

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Biología Ambiental**

**Metabólica de la defensa contra herbívoros en chiles
mexicanos *Capsicum annum***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Edna Elizeth Arvizu Díaz

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Edna Elizeth Arvizu Díaz

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. María Clara Arteaga Uribe
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Bello Bedoy
Codirector de tesis

Dra. Jimena Carrillo Tripp

Dr. Ernesto García Mendoza



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Edna Elizeth Arvizu Díaz © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Edna Elizeth Arvizu Díaz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental.

Metabolómica de la defensa contra herbívoros en chiles mexicanos *Capsicum annuum*

Resumen aprobado por:

Dra. María Clara Arteaga Uribe
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Bello Bedoy
Codirector de tesis

La domesticación es un proceso que modifica las características morfológicas y fisiológicas de una planta o animal de interés humano derivado de la selección artificial. Este estudio determinó el efecto de la domesticación sobre la química foliar de cuatro cultivares de chiles mexicanos (serrano, pimiento morrón, güero y Yahuahualica) en relación con su ancestro silvestre (chiltepín). Utilizando una técnica de metabolómica no dirigida para evaluar la composición química constitutiva e inducida. Se encontró un total de 5508 señales que corresponden a iones precursores (MS1) en muestras de tejido foliar después del pretratamiento de los datos con MZmine2. Se realizó un análisis de Wilcoxon para encontrar las diferencias químicas, encontrando 241 y 185 señales significativas con y sin daño, respectivamente, entre los cultivares y el chiltepín. De manera similar, se encontraron diferencias significativas en las señales reguladas al alza y a la baja entre el metaboloma constitutivo e inducido del chiltepín y los cultivares. El análisis de componentes principales mostró la variación en el conjunto de datos de manera general. Posteriormente, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico y un mapa de calor, donde se corroboraron los resultados observados en el análisis de componentes principales. Se encontraron tres grupos distintivos en el metaboloma constitutivo: grupo A (chiltepín), subgrupo A1 (Yahuahualica y serrano), y grupo B (güero y pimiento morrón). En el metaboloma inducido se encontraron tres grupos: grupo C (chiltepín y Yahuahualica), grupo D (serrano, pimiento morrón y güero) y subgrupo D1 (güero y pimiento morrón). Se realizaron diagramas de Venn para comparar las señales únicas y compartidas. El chiltepín presentó más señales únicas en relación a los cultivares. Además, el cultivar Yahuahualica compartió el mayor número de señales con el chiltepín, con y sin daño. Se encontraron 42 coincidencias en las bibliotecas del GNPS; de estos metabolitos identificados, el mayor número fueron flavonoides. En general, los resultados sugieren una diferencia en la composición química constitutiva e inducida entre los cultivares y el chiltepín.

Palabras clave: Domesticación, ancestro silvestre, *Spodoptera frugiperda*, metabolitos secundarios, resistencia.

Summary of the thesis presented by **Edna Elizeth Arvizu Díaz** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Master in Life Sciences with orientation in Environmental Biology.

Metabolomics of defense against herbivores in Mexican chili peppers *Capsicum annuum*

Summary approved by:

Dra. María Clara Arteaga Uribe
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Bello Bedoy
Codirector de tesis

Domestication is a process that modifies the morphological and physiological characteristics of a plant or animal of human interest derived from artificial selection. This study determined the effect of domestication on the foliar chemical of four cultivars of Mexican chili peppers (serrano, bell pepper, güero, and Yhualica) concerning their wild ancestor (chiltepin). Using an untargeted metabolomics technique to evaluate the constitutive and induced chemical composition. A total of 5508 signals corresponding to precursor ions (MS1) were found in leaf tissue samples after pretreatment of the data with MZmine 2. A Wilcoxon analysis was carried out to find the chemical differences, finding 241 and 185 significant signals with and without damage, respectively, between the cultivars and the chiltepin. Similarly, significant differences in the up and down-regulated signals were found between the constitutive and induced metabolomes of the chiltepin and cultivars. The principal component analysis showed the variation in the data set in a general way. Subsequently, a hierarchical grouping analysis and a heat map were carried out, where the results observed in the principal components analysis were corroborated. Three distinctive groups were found in the constitutive metabolome: group A (chiltepin), subgroup A1 (Yhualica and serrano), and group B (güero and bell pepper). In the induced metabolome, three groups were found: group C (chiltepin and Yhualica), group D (serrano, bell pepper and güero) and subgroup D1 (güero and bell pepper). Venn diagrams show the unique and shared signals in the chiltepin and cultivars. The chiltepin presented more unique signals concerning the cultivars. Furthermore, the cultivar Yhualica shared the highest number of signals with the chiltepin, with and without damage. A total of 42 coincidences were found in the GNPS libraries; of these identified metabolites, the highest number were flavonoids. In general, the results suggest a difference in the constitutive and induced chemical composition between the cultivars and the chiltepin.

Keywords: Domestication, wild ancestor, *Spodoptera frugiperda*, secondary metabolites, resistance.

Dedicatoria

A mis padres por su apoyo y paciencia.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó para que pudiera realizar mis estudios (CVU: 993393). Y por el financiamiento otorgado al proyecto: “Variación genética de la defensa constitutiva e inducida contra herbívoros y patógenos en chile silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*” (SEP-CONACYT-CB2015/255631).

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada (CICESE) y al posgrado en Ciencias de la Vida, en especial a Adriana Mejía, por su paciencia y toda la ayuda.

A mis directores de tesis, la Dra. María Clara Arteaga y el Dr. Rafael Bello Bedoy, por sus consejos y paciencia en todo el proceso. Por todo el apoyo que me brindaron para mejorar y seguir aprendiendo.

A mis sinodales la Dra. Jimena Carrillo y el Dr. Ernesto García, gracias por ayudar a mejorar mi trabajo con sus comentarios y correcciones.

Al Dr. Aldo Moreno, por contribuir en este proyecto y a todo su equipo, gracias por la paciencia.

Agradezco Alan y a Rommel Alejandro Carballo, por su contribución en este trabajo, especialmente a Rommel por la paciencia.

A todos mis amigos y compañeros de Ciencias de la vida, en especial: Antonio Gorriño, Vianey Cabello, Cristina Álvarez, Eduardo Lucero, Diego de Pedro y Luz Abril.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Gustavo Velázquez, Haran Peiro y Carlos Serrano por apoyarme y compartir sus conocimientos, además del excelente ambiente de compañerismo y esas pláticas entretenidas en el laboratorio.

A mi amiga y compañera desde la universidad Francisca Zayas, por su apoyo y amistad.

A Carlos Soto por brindarme su amistad y apoyo en momentos difíciles.

Con mucho cariño a Cristóbal Aguilar, por alegrar mis días al brindarme su amistad, amor y confianza.

A mi familia por apoyarme.

Y a todos aquellos que contribuyeron de alguna forma en este trabajo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	4
1.2 Justificación	6
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo general	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Sistema de estudio	9
2.1.1 Condiciones de Crecimiento de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> y distintos cultivares de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	9
2.1.2 Condiciones de desarrollo de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidóptera: Noctuidae).....	10
2.2 Tratamiento de daño por larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	10
2.3 Perfil de los metabolitos	11
2.3.1 Obtención de muestras de tejido de hojas de <i>Capsicum annuum</i>	11
2.3.2 Extracción de metabolitos.....	12

2.3.3	Análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas.....	12
2.4	Análisis de datos.....	13
2.4.1	Procesamiento de los datos	13
2.4.2	Anotación de metabolitos	14
2.4.3	Análisis Estadístico	14
2.4.4	Diferencias en el número de metabolitos únicos y compartidos entre los cultivares y el chiltepín.....	15
Capítulo 3. Resultados		16
3.1	Diferencias entre los cultivares y el chiltepín.....	16
3.1.1	Diferencias en las señales entre los cultivares y el chiltepín	17
3.1.2	Efecto de la domesticación en la composición química foliar	19
3.1.3	Efecto de la domesticación en el metaboloma constitutivo.....	20
3.1.4	Efecto de la domesticación en el metaboloma inducido	21
3.1.5	Patrón de expresión del metaboloma constitutivo e inducido.....	22
3.1.6	Diferencias en el patrón de expresión del metaboloma constitutivo.....	23
3.1.7	Diferencias en el patrón de expresión del metaboloma inducido con <i>Spodoptera frugiperda</i> ..	24
3.2	Diferencias en el número de metabolitos únicos y compartidos	25
3.2.1	Metabolitos secundarios constitutivos únicos y compartidos entre los cultivares y el chiltepín	25
3.2.2	Metabolitos secundarios inducidos únicos y compartidos entre los cultivares y el chiltepín	26
3.2.3	Metabolitos únicos y compartidos entre el metaboloma constitutivo e inducido.....	27
3.3	Anotación de los metabolitos	29
Capítulo 4. Discusión		32
4.1	Metaboloma de <i>Capsicum annuum</i>	32
4.2	Diferencias en la composición química constitutiva e inducida	33

4.3 Perfil de los metabolitos	35
Capítulo 5. Conclusiones	37
5.1 Perspectivas	37
Literatura citada.....	39
Anexos.....	48

Lista de figuras

Figura		Página
1	Jaulas de clip con larvas de <i>S. frugiperda</i> en planta de chile para el tratamiento de daño.....	11
2	Hojas con daño foliar provocado por la larva de <i>S. frugiperda</i>	11
3	Señales que muestran diferencias significativas entre el chiltepín y los cultivares sin daño.....	17
4	Señales reguladas al alza y a la baja entre el chiltepín y los cultivares sin daño.....	18
5	Señales que difieren entre el chiltepín y los cultivares con tratamiento de daño.....	18
6	Señales reguladas al alza y a la baja entre el chiltepín y los cultivares con tratamiento de daño.....	19
7	Análisis de componentes principales del metaboloma constitutivo e inducido.....	20
8	Análisis de componentes principales del metaboloma constitutivo.....	21
9	Análisis de componentes principales del metaboloma inducido.....	22
10	Mapa de calor del metaboloma constitutivo e inducido.....	23
11	Mapa de calor del metaboloma constitutivo.....	24
12	Mapa de calor del metaboloma inducido con daño de <i>Spodoptera frugiperda</i>	25
13	Diagrama de Venn de las señales únicas y compartidas entre los cultivares serrano, Yahualica, morrón, güero y el chiltepín sin tratamiento de daño.....	26
14	Diagrama de Venn de las señales únicas y compartidas entre los cultivares serrano, Yahualica, morrón, güero y el chiltepín con tratamiento de daño.....	27
15	Diagrama de Venn de los metabolitos de cada cultivar y el chiltepín con y sin tratamiento de daño.....	28
16	Búsqueda sistemática de literatura.....	48
17	Metadatos utilizados en el análisis de redes moleculares.....	49
18	Archivo con datos obtenidos en el análisis LC-MS modificado para análisis estadísticos.....	50
19	Parámetros utilizados para normalizar y transformar los datos utilizados para el análisis multivariado en MetaboAnalyst 5.0.....	51

20	Diagramas de caja y diagramas de densidad de Kernel antes y después de la normalización.....	52
21	Parámetros para realizar el mapa de calor en MetaboAnalyst 5.0.....	53
22	Gráfico de Scree.....	54

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Revisión de literatura, con el fin de sintetizar la información disponible sobre la metabolómica de esta especie.....	5
2	Plantas obtenidas para el experimento de daño con <i>S. frugiperda</i> y la obtención de tejido foliar para la extracción de metabolitos.....	10
3	Resumen de los resultados del procesamiento de datos.....	16
4	Metabolitos encontrados en las muestras de tejido foliar.....	29

Capítulo 1. Introducción

La domesticación es un proceso que modifica las características morfológicas y fisiológicas de una planta o animal de interés humano derivado de la selección artificial (Chen et al., 2015). Las plantas domesticadas tienen su origen a partir de un ancestro silvestre, el cual tiene una mayor diversidad genética (Milla et al., 2015). Generalmente las plantas domesticadas presentan diferencias genéticas que se expresan en caracteres morfológicos y bioquímicos, que las distinguen de sus ancestros silvestres (Pickersgill, 2007). El conjunto de rasgos que distingue a un cultivo respecto a su ancestro silvestre se conoce como "síndrome de domesticación" y este síndrome ha evolucionado de forma independiente en una amplia diversidad de *taxa* (Meyer et al., 2012). Estos rasgos incluyen el aumento de tamaño del órgano cosechado, pérdida de dispersión y latencia de las semillas, maduración temprana, así como la disminución o pérdida de defensas químicas o mecánicas (Evans, 1993; Pickersgill, 2007). Además, se ha determinado que estos rasgos son más comunes en plantas anuales domesticadas que en plantas perennes (Meyer et al., 2012; Chen et al., 2015).

Las plantas silvestres y cultivadas pueden diferir en su composición y concentración de metabolitos secundarios (Kempel et al., 2011; Moreira et al., 2014). Una explicación es que las diferencias surgen de la selección para disminuir compuestos químicos con sabor desagradable para aumentar la palatabilidad y el contenido nutricional, modificando la composición química de las plantas cultivadas (Benrey et al., 1998; Dicenta et al., 2002; Olsen y Wendel, 2013). La evidencia que apoya este proceso de diferenciación química, se ha encontrado en estudios comparativos entre plantas domesticadas y su ancestro silvestre (Johns, 1989; Pickersgill, 2007). Entre las plantas que se han comparado se encuentra el maíz (*Zea mays*, Rosenthal y Dirzo, 1997), frijol (*Phaseolus vulgaris*, Lindig-Cisneros et al., 2002), pepino (*Cucumis sativus*, Denison et al., 2003), yuca (*Manihot esculenta*, Mondolot et al., 2008) y la col (*Brassica oleracea*, Gols et al., 2008).

Otra explicación está enfocada en los costos energéticos, debido a que la producción de metabolitos secundarios puede tener un costo energético significativo (Agrawal, 2011). Esta idea sugiere que las plantas domesticadas presentan niveles más bajos de sustancias químicas defensivas que sus ancestros silvestres para minimizar la disyuntiva entre la asignación de recursos a defensa o reproducción (Rosenthal y Dirzo, 1997; Strauss y Agrawal, 1999). Por ejemplo, ya que las plantas tienen recursos limitados, la reasignación de recursos para producir órganos más grandes como hojas, flores o frutos, puede comprometer la inversión en metabolitos secundarios implicados en otras funciones, como la resistencia contra insectos u otro tipo de estrés. Si bien los metabolitos secundarios son relevantes en general, la

presencia y diversidad de metabolitos secundarios dependerá de las condiciones ambientales y de las interacciones bióticas. En consecuencia, como las plantas silvestres y cultivadas son expuestas a diferentes ambientes que favorecen la presencia o concentración de ciertos metabolitos implicados en funciones fisiológicas y ecológicas (Blanckaert et al., 2012), se espera que estas difieran en su constitución química.

Respuestas defensivas de las plantas contra herbívoros

Las plantas silvestres están constantemente expuestas a herbívoros, lo que favorece el mantenimiento de sus defensas para sobrevivir, crecer y reproducirse. Una estrategia defensiva de las plantas es la resistencia, que es definida como la habilidad de evitar o disminuir la pérdida de tejido foliar mediante defensas químicas o físicas que afecten la adecuación de un herbívoro o patógeno (Núñez-Farfán et al., 2007). Las plantas tienen mecanismos de defensa que siempre están presentes, estos se conocen como constitutivos (Schultz et al., 2000; Gatehouse, 2002). Sin embargo, algunos mecanismos de defensa se presentan sólo después del ataque de un herbívoro o patógeno, este tipo de defensa se conoce como inducida (Agrawal, 1998; Barton, 2016).

Metabolitos primarios y secundarios en plantas

Entre los componentes de la resistencia contra los herbívoros se encuentran los metabolitos. Los metabolitos son sustancias químicas derivados del metabolismo de la planta, pueden ser precursores o intermediarios de otros metabolitos (Fang et al., 2019). Dependiendo de sus funciones fisiológicas se clasifican en dos grupos. En primer lugar, los metabolitos primarios son los compuestos químicos que están involucrados en las funciones fisiológicas básicas del metabolismo de las plantas, para la supervivencia, desarrollo y reproducción de una planta, por lo cual se encuentran presentes en todas las células de la planta (Fang et al., 2019). Algunos ejemplos son la clorofila, los aminoácidos, fosfolípidos, etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido málico, ácido oxálico y el ácido shikímico (Chen et al., 2013a; Jang et al., 2015; Fang et al., 2019).

En segundo lugar, los metabolitos secundarios, un numeroso grupo de metabolitos que no son esenciales en el metabolismo primario de las plantas, pero su presencia en las plantas vasculares se ha relacionado con la capacidad de responder a factores ambientales que imponen estrés, como la escasez de agua o los herbívoros (Wink, 2003). A nivel ecológico, su presencia contribuye a garantizar la supervivencia de las plantas como individuos y especie, además representan la base de un lenguaje químico en el cual se sustenta una parte importante del equilibrio de los ecosistemas (Fraenkel, 1959). Entre los metabolitos

secundarios más importantes relacionados con la defensa de las plantas, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos y alcaloides (Cowan, 1999). En general se ha encontrado que los metabolitos tienen efecto repelente o su consumo resulta adverso para sus consumidores, ya que reducen el crecimiento, la tasa de alimentación, la asimilación de nutrientes, o sus efectos pueden ser letales (Berenbaum, 1985; Nava-Pérez et al., 2012).

Entre los metabolitos, los terpenos son los más abundantes en el reino vegetal (Dudareva et al., 2006). Algunos tienen actividad repelente y tóxica contra insectos como el citronelal y las piretrinas, respectivamente (Jiménez et al., 2003). Los fenoles son otro grupo de compuestos abundantes en plantas (Cartaya y Reynaldo, 2001), entre ellos destacan los flavonoides por su actividad tóxica contra insectos, como las metoxiflavonas (Morimoto et al., 2000, 2003). Por otra parte, algunos alcaloides presentan actividad neurotóxica en insectos y vertebrados, un ejemplo es la nicotina (Jiménez et al., 2003). Además, los alcaloides también pueden inhibir el desarrollo de algunos insectos herbívoros evitando que alcancen su etapa adulta y que se reproduzcan (Chang et al., 2000). Si bien se han identificado grandes cantidades de metabolitos secundarios en las plantas, existen plantas para las que se desconoce sus componentes químicos y su papel ecológico en las interacciones de la planta con el ambiente.

Metabolómica no dirigida

La metabolómica es una herramienta que ayuda a conocer la composición química de diferentes órganos de las plantas (Bino et al., 2004; Van Der Greef et al., 2004). La técnica de metabolómica no dirigida permite detectar diferencias en la composición química de las plantas (metabolitos) en respuesta a cambios ambientales o herbívoros (De Vos et al., 2007; Jang et al., 2015). En este estudio se realizó una comparación del efecto de la domesticación en el perfil metabolómico foliar de los cultivares de chiles serrano, morrón, güero, Yahualica respecto a su ancestro silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (chiltepín), con el objetivo de determinar cómo la domesticación ha afectado a la defensa constitutiva e inducida. Específicamente se respondieron las siguientes preguntas: I) ¿Cuál es el efecto de la domesticación en la composición metabólica foliar en cultivares de chiles mexicanos *Capsicum annuum* var. *annuum* en contraste con su ancestro silvestre? II) ¿Existe diferencia en los metabolitos secundarios con papel potencial en la resistencia contra herbívoros?

1.1 Antecedentes

Capsicum annuum

Capsicum annuum var. *glabriusculum* es el ancestro silvestre de los chiles cultivados mexicanos (Qin et al., 2014; Carvalho et al., 2014). Esta planta es una hierba que se distribuye en México desde Sonora hasta Chiapas y los alrededores de la Península de Yucatán; en el norte de México, se puede encontrar en los estados de Sinaloa, Sonora, Baja California, Nuevo León y Coahuila (Bello y González, 2011; López-España et al., 2016; Votava et al., 2002). Las variedades domesticadas de Chile tienen una gran diversidad morfológica en comparación a sus ancestros silvestres (Perry et al., 2007).

Las plantas domesticadas del género *Capsicum* se cultivan en todo el mundo y su fruto tiene una gran importancia económica, en especial los chiles picantes y dulces de la especie *Capsicum annuum* L. (Steenbergen et al., 2018). Los chiles son clasificados dependiendo de su nivel de domesticación en 30 taxones que corresponden a plantas silvestres o semi-domesticadas y 5 taxa domesticados (Carvalho et al., 2014). La especie *Capsicum annuum* fue domesticada aproximadamente hace 7000 años, y se sabe que las variedades silvestres y cultivadas presentan diferencias morfológicas marcadas en sus hojas, flores y frutos (Eshbaugh, 1975). En plantas cultivadas, el fruto es más alargado y tiene coloraciones de diferentes gradientes entre rojo y naranja, amarillo o café, mientras que los frutos de plantas silvestres suelen ser redondos y de color rojo a la madurez, también se puede observar un cambio en el picor entre las distintas variedades y su ancestro silvestre (Perry et al., 2007; Araceli et al., 2009). Además, los frutos presentan una pérdida de la dehiscencia (permanecen unidos a la planta) (Eshbaugh, 1975). La morfología floral favorece la autopolinización y sus semillas presentan un aumento en la tasa de germinación (Paran y Van Der Knaap, 2007). Este conjunto de rasgos que diferencia a las plantas domesticadas de Chile de su ancestro silvestre son características típicas del “síndrome de domesticación” (Pickersgill, 2007). La variación entre las plantas domesticadas de Chile y su ancestro silvestre es el resultado de diferentes procesos de selección ambiental y artificial, además algunas variedades domesticadas presentan más de un centro de diversificación (González-Pérez et al., 2014).

Metabolómica en *Capsicum*

Se ha documentado que las plantas de *Capsicum annuum* son atacadas por varios herbívoros, entre ellos se ha reportado que se encuentran las larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:

Noctuidae), a pesar de no es frecuente, puede llegar a afectar el rendimiento en parcelas de chiles cultivados.

En *Capsicum annuum* se han realizado varios estudios para determinar el perfil metabolómico. Sin embargo, la mayoría están enfocados en los metabolitos del fruto, por la relevancia de la capsaicina y sus precursores que solo se sintetizan en el fruto (Tabla 1: Ver Chile serrano: Becerra-Martínez et al., 2017; Villa-Ruano et al., 2019). Hasta ahora sólo dos eran estudios metabolómicos en tejido foliar relacionados con la defensa de plantas de chile *C. annuum* (Maharijaya et al., 2019; Macel et al., 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Revisión de literatura, con el fin de sintetizar la información disponible sobre la metabolómica de esta especie (Figura 16 Anexo).

Factor estresante/herbívoro/comparación	Estructura de la cual se tomó la muestra	Referencia
Comparación entre tabaco silvestre y transgénico con un gen de <i>Capsicum</i>	Semilla	Becerra-Martínez et al. (2020)
Perfil metabolómico de <i>Capsicum annuum</i> cv. Mirasol infectado por <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i>	Fruto	Velásquez-Valle et al. (2020)
Efecto del bioestimulante comercial Actium® en hojas y frutos de <i>Capsicum annuum</i>	Hoja y fruto	Barraón-Catalán et al. (2020)
Estrés por calor	Hoja	Wang et al. (2019)
Detectar metabolitos relacionados con la resistencia a <i>Frankliniella occidentalis</i>	Hoja	Macel et al. (2019)
Caracterización fitoquímica de un híbrido entre <i>C. annuum</i> × <i>C. chinense</i> y su resistencia a <i>Frankliniella occidentalis</i>	Hoja	Maharijaya et al. (2019)
Perfil metabolómico del fruto de diez razas de <i>Capsicum annuum</i> cv. Serrano	Fruto	Villa-Ruano et al. (2019)
Perfil metabolómico de chiles sanos (cv. mirasol) y chiles infectados con el virus "beet mild curly top" para encontrar marcadores químicos asociados a la infección	Fruto	Villa-Ruano et al. (2018)
Perfil metabolómico de la variedad serrano, perteneciente a dos localidades diferentes (Oaxaca y Veracruz)	Fruto	Becerra-Martínez et al. (2017)
Caracterización de calidad del gochujang (pasta de chile fermentado) mediante el perfil metabolómico de <i>Capsicum annuum</i>	Fruto	Lee et al. (2016)
Caracterización metabolómica del pimiento picante <i>Capsicum annuum</i> cM334 durante diferentes etapas de desarrollo del fruto	Fruto	Jang et al. (2015)
Diversidad metabólica en frutos maduros de 32 líneas genéticas de <i>Capsicum sp.</i> , midiendo la composición de metabolitos semipolares y volátiles.	Fruto	Wahyuni et al. (2013b)

De los estudios enfocados en evaluar el metaboloma asociado a la resistencia contra los herbívoros, Maharijaya et al. (2019) caracterizaron los metabolitos de hojas de un híbrido derivado de cruces de *C. annuum* × *C. chinense* para conocer qué metabolitos podrían estar involucrados en la resistencia contra

los trips. Para ello cruzaron una accesión de *C. annuum* resistente a los trips como parental materno con una accesión susceptible de *C. chinense* como parental paterno. El estudio encontró una asociación entre la resistencia a los insectos herbívoros comúnmente llamados trips (*Frankliniella occidentalis*) y 23 metabolitos secundarios, como luteolin-metilO-di-hexosa, luteolina-hexaóxido, luteolina-di-hexósido, y otros compuestos que no se pudieron identificar. Los autores no lograron determinar con exactitud qué metabolitos están implicados en la resistencia contra los trips (Maharajaya et al., 2019). Además, este estudio combina dos especies y no está enfocado a entender los cambios en relación a los ancestros.

En el otro estudio, Macel et al. (2019) utilizaron la metabolómica no dirigida para encontrar los metabolitos secundarios de las hojas involucrados en la resistencia a los trips (*F. occidentalis*). En este estudio se encontró una correlación negativa entre la abundancia de monómeros capsinoides y dímeros capsinoides con la preferencia de los trips, así como varios glucósidos diterpénicos acíclicos, mientras que compuestos como el ácido clorogénico y los glucósidos de flavona se relacionaron con la susceptibilidad. Los autores encontraron una diferencia significativa en la preferencia de alimentación de los trips entre las diferentes líneas genéticas de *Capsicum* utilizadas (Macel et al., 2019).

De los dos estudios metabolómicos enfocados en los compuestos químicos de las hojas relacionados a la resistencia a herbívoros en *Capsicum annuum*. (Macel et al., 2019; Maharajaya et al., 2019), ninguno evaluó los perfiles metabolómicos foliares del ancestro silvestre. Por lo tanto, se desconoce si la domesticación ha modificado el metaboloma foliar asociado a la resistencia contra insectos. Además, no se ha considerado si la domesticación ha afectado la inducción de metabolitos cuando las plantas son dañadas por herbívoros, por lo que el estudio comparativo de la composición química entre los cultivares de *Capsicum annuum* var. *annuum* (serrano, güero, morrón y Yahualica) y su ancestro silvestre comúnmente conocido como chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*), con y sin inducción de la defensa química puede ayudar a determinar cómo la domesticación ha afectado los rasgos bioquímicos relacionados con la defensa contra insectos herbívoros.

1.2 Justificación

La mayor parte de los estudios para establecer los efectos de la domesticación en las plantas se basan en caracteres morfológicos (Bellota et al., 2013; Gong y Zhang, 2014; Zeder, 2017). Otros están enfocados en indicadores fitoquímicos y su relación con las interacciones ecológicas (Hernández-Cumplido et al., 2017;

Moreira et al., 2018; Batyrshina et al., 2020). Mientras que los estudios recientes se enfocan en determinar el perfil metabolómico del fruto de plantas de Chile (Villa-Ruano et al., 2019; Velásquez-Valle et al., 2020). Aunado a lo anterior, existe escasa información sobre el perfil metabolómico de las hojas de Chile (Wang et al., 2019; Barrajón-Catalán et al., 2020), y son pocos los estudios enfocados en los compuestos químicos de las hojas relacionados a la resistencia a herbívoros (Macel et al., 2019; Maharijaya et al., 2019). Por lo que el estudio comparativo de la composición química entre los cultivares de *Capsicum annuum* (serrano, güero, morrón y Yahualica) y el chiltepín (ancestro silvestre) *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* puede ayudar a determinar cómo la domesticación ha afectado los rasgos bioquímicos relacionados con la defensa contra insectos herbívoros y sus implicaciones evolutivas.

1.3 Hipótesis

Los cultivares de Chile *Capsicum annuum* (serrano, morrón, güero y Yahualica) han sido sometidos a selección artificial enfocada en el tamaño y sabor del fruto. Sin embargo, esta selección puede afectar de forma indirecta los caracteres químicos que pueden estar relacionados con la resistencia contra herbívoros o patógenos de las hojas. Por lo anterior, se encontrará una diferencia en la composición química foliar entre los cultivares y el chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la domesticación en la composición química foliar entre los cultivares de Chile mexicanos *Capsicum annuum* var. *annuum* y el chiltepín *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la composición química foliar de cuatro cultivares de *Capsicum annuum* var. *annuum* y el chiltepín *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.

-Evaluar si existe diferencia en los metabolitos secundarios con potencial en la resistencia contra herbívoros entre *Capsicum annum* var. *glabriusculum* y los cultivares de *Capsicum annum* var. *annuum*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Sistema de estudio

2.1.1 Condiciones de Crecimiento de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y distintos cultivares de *Capsicum annuum* var. *annuum*

Las semillas de los cultivares de chiles de la variedad *annuum* conocidas como serrano, güero y morrón, fueron compradas en un supermercado local, de la marca comercial Vita Rancho Los Molinos, S.A. de C.V. Mientras que las semillas de chiltepín *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y el chile de árbol con denominación de origen Yahualica (*C. annuum* var. *annuum*), se obtuvieron de la colección de germoplasma del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución de la Facultad de Ciencias, UABC.

Como tratamiento previo a la siembra de todas las semillas, se hidrataron durante 24 horas con excepción del de chile güero. Las semillas de chile güero se mantuvieron en una solución de ácido giberélico a 500 ppm durante 24 horas. Para la germinación, las semillas se sembraron en charolas de 50 pozos, se colocaron a medio centímetro de profundidad y se cubrieron con una capa de suelo. Una vez que las plántulas presentaron hojas verdaderas fueron trasplantadas a macetas de 2.5 L. Como sustrato de germinación y crecimiento se utilizó suelo estéril turba Berger B2 (Berger, Saint-Modeste, QB). Las plantas se mantuvieron dentro de una cámara de crecimiento del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución de la Facultad de Ciencias, UABC, bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se fertilizaron una vez a la semana a partir del trasplante con 50 mL de una solución de NPK (19-19-19, 2 gr/L). Se obtuvieron plantas de chiles domesticados de los cultivares serrano, Yahualica, morrón y güero; también se obtuvieron plantas de chiltepín (Tabla 2).

Tabla 2. Plantas obtenidas para el experimento de daño con *S. frugiperda* y la obtención de tejido foliar para la extracción de metabolitos.

Cultivar/variedad	Siembra	Germinación	Trasplante	Floración
Yahualica	15/09/20	25/09/20	30/09/20	26/11/20
Serrano	15/09/20	20/09/20	30/09/21	25/11/20
Chiltepín	10/09/20	15/09/20	30/09/20	04/12/20
Morrón	03/11/20	17/11/20	28/11/20	15/12/20
Güero	03/11/20	19/11/20	28/11/20	15/12/20

2.1.2 Condiciones de desarrollo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Para llevar a cabo el tratamiento de plantas con daño y examinar la respuesta de las plantas de Chile al ataque por herbívoros, se emplearon larvas de *S. frugiperda*, que es un herbívoro generalista de hábitos nocturnos comúnmente conocido como el cogollero del maíz (Montezano et al., 2018). Su ciclo de vida consiste en 6 estadios larvarios, pupa y adulto (Sparks, 1979). Tiene una distribución cosmopolita y es una de las polillas plaga más importantes de Norte América y Sudamérica (Luginbill, 1928; Ashley et al. 1989).

Para el experimento, larvas recién eclosionadas de *S. frugiperda* se mantuvieron en contenedores de plástico de 4 cm de diámetro y 3.5 cm de alto y se les proporcionó una dieta artificial, desde su eclosión hasta que alcanzaron el 3er estadio. Las larvas fueron criadas en el insectario del laboratorio de Genética ecológica y evolución de la Universidad Autónoma de Baja California bajo las siguientes condiciones: 25° C \pm 1 ° C, con una humedad relativa de 50% \pm 10 y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Para preparar 1 kg de dieta, se mezclaron los siguientes ingredientes en un recipiente de 2 L: 165 g de harina de maíz (Maseca), 44 g de levadura, 42 g de germen de trigo, 6 g de ácido ascórbico, 1.7 g de ácido benzoico. Además, se agregaron 4 pastillas de vitamina B12 (2.5 g), las cuales fueron previamente molidas con un mortero y pistilo. Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer de 1 L, se agregaron 15 g de agar Bacto y se añadieron 723.8 mL de agua. El agua con agar fue calentada por aproximadamente 3 minutos en un horno microondas hasta llegar al punto de ebullición. Posterior a esto, se agregó el resto de los ingredientes y se mezclaron hasta obtener una masa homogénea.

2.2 Tratamiento de daño por larvas de *Spodoptera frugiperda*

Para este experimento se llevó a cabo un tratamiento de daño foliar y un control. Para el tratamiento de daño, se utilizaron larvas de *S. frugiperda* en el tercer estado larvario (privadas de alimento durante 24 horas previas al tratamiento), 3 plantas de chiltepín, 3 de serrano, 3 de Yahualica, 3 de güero y 3 de morrón. Para el control se usaron 3 plantas sin daño de cada uno de los cultivares y el chiltepín, obteniendo un total de 30 plantas. A cada planta asignada al tratamiento de daño, se le colocó una jaula tipo clip (clip-cage) de 3.5 cm de diámetro con dos larvas en el tercer estadio de *S. frugiperda* dentro. La jaula con los insectos se colocó en la 5ta hoja verdadera de las plantas. Se utilizaron jaulas de clip para evitar que las larvas se movieran a otra hoja o provocarán un daño excesivo en la hoja muestreada. Las larvas se dejaron dentro de la jaula por 1 h (Figura 1). A las plantas del tratamiento control (sin daño) se les colocó la jaula

de clip sin herbívoro una hora antes de la recolecta para simular la misma condición. Todas las plantas sometidas al tratamiento de daño por larvas de *S. frugiperda*, mostraron daño foliar después de una hora (Figura 2).



Figura 1. Jaulas de clip con larvas de *S. frugiperda* en planta de chile para el tratamiento de daño.



Figura 2. Hojas con daño foliar provocado por la larva de *S. frugiperda*.

2.3 Perfil de los metabolitos

2.3.1 Obtención de muestras de tejido de hojas de *Capsicum annuum*

Para determinar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de chile se utilizó el método de metabolómica no dirigida (Gevi et al., 2019). Se recolectó tejido proveniente de la quinta hoja de cada uno de los cultivares y de chiltepín, utilizando la misma hoja del tratamiento de daño con *S. frugiperda* y sin daño en el caso de los controles (solo se usó el tejido que no estuvo en contacto con el insecto para evitar contaminación). Se tomó la hoja tratada (donde se colocó la clip-cage) de cada una de las tres réplicas por variedad, dando 3 muestras de planta con daño por variedad y 3 controles, en total fueron 30 muestras.

Después de 1 hora con las clip-cage se cortó el área foliar que tuvo contacto con la clip-cage y se utilizó el resto del foliar desde la base de la hoja, las hojas se cortaron de la planta con un bisturí, fueron lavadas con agua grado HPLC y secadas con kimwipes KIMTECH®. Después, las hojas fueron maceradas en un mortero con nitrógeno líquido utilizando un pistilo hasta obtener un polvo fino. Una vez molido, se pesó el tejido para obtener aproximadamente 50 mg de tejido vegetal en una Balanza de Precisión Mettler Toledo modelo MS204S. El tejido macerado se colocó dentro de un tubo Eppendorf preenfriado y etiquetado con el nombre de la variedad o cultivar, tratamiento y número de muestra. Para evitar contaminación, la espátula, el bisturí, el mortero y el pistilo fueron lavados con alcohol al 70% y enjuagados con agua grado HPLC tres veces. Todas las muestras fueron almacenadas en un ultracongelador a -80 °C.

2.3.2 Extracción de metabolitos

Se utilizaron 30 muestras de tejido foliar con aproximadamente 50 mg de tejido foliar para llevar a cabo la extracción de metabolitos. Primeramente, se liofilizaron las muestras molidas de tejido foliar para evitar posibles errores por la diferencia de peso de las muestras de tejido. Después se pesaron alrededor de 5 mg de los liofilizados de las muestras y se agregó la mezcla de metanol (MetOH): agua (H₂O) (80:20) hasta obtener una concentración final de [1mg/100µL]. Se dejaron macerar en sonicación durante 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y se transfirieron 350 µL del sobrenadante en un nuevo tubo cónico de 1.5 mL. El sobrenadante se secó utilizando un speedvac. Se añadieron 500 µL de fase móvil agua (H₂O): Acetonitrilo (ACN) (95:5) + 0.1% ácido fórmico (FA) a los tubos secos. Nuevamente se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A continuación, se transfirieron 10 µL del sobrenadante a tubos cónicos de 1.5 mL que contenían previamente 90 µL de fase móvil H₂O: ACN (95:5) + 0.1% FA y se centrifugaron una vez más a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se transfirieron 50 µL del sobrenadante a un vial de inyección. También se prepararon 4 controles de calidad, que consistieron en una mezcla de alícuotas de todas las muestras de tejido foliar. Se obtuvieron un total de 34 viales para el análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas.

2.3.3 Análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas

Para realizar este análisis se calibró el equipo (Espectrómetro de masas Agilent 6530A Q-TOF LC/MS (Quadrupole Time Of Flight a través de la interfaz Chip Cube-CL). Se utilizaron las disoluciones obtenidas

en la extracción de metabolitos. Además, se preparó un vial con 200 μ L de fase móvil como control. La separación de las moléculas se realizó a través de una columna ProtID-Chip-43 II (C18, 43 mm, 300 Å, tamaño de partícula de 5 μ m, equipado con una columna de enriquecimiento de 40 nL). El volumen de inyección de las muestras fue de 0.5 μ L. Las fases móviles fueron H₂O con 0.1% de Ácido Fórmico (FA) como disolución A y Acetonitrilo (ACN) con 0.1% de FA como disolución B. El flujo de las fases móviles fue de 0.3 μ L/min y las condiciones cromatográficas optimizadas fueron las siguientes: 1-20 min, A: 95-60%, B: 5.0-40%; 20-25 min, A: 60-0.0%, B: 40-100%; 25-30 min, A: 0.0-0.0%, B:100-100%; 30-31 min, A: 0.0-95%, B:100-5.0%; 31-32 min, A: 95-95%; B:5.0-5.0%, regresando a las condiciones iniciales. El tiempo total de la corrida fue de 40 minutos incluyendo el re-equilibrio de la columna a las condiciones iniciales. Las moléculas eluidas se introdujeron a un espectrómetro de masas Agilent 6530A Q-TOF (Quadrupole Time-Of-Flight) a través de la interfaz Chip Cube-CL. Los espectros fueron adquiridos de manera MS/MS automático dependiente de datos y en modo positivo. Para los MS1 el rango de masa fue de 110-2000 m/z a una velocidad de 4 espectros/s. Un máximo de 5 iones precursores fue seleccionado para cada ciclo de MS/MS con exclusión activa después de 2 espectros. Las energías de colisión se calcularon con base en la ecuación $CE = [(3.7 \times m/z) / 100] + 2.5$. Se estableció la temperatura de la fuente de gases en 325 °C y el flujo de gas en 5 L/min. El equipo se calibró cada día de análisis con la finalidad de garantizar una precisión de masa <5 ppm. Para generar la biblioteca espectral (anotación de los metabolitos) se usaron tres réplicas nuevas del control de calidad obtenido en la extracción de metabolitos. Se optimizaron los parámetros de adquisición del equipo con el objetivo de generar más iones con espectros de fragmentación (MS2). Cambiando la velocidad de escaneo a 4 espectros/segundo en el MS1 y a 3 espectros/segundo para el MS2, el resto de los parámetros se mantuvieron igual que el experimento anterior.

2.4 Análisis de datos

2.4.1 Procesamiento de los datos

Los archivos generados en el análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se exportaron en el formato universal mzML. Después se utilizaron para la detección de masas, construcción de picos y deconvolución de los cromatogramas (para separar los picos individualmente); para la asignación isotópica, alineación de los picos y rellenado de huecos (para detectar picos perdidos en la alineación anterior) se utilizó el software MZmine 2 siguiendo la metodología de Pluskal et al. (2010).

Finalmente se exportaron los archivos que tenían los picos, los cuales contenían las tablas con el tiempo de retención, relación masa/carga (m/z), área de los picos y los ID para realizar los análisis posteriores.

2.4.2 Anotación de metabolitos

Para la identificación de los metabolitos se utilizaron los archivos crudos en formato mzML de tres muestras obtenidas a partir de la mezcla del control de calidad, con parámetros optimizados. En primer lugar, se creó un archivo de texto (.txt) con ayuda del Bloc de notas, el cual contiene los metadatos de las muestras (Figura 17 anexos). A continuación, se realizó una cuenta en “The Global Natural Product Social Molecular Networking” (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>) la cual permite el almacenamiento y análisis de espectros MS/MS utilizando bibliotecas libres para la anotación de compuestos (Wang et al., 2016). Se procedió a cargar los archivos obtenidos en MZmine 2 y metadatos utilizando el Software WinSCP. Después se accedió a GNPS y se utilizó el método METABOLOMICS-SNETS-V2. Se cargaron los archivos previamente almacenados con ayuda de WinsSCP. Se asignó un nombre al trabajo y se procedió a cargar los datos separados en dos grupos: en el grupo 1 (G1) se cargaron los espectros de las muestras de tejido foliar y los controles de calidad, mientras que en el grupo 6 (G6) se cargaron las fases móviles. Los datos se filtraron para remover los iones de fragmentos MS/MS con una carga de iones precursores m/z entre ± 17 Da. La tolerancia de masa de iones precursores y de fragmentos MS/MS fue de 0.02 Da. Para crear la red se estableció una puntuación de coseno mayor a 0.7 con 4 picos de similitud. Asimismo, el borde de dos nodos en la red se mantuvo sólo si ambos nodos se encontraban dentro de los nodos con mayor similitud del otro. Por último, el tamaño máximo de familias moleculares se determinó en 100. A continuación, se realizó la búsqueda de espectros de la red en las bibliotecas espectrales de GNPS. Los espectros de la biblioteca utilizaron los mismos parámetros de filtrado que los datos de entrada. Todas las coincidencias entre los espectros de la red y los de la biblioteca tuvieron una puntuación mayor a 0.7 y con al menos 4 picos de similitud (Scheubert et al., 2017; Wang et al., 2016), se siguió el protocolo de Aron et al. (2020).

2.4.3 Análisis Estadístico

Se utilizó la tabla de cuantificación obtenida en Mzmine 2, con algunas modificaciones (Figura 18 anexo) y se importó al software MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). Se utilizó una prueba de

Wilcoxon para probar si hay diferencias significativas en las señales entre los cultivares y el chiltepín y un diagrama de dispersión (diagrama de volcán) para identificar cambios en la expresión de las señales en el conjunto de datos (señales significativamente reguladas al alza y a la baja). Para llevar a cabo la prueba de Wilcoxon y el diagrama de volcán, se filtraron los datos usando la desviación estándar relativa del control de calidad (desviación estándar/media) con un umbral del 25% y un filtrado basado en rango intercuantil para reducir la carga computacional del servidores. Se retiraron las muestras de control de calidad y se hizo una normalización por cuantil de los datos.

Para realizar el análisis de componentes principales y mapas de calor, se llevó a cabo una normalización por cuantiles de los datos y una conversión logarítmica, utilizando los mismos parámetros de filtrado que el análisis anterior (Figura 19 y 20 anexo). Además, en el análisis se incluyeron los datos obtenidos del control de calidad el cual consiste en una mezcla proporcional de todas las muestras, del mismo modo las muestras con y sin daño se encontraban agrupadas dentro de un intervalo del 95% de confianza. Enseguida se realizó un análisis de agrupación jerárquica (mapa de calor) para corroborar los resultados obtenidos en el PCA utilizando los siguientes parámetros: distancia Euclidiana, el algoritmo utilizado fue Ward (Figura 21 anexo). Se usaron los datos normalizados y se llevó a cabo una estandarización. Para llevar a cabo estos análisis se siguió el protocolo básico 1 y 3 de Chong et al. (2019).

2.4.4 Diferencias en el número de metabolitos únicos y compartidos entre los cultivares y el chiltepín

Se realizaron diagramas de Venn utilizando los datos obtenidos en el preprocesamiento con MZmine 2 para comparar metabolitos entre los cultivares (serrano, morrón, Yahualica y güero) y el chiltepín con y sin daño. Se descartaron las señales que estaban ausentes en las tres réplicas de una muestra (abundancia = 0). Del mismo modo, se realizó un diagrama de Venn para comparar la defensa constitutiva e inducida de cada cultivar y el chiltepín. Los diagramas de Venn se hicieron utilizando la plataforma en línea InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/>) (Heberle et al. 2015).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Diferencias entre los cultivares y el chiltepín

El resumen del procesamiento de datos para evaluar si hay diferencias entre los cultivares y el chiltepín, mostró que las 5508 señales obtenidas en el preprocesamiento de los datos con MZmine 2 se encuentran ampliamente distribuidas entre las muestras (Tabla 3). Además, se evaluaron las diferencias entre las señales en plantas con y sin ataque por herbívoros. Se encontró que, en general, hay un aumento en el promedio de las señales en los tratamientos con daño en comparación con el control sin daño en los cultivares y el chiltepín, con excepción del cultivar güero. No se utilizó el control de calidad 1 (QC1) debido a que mostró valores atípicos.

Tabla 3. Resumen de los resultados del procesamiento de datos. CCD: chiltepín con daño, CSD: chiltepín sin daño, GCD: güero con daño, GSD: güero sin daño, MCD: morrón con daño, MSD: morrón sin daño, SCD: serrano con daño, SSD: serrano sin daño, YCD: Yahualica con daño, YSD: Yahualica sin daño, QC: Control de calidad. N/A: no aplica.

Muestra	Señales (positivo)	Promedio de señales por tratamiento
CSD1	4988	5071
CSD2	5141	
CSD3	5086	
CCD1	4978	5093
CCD2	5194	
CCD3	5109	
YSD1	5133	5141
YSD2	5236	
YSD3	5054	
YCD1	5172	5169
YCD2	5143	
YCD3	5191	
SSD1	4666	4954
SSD2	5104	
SSD3	5091	
SCD1	5073	5184
SCD2	5260	
SCD3	5219	
GSD1	5222	5229
GSD2	5204	
GSD3	5263	
GCD1	4055	4326
GCD2	4282	
GCD3	4643	

MSD1	4715	
MSD2	4944	
MSD3	4964	4875
MCD1	4965	
MCD2	4943	
MCD3	4948	4952
QC1	N/A	N/A
QC4	5216	
QC3	5000	
QC2	4943	5053

3.1.1 Diferencias en las señales entre los cultivares y el chiltepín

Para probar si hay diferencias significativas entre las señales presentes en los cultivares y el chiltepín, así como identificar cambios en la expresión de las señales del conjunto de datos, se realizó una prueba de Wilcoxon y un gráfico de volcán, respectivamente. Después de realizar los filtrados y la normalización se utilizaron 1393 señales para la prueba de Wilcoxon. Se encontraron 185 señales significativas entre el chiltepín y los cultivares sin daño ($P < 0.05$) (Figura 3).

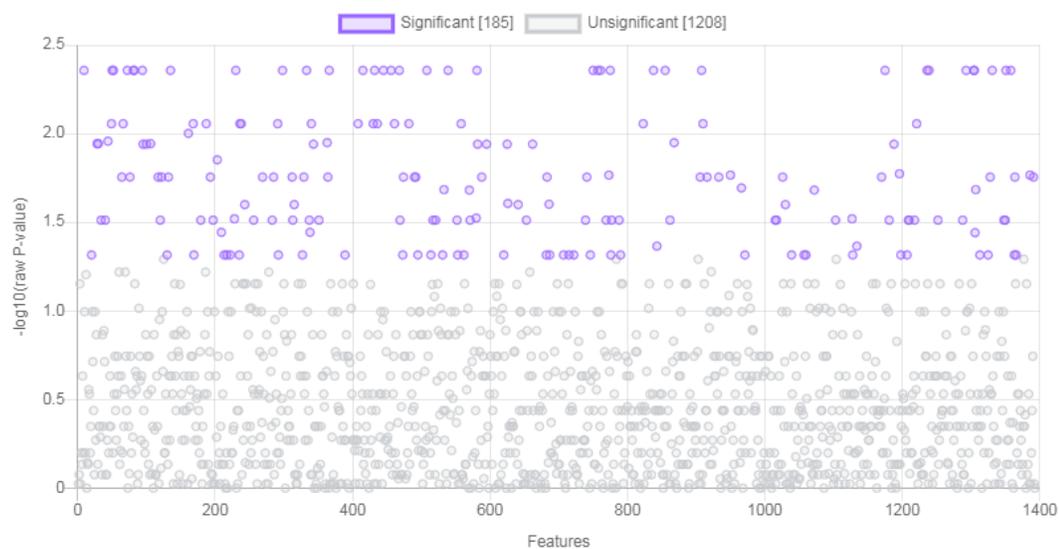


Figura 3. Señales que muestran diferencias significativas entre el chiltepín y los cultivares sin daño. (Prueba de Wilcoxon $P < 0.05$). Círculos morados: Señales por encima del umbral. Los valores de p se transforman mediante $-\log_{10}$ para que los valores más significativos (valores de p más pequeños) se tracen más arriba en el gráfico.

En el gráfico de volcán se encontraron 91 señales significativamente reguladas al alza y 92 señales a la baja entre la variedad silvestre “chiltepín” y los cultivares serano, morrón, Yahualica y güero (Figura 4).

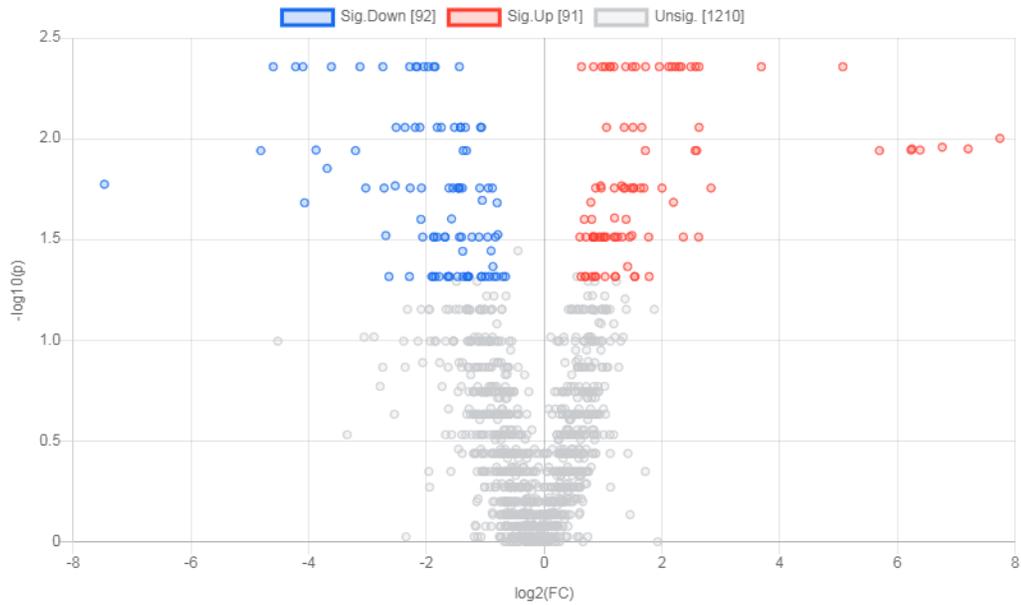


Figura 4. Señales reguladas al alza y a la baja entre el chiltepín y los cultivares sin daño. Umbral de cambio (x):1,5. Umbral de pruebas t (y): $P < 0.05$. Círculos rojos y azules: picos por encima del umbral. Rojo: expresados al alza. Azul: expresados a la baja. El umbral de cambio y los valores de p se transformaron logarítmicamente. Cuanto más alejada de (0,0), más significativa será la característica.

Después de realizar los filtrados y la normalización se utilizaron 1394 señales en muestras con daño para realizar la prueba de Wilcoxon. Encontrando 241 señales significativas ($P < 0.05$) entre el chiltepín y los cultivares con inducción de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Figura 5).

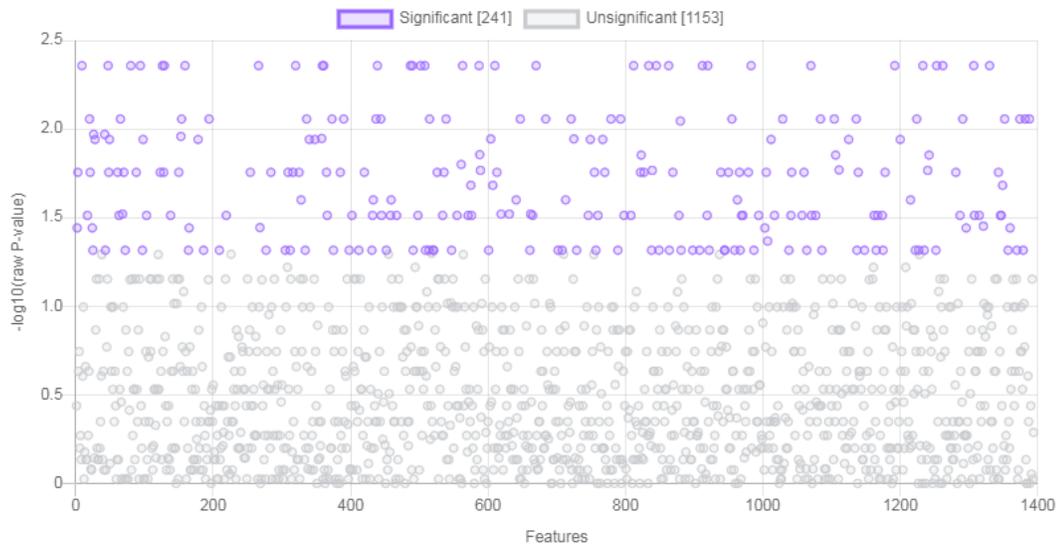


Figura 5. Señales que muestran diferencias significativas entre el chiltepín y los cultivares con tratamiento de daño. (Prueba de Wilcoxon $P < 0.05$). Círculos morados: Señales por encima del umbral. Los valores de p se transforman mediante $-\log_{10}$ para que los valores más significativos (valores de p más pequeños) se tracen más arriba en el gráfico.

Se encontró un mayor número de señales reguladas al alza después de la inducción con larvas de *Spodoptera frugiperda* entre la variedad silvestre “chiltepín” y los cultivares serrano, güero, Yahualica y morrón. En el gráfico de volcán se encontraron 146 señales significativamente reguladas al alza y 85 señales significativamente reguladas a la baja ($P < 0.05$) (Figura 6).

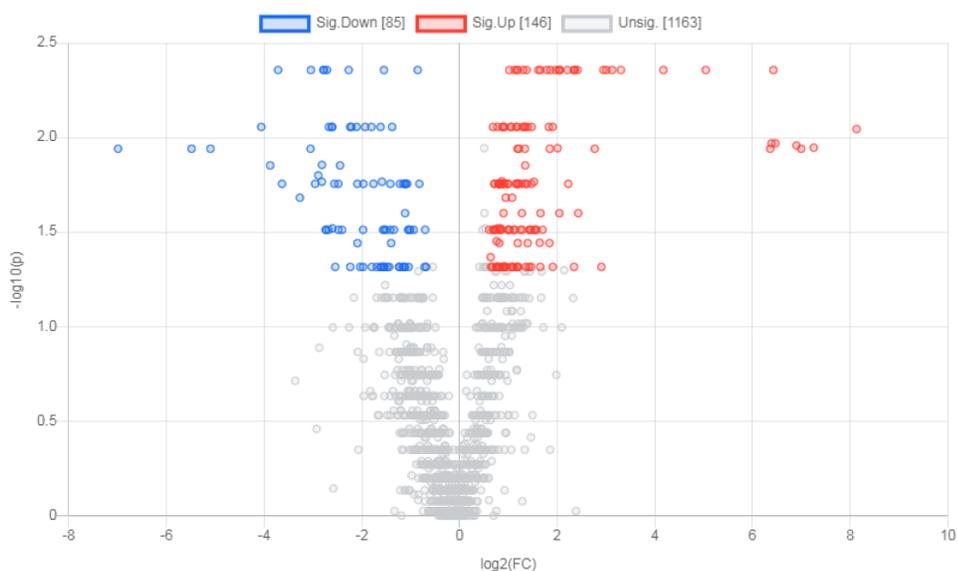


Figura 6. Señales reguladas al alza y a la baja entre el chiltepín y los cultivares con tratamiento de daño. Umbral de cambio (x):1,5. Umbral de pruebas t (y): $P < 0.05$. Círculos rojos y azules: picos por encima del umbral. Rojo: expresados al alza. Azul: expresados a la baja. El umbral de cambio y los valores de p se transformaron logarítmicamente. Cuanto más alejada de (0,0), más significativa será la característica.

3.1.2 Efecto de la domesticación en la composición química foliar

Para la determinar la agrupación del chile silvestre y de los cultivares de acuerdo a su similitud química se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), incluyendo los datos con y sin daño (Figura 7). Las muestras del control de calidad (QC) se agrupan cerca del centro gráfico, indicando confiabilidad análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas. Las muestras con y sin daño se encuentran agrupadas dentro de elipses del 95% de confianza.

Se encontró que el componente principal 1 (PC1) explica el 27.7% de la varianza de los datos, mientras que el componente principal 2 (PC2) explica el 14.1%, y en conjunto acumulan el 41.8% de la varianza explicada (Figura 22 anexo). El análisis muestra una separación entre los perfiles metabolómicos de los cultivares y el chiltepín independientemente del tratamiento de daño. El chile silvestre “chiltepín” forma un grupo único que se agrupa en el cuadrante A. Las variedades serrano sin daño, Yahualica con y sin daño se encuentran en el cuadrante C. Serrano con daño y güero sin daño están en el cuadrante B. Por último,

morrón con ambos tratamientos y güero con daño se agrupan en el cuadrante D. Los resultados indican que existe una mayor similitud en la composición química, entre los cultivares serrano y güero que entre tratamientos (con y sin daño).

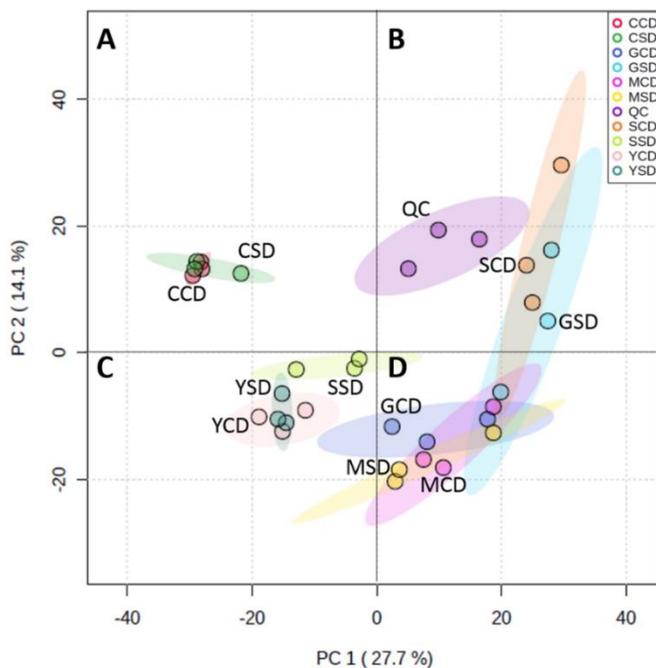


Figura 7. Análisis de componentes principales del metaboloma constitutivo e inducido. CCD: chiltepín con daño, CSD: chiltepín sin daño, GCD: güero con daño, GSD: güero sin daño, MCD: morrón con daño, MSD: morrón sin daño, SCD: serrano con daño, SSD: serrano sin daño, YCD: Yahuatl con daño, YSD: Yahuatl sin daño, QC: Control de calidad.

3.1.3 Efecto de la domesticación en el metaboloma constitutivo

Por otra parte, se realizó un PCA para observar cómo se agrupa el chiltepín y los cultivares por su metaboloma constitutivo (sin daño con *S. frugiperda*) (Figura 8). Se encontró que el PC1 explica el 23.2% de la varianza esperada y el PC2 el 12.6%, en conjunto tienen una varianza acumulada de 35.8%. Se puede observar un grupo definido para cada variedad. El chiltepín (CSD) se encuentra más cerca de los cultivares, serrano (SSD) y Yahuatl (YSD), mientras que el Chile güero (GSD) y morrón (MSD) se encuentran separados del resto.

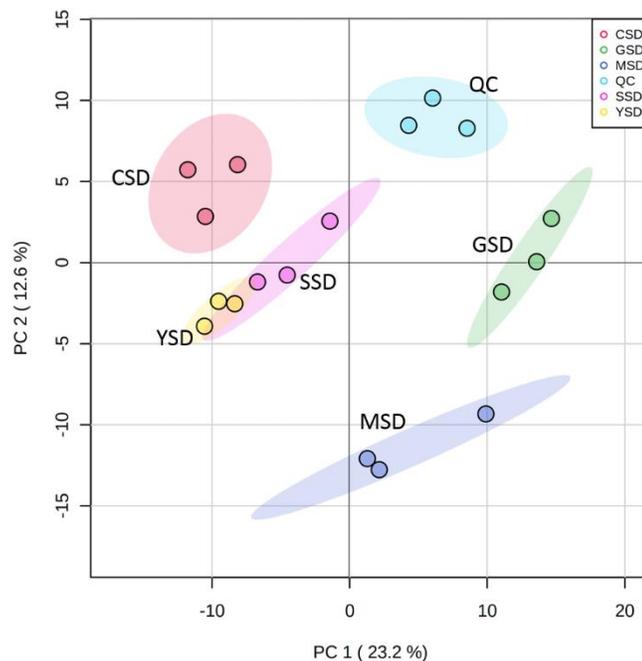


Figura 8. Análisis de componentes principales del metaboloma constitutivo (sin daño). CSD: chiltepín sin daño, GSD: güero sin daño, MSD: morrón sin daño, SSD: serrano sin daño, YSD: Yahualica sin daño.

3.1.4 Efecto de la domesticación en el metaboloma inducido

Se realizó un PCA con el tratamiento de daño para observar las agrupaciones del metaboloma inducido (Figura 9). El resultado mostró que los dos primeros componentes explican el 38.2% de la varianza. El componente principal 1 explica el 24.6% y CP2 explica 13.6% de la varianza. Este análisis agrupa al chiltepín (CCD) y al cultivar Yahualica (YCD) se encuentran agrupados cerca, del mismo modo que el tratamiento sin daño. El chile serrano se encuentra más cerca del chile morrón y güero, mostrando más similitud en la expresión de sus compuestos involucrados en la respuesta de defensa inducida por *S. frugiperda*. El chile morrón (MCD) y güero (GCD) se encuentran agrupados y segregados claramente del chiltepín y de yahualica, y parcialmente de la variedad serrado (SCD).

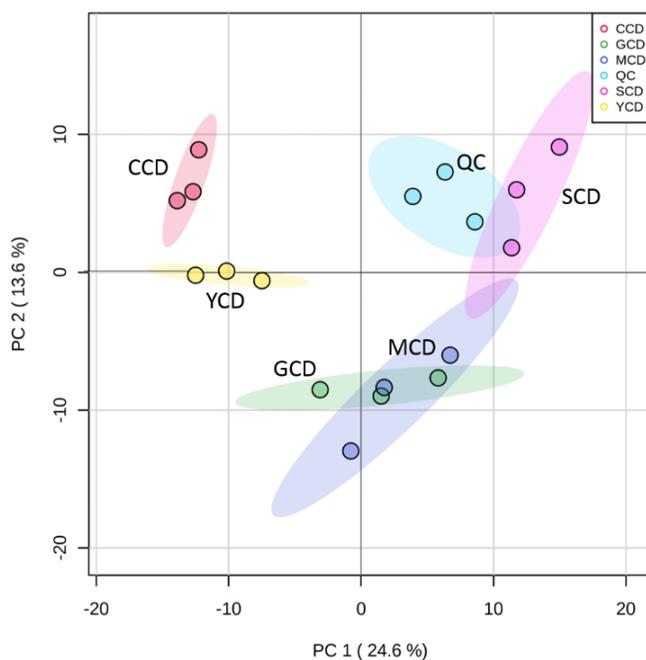


Figura 9. Análisis de componentes principales del metaboloma inducido (con daño). Eje (X) componente principal 1. Eje (Y) componente principal 2. CCD: chiltepín con daño, GCD: güero con daño, MCD: morrón con daño, SCD: serrano con daño, YCD: Yahualica con daño.

3.1.5 Patrón de expresión del metaboloma constitutivo e inducido

Con los datos del metaboloma se realizó un análisis de agrupación jerárquica, y un mapa de calor para detectar patrones de expresión de los metabolitos entre el chiltepín y los cultivares y agruparlos por su similitud. El análisis de agrupación jerárquica con todos los datos mostró dos grupos distintivos, en el grupo A: se encuentran los subgrupos A1: chiltepín, A2: serrano, Yahualica con y sin daño, dentro de este subgrupo se encuentra el grupo A3: Yahualica con y sin daño. Por otra parte, en el grupo B se encuentra serrano con daño, dentro de este grupo hay 3 subgrupos donde se encuentran los cultivares morrón y güero con y sin daño. Las agrupaciones corresponden con las encontradas en el PCA, además se observaron diferencias en los patrones de expresión en el mapa de calor, entre el grupo A y B (Figura 10).

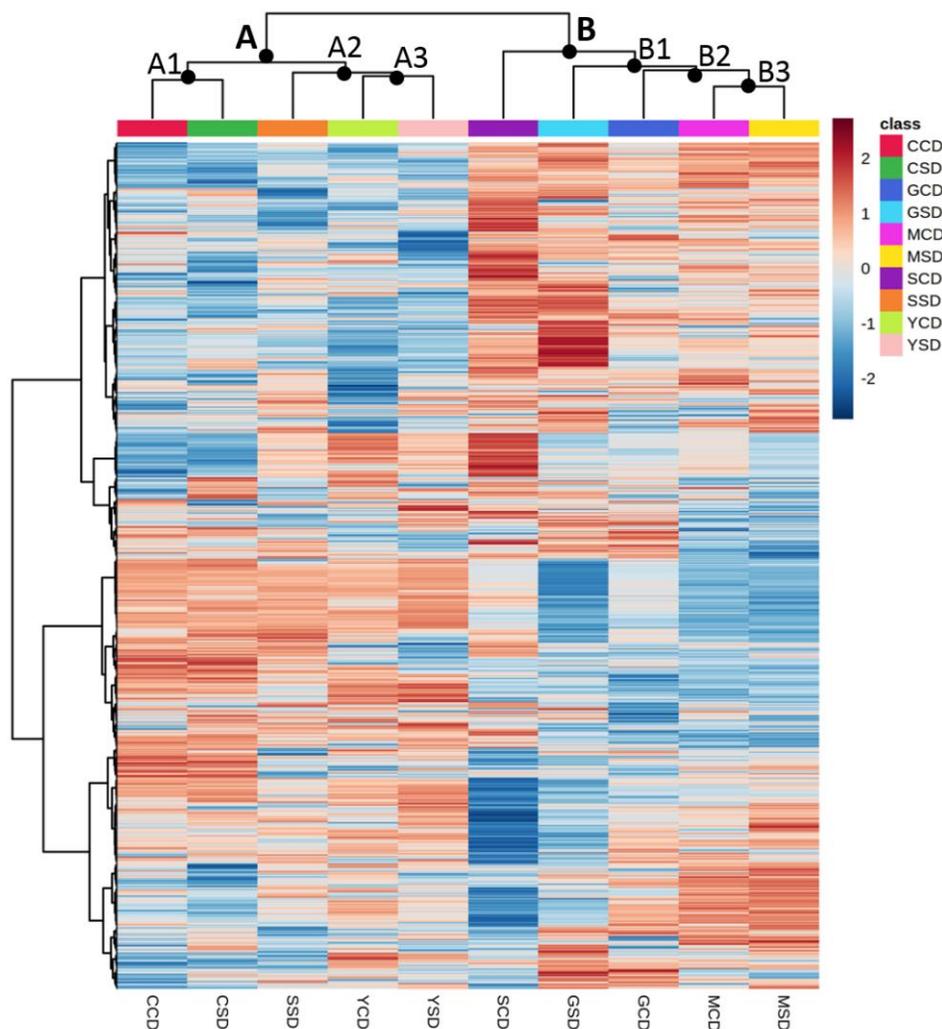


Figura 10. Mapa de calor del metaboloma constitutivo e inducido. Se utilizaron los datos normalizados con el algoritmo de agrupación Ward y la medida de distancia euclidiana. Dendrograma superior: agrupación entre variedades. Dendrograma de la izquierda: familias de compuestos. La matriz de rojos y azules representa los valores medios de abundancia relativa del metabolito de tres réplicas biológicas. CCD: chiltepín con daño, CSD: chiltepín sin daño, GCD: güero con daño, GSD: güero sin daño, MCD: morrón con daño, MSD: morrón sin daño, SCD: serrano con daño, SSD: serrano sin daño, YCD: Yahualica con daño, YSD: Yahualica sin daño.

3.1.6 Diferencias en el patrón de expresión del metaboloma constitutivo

En el mapa de calor muestra un patrón diferenciado para cada cultivar y el chiltepín (Figura 18). El análisis de agrupación jerárquica muestra tres grupos distintivos de acuerdo a la similitud de su metaboloma, en el grupo A se encuentra el chiltepín, y en el subgrupo A1 se encuentran Yahualica y serrano. Mientras que los cultivares güero y morrón se encuentran en el grupo B (Figura 11).

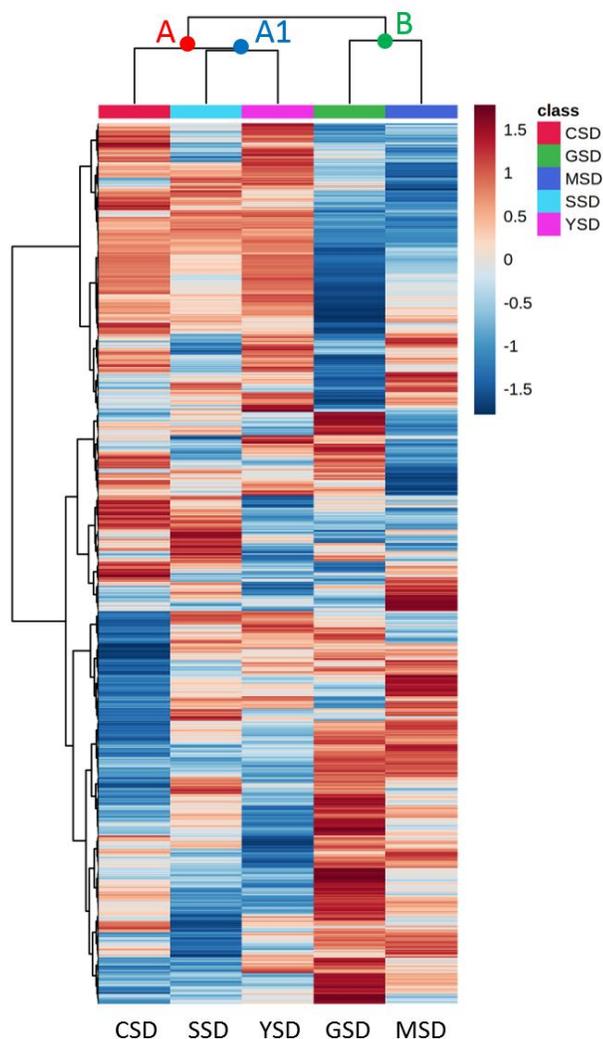


Figura 11. Mapa de calor del metaboloma constitutivo. Se utilizaron los datos normalizados con el algoritmo de agrupación Ward y la medida de distancia euclidiana. Dendrograma superior: agrupación entre variedades. Dendrograma de la izquierda: familias de compuestos. La matriz de rojos y azules representa los valores medios de abundancia relativa del metabolito de tres réplicas biológicas. CSD: chiltepin sin daño, GSD: güero sin daño, MSD: morrón sin daño, SSD: serrano sin daño, YSD: Yahualica sin daño.

3.1.7 Diferencias en el patrón de expresión del metaboloma inducido con *Spodoptera frugiperda*

El dendrograma obtenido por el análisis de agrupación jerárquica muestra tres grupos distintivos de acuerdo a su similitud en la expresión de metabolitos, el grupo C incluye al chiltepin y al chile Yahualica, mientras que el grupo D está conformado por el chile serrano, morrón y güero. Sin embargo, el chile güero y morrón se encuentran agrupados en el subgrupo D1 (Figura 12).

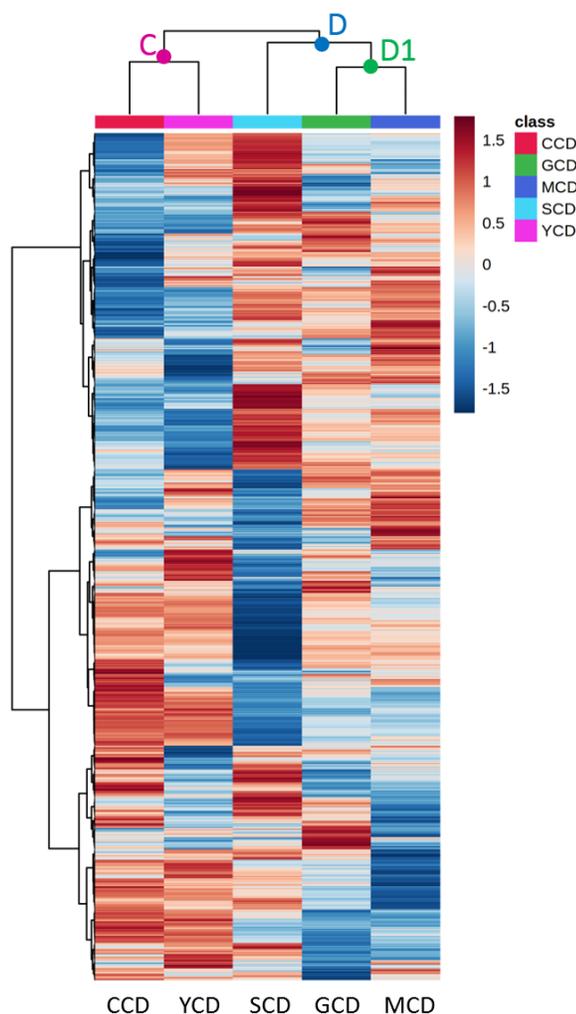


Figura 12. Mapa de calor del metaboloma inducido con daño de *Spodoptera frugiperda*. Se utilizaron los datos normalizados con el algoritmo de agrupación Ward y la medida de distancia euclidiana. Dendrograma superior: agrupación entre variedades. Dendrograma de la izquierda: familias de compuestos. La matriz de rojos y azules representa los valores medios de abundancia relativa del metabolito de tres réplicas biológicas. CCD: chiltepín con daño, GCD: güero con daño, MCD: morrón con daño, SCD: serrano con daño, YCD: Yahualica con daño.

3.2 Diferencias en el número de metabolitos únicos y compartidos

3.2.1 Metabolitos secundarios constitutivos únicos y compartidos entre los cultivares y el chiltepín

Los diagramas de Venn se elaboraron con los datos de las señales de las muestras que tenían un valor de abundancia diferente a cero en al menos una de sus tres replicas. Con este análisis se encontraron las señales que solo estaban presentes en cada cultivar o en el chiltepín, además de saber cuántas señales se

encuentran compartidas. Los cultivares y el chiltepín compartieron 4867 metabolitos. Individualmente, el chiltepín presentó un total de 5337, Yahualica 5270, serrano 5261, morrón 5204 y güero 5008 metabolitos (señales potencialmente identificables). Se encontró que 53 metabolitos sólo estaban presentes en chiltepín sin daño, seguido de 13 en Chile serrano, 6 para güero y morrón y 5 en Yahualica (Figura 13). El Chile Yahualica y serrano compartieron un mayor número de metabolitos con el chiltepín, con 35 y 33, respectivamente.

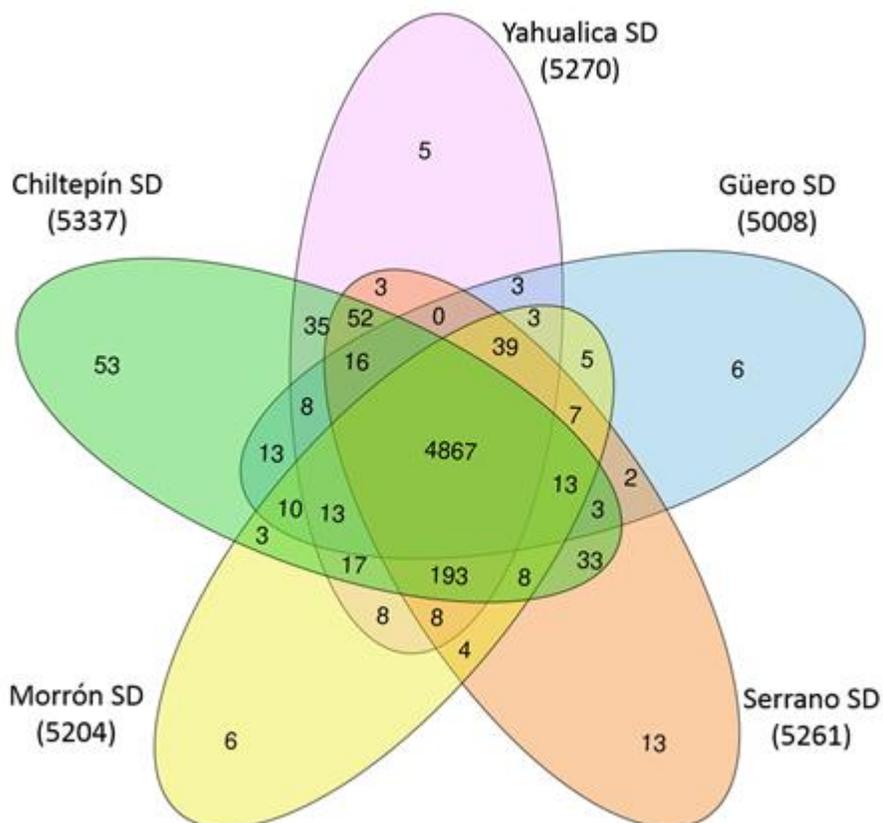


Figura 13. Diagrama de Venn de las señales únicas y compartidas entre los cultivares serrano, Yahualica, morrón, güero y el chiltepín sin tratamiento de daño. SD: Sin daño.

3.2.2 Metabolitos secundarios inducidos únicos y compartidos entre los cultivares y el chiltepín

Se realizó un diagrama de Venn para comparar el número de metabolitos compartidos y únicos entre los cultivares y el chiltepín con inducción de la defensa por *S. frugiperda*. Los cultivares y el chiltepín compartieron 4702 metabolitos, 165 metabolitos menos que en el metaboloma constitutivo (sin daño). El chiltepín mostró un mayor número de metabolitos (5349), seguida de Yahualica 5319, morrón 5178, güero

5153 y serrano 4860. Además, de los metabolitos únicos en cada cultivar y en el chiltepín, el cual mostró un mayor número con 68 metabolitos únicos seguido de Yahualica con 13, serrano y güero con 7 y morrón con 5 (Figura 14). Del mismo modo que en el tratamiento sin daño, el cultivar Yahualica comparte un mayor número de metabolitos (71) con el chiltepín, seguido del chile serrano con 11 metabolitos compartidos con chiltepín.

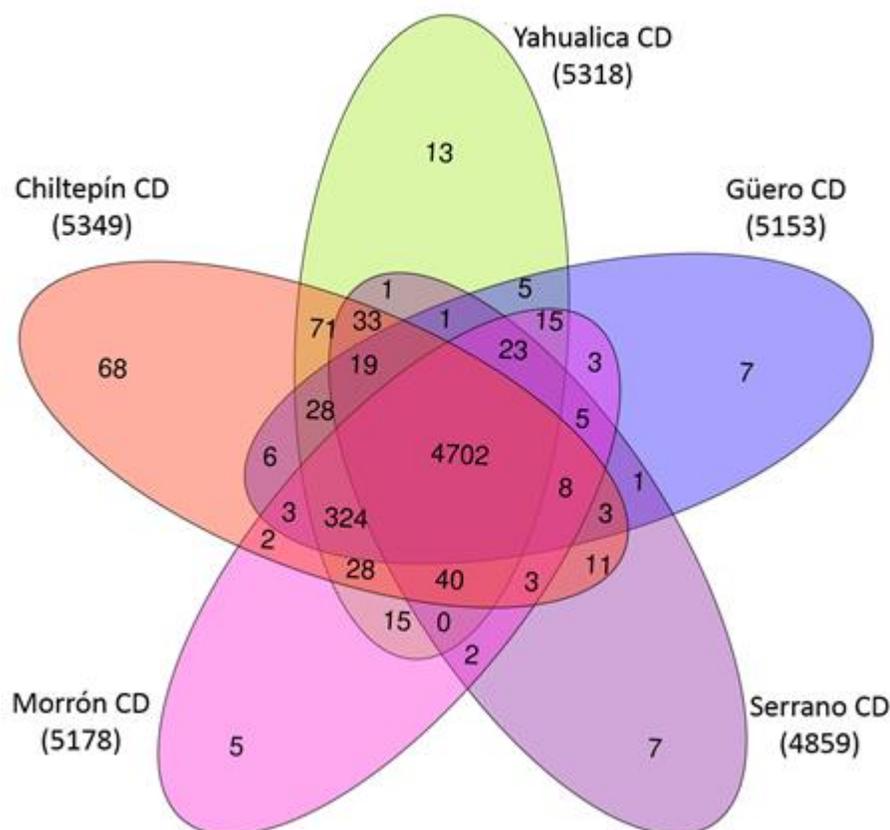


Figura 14. Diagrama de Venn de las señales únicas y compartidas entre los cultivares serrano, Yahualica, morrón, güero y el chiltepín con tratamiento de daño. CD: Con daño.

3.2.3 Metabolitos únicos y compartidos entre el metaboloma constitutivo e inducido

Se llevaron a cabo diagramas de Venn para determinar el número de metabolitos que varían entre la composición química constitutiva (sin daño) y la inducida (con daño). Al comparar cada cultivar con y sin tratamiento de daño, se encontraron diferencias en el número de metabolitos únicos y compartidos. El chiltepín comparte 5286 metabolitos entre ambos tratamientos (Figura 15A), además 51 metabolitos se encuentran únicamente en muestras sin daño y 63 metabolitos con daño, difiriendo $\approx 1\%$ entre

tratamiento. Los cultivares morrón y güero sin daño, así como Yahualica con daño presentan 1.5% de metabolitos únicos (Figuras 15B, D y E). Por otra parte, el cultivar serrano tiene el mayor número de metabolitos únicos en el tratamiento sin daño, con un total de 437 (8%), que contrasta con las 35 (<1%) del tratamiento con daño. De forma similar, el chile güero difiere en sus metabolitos entre los tratamientos, pero en este caso el tratamiento con daño tiene un mayor número de metabolitos únicos con 220 que representan el 4% de los metabolitos totales (Figura 15E).

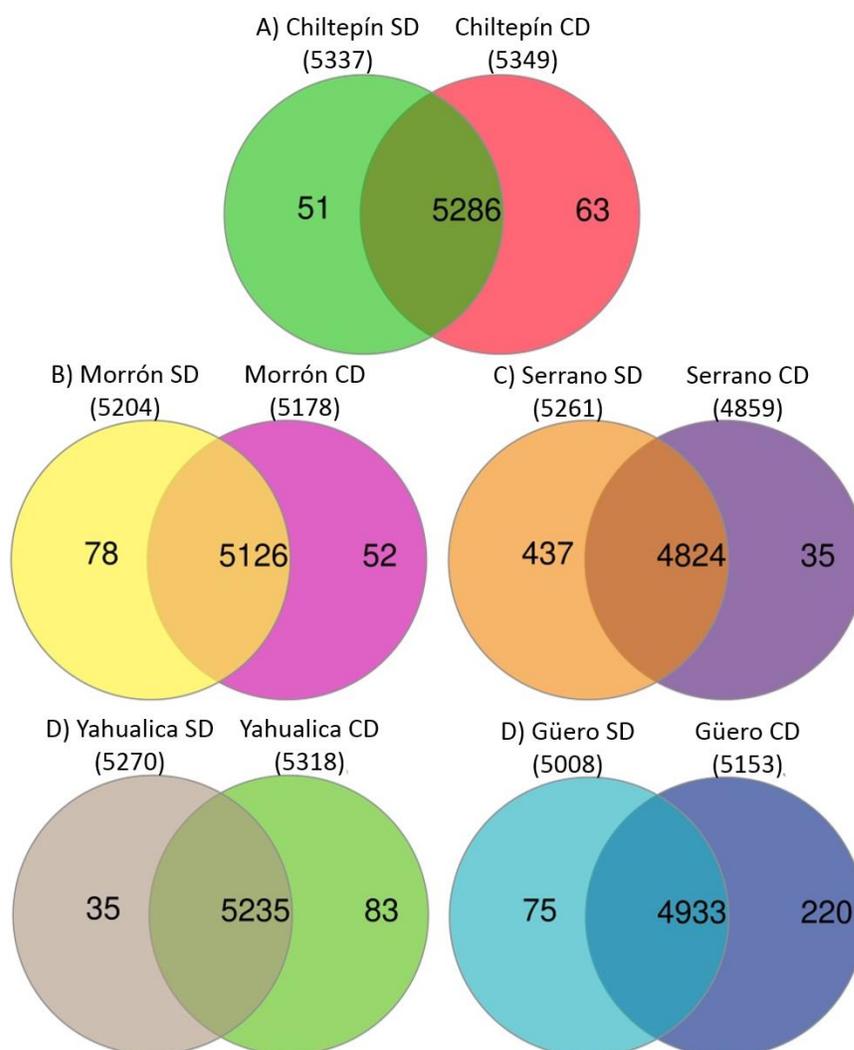


Figura 15. Diagrama de Venn de los metabolitos de cada cultivar y el chiltepín con y sin tratamiento de daño. SD: sin daño. CD: con daño.

3.3 Anotación de los metabolitos

Se encontraron 42 coincidencias en las librerías disponibles de GNPS. Considerando las anotaciones con valores de similitud espectral a partir de 0.70 (Scheubert et al., 2017), donde un valor igual a 1 indica espectros idénticos. Estas anotaciones se realizaron en tres muestras de control de calidad (mezcla proporcional de todas las muestras), adicionales a las utilizadas en los análisis estadísticos (con parámetros optimizados). Los metabolitos encontrados corresponden a la composición química foliar de la especie *Capsicum annuum* con y sin de daño de *S. frugiperda* (Tabla 4). Entre los metabolitos encontrados destacan 15 flavonoides, 4 glicerofosfolinas, 3 aminas, 2 diterpenos, 2 Aminoácidos, péptidos y análogos, 2 Sesquiterpenoides y 2 lignanos.

Tabla 4. Metabolitos encontrados en las muestras de tejido foliar. m/z: relación masa-carga. RT: tiempo de retención en minutos. Coseno: medida de similitud entre dos espectros de fragmentación, un valor de coseno de 1 es un espectro idéntico. La anotación fue en modo positivo.

N.º compuesto	Nombre del compuesto	RT (min)	m/z	coseno	subclase/superclase
1	3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl] oxyoxan-2-yl] oxy-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chromen-4-one	10.46	581.152	0.92	Flavonoides
2	4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-methoxy-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl] oxymethyl] oxan-2-yl] oxychromen-2-one	12.22	595.167	0.88	Flavonoides
3	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2S,3R,4S,5S)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl] oxymethyl] oxan-2-yl] oxychromen-4-one	10.36	581.152	0.87	Flavonoides
4	7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-6-[[[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) oxolan-2-yl]oxymethyl]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxychromen-4-one	12.19	595.167	0.9	Flavonoides
5	Ambocin	11.38	565.156	0.92	Flavonoides
6	apigetrin	11.48	433.115	0.93	Flavonoides
7	Apiin	12.1	565.156	0.78	Flavonoides
8	Austinoneol	23.45	415.212	0.9	Meroterpeno
9	Cocamidopropyl Betaine	21.32	343.296	0.78	Aminoácidos, péptidos y análogos
10	Eplerenone	22.92	851.398	0.93	Esteroides
11	Luteolin	10.61	287.055	0.71	Flavonoides
12	Lauramine oxide	21.69	230.248	0.7	Óxidos de amina
13	Lauramidopropyl betaine	21.19	343.296	0.86	Aminoácidos, péptidos y análogos

14	Lauryl diethanolamine	21.62	274.275	0.91	Aminas
15	Lauryl diethanolamine	21.59	274.275	0.87	Aminas
16	Apigenin	11.54	271.061	0.7	Flavonoides
17	Luteolin 7-glucoside	10.43	449.109	0.83	Flavonoides
18	NCGC00169653-02!7-[3-[3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chromen-4-one	11.53	565.156	0.96	Flavonoides
19	NCGC00180259-02!2-(hydroxymethyl)-6-[4-[(2S,3S)-3-(hydroxymethyl)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol	11.28	503.192	0.73	Lignan
20	NCGC00347704-02_C24H32O7_2H-Oxireno[1,10a]phenanthro[3,2-b]furan-10(11bH)-one, 5,7-bis(acetyloxy)-3,3a,4,5,6,7,7a,7b,8,8a-decahydro-4,4,7a,11-tetramethyl-, (1aS,3aR,5S,7S,7aR,7bS,8aR,11bR)-	23.21	415.212	0.92	Diterpenos
21	NCGC00381060-01_C24H32O7_Benzoic acid, 4-hydroxy-, (1aS,2aR,3S,5R,6S,7aR)-3-(acetyloxy) decahydro-5-hydroxy-2a, 7a-dimethyl-5-(1-methylethyl) azuleno[5,6-b]oxiren-6-yl ester	24.1	415.212	0.74	Ácidos benzoicos y derivados
22	NCGC00384592-01!3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chromen-4-one	10.73	581.152	0.89	Flavonoides
23	NCGC00385085-01!5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2S,3R,4S,5S)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	10.83	581.152	0.93	Flavonoides
24	NCGC00385123-01_C22H30O6_7b,9-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5-oxo-1, 1a,1b,4, 4a,5, 7a,7b,8,9-decahydro-9aH-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulen-9a-yl acetate	23.48	432.238	0.82	Diterpenos
25	NCGC00385551-01!5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-6-[[[(2R,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) oxolan-2-yl]oxymethyl]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxychromen-2-one	11.2	581.152	0.76	Glucósidos cumarínicos
26	NCGC00385811-01!6-[3-[(3,4-dimethoxyphenyl) methyl]-4-methoxy-2-(methoxymethyl) butyl]-4-methoxy-1,3-benzodioxole	23.01	415.212	0.92	Lignan
27	NCGC00385820-01!5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-	10.4	449.109	0.81	Flavonoides

	trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl] oxyphenyl] chromen-4-one				
28	1-Hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	26.91	760.583	0.73	Glicerofosfocolina
29	1-Hexadecanoyl-2-octadecadienoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	28.19	758.569	0.79	Glicerofosfocolina
30	1-Oleoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	26.8	760.583	0.80	Glicerofosfocolina
31	1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	28.23	786.601	0.94	Glicerofosfocolina
32	9,12-Octadecadiynoic Acid	25.19	161.095	0.73	Ácidos grasos
33	Aloenin	11.9	433.115	0.77	Carbohidratos y carbohidratos conjugados
34	.alpha.-Bisabolol	18.43	205.195	0.83	Sesquiterpenoides
35	.beta.-Gentiobiose	22.06	325.114	0.73	Carbohidratos y derivados
36	Dibutyl adipate	25.28	259.189	0.76	Ácidos carboxílicos
37	Dibutyl phthalate	25.48	279.159	0.97	Ácidos benzoicos y derivados
38	Diethyl phthalate	16.86	177.055	0.82	Ácidos carboxílicos
39	Genistin	11.93	433.115	0.81	Flavonoides
40	Glycerol 1-stearate	27.71	359.316	0.92	Lípidos
41	(-)-Isolongifolol	18.5	205.195	0.72	Sesquiterpenoides
42	N-Cyclohexanecarbonylpentadecylamine	18.52	205.195	0.82	Aminas

Capítulo 4. Discusión

4.1 Metaboloma de *Capsicum annuum*

El chile *C. annuum* es una especie de gran importancia a nivel mundial y no es raro que se hayan realizado estudios metabolómicos previos para observar la variación química en hojas de *Capsicum annuum* (Maharijaya et al., 2019; Macel et al., 2019; Wang et al., 2019; Barraón-Catalán et al., 2020). Sin embargo, este es el primer estudio que compara la evolución del metaboloma constitutivo e inducido de chile *Capsicum annuum* en el estado domestico empleando variedades mexicanas y su ancestro común. El objetivo de este trabajo fue analizar el metaboloma de diferentes cultivares de chiles mexicanos y hacer una comparación con el metaboloma del chiltepín (ancestro silvestre) para determinar los efectos de la domesticación en la química secundaria de este grupo. El análisis metabolómico detectó una amplia variación en el número y la abundancia de señales con potencial de ser identificadas (metabolitos) entre los cultivares y el chiltepín, del mismo modo permitió distinguir entre cultivares de chiles (Figuras 7 y 10). Esto comprueba que la fuerza de la selección artificial durante la domesticación modificó el metaboloma de los cultivares en relación al ancestro silvestre, posiblemente alterando parte del arsenal defensivo de las plantas para enfrentar a sus herbívoros.

En total se detectaron 5508 señales (potenciales metabolitos secundarios) en todas las muestras. Floros et al. (2017) detectaron un total de 2598 señales en tejido foliar de una accesión (Línea de reproducción o población almacenada para su uso) (FAO, 2021) de *C. annuum*. Otros autores como Macel et al. (2019), encontraron 52,530 señales en tejido foliar de 9 accesiones de *C. annuum* y 3 de *C. chinense* en dos estados de desarrollo. La cantidad de señales detectadas dependerá del equipo, los protocolos utilizados, los diferentes tratamientos, los tejidos procesados y el número de organismos analizados. En este estudio se utilizó una metodología similar en el preprocesamiento de los datos y la anotación de los metabolitos a la de Floros et al. (2017), difiriendo en los parámetros de adquisición de los datos y en los equipos. En el caso de Macel et al. (2019), utilizaron una metodología diferente para el preprocesamiento (MetAlign) de los datos y la anotación se realizó en una base de datos interna, corroborando las anotaciones con bases de datos en línea. Se ha reportado en varios estudios que existen diferencias entre los parámetros y los resultados obtenidos con las diferentes herramientas de preprocesamiento (Chen et al., 2013b; Cajka y Fiehn, 2016), específicamente en el grado de detección y la capacidad de rellenado de huecos (algoritmo que predice picos que podrían coincidir en otras muestras) (Gürdeniz et al., 2012). Coble y Fraga (2014), compararon cuatro herramientas, (MetAlign, MZmine 2, SpectConnect y XCMS) encontrando que MetAlign fue la mejor en el número de detección. Son pocos los estudios realizados en tejido foliar de *C.*

annuum y este estudio es el primero enfocado en comparar las diferencias químicas entre cultivares y su ancestro silvestre en *C. annuum*, por lo cual no se puede realizar una comparación en número de señales.

4.2 Diferencias en la composición química constitutiva e inducida

Los resultados obtenidos en los análisis de agrupación jerárquica con y sin daño, confirman los resultados de los análisis de componentes principales (ver Figura 10). Los cultivares se agruparon de forma distintiva con y sin tratamiento de daño. Sin embargo, el chiltepín quedó fuera de cualquier agrupación (ver Figura 7). Los resultados del presente estudio apoyan la idea de que existe una diferencia en la composición química relacionada con la defensa entre las plantas domesticadas y el chiltepín (ancestro silvestre). En este estudio se encontró que el cultivar serrano mostraba una similitud en su metaboloma constitutivo con el chiltepín (ver Figura 7; Figura 10). Sin embargo, esto cambió después de la inducción con larvas de *S. frugiperda*, agrupándose con los cultivares güero y morrón. En un estudio realizado por Valenzuela-Apodaca (2019), donde el objetivo era determinar si había una variación en la respuesta defensiva entre plantas silvestres y domesticadas de *C. annuum*, se encontró que ninguna de las larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*) sobrevivió, mientras que en los cultivares serrano y poblano sobrevivió el 73.3% de las larvas. En los resultados de este trabajo el cultivar serrano con daño de *S. frugiperda* se agrupó con los cultivares güero y morrón, debido a su similitud química, esto sugiere que las larvas de *S. frugiperda* podrían tener un alto porcentaje de supervivencia al ser alimentadas con hojas de estos cultivares.

En el presente estudio todas las plantas expuestas a las larvas de *S. frugiperda*, mostraron daño foliar después de una hora de tratamiento, y se observó un cambio en las señales (metabolitos secundarios) por la inducción con *S. frugiperda* (ver Figura 14; Figura 15). En un estudio desarrollado por Vijaya y Rani (2017) encontraron que las larvas de *S. litura* en el tercer estadio, inducen un aumento del contenido de fenoles totales en plantas de *C. annuum* desde el inicio de la alimentación y este efecto se mantiene en la planta por 24 horas a pesar de retirar las larvas. Del mismo modo, González (2019) encontró una diferencia en la composición química (fenoles totales) y densidad de tricomas entre familias genéticas de *C. annuum* var. *glabriusculum* al ser sometidas a un tratamiento de daño con el herbívoro *Lema daturaphila*. González (2019) sugiere que puede existir una variación genética en los caracteres relacionados con la defensa de estas plantas, por lo cual puede presentar una respuesta selectiva al ser atacada por herbívoros. Esto confirma que también existe una variación en el patrón de expresión dentro de las variedades silvestres.

En este trabajo se encontró una respuesta diferencial dentro de los cultivares al ser atacados por *S. frugiperda* (ver serrano y güero en la Figura 7; Figura 10; Figura 15).

El cultivar Yahualica mostró una mayor similitud en su metaboloma constitutivo e inducido con el chiltepín, respecto al resto de los cultivares, siendo el metaboloma inducido el que comparte un mayor número de metabolitos (Ver figura 14). Esto sugiere que conserva un mayor número de metabolitos relacionados con la defensa de su ancestro silvestre (chiltepín), por lo cual su defensa química no ha sido tan alterada por la domesticación en comparación con los cultivares serrano, güero y morrón. En contraste, el cultivar morrón difiere más del chiltepín en los metabolitos compartidos (ver figura 13; Figura 14) y en los patrones de expresión de sus metabolitos (Figura 10). El chile morrón tiene diferencias marcadas en el tamaño y picor de su fruto, respecto al chiltepín (Eshbaugh, 1975). El chile morrón tiene la menor pungencia en sus frutos entre los cultivares analizados en este estudio y esta característica es de importancia en la selección artificial (Moscone et al., 2007), ya que la selección basada en aumentar la palatabilidad puede reducir las defensas químicas (Dicenta et al., 2002; Londoño-Giraldo et al., 2021). Por otra parte, los cultivares güero y morrón presentaron una composición química constitutiva e inducida similar (Ver mapas de calor Figura 10; Figura 11; Figura 12), estos cultivares tienen el menor contenido de capsaicina encontrándose en la escala más baja de la clasificación de Scoville (Scoville, 1912; Lotha et al., 2018). Además, se ha encontrado que los cultivares güero y morrón tienen un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, en comparación con otros cultivares como serrano, jalapeño y Anaheim (Medina-Juárez et al., 2012). En conclusión, a pesar de que el cultivar Yahualica tiene más similitudes con el chiltepín, el patrón general muestra una diferencia en la composición química constitutiva e inducida entre los cultivares y el chiltepín, donde en algunos casos la disminución de señales es más marcada (cultivares morrón y güero).

Macel et al. (2019) utilizaron la metabolómica no dirigida para determinar los metabolitos secundarios involucrados en la resistencia a los trips (*Frankliniella occidentalis*) en hojas de 9 accesiones de *Capsicum annuum* y 3 de *C. chinense*, y analizaron el metaboloma constitutivo de las accesiones con dos estados de desarrollo (vegetativo y floración). Ellos encontraron que las accesiones resistentes tienen una diversidad química significativamente mayor que las susceptibles en la etapa de floración, y este patrón no se observó en la etapa vegetativa (Macel et al., 2019). En nuestro estudio, el chiltepín (variedad silvestre) mostró una mayor diversidad química en relación a los cultivares (ver señales únicas Figura 13; Figura 14), y un mayor número de señales significativamente reguladas al alza con inducción de *S. frugiperda* en comparación con los cultivares (ver diagrama de volcán Figura 6).

No hay estudios metabolómicos comparativos de la composición química foliar de *C. annuum* entre cultivares y su ancestro silvestre (chiltepín). Sin embargo, en un estudio realizado en tomate, una especie de la misma familia que el chile, Solanaceae, se encontraron resultados similares a los nuestros. Específicamente, Londoño-Giraldo et al. (2021) encontraron que las accesiones de la variedad silvestre de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, tienen una mayor abundancia y diversidad de metabolitos secundarios en sus hojas y frutos que la variedad domesticada *S. lycopersicum* Lam. Los autores sugieren que esto puede ser consecuencia de la selección artificial enfocada en el sabor del fruto (Londoño-Giraldo et al., 2021). Algunos autores han encontrado evidencia que indica una disminución de la resistencia como consecuencia de la domesticación, mencionan que estos efectos serán más notorios dependiendo del grado de domesticación del cultivo (Rosenthal y Dirzo; Chen et al., 2015). De igual manera, en algunos estudios se ha encontrado que la domesticación generalmente conduce a una reducción en la defensa química (Meyer et al., 2012, Chen et al., 2015; Milla et al., 2015). A pesar de que Turcotte et al. (2014) también encontraron que la domesticación alteraba la defensa de las plantas, no detectaron un efecto marcado como se sugiere en la teoría de reasignación de recursos de Agrawal, (2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan evidencia que apoya la hipótesis de la reducción de la defensa como efecto de la domesticación.

4.3 Perfil de los metabolitos

No se encontraron anotaciones en las primeras muestras analizadas, esto podría deberse a que se obtuvieron pocos iones con espectros de fragmentación (MS2) y el análisis de redes moleculares en GNPS utiliza datos MS2 para comparar los espectros y realizar las anotaciones (Annesley, 2003; Taylor, 2005). Los espectros de fragmentación (MS2) se obtienen a partir de la fragmentación de los iones precursores (MS1) (Aron et al., 2020). Para obtener un mayor número de MS2 se realizó otro experimento con parámetros de adquisición optimizados en el control de calidad. Al modificar la velocidad de escaneo de los (MS2) de 4 espectros/segundo a 3 espectros/segundo, se obtuvo un mayor número de espectros de fragmentación, aumentando la probabilidad de encontrar coincidencias con las librerías disponibles en GNPS.

Se encontraron 42 coincidencias con las librerías disponibles en GNPS utilizando los datos obtenidos con los parámetros de adquisición optimizados en muestras de control de calidad. Estas 42 anotaciones corresponden a un porcentaje de anotación menor al 1%. En la actualidad el promedio del porcentaje de

anotación en GNPS se encuentra entre el 5-6%, y la mayor parte de los espectros de fragmentación (MS2) permanecen sin anotar (Aron et al., 2020). A pesar de que el porcentaje de anotación en este estudio fue menor al 1%, se ha encontrado un bajo porcentaje de anotación para *Capsicum annuum* utilizando GNPS. Específicamente, Floros et al. (2017), obtuvieron una la tasa de identificación del 1.6% (96 anotaciones) para dos especies (chile y tomate) utilizando varios tipos de tejido vegetal, como hojas (2598 señales), flores, frutos y tallos, lo que sugiere que muchos compuestos aún no se encuentran en las librerías disponibles en GNPS.

La mayor parte de los compuestos identificados en este estudio fueron flavonoides. Estos compuestos tienen importancia en la resistencia de las plantas contra los insectos, ya que pueden afectar el valor nutritivo o la digestibilidad, inhibir la alimentación o ser tóxicos (Treutter, 2005). Entre los flavonoides identificados en este estudio se encuentra la apigenina, este compuesto se ha encontrado con anterioridad en muestras de tejido foliar de *C. annuum* (Macel et al., 2019; Cho et al., 2020). Mikulic-Petkovsek et al. (2013) encontraron luteolin 7-glucoside y varios derivados de apigenin en frutos de chile. En este estudio se encontró luteolin 7-glucoside en tejido foliar de *C. annuum*. A pesar de la baja tasa de anotación en el presente estudio, una de las ventajas de utilizar la plataforma de anotación en línea GNPS, es que las bibliotecas disponibles se encuentran en constante crecimiento, lo cual podría generar nuevas anotaciones putativas (Aron et al., 2020).

Capítulo 5. Conclusiones

Este es el primer estudio comparativo del metaboloma foliar entre cultivares de chiles mexicanos y su ancestro silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. El análisis metabolómico permitió distinguir diferencias entre el chiltepín y los cultivares, así mismo, permitió distinguir entre cultivares de chiles y entre el metaboloma constitutivo e inducido. Los resultados obtenidos sugieren que la domesticación modificó el metaboloma de los cultivares respecto a la variedad silvestre (chiltepín), afectando la abundancia y diversidad de los metabolitos secundarios presentes en el tejido foliar. Se observó una variación en el efecto de la domesticación entre los cultivares, donde el efecto fue menor en el chile Yahualica, seguido del chile serrano, güero y morrón. Se ha reportado que la disminución de la abundancia y diversidad en los metabolitos secundarios presentes en el tejido foliar puede afectar la resistencia a herbívoros en los cultivares (Turcotte et al., 2014).

La detección de variación entre los metabolomas foliares constitutivos e inducidos sugiere que la especie *Capsicum annuum* puede responder a los herbívoros expresando metabolitos secundarios de forma diferencial. Los cultivares muestran una reducción en la abundancia y diversidad de metabolitos secundarios como consecuencia de la selección de rasgos de interés en los cultivares (tamaño y sabor del fruto) (Meyer et al., 2012, Chen et al., 2015; Milla et al., 2015). Entre tanto, la variedad silvestre (chiltepín) presenta una expresión de metabolitos secundarios en respuesta a factores ambientales y al ataque de herbívoros consecuencia de la selección natural.

5.1 Perspectivas

Este estudio demuestra que la metabolómica es una herramienta útil para determinar diferencias en la composición química foliar constitutiva e inducida en plantas. Un enfoque dirigido combinado con ensayos biológicos de resistencia podría ayudar a entender de forma más detallada los efectos de la domesticación. En este estudio se utilizó un herbívoro generalista, se desconoce el efecto de la domesticación ante el ataque de insectos especialistas o que generen otro tipo de daño en el tejido foliar por su forma de alimentación, como los áfidos. Además, se podrían realizar estudios en otro estado de desarrollo de la planta (floración).

Finalmente, un experimento de alimentación de larvas de *S. frugiperda* utilizando hojas después de inducir la defensa química en los cultivares, complementaria este estudio, con el objetivo de evaluar si la inducción de la defensa química observada en este estudio reduce la sobrevivencia y el desarrollo del herbívoro, y si esto difiere entre plantas silvestres y cultivadas.

Literatura citada

- Agrawal, A. A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in ecology & evolution*, 22(2), 103-109.
- Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 49(7), 1041-1044.
- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Dorrestein, P. C., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J. J., Ernst, M., Bin Kang, K., Aceves, C.M., Caraballo-Rodríguez, A., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C., K. Sun, Tehan, R. M., Boya, C. A., Christian, M. H., Gutiérrez, M., Ulloa, A. M., Tejeda, J. A., Mojica-Flores, R., Lakey-Beitia, J., Vásquez-Chaves, V., Zhang, Y., Calderón, A., Tayler, N., Keyzers, R. A., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A., Jarmusch, A. K., Schmid, R., Truman, A. W., Bandeira, N., Wang, M., and Dorrestein, P. C. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature protocols*, 15(6), 1954-1991.
- Ashley, T. R., Wiseman, B. R., Davis, F. M., & Andrews, K. L. (1989). The fall armyworm: a bibliography. *Florida Entomologist*, 152-202.
- Bandoly, M., Hilker, M., & Steppuhn, A. 2015. Oviposition by *Spodoptera exigua* on *Nicotiana attenuata* primes induced plant defence against larval herbivory. *The Plant Journal*, 83(4), 661-672.
- Barrajón-Catalán, E., Álvarez-Martínez, F. J., Borrás, F., Pérez, D., Herrero, N., Ruiz, J. J., & Micol, V. (2020). Metabolomic analysis of the effects of a commercial complex biostimulant on pepper crops. *Food chemistry*, 310, 125818.
- Batyrshina, Z. S., Yaakov, B., Shavit, R., Singh, A., and Tzin, V. (2020). Comparative transcriptomic and metabolic analysis of wild and domesticated wheat genotypes reveals differences in chemical and physical defense responses against aphids. *BMC Plant Biology*, 20(1), 19.
- Becerra-Martínez, E., Florentino-Ramos, E., Pérez-Hernández, N., Gerardo Zepeda-Vallejo, L., Villa-Ruano, N., Velázquez-Ponce, M., García-Mendoza, F., and Bañuelos-Hernández, A. E. 2017. ¹H NMR-based metabolomic fingerprinting to determine metabolite levels in serrano peppers (*Capsicum annum* L.) grown in two different regions. *Food Research International*, 102, 163–170. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.005.
- Becerra-Martínez, E., Pacheco-Hernández, Y., Lozoya-Gloria, E., Betancourt-Jiménez, M. G., Hidalgo-Martínez, D., Zepeda-Vallejo, L. G., and Villa-Ruano, N. (2020). ¹H-NMR metabolomics profiling of recombinant tobacco plants holding a promoter of a sesquiterpene cyclase. *Phytochemical Analysis*, 31:480–487.
- Bell, G., and González, A. 2011. Adaptation and evolutionary rescue in metapopulations experiencing environmental deterioration. *Science*, 332(6035), 1327–1330. doi:10.1126/science.1203105

- Bellota, E., Medina, R. F., & Bernal, J. S. (2013). Physical leaf defenses—altered by *Zea* life-history evolution, domestication, and breeding—mediate oviposition preference of a specialist leafhopper. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 149(2), 185-195.
- Benrey, B., Callejas, A., Rios, L., Oyama, K., & Denno, R. F. 1998. The Effects of Domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the Interaction between Phytophagous Insects and Parasitoids. *Biological Control*, 11(2), 130-140.
- Berenbaum, M. 1985. Brementown revisited: interactions among allelochemicals in plants. In Cooper-Driver, G. A., Swain, T., and Conn, E. E. (Ed.). *Chemically mediated interactions between plants and other organisms* (pp. 139-169). United States, New York. Springer Science & Business Media. doi:10.1007/978-1-4757-9658-2
- Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B. J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, M. H., Trethewey, R. N., Lange, B. M., Wurtele, E. S., and Sumner, L. W. 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*, 9(9), 418-425. doi:10.1016/j.tplants.2004.07.004.
- Blanckaert, I., Paredes-Flores, M., Espinosa-García, F. J., Piñero, D., & Lira, R. 2012. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(4), 557-573.
- Cajka, T., & Fiehn, O. (2016). Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *Analytical chemistry*, 88(1), 524-545.
- Cartaya, O., y Reynaldo, I. 2001. Reseña bibliográfica Flavonoides: Características Químicas Y Aplicaciones O. Cartaya e Inés Reynaldo. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Carvalho, S., Ragassi, C., Bianchetti, L., Reifschneider, F., Buso, G. and Faleiro, F. 2014. Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7447–7464.
- Chang, F. R., Chen, C. Y., Wu, P. H., Kuo, R. Y., Chang, Y. C., and Wu, Y. C. 2000. New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, 63(6), 746–748. doi:10.1021/np990548n
- Chen, W., Gong, L., Guo, Z., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., Yu, S., Xiong, L., Luo, J. 2013a. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics. *Molecular Plant*, 6(6), 1769–1780. doi:10.1093/mp/sst080.
- Chen, Y., Gols, R., and Benrey, B. 2015. Crop Domestication and Its Impact on Naturally Selected Trophic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 35–58.

- Chen, Y., Xu, J., Zhang, R., Shen, G., Song, Y., Sun, J., He, J., Zhan, Q. & Abliz, Z. (2013b). Assessment of data pre-processing methods for LC-MS/MS-based metabolomics of uterine cervix cancer. *Analyst*, 138(9), 2669-2677.
- Cho, S. Y., Kim, H. W., Lee, M. K., Kim, H. J., Kim, J. B., Choe, J. S., Lee, M. & Jang, H. H. 2020. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities in Relation to the Flavonoids Composition of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Antioxidants*, 9(10), 986.
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 68(1), e86.
- Coble, J. B., & Fraga, C. G. (2014). Comparative evaluation of preprocessing freeware on chromatography/mass spectrometry data for signature discovery. *Journal of chromatography A*, 1358, 155-164.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582. doi:10.1128/cmr.12.4.564.
- De Vos, R. C. H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J. B., Bino, R. J., & Hall, R. D. 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(4), 778–791. doi:10.1038/nprot.2007.95
- Denison, R. F., Kiers, E. T., & West, S. A. (2003). Darwinian agriculture: when can humans find solutions beyond the reach of natural selection?. *The quarterly review of biology*, 78(2), 145-168.
- Dicenta, F., Martínez-Gómez, P., Grané, N., Martín, M. L., León, A., Cánovas, J. A., & Berenguer, V. 2002. Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2149-2152.
- Eshbaugh, W. H. 1975. Genetic and Biochemical Systematic Studies of Chili Peppers (*Capsicum-Solanaceae*). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102(6), 396-403. doi:10.2307/2484766
- Evans, L. T. (1993). *Crop evolution, adaptation and yield.*, (Cambridge University Press: New York).
- Fang, C., Fernie, A. R., & Luo, J. 2019. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. *Trends in Plant Science*, 24(1), 83–98. doi:10.1016/j.tplants.2018.09.006.
- Floros, D. J., Jensen, P. R., Dorrestein, P. C., & Koyama, N. 2016. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. *Metabolomics* 12, 145. doi: 10.1007/s11306-016-1087-5
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2021. WIEWS - World Information and Early Warning System on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture-Glossary. Consultado el 28 de septiembre de 2021, de: <http://www.fao.org/wiews/glossary/en/>
- Fraenkel, G. S. 1959. The Raison d'Être of Secondary Plant Substances. *Science*, 129(3361), 1466–1470.

- García-Palacios, P., Milla, R., Delgado-Baquerizo, M., Martín-Robles, N., Álvaro-Sánchez, M., & Wall, D. H. 2013. Side-effects of plant domestication: ecosystem impacts of changes in litter quality. *New Phytologist*, 198(2), 504-513.
- Gevi, F., Fanelli, G., Zolla, L., & Rinalducci, S. 2019. Untargeted Metabolomics of Plant Leaf Tissues Federica. In *High-Throughput Metabolomics*. In D'Alessandro, A. (Ed.). *High-throughput Metabolomics: Methods and Protocols*. (pp. 187-195). United States, New York. Humana. doi:10.1007/978-1-4939-9236-2.
- Gols, R., Bukovinszky, T., Van Dam, N. M., Dicke, M., Bullock, J. M., & Harvey, J. A. 2008. Performance of generalist and specialist herbivores and their endoparasitoids differs on cultivated and wild Brassica populations. *Journal of Chemical Ecology*, 34(2), 132–143. doi:10.1007/s10886-008-9429-z.
- Gong, B., & Zhang, G. 2014. Interactions between plants and herbivores: A review of plant defense. *Acta Ecologica Sinica*, 34(6), 325-336. doi:10.1016/j.chnaes.2013.07.010
- González Vera, C.G. 2019. Variación genética en la concentración de fenoles y densidad de tricomas asociados a la defensa en chile silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 50 pp.
- González-Pérez, S., Garce's-Claver, A., Mallor, C., Saenz de Miera, L., Fayos, O., Pomar, F., Merino, F., & Silvar, C. 2014. New Insights into Capsicum spp Relatedness and the Diversification Process of *Capsicum annuum* in Spain. *PLOS ONE*, 9(12), 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0116276.
- Gürdeniz, G., Kristensen, M., Skov, T., & Dragsted, L. O. (2012). The effect of LC-MS data preprocessing methods on the selection of plasma biomarkers in fed vs. fasted rats. *Metabolites*, 2(1), 77-99.
- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. Á. 2016. Wild *Pepper Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1–11. doi:10.2135/cropsci2014.11.0789
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. 2015. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16:1. doi: 10.1186/s12859-015-0611-3
- Hernández-Cumplido, J., Giusti, M. M., Zhou, Y., Kyryczenko-Roth, V., Chen, Y. H., & Rodriguez-Saona, C. 2018. Testing the 'plant domestication-reduced defense hypothesis in blueberries: the role of herbivore identity. *Arthropod-Plant Interactions*, 12(4), 483-493.
- Jang, Y. K., Jung, E. S., Lee, H. A., Choi, D., & Lee, C. H. 2015. Metabolomic Characterization of Hot Pepper (*Capsicum annuum* "cM334") during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9452–9460. doi:10.1021/acs.jafc.5b03873

- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., y Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Johns, T. (1989). A chemical-ecological model of root and tuber domestication in the Andes. *Foraging and farming: the evolution of plant exploitation.*, 504-519.
- Kempel, A., Schädler, M., Chrobok, T., Fischer, M., & van Kleunen, M. (2011). Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5685-5689.
- Lee, G. M., Suh, D. H., Jung, E. S., & Lee, C. H. 2016. Metabolomics provides quality characterization of commercial gochujang (fermented pepper paste). *Molecules*, 21(7), 921.
- Lindig-Cisneros, R., Benrey, B., & Espinoza-Garcia, F. 1997. Phytoalexins, resistance traits, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(8), 1997–2011. doi:10.1023/B:JOEC.0000006485.38713.8c
- Lindig-Cisneros, R., Dirzo, R., & Espinosa-García, F. J. (2002). Effects of domestication and agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in *Phaseolus* beans. *Ecological Research*, 17(3), 315-321.
- Londoño-Giraldo, L. M., Baena-Pedroza, A. M., Martínez-Seidel, F., Corpas-Iguarán, E., & Taborda-Ocampo, G. (2021). Gone wild: Integration of antioxidative, physicochemical, volatilomic and sensorial profiles ratify rustic relatives of cherry tomato as ideal mating partners. *Scientia Horticulturae*, 277, 109814.
- López-España, R. G., Hernández-Verdugo, S., Parra-Terraza, S., Porras, F., Pacheco-Olvera, A., Valdez-Ortiz, A., Osuna-Enciso, T., y Muy-Rangel, M. D. 2016. Diferenciación geográfica de poblaciones de Chile silvestre (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) del noroeste de México. *Phyton*, 85(667), 131–141.
- Lotha, R., Shamprasad, B. R., Sundaramoorthy, N. S., Ganapathy, R., Nagarajan, S., & Sivasubramanian, A. (2018). Zero valent silver nanoparticles capped with capsaicinoids containing *Capsicum annuum* extract, exert potent anti-biofilm effect on food borne pathogen *Staphylococcus aureus* and curtail planktonic growth on a zebrafish infection model. *Microbial pathogenesis*, 124, 291-300.
- Luginbill, P. 1928. The Fall Armyworm. United States Department of Agriculture, Washington, DC, USA. Technical Bulletin, 34.
- Macel, M., Visschers, I., Peters, J., Kappers, I., de Vos, R., & van Dam, N. 2019. Metabolomics of Thrips Resistance in Pepper (*Capsicum spp.*) Reveals Monomer and Dimer Acyclic Diterpene Glycosides as Potential Chemical Defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 45(5–6), 490–501. doi:10.1007/s10886-019-01074-4.

- Maharijaya, A., Vosman, B., Pelgrom, K., Wahyuni, Y., de Vos, R. C., & Voorrips, R. E. 2019. Genetic variation in phytochemicals in leaves of pepper (*Capsicum*) in relation to thrips resistance. *Arthropod-Plant Interactions*, 13(1), 1-9.
- Medina-Juárez, L. Á., Molina-Quijada, D. M., Sánchez, C. L. D. T., González-Aguilar, G. A., & Gámez-Meza, N. (2012). Antioxidant activity of peppers (*Capsicum annuum* L.) extracts and characterization of their phenolic constituents. *Interciencia*, 37(8), 588-593.
- Meyer RS, DuVal AE, & Jensen HR. 2012. Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytol.* 196(1):29–48.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Jakopic, J., Cunja, V., Veberic, R., Munda, A., & Stampar, F. (2013). Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. *Physiological and molecular plant pathology*, 84, 138-145.
- Milla, R., Osborne, C. P., Turcotte, M. M., & Violle, C. 2015. Plant domestication through an ecological lens. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(8), 463–469. doi:10.1016/j.tree.2015.06.006
- Mondolot, L., Marlas, A., Barbeau, D., Gargadennec, A., Pujol, B., & McKey, D. (2008). Domestication and defence: foliar tannins and C/N ratios in cassava and a close wild relative. *Acta Oecologica*, 34(2), 147-154.
- Montezano, D. G., Specht, A., Sosa-Gomez, D. R., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. V., Peterson, J. A., & Hunt, T. E. 2018. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2), 286–300. doi:10.4001/003.026.0286
- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Gols, R., & Francisco, M. 2018. Plant domestication decreases both constitutive and induced chemical defences by direct selection against defensive traits. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Morimoto, M., Kumeda, S., & Komai, K. 2000. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1888–1891. doi:10.1021/jf990282q
- Morimoto, M., Tanimoto, K., Nakano, S., Ozaki, T., Nakano, A., & Komai, K. 2003. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 389–393. doi:10.1021/jf025627a
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J., y Vázquez-Montoya, E. 2012. Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control Biológico De Plagas Biopesticidas: An Option for the Biological Pest Control. *Ra Ximhai*, 8(3), 17–29.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., & Valverde, P. L. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 38, 541-566.
- Olsen, K. M., & Wendel, J. F. 2013. A bountiful harvest: genomic insights into crop domestication phenotypes. *Annual review of plant biology*, 64, 47-70.

- Paran, I., & Van Der Knaap, E. 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3841-3852.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., Berman, M. J., Cooke, R. G., Rademaker, K., Ranere, A. J., Raymond, J. S., Sandweiss, D. H., Scaramelli, F., Tarble, K., & Zeidler, J. A. 2007. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum spp.* L.) in the Americas. *Science*, 315(5814), 986–988. doi:10.1126/science.1136914
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of botany*, 100(5), 925-940.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*, 11(1), 1-11.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., Cheng, J., Zhao, S., Xu, M., Lou, Y., Yang, Y., Wu, Z., Mao, L., Wu, H., Ling-Hu, C., Zhou, H., Lin, H., González-Morales, S., Trejo-Saavedra, D., Tian, H., Tang, X., Zhao, M., Huang, Z., Zhou, A., Yao, X., Cui, J., Li, W., Chen, Z., Feng, Y., Niu, Y., Bi, S., Yang, X., Li, W., Cai, H., Lou, X., Montes-Hernández, S., Leyva-González, M., Xiong, Z., He, X., Bai, L., Tan, S., Tang, L., Liu, D., Liu, J., Zhang, S., Chen, M., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, Y., Liao, W., Zhang, Y., Wang, M., Lv, X., Wen, B., Liu, H., Luan, H., Zhang, Y., Yang, S., Wang, X., Xu, J., Li, X., Li, S., Wang, J., Palloix, A., Bosland, P., Li, Y., Krogh, A., Rivera-Bustamante, R., Herrera-Estrella, L., Yin, Y., Yu, J., Hu, K., & Zhang, Z. 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5135-5140.
- Rosenthal, J., & Dirzo, R. 1997. Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology*, 11(3), 337-355.
- Scheubert, K., Hufsky, F., Petras, D., Wang, M., Nothias, L. F., Dührkop, K., Bandeira, N., Dorrestein, P. & Böcker, S. (2017). Significance estimation for large scale metabolomics annotations by spectral matching. *Nature Communications*, 8(1), 1-10.
- Scoville, W. L. (1912). Note on capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1(5), 453-454.
- Smith, C. E. 1967. The Prehistory of the Tehuacan Valley: Environment and Subsistence. In Byers D. (Ed.), *Plant remains*.
- Strauss, S. Y., & Agrawal, A. A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(5), 179-185.
- Taylor, P. J. (2005). Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*, 38(4), 328-334.

- Treutter, D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant biology*, 7(6), 581-591.
- Turcotte, M. M., Turley, N. E., Johnson, M. 2014. The impact of domestication on resistance to two generalist herbivores across 29 independent domestication events. *New Phytologist*, 204(3), 671–681. doi:10.1111/nph.12935.
- Valenzuela-Apodaca, E. A. 2019. Variación en la tolerancia al daño mecánico foliar y resistencia contra herbívoros en chiles domesticados y su pariente silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 44 pp.
- Van Der Greef, J., Stroobant, P., & Van Der Heijden, R. 2004. The role of analytical sciences in medical systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(5), 559–565. doi:10.1016/j.cbpa.2004.08.013
- Velásquez-Valle, R., Villa-Ruano, N., Hidalgo-Martínez, D., Zepeda-Vallejo, L. G., Pérez-Hernández, N., Reyes-López, C. A., Reyes-Cervantes E., Medina-Melchor, D. & Becerra-Martínez, E. (2020). Revealing the ¹H NMR metabolome of mirasol chili peppers (*Capsicum annuum*) infected by *Candidatus Phytoplasma trifolii*. *Food Research International*, 131, 108863.
- Vijaya, M., & Rani, P. U. 2017. Defensive responses in *Capsicum annuum* (L) plants, induced due to the feeding by different larval instars of *Spodoptera litura* (F). *Arthropod-Plant Interactions*, 11(2), 193–202. doi:10.1007/s11829-016-9479-z
- Vijaya, M., Rani, P. U., & Rajna, S. 2018. Induced indirect defense in chilli plant, *Capsicum annuum* L. due to feeding stress caused by herbivore, *Spodoptera litura*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6(2): 1264-1270.
- Villa-Ruano, N., Ramírez-Meraz, M., Méndez-Aguilar, R., Zepeda-Vallejo, L. G., Álvarez-Bravo, A., Pérez-Hernández, N., & Becerra-Martínez, E. 2019. ¹H NMR-based metabolomics profiling of ten new races from *Capsicum annuum* cv. serrano produced in Mexico. *Food Research International*, 119, 785–792. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.061
- Villa-Ruano, N., Velásquez-Valle, R., Zepeda-Vallejo, L. G., Pérez-Hernández, N., Velázquez-Ponce, M., Arcos-Adame, V. M., & Becerra-Martínez, E. (2018). ¹H NMR-based metabolomic profiling for identification of metabolites in *Capsicum annuum* cv. mirasol infected by beet mild curly top virus (BMCTV). *Food Research International*, 106, 870-877.
- Visschers I., Peters J., van de Vondervoort J., Hoogveld R., & van Dam N. 2019. Thrips resistance screening is coming of age: leaf position and ontogeny are important determinants of leaf-based resistance in pepper. *Frontiers in Plant Science*.
- Votava, E. J., Nabhan, G. P., & Bosland, P. W. 2002. Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an in-situ population and ex situ accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics*, 3, 123–129.

- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. 2013a. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of Natural Products*, 76(4), 783–793.
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Tikunov, Y., de Vos, R. C., Pelgrom, K. T., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, R. & Bovy, A. G. 2013b. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum sp.*) biodiversity. *Metabolomics*, 9(1), 130-144.
- Wang, J., Lv, J., Liu, Z., Liu, Y., Song, J., Ma, Y., Ou, L., Zhang, X., Liang, C., Wang, F., Juntawong, N., Jiao, C., Chen, W. & Zou, X. (2019). Integration of Transcriptomics and Metabolomics for Pepper (*Capsicum annuum* L.) in Response to Heat Stress. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 5042.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y. Nguyen, D. D., Watrous, J., Kaponov, C., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R., Pace, L. A., Quinn, R. A., Duncan, K. R., Hsu, C. C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot, D., Carlson, E. E., Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B., Gerwick, L., Liaw, C., Yang, Y., Humpf, H., Maansson, M., Keyzers, R., Sims, A., Johnson, A., Sidebottom, A., Sedio, B., Klitgaard, A., Larson, C., Boya, C., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D., Silva, D., Marques, L., Demarque, D., Pociute, E., O'Neill, E., Briand, E., Helfrich, E., Granatosky, E., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J., Zeng, Y., Vorholt, J., Kurita, K., Charusanti, P., McPhail, K., Nielsen, K., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, Niclas Engene, N., Koyama, N., Vining, O., Baric, R., Silva, R., Mascuch, S., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B., Almaliti, J., Allard, P., Phapale, P., Nothias, L., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, Kyle, J., Metz, T., Peryea, T., Nguyen, D., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P., Palsson, B., Pogliano, K., Lington, R., Gutiérrez, M., Lopes, N., Gerwick, W., Moore, B., Dorrestein, P. and Bandeira, N. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, 34(8), 828-837.
- Wang, S., Alseekh, S., Fernie, A. R., and Luo, J. 2019. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Molecular Plant*, 12(7), 899–919. doi:10.1016/j.molp.2019.06.001.
- Whitehead, S. R., Turcotte, M. M., & Poveda, K. 2017. Domestication impacts on plant–herbivore interactions: a meta-analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712), 20160034.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Zeder, M. 2017. Domestication as a model system for the extended evolutionary synthesis. *Interface Focus*, 7(5). doi:10.1098/rsfs.2016.0133
- Zhigala, D. A., Abdulrahman, A. A., Kolawole, O. S., and Oladele, F. A. 2014. Fruit Morphology as Taxonomic Features in Five Varieties of *Capsicum annuum* L. Solanaceae. *Journal of Botany*, 2014, 1–6.

Anexos

The screenshot displays the Scopus search interface. At the top, the Scopus logo is on the left, and navigation links for Search, Sources, Lists, and SciVal are in the center. On the right, there are icons for help, notifications, and a library, along with buttons for 'Create account' and 'Sign in'.

The main heading reads '10 document results'. Below it, the search query is displayed: `(TITLE-ABS-KEY(capsicum AND annuum)) AND ((metabolome)) AND (leaf) AND (LIMIT-TO(EXACTKEYWORD, "Metabolomics"))`.

Below the query are options to 'Edit', 'Save', and 'Set alert'.

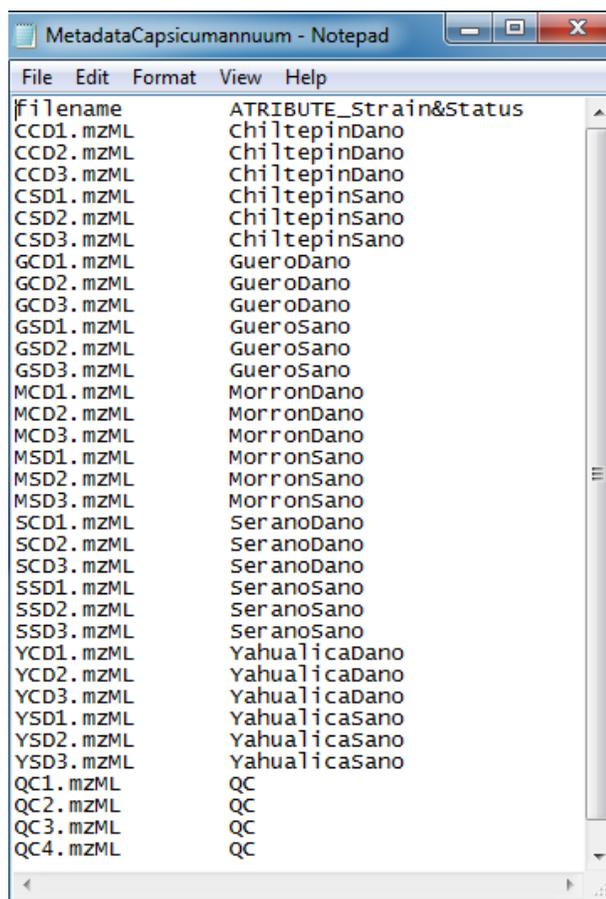
The results section is divided into 'Documents', 'Secondary documents', and 'Patents'. The 'Documents' tab is active. A search bar on the left allows for 'Search within results...'. Below it, 'Refine results' options include 'Limit to' and 'Exclude'. An 'Open Access' filter is also visible.

The main results area shows 'Analyze search results' with options to 'Show all abstracts' and 'Sort on: Date (newest)'. A toolbar includes 'All', 'Export', 'Download', 'View citation overview', 'View cited by', and 'Add to List'. There are also icons for printing, email, and saving.

The results table has the following columns: Document title, Authors, Year, Source, and Cited by.

Figura 16. Búsqueda sistemática de literatura. Se realizó una revisión sistemática sobre los estudios de metabolómica de la defensa de *Capsicum annuum*, específicamente del tejido de sus hojas. La búsqueda se llevó a cabo con la base de datos Scopus, se utilizaron las palabras clave (*Capsicum annuum*, metabolome y leaf) además de los caracteres booleanos (KEY, AND y LIMIT-TO) esto se introdujo en el buscador de la siguiente manera: TITLE-ABS KEY (capsicum AND annuum)) AND ((metabolome)) AND (leaf) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Metabolomics")). No se utilizó una restricción de fecha.

Anexo B.



Filename	ATTRIBUTE_Strain&status
CCD1.mzML	ChiltepinDano
CCD2.mzML	ChiltepinDano
CCD3.mzML	ChiltepinDano
CSD1.mzML	ChiltepinSano
CSD2.mzML	ChiltepinSano
CSD3.mzML	ChiltepinSano
GCD1.mzML	GueroDano
GCD2.mzML	GueroDano
GCD3.mzML	GueroDano
GSD1.mzML	GueroSano
GSD2.mzML	GueroSano
GSD3.mzML	GueroSano
MCD1.mzML	MorrónDano
MCD2.mzML	MorrónDano
MCD3.mzML	MorrónDano
MSD1.mzML	MorrónSano
MSD2.mzML	MorrónSano
MSD3.mzML	MorrónSano
SCD1.mzML	SeranoDano
SCD2.mzML	SeranoDano
SCD3.mzML	SeranoDano
SSD1.mzML	SeranoSano
SSD2.mzML	SeranoSano
SSD3.mzML	SeranoSano
YCD1.mzML	YahuálicaDano
YCD2.mzML	YahuálicaDano
YCD3.mzML	YahuálicaDano
YSD1.mzML	YahuálicaSano
YSD2.mzML	YahuálicaSano
YSD3.mzML	YahuálicaSano
QC1.mzML	QC
QC2.mzML	QC
QC3.mzML	QC
QC4.mzML	QC

Figura 17. Metadatos utilizados en el análisis de redes moleculares.

Anexo C.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Sample	QC2	QC3	QC4	GSD1	GSD2	GSD3
2	Label	QC	QC	QC	GSD	GSD	GSD
3	950.232603130918/19.435852020202	26347.098	14943.5051	13995.7591	27848.0523	7239.50602	10073.2043
4	812.230540882457/13.89203888888888	4212.68499	4943.84172	4217.6529	5560.73165	4554.39626	5410.19638
5	1971.53797149658/24.0779958333334	0	0	0	0	0	0
6	743.232632723721/21.7216707070706	49717.3561	58699.8873	60768.1586	11155.8184	12550.7666	27560.2425
7	1666.58083801269/12.5769741666665	53.0221195	0	57.0836144	62.4706237	0	5824.02221
8	1566.56823238249/22.5089102150538	4057.17405	5890.93851	5781.38422	0	345.291758	83.4429212
9	1392.98223680065/22.0778225806451	3898.14948	5826.26021	2313.04636	0	1782.16829	7246.38469
10	955.259441953716/16.6825484848484	12880.083	12731.1431	7033.00357	4033.2803	4857.63515	3824.64258
11	307.08360151811/22.3718919191919	39687.1164	39660.8152	22801.3675	37799.8836	31969.6312	60428.5087
12	1519.00245593843/22.3728023809523	0	0	0	0	0	0
13	290.149637858072/17.6159212121212	19309.7091	19049.1786	18697.5674	12583.6272	16038.2013	22396.0036
14	845.95058926669/17.6697106060606	0	351.882046	0	0	0	0
15	1517.45966593424/23.7710555555555	0	0	0	0	0	0
16	625.147354125976/15.7270262626262	8276.03886	7746.54519	7513.95311	3129.89343	7981.17238	4762.01318
17	1059.31342315673/23.0144546875001	1378.19014	3133.59954	531.317806	54.8583956	3176.5014	5565.99843
18	1547.53050278172/22.6736363636364	34465.2098	46843.6952	7471.16727	7759.97274	6189.93502	12864.2451
19	722.214971368963/20.6090742424242	1522.92475	2274.94575	4362.58143	515.418619	2387.20297	4489.94417
20	843.268926447088/20.2295737373738	1777.82493	1633.95189	2145.54472	309.908988	870.596667	1104.88567
21	1077.39953243371/21.2368378787878	85241.5683	98765.3404	7048.88329	39984.1152	95228.9521	146479.698
22	1008.39233112335/22.1502119791667	10828.7711	12546.63	8726.61591	3146.2141	6049.42445	15794.1622
23	1370.83482360839/22.5782750000001	0	367.48814	0	0	0	0

Figura 18. Archivo con datos obtenidos en el análisis LC-MS modificado para análisis estadísticos. Usado para realizar el análisis de componentes principales, análisis de agrupación jerárquica y el mapa de calor.

Anexo D.

Sample Normalization

- None
- Sample-specific normalization (i.e. weight, volume) [Specify](#)
- Normalization by sum
- Normalization by median
- Normalization by reference sample (PQN) [Specify](#)
- Normalization by a pooled sample from group [Specify](#)
- Normalization by reference feature [Specify](#)
- Quantile normalization

Data transformation

- None
- Log transformation (generalized logarithm transformation or glog)
- Cube root transformation (takes the cube root of data values)

Data scaling

- None
- Mean centering (mean-centered only)
- Auto scaling (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable)
- Pareto scaling (mean-centered and divided by the square root of the standard deviation of each variable)
- Range scaling (mean-centered and divided by the range of each variable)

Figura 19. Parámetros utilizados para normalizar y transformar los datos utilizados para el análisis multivariado en MetaboAnalyst 5.0.

Anexo E.

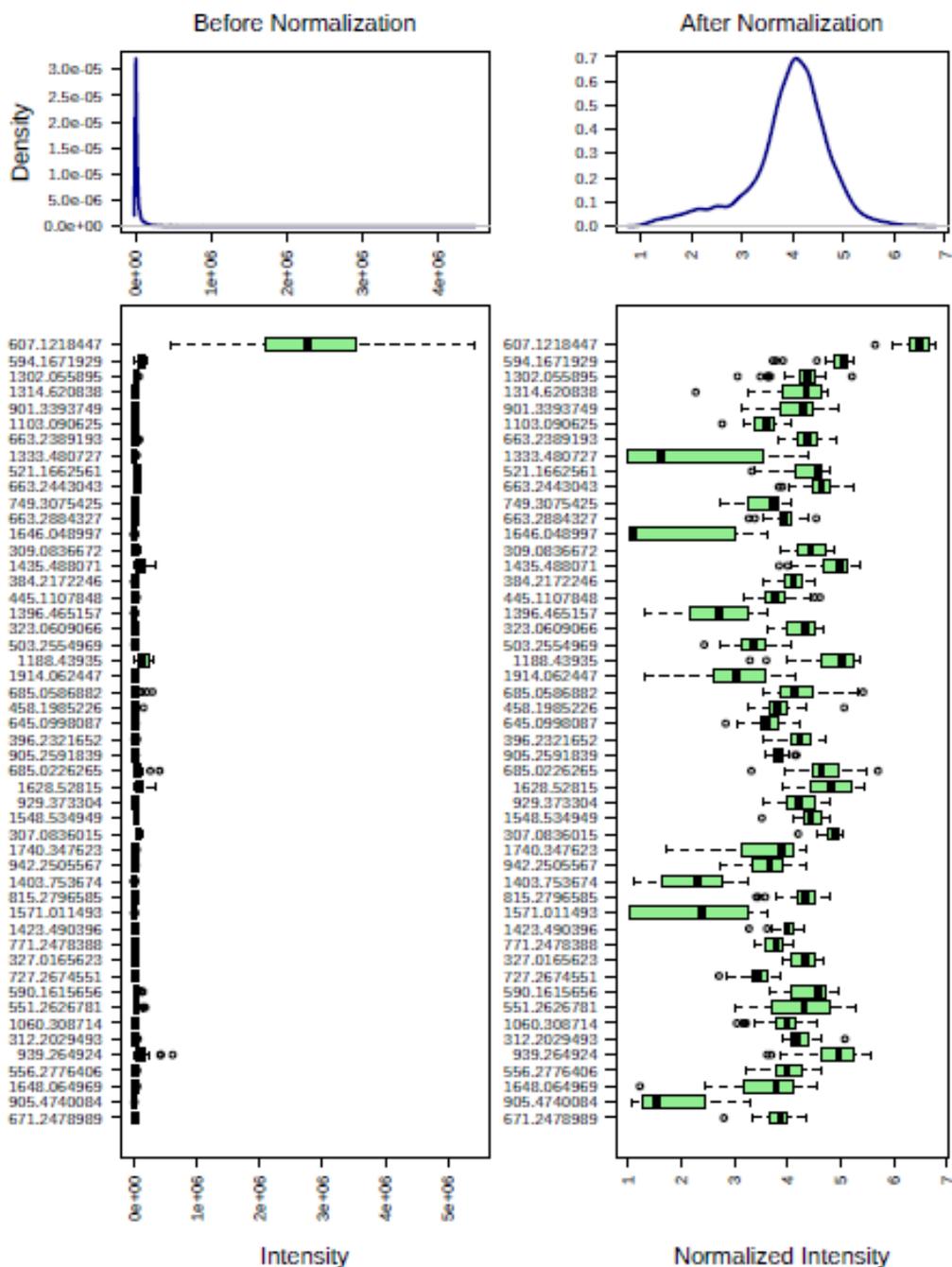


Figura 20. Diagramas de caja y diagramas de densidad de Kernel antes y después de la normalización. Los diagramas de caja muestran aproximadamente 50 características debido al límite de espacio. Las gráficas de densidad de Kernel incluyen todas las muestras. Métodos seleccionados: normalización por cuantiles; transformación de datos Log10, escala de datos: N/A.

Anexo F.

Distance Measure:	Euclidean	▼
Clustering Algorithm:	Ward	▼
Color Contrast:	Default	▼
Data Source:	Original data	▼
Standardization:	Autoscale features	▼
View Mode :	<input checked="" type="radio"/> Overview	<input type="radio"/> Detail View (< 2000 features)
	<input type="checkbox"/> Do not reorganize:	Samples ▼
View Options:	<input type="checkbox"/> Use top: 25	T-test / ANOVA ▼
	<input checked="" type="checkbox"/> Show cell borders	
	<input checked="" type="checkbox"/> Show only group averages	

Figura 21. Parámetros para realizar el mapa de calor en MetaboAnalyst 5.0.

Anexo G.

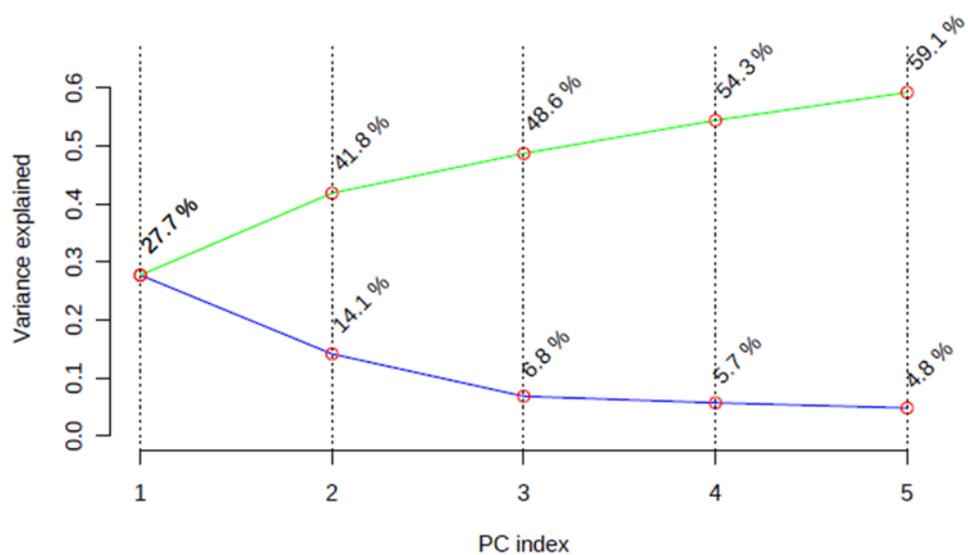


Figura 22. Gráfico de Scree. Muestra la varianza explicada por los componentes principales. La línea verde muestra la varianza explicada acumulada; la línea azul muestra la varianza explicada por cada uno de los componentes principales.