obtained from each cultivar: 50, 33, and 20% from Recas, Fuentes de Ebro, and BGHZ1354, respectively. A level of 30% mixoploid (n/2n) plants was obtained from BGHZ1354 (Table 5).

Chromosome Doubling by Flower Bud Somatic Regeneration

Somatic regeneration from flower buds following the protocol described by Luthar and Bohanec (1999) was performed as an alternative approach for chromosome doubling from haploid and mixoploid (n/2n) plants. Five out of the 33 acclimated plants from Spanish germplasm (Tables 2, 5), and 2 out of the 21 plants from the OH-1 population flowered in July 2014 and were used for somatic regeneration (Table 6). After 3–4 weeks

of culture, globular embryogenic structures developed on the bases of the flower buds. Large differences in percentages of embryogenic structures and acclimated plants were observed among cultivars and lines. The haploid line from Fuentes de Ebro produced a medium percentage of embryogenic structures (33%), and a low rate of acclimated plants (2.5%). Of the lines from BGHZ1354, a high percentage of embryogenesis was observed from lines 13.P.045 (72%) and 13.P.074 (53%). The other lines from BGHZ1354 and the 2 lines from OH-1 never or rarely developed embryogenic structures. Shoots were regenerated from lines 13.P.041, 13.P.045, and 13.P.074 that had a high percentage of globular structures, and even from the low embryogenic line 13.P.042. No acclimated plants were produced from OH-1.

Differences in the ploidy level of somatic regenerated plants were observed between H lines. The two plants from 13.P.042 were diploid, whereas similar percentages of H and diploid plants were obtained from 13.P.045. The mixoploid line that produced embryogenic structures rendered up to 88% of diploid plants. Mixoploid (2n/4n) and tetraploid plants were also produced from H and mixoploid plants.

Discussion

The availability of protocols for onion DH production represents a unique opportunity to have completely homozygous and stable inbred lines. Gynogenesis capacity from Spanish germplasm has been evaluated and different protocols have been assayed to increase the number of acclimated plants, in order to introduce pure inbred lines in an onion breeding program, to improve bulb size, uniformity and storability (Mallor and Sales, 2012). Spain is the third largest producer in Europe with over 1.2 million tons. We should remark that the cultivar “Fuentes de

TABLE 6 | Chromosome doubling of gynogenetic haploid and mixoploid plants by flower bud somatic regeneration.

Origin	Gynogenic line	Initial ploidy level	Flowers	Globular structures (%)	Acclimated plants		ploidy level of acclimated plants			
					Plants	Plants/100 Flowers	n (%)	2n (%)	2n/4n (%)	4n (%)
Fuentes de Ebro-17	13.P.041	N	122	32.8c*	2	1.6bc*	1 (50.0a*)	1 (50.0c*)	0	0
BHGZ1354-16	13.P.045	n	255	71.8a	16	6.3b	7 (43.8a)	8 (50.0c)	1 (6.0a*)	0
BHGZ1354-1	13.P.042	n	134	3.0d	2	1.5bc	0	2 (100.0a)	0	0
BHGZ1354-14	13.P.213	n/2n	182	0.0d	0	0.0c	0	0	0	0
BHGZ1354-17	13.P.074	n/2n	309	52.8b	50	16.2a	0	44 (88.0b)	3 (6.0a)	3 (6.0)
OH-1-8	13.E2.034	n	55	0.0d	0	0.0c	0	0	0	0
OH-1-8	13.E2.040	n	160	2.5d	0	0.0c	0	0	0	0

*Values followed by the same letter within lines are not significantly different ($P < 0.05$).

Ebro” used in this study has a high commercial value due to its differentiated quality. Genetic factors, including cultivar, donor plant genotype, geographic origin and genetic structure are thought to be the most important for the success of gynogenesis induction (Campion and Alloni, 1990; Geoffriau et al., 1997; Bohanec and Jakše, 1999; Michalik et al., 2000; Chen et al., 2011). In Spanish germplasm, cultivar and plant genotype also has a strong effect on gynogenesis induction. The two Valencia-type cultivars Rita and Recas showed the highest embryogenesis percentage (0.87–2.09%), followed by the highly pungent landrace BGHZ1354 (0.40–1.28%), and finally the sweet cultivar Fuentes de Ebro (0.27–0.75%). A similar percentage of embryogenesis induction was described in the unique Spanish cultivar Morada de Amposta evaluated previously (2.1%) and in 5 Portuguese cultivars (average 0.98%) (Bohanec and Jakše, 1999). However, gynogenesis capacity of Spanish germplasm used in this study was lower than that from the American OH-1 population, and other American inbred and F1s reported by Bohanec and Jakše (1999). It has also been reported that American materials were on average 5 times more responsive than European cultivars (Bohanec et al., 2003), and northern European cultivars were more responsive than southern- and eastern European material (Geoffriau et al., 1997; Bohanec and Jakše, 1999). On the other hand, open pollinated cultivars, such as the ones used in this study, had shown a lower percentage of embryogenesis than inbred lines or F1s (Geoffriau et al., 1997; Bohanec and Jakše, 1999). Deleterious genes regulating vegetative growth are responsible for hampering gynogenic embryo development and plant regeneration and are eliminated during inbreeding (Geoffriau et al., 1997; Hyde et al., 2012).

A great variation in gynogenesis induction was also reported even between plants from the same inbred line. By way of example, B2923B showed a percentage of embryogenesis from 2.1 to 54.7% (Bohanec et al., 2003). Similar results were obtained in this study among individual plants from the same cultivar or population, since each plant was a different genotype. In this study, plant response from the synthetic population OH-1, characterized by its high embryogenesis induction and obtained from inbreeds B2923B and B0223B (Prof Havey, University of Wisconsin), varied from 0 to 93%. As for the Spanish germplasm, the highest variation, from 0 to 11%, was found in Recas.

The environmental conditions under which the donor plants are grown are also a key factor influencing embryogenesis

induction (Campion et al., 1992; Chen et al., 2011). Onion plants in the growth chamber during bolting at 14–15 °C produced higher percentages of embryogenesis than plants in the greenhouse (13–25°C) (Puddephat et al., 1999) or plants in growth chamber at 4°C or 18°C or in the field (Michalik et al., 2001). In this study, no statistically significant differences were obtained between the two growing conditions, probably due to the low number of embryos produced. However, Fuentes de Ebro and Rita plants grown in the field rendered a slightly higher percentage of embryogenesis than those in the growth chamber at 15–18°C.

The differences in the percentage of gynogenesis induction from plants grown under natural conditions observed between years could be due to environmental, climatic or physiological conditions, as they were grown in pots or in soil under natural conditions, as well as genotype effects. A variation in the percentage of gynogenesis induction between the same bulbs over 2 years (23.2–32.9%) has been described in an onion inbred line (Bohanec et al., 2003).

Gynogenesis response of onion material depended on the culture media used (Campion et al., 1992; Jakše et al., 1996; Michalik et al., 2000). Thus, local cultivars from Argentina produced more haploid plants in media containing polyamines than without growth regulators (Martínez et al., 2000). In order to improve the percentage of embryogenesis obtained with our material in 2012 with the one-step protocol (protocol A) described by Jakše and Bohanec (2003), a two-step protocol (protocol B), that had been proved to induce gynogenesis efficiently in Polish cultivars (Michalik et al., 2000), was also assayed. A real comparison of the two protocols was possible since the same cultivars have been used. The low-responding Spanish material produced 2–3 times higher percentages of embryogenesis and plant acclimation with the two-step protocol described by Michalik et al. (2000). No significant differences were obtained in Fuentes de Ebro, probably due to the low number of embryos produced. The high gynogenetic population OH-1 produced similar percentages of embryogenesis, an average of 15%, independently of the protocol used. It had been reported previously that inbred lines B2923B and B0223B, used for the creation of the OH-1 synthetic population, reached 18–33% of gynogenesis induction (Bohanec et al., 2003; Jakše and Bohanec, 2003). Therefore, our results are comparable to those described by these authors.

The protocols differed in culture medium composition, vitamins, amount of ammonium and growth regulators. Regarding the latter, 2iP and NAA in protocol B, instead of 2,4-D and BA (protocol A) could account for the higher gynogenesis efficiency. Higher percentages of embryogenesis were also reported with Polish onion cultivars, with media containing 2iP and NAA (Michalik et al., 2000). The effect of growth regulators on plant acclimation confirms the results described by Bohanec et al. (1995). Hence, protocol B will be adopted for the development of onion haploids in our laboratory.

The presence of an unbalanced gaseous environment in the culture container could lead to plant hyperhydricity (Kozai and Smith, 1995; Lai et al., 2005). The use of different containers and/or container closure could cause different rates of gas exchange. In this study, a high percentage of hyperhydricity was observed during the first year, especially in Fuentes de Ebro (up to 50%) and Recas (21%). Different types of plug for glass tubes and containers were tested to decrease hyperhydricity and even though cellulose plugs were expected to reduce hyperhydricity and favor a better gas exchange than plastic plugs, a similar percentage of hyperhydricity was obtained with both types of plug in this study. Nevertheless, hyperhydricity was reduced to 4% and the percentage of acclimated plants was increased up to 70% with Eco2box in protocol B. This could be due to the presence of an aeration filter in the lid, favoring gas exchange. Our results agree with those reported in other crops in which hyperhydricity was reduced or even completely eliminated in ventilated cultures (Zobayed et al., 1999; Lai et al., 2005; Casanova et al., 2008; Ivanova and Van Staden, 2010). As far as we know, Eco2boxes have not been used previously for plant regeneration in onion. The differences observed from Spanish germplasm in the percentage of acclimated plants between years could be due to the use of both Eco2boxes and glass tubes for plant regeneration in the second year, but exclusively glass tubes in the first year. Other important factors associated with hyperhydricity are the amount of ammonium and the type of cytokinin in the medium (Ivanova and Van Staden, 2008). Since ammonium was only used in the first month of culture in the two-step protocol, the higher percentage of hyperhydricity produced with this protocol could be related to the use of the cytokinin 2iP instead of BA. However, BA has been reported to produce higher rates of hyperhydricity than other cytokinins such as kinetin, zeatin or thidiazuron (Chukwujekwu et al., 2002; Chen et al., 2006; Ivanova and Van Staden, 2011).

Several duplication agents and different strategies have been used for chromosome doubling of onion haploid embryos/plants (Campion et al., 1995; Alan et al., 2004; Grzebelus and Adamus, 2004). In general, the optimal concentration of the duplication agent and the duration of treatments must always be determined in relation to the percentage of doubled plants and the percentage of plant survival (Bohanec, 2009; Castillo et al., 2009). Although a relatively low number of embryos was used for each treatment, an increase in the concentration of APM from 25 to 50 μ M in a liquid medium significantly increased the percentage of chromosome doubling. However, the same number of DH plants was obtained in both concentrations, since the high concentration reduced the percentage of plant survival. Similar results were reported previously in onion by Jakše et al. (2003).

A higher percentage of diploid plants were produced when duplication agents were incorporated in liquid rather than in solid media (Jakše et al., 2003; Alan et al., 2004). However, in our study APM in a solid medium produced a higher survival rate (40%) and a higher percentage of doubling (35%) than in a liquid medium, resulting in 14% of DH/embryos treated. This percentage was higher than the 4% obtained by Jakše et al. (2003) with the same concentration of APM and application time. The differences between these two studies could be due to the use of different genotypes, since a genotype effect has been reported (Alan et al., 2004). In this study, increasing the time of application from 24 to 72 h in a solid medium significantly increased the percentage of mixoploid ($n+2n$) plants up to 57%, confirming the results reported by Jakše et al. (2003).

An alternative approach for chromosome doubling in onion is *in vitro* adventitious somatic regeneration (Alan et al., 2007; Jakše et al., 2010). This method has two advantages over the application of antimetabolic agents: no potentially damaging chemicals are used and a higher percentage of doubling efficiency can be achieved (Alan et al., 2007; Jakše et al., 2010). When the protocol described by Luthar and Bohanec (1999) was applied, a large variation in somatic regeneration response was observed between different germplasms. The landrace BGHZ1354 showed the highest percentage of globular embryogenic structures (up to 72%), followed by “Fuentes de Ebro.” No correlation between somatic and gynogenetic embryogenesis was observed, since DH lines 13.E2.034 and 13.E2.040 derived from OH-1-8 plant produced a low percentage of embryogenic structures (0–2.5%), whereas OH-1-8 showed the highest percentage of embryogenesis induction (76–98%). Similar results were observed from line 13.P.042, indicating that genetic control for somatic regeneration and gynogenesis induction are inherited independently.

In the first study using this strategy for chromosome doubling 60% of the somatic plants regenerated from haploid flowers were spontaneously doubled (Alan et al., 2007). Jakše et al. (2010) produced diploid plants from 83 and 100% of regenerated haploid and mixoploid lines, respectively, and the average percentages of diploid plants among the regenerants was 55.8% from mixoploid lines and 9.7% from haploid lines. In this study, 4 out of the 7 lines that bolted the first year were regenerated, and diploid plants were produced from all of them (100%). The percentage of spontaneous doubling was 88% from the mixoploid line and between 47 and 100% from the haploid lines. Our results confirm that somatic regeneration is an alternative approach for chromosome doubling in onion. As described by Alan et al. (2007), the use of different strategies offers an integrated approach to recover diploid onion gynogenetic plants. In this study, both the application of APM to embryos, and diploidization of haploids and mixoploid lines by somatic regeneration were used successfully.

The gynogenesis capacity of Spanish germplasm has been evaluated. This germplasm showed a low capacity for embryogenesis induction, the sweet cultivar Fuentes de Ebro being the most recalcitrant. For the first time comparison of two protocols has been addressed, the protocol described by Michalik et al. (2000) being more efficient for embryogenesis induction and acclimated plants than the one described by Jakše

and Bohanec (2003). A new generation of tissue culture vessel, the Eco2box container, significantly reduced the percentage of hyperhydricity leading to a higher percentage of plant survival. Two strategies for chromosome doubling, the application of 25 μ M APM in solid medium for 24 h and somatic regeneration from flower buds of haploid and mixoploid plants, were successfully used. Although gynogenetic plants were obtained from all the Spanish cultivars, further improvements of the protocol using different strategies should be performed in order to produce a high number of DH plants that could be used efficiently in onion breeding programs.

Acknowledgments

OF was a recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness FPI (INIA-FEDER). This work was supported by the Spanish Ministry of Economy

and Competitiveness INIA-FEDER (RTA2011-00118-C02-01), by the Agreement EEAD-CSIC with CITA-Aragón for Onion Doubled Haploid Production and the Aragon Government (Group A16 and Group A06). We are grateful to Ramiro Arnedo S.A. Seeds Company and Prof. Havey (University of Wisconsin-Madison, USDA) for kindly providing bulbs from the Rita cultivar and seeds from the OH-1 population, respectively. We are also grateful to Prof. Bohanec (University of Ljubljana) and Prof. Adamus (Agricultural University of Kraków) for their advice in the application of onion gynogenesis protocols.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00384/abstract>

References

- Alan, A. R., Brants, A., Cobb, E., Goldschmied, P. A., Mutschler, M. A., and Earle, E. D. (2004). Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *Plant Sci.* 167, 1055–1066. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.06.007
- Alan, A. R., Kaska, A., and Celebi-Toprak, F. (2014). Production of fully homozygous genotypes from various edible *Allium*. *Int. J. Secondary Metabolite* 1, 77.
- Alan, A. R., Lim, W., Mutschler, M. A., and Earle, E. D. (2007). Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). *Plant Sci.* 173, 25–31. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.03.010
- Alan, A. R., Mutschler, M. A., Brants, A., Cobb, E., and Earle, E. D. (2003). Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. *Plant Sci.* 165, 1201–1211. doi: 10.1016/S0168-9452(03)00327-3
- Bohanec, B. (1998). “Gynogenic haploid induction in plant breeding” in *Gametic Embryogenesis, Report of Activities, 1995-97*, ed M. Hansen (Luxembourg: COST Action 824, Directorate-General Science, Research and Development, European Commission), 253–255.
- Bohanec, B. (2009). “Doubled haploids via gynogenesis”, in *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, eds A. Touraev, B. P. Forster, and S. M. Jain (Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V.), 35–46.
- Bohanec, B., and Jakše, M. (1999). Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Rep.* 18, 737–742. doi: 10.1007/s002990050652
- Bohanec, B., Jakše, M., and Havey, M. J. (2003). Genetic analyses of gynogenetic haploid production in onion. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128, 571–574.
- Bohanec, B., Jakše, M., Ihan, A., and Javornik, B. (1995). Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Sci.* 104, 215–224. doi: 10.1016/0168-9452(94)04030-K
- Campion, B., and Alloni, C. (1990). Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. *Plant Cell Tiss. Org.* 20, 1–6.
- Campion, B., Azzimonti, M. T., Vicini, E., Schiavi, M., and Falavigna, A. (1992). Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Sci.* 86, 97–104. doi: 10.1016/0168-9452(92)90183-M
- Campion, B., Bohanec, B., and Javornik, B. (1995). Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. *Theor. Appl. Genet.* 91, 598–602. doi: 10.1007/BF00223285
- Casanova, E., Moysset, L., and Trillas, M. I. (2008). Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biol. Plant.* 52, 1–8. doi: 10.1007/s10535-008-0001-z
- Castillo, M. A., Cistué, L., Vallés, M. P., and Soriano, M. (2009). “Chromosome doubling in monocots,” in *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, eds A. Touraev, B. P. Forster, and S. M. Jain (Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V.), 329–338.
- Celebi-Toprak, F., Kaska, A., Alan, V., Aykut, A., and Alan, A. R. (2015). “Evaluation of doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines developed from Turkish landraces,” in *7 International Symposium on Edible Alliaceae* (Nigde Turkey).
- Chen, J. F., Cui, L., Malik, A. A., and Mbira, K. G. (2011). *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tiss. Org.* 104, 311–319. doi: 10.1007/s11240-010-9874-6
- Chen, U.-C., Hsia, C.-N., Yeh, M.-S., Agrawal, D. C., and Tsay, H.-S. (2006). *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi*-an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42, 128–133. doi: 10.1079/IVP2005744
- Chukwujekwu, J. C., Fennell, C. W., and Van Staden, J. (2002). Optimisation of the tissue culture protocol for the endangered *Aloe polyphylla*. *S. Afr. J. Bot.* 68, 424–429.
- Duangjit, J., Bohanec, B., Chan, A. P., Town, C. D., and Havey, M. J. (2013). Transcriptome sequencing to produce SNP-based genetic maps of onion. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2093–2101. doi: 10.1007/s00122-013-2121-x
- Dunstan, D. I., and Short, K. C. (1977). Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41, 70–72. doi: 10.1111/j.1399-3054.1977.tb01525.x
- Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 8, 377–424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
- FAO. (2013). *FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO Statistical Database*. Available online at: <http://faostat.fao.org/> (Accessed January 2015).
- Foschi, M., Martínez, L., Ponce, M. T., and Galmarini, C. R. (2009). Doblehaploides, una estrategia biotecnológica para el mejoramiento genético en cebolla (*Allium cepa*). *Hortic. Argent.* 28, 40–48.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Geoffriau, E., Kahane, R., and Rancillac, M. (1997). Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 94, 37–44. doi: 10.1023/A:1002949606450
- Grzebelus, E., and Adamus, A. (2004). Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. *Plant Sci.* 167, 569–574. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.05.001
- Havey, M. J., and Bohanec, B. (2007). Onion inbred line ‘B8667 A&B’ and Synthetic populations ‘Sappory-Ki-1 A&B’ and ‘Onion Haploid-1’. *HortScience* 42, 1731–1732.
- Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. (1950). *The Water-culture Method FOR Growing Plants Without Soil*. Berkeley, CA: California Agricultural Experiment Station Circular Number 347, College of Agriculture, University of California

- Hyde, P. T., Earle, E. D., and Mutschler, M. A. (2012). Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance. *Hortscience* 4, 1690–1695.
- Ivanova, M., and Van Staden, J. (2008). Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss. Org.* 92, 227–231. doi: 10.1007/s11240-007-9311-7
- Ivanova, M., and Van Staden, J. (2010). Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. *Plant Growth Regul.* 60, 143–150. doi: 10.1007/s10725-009-9430-8
- Ivanova, M., and Van Staden, J. (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss. Org.* 104, 13–21. doi: 10.1007/s11240-010-9794-5
- Jakše, M., and Bohanec, B. (2000). “Studies of alternative approaches for genome doubling in onion,” in *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, ed B. Bohanec (Brussels: COST Action 824, Final meeting 1–5 July, Bled, Slovenia. Directorate-General for Research, Communication Unit, European Commission), 101–104.
- Jakše, M., and Bohanec, B. (2003). “Haploid induction in onion via gynogenesis,” in *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, eds M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko (Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publishers), 281–285.
- Jakše, M., Bohanec, B., and Ihan, A. (1996). Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. *Plant Cell Rep.* 15, 934–938. doi: 10.1007/BF00231591
- Jakše, M., Havey, M. J., and Bohanec, B. (2003). Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. *Plant Cell Rep.* 21, 905–910. doi: 10.1007/s00299-003-0595-8
- Jakše, M., Hirscheegger, P., Bohanec, B., and Havey, M. J. (2010). Evaluation of gynogenic responsiveness and pollen viability of selfed doubled haploid onion lines and chromosome doubling via somatic regeneration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135, 67–73.
- Keller, J. (1990). Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 47, 241–247.
- Kozai, T., and Smith, M. A. L. (1995). “Environmental control in plant tissue culture—general introduction and overview,” in *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, eds J. Aitken-Christie, T. Kozai, and M. A. L. Smith (Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V.), 301–318.
- Lai, C. C., Lin, H. M., Nalawade, S. M., Fang, W., and Tsay, H. S. (2005). Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *J. Plant Physiol.* 162, 355–361. doi: 10.1016/j.jplph.2004.07.015
- Luthar, Z., and Bohanec, B. (1999). Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Rep.* 18, 797–802. doi: 10.1007/s002990050664
- Mallor, C., Balcells, M., Mallor, F., and Sales, E. (2011a). Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. *Plant Breed.* 130, 55–59. doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01737.x
- Mallor, C., Carravedo, M., Estopañán, G., and Mallor, F. (2011b). Characterization of genetic resources of onion (*Allium cepa* L.) from the Spanish secondary centre of diversity. *Span. J. Agric. Res.* 9, 144–155. doi: 10.5424/sjar/20110901-149-10
- Mallor, C., and Sales, E. (2012). Yield and traits of bulb quality in the Spanish sweet onion cultivar ‘Fuentes de Ebro’ after selection for low pungency. *Sci. Hortic.* 140, 60–65. doi: 10.1016/j.scienta.2012.04.003
- Martínez, L. E., Agüero, C. B., López, M. E., and Galmarini, C. R. (2000). Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Sci.* 156, 221–226. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00263-6
- Michalik, B., Adamus, A., and Nowak, E. (2000). Gynogenesis in Polish onion cultivars. *J. Plant Physiol.* 156, 211–216. doi: 10.1016/S0176-1617(00)80308-9
- Michalik, B., Adamus, A., Samek, L., and Nowak, E. (2001). “Gynogenesis in Polish onion cultivars: effect of temperature during donor plant growth,” in *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, ed B. Bohanec (Brussels: COST Action 824, EUR 19691), 91–94.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Muren, R. C. (1989). Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience* 24, 833–834.
- Puddephat, I. J., Robinson, H. T., Smith, B. M., and Lynn, J. (1999). Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. *Plant Cell Tiss. Org.* 57, 145–148. doi: 10.1023/A:1006312614874
- Walker, R. L., Kim, S., Betran, J. V., Yoo, K., and Pike, L. M. (2006). Investigation of doubled haploid performance and combining ability in short-day onion. *HortScience* 41, 990.
- Zobayed, S. M. A., Armstrong, J., and Armstrong, W. (1999). Cauliflower shoot-culture: effects of different types of ventilation on growth and physiology. *Plant Sci.* 141, 209–217. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00232-5

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Fayos, Vallés, Garcés-Claver, Mallor and Castillo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplemental Table S1. Composition of culture media used in onion gynogenesis with protocol A (Jakše and Bohanec, 2003) and protocol B (Michalik *et al.*, 2000), somatic embryogenesis (Luthar and Bohanec, 1999), and elongation medium for plant development (Jakše and Bohanec, 2003).

Compounds	Gynogenesis			Somatic Embryogenesis		Elongation
	Protocol A	Protocol B		Induction (I)	Regeneration (R ₂)	
	Induction	Induction (A ₁)	Regeneration (R ₁)			
Macronutrients	BDS	B5	BDS	BDS	BDS	BDS (x1/2)
Micronutrients	BDS	B5	BDS	BDS	BDS	BDS (x1/2)
<i>Vitamins, amino acids and other nutrient elements(mg/l)</i>						
Fe	40	40	40	40	40	40
Thiamine	10	2	2	10	10	10
Pyridoxine	1	1	1	1	1	1
Nicotinic acid	1	1	1	1	1	1
Ca panthotenate		1	1			
Glicine		2				
Folic acid		1				
Biotin		0.01				
Adenine			10			
Myo-inositol	500	100	500	500	500	250
L- Proline	200		200	200	200	100
<i>Growth regulators (mg/l)</i>						
2,4-D	2	2		2		
BAP	2	2		2		
2iP			2			
NAA			1			
Thidiazuron					2	
<i>Other components (g/l)</i>						
Sucrose	100	100	100	100	50	
Glucose						15
Agar Daishin	7	7	7			7
Phytigel				2.5	2.5	
pH	6.0	5.8	5.8	6.0	6.0	6.0

Capítulo 8

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

El aumento de la demanda de los consumidores de alimentos saludables con mayores contenidos en compuestos bioactivos ha provocado un interés creciente en especies hortícolas, como el pimiento y la cebolla, por su alto contenido en diversos compuestos nutraceuticos. A su vez, esta demanda ha direccionado a los programas de mejora genética vegetal, tanto en cebolla como en pimiento, hacia la mejora de la calidad nutraceutica para la obtención de variedades con mayores contenidos en compuestos bioactivos. De entre todos los compuestos bioactivos, los responsables del picor, los CAPs/CTOs en pimiento y los SCs en cebolla, destacan por sus numerosas propiedades saludables. En el Capítulo 3, de esta Tesis Doctoral, se revisa en profundidad este aspecto, así como otros que son el punto de partida de este trabajo.

El picante del pimiento, ocasionado en gran medida por el contenido de CAPs, es uno de los principales atributos de la calidad sensorial de esta especie. De hecho, el desarrollo de nuevas variedades cada vez más picantes es un reto para los mejoradores (Bosland y Baral, 2007; Bosland y col., 2012). El nivel de picor del pimiento determina, en gran medida, la forma de consumo: en inmaduro o maduro, en fresco o procesado, como especia, en salsas, etc.

Es conocido que el ser humano es capaz de diferenciar sensorialmente el tipo e intensidad de picor de cada CAPs. Por ejemplo, la Cap y la dhCap son los más irritantes y su picor afecta a la boca, el paladar, la garganta y la lengua; la hdhCap además de ser muy irritante perdura durante un período prolongado (hasta 12 h) y, por el contrario, la ndhCap es la menos irritante y la sensación de picor es suave y desaparece rápidamente (Bosland y Votava, 2012). Las diferentes combinaciones de CAPs determinan el tipo (perfil) de picor característico para cada variedad de pimiento y, este a su vez, puede variar a lo largo de la maduración de los frutos. En relación a este último aspecto, el objetivo del Capítulo 4 se centró en la evaluación de la variación del patrón de acumulación de CAPs durante el desarrollo de los frutos del pimiento ‘Malagueta’ (*C. frutescens*) y, en consecuencia, el establecimiento del perfil de picor de este pimiento.

La composición de CAPs en el pimiento ‘Malagueta’ se mantuvo prácticamente constante durante toda la maduración de los frutos, la Cap fue el mayoritario, seguida por la dhCap, la ndhCap, la hCap y la hdhCap. Estos mismos 5 CAPs se han identificado en las variedades de pimiento ‘Cayena’ y ‘Peter pepper’ ambas de *C. annuum*. Sin embargo, la evolución de los CAPs es diferente en cada variedad; mientras que en el pimiento

‘Cayena’ se alternan Cap y dhCap como principales (Barbero y col., 2014), en el ‘Peter pepper’, la dhCap y la ndhCap son los mayoritarios en los primeros estados de desarrollo del fruto, aumentando, después, el contenido de Cap hasta ser el más abundante en el estado final de la maduración del fruto.

En cuanto al contenido total de CAPs, su patrón de acumulación en ‘Malagueta’ es similar al descrito en otras variedades de *C. annuum* y *C. chinense* (Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Barbero y col., 2014; BenMansour-Gueddes, 2015; Barbero y col., 2016). Este patrón de acumulación en ‘Malagueta’ revela que la biosíntesis de los CAPs se origina alrededor de los 12 días después de la anthesis (dda). El contenido en CAPs se incrementa rápidamente desde los 12 dda hasta los 33 dda y se mantiene prácticamente constante hasta los 54 dda. Entre los 54 –61 dda se observó una disminución en el contenido total, probablemente debida a la acción de las enzimas peroxidasas que degradan los CAPs (Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Díaz y col., 2004), y entre los 61–75 dda un aumento, probablemente debido a la pérdida de agua por sobremaduración de los frutos (Barbero y col., 2014). Esta caracterización fenotípica, sobre el contenido específico de compuestos a lo largo del desarrollo del fruto, es una información valiosa para complementar futuros trabajos sobre el control genético de la biosíntesis de los distintos CAPs y que, junto con enfoques transcriptómicos permitirán la selección de genes involucrados en su síntesis.

Aunque el picor es uno de los atributos de calidad más importantes en pimiento, en algunos mercados, como el europeo, tienen mayor aceptación las variedades no picantes. Como consecuencia, los CTOs se han convertido en compuestos potencialmente interesantes para la obtención de nuevas variedades, con altos contenidos en compuestos nutraceuticos, pero poco o nada picantes. Sin embargo, los CTOs son compuestos minoritarios presentes en unos pocos cultivares de pimiento y, solo en algunos de ellos, en cantidades moderadamente altas. Hasta el momento, se han identificado tres CTOs en frutos de pimiento: Cto, dhCto y ndhCto, pero, al igual que ocurre con los CAPs, entre los que se han identificado más de 20 análogos (Bosland y Votava, 2012), podrían existir otros análogos de CTOs. Dada la presencia minoritaria de los CTOs en la mayoría de los cultivares de pimiento, así como el elevado número de análogos (dentro de CAPs y CTOs), es necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan un análisis preciso y exhaustivo de los distintos CTOs presentes en el fruto.

La técnica analítica más ampliamente utilizada para la determinación de CTOs ha sido la HPLC acoplada a detectores de absorbancia UV y UV/Vis (Tanaka y col., 2010

a,b; Wahyuni y col., 2011; Han y col., 2013; Coutinho y col., 2015; Tanaka y col., 2015). Sin embargo, estas técnicas basadas en tiempos de retención y espectros de absorbancia para la determinación de los compuestos, pueden verse limitadas en cuanto a sensibilidad y selectividad, como es en el caso de los CAPs y por homología para los CTOs, donde pueden co-existir numerosos análogos con la misma longitud de onda (parámetro de identificación) e isómeros cuyo comportamiento cromatográfico es similar.

En la actualidad, la HPLC acoplada a la espectrometría de masas (MS) es la técnica más sensible, selectiva y precisa que existe para la determinación de metabolitos. De hecho, la HPLC-MS se ha aplicado con éxito a la detección de CAPs, permitiendo la detección de hasta 15 CAPs en frutos de pimiento (Maillard y col., 1997; Garcés-Claver y col., 2006; Schweiggert y col., 2006). A diferencia de los métodos UV/Vis, la detección por MS se basa en la relación m/z de cada analito y en el caso de MS/MS, en el patrón de fragmentación (huella isotópica) y la fórmula exacta de cada molécula ionizada. Toda esta información garantiza la identificación inequívoca de cualquier compuesto de naturaleza análoga a los CTOs. En relación a este tema, en el curso de esta tesis se ha desarrollado y validado, por primera vez, un método de cromatografía líquida acoplada mediante una fuente de ionización por electrospray a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo [HPLC-ESI-MS(QTOF)].

No obstante, para el desarrollo de este método analítico ha sido necesario disponer de estándares de CTOs y de un estándar interno que corrija las fluctuaciones que puedan producirse en la ionización de los compuestos durante el análisis. En consecuencia, durante el curso de esta tesis, se ha diseñado y se ha procedido a la síntesis de un nuevo compuesto análogo a los CTOs, pero que no está presente de forma natural en los frutos de pimiento. Hasta el momento no se disponía de un compuesto, cuyas características propias de un estándar interno, permitieran que pudiera utilizarse para identificar y cuantificar los CTOs, a través de MS. En el Capítulo 5 se describe el procedimiento síntesis y se evalúa su idoneidad como estándar interno en la determinación de CTOs. La estructura química de este estándar interno le confiere unas propiedades físico-químicas únicas, que permiten su elución entre el Cto y el dhCto y un comportamiento de ionización con una huella de fragmentación similar al de los CTOs. Todas estas características que ofrece el DMBO como estándar interno, han sido fundamentales para el desarrollo y la validación del método analítico.

El método analítico desarrollado en el Capítulo 6 de esta tesis ofrece algunas ventajas frente a los métodos analíticos (UV/Vis) más utilizados hasta ahora para la

determinación de CTOs. Por un lado, la mayor sensibilidad de esta técnica, con límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs) inferiores al resto de métodos. Este hecho ha permitido la cuantificación de Cto y dhCto en la variedad de pimiento ‘Tabasco’, en la que en análisis previos no se detectaron estos CTOs posiblemente por encontrarse en concentraciones menores a los LOD del instrumento (Tanaka y col., 2009; Wahyuni y col., 2011). Además, la aplicación del método desarrollado ha permitido la detección de Cto y dhCto en todas las entradas analizadas pertenecientes a las especies *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*. Por otro lado, la MS en tándem (MS/MS) ha permitido la identificación de dos nuevos isómeros de CTOs hasta el momento no citados en bibliografía. Estos dos nuevos compuestos fueron encontrados en la variedad ‘Bhut Jolokia’. La identidad de estos dos nuevos compuestos como isómeros de CTOs fue confirmada por su relación m/z , su patrón de fragmentación similar al de los CTOs y mediante la asignación de la fórmula elemental exacta.

El método de HPLC-ESI-MS(QTOF) desarrollado en esta tesis es novedoso tanto para la cuantificación de los CTOs mayoritarios, Cto y dhCto, como para la identificación inequívoca de los CTOs minoritarios presentes en una muestra. La disponibilidad de metodologías analíticas precisas en la determinación del contenido en CTOs y CAPs, se brinda como una herramienta muy útil para apoyar y complementar los trabajos de identificación de genes relacionados con el carácter picante en pimiento e involucrados en las rutas de biosíntesis de estos compuestos. Además, el conocimiento del modo de herencia individual de los distintos CAPs (Lee y col., 2016) y posiblemente de los CTOs permitirá a los mejoradores seleccionar variedades, con perfiles específicos de CTOs y CAPs, con más eficiencia y, en consecuencia, obtener variedades, con perfiles de picor y compuestos nutracéuticos determinados, adaptándose a las necesidades de los mercados.

Por lo que se refiere al cultivo de la cebolla, los objetivos de selección en los programas mejora genética de la calidad dependen en gran parte de la forma de consumo o de procesamiento final. Por ello, la mejora genética se ha encaminado a buscar variedades, que además de ser productivas, presentaran características diferenciales en cuanto a la precocidad, resistencia a enfermedades, color, forma, sabor, pungencia o aptitudes industriales y de conservación, entre otras (Chiquirín y Ruíz, 2003; Mallor y col., 2007; Batista y Núñez, 2011; Simó y col., 2014).

Por lo general, en estos programas de mejora se utilizan líneas parentales parcialmente homocigotas para la obtención de híbridos, debido a la alta depresión por consanguinidad que sufre este cultivo, sólo admite dos o tres ciclos de autofecundaciones.

Además, el carácter bienal y alógamo de la cebolla dificultan en gran medida la obtención de híbridos, que requiere alrededor de 10 – 12 años (Foschi y col., 2009).

La producción de plantas haploides y la consiguiente duplicación de los cromosomas es la forma más eficiente para el desarrollo de poblaciones de mejora totalmente homocigotas, facilitándose la producción de híbridos estables y de gran vigor. La aplicación de herramientas biotecnológicas como la inducción de la embriogénesis mediante el cultivo *in vitro* ha permitido la obtención de doblehaploides (DH). En cebolla, la ginogénesis mediante el cultivo *in vitro* de flores enteras es la técnica más utilizada en la mayoría de los estudios, por ser la más eficiente en la producción de embriones y la menos laboriosa (Muren, 1989; Campion y Alloni, 1990; Keller, 1990; Campion y col., 1992; Bohanec y col., 1995; Geoffriau y col., 1997; Michalik y col., 2000; Jakše y Bohanec, 2003; Khar y col., 2018).

Por tanto, el poder disponer de protocolos de producción de líneas DH de cebolla representa una oportunidad única para la obtención de materiales completamente homocigóticos y estables. Con estos antecedentes, el objetivo del Capítulo 7 se centra en la optimización de un protocolo de obtención de DH, en germoplasma español de cebolla, mediante la inducción de la ginogénesis *in vitro*. Para ello se han tenido en cuenta los principales factores que afectan al éxito de la técnica como son: el genotipo y las condiciones de cultivo de la planta donante, la composición del medio de cultivo, los reguladores del crecimiento, el tipo de contenedores y el tratamiento de duplicación (Geoffriau y col., 1997; Jakše y Bohanec, 2000; Martínez y col., 2000; Michalik y col., 2000; Jakše y Bohanec, 2003).

De todas las combinaciones ensayadas el genotipo de la planta donante fue el principal factor limitante del éxito de esta técnica. Los porcentajes de inducción de la ginogénesis en los materiales utilizados fueron similares a los obtenidos en otros estudios con genotipos portugueses y españoles (Bohanec y Jakše, 1999). Sin embargo, otros materiales como el americano o el del norte de Europa, así como poblaciones sintéticas e híbridos F1, rindieron mayores porcentajes de inducción de embriones (Bohanec y Jakše, 1999). El medio de cultivo, en especial el tipo de reguladores de crecimiento, tuvo un efecto importante sobre la eficiencia de la ginogénesis, obteniéndose mejores resultados con la combinación de la citoquinina 2-Isopentenil-adenina (2iP) y la auxina, ácido naftalenacético (NAA), en la mayoría de materiales. Estos resultados confirman el efecto de esta combinación de reguladores del crecimiento sobre la inducción de la embriogénesis (Michalik y col., 2000), y el porcentaje de plantas aclimatadas (Bohanec

y col., 1995). Además, el favorecimiento del intercambio de gases, con los contenedores Eco2box, fue esencial para reducir el porcentaje de hiperhidricidad de los embriones y en consecuencia, aumentar los porcentajes de aclimatación de las plantas. La importancia del intercambio de gases sobre la reducción o eliminación de la hiperhidricidad de los explantos ha sido ampliamente documentada en diferentes especies (Zobayed y col., 1999; Lai y col., 2005; Casanova y col., 2008; Ivanova y Van Staden, 2010). Otro factor importante para la supervivencia de las plantas fue el tratamiento de duplicación; mediante la aplicación del tratamiento con APM en medio sólido y durante un tiempo corto se obtuvieron los mayores porcentajes de duplicación. Con tiempos más largos de exposición con el agente diploidizante se obtuvieron mayores porcentajes de plantas mixoploides, confirmando los resultados de Jakše y col. (2003).

Para finalizar y en relación con este último punto, la embriogénesis somática se plantea como un herramienta útil y eficaz para duplicación de los cromosomas de las plantas haploides y mixoploides. Esta técnica tiene dos ventajas sobre la aplicación de agentes antimitóticos: por un lado, no se utilizan productos químicos potencialmente dañinos y, por otro lado, la mayor eficiencia de duplicación (Alan y col., 2007; Jakše y col., 2010).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Al considerar la evolución del contenido individual de los capsicinoides, se ha podido verificar que los capsicinoides tipo dihidrocapsicina (dihidrocapsicina, nordihidrocapsicina y homodihidrocapsicina) muestran un patrón de comportamiento similar, mientras que los de tipo capsicina (capsicina y homocapsicina) siguen patrones de evolución diferentes.
2. La relación individual y total de los capsicinoides proporciona un perfil de picor característico de cada variedad de pimiento en cada momento del desarrollo de los frutos, y este condiciona, en gran parte, el uso final del fruto (fresco, especia, concentrado, salsa,...). Además, el estudio del patrón de acumulación de capsicinoides a lo largo del fruto permite determinar el momento con mayores contenidos en compuestos nutraceuticos, óptimo para la recolección del fruto.
3. Por primera vez, se ha sintetizado un compuesto análogo a los capsinoides, el ($\pm$)-DMBO, para su utilización como estándar interno en la determinación de estos compuestos mediante ESI-MS(QTOF). El ($\pm$)-DMBO no se encuentra presente de forma natural en los frutos de *Capsicum*. Además, las propiedades físico-químicas de este compuesto permiten su elución entre el capsiato y el dihidrocapsiato y le confieren un comportamiento de ionización y patrón de fragmentación similar al de los capsinoides.
4. Se ha desarrollado y validado, por primera vez, un método analítico de HPLC-ESI-MS(QTOF) para la determinación de los capsinoides en frutos de pimiento. El método HPLC-ESI-MS(QTOF) permitió el análisis simultáneo de los dos capsinoides mayoritarios, capsiato y dihidrocapsiato, en los frutos de pimiento, con alta selectividad y sensibilidad, y con una buena reproducibilidad.
5. La alta sensibilidad del método de HPLC-ESI-MS(QTOF) desarrollado ha permitido, por primera vez, la cuantificación de capsiato y dihidrocapsiato en la variedad de pimiento 'Tabasco'.
6. Los análisis ESI-MS/MS(QTOF) permitieron la identificación de dos nuevos capsinoides minoritarios en frutos de pimiento, mediante la identificación de la relación m/z exacta, la asignación de la fórmula molecular y el patrón de fragmentación obtenido

por MS/MS. Consecuentemente, el método desarrollado resulta particularmente adecuado para el análisis exhaustivo de los capsinoides presentes en los frutos de pimiento, lo que le confiere un amplio rango de aplicabilidad; por ejemplo, en programas de mejora genética de la calidad, para seleccionar genotipos con contenidos de determinados capsinoides o en estudios transcriptómicos destinados a identificar los genes involucrados en la biosíntesis de capsinoides.

7. La aplicación de herramientas biotecnológicas, mediante el cultivo *in vitro* de flores enteras, para la inducción de la embriogénesis ha permitido la obtención de plantas dobles haploides de cebolla. Se ha verificado que la capacidad de la ginogénesis es muy dependiente del genotipo, siendo la capacidad de inducción de la embriogénesis menor en el germoplasma español que en la población sintética ‘OH-1’.

8. La comparación de dos protocolos para la inducción de la ginogénesis determinó una mayor eficiencia para la inducción de embriogénesis y mayor porcentaje de plantas aclimatadas con el protocolo de dos pasos.

9. La utilización del contenedor Eco2box redujo el porcentaje de hiperhidricidad de los explantos y, en consecuencia, aumentó el porcentaje de supervivencia de las plantas posiblemente por favorecer el intercambio de gases. Por tanto, de los utilizados en este trabajo, el contenedor Eco2box es el recomendado para el desarrollo de los embriones y la aclimatación de las plantas de cebolla.

10. De las dos estrategias utilizadas para la duplicación de los cromosomas, la embriogénesis somática, a partir del cultivo de las flores de plantas haploides y mixoploides de cebolla, rindió mayores porcentajes de plantas dobles haploides que con la aplicación del agente diploidizante APM. Esta estrategia se convierte en una buena alternativa para la obtención de plantas dobles haploides en cebolla.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Melendez A, Morrell PL, Roose ML, Kim SC. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany* (2009) 96: 1190–1202.

Alan AR, Lim W, Mutschler MA, Earle ED. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). *Plant Science* (2007) 173: 25–31.

Bahram-Parvar M, Lim LT. Fresh-cut onion: a review on processing, health benefits, and shelf-life. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2018) 17: 290–308.

Barbero GF, de Aguiar AC, Carrera C, Olachea Á, Ferreiro-González M, Martínez J, Palma M, Barroso CG. Evolution of capsaicinoids in Peter pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) during fruit ripening. *Chemistry & biodiversity* (2016) 13:1068–1075.

Barbero GF, Liazid A, Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* (2008) 75: 1332–1337.

Barbero GF, Molinillo JMG, Varela RM, Palma M, Macías A, Barroso CG. Application of Hansch's Model to capsaicinoids and capsinoids: a study using the quantitative structure-activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010) 58: 3342–3349.

Barbero GF, Ruiz AG, Liazid A, Palma M, Vera JC, Barroso CG. Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food chemistry* (2014) 153: 200–206.

Batista EL, Núñez LMG. Identificación de variables que puedan ser usadas como criterios de selección en programas de mejoramiento genético de la cebolla (*Allium cepa* L.). *Centro Agrícola*, (2011) 38: 2328.

BenMansour-Gueddes S. Evolution of capsaicinoids and mineral composition during fruit development in some hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Agriculture Innovations and Research* (2015) 3: 1094–1102.

Beretta HV, Bannoud F, Insani M, Berli F, Hirscheegger P, Galmarini CR, Cavagnaro PF. Relationships between bioactive compound content and the antiplatelet and antioxidant activities of six allium vegetable species. *Food technology and biotechnology* (2017) 55: 266.

Bisen S, Emerald MP. Nutritional and therapeutic potential of garlic and onion (*Allium* sp.). *Current Nutrition & Food Science* (2016) 12: 190–199.

Bohanec B, Jakše M, Ihan A, Javornik B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science* (1995) 104: 215–224.

Bohanec B, Jakše M. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Reports* (1999) 18: 737–742.

Bosland PW, Baral JB. ‘Bhut Jolokia’-The world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *HortScience* (2007) 42: 222–224.

Bosland PW, Coon D, Reeves G. ‘Trinidad Moruga Scorpion’ Pepper is the World’s Hottest Measured Chile Pepper at More Than Two Million Scoville Heat Units. *HortTechnology* (2012) 22: 534–538.

Bosland PW, Votava EJ. Peppers: vegetable and spice *Capsicums*, 2nd Ed. CAB International, MA, USA. 2012, 230 pp.

Brewster JL. Onions and other vegetable *Alliums*. CABI (2008), Vol. 15, Publishing: Wallingford, UK.

Campion B, Alloni C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (1990) 20: 1–6.

Campion B, Azzimonti MT, Vicini E, Schiavi M, Falavigna A. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Science* (1992) 86: 97–104.

Casanova E, Moysset L, Trillas MI. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biologia Plantarum* (2008) 52: 1–8.

Chiquirrín G. Mejoramiento genético de cebolla de días cortos. Proyecto Regional Hortícola, Argentina, INTA, (2003) 26–29.

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

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

Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* (2007) 18: 609–625.

Coutinho JP, Barbero GF, Fayos O, Garcés-Claver A, Godoy HT, Palma M, Barroso CG. Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. *Talanta* (2015) 134: 256–263.

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

FAOSTAT (2014). Food and Agriculture Organization statistical database. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Consultado: 14 septiembre 2017).

Foschi M, Martínez L, Ponce MT, Galmarini CR. Doblehaploides, una estrategia biotecnológica para el mejoramiento genético en cebolla (*Allium cepa*). *Horticultura Argentina* (2009) 28: 40–48.

Friedman JR, Nolan NA, Brown KC, Miles SL, Akers AT, Colclough KW, Seidler JM, Rimoldi JM, Valentovic MA, Dasgupta P. Anticancer activity of natural and synthetic capsaicin analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2018) 364: 462–473.

Fritsch RM, Friesen N. “Evolution, domestication and taxonomy”. En *Allium Crop Science: Recent Advances*, eds. Rabinowitch HD, Currah L. CAB International, Wallingford, UK, 2002, pp. 5–30.

Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés M, Abadia J, Gil-Ortega R, Álvarez-Fernandez A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54: 9303–9311.

Geoffriau E, Kahane R, Rancillac M. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* (1997) 94: 37–44

Han K, Jeong HJ, Sung J, Keum YS, Cho MC, Kim JH, Kwon JK, Kim BD, Kang BC. Biosynthesis of capsinoid is controlled by the *Pun1* locus in pepper. *Molecular Breeding* (2012) 31: 537–548.

Ivanova M, Van Staden J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. *Plant Growth Regulation* (2010) 60: 143–150.

Jakše M, Bohanec B. “Haploid induction in onion via gynogenesis”. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, eds. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I. (Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publishers), 2003, 281–285.

Jakše M, Bohanec B. “Studies of alternative approaches for genome doubling in onion”. En *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, ed. Bohanec B. (Brussels: COST Action 824, Final meeting 1–5 July, Bled, Slovenia. Directorate-General for Research, Communication Unit, European Commission), **2000**, 101–104.

Jakše M, Havey MJ, Bohanec B. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. *Plant Cell Reports* (**2003**) 21: 905–910.

Jakše M, Hirschegger P, Bohanec B, Havey MJ. Evaluation of gynogenic responsiveness and pollen viability of selfed doubled haploid onion lines and chromosome doubling via somatic regeneration. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (**2010**) 135: 67–73.

Jones MG, Hughes J, Tregova A, Milne J, Tomsett AB, Collin HA. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* (**2004**) 55: 1903–1918.

Keller J. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* (**1990**) 47: 241–247.

Khar A, Kumar A, Islam S, Kumar A, Agarwal A. Genotypic response towards haploid induction in short day tropical Indian onion (*Allium cepa*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* (**2018**) 88: 709–713.

Kim S, Kim DB, Jin W, Park J, Yoon W, Lee Y, Kim S, Lee S, Kim S, Lee OH, Shin D, Yoo M. Comparative studies of bioactive organosulphur compounds and antioxidant activities in garlic (*Allium sativum* L.), elephant garlic (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Natural Product Research* (**2018**) 32: 1193–1197.

Kobata K, Sutoh K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T. Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products* (**1999**) 62: 335–336.

Kobata K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T. Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (**1998**) 46: 1695–1697.

Lai CC, Lin HM, Nalawade SM, Fang W, Tsay HS. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *Journal of Plant Physiology* (**2005**) 162: 355–361.

Lang Y, Hiroaki K, Ryuji S, Kenzo N, Akihito M, Tatsuo W, Yoshiyuki T, Susumu Y, Tetsuya M. Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *The Plant Journal* (2009) 59: 953–961.

Lee J, Park SJ, Hong SC, Han JH, Choi D, Yoon JB. QTL mapping for capsaicin and dihydrocapsaicin content in a population of *Capsicum annuum* ‘NB 1’ × *Capsicum chinense* ‘Bhut Jolokia’. *Plant Breeding* (2016) 135: 376–383.

Luo XJ, Peng J, Li YJ. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology* (2011) 650: 1–7.

Luthar Z, Bohanec B. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Reports* (1999) 18: 797–802.

Mallor C, Llamazares A, Gutiérrez M, Bruna P, Mallor F, Arnedo-Andrés MS, Álvarez JM. Evaluación morfológica, de pungencia y contenido en sólidos solubles de la cebolla ‘Fuentes de Ebro’. *ITEA* (2007) 103: 212–223.

Martínez LE, Agüero CB, López ME, Galmarini CR. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Science* (2000) 156: 221–226.

Michalik B, Adamus A, Nowak E. Gynogenesis in Polish onion cultivars. *Journal of Plant Physiology* (2000) 156: 211–216.

Muren RC. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience* (1989) 24: 833–834.

Ohyama K, Suzuki K. Dihydrocapsiate improved age-associated impairments in mice by increasing energy expenditure. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* (2017) 313: E586–E597.

Parvez GMM. Current advances in pharmacological activity and toxic effects of various *Capsicum* species. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* (2017) 8: 1900–1912.

Rabinowitch HD, Currah L. *Allium* crop science: recent advances. CAB International, Wallingford, UK, 2002, 5–378.

Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Product Reports* (2005) 22: 351–368.

Schweiggert U, Carle R, Schieber A. Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (2006) 57: 236–244.

Simó J, Pascual L, Cañizares J, Casañas F. Spanish onion landraces (*Allium cepa* L.) as sources of germplasm for breeding calçots: a morphological and molecular survey. *Euphytica* (2014) 195: 287-300

Srinivasan K. Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2016) 56: 1488–1500.

Sutoh K, Kobata K, Watanabe T. Stability of capsinoid in various solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001) 49: 4026–4030.

Suzuki T, Iwai K. Chapter 4 constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (1984) 23: 227–299.

Szydelko J, Szydelko M, Boguszewska-Czubara A. Health-promoting properties of compounds derived from *Capsicum* sp. A review. *Herba Polonica* (2017) 63: 67–87.

Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T, Yazawa S. Newly mutated putative-aminotransferase in nonpungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010a) 58: 1761–1767.

Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T, Yazawa S. Novel loss-of-function putative aminotransferase alleles cause biosynthesis of capsinoids, nonpungent capsaicinoid analogues, in mildly pungent chili peppers (*Capsicum chinense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010b) 58: 11762–11767.

Tanaka Y, Sonoyama T, Muraga Y, Koeda S, Goto T, Yoshida Y, Yasuba K. Multiple loss-of-function putative aminotransferase alleles contribute to low pungency and capsinoid biosynthesis in *Capsicum chinense*. *Molecular Breeding* (2015) 35: 142.

USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. 2018. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <https://npgsweb.arsgrin.gov/gringlobal/taxonomyfamily.aspx?type=subfamily&id=22>. Consultado el 9 de julio de 2018.

Wahyuni Y, Ballester A, Sudarmonowati E, Bino R, Bovy A. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* (2011) 72: 1358–1370.

Yazawa S, Suetom N, Okamoto K, Namiki T. Content of capsaicinoids and capsaicinoid-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrids made with ‘CH-19 Sweet’ as a parent. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* (1989) 58: 601–607.

Zang Y, Fan L, Chen J, Huang R, Qin H. Improvement of lipid and glucose metabolism by capsiate in palmitic acid-treated HepG2 cells via activation of AMPK/SIRT1 Signal Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2018) 66: 6772–6781.

Zhai B, Zhang C, Sheng Y, Zhao C, He X, Xu W, Huang K, Luo Y. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of S-allyl-cysteine sulfoxide (alliin) in DIO mice. *Scientific Reports* (2018) 8: 3527.

Zobayed SMA, Armstrong J, Armstrong W. Cauliflower shoot- culture: effects of different types of ventilation on growth and physiology. *Plant Science* (1999) 141: 209–217.

