



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de la familia de genes *GLRs* en chile
habanero y el efecto del NaCl sobre sus perfiles de
expresión**

Tesis que presenta

Federico García Laynes

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Biología Integrativa)

Mérida, Yucatán, México 2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Federico García Laynes titulado “**Análisis de la familia de genes GLRs en chile habanero y el efecto del NaCl sobre sus perfiles de expresión**”, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación Agrobiología Integrativa, en el laboratorio No. 07 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 18 de abril de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  _____

Nombre: M.C. Federico García Laynes

AGRADECIMIENTOS

Agradesco al **Centro de Investigación Científica de Yucatan** por haberme permitido realizar mi estancia durante mis estudios de doctorado en sus instalaciones. A la **Unidad de Biología Integrativa** que fueron las instalaciones específicas donde me encontré realizando mi investigación durante estos años. Al **CONAHCyT** por la beca proporcionada, que fue una herramienta clave para poder culminar con mi proyecto.

A la doctora **Ileana Echevarria Machado** por todo su empeño, dedicación y esfuerzo durante el desarrollo y culminación de este proyecto. Por la motivación que emprendió en mí para continuar en este camino a través de sus palabras de ánimo y a través de la integración en diversas actividades académicas etc. Gracias por ser una excelente mentora, y por su trato humano.

Al doctor **Manuel Martinez Estevez** por su ayuda durante toda mi estancia en el CICY. Es un gran investigador, que siempre estuvo dispuesto a contribuir en este proyecto. Gracias por las facilidades otorgadas en su laboratorio, en el préstamo de reactivo y uso de equipos.

A los doctores **Felipe Sánchez Teyer**, **Ernesto Pérez Rueda**, **Georgina Estrada Tapia**, **Enrique Castaño de la Serna** y **Emanuel Bojórquez Quintal** por ser parte de este logro, ya que aportaron mucho a través de las evaluaciones realizadas. Todas sus observaciones, consejos y preguntas fueron de gran utilidad para el desarrollo de este proyecto.

A la M.C **Fátima Medina Lara** y a la M.C **Miriam Monforte González** por su gran ayuda y paciencia en el manejo de diversos equipos y reactivos del laboratorio.

A mi compañera de laboratorio **Fabiola Guadalupe Leon García** por ayudarme muchas veces en muchos de los experimentos y aportar ideas y consejos valiosos en este proyecto. Agradezco su amistad durante estos años que compartimos el laboratorio y por todos los que vendrán (que esperemos sean para siempre).

Al doctor **Fulgencio Alatorre Cobos** por su ayuda en el manejo del equipo ChemiDoc.

A mis **padres**, **hermano**, así como también a mi **esposa** por siempre apoyarme en todo momento y que sin lugar a duda son también responsables de este logro.

A **DIOS** por permitirme salud, vida, una gran familia y excelentes personas a mi alrededor

DEDICATORIAS

A mis padres, **Federico** y **Martha**. Porque siempre fueron mi fortaleza en todo momento. A pesar de las dificultades que esta vida me ha puesto, me han animado y enseñado a salir adelante. Una de las recompensas de todo su empeño en mí se ve reflejado en la culminación de esta etapa importante. Siempre estare en deuda con ustedes.

A mi hermano **Sergio**, a quien también quiero mucho. Siempre ha estado a mi lado y ha cuidado de mi desde pequeño, hasta el día de hoy que ya soy un adulto. Gracias por todo.

A mi esposa **Arale**, con quien comparto hoy mi vida, con quien comparto los momentos felices y los no tantos. Sin lugar a duda un gran apoyo.

A mi abuela **Llulla** y mi tía **Lica** porque también han estado para mí.

A todos mis amigos por creer en mí (Beto, Nacho, Fabi).

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1. Receptores de glutamato en mamíferos.....	3
1.2 Clasificación de los iGluRs en mamífero	4
1.3 Estructura y formación del tetrámero de los iGluRs.....	6
1.4 Función de los iGluRs en mamíferos.....	8
1.5 Presencia de homólogos de iGluRs en distintos organismos.	10
1.6 GLRs en plantas	11
1.7 Localización subcelular de los GLRs de plantas	14
1.8 Función de los GLRs de plantas	14
1.9 GLRs en el balance C-N	16
1.10 GLRs en la homeostasis de Ca ²⁺	16
1.11 GLRs en el estrés abiótico	16
1.13 GLRs en el desarrollo radical	18
1.14 GLRs en la regulación de la apertura estomática	18
1.15 GLRs en la reproducción.....	18
1.16 GLRs en la comunicación celular	18
1.17 Regulación transcripcional de los <i>GLRs</i> de plantas.....	19
1.18 Promotores en plantas	22

1.19 Salinidad en plantas.....	24
1.20 Entrada de NaCl en las plantas.....	25
1.21 Efectos de la salinidad.	26
1.22 Efectos provocados por la salinidad (NaCl) en plantas	27
1.23 Efecto sobre el estrés oxidativo y rendimiento de los cultivos	27
1.24 Respuesta de las plantas al estrés salino por NaCl.....	28
1.25 La tolerancia a la salinidad es dependiente del genotipo.....	28
1.26 Mecanismos de tolerancia a la salinidad por NaCl	29
1.27 Homeostasis iónica	29
1.28 Ajuste osmótico.....	30
1.29 Respuesta antioxidante.....	30
1.30 <i>Capsicum chinense</i> como modelo de estudio	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
JUSTIFICACIÓN	33
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
CAPITULO II.....	35
Análisis <i>in silico</i> de la familia de GLRs en chile habanero	35
2.1 Introducción	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.2 Identificación de secuencias <i>GLRs</i> en el genoma de chile habanero	36

2.3 Dominios presentes en los CcGLRs.....	37
2.4 Predicción de la localización subcelular de los CcGLRs	37
2.5 Diseño de cebadores para los CcGLRs	37
2.6 Identificación de ortólogos de los CcGLRs en otras especies vegetales y análisis taxonómico	38
2.7 Análisis de los valores de Ka y Ks.....	39
2.8 Análisis de duplicación de genes CcGLRs.....	39
2.9 Análisis de los promotores de los <i>CcGLRs</i>	39
RESULTADOS.....	40
2.10 Análisis de CcGLRs presentes en el genoma de <i>chile habanero</i>	40
2.11 Ortólogos presentes en el genoma de otras especies.....	44
2.12 Eventos de duplicación de los CcGLRs.....	46
2.13 Valores de Ka y Ks de los ortólogos a los CcGLRs	47
2.14 Elementos en CIS presentes en los promotores de los <i>CcGLRs</i>	48
Discusión	50
CAPITULO III.....	53
Perfil de expresión de los <i>GLRs</i> en hoja, tallo, raíz y frutos	53
INTRODUCCIÓN.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1 Material vegetal.....	53
3.2 Extracción de ARN.....	54

3.3 Síntesis de ADNc y PCR punto final de los GLRs en chile habanero	55
3.4 Análisis de la expresión de los CcGLRs en los tejidos evaluados	57
Resultados.....	57
3.5 Calidad del RNA extraído de diferentes tejidos en dos variedades de chile habanero .57	
3.6 Perfil de expresión de los <i>CcGLRs</i>	58
CAPITULO IV	63
Efecto del NaCl sobre el perfil de expresión de los CcGLRs.....	63
Introducción	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
4.1 Material vegetal.....	64
4.2 Extracción de RNA y síntesis de ADNc.....	64
4.3 PCR punto final de los CcGLR bajo condiciones de estrés salino	64
4.4 PCR tiempo real de los CcGLRs en raíces bajo estrés por NaCl.	65
4.5 Determinación del contenido de Na ⁺ y K ⁺	65
4.6 Identificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	66
4.7 Identificación de elementos en CIS que responden al estrés salino	66
4.8 Análisis estadístico.....	66
Resultados.....	67
4.8 Morfología de las plantas de chile habanero bajo 150 mM de NaCl	67
4.9 Extracción de RNA.....	67
4.10 Perfil de expresión de los GLRs bajo condiciones de salinidad por NaCl.....	68

4.11 Contenido de Na ⁺ y K ⁺ en hoja, tallo y raíz	71
4.12 Presencia de especies reactivas de oxígeno	73
4.13 PCR en tiempo real de CcGLRs.....	74
4.14 Elementos en CIS que responden al estrés salino	75
CAPITULO V.	78
DISCUSIÓN GENERAL	78
CAPITULO VI	81
CONCLUSIONES Y PERPECTIVAS	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82
ANEXO	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación estructural de los iGluRs y los mGluRs.....	4
Figura 1.2 Clasificación de los iGluRs.....	5
Figura 1.3 Dominios de los iGluRs y la estructura tridimensional del tetrámero..	7
Figura 1.4 Ensamblaje de un iGluR. El ensamblaje del receptor se inicia con la formación de un dímero a través de dos subunidades individuales (monómero).....	8
Figura 1.5 Algunos organismos en donde se han identificados secuencias homologas a los iGluRs.....	11
Figura 1.6 Dominios característicos de los GLRs. S1-S2.	12
Figura 1.7 Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de GLRs e iGluRs.....	13
Figura 1.8 Procesos en los que se ha demostrado la participación de los GLRs de plantas. Imagen creada con información de Weiland <i>et al.</i> , (2016).....	16
Figura 1.9 Función de algunos GLRs en la tolerancia al estrés hídrico.....	17
Figura 1.10 Sitios de expresión y localización algunos AtGLRs	22
Figura 1.11 Clasificación de un promotor con base a la distancia al sitio de inicio de la transcripción (Inr)	23
Figura 1.12 Representación del proceso de regulación de la expresión de un gen..	24
Figura 2. 1 Dominios presentes en los CcGLR de chile habanero.....	42
Figura 2. 2 Distribución de los <i>CcGLRs</i> en los cromosomas de chile habanero	43
Figura 2. 3. Árbol taxonómico de especies divergentes e identificación de secuencias ortólogas a los CcGLRs.....	45
Figura 2. 4 Valores de Ka y Ks de todas las especies vegetales.....	48
Figura 2. 5. Elementos en CIS presentes en los promotores de los <i>CcGLRs</i>	50
Figura 3. 2. Perfil de expresión de los CcGLRs de chile habanero mediante PCR punto final...59	59
Figura 3. 3. Diagrama de Venn sobre la presencia de los CcGLRs en hoja, tallo y raíz.	60
Figura 3. 4. Perfil de expresión de los <i>CcGLRs</i> de chile habanero.....	61
Figura 4. 1 Plantas de la variedad Mayan Kisin bajo estrés por NaCl.	67
Figura 4. 2 Extracción de ARN de hojas y raíces de plantas de chile habanero.	68

Figura 4. 3 perfil de expresión de los GLRs de la familia IV bajo condiciones de estrés salino..	69
Figura 4. 4 Perfil de expresión de los CcGLRs de la familia II bajo condiciones de estrés salino.....	70
Figura 4. 5 Perfil de expresión de los CcGLRs de la familia III bajo condiciones de estrés salino.....	70
Figura 4. 7 Contenido de Na ⁺ en hoja, tallo y raíz de plantas sometidas a estrés por NaCl.....	72
Figura 4. 11 Elementos en Cis presente en los promotores en respuesta al déficit hídrico..	76
Figura 4. 12 Frecuencia de los elementos en CIS presentes en los promotores de los CcGLRs.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar la familia de los CcGLRs.	37
Tabla 2. 2 CcGLR identificados en el genoma de chile habanero. En el cuadro se muestran las características de cada secuencia.	40
Tabla 2. 3 Predicción de la localización subcelular de los CcGLRs. Para la predicción se utilizaron tres herramientas bioinformáticas. MP: membrana plasmática, NU: núcleo.	43
Tabla 2. 4 Genes CcGLR duplicados y sus valores de Ka y Ks	46
Tabla 2. 5 Promotores putativos de los <i>CcGLRs</i>	48

ABREVIATURAS

GluR.....Receptores de glutamato

iGluRs.....Receptores de glutamato inotrópicos

mGluRs..... Receptores de glutamato metabotrópicos

SNC.....Sistema nerviosos central

C-NCarbono-Nitrógeno

FT.....Factor de transcripción

NSCC..... Canales catiónicos no selectivos

RESUMEN

Los receptores de glutamato de plantas (GLRs) son un objeto de estudio muy importante en la actualidad debido a que se ha encontrado que participan en muchos procesos dentro de la célula. Dentro de estos procesos se encuentra el balance carbono-nitrógeno (C-N), la homeostasis de calcio y los factores bióticos y abióticos, donde la respuesta al estrés por sequía, frío, daño mecánico y salinidad, son de los factores más estudiados. A pesar de todo el conocimiento generado a la fecha, aún no se han podido establecer funciones específicas para ellos, ni la manera en la que actúan. Las evidencias sugieren que al igual que su contraparte en animales (los cuales son receptores altamente especializados), los GLR de plantas pueden funcionar como canales catiónicos no selectivos (NSCC) activados por ligando y, de esta manera, funcionar como sensores de señales (no se conoce el ligando en plantas), desencadenando el flujo de cationes como paso siguiente en la transducción de señales. Este trabajo pretende ampliar el conocimiento de los GLRs en una especie de importancia agrícola, como lo es *Capsicum chinense* Jacq., a través del estudio de las secuencias presentes en su genoma y el perfil de expresión de éstos en los diferentes órganos de la planta. Igualmente, la identificación de posibles secuencias GLRs que estén involucradas en la respuesta de chile habanero a la salinidad fue otro de los objetivos abordados en este estudio.

ABSTRAC

The plant glutamate receptors (GLRs) are currently a highly important subject of study due to their involvement in numerous cellular processes. These processes include carbon-nitrogen (C-N) balance, calcium homeostasis, and biotic and abiotic factors, with responses to stress factors such as drought, cold, mechanical damage, and salinity being among the most studied. Despite the considerable body of knowledge generated to date, specific functions for GLRs and their mode of action have yet to be fully established. Evidence suggests that similar to their counterparts in animals (which are highly specialized receptors), plant GLRs may function as non-selective cation channels (NSCCs) activated by ligands, thus serving as signal sensors (the ligand in plants remains unknown), triggering the subsequent flow of cations as the next step in signal transduction. This work aims to expand our understanding of GLRs in a species of agricultural importance, such as *Capsicum chinense* Jacq., through the study of sequences present in its genome and the expression profile of these receptors in different plant organs. Additionally, the identification of potential GLR sequences involved in the response of habanero pepper to salinity was another objective addressed in this study.

INTRODUCCIÓN

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) son proteínas integrales de membrana que se descubrieron inicialmente en mamíferos. En estos organismos estas proteínas son los principales actores de procesos esenciales como la memoria, el aprendizaje y la plasticidad sináptica (Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2017; Mukherjee & Manahan-Vaughan, 2013; Traynelis *et al.*, 2010).

Inesperadamente este tipo de proteínas se identificaron en plantas en 1998 por Lam y colaboradores (Lam *et al.*, 1998) y hasta la fecha se ha demostrado su participación en procesos celulares como el balance C-N (Kang *et al.*, 2004), la homeostasis de Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2001), la inmunidad (Sun *et al.*, 2019), la respuesta al estrés por frío, la sequía y la salinidad (Lu *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014). Sin embargo, no se tiene un panorama completo sobre la función de estas proteínas en plantas. Los factores que han limitado el estudio de estos receptores son la dificultad de su clonación debido a la longitud del gen, la complejidad de su aislamiento por su localización en membrana, así como también el ensamblaje en una estructura tetramérica para formar el receptor activo (Weiland *et al.*, 2016).

La mayoría de las investigaciones realizadas que aportan conocimiento sobre esta familia de proteínas han sido desarrolladas casi en su totalidad en *Arabidopsis thaliana* (Weiland *et al.*, 2016). En especies de importancia agrícola solo hay reportes de GLRs en tomate (Aouini *et al.*, 2012), arroz (Singh *et al.*, 2014), caña de azúcar (Zhang *et al.*, 2022), vainilla (Zhu & Li, 2023), fresa, pera, ciruela y durazno (Chen *et al.*, 2016).

Por otro lado, la mayoría de los cultivos de importancia agrícola son glicófitas, es decir, son sensibles a la salinidad, dando como resultado efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas o incluso la muerte (Zhou *et al.*, 2024). Esto incide en el hecho de este factor afecta directamente en la producción y rendimiento de los cultivos, dando lugar a pérdidas económicas (Ondrasek *et al.*, 2022). Sin embargo, a pesar de que los mecanismos moleculares desencadenados por la salinidad en las plantas se han estudiado ampliamente, las proteínas involucradas en ellos no se conocen en su totalidad (Xiao & Zhou, 2023).

En este proyecto se aborda el papel de los GLR en plantas sometidas a salinidad utilizando como modelos de estudio a chile habanero (*C. chinense* Jacq.). Esta especie vegetal es de importancia agrícola y cultural para el estado de Yucatán. Además, existen reportes de la existencia de variedades tolerantes a la salinidad en esta especie (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014), lo cual las hace un excelente modelo para el estudio sobre la participación de los GLRs en la tolerancia a este estrés. Parte importante del proyecto propuesto fue realizar el estudio sobre la regulación de la expresión de estas proteínas a nivel de sus promotores.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1. Receptores de glutamato en mamíferos

Procesos esenciales como la memoria, el aprendizaje, desarrollo de redes neuronales y plasticidad sináptica en mamíferos se atribuye en gran parte a la función de un grupo de proteínas denominadas receptores de glutamato (Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2017; Mukherjee & Manahan-Vaughan, 2013; Lisman, Yasuda, & Raghavachari, 2012; Monaghan, Bridges, & Cotman, 1989). Las proteínas GluRs juegan un papel fundamental en la comunicación celular de mamíferos y la ineficiente regulación de las mismas da como resultado la presencia de enfermedades neurológicas graves como el Parkinson, la epilepsia, el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la depresión, entre otras muchas enfermedades (Sobolevsky, 2015; Traynelis, *et al.*, 2010).

Los GluRs presentan un sitio de unión al ligando (glutamato) que al ser ocupado induce un cambio conformacional de este tipo de receptores, lo cual ocasiona la apertura de un canal a través de la membrana por donde pueden pasar cationes de manera no selectiva o generando la activación de una cascada de señalización a través de la producción de segundos mensajeros (Willard & Koochekpour, 2013). La activación de los GluRs debida a la unión de su ligando produce cambios en los potenciales de membrana que son la base de las neurotransmisiones a través de todo el sistema nervioso central (SNC).

Los GluRs, de acuerdo a su mecanismo de acción, estructura y secuencia de aminoácidos, se clasificaron en receptores inotrópico de glutamato (iGluRs) y receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). Los iGluRs pertenecen a los canales catiónicos no selectivos (NSCC por sus siglas en ingles) en los que el receptor activo se estructura por el ensamblaje de cuatro subunidades individuales (tetrámero, **Figura 1.1-A**), que forman un poro, el cual presenta una apertura gradual dependiendo del grado de saturación de los sitios de unión a ligando de cada una de las subunidades que estructuran al receptor. En el caso de los mGluRs también presentan un sitio de unión al ligando, pero no forma un canal iónico en su estructura. Estos receptores forman dímeros en su forma activa (**Figura 1.1-B**) y funcionan acoplados a proteína G que, al ser activadas, desencadenan cascadas de

señalización y, por ende, la producción de segundos mensajeros intracelulares (Reiner & Levitz, 2018; Willard & Koochekpour, 2013).

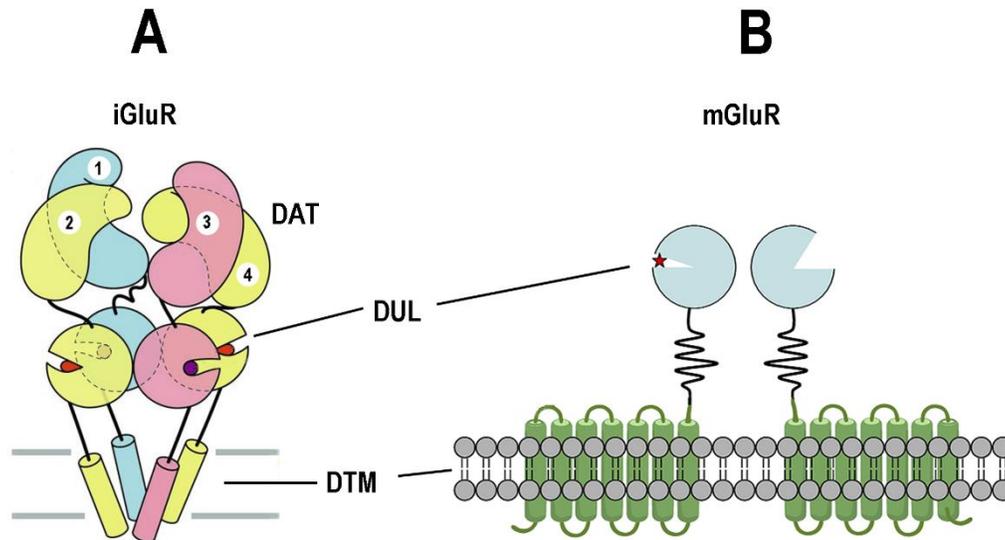


Figura 1.1 Representación estructural de los iGluRs y los mGluRs. En A, se muestra la estructura tetramérica activa de los iGluRs y en B el dímero de los mGluRs. DAT: dominio amino terminal, DUL: dominio de unión a ligando, DTM: dominios transmembranales (Lü et al., 2017; Topiol et al., 2011).

Grandes esfuerzos se han realizado en la elucidación de los mecanismos de acción de los iGluRs y los mGluRs debido a los papeles que ejercen en mamíferos y que fueron ya mencionados. Los iGluRs son el grupo de proteínas más estudiados debido a su rápida respuesta de acción; principalmente, debido a que en su estructura forman un canal catiónico que tiene apertura inmediatamente después de la unión del ligando (Reiner & Levitz, 2018)

1.2 Clasificación de los iGluRs en mamífero

Los iGluRs son proteínas integrales de membrana que se constituyen de cuatro subunidades individuales. Estos receptores se clasificaron con base a estudios farmacológicos y electrofisiológicos en los del tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato), KAINATO (ácido kaínico), y NMDA (N-metil-D-aspartato) (Dingledine *et al.*, 1999). Posteriormente, aparecieron los receptores DELTA (δ) a través de

la búsqueda de secuencias homologas (mostrando de un 16-25 % de identidad en secuencia de aminoácidos con otros iGluRs), los cuales no forman canales funcionales por sí mismos, ni se ha demostrado que modifique las propiedades farmacológicas a través de la combinación de subunidades con los otros receptores mencionados (Lomeli *et al.*, 1993).

En mamíferos se han identificado 18 secuencias de proteínas que muestran una longitud entre 894 hasta casi 1500 residuos de aminoácidos, así como también se han identificado variantes de procesamiento alternativo del ARN de muchas de las subunidades de iGluRs (Traynelis *et al.*, 2010).

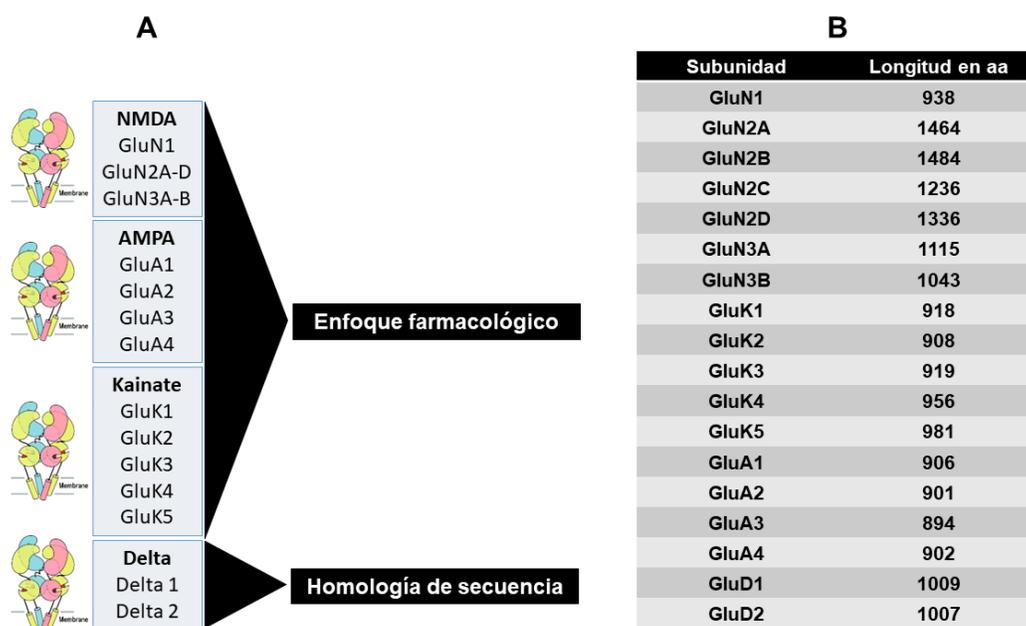


Figura 1.2 Clasificación de los iGluRs. En **A**, se muestran los cuatro grupos en los que se clasificaron este tipo de receptores. En el caso de los NMDA, AMPA y KAINATO se utilizó el enfoque farmacológico y los receptores DELTA se identificaron a través de la búsqueda de secuencias homologas. En **B**, se muestra la longitud de las 18 subunidades de los iGluRs en aminoácidos

Estas variantes aumentan el número de subunidades disponibles para la estructuración de receptores y a su vez modificar las propiedades farmacológicas. De las subunidades del receptor tipo AMPA cuatro muestran procesamiento alternativo (GluA1-GluA4), de los del tipo KAINATO las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3 y de los del tipo NMDA solo se ha

reportado a la subunidad GluN1 que muestra ocho variantes. Estas modificaciones generalmente se dan en el dominio carboxilo terminal (Dingledine *et al.*, 1999).

1.3 Estructura y formación del tetrámero de los iGluRs

Las subunidades individuales de los iGluRs contienen un dominio amino terminal (DAT), dos dominios de unión al ligando (DUL), tres dominios transmembranales y un dominio más que no atraviesa completamente la membrana y, por último, un dominio carboxilo terminal (**Figura 1.3-A**).

Sobolevsky *et al.*, (2009) mostraron por primera vez en alta resolución la estructura tetramérica de los receptores de glutamato, y en la Figura 1.3-B puede observarse como se ensamblan cada uno de los dominios de las subunidades. El ensamblaje de las cuatro subunidades es la forma funcional del receptor, tanto para percibir las señales de moléculas agonista como para la formación del canal iónico (Traynelis *et al.*, 2010).

En lo que respecta a como se agrupan las subunidades de los iGluRs tenemos que las subunidades GluA y GluK perteneciente a los receptores AMPA y KAINATO, respectivamente, pueden formar homo o heterotetrámeros y, de esta manera, son capaces de modificar sus propiedades farmacológicas y posiblemente fisiológicas dentro de la célula (Greger *et al.*, 2017). Los receptores del tipo NMDA únicamente pueden formar

heterotetrámeros para formar el receptor activo (Paoletti et al., 2013).

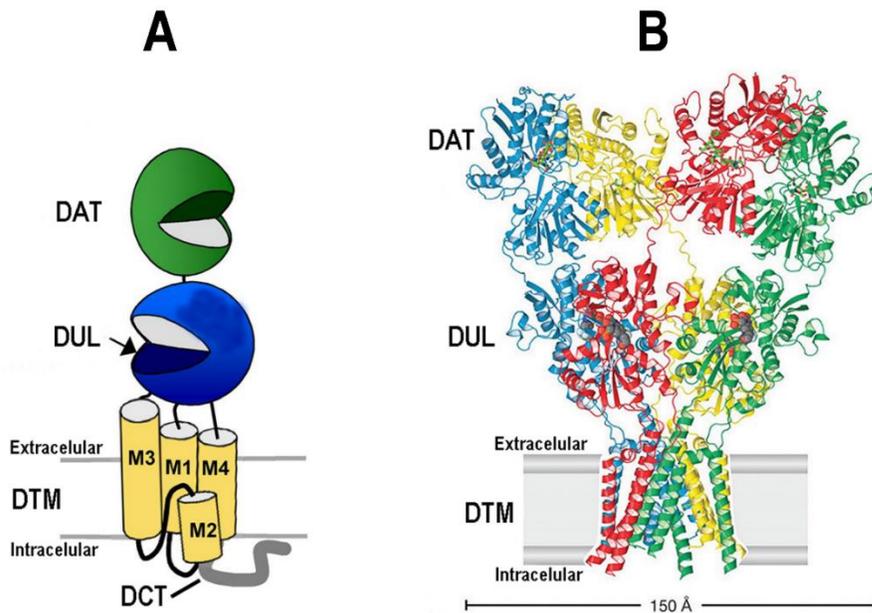


Figura 1.3 Dominios de los iGluRs y la estructura tridimensional del tetrámero. En **A**, se muestran los dominios característicos de los iGluRs: dominio amino terminal (DAT), el dominio de unión al ligando (DUL), los dominios transmembranales (DTM, que abarcan del M1-M4) y el dominio carboxilo terminal. En **B**, se muestra la estructura tridimensional del receptor AMPA (Sobolevsky *et al.*, 2009).

De acuerdo con Madden, (2002), el ensamblaje del receptor funcional comienza con la formación de dímeros a través de la interacción de los DAT de cada subunidad del receptor. Posteriormente, dos dímeros son unidos a través de interacciones entre los dominios S2 y los transmembranales (se le conoce como dímero de dímeros), dando lugar al complejo tetramérico que forma el GluR funcional (Figura 1.4).

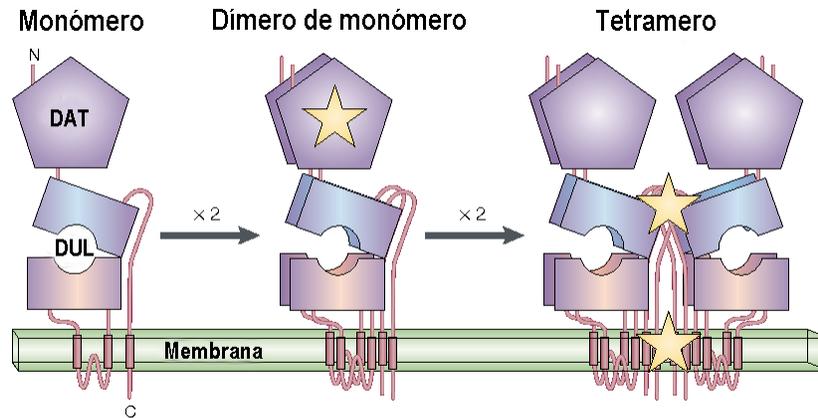


Figura 1.4 Ensamblaje de un iGluR. El ensamblaje del receptor se inicia con la formación de un dímero a través de dos subunidades individuales (monómero). Posteriormente, dos dímeros se unen a través del dominio de unión al ligando y de los dominios transmembranales para formar el receptor activo (modificado de Madden, 2002).

1.4 Función de los iGluRs en mamíferos

A través del SNC la mayoría de las neurotransmisiones son realizadas por los iGluRs. Estas señales son transmitidas a través del flujo de entrada de cationes como Na^+ , K^+ , y/o Ca^{2+} , a través del poro del receptor, el cual se activa (apertura del poro) por la unión del agonista (Zhu & Gouaux, 2017; Traynelis *et al.*, 2010). Dentro del SNC los tres tipos de iGluRs (AMPA, KAINATO y NMDA) tienen funciones esenciales, las cuales se describen a continuación para cada uno de ellos.

Los receptores tipo NMDA han sido los más estudiados dentro de los iGluRs, debido a su papel central en la comunicación celular y en la función que desempeñan como consecuencia de su actividad en varios procesos neurológicos, que abarcan desde la memoria y el aprendizaje, hasta problemas neurodegenerativos (Paoletti, Bellone, & Zhou, 2013; Traynelis *et al.*, 2010; Lau & Tymianski, 2010). Por otro lado, Bard & Groc, (2011) mencionan que la principal actividad de estos receptores se centra en la plasticidad neuronal y en la exotoxicidad debido a una mala regulación. Estos procesos son el resultado de una fina regulación del flujo de entrada de Ca^{2+} en las neuronas o de una desregulación, respectivamente, llevadas a cabo por este tipo de receptores (Traynelis *et al.*, 2010). Con respecto a la selectividad iónica se ha reportado que este tipo de receptores

puede transportar Na^+ , Ca^{2+} y K^+ (Bard & Groc, 2011), aunque otros autores mencionan que estos receptores tienen mayor preferencia por el Ca^{2+} que cualquier otro catión (Zhu & Gouaux, 2017).

Los receptores tipo KAINATO y AMPA presentan una homología hasta del 25% entre sí. A estos dos tipos de receptores se les conoce también como de tipo no NMDA, esto con base en que pueden ser activados de manera cruzada por sus ligandos o agonistas (Traynelis *et al.*, 2010; Lau & Tymianski, 2010). Los receptores tipo KAINATO son los menos estudiados de los tres tipos de iGluRs. Estos se relacionan con diversos procesos como la integración sináptica, la plasticidad neuronal, la regulación de la liberación de los neurotransmisores y el control de la excitabilidad neuronal, debido a que una disfunción de los receptores tipo KAINATO conducen a un desbalance en la excitación o inhibición en el SNC, dando como consecuencias especialmente manifestaciones de epilepsias en mamíferos (Popov *et al.*, 2017). Por otra parte, una desregulación de estos receptores puede conducir a graves problemas neurológicos, como el autismo, el retraso mental, la esquizofrenia, la enfermedad de Huntington, la depresión, desordenes bipolares, entre otras anomalías (Lerma & Marques, 2013; Vincent & Mulle, 2009). En los receptores tipo KAINATO la selectividad iónica reportada es preferentemente para los cationes Na^+ y K^+ y en menor medida para el Ca^{2+} (Popov *et al.*, 2017).

Los receptores tipo AMPA son los encargados de la mayoría de las neurotransmisiones excitatorias del SNC. Para desencadenar la señal el glutamato se une al sitio de unión al ligando, dando como resultados la apertura del poro y el paso de los cationes (Traynelis *et al.*, 2010). Dentro de las funciones a las que se han ligado estas proteínas están el aprendizaje y la memoria (Derkach *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando existen problemas de regulación en este tipo de receptores se pueden desencadenar enfermedades graves, similares a las anteriores, como la epilepsia, la esquizofrenia, el retraso mental, entre otras (Traynelis *et al.*, 2010). En lo que respecta a su selectividad iónica, estudios reportan que estos receptores tienen selectividad por el Na^+ y el Ca^{2+} (Greger *et al.*, 2017; Derkach *et al.*, 2007).

Muchos de los procesos realizados por estos receptores son muy parecidos, tanto en la activación como en el desencadenamiento del flujo de cationes; sin embargo, las propiedades farmacológicas son características tanto del tipo de receptor (AMPA, NMDA y

KAINATO) como de la combinación de las subunidades. Las consecuencias del mal funcionamiento de estas proteínas también conducen a desórdenes neurológicos graves parecidos entre los tipos de iGluRs (Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2017).

1.5 Presencia de homólogos de iGluRs en distintos organismos.

Homólogos a los iGluRs de animales han sido identificados en tres dominios filogenéticos de la vida (Wudick *et al.*, 2018). En humanos es donde se tiene un mayor conocimiento sobre la función de estas proteínas; sin embargo, se han identificados secuencias homólogas en *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Traynelis *et al.*, 2010; Maricq *et al.*, 1995; Ultsch *et al.*, 1993).

Sorprendentemente, secuencias homólogas a los iGluRs a las cuales se les denominó GLRs (Glutamate-Like Receptors, por sus siglas en inglés) se han identificado en organismos que carecen de un SNC como lo son las bacterias, las algas y las plantas (De Bortoli *et al.*, 2016) (**Figura 1.5**). En el genoma bacteriano generalmente existe la presencia de una sola secuencia homóloga por especie, un ejemplo es el GLR0 encontrado en *Synechocystis*, el cual presenta homología de secuencia y mantiene a glutamato como ligando, pero a diferencia de los iGluRs muestra selectividad por K^+ . Una diferencia estructural muy marcada es que los receptores bacterianos no contienen el largo dominio N-terminal de los receptores eucarióticos, pero sí conservan los dominios de unión al ligando y los dominios transmembranales formadores del canal (Chen *et al.*, 1999).

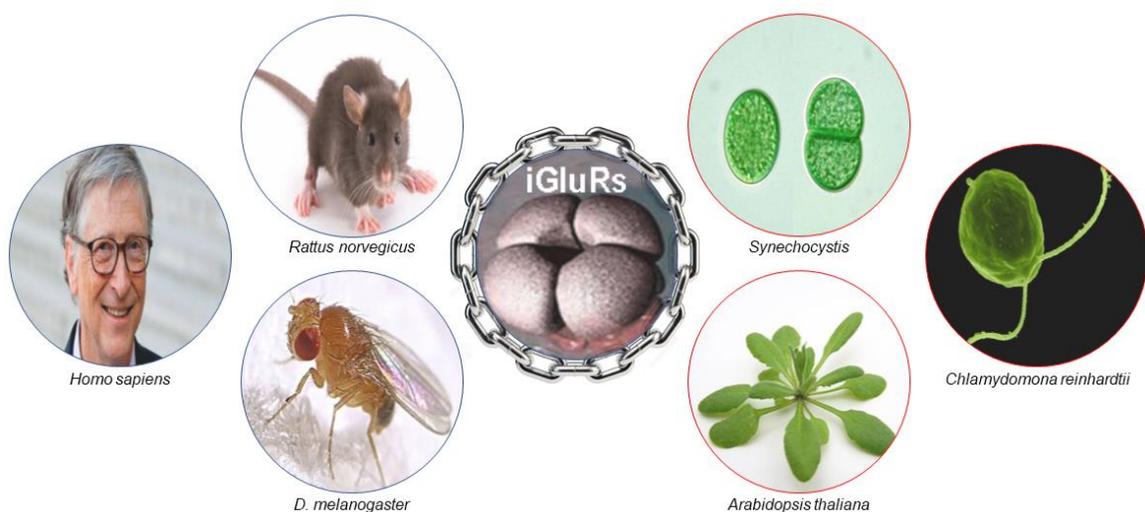


Figura 1.5 Algunos organismos en donde se han identificados secuencias homologas a los iGluRs (Imagen creada con información de Weiland *et al.*, (2016)).

En el caso de las algas, secuencias GLRs homólogas se han identificado en las Chlorophytas, Cryptophytas y Streptophytas. El número de GLRs encontrados varió de 1 hasta 13 secuencias, dependiendo de la especie de alga y las subunidades contenidas difirieron a las secuencias encontradas en bacterias, especialmente en que éstas contenían un dominio AMT y DCT (De Bortoli *et al.*, 2016).

En plantas, Lam *et al.*, (1998) encontraron por primera vez secuencias homólogas en el genoma de *A. thaliana* a través de un análisis de comparación de secuencias utilizando los iGluRs de mamíferos como anzuelos. En esta especie se identificaron 20 secuencias, a las cuales se les denominó GLRs. Estas secuencias mostraron una homología de hasta 25% y 39% en los sitios de unión al ligando y en la regiones formadoras del canal, respectivamente, cuando se compararon con las secuencias de las proteínas de animales (Chiu *et al.*, 2002). Cabe destacar que se han identificado GLRs en otra especies de plantas (Weiland *et al.*, 2016).

1.6 GLRs en plantas

Los GLRs de plantas fueron identificados por primera vez en *A. thaliana* a través de un análisis de comparación de secuencias de aminoácidos. Las dos secuencias identificadas inicialmente (GLR1 y GLR2) presentaban una homología del 16 al 63% y contenían todos los dominios característico de los iGluRs de animales (Lam *et al.*, 1998), como se observa en la **Figura 1.6**.

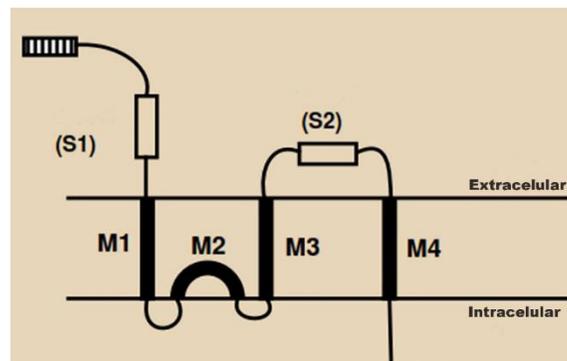


Figura 1.6 Dominios característicos de los GLRs. S1-S2: dominios de unión al ligando; M1, M2, M3 y M4: dominios transmembranales. En la parte anterior al S1 se representa el dominio amino terminal y en la parte siguiente al dominio M4 se encuentra el dominio carboxilo terminal (Lam *et al.*, 1998).

Con la liberación del genoma completo de *A. thaliana* se logró la identificación de 20 secuencias GLRs, denominadas como AtGLRs con base al nombre de la especie vegetal. Los resultados del análisis filogenético de estas secuencias muestran que se agrupan en tres clados distintos (clado I, II y III). Para el análisis se utilizaron las 18 secuencias disponibles de los iGluRs de animales (AMPA, NMDA y KAINATO) y dos secuencias GLRs de procariotas (Chiu *et al.*, 2002). La clasificación de los 20 GLRs en tres clados distintos sentó las bases para la nomenclatura de las secuencias identificadas y como ayuda en la clasificación de nuevas secuencias identificadas en otras especies vegetales.

En la actualidad se han identificado GLRs en otras especies vegetales como tomate y arroz, especies de importancia agrícola a nivel mundial (Singh *et al.*, 2014; Aouini *et al.*, 2012). En el genoma de tomate se reportaron 13 secuencias *SIGLRs*; sin embargo, muy poco se sabe sobre su papel en la planta (Aouini *et al.*, 2012). En arroz se identificaron 24 secuencias *OsGLRs*, lo cual aumenta las posibilidades de estar implicados en muchos procesos fisiológicos (Singh *et al.*, 2014). Estos *OsGLRs* son unos de los más caracterizados después de las secuencias *AtGLRs* (Weiland *et al.*, 2016).

Con las secuencias disponibles Weiland *et al.*, (2016) realizaron un análisis filogenético de los GLRs disponibles de tomate, arroz, *Arabidopsis*, una secuencia proveniente de la cianobacteria *Synechocystis* (GluR0), dos secuencias de canales de potasio procarióticos: KscA, a partir de *Streptomyces lividans* y MthKa, partir de *Methanobacterium thermoautotrophicum* y las 18 secuencias iGluRs identificadas en el genoma de *Rattus norvegicus* (**Figura 1.7**). El análisis se realizó por el método de neighbour joining en MEGA6, con valores de bootstrap de 150 repeticiones.

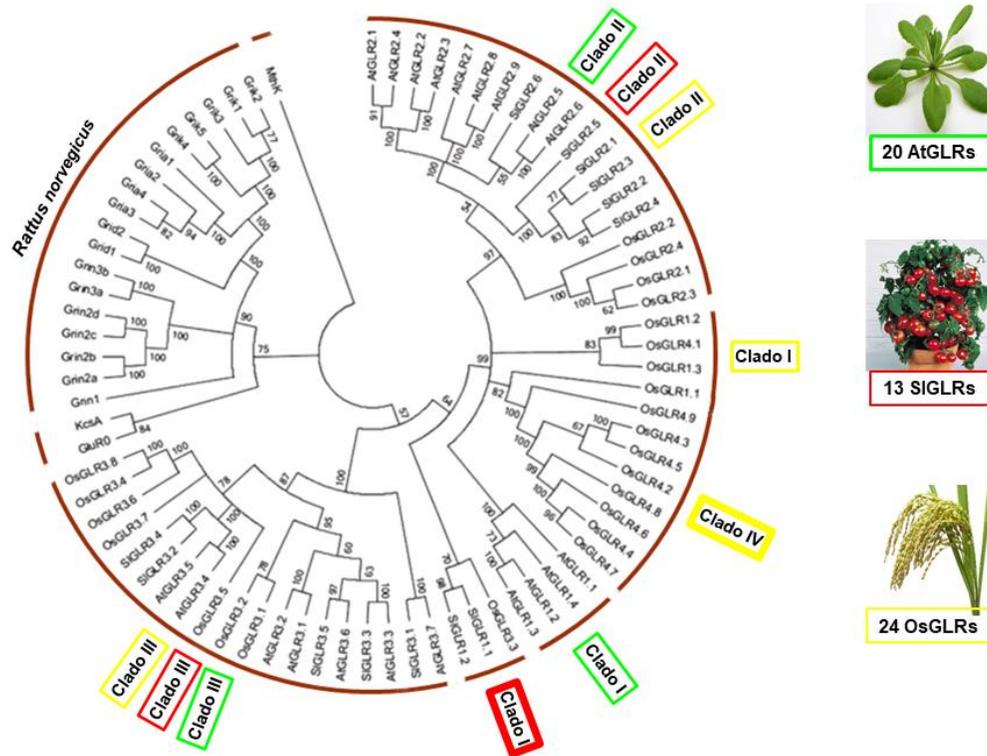


Figura 1.7 Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de GLRs e iGluRs. Las secuencias analizadas fueron: 20 de *A. thaliana* (AtGLR), 24 de *O. sativa* (OsGLR), 23 de *S. lycopersicum* (SIGLR), una de la cianobacteria *Synechocystis* (GluR0), dos de canales de potasio procarionticos (KcsA y MthK) y 18 iGluRs de *Rattus norvegicus*. El análisis se realizó por el método de neighbour joining muestra con valores de bootstrap de 150 repeticiones (Modificado de Weiland *et al.*, 2016).

El árbol construido a partir de las secuencias mencionadas muestra que los clados II y III son los más conservados entre las especies vegetales en estudio y sugiere una relación entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, posiblemente en la función de los GLRs que se agrupan en esos clados. Por otro lado, el clado I de arroz, tomate y *Arabidopsis* no se agrupan en un mismo clado, sugiriendo que posiblemente surgieron a partir de eventos de duplicación (Weiland *et al.*, 2016). En el árbol se muestra un clado IV perteneciente a secuencias de arroz. Este clado posiblemente fue perdido en las monocotiledóneas; sin embargo, pueden estar ejerciendo papeles muy importantes en esta monocotiledónea.

A pesar de que ya se han descubierto algunos GLR en plantas, la función que desempeñan en el reino vegetal no ha sido definida totalmente. Por ello, se requieren más estudios para

identificar y caracterizar GLRs presentes en otras especies vegetales y la función que ejercen en cada una de ellas.

1.7 Localización subcelular de los GLRs de plantas

Los iGluRs identificados en mamíferos se localizan en las membranas de las células post-sinápticas (neuronas) donde ejercen su función (Zhu & Gouaux, 2017; Traynelis et al., 2010). En plantas poco se conoce sobre la localización de estas proteínas en la célula. De las 20 secuencias identificadas en *A. thaliana* solo se ha demostrado la presencia en la membrana plasmática de los AtGLRs 1.4, 3.2, 3.3 y 3.4 (Vincill et al., 2013; Vincill et al., 2012; Tapken & Hollmann, 2008).

Inicialmente se pensó que los GLR solo estaban presentes en la membrana plasmática; sin embargo, se ha demostrado a través de análisis bioquímicos y genéticos su presencia en mitocondrias y cloroplastos, aunque no se sabe qué función estén realizando en estos organelos. El direccionamiento a una membrana específica está dado por el procesamiento alternativo del ARNm del mismo GLR (AtGLR3.5) (Teardo et al., 2015). También, se conoce el direccionamiento del AtGLR3.3 a la membrana del tonoplasto en células del tubo polínico de *A. thaliana* (Wudick, et al., 2018). Estos resultados indican el grado de especialización de los GLRs de plantas, los cuales pueden estar implicados en muchos procesos celulares. Por tanto, este es un campo muy grande que tiene que ser investigado para armar el rompecabezas completo sobre la función de los GLRs.

1.8 Función de los GLRs de plantas

En mamíferos los iGluRs son los principales responsables de las neurotransmisiones a través del SNC (Traynelis et al., 2010). En plantas hasta la fecha no se conoce la presencia de un SNC ni de un sistema homólogo que permita la señalización rápida y a larga distancia. La identificación de secuencias GLRs en el genoma de plantas abrió un amplio campo de estudio en la elucidación de que papeles están jugando estas proteínas en estos organismos (Lam et al., 1998).

A pesar de la importancia de conocer la función de los GLRs, es una tarea muy difícil debido a los problemas de clonación y expresión en sistemas heterólogos, además del alto grado de redundancia que existe entre ellos. Sin embargo, desde el descubrimiento de los GLRs

en plantas, se han realizado diferentes estudios con la finalidad de determinar su función biológica (Weiland *et al.*, 2016).

Contrario a la alta especialización de los iGluRs en animales, los GLRs encontrados en plantas parecen estar involucrados en una gran variedad de procesos biológicos. Cabe resaltar también que todas las funciones fisiológicas documentadas hasta el momento de los GLRs están relacionadas con su capacidad de permitir el flujo de Ca^{2+} (Wudick *et al.*, 2018; Weiland *et al.*, 2016).

Dentro de los procesos biológicos en los que se ha implicado a los GLRs de plantas se encuentra el metabolismo del Carbono-Nitrógeno (C-N) (Kang *et al.*, 2004; Kang & Turano, 2003), la homeostasis de Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2001), la respuesta al estrés biótico y abiótico (Lu *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2006; Meyerhoff *et al.*, 2005), el desarrollo radicular (Singh *et al.*, 2016; Vincill *et al.*, 2013), la regulación de la apertura estomática (Cho *et al.*, 2009), el desarrollo reproductivo (Singh *et al.*, 2014; Michard *et al.*, 2011) y la señalización a larga distancia (Mousavi *et al.*, 2013) (**Figura 1.8**).

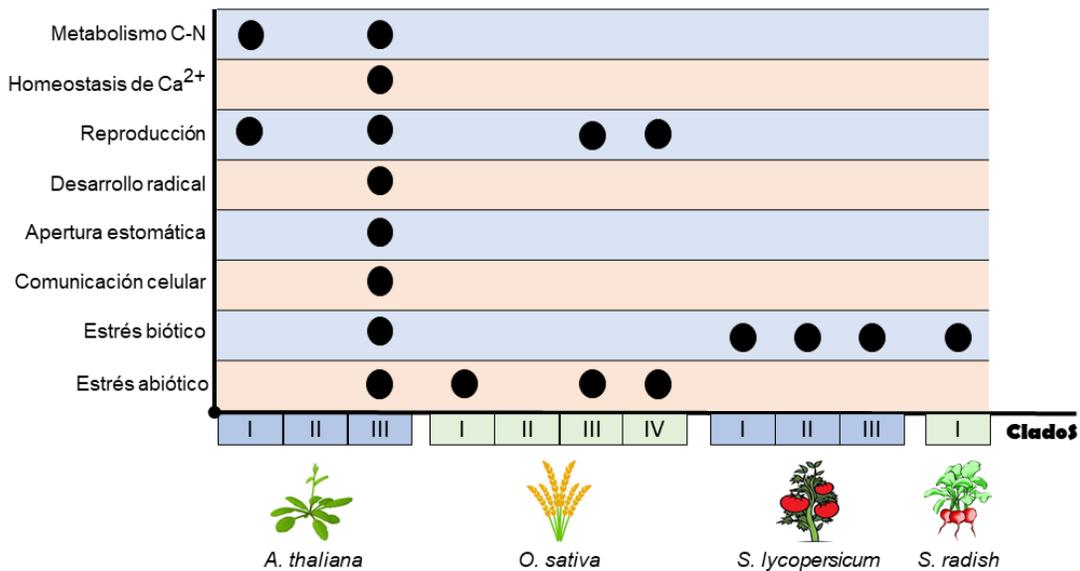


Figura 1.8 Procesos en los que se ha demostrado la participación de los GLRs de plantas. Imagen creada con información de Weiland *et al.*, (2016).

1.9 GLRs en el balance C-N

En el balance C-N, Kang & Turano, (2003) demostraron que el AtGLR1.1 funciona como un regulador del contenido de estos dos elementos, ya que en líneas de *A. thaliana atglr1.1*, cuando se colocan en condiciones de germinación en un medio que solo contiene una fuente de carbono (sacarosa) y no de nitrógeno, las semillas no germinan. Cuando el balance C-N se restablece agregando al medio una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno la germinación se restablece en las semillas de la línea *atglr1.1*. Una manera en que las plantas posiblemente realicen el censado del balance C-N es a través del tejido vascular. Vincill *et al.*, (2013) mostraron que las proteínas AtGLR3.2 y AtGLR3.4 están presentes únicamente en el floema, lo cual puede sugerir que estén participando como sensores de la condición nutricional de la planta a través del censado de aminoácidos.

1.10 GLRs en la homeostasis de Ca²⁺

La homeostasis de Ca²⁺ es un proceso muy importante, ya que al ser un segundo mensajero por excelencia la concentración celular de este elemento tiene que ser finamente regulado (Edel *et al.*, 2017). En este contexto se ha demostrado la participación de GLRs de plantas. En una línea transgénica de *A. thaliana* que sobre expresa el AtGLR3.2 da como resultado una deficiencia severa de Ca²⁺, así como también se observa el efecto fisiológico de color marrón en las hojas y necrosis en las extremidades (Kim *et al.*, 2001b)

1.11 GLRs en el estrés abiótico

La participación de los GLRs en la respuesta al estrés biótico y abiótico es un campo donde se ha invertido mucho trabajo de investigación, esto debido a que son problemas emergentes que golpean directamente en la seguridad alimentaria global actual y en el futuro. En la respuesta al estrés abiótico, un ejemplo contundente del papel de los GLRs en el estrés hídrico es el demostrado por Lu *et al.*, (2014), en el que se observa una gran tolerancia al estrés por sequía en plantas de *Oryza sativa* y *A. thaliana* cuando se sobreexpresan *OsGLR1.1* y *OsGLR1.3*, comparado con las plantas testigo no transformadas (**Figura 1.9**). Singh *et al.*, (2014) reportaron a través de ensayos con microarreglos que, bajo condiciones de estrés por frío, sequía o salinidad se induce la

expresión de *OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.6*, *OsGLR4.7* y *OsGLR4.9* en plantas de arroz, lo que muestra la versatilidad de los GLRs ante los diferentes tipos de estrés. En otro reporte también se encontró que el *AtGLR 3.4* modifica su expresión en condiciones de estrés por frío, estrés osmótico o daño mecánico (Meyerhoff *et al.*, 2005).

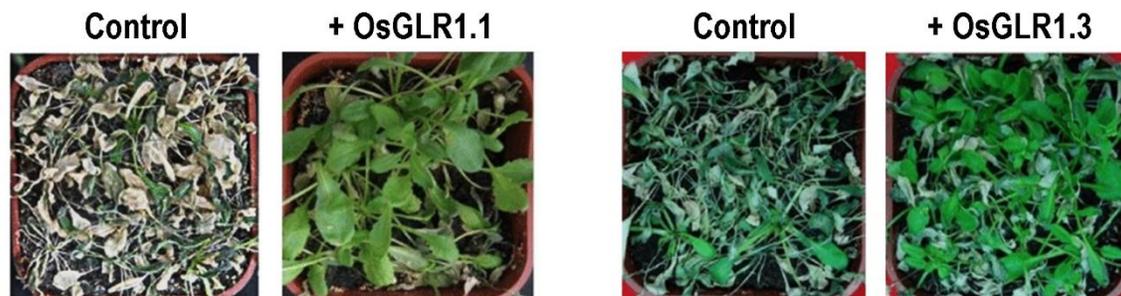


Figura 1.9 Función de algunos GLRs en la tolerancia al estrés hídrico. Plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan el *OsGLR1.1* o *OsGLR1.3* muestran una mayor tolerancia a un estrés hídrico de 13 días sin irrigación en comparación con sus respectivos controles no transformados. +*OsGLR1.1* y +*OsGLR1.3* son las líneas transformantes (Meyerhoff *et al.*, 2005).

1.12 En el estrés biótico

Dentro de los reportes que mencionan el papel de los GLRs en la respuesta a factores bióticos se encuentra el de Kang *et al.*, (2006), quienes demostraron que líneas de *A. thaliana* que sobreexpresan el *RsGLR1* proveniente de rábano (*Raphanus sativus*) muestran una mayor resistencia a la infección por *Botrytis cinerea*. Esto posiblemente debido a que en esta línea se encontró una mayor cantidad de defensinas, lo cual puede ser resultado de la señalización por Ca^{2+} activada por los GLRs. En otro estudio, se reporta que el *AtGLR3.3* es un componente clave en la resistencia de *A. thaliana* a *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Manzoor *et al.*, 2013).

En un estudio a partir del cual se generó una potencial herramienta para el tratamiento pos-cosecha de frutos de tomate, los frutos de tomate que fueron asperjados con L-Glutamato mostraron una mayor resistencia al hongo *Botrytis cinérea*. Igualmente, se observó un aumento en los niveles de expresión de *SIGLR1.1*, *SIGLR1.2*, *SIGLR2.1*, *SIGLR2.4*, *SIGLR2.5*, *SIGLR2.6*, *SIGLR3.1*, *SIGLR3.2* y *SIGLR3.3* (Sun *et al.*, 2019).

1.13 GLRs en el desarrollo radical

Referente al papel de los GLR en el desarrollo radical, Singh *et al.*, (2016) demostraron que la pérdida de función del AtGLR3.6 en *A. thaliana* conduce a una disminución en el crecimiento de la raíz primaria y en el número de raíces laterales, así como la reducción del área del meristemo de la raíz. Cuando se sobreexpresa el gen, de manera contrastante se presenta un aumento en la longitud de la raíz primaria y un mayor número de raíces laterales. Por su parte Vincill *et al.*, (2013), en líneas de *A. thaliana* mutantes de *AtGLR3.2* o *AtGLR3.4* obtuvieron como resultado la producción aberrante de primordios radicales, lo cual sugiere el importante papel en el crecimiento y desarrollo de la raíz de estas proteínas.

1.14 GLRs en la regulación de la apertura estomática

En la regulación de la apertura estomática se ha encontrado que el AtGLR3.1 se expresa específicamente en las células guarda y la sobreexpresión de este GLR en *A. thaliana* daña el proceso de apertura estomática, obteniéndose poros que se encuentran más estrechos comparados con las plantas testigo (Cho *et al.*, 2009).

1.15 GLRs en la reproducción

En arroz se ha demostrado que OsGLR3.1, OsGLR3.6, OsGLR4.7 y OsGLR4.9 están involucrados en el desarrollo reproductivo, ya que son regulados positivamente cuando la planta entra en una fase reproductiva y su expresión se modifica a través de diferentes estados del desarrollo de la panícula y de la semilla (Singh *et al.*, 2014). En *A. thaliana*, los GLRs también juegan un papel importante en la reproducción, ya que líneas mutantes de los genes *AtGLR1.2* o *AtGLR3.7* muestran una disminución en el número de semillas por silicua (Michard *et al.*, 2011).

1.16 GLRs en la comunicación celular

En la comunicación a larga distancia se ha visto que AtGLR3.2, AtGLR3.3 y AtGLR3.6 en *A. thaliana* participan en la comunicación a larga distancia de una hoja a otra (Mousavi *et al.*, 2013). Por otro lado, Vincill *et al.*, (2013) mencionan que la presencia específicamente en el floema de los AtGLR3.2 y AtGLR3.4 puede sugerir el papel en la comunicación a larga distancia de estos receptores, ya que este tejido vascular conecta directamente todos los rincones de la planta.

En resumen, se puede observar la gran diversidad de funciones en las que pueden estar implicados los GLRs de planta; sin embargo, aún falta mucho camino por recorrer en la búsqueda de más pruebas que nos permitan armar el rompecabezas de la función biológica de estas proteínas.

1.17 Regulación transcripcional de los GLRs de plantas

La regulación de la transcripción de un gen es un proceso esencial y finamente controlado por la célula, ya que toda la maquinaria enzimática, proteínas estructurales y ARN no codificantes que realizan todas las funciones proceden de esta actividad (Juven-Gershon *et al.*, 2008).

En el caso de los GLRs de plantas, al igual que todas las demás proteínas celulares, su concentración está determinada por los procesos como la transcripción, traducción, modificaciones pos-traduccionales, compartimentalización y degradación (Weiland *et al.*, 2016).

El proceso de transcripción es regulado por los promotores, donde se encuentran los elementos en CIS y en TRANS que activan o reprimen la expresión de un gen (Barrett *et al.*, 2012; Juven-Gershon *et al.*, 2008). En el caso de los GLR de plantas no existen estudios funcionales que identifique elementos en CIS que regulen su transcripción. Únicamente hay un reporte que menciona la presencia de elementos en CIS a través de análisis *in silico* en las regiones promotoras de los *AtGLRs* de *A. thaliana*. Dentro de los elementos en *cis* identificados se encontraron a RAV1-A y GATA, los cuales estaban presentes en 19 de los 20 *AtGLR*. RAV1-A es un sitio de unión para el factor de transcripción (FT) AB13/VP1, el cual está asociado con la regulación de genes de respuesta a ácido abscísico (ABA). El motivo GATA es un elemento de respuesta a la luz que también está asociado con el control de la transcripción dependiente de nitrato. Otros elementos encontrados fueron sitios de unión a proteínas WRKY, MYB y LFY, identificados en las regiones regulatorias de los *AtGLR*. Las proteínas WRKY son FT involucrados en la defensa de las plantas, en la respuesta a estrés hídrico, daño mecánico y altas temperaturas (Dong *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2002). El FT MYB principalmente ejerce su función durante el desarrollo, señalización por hormonas, metabolismo secundario y resistencia a enfermedades (Cominelli & Tonelli, 2009). Por último, LFY es un FT involucrado principalmente en el desarrollo floral (Moyroud

et al., 2010). Sin embargo, es necesario realizar los estudios funcionales para verificar la funcionalidad y validez de estos elementos en CIS.

Lo antes mencionado concuerda con los reportes sobre la participación de GLRs en el balance C-N (Kang & Turano, 2003b), en la apertura de los estomas donde participan en conjunto con ABA (Cho *et al.*, 2009) y en la respuesta a la luz (Lam *et al.*, 1998), entre otros procesos.

Pruebas indirectas sobre la regulación de los GLRs están disponibles a través de diferentes estudios. Chiu *et al.*, (2002) demostraron que los 20 *AtGLRs* de *A. thaliana* se expresan a través de los tejidos de raíz, tallo, hoja y tejidos reproductivos. Los *AtGLR* de la familia II en general mostraron expresión específicamente en la raíz, lo cual sugiere la presencia de elementos regulatorios que confinen la expresión solo en este tejido. Los *AtGLR* de la familia I y III se identificaron en los tres tejidos evaluados. En tomate, de los 13 genes *SIGLRs* localizados en el genoma, solo cuatro se expresaron. Los genes del clado I *SIGLR1.1* y *1.2* tuvieron un mayor nivel de expresión en raíz y frutos maduros. Por otro lado, únicamente un gen del clado II (*SIGLR2.2*) mostró un alto nivel de expresión en hojas, y el del clado III *SIGLR3.1* también se expresó fundamentalmente en hojas y tallos (Aouini *et al.*, 2012)

En arroz generalmente los genes *OsGLRs* de la familia III y IV mostraron expresión en hoja, raíz y diferentes estados del desarrollo de la silicua. De la familia I solo el *OsGLR1.1* mostró una expresión considerable en algunos estados del desarrollo de la silicua (Singh *et al.*, 2014).

Otros estudios más específicos muestran los sitios de expresión y localización en la célula de algunos *GLRs*. Chiu *et al.*, (2002) evaluaron la región promotora de un *AtGLR* de cada clado. La longitud de las regiones evaluadas fueron 1713, 1553, y 1780 pb correspondientes al *AtGLR1.1*, *AtGLR2.1* y *AtGLR3.1*, respectivamente. Estos fragmentos fueron fusionado a la proteína reportera GUS (β -glucuronidase) y los resultados mostraron que el promotor del *AtGLR1.1* dirige generalmente la expresión hacia la raíz y levemente a hojas. Por otro lado, la región regulatoria del *AtGLR2.1* muestra una mayor expresión de la proteína reportera a través de todos los tejidos de la raíz. Por último, la región regulatoria del *AtGLR3.3* muestra expresión fuerte de la proteína reportera en hojas y raíces. Aunque es de destacar que la expresión en raíces se observa únicamente a través del tejido vascular.

En otro estudio, utilizando la misma proteína reporte GUS, se observó que la región promotora de 2000 pb del *AtGLR3.7* dirige la expresión a través de todo el tejido vascular de *A. thaliana*, desde la raíz, el tallo, hasta las hojas (Wang *et al.*, 2019).

En otro reporte, Nguyen *et al.*, (2018) mostraron tanto los sitios de expresión como la localización de algunos *AtGLRs* (**Figura 1.10**). En los resultados se demuestran que las regiones regulatorias de *AtGLR3.1*, *AtGLR3.3* y *AtGLR3.6* dirigen la expresión en el tejido vascular de la planta. Cuando se fusionaron las regiones regulatorias mencionadas a sus respectivos GLRs, más la proteína reportera GUS se obtuvo la localización exacta de cada uno de los *AtGLRs*. En este estudio se observó que el *AtGLR3.1* está presente tanto en el xilema, como en el floema. El *AtGLR3.3* y el *AtGLR3.6* se encontraron en el floema y el xilema, respectivamente.

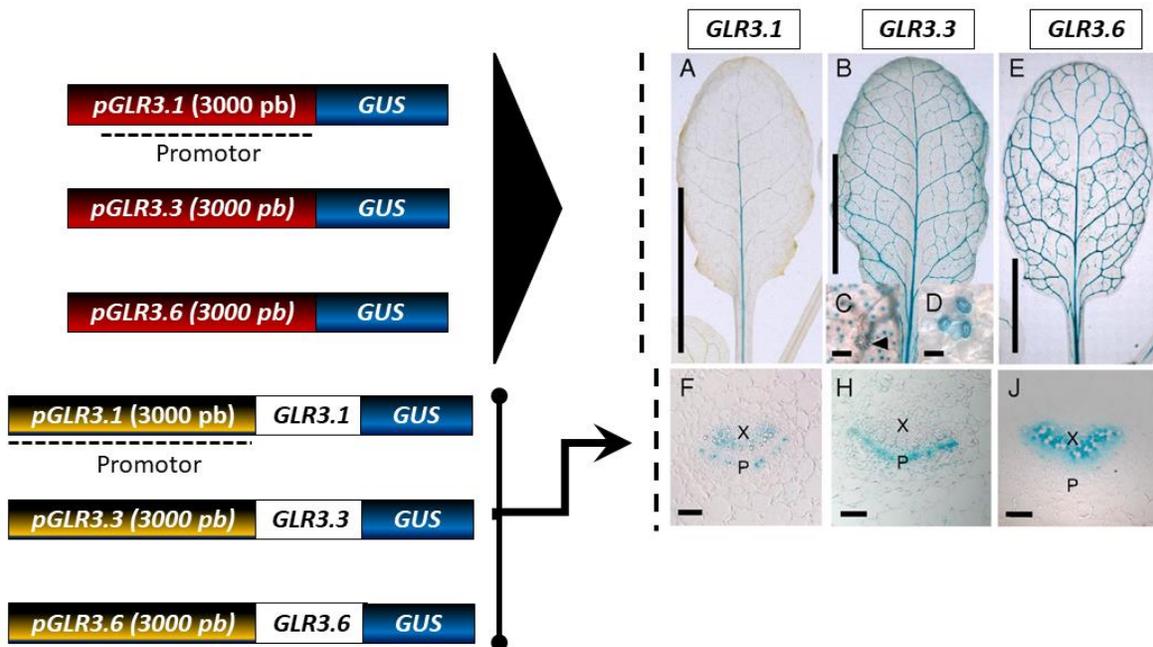


Figura 1.10 Sitios de expresión y localización algunos AtGLRs. Las primeras tres construcciones de la parte superior izquierda se utilizaron para evaluar los sitios de expresión de los *AtGLRs* 3.1, 3.3 y 3.6. Las últimas tres construcciones se utilizaron para ver la localización de los mismo *AtGLRs*. En A, B, C, D y E se utilizaron hojas de *A. thaliana* de plantas de cuatro semanas. C: tricomas; D: células guarda. F, H y J son cortes transversales de tallo (Nguyen *et al.*, 2018)

1.18 Promotores en plantas

Los elementos regulatorios son los responsables de controlan la expresión de un gen en los tres reinos de la vida (Shahmuradov *et al.*, 2017; Juven-Gershon *et al.*, 2008). Estos elementos regulatorios están comprendidos de la región promotora, potenciadores y represores. Sin embargo, el promotor en general es uno de los actores principales de la transcripción (Bilal *et al.*, 2016).

De manera conceptual los promotores se dividen en tres regiones (**Figura 1.11**), dependiendo de la distancia al sitio de inicio de la transcripción. El promotor núcleo, el promotor proximal y el promotor distal. El promotor núcleo generalmente se encuentra de -50 a -40 pb del sitio de inicio de la transcripción, el promotor proximal hasta -1000 pb y el promotor distal arriba de -1000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Hernandez-Garcia & Finer, 2014a).

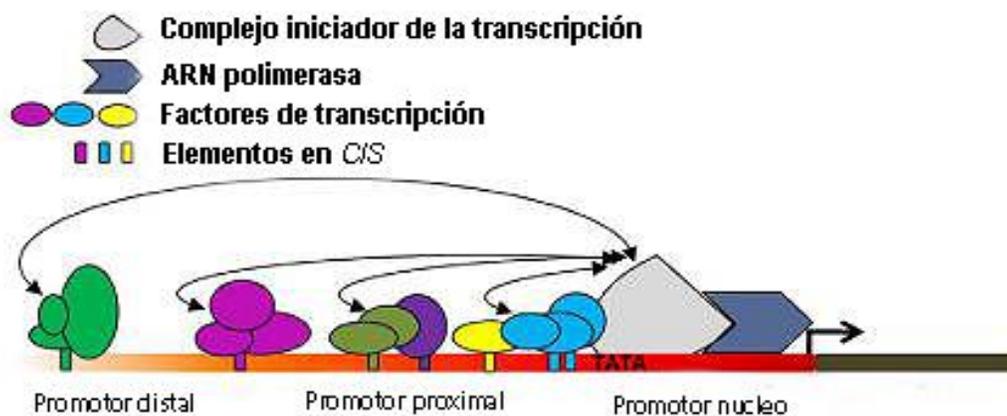


Figura 1.11 Clasificación de un promotor con base a la distancia al sitio de inicio de la transcripción (Inr) (Hernandez-Garcia & Finer, 2014b)

Otro tipo de clasificación de los promotores es con base a la manera en que regula la expresión de un gen, es decir, el tiempo/espacio en que un ARNm es expresado. Dentro de ellos tenemos a los promotores constitutivos, específicos de un tiempo y específicos de tejido (Biłas *et al.*, 2016; Hernandez-Garcia & Finer, 2014). Los promotores constitutivos mantienen un nivel constantes de expresión de un ARNm a través de todos los tejidos de las plantas; los específicos de un tiempo necesitan una señal específica que es determinada por una etapa de desarrollo, generalmente para poder iniciar la expresión de un gen y, los específicos de un tejido siempre controlan la expresión constante de un gen confinado a un tejido específico como la raíz, el tallo y las hojas; sin embargo, cuando son específicos de semillas o frutos se expresarán hasta que dicho tejido se desarrolle en la planta (Biłas *et al.*, 2016).

La regulación de un promotor, como se mencionó anteriormente, es un proceso muy complejo que involucra una gran cantidad de elementos en CIS y elementos en TRANS para dar como resultado una fina regulación, como se representa en la **Figura 1.12**. El tipo y número de elementos en CIS determinan la fuerza de unión y actividad cinética de la ARN polimerasa para llevar a cabo la transcripción del ARNm (Shrestha *et al.*, 2018).

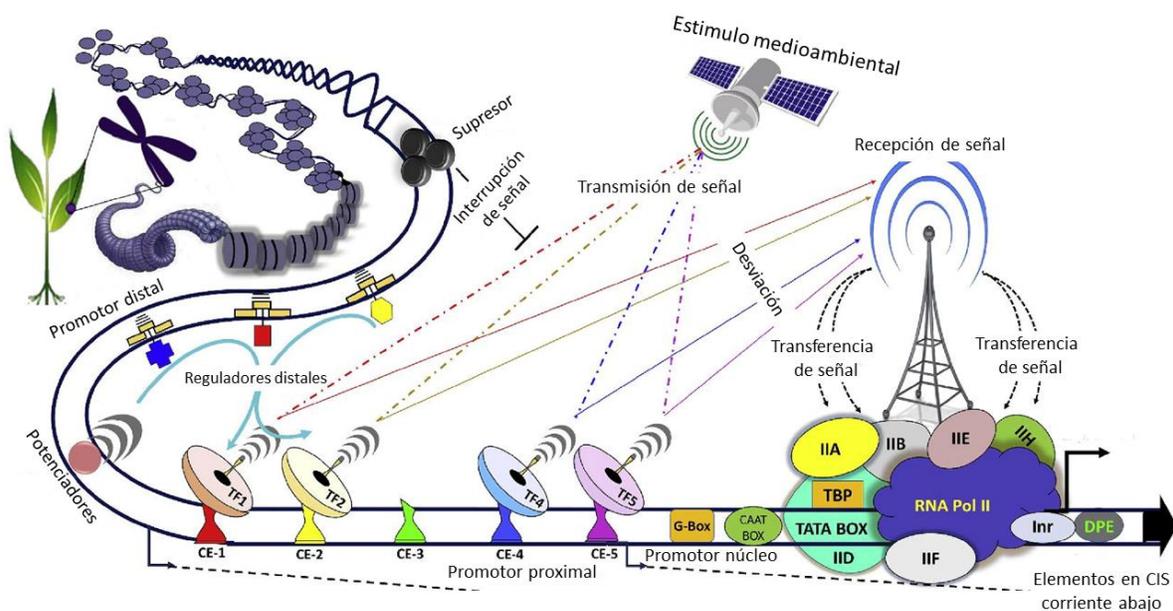


Figura 1.12 Representación del proceso de regulación de la expresión de un gen. Manera en cómo se lleva a cabo el control de la regulación de un gen. La participación de los elementos en CIS y TRANS son fundamentales (Hernandez-Garcia & Finer, 2014b).

1.19 Salinidad en plantas

La salinidad es uno de los principales factores abióticos a nivel mundial que limita el desarrollo, productividad y calidad de los cultivos. Esto se refleja en el hecho de que el 7% del área mundial de la tierra es actualmente afectada por la salinidad y, el 20% de los suelos afectados, es por un exceso (Munir *et al.*, 2022). Lo inquietante es que se espera que para el 2050 la mitad de las tierras arables presenten problemas de salinidad, lo cual plantea un panorama poco prometedor desde la perspectiva de la seguridad alimentaria (Wang *et al.*, 2022). A pesar de esta problemática, hay que hacer frente al problema de sostener y aumentar la producción de alimentos para el mantenimiento de la población debido a que se proyecta que para el 2050 habrá una población de 9.6 billones de personas (Wang *et al.*, 2022).

La salinidad se puede definir como la cantidad excesiva de sales solubles en los suelos, que da como resultado tierras estériles para la producción de cultivos. Dentro de las sales que se acumulan por actividades antropogénicas y por fenómenos naturales como la erosión de las rocas se tiene a los cloruros de sodio (NaCl), calcio (CaCl_2) y magnesio (MgCl_2), sulfatos y carbonatos, aunque la sal más soluble y abundante que tiene un efecto negativo sobre las plantas es el NaCl (Isayenkov & Maathuis, 2019).

El efecto que el NaCl tiene sobre las plantas fue la base para establecer los dos grupos de plantas que se conocen en la actualidad: halófitas y glicófitas. Las primeras se refieren a aquellas especies vegetales que pueden crecer en una concentración >200 mM de NaCl, mientras que las segundas pueden crecer y reproducirse solo cuando existe una muy baja concentración de sal (Zelm *et al.*, 2020).

Las altas concentraciones de sal en el entorno de las plantas glicófitas son un verdadero enemigo que pone en peligro no solo su rendimiento, sino también su supervivencia. Es de destacar que la mayoría de los cultivos de importancia en la alimentación mundial pertenecen a las glicófitas (Zelm *et al.*, 2020).

1.20 Entrada de NaCl en las plantas

El órgano de la planta que enfrenta el primer contacto con las altas concentraciones de sales es la raíz. Se conoce que la entrada de los iones Na^+ y Cl^- por la raíz se realiza a través de las vías apoplástica y simplástica, siendo esta última la de mayor aporte a la entrada de estos iones (Zhou et al., 2024; Isayenkov & Maathuis, 2019).

A pesar de que hace ya muchos años investigaciones ha tratado de resolver la cuestión de cómo los iones Cl^- y Na^+ entran a la célula, hasta el momento no se han descrito en su totalidad cuales son los mecanismos de toma de estos iones (Zhou *et al.*, 2024; Isayenkov & Maathuis, 2019). Sin embargo, la evidencia científica sugiere la implicación de canales y transportadores que facilitan la entrada del Na^+ dentro de la célula (**Figura 1.13**). Los canales implicados en la toma de Na^+ de forma pasiva pertenecen a los canales catiónicos no selectivos (CCNG, por sus siglas en inglés). Dentro de este grupo tenemos a los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs por sus siglas en inglés) (Zhou *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2019). Por otro lado, los transportadores que participan de manera pasiva en la toma de Na^+ pertenecen a las familias HKTs (High-affinity Potassium Transporters, por sus siglas en inglés) y HAKs (High-Affinity Potassium transporters, por sus siglas en inglés) (Xiao & Zhou, 2023). Aunque se conoce que estas familias de proteínas están involucradas en el paso de los cationes, su contribución y relevancia fisiológica no han sido esclarecidas.

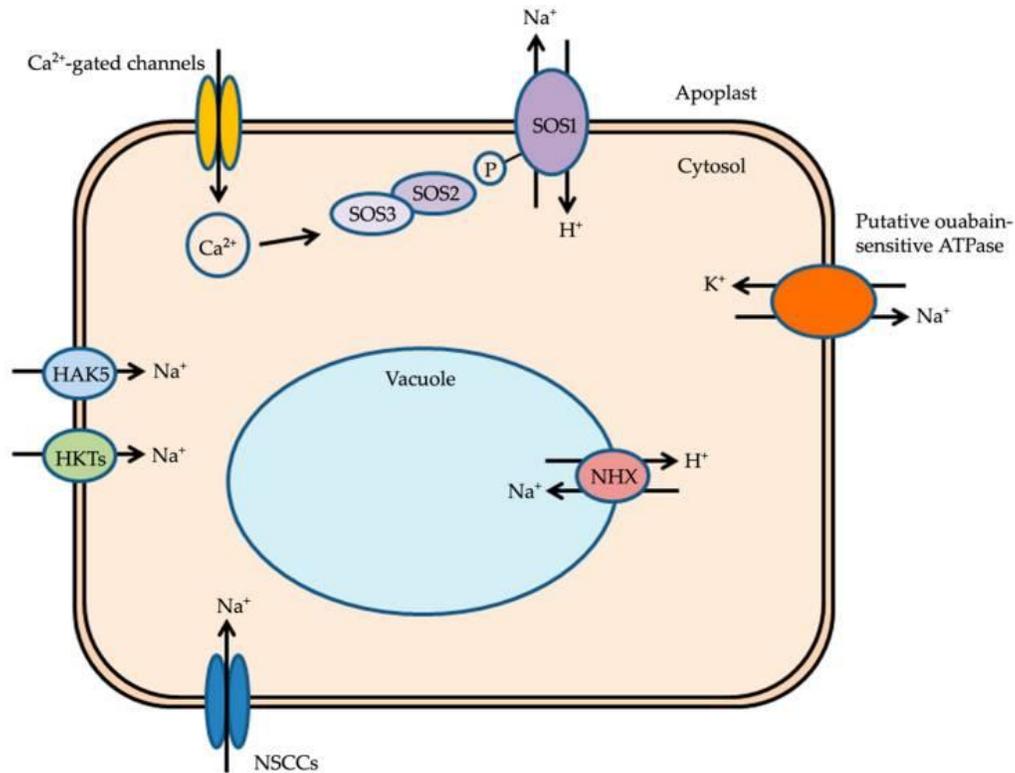


Figura 1.13. Entrada de Na^+ , compartimentalización en vacuola, y respuesta al estrés salino mediado por el sistema SOS (SOS1, SOS2 y SOS3). El Na^+ entra a la célula a través de los NSCCs y los transportadores HAK y HKT. Luego de que la célula identifica el Na^+ (por algún mecanismo aún desconocido), la cascada de señalización por Ca^{2+} es activada a través de un aumento en la concentración citosólica de este ion divalente. Posteriormente, el sistema SOS es activado para dar lugar a la exclusión de Na^+ de la célula. Adicionalmente el Na^+ es excluido de la célula a través de una ATPasa sensible a la ouabain. El Na^+ es también compartimentalizado en la vacuola a través de los NHX como una respuesta al estrés salino (tomado de Keisham, Mukherjee, & Bhatla, 2018).

1.21 Efectos de la salinidad.

El efecto de la salinidad por NaCl se presenta a través de dos vías. La toxicidad iónica y osmótica. Dentro de la toxicidad iónica el catión monovalente Na^+ tienen un efecto tóxico en la mayoría de las especies vegetales de importancia agrícola (glicófitas). La entrada en exceso de Na^+ a la célula vegetal da como resultado la salida de una gran cantidad de K^+ . Esto disminuye la relación K^+/Na^+ dentro de la célula, llevándola a la muerte celular debido

a una despolarización de la membrana que es irreparable (Zhou *et al.*, 2024; Hasanuzzaman & Fujita, 2022).

En el caso de potencial osmótico, éste se presenta cuando el potencial hídrico del suelo disminuye debido al aumento en la concentración de sales, lo cual limita la toma de agua por parte de la planta y ésta muere debido al estrés por un déficit hídrico severo (Ondrasek *et al.*, 2022).

1.22 Efectos provocados por la salinidad (NaCl) en plantas

Una alta concentración de sales en los suelos puede limitar el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de dos factores principales. En primer lugar, la alta concentración de sales en el suelo disminuye la habilidad de la planta de tomar el agua y por consiguiente nutrientes del suelo y, de esta manera, se reduce de forma muy rápida el crecimiento (Maathuis *et al.*, 2014; Parihar *et al.*, 2015). Por otro lado, si una gran cantidad de sal entra a la planta mediante la corriente de transpiración muchos tejidos se verán seriamente dañados por el efecto tóxico de la sal, dando lugar a una afectación de procesos biológicos como la germinación (Kaveh & Farsi, 2011; Hakim *et al.*, 2010; Kaymakanova, 2009; Carpici *et al.*, 2009), el crecimiento (Gupta & Huang, 2014; Maathuis *et al.*, 2014), la fotosíntesis (Parihar *et al.*, 2015; Amirjani, 2011), el balance de nutrientes (Parihar *et al.*, 2015; Maathuis *et al.*, 2014), el estrés oxidativo y el rendimiento (Zelm *et al.*, 2020; Isayenkov & Maathuis, 2019).

1.23 Efecto sobre el estrés oxidativo y rendimiento de los cultivos

El estrés oxidativo es la señal desencadenada por la planta luego de sufrir un estrés por déficit hídrico y toxicidad iónica (Na^{2+}). La acumulación del anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) da como resultado una afectación a la integridad de la membrana, daño a proteínas y al ADN (Zelm *et al.*, 2020; Isayenkov & Maathuis, 2019). Dependiendo de la severidad del estrés salino las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) pueden afectar el desarrollo y rendimiento de la planta o llevarla hasta la muerte. Esto como resultado de que la planta ya no puede hacer frente a estos agentes mediante su maquinaria enzimática para su eliminación (Parihar *et al.*, 2015).

Con respecto a los rendimientos de cultivo Zeng & Shannon, (2000) mostraron que el peso del grano y el número de panículas disminuyeron en plantas de arroz cuando fueron

sometidas a salinidad. En trigo también se ha observado una respuesta similar, ya que hay una disminución en los rendimiento de grano en respuesta a una concentración de sal (Maas *et al.*, 1994). Esta afectación en los cultivos puede ser por todos los factores negativos desencadenados por la salinidad, como la falta de agua, la toxicidad iónica, el balance nutrimental, entre otros.

1.24 Respuesta de las plantas al estrés salino por NaCl

El conocimiento completo sobre los componentes tempranos de la señalización por salinidad permanece aún desconocido; sin embargo, en la actualidad se realizan esfuerzos con la finalidad de elucidar cada uno de los elementos que participan en la señalización (Zelm *et al.*, 2020).

En la actualidad se desconoce como las plantas censan los iones Na^+ y Cl^- para generar una respuesta de adaptación. A pesar del poco conocimiento en esa área, los estudios realizados muestran que unas de las principales respuestas tempranas de la planta bajo salinidad es el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , GMPc (guanosina monofosfato cíclico) y la producción de ROS (Miller *et al.*, 2010; Donaldson *et al.*, 2004; Kiegle *et al.*, 2000).

1.25 La tolerancia a la salinidad es dependiente del genotipo

Como es de esperarse cada especie vegetal mantiene una cierta tolerancia a la salinidad que es dependiente del genotipo (Munns & Tester, 2008). Arroz mantiene un límite de tolerancia de 100 mM de NaCl, siendo una de las especies más sensibles, en conjunto con *Arabidopsis* (Cramer, 2002; Aslam *et al.*, 1993). Dentro de las especies vegetales con tolerancia media a la salinidad se encuentra al trigo y la cebada (Colmer *et al.*, 2005) y, dentro de las especies altamente tolerantes a la salinidad, está la alfalfa que puede soportar de forma temporal hasta 400 mM de NaCl, a pesar de ser una glicófita (Kapulnik *et al.*, 1989). *Atriplex amnícola* se encuentra dentro de las especies vegetales más tolerantes a la salinidad, la cual es una halófito que puede crecer en presencia de 600 mM de NaCl (Aslam *et al.*, 1986).

Cada planta presenta diferentes estrategias para hacer frente a este tipo de estrés salino por NaCl, incluso planta del mismo género pero diferentes especies y variedades presentan mecanismo diferentes de tolerancia (Munns & Tester, 2008)

1.26 Mecanismos de tolerancia a la salinidad por NaCl

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para hacer frente al estrés salino, el cual es un problema en auge en la actualidad y que se expande rápidamente (Zelm et al., 2020). Dentro de los mecanismos de respuesta se encuentra la homeostasis iónica, la compartimentalización, el ajuste osmótico, y la respuesta antioxidante, entre otros (Gupta & Huang, 2014).

1.27 Homeostasis iónica

En condiciones salinas la homeostasis iónica de Na^+ y K^+ es fundamental para hacer frente a esta condición. Para ello, las plantas cuentan con un sistema de transporte para cada uno de los iones mencionados (Zhu, 2003). Cuando el Na^+ entra a la planta éste necesita ser compartimentalizado o excluido de la célula, pero no puede existir una alta concentración en el citosol, pues si esto sucede la planta irremediablemente muere (Hasegawa, 2013). Cuando el Na^+ empieza a acumularse en el citosol, el sistema SOS (Salt Over Sensitive, por sus siglas en inglés) es el encargado de excluir este catión. El sistema SOS está constituido principalmente por las proteínas SOS1, SOS2 y SOS3 que, a través de su función, generan un grado de tolerancia en cada una de las especies vegetales (Gupta & Huang, 2014). La proteína SOS3 es un sensor de Ca^{2+} (catión que aumenta su concentración en respuesta a la salinidad) que posteriormente se une a la cinasa SOS2, la cual a su vez activa a SOS1, siendo este último un antiportador Na^+/H^+ encargado de transportar el Na^+ fuera de la célula y disminuir su concentración dentro del citosol (Shi *et al.*, 2002; Ishitani *et al.*, 2000; Liu, 2000). De esta manera a través del sistema SOS1 las plantas pueden tolerar la salinidad hasta cierto grado. Es de destacar también que en conjunto con el sistema SOS la fuerza motriz para que se lleve a cabo la exclusión del Na^+ es el gradiente de H^+ generado por la H^+ -ATPasa, lo cual conlleva a un enorme gasto de energía (Zhu, 2003).

Otro medio que utilizan las plantas para disminuir la concentración citosólica de Na^+ es la compartimentalización en las vacuolas. Este flujo hacia el interior de las vacuolas es llevado a cabo por los transportados NHX ($\text{Na}^+ \text{H}^+$ exchanger) los cuales a su vez también trabajan a expensas de un gradiente de protones que es proporcionado por las H^+ -ATPasas (Blumwald, 2000). Este compartimentalización permite disminuir la concentración de Na^+ en el citosol, así como también permite la toma continua de agua para abastecer a las

plantas de otros nutrientes esenciales (Maathuis *et al.*, 2014; Hasegawa, 2013; Blumwald, 2000).

Una alta relación K^+/Na^+ es necesaria para mantener un buen funcionamiento celular y en condiciones salinas esto es logrado a través de transportadores ubicados en la membrana plasmática (Zhu, 2003). Cuando el Na^+ entra a la célula da lugar a una salida proporcional de K^+ . Por lo tanto, la célula bajo estas condiciones activa sistemas de transportes que dan lugar a la entrada de K^+ y a la salida de Na^+ a través del sistema SOS. Los estudios sugieren que algunas de las proteínas transportadoras involucradas en esta función son los HKTs y HAKs

1.28 Ajuste osmótico

Para hacer frente al estrés osmótico provocado por la salinidad, las plantas realizan ajustes de solutos compatibles que les permite realizar la toma de agua y evitar su pérdida. Cada una de las especies vegetales cuando se enfrenta a la salinidad generan un perfil de componentes de bajo peso molecular característico. Dentro de estos componentes se encuentran prolina, carbohidratos, sorbitol y cuaternarios de amonio (Zelm *et al.*, 2020). Cabe destacar que el ajuste osmótico involucra desviar una gran cantidad de energía destinada al mantenimiento para activar las vías biosintéticas para producir los solutos compatibles como la prolina (Munns & Gilliam, 2015).

1.29 Respuesta antioxidante

Posterior al estrés osmótico y toxicidad iónica por el Na^+ , se genera una consecuencia celular que es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como lo son el oxígeno singlete (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) (Parihar *et al.*, 2015). Esta producción de ROS se da en consecuencia al daño de cloroplastos y mitocondrias en donde la cadena de transporte de electrones es un proceso muy controlado. Cuando la membrana de estos organelos se daña, las ROS escapan hacia el citosol (Munns & Tester, 2008).

Una respuesta de la planta para hacer frente a las ROS es a través de enzimas especializadas en la eliminación de estos compuestos dañinos. Dentro de las enzimas que realizan esta tarea se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). Otro medio utilizado es la

eliminación de las ROS a través de medios no enzimáticos, como lo son a través del ascorbato, glutatión, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides, entre otros (Foyer & Noctor, 2005; Apel & Hirt, 2004).

1.30 *Capsicum chinense* como modelo de estudio

En Yucatán el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una especie hortícola de importancia económica y cultural para el estado y, esto puede observarse en los diferentes productos donde se utiliza, que van desde la gastronomía, hasta su utilización como fármaco (Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

Por otra parte, los antecedentes mencionan que existen variedades de chile habanero con diferente grado de tolerancia al estrés salino. En uno de los resultados de la investigación de Bojórquez-Quintal *et al.*, (2014) se mostró que de las variedades Rex (roja) y Chichen-Itza (naranja) de chile habanero sometidas a 150 mM de NaCl durante siete días, la variedad Rex mostró una mayor tolerancia al estrés salino. En otro estudio se utilizaron las variedades Mayan Chan, Mayan Kisin, Mayan Ba'alche y Génesis de chile habanero, las cuales se sometieron a 150 mM de NaCl. Luego de siete días en recuperación en medio sin sal el porcentaje de recuperación fue de 100% para las variedades Mayan Chan y Mayan Kisin, de 91% para génesis y de 58% para Mayan Ba'alche (Escalante-Magaña, 2020).

Con respecto al estudio de los GLRs de plantas en chile habanero se realizó una búsqueda inicial de secuencias. En este primer escrutinio se identificaron nueve secuencias de receptores de glutamato (*CcGLRs*) que se expresan a través de diferentes etapas de desarrollo de flor y fruto de chile habanero (Laynes, 2019). Su papel en la respuesta de chile habanero a la salinidad es aún desconocido.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la familia de los GLRs de chile habanero y evaluar el efecto del NaCl sobre sus perfiles de transcritos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar mediante herramientas bioinformáticas la familia de GLRs en chile habanero.
- Evaluar la expresión de los *CcGLRs* en órganos vegetativos de chile habanero.
- Determinar el efecto del NaCl sobre los perfiles de transcritos de los *CcGLRs*.
- Identificar los elementos en CIS en aquellos *CcGLR* que modificaron su expresión

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se sugiere que los GLRs son importante en muchos de los procesos biológicos en plantas. Estos receptores participan en respuesta al ataque por patógenos, en el balance C:N, en la homeostasis de Ca^{2+} , en la señalización por daño mecánico, estrés hídrico y salinidad. Éste último factor puede dar lugar a una pérdida de hasta el 90% en la producción de los cultivos, dependiendo de la severidad del estrés. Bajo este contexto, el estudio de GLRs que hagan frente al estrés salino es de mucha importancia ya que aportará conocimiento en la comprensión de los mecanismos de respuesta de las plantas a esta condición.

El conocimiento actual sobre los GLRs se ha generado casi en su totalidad en *A. thaliana* y muy poco conocimiento se tiene sobre estas proteínas en especies de importancia agrícola. En este contexto, chile habanero, al ser una especie de importancia económica, figura como un buen modelo para el estudio de este tipo de proteínas.

En este proyecto se pretende identificar los GLR en chile habanero y aportar conocimiento sobre los GLRs que participan en la respuesta al estrés salino mediante el análisis de la regulación de la expresión génica de los GLRs. También se aborda en este proyecto el estudio de sus promotores a través de un acercamiento *in silico* de los elementos en CIS presentes.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El genoma de *Capsicum chinense* se utilizó para la búsqueda de secuencias homólogas a los *GLRs* de plantas a través de análisis *in silico*. La secuencia CDS y de aminoácidos de los **GLRs identificados** se analizó mediante herramientas bioinformáticas. Para la obtención del perfil de expresión en órganos vegetativos de los *CcGLRs*, se utilizaron plántulas de chile habanero var. Kisin y Chichen-itza (para corroborar lo contrastante en cuanto a la tolerancia a la salinidad) de 45 días posterior a la germinación. Para ello, previamente se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada *CcGLR*. Las plantas fueron seccionadas en hoja, tallo y raíz para los análisis de PCR punto final. El **efecto del NaCl sobre el perfil de expresión** se estudió utilizando plántulas de 45 días de la variedad tolerante (Mayan Kisin) al estrés salino. Las plantas fueron sometidas a 150 mM de NaCl con su respectivo control y posteriormente se colectaron las hojas y raíces. Se realizó PCR punto final de los *CcGLRs* en los dos tejidos y posteriormente se seleccionaron algunos *CcGLRs* para análisis de la expresión mediante la técnica de qPCR en tiempo real. Por último, se analizaron los elementos en CIS presentes en los promotores que modificaron su expresión (Figura 1.14).

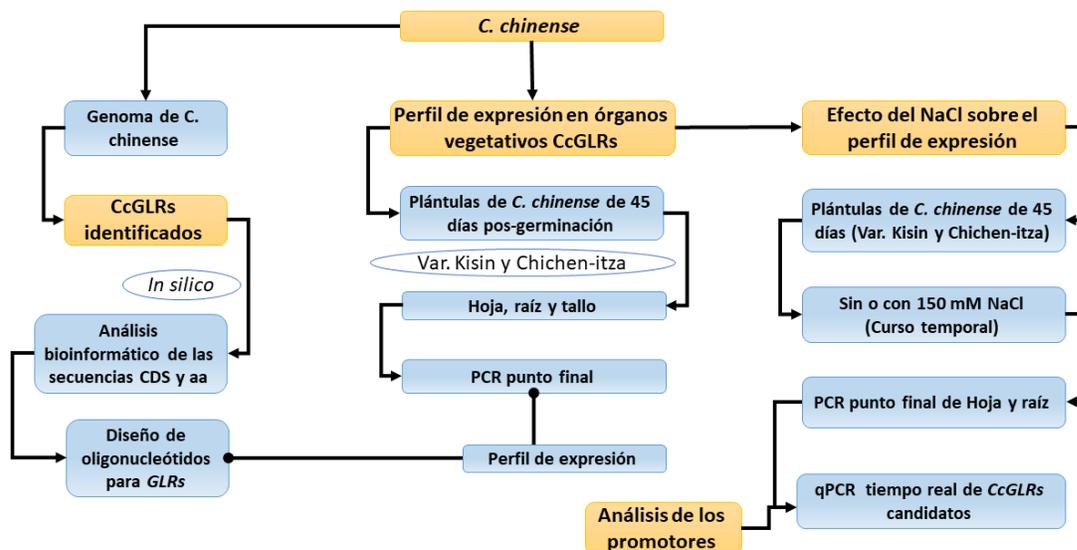


Figura 1.14 Estrategia experimental del proyecto.

CAPITULO II

Análisis *in silico* de la familia de GLRs en chile habanero*

*Partes de estos resultados fueron publicados en el artículo: “*In Silico* Analysis of Glutamate Receptors in *Capsicum chinense*: Structure, Evolution, and Molecular Interactions”. *Plants* 2024, 13, 812. <https://doi.org/10.3390/plants13060812>

2.1 Introducción

Las evidencias obtenidas en diversos experimentos de los receptores de glutamato de plantas (GLR) sugieren que esta familia de proteínas participan en varios procesos biológicos en estos organismos autótrofos (Weiland *et al.*, 2016). A pesar de la importancia que han mostrado tener estas proteínas en las plantas, hasta la fecha no se tiene conocimiento completo de cómo actúan a nivel molecular y cuáles son los principales procesos biológicos en los que están involucrados (Wudick *et al.*, 2018).

En plantas, un escrutinio completo sobre secuencias GLRs se ha realizado para *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *O. sativa*, *Pyrus bretschneideri*, *Fragaria vesca*, *Prunus persica* y *Prunus mume* (Chen *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014; Aouini *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2002). Estas especies mostraron presencia de GLRs en un rango desde 13 secuencias en tomate hasta 40 secuencias en el caso de melocotón (*P. persica*). En otras especies vegetales se ha identificado parcialmente la presencia de GLRs; en el caso de *Raphanus sativus* (rábano) se identificó un solo GLR (*RsGLR*), asimismo en *Echinochloa crus-galli* (pasto dentado) se identificó la presencia de un solo GLR (Li *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2006).

Un análisis filogenético de los 20 genes de GLRs identificados inicialmente en *A. thaliana*, en conjunto con las secuencias totales de los iGluRs de rata, con excepción de NR3, y dos secuencias de procariontas, GluR0 de *Synechocystis* y GluR de *Anabaena* dividió los 20 GLRs de *A. thaliana* en tres clados distintos (Chiu *et al.*, 2002). Esto dio lugar para colocar la nomenclatura de las secuencias en estudio y planteó una nueva base para el análisis de nuevas secuencias GLRs identificadas en otras especies vegetales. En tomate (*S. lycopersicum*) las 13 secuencias identificadas se agruparon en tres clados diferentes. Las secuencias se agruparon en el clado II y III junto con la de *A. thaliana*; sin embargo, el clado I se agrupó de manera separada (Aouini *et al.*, 2012). En otras especies como *O. sativa*, *P.*

bretschneideri, *F. vesca*, *P. pérsica* y *Prunus mume* surgió la presencia de un nuevo clado, el clado IV. Este clado IV puede estar representado un nuevo grupo de proteínas con nuevas funciones, aún por determinar en plantas (Chen *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014).

Para el caso de los GLR presentes en *Raphanus sativus* y en *Echinochloa crusgalli* todavía falta realizar un escrutinio completo en el genoma de estas plantas para poder establecer una nomenclatura de las secuencias genéticas reportadas (Li *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2006).

Cabe resaltar que la mayoría de las funciones biológicas atribuidas a los GLRs provienen de experimentos realizados casi en su totalidad en *A. thaliana*. Muy poca investigación se ha realizado en GLRs fuera de esta especie; por ejemplo, los estudios realizados en rábano, tomate y arroz, sin embargo, aún son pocos estudios (Weiland *et al.*, 2016).

Con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre los GLRs en otras especies vegetales, en este proyecto se abarcó el estudio bioinformático de los GLRs en el genoma de chile habanero (*Capsicum chinense*). El chile habanero es una planta de importancia cultural y económica para el estado de Yucatán, así como también de México. Por lo tanto, la identificación de este tipo de proteínas en esta especie vegetal abrirá un nuevo campo de estudio que aportará conocimiento sobre las funciones biológica de los GLRs. En este capítulo se aporta conocimiento sobre secuencias presentes en el genoma de esta especie, su nomenclatura y otras características muy importantes en base a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.2 Identificación de secuencias GLRs en el genoma de chile habanero

Las secuencias CcGLRs presentes en el genoma de chile habanero fueron identificadas por León Garcia *et al.*, (2024). En total se identificaron 19 secuencias CcGLR en el genoma de acuerdo con la metodología establecida en la investigación. Sin embargo, dos de estas secuencias no contienen la totalidad de los dominios característicos de los GLR de plantas.

La localización física de los CcGLRs en los cromosomas se realizó utilizando la ubicación específica de cada gen en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para

la representación en imagen se utilizó el software TbTools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools-II>).

2.3 Dominios presentes en los CcGLRs

Las secuencias de GLR presentes en chile habanero fueron analizadas con InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y NCBI para la búsqueda de dominios de unión a ligando, característico de los GLRs de plantas. Los dominios transmembranales fueron identificados con las herramientas en línea TMpred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) y TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Los dominios característicos de los GLR de plantas fueron identificados en las secuencias CcGLRs y representados proporcionalmente de manera lineal con la herramienta DOG2.0.

2.4 Predicción de la localización subcelular de los CcGLRs

La localización subcelular de los CcGLRs fue realizada con los softwares DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>), WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) y Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>). Cada uno de estos programas identifica firmas específicas en las secuencias de aminoácidos.

2.5 Diseño de cebadores para los CcGLRs

Cebadores específicos para cada una de las secuencias GLRs putativas de *chile habanero* fueron diseñados a través de las herramientas en línea primerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) y Oligo evaluator (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Estas herramientas nos permitieron realizar el diseño de oligos con parámetros de 50% de GC, diseño específico, temperaturas de alineamiento por encima de 60 °C y evitar la formación de dímeros. Los resultados de los cebadores se muestran a continuación (Tabla 2.1).

Tabla 2. 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar la familia de los CcGLRs.

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (nt)	T _m (°C)	% GC	Amplicon (Pb)
CcGLR1.1-F	5'-CTACTGCCTTCTCCTTGTGGTGC-3'	23	63	47.8	196
CcGLR1.1-R	5'-TCAACAGCCATCTCCATTGC-3'	20	66.2	50	
CcGLR1.2-F	5'-TGGGTAGAGAGTCAGCTTGA-3'	21	63.9	52.4	170
CcGLR1.2-R	5'-CCGGAATATCTTTTGGGAATTGACC-3'	24	66.9	41.7	
CcGLR1.3-F	5'-TCAGTTCATTCAGTACTATCC-3'	22	58.2	40.9	158
CcGLR1.3-R	5'-AAATACGAAGCCAAATCCG-3'	19	61.4	42.1	
CcGLR1.4-F	5'-CTTAGTAGCTCCGCATGCC-3'	19	62.5	57.9	224
CcGLR1.4-R	5'-CAGCTGATGGAGAAGAGCAG-3'	20	62.9	55	

CcGLR1.5-F	5'- TCATAACGTGTTTGTGACG- 3'	20	59.7	40	167
CcGLR1.5-R	5'- ACGTCGAATAAGTAACAGCC- 3'	20	58.3	45	
CcGLR2.1-F	5'-CAAAGGGCTAAATTGTTCCG- 3'	20	63.3	45	186
CcGLR2.1-R	5'-TCATCTCTCTTCGATTGTC- 3'	21	63.1	47.6	
CcGLR2.2-F	5'-AAAAATCCAGACGCCAGTGAG- 3'	20	64.2	50	165
CcGLR2.2-R	5'-TTCCAGGTTCTGTAGGAGGG- 3'	20	63	55	
CcGLR2.3-F	5'-AATTCTGACGGCCTAGGAG- 3'	20	62.1	50	132
CcGLR2.3-R	5'-TGTACGGTCTCTTGTAGGGC- 3'	20	61.7	55	
CcGLR2.4-F	5'-GTGGTGTAAACGGTGGATGTG- 3'	20	63.9	55	114
CcGLR2.4-R	5'-TGTGATTAGCAGTGGCATTGC- 3'	21	66	47.6	
CcGLR2.5-F	5'-TCCAAATAGCCCTCAAACCG- 3'	21	66.5	47.6	185
CcGLR2.5-R	5'-GCTTCGATTGTGGAGCTTGG- 3'	20	67	55	
CcGLR2.6-F	5'-AGATTCAAGTAGGTCGCTCTCC- 3'	22	62.6	50	144
CcGLR2.6-R	5'-CGTCTTATGATGTGCCAATGC- 3'	21	65.2	47.6	
CcGLR2.7-F	5'-GATGGCCGGATATACTGAAGG- 3'	21	64.3	52.4	123
CcGLR2.7-R	5'-TATCCCTTGAAGCACCATCAG- 3'	21	63.9	47.6	
CcGLR2.8-F	5'-TTCCATTCTTGTAGCTTCGC- 3'	21	63.1	42.9	143
CcGLR2.8-R	5'-AACGAGCAATCATCAAGCAG- 3'	20	63	45	
CcGLR2.9-F	5'-CAGAGATCTCTATCATCCGGAC- 3'	22	61.6	50	237
CcGLR2.9-R	5'-AGATGGATGGACAACCTCTG- 3'	20	61.6	50	
CcGLR3.1-F	5'-ACTGTGAGAGACCTGGTGTG- 3'	21	61.9	54.4	173
CcGLR3.1-R	5'-GACACTGCACTCAGAATCCTC- 3'	21	61.5	52.4	
CcGLR3.2-F	5'-AGGATCCGTATATTGAAAACCG- 3'	22	62.6	40.9	163
CcGLR3.2-R	5'-CCTTTGTGAACTCCTGTCTAC- 3'	22	61.5	50	
CcGLR3.3-F	5'-AATGGTCAGAGTACTTCACGG- 3'	21	60.6	47.6	174
CcGLR3.3-R	5'-AACCTGTGATTCTCTCCACC- 3'	20	60.6	50	
CcGLR3.4-F	5'-AATGCCACTGTCTCCTCCCT- 3'	20	65	55	147
CcGLR3.4-R	5'-CCCCTGAGTACTGTCTCAATCA- 3'	22	64	50	
CcGLR3.5-F	5'-TGCCATTACTATCCCAGCCC- 3'	20	65.7	55	198
CcGLR3.5-R	5'- GTATAACTCAGAACGGTCGATCC- 3'	23	62.5	47.8	

El tamaño de los amplicones generados por los oligonucleótidos diseñados se encuentran en un rango de 100 a 250 pb. El contenido de GC se encuentra por arriba de 40% pero por debajo de 60%. La temperatura media se encuentra en un rango de 58 a 67 °C

2.6 Identificación de ortólogos de los CcGLRs en otras especies vegetales y análisis taxonómico

Para la identificación de proteínas ortólogas se utilizaron las anotaciones de proteínas (Tabla S1) de *Physcomitrium patents*, *Marchantia polymorpha*, *Selaginella moellendorffii*, *Adiantum capillus-veneris*, *Ginkgo biloba*, *Cycas panzihuaensis*, *Amborella trichopoda*, *Cinnamomum micranthum*, *Spirodela intermedia*, *Dendrobium nobile*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Brachypodium distachyon*, *Saccharum spontaneum*, *Zea mays*, *Nelumbo nucifera*, *Aquilegia coerulea*, *Vitis vinífera*, *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum*, *Fragaria vesca*, *Pyrus bretschneideri*, *Prunus mume*, *Prunus pérsica*, *Medicago truncatula*, *Capsicum chinense*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, y *Nicotiana tabacum*.

El archivo de las anotaciones de cada especie fue comparado con los 17 CcGLRs de chile habanero mediante la herramienta en línea Orthovenn

(<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net/home>) (Xu *et al.*, 2019) utilizando los parámetros de Evalue: 1e-2 e inflation value: 1.5. Los ortólogos de los CcGLRs por cada especie vegetal fueron mostrados en un mapa de calor con ayuda de la herramienta "HeatMap Illustrator", del programa TbTools (Zhang *et al.* 2022).

Para la construcción del árbol taxonómico de las especies analizadas se utilizó el programa MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). En este sentido se construyó un archivo de texto con una lista de los nombres de las 29 especies mencionadas y este archivo se sometió al programa. Se procedió a utilizar la opción "Time Tree" de MEGA que es una base publica de miles de publicaciones relacionadas con la evolución de las especies (Tamura *et al.*, 2021).

2.7 Análisis de los valores de Ka y Ks

La relación Ka/Ks entre pares de genes ortólogos fue calculada utilizando la opción "Simple Ka/Ks calculator" del programa TBtools. Para este análisis se utilizó la secuencia codificante de todos los CcGLRs y de todos sus respectivos ortólogos.

2.8 Análisis de duplicación de genes CcGLRs

Para la detección de duplicación segmental y en tándem se usó la herramienta Multiplex Collinear Scanning Toolkit (MC-ScanX) con los parámetros default (Wang *et al.* 2012). También, genes separados por menos de 10 genes y/o una distancia menor a 30 Kpb fueron considerados genes duplicados en tándem (Roy & Mukherjee 2017).

2.9 Análisis de los promotores de los CcGLRs

Para el análisis de los promotores como primer paso se procedió al aislamiento de estas secuencias regulatorias putativas a partir del ADN genómico de *C. chinense* disponible en la plataforma de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). De las 20 secuencias CcGLRs se procedió a realizar el aislamiento de los promotores. A partir del inicio de la secuencia codificante (CDS) de cada CcGLR se tomaron 2000 bases corriente arriba hacia el promotor.

Las secuencias obtenidas de los CcGLRs se sometieron a el software PLANCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y las cajas encontradas en cada uno de los CcGLRs fueron registradas en EXEL para el análisis.

RESULTADOS

2.10 Análisis de CcGLRs presentes en el genoma de *chile habanero*

Las secuencias utilizadas en nuestros análisis fueron 19 CcGLRs putativos (García León, 2024). El tamaño de las proteínas estuvo en un rango entre 477 aminoácidos (aa) y 1132 aa. Con relación a la presencia de intrones y exones, los miembros de la familia III de los CcGLRs presentaron casi en su totalidad seis exones y cinco intrones, a excepción del CcGLR3.4 que contiene cuatro exones y tres intrones. La familia IV presenta la mayoría de sus miembros con cinco exones y cuatro intrones (CcGLRs 4.2, 4.3 y 4.4). Únicamente el CcGLR4.1 contiene ocho exones y siete intrones. La familia II, la más diferente en estructura del gen, muestra seis secuencias (CcGLRs 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.8 y 2.9) con cinco exones y cuatro intrones, dos secuencias con seis exones y cinco intrones (CcGLRs 2.5, 2.6) y una secuencia con nueve exones y ocho intrones (CcGLR 2.7) (**Tabla 2.2**).

Tabla 2. 2 CcGLR identificados en el genoma de chile habanero. En el cuadro se muestran las características de cada secuencia.

ID	Nombre	# Exones	# Intrones	CDS (bp)	aa
PHU20802.1	CcGLR4.1	8	7	2703	901
PHU26278.1	CcGLR4.2	5	4	2784	928
PHU20786.1	CcGLR4.3	5	4	2703	901
PHU20798.1	CcGLR4.4	5	4	2703	901
PHU20800.1	CcGLR4.5	3	2	1431	477
PHU14992.1	CcGLR2.1	5	4	2823	941
PHU14985.1	CcGLR2.2	5	4	2898	966
PHU14982.1	CcGLR2.3	5	4	2934	978
PHU14980.1	CcGLR2.4	5	4	2874	958
PHU14979.1	CcGLR2.5	6	5	3396	1132

PHU08778.1	CcGLR2.6	6	5	2739	913
PHU24790.1	CcGLR2.7	9	8	3336	1112
PHU24792.1	CcGLR2.8	5	4	2913	971
PHU24793.1	CcGLR2.9	5	4	2745	915
PHU12201.1	CcGLR3.1	6	5	2721	907
PHU12202.1	CcGLR3.2	6	5	2829	943
PHU21095.1	CcGLR3.3	6	5	2835	945
PHU19527.1	CcGLR3.4	4	3	2007	669
PHU26821.1	CcGLR3.5	6	5	2808	936

Las secuencias CcGLRs identificadas fueron analizadas a través de InterPro y NCBI con la finalidad de identificar los sitios de unión a ligando S1 y S2, el dominio amino terminal (DAT) y el dominio carboxilo terminal (DCT), que son característicos de los GLRs de plantas. Los dominios transmembranales fueron identificados con TMpred y TMHMM (**Figura 2.1**).

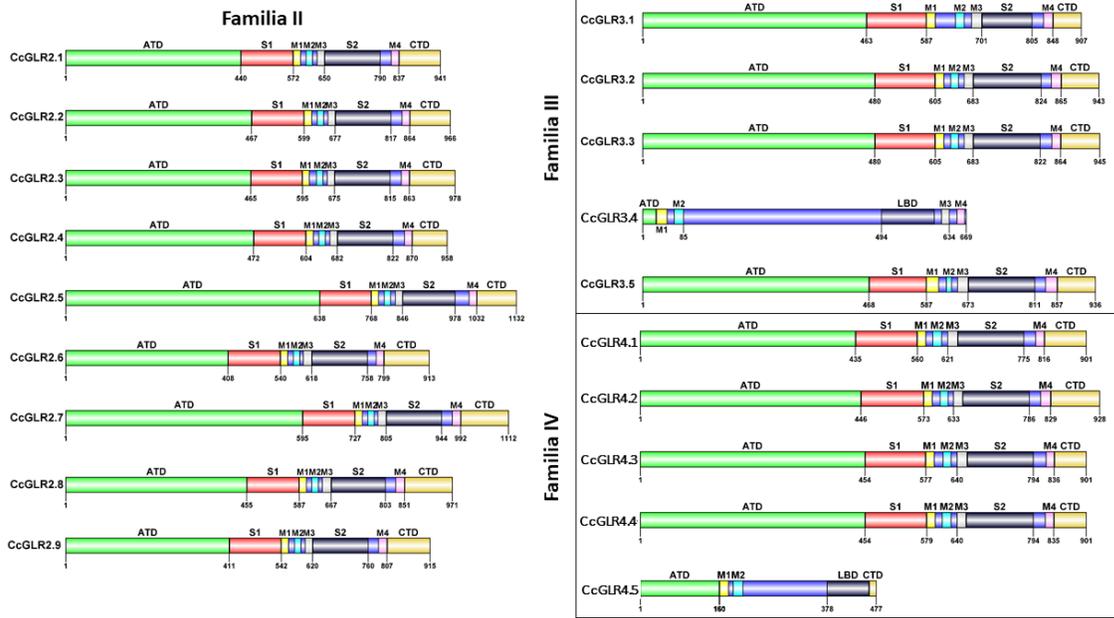


Figura 2. 1 Dominios presentes en los CcGLR de chile habanero. En el esquema se representan los dominios característicos de los GLR de plantas. La identificación de los dominios se obtuvo mediante las herramientas InterPro y NCBI. La imagen fue diseñada con TbTools. ATD: Dominio amino terminal; S1: Dominio de unión a ligando 1; S2: Dominio de unión a ligando 2; M1-M4, Dominios transmembranales 1-4, respectivamente; CTD: Dominio carboxilo terminal.

De las 19 secuencias CcGLRs identificadas en el genoma de chile habanero, 17 contienen todos los dominios característicos de los GLRs de plantas, y solo los GLRs 3.4 y 4.5 no contienen todos los dominios característicos (Figura 2.1). Por tanto, a partir de este análisis se continuó trabajando únicamente con 17 secuencias, las cuales contienen todos los dominios característicos de los GLRs de plantas.

La ubicación física en los cromosomas nos da información importante sobre la estructura genética de los CcGLRs. Utilizando datos disponibles en NCBI y mediante el software TbTools se representó la localización física de las 17 secuencias CcGLRs. Las secuencias CcGLRs se identificaron a través de seis de los doce cromosomas de chile habanero. El mayor número de secuencias se ubican en el cromosoma seis, que contiene los CcGLRs 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5. El cromosoma cuatro contiene cuatro secuencias (CcGLR 4.1, 4.3,

4.4 y 3.3). El cromosoma tres contiene tres secuencias (*CcGLRs* 2.7, 2.8 y 2.9). El cromosoma dos y el siete con dos secuencias cada uno (*CcGLRs* 4.2, 3.5, y *CcGLR* 3.1 y 3.2, respectivamente). El cromosoma ocho únicamente contiene al *CcGLR*2.6 (**Figura 2.2**).

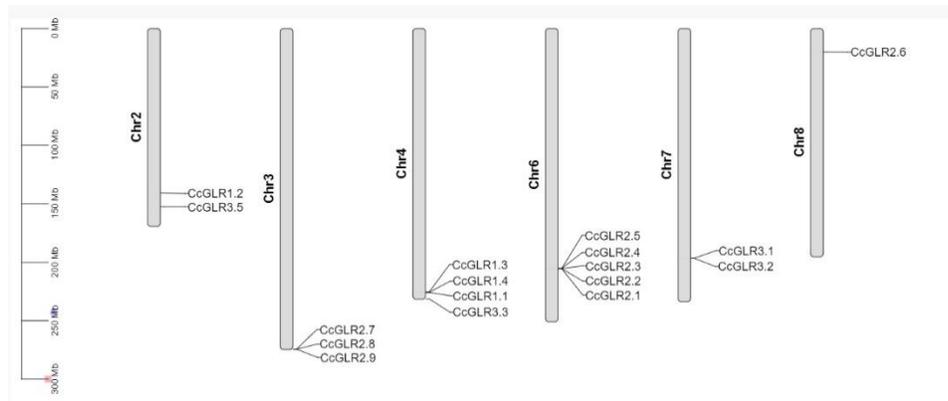


Figura 2. 2 Distribución de los *CcGLRs* en los cromosomas de Chile habanero. La distancia genética se presenta en Mb a la izquierda de la figura y el nombre de los cromosomas se ubica verticalmente a un lado de cada uno de ellos.

La localización subcelular de las 17 secuencias proteicas de los *CcGLRs* se predijo a través de tres programas en línea: DeepLoc, WoLF PSORT, Plant-mPLOC. Los resultados sugieren que todos los *CcGLRs* se localizan en la membrana plasmática. Solo el *CcGLR*2.5 mostró una localización subcelular predicha en el núcleo, usando el programa Plant-mPLOC, siendo la membrana plasmática con los otros dos programas (**Tabla 2.3**).

Tabla 2. 3 Predicción de la localización subcelular de los *CcGLRs*. Para la predicción se utilizaron tres herramientas bioinformáticas. MP: membrana plasmática, NU: núcleo.

Proteína	DeepLoc	WoLFPSORT	Plant-mPLOC
<i>CcGLR</i> 4.1	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 4.2	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 4.3	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 4.4	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 2.1	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 2.2	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 2.3	MP	MP	MP
<i>CcGLR</i> 2.4	MP	MP	MP

CcGLR2.5	MP	MP	NU
CcGLR2.6	MP	MP	MP
CcGLR2.7	MP	MP	MP
CcGLR2.8	MP	MP	MP
CcGLR2.9	MP	MP	MP
CcGLR3.1	MP	MP	MP
CcGLR3.2	MP	MP	MP
CcGLR3.3	MP	MP	MP
CcGLR3.5	MP	MP	MP

2.11 Ortólogos presentes en el genoma de otras especies

El análisis de ortología utilizando las 17 secuencias CcGLRs y las anotaciones de 28 especies (**Tabla S1**) en estudio mostró que 27 especies comparten secuencias ortólogas a los CcGLRs de chile habanero. Únicamente *Ginkgo biloba* no mostró la presencia de ortólogos. El número total de secuencias ortólogas a los CcGLRs identificados fue de 408. Las cuatro especies con mayor número de ortólogos fueron *Gossypium hirsutum*, *Nicotiana tabacum*, *Nelumbo nucifera* y *Pyrus bretschneideri* con 44, 40, 23 y 19 secuencias, respectivamente (Figura 2.3). El menor número se presentó para *Marchantia polymorpha*, *Selaginella moellendorffii*, *Adiantum capillus-veneris*, y *Physcomitrium patens*, cada uno con una secuencia por especie (**Figura 2.3**).

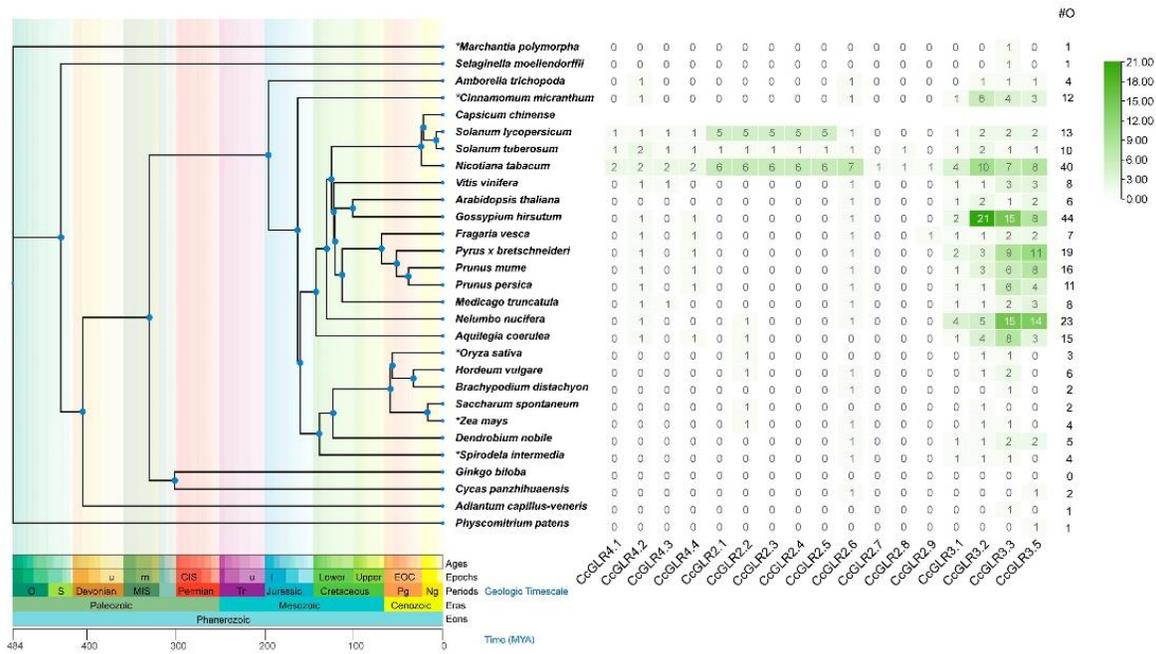


Figura 2. 3. Árbol taxonómico de especies divergentes e identificación de secuencias ortólogas a los CcGLRs. Para la construcción del árbol taxonómico se utilizó MEGA10.2. El análisis de ortólogos se realizó mediante Orthovenn utilizando las 17 secuencias CcGLRs y representado en imagen con TbTools. En total se identificaron 408 secuencias de proteínas ortólogas. #O: número de ortólogos.

En un análisis de los ortólogos por familia (II, III y IV) con ayuda del árbol taxonómico se observó que los ortólogos más ancestrales pertenecen al clado III, específicamente se tiene un ortólogo al CcGLR3.3 en *Marchantia polymorpha* y uno al CcGLR3.5 en *Physcomitrium patens*. Posteriormente, aparece un ortólogo al CcGLR3.2 en *Amborella trichopoda* y por último un ortólogo al CcGLR3.1 en *Cinnamomum micranthum*. La familia II aparece posterior a la familia III en la evolución, debido a que el primer ortólogo del CcGLR2.6 se identifica en *Cycas panzhihuaensis*. El ortólogo del CcGLR2.2 apareció posteriormente en la línea del tiempo de la evolución en *Aquilegia coerulea*. Todos los demás miembros ortólogos se diversificaron en gran número en *Nicotiana tabacum*, posiblemente mediante procesos de duplicación (**Figura 2.3**).

Más reciente en la evolución la familia IV se identifica a través del ortólogo del CcGLR4.2 en *Amborella trichopoda*, posteriormente aparece el ortólogo del CcGLR4.4 en *Aquilegia*

coerulea, seguido por el ortólogo del CcGLR4.3 en *Medicago truncatula* y por último el ortólogo del CcGLR4.1 en la solanacea (*Nicotiana tabacum*).

Un dato interesante es que del total de los ortólogos identificados el 67% son de la familia III, el 23% de la familia II y solo el 9% de la familia IV; de esta manera evidenciando que el clado III ha sido el que más se diversificó a través de la evolución.

2.12 Eventos de duplicación de los CcGLRs

En cuanto al origen de muchos de los genes *CcGLRs* de Chile los análisis muestran que los eventos de duplicación son la fuerza que dio origen a nuevos genes. Los resultados muestran diez eventos de duplicación, de los cuales ocho son duplicaciones en tándem y dos son duplicaciones segmentales. La mayor cantidad de eventos de duplicación se observan en la familia II, en donde se identificaron siete de los diez eventos de duplicación. En el caso de la familia IV únicamente está presente un evento de duplicación (CcGLR4.4 y CcGLR4.3) y la familia III contiene dos eventos de duplicación (CcGLR3.1 y CcGLR3.2) y (CcGLR3.3 y CcGLR3.5) (**Tabla 2.4**).

Tabla 2. 4 Genes CcGLR duplicados y sus valores de Ka y Ks

Seq 1	Seq 2	Ka	Ks	Ka/Ks	Tipo de duplicación
CcGLR4.4	CcGLR4.3	0.09238882	0.21538756	0.42894224	Tandem
CcGLR2.2	CcGLR2.1	0.09404683	0.29266319	0.32134834	Tandem
CcGLR2.2	CcGLR2.3	0.08130223	0.2817064	0.28860626	Tandem
CcGLR2.3	CcGLR2.7	0.48684464	2.31317914	0.2104656	Segmental
CcGLR2.3	CcGLR2.4	0.11783723	0.32134749	0.36669723	Tandem
CcGLR2.4	CcGLR2.5	0.13676414	0.32876016	0.41599975	Tandem
CcGLR2.7	CcGLR2.8	0.0388931	0.07486174	0.51953246	Tandem
CcGLR2.8	CcGLR2.9	0.27542592	1.21675472	0.22636109	Tandem
CcGLR3.1	CcGLR3.2	0.46951787	2.61135974	0.17979823	Tandem
CcGLR3.3	CcGLR3.5	0.31560447	1.82245184	0.17317576	Segmental

En cuanto a la tasa de mutación no sinónima (Ka) podemos observar que los valores de todos los CcGLRs duplicados está por debajo de la tasa de mutación sinónima (Ks). En cuanto a la relación Ka/Ks todos los valores se ubican por debajo de 1, siendo el valor más alto de 0.519 para los CcGLRs2.7 y 2.8, y el valor más bajo de 0.173 para los CcGLR3.3 y 3.5 (**Tabla 2.4**).

2.13 Valores de Ka y Ks de los ortólogos a los CcGLRs

Al hacer el análisis entre los mismos pares de ortólogos obtenidos mediante Orthovenn, los resultados mostraron que a pesar de la alta presión selectiva a la que han estado expuesta la familia de proteínas GLRs, todos los pares de ortólogos a los CcGLRs presentan valores de la relación Ka/Ks por debajo de 1. Este resultado dirige al hecho de que la tendencia de las proteínas es mantener la función. Las secuencias ortólogas con los valores menores de Ka/Ks son las solanaceas en estudio (*Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*). Por otro lado, las especies con mayor tasa de mutaciones fueron *Vitis vinifera*, *Cycas panzhihuaensis*, *Fragaria vesca* y *Aquilegia coerulea* (**Figura 2.4, Tabla S2**).

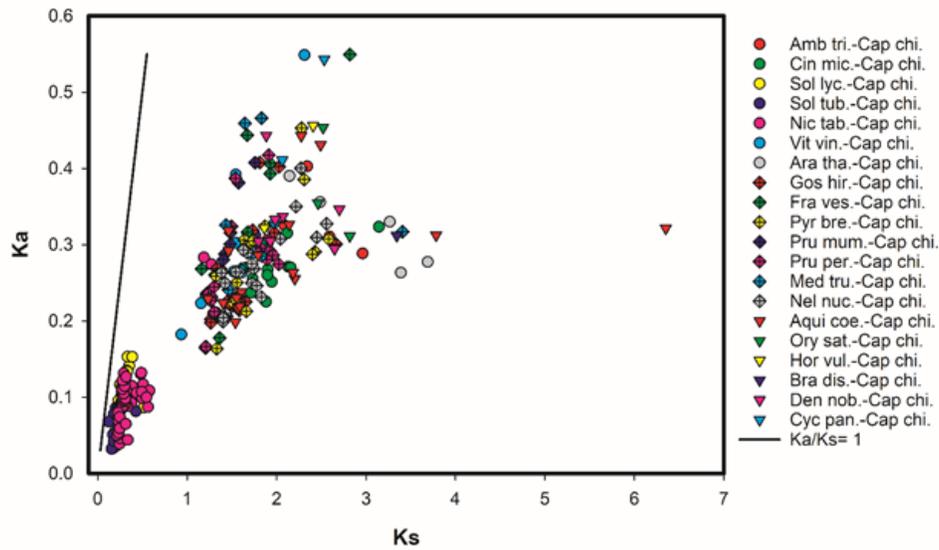


Figura 2. 4 Valores de Ka y Ks de todas las especies vegetales. El eje Y representa las mutaciones no sinónimas (Ka), el eje X representa las mutaciones sinónimas (Ks) y la línea dentro de la gráfica representa el valor de Ka/Ks=1. Los valores específicos de cada punto se ubican en la Tabla S2. Amb tri: *Amborella trichopoda*, Cin mic: *Cinnamomum micranthum*, Sol lyc: *Solanum lycopersicum*, Sol tub: *Solanum tuberosum*, Nic tab: *Nicotiana tabacum*, Vit vin: *Vitis vinífera*, Ara tha: *Arabidopsis thaliana*, Gos hir: *Gossypium hirsutum*, Fra ves: *Fragaria vesca*, Pyr bre: *Pyrus bretschneideri*, Pru mum: *Prunus mume*, Pru per: *Prunus pérsica*, Med tru: *Medicago truncatula*, Nel nuc: *Nelumbo nucifera*, Aquí coe: *Aquilegia coerulea*, Ory Sat: *Oryza sativa*, Hor vul: *Hordeum vulgare*, Bra dis: *Brachypodium distachyon*, Den nob: *Dendrobium nobile*, Cyc pan: *Cycas panzhihuaensis*, Cap chi: *Capsicum chinense*.

2.14 Elementos en CIS presentes en los promotores de los CcGLRs

Se aislaron 17 secuencias de promotores putativos del genoma de chile habanero (Tabla 2.5). La región aislada de cada promotor fue de 2000 pb, a excepción de los CcGLRs 4.1 y 4.2 donde solo se aislaron 1418 y 1918 pb debido a la cercanía de otra secuencia codificante. Estas secuencias fueron utilizadas para estudios posteriores.

Tabla 2. 5 Promotores putativos de los CcGLRs

Promotor putativo	Tamaño identificado (pb)
PCcGLR4.1	2,000

PCcGLR4.2	2,000
PCcGLR4.3	2,000
PCcGLR4.4	2,000
PCcGLR2.1	2,000
PCcGLR2.2	2,000
PCcGLR2.3	2,000
PCcGLR2.4	2,000
PCcGLR2.5	2,000
PCcGLR2.6	2,000
PCcGLR2.7	2,000
PCcGLR2.8	2,000
PCcGLR2.9	2,000
PCcGLR3.1	2,000
PCcGLR3.2	2,000
PCcGLR3.3	2,000
PCcGLR3.5	2,000

Por otro lado, las secuencias promotoras putativas identificadas fueron sometidas a Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) en la búsqueda del porcentaje de similitud. Los resultados muestran un bajo porcentaje de identidad entre las secuencias evaluadas, teniendo los porcentajes más altos con el 50% para las comparaciones de los CcGLRs4.3-4.4 y los CcGLRs 2.2-2.3. La comparación de promotores con porcentajes de identidad más bajos corresponde a CcGLRs2.5 y 2.6 con 28% (Tabla 2.6).

Tabla 2. 6 Porcentaje de identidad entre los promotores de los CcGLRs. Las secuencias fueron sometidas en CLUSTAL OMEGA.

	pCcGLRs																			
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	
1: pCcGLR1.1	100.00	35.37	30.84	32.94	37.75	37.00	37.01	35.60	29.81	29.62	37.81	36.92	37.52	36.13	31.00	35.62	35.30	41.09	34.56	
2: pCcGLR1.2	35.37	100.00	35.76	34.12	43.63	37.11	39.29	39.47	33.71	31.69	36.22	37.20	39.67	35.93	34.17	41.84	37.36	48.45	39.06	
3: pCcGLR1.3	30.84	35.76	100.00	50.74	35.71	33.18	34.53	33.57	40.20	38.27	31.98	34.40	34.28	31.36	42.54	33.94	32.48	35.27	33.95	
4: pCcGLR1.4	32.94	34.12	50.74	100.00	34.03	33.59	33.29	32.08	40.27	38.72	33.42	34.61	33.55	32.49	43.67	33.52	34.64	34.49	34.31	
5: pCcGLR1.5	37.75	43.63	35.71	34.03	100.00	36.43	37.08	36.29	34.42	32.14	37.99	39.89	38.38	38.58	34.02	42.84	40.56	46.29	40.07	
6: pCcGLR2.1	37.01	39.29	34.53	33.29	37.08	38.09	100.00	36.95	31.69	31.20	36.07	36.40	35.35	34.32	30.94	38.43	36.75	38.99	38.03	
7: pCcGLR2.2	35.60	39.47	33.57	32.08	36.29	36.95	51.85	100.00	30.55	29.39	37.49	33.39	38.36	35.48	32.45	37.86	38.72	37.93	35.24	
8: pCcGLR2.3	29.81	33.71	40.20	40.27	34.42	31.33	31.69	30.55	100.00	38.49	30.25	30.24	31.31	33.25	42.18	33.27	32.36	33.02	32.95	
9: pCcGLR2.4	29.62	31.69	38.27	38.72	32.14	31.20	32.12	29.39	38.49	100.00	28.35	30.72	32.02	30.14	38.29	30.88	32.84	32.33	32.33	
10: pCcGLR2.5	37.81	36.22	31.98	33.42	37.99	36.07	37.14	37.49	30.25	28.35	100.00	37.95	35.97	34.80	33.23	37.36	36.83	38.84	36.42	
11: pCcGLR2.6	36.92	37.20	34.40	34.61	39.89	36.40	34.30	33.39	30.24	30.72	37.95	100.00	35.44	35.17	30.88	38.62	37.09	39.13	39.46	
12: pCcGLR2.7	37.52	39.67	34.28	33.55	38.38	35.35	38.31	38.36	31.31	32.02	35.97	35.44	100.00	35.73	31.12	38.71	35.87	39.67	37.17	
13: pCcGLR2.8	36.13	35.93	31.36	32.49	38.56	34.32	38.07	35.48	33.25	30.14	34.80	35.17	35.73	100.00	31.99	35.53	37.58	38.32	36.16	
14: pCcGLR2.9	31.00	34.17	42.54	43.67	34.02	30.24	34.35	32.45	42.18	38.29	33.23	30.88	31.12	31.99	100.00	34.56	34.29	34.90	34.50	
15: pCcGLR3.1	35.62	41.84	33.94	33.52	42.84	38.43	37.55	37.86	33.27	30.86	37.36	38.62	38.71	35.53	34.56	100.00	39.56	43.64	41.04	
16: pCcGLR3.2	35.30	37.36	32.48	34.64	40.56	36.75	37.42	38.72	32.36	32.84	36.83	37.09	35.87	37.58	34.29	39.56	100.00	39.49	39.62	
17: pCcGLR3.3	41.09	48.45	35.27	34.49	46.29	38.99	38.48	37.93	33.02	32.38	38.84	39.13	39.67	38.32	34.90	43.64	39.49	100.00	41.70	
18: pCcGLR3.4	34.56	39.06	33.95	34.31	40.07	38.03	36.39	35.24	32.95	32.33	36.42	39.46	37.17	36.16	34.50	41.04	39.62	41.70	100.00	
19: pCcGLR3.5																				

En los análisis con el software PLANCARE y New PLACE el análisis de las 17 secuencias mostraron la presencia de muchos elementos en CIS dentro de los que se encuentran: elementos de respuesta a fitohormonas, respuesta a daño mecánico, de respuesta a la luz, a estrés hídrico, de respuesta al estrés salino, entre otros (**Figura 2.5, Tabla S3**). En total los elementos en cis identificados fueron 10,483.

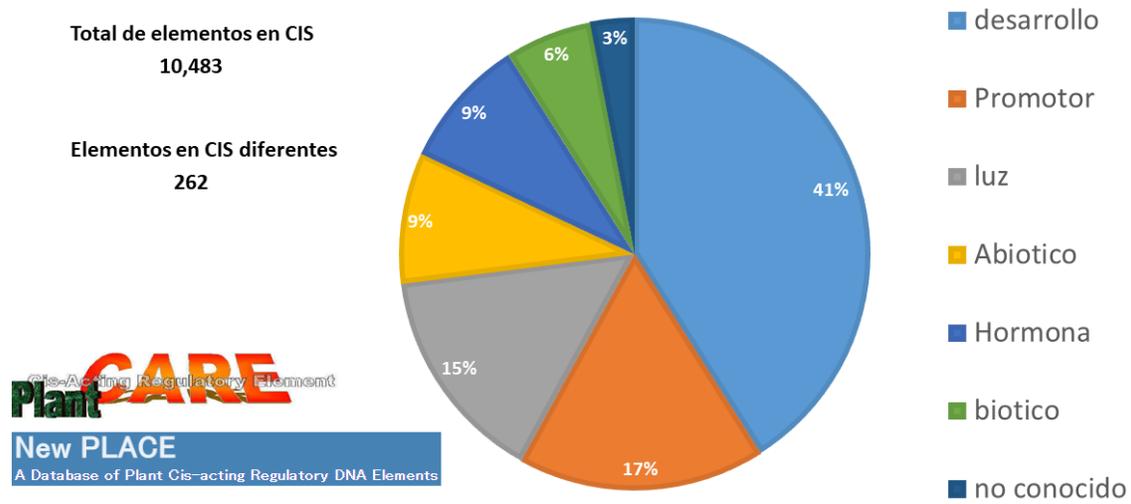


Figura 2. 5. Elementos en CIS presentes en los promotores de los *CcGLRs*. La búsqueda se realizó con PLANTCARE y New PLACE. El total de elementos en cis (10,483) fueron divididos en siete categorías (desarrollo, elementos del promotor, luz, abiótico, hormona, biótico y no conocido).

Los resultados obtenidos nos sugieren la versatilidad de respuesta de los genes *CcGLRs* al entorno. Falta realizar experimentos que nos permitan confirmar la funcionalidad de estas cajas presentes a través de las secuencias regulatorias de los *CcGLRs*.

Discusión

Los GLRs presentes en *A. thaliana* son elementos cruciales en diversos procesos celulares, desde el equilibrio carbono-nitrógeno hasta la respuesta a estresores abióticos como sequía, frío, daño mecánico y salinidad (Weiland *et al.*, 2016). La identificación de 17 GLRs putativos en el genoma del chile habanero y su caracterización estructural proporciona un

marco valioso para comprender la función de estos receptores en la adaptación de las plantas a su entorno.

Las familias III y IV presentan una consistencia notable en la organización de sus exones e intrones, sugiriendo una conservación estructural a lo largo de la evolución de estas familias. La similitud estructural con los GLRs de otras plantas, evidenciado por dominios característicos y la presencia de secuencias ortólogas en diferentes especies, respalda la idea de funciones conservadas en estos receptores (Teardo *et al.*, 2015).

La distribución de *CcGLRs* en los cromosomas del chile habanero revela patrones de duplicación génica y eventos de transposición, especialmente evidentes en el cromosoma 6, que alberga múltiples secuencias. Estos hallazgos concuerdan con estudios que sugieren que la duplicación génica y la transposición desempeñan un papel crucial en la evolución y adaptación de genes en plantas (Liu *et al.*, 2017).

La predicción subcelular utilizando herramientas bioinformáticas indica principalmente una localización en la membrana plasmática para los *CcGLRs*, sugiriendo su participación en la percepción de señales extracelulares y la transducción de estas señales en la célula. Sin embargo, es esencial considerar las discrepancias en las predicciones entre programas y validar experimentalmente la localización subcelular para una comprensión más completa.

El análisis de ortólogos revela la conservación evolutiva de los *CcGLRs* en diversas especies, con excepción de *Ginkgo biloba*. La identificación de ortólogos más antiguos en la familia III, como *CcGLR3.3* en *Marchantia polymorpha*, proporciona información valiosa sobre la evolución temprana de estos receptores en plantas. Además, la detección de ortólogos en otras especies, como *Cycas panzhihuaensis* para *CcGLR2.6*, sugiere eventos de divergencia y adaptación evolutiva. El análisis de ortólogos y eventos de duplicación ofrece una perspectiva evolutiva. Estudios como el de Zhang *et al.* (2020) han examinado la evolución de familias de genes en plantas, destacando la importancia de eventos de duplicación en la generación de diversidad genética y adaptación a condiciones ambientales cambiantes.

El análisis de duplicación génica indica eventos tanto en tándem como segmentales, siendo la familia II la más propensa a duplicaciones. La conservación de Ka/Ks por debajo de 1 en

los pares de ortólogos sugiere una presión selectiva conservadora, indicando que estos genes mantienen su función a lo largo de la evolución.

El análisis de promotores y elementos en CIS destaca la posible regulación coordinada de los *CcGLRs* en respuesta a diversos estímulos ambientales. La identificación de elementos de respuesta a fitohormonas, luz, desarrollo, estrés biótico y estrés abiótico proporciona pistas sobre las vías de señalización en las que podrían estar involucrados estos receptores.

Dentro de las respuestas a factores abióticos tenemos a la salinidad por NaCl como uno de los factores de estrés que afectan fuertemente la producción de los cultivos (Amin et al., 2021). En el caso de la familia de GLRs de plantas estudios recientes muestran que tienen un papel en la respuesta al estrés salino. Este es el caso del gen *AtGLR3.7* de *A. thaliana*, que muestra un papel en la respuesta al estrés salino, debido a que la mutante *atglr3.7* muestra una afectación en la germinación y en el desarrollo de la raíz cuando se encuentra a 150 mM de NaCl (Wang et al., 2019). En otro estudio, el *AtGLR3.6* de la misma manera mostró su papel en la respuesta al estrés por NaCl (150 mM) en plantas de *A. thaliana*, debido a que las plantas que sobreexpresaron el *AtGLR3.6* mostraron un mayor desarrollo de las raíces bajo el estrés salino comparado con la línea control (Silamparasan et al., 2023). Con respecto a la dinámica de la expresión de los GLRs, en investigaciones se ha demostrado que las condiciones de estrés salino modifican el nivel de expresión.

Sin embargo, hasta la fecha existe poca información sobre elementos de regulación en *cis* de los promotores de los GLRs de plantas, es por tanto, que este estudio brinda información importantes de elementos en CIS de respuesta a estrés abiótico que abarcan desde el elemento de respuesta en *cis* a daño mecánico “WUN-motif”, hasta el elemento de respuesta a estrés salino “GT1GMSCAM4”.

En resumen, este estudio brinda una visión integral de los *CcGLRs* en *C. chinense* Jacq., destacando su estructura, distribución genómica, conservación evolutiva, y posibles mecanismos de regulación.

CAPITULO III

Perfil de expresión de los *GLRs* en hoja, tallo, raíz y frutos

*Partes de estos resultados (obtención del transcriptoma de frutos de chile habanero) fueron publicados en el artículo: "Differential Expression of Genes Related to Fruit Development and Capsaicinoids Synthesis in Habanero Pepper Plants Grown in Contrasting Soil Types. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. DOI: 10.32604/phyton.2023.046943.

INTRODUCCIÓN

Un primer acercamiento para sugerir la presencia de la proteína en un tejido específico de la planta es conocer si su ARNm está presente (Vogel & Marcotte, 2012). El conocimiento sobre perfiles de expresión de *GLRs* en plantas es limitado. Algunas de las investigaciones donde se han realizado incluyen a *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *O sativa* (Weiland et al., 2016). En *A. thaliana* se observó que los *GLRs* presentes en el genoma se expresan a través de los diferentes tejidos donde se evaluaron (raíz, tallo, hoja y flores), aunque es de destacar que las 20 secuencias evaluadas mostraron expresión en raíz (Chiu et al., 2002). En tomate el perfil de expresión realizado por Aouini et al., (2012) muestra la presencia de estas secuencias también en los tejidos de hoja, raíz, tallo y frutos. Estos perfiles de expresión se han utilizado para la realización de estudios más dirigidos tratando de encontrar una función específica como se demuestra en las investigaciones realizadas con los AtGLR de *A. thaliana* (Wang et al., 2019; Michard et al., 2011; Kang & Turano, 2003b).

Como un primer acercamiento para conocer donde están ejerciendo su función los CcGLRs de chile habanero se evaluó el perfil de expresión de los genes a través de hoja, tallo, raíz y frutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Las variedades Mayan Kisin y Chichen-Itzá fueron utilizadas como material biológico para evaluar los perfiles de expresión de CcGLRs en chile habanero. Para la obtención de material vegetal de hoja, tallo y raíz, 50 semillas de cada variedad de chile habanero fueron desinfectadas con etanol al 80% (v/v) por 5 min. A continuación, se realizaron tres lavados

con agua estéril. Posteriormente, se incubaron con hipoclorito de sodio de la marca comercial (Cloralex, 5% NaOCl) al 30% (v/v) por 15 min, se realizaron lavados continuos y se dejaron embebiendo con agua estéril durante 48 horas, a una temperatura de 4°C en condiciones de oscuridad. Luego de 48 h de estratificación, las semillas fueron colocadas en vermiculita estéril con agua y se colocaron en condiciones de germinación en el cuarto de fotoperiodo (25°C). Luego de que las plantas germinaron y mostraron la presencia de hojas verdaderas se procedió a regar las plantas con medio Hoagland a 1/5 de su fuerza iónica. Cuando las plantas tuvieron un mes de crecimiento se seleccionaron 10 plántulas, las cuales se utilizaron para colecta de hoja, tallo y raíz.

Para la colecta de frutos de chile habanero, plántulas de 45 días de crecimiento de la variedad Jaguar fueron trasplantadas en macetas que contenían suelo negro (SN) o suelo rojo (SR). Para cada tipo de suelo se utilizaron 15 plantas. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de invernadero durante un periodo de 150 días posteriores al trasplante. Las plantas fueron regadas periódicamente con 0.5 a 1.5 litros de agua (1.48 mS) y se fertilizó cada planta con triple 18 (0.77 g x planta), dos veces por semana. También fueron fertilizadas vía foliar con Bayfolan® (6 ml para todas las plantas) una vez por semana.

Cuando el 50% de las plantas totales presentaron flores, se inició el etiquetado manual de cada flor con una etiqueta y se llevó un registro detallado de cada una durante 60 días. Los frutos de 25 días posteriores a la antesis fueron colectados y almacenados a -80 °C para los experimentos posteriores.

3.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN de hoja, tallo y raíz se realizó utilizando el método de trizol de la siguiente manera: después de la adición del Trizol®, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 12,000 x g a 4 °C por cinco minutos; a continuación, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 200 µl de cloroformo, se homogenizó en un vortex, y se dejó en reposo durante tres minutos para luego centrifugar a 12,000 x g a 4° C por 15 minutos. La fase acuosa se transfirió en tubos nuevos y el ARN se precipitó, añadiendo 500 µl de isopropanol. Se homogenizó y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 x g a 4° C por 10 minutos y

la pastilla conteniendo el ARN total fue lavada dos veces con etanol al 75 % (v/v) y centrifugada cada vez a 12,000 x g a 4 °C por cuatro minutos. Después de secar por 10 minutos, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua grado biología molecular. La pureza y calidad del RNA fue evaluada en un NanoDrop 2000 ThermoFisher Scientific y a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

Para la extracción de ARN de frutos se procedió a separar cinco frutos de suelo negro y cinco frutos de suelo rojo con el objetivo de representar réplicas biológicas por tipo de suelo. Los cinco frutos de cada suelo fueron congelados en nitrógeno líquido y procesados de manera separada en una licuadora evitando que se descongelaran y el polvo resultante fue inmediatamente almacenado a -80 °C.

Las muestras pulverizadas de frutos se utilizaron para la extracción de ARN mediante el kit ENeasy Plant Minikit®. Para este procedimiento se utilizaron 0.1 g de la muestra pulverizada de cada suelo (SN y SR) y se maceraron en morteros previamente enfriados con nitrógeno líquido. Se adicionaron 450 µl de amortiguador RLT con 10 µl de β-mercaptoetanol por ml de amortiguador RLT. El lisado se transfirió a columnas spin QIAshredder, donde se centrifugó por dos minutos a 13000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 0.5 volúmenes de etanol absoluto. A continuación, se transfirió la muestra a columnas y se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto a 4 °C. Se descartó el filtrado y se procedió a continuar con la columna que tiene unido el ARN. Esta columna fue lavada con 700 µl de amortiguador RW1, luego se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto a 4 °C. En el siguiente paso se adicionó 500 µl de amortiguador RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto a 4 °C. Finalmente, las muestras se eluyeron con 40 µl de agua libre de nucleasas.

Todas las muestras de la extracción de ARN fueron tratadas con Turbo Dnase (Thermo Fisher Scientific®) (2 U/ µl), de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. La calidad del ARN fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V.

3.3 Síntesis de ADNc y PCR punto final de los GLRs en chile habanero

La síntesis de la primera hebra de ADN se realizó con los reactivos “First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific®). Se tomó 1µg del ARN extraído de cada muestra y se le agrego oligo Dt, dNTPs, solución amortiguadora, transcriptasa reversa hasta

completar un volumen con agua de 20 µl. Para inactivar la enzima se colocó por 60 minutos a 42 °C y finalmente 5 minutos a 70 °C.

Para la PCR (polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) de cada *CcGLR* se colocó 1 µl de ADNc de cada muestra, 1.25 µl del amortiguador 10x, 0.5 µl de 50 mM de MgCl₂, 0.5 µl de dNTPs, 1 µl de cada cebador específico, en sentido y antisentido (descritos en el cuadro 2.1) y 0.2 µl de Taq DNA polimesase (5 u/µl). Las condiciones de polimerización fueron: 95 °C un minuto y 32 ciclos a 94 °C 30 segundos, la temperatura de alineamiento y polimerización corresponde con las características del par de oligonucleótidos utilizados (cuadro 2.2), y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Como control de carga, se amplificó al gen de la tubulina, usando los oligonucleótidos: en sentido (5'-GGAGGGTGAGTGAGCAGTTC-3') y en antisentido (5'-CTGCTGTCGCATCCTGGTAT-3'), generando un amplicón de 156 pb.

Transcriptoma de frutos de chile habanero

Las muestras de ARN fueron tratadas con el kit RNAsable/RNAsable (Biomatrica) con la finalidad de proteger las muestras de la degradación para su posterior envío al lugar donde fueron secuenciadas. La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina por TruSeq. Se secuenciaron dos muestras biológicas por tipo de suelo (SN y SR) obteniendo en total cuatro librerías (SN1, SN2, SR1, SR2).

Ensamblado del transcriptoma

El ensamblado y predicción de los marcos de lectura abiertos (ORFs), la anotación funcional de la biblioteca de contigs se realizó con los servicios de Macrogen. La empresa utilizó el siguiente procedimiento. Mediante Trimomatic v.0.38 se eliminaron adaptadores y bases de baja calidad (<Q3) de los extremos de estos. Los reads resultantes con una longitud inferior a 36 bases fueron eliminados. Para evaluar la calidad del transcriptoma se usó el software FastQC v-0.11.7. Luego del filtrado, se realizó el ensamblado de novo utilizando el programa Trinity con los parámetros por default. Para realinear los reads en el transcriptoma ensamblado se utilizó el software Bowtie 1.1.2. Los contig fueron filtrados y agrupados en transcritos no redundantes que se denominan unigenes mediante el software CD-HIT v.4.6.

Predicción de ORFs, anotación funcional

La predicción de los ORFs se realizó mediante el software TransDecoder v.3.0.1 para identificar las regiones codificantes. Para la estimación de los genes, los reads fueron alineados a la biblioteca de unigenes con el software Bowtie v.1.1.2, y luego la abundancia de los transcritos fue estimada como conteo de reads, en FPKM (fragmentos por kilobase de transcrito por millones de reads mapeados) y en TPM (transcritos por millón) usando el programa RSEM V.1.3.1. La anotación funcional de los unigenes se realizó con las bases de datos de nucleótidos y de proteínas no redundantes del NCBI, usando blastn (BLAST v.2.9.0) para blastx con el software DIAMON v.0.9.21 para las otras tres bases de datos, usando un valor límite de 1.0×10^{-5} . Con respecto a las anotaciones GO, éstas se clasificaron respecto a cada una de las tres categorías funcionales principales: proceso biológico, componente celular y función molecular. Por último, la anotación KEGG se realizó con el método BBH (Bi-directional best hit).

Análisis de la expresión de los *CcGLRs* en frutos de chile habanero

Para este análisis se utilizaron los CDS de las 17 secuencia *CcGLRs* como genes de referencia contra la biblioteca de unigenes del transcriptoma mediante blast local utilizando el programa Bioedit con un valor de $E=0$. Las secuencias identificadas en el transcriptoma fueron utilizadas para graficar los valores de FPKM en un mapa de calor utilizando el programa TBtools.

3.4 Análisis de la expresión de los *CcGLRs* en los tejidos evaluados

Las secuencias *CcGLRs* identificadas fueron evaluadas mediante un diagrama de Venn (Heberle et al., 2015), para obtener información detallada de su expresión a través de hoja, tallo y raíz. Para la construcción de este diagrama no se tomó en cuenta su nivel de expresión, solo se tomó el dato de la presencia del gen cuando la banda correspondiente estaba presente y el amplicón concordaba con el tamaño esperado.

Resultados

3.5 Calidad del RNA extraído de diferentes tejidos en dos variedades de chile habanero

Los tejidos de hoja, tallo y raíz colectados de las plantas de Mayan kisin y Chichen-itza que se utilizaron en la extracción de ARN mostraron ARN de buena calidad, como se muestra

en la **Figura 3.1**. Las bandas 18s y 28s están presentes indicando la integridad del ARN de cada una de las muestras.

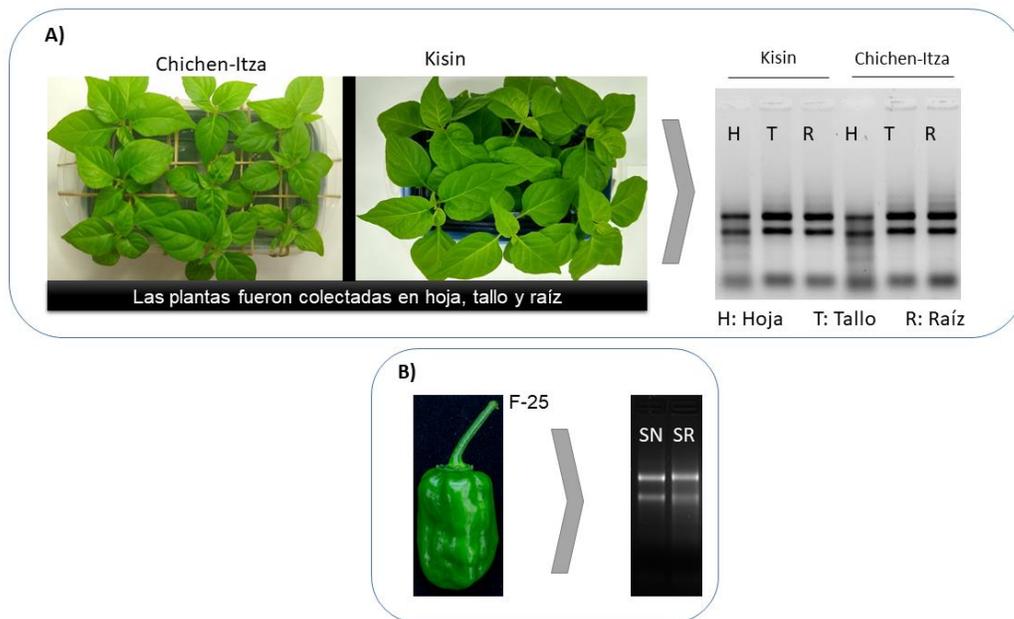


Figura 3. 1. Integridad del ARN extraído de las muestras de chile habanero. A) Fenotipo de plántulas de dos variedades de chile habanero. En la parte superior derecha se muestra el resultado del fraccionamiento de las muestras de hoja, tallo y raíz en un gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etídio. En la figura B) ARN extraído a partir de frutos de 25 días posteriores a la antesis (F-25) en los dos tipos de suelo. SN: Suelo Negro, SR: Suelo Rojo.

3.6 Perfil de expresión de los *CcGLRs*

En los estudios bioinformáticos se habían descartados los *CcGLR*3.4 y 4.5; sin embargo, fueron tomados en cuenta en este estudio para identificar su presencia como transcritos. Los resultados de las PCRs punto final de los *CcGLRs* en hoja, tallo y raíz muestran que 15 de las 19 secuencias a identificar están presentes en las dos variedades de chile habanero utilizadas (**Figura 3.2**). Los *CcGLRs* 2.3, 2.5, 3.3 y 3.5 son las únicas secuencias que presentan una expresión constitutiva a través de hoja, tallo y raíz en las dos variedades. Las 11 secuencias restantes muestran una expresión diferencial a través de hoja tallo y raíz. Por ejemplo, los *CcGLRs*4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 3.2 y 3.4 muestra un mayor nivel de expresión en tallo y raíces, pero un nivel bajo de expresión en hojas. En contraste los

*CcGLRs*2.2, 2.4, 2.9 y 3.1 muestra un mayor nivel de expresión en hojas y tallo. Solo el *CcGLR*2.6 muestra una expresión específica de tejido, ya que solo muestra expresión en raíz (**Figura 3.2**).

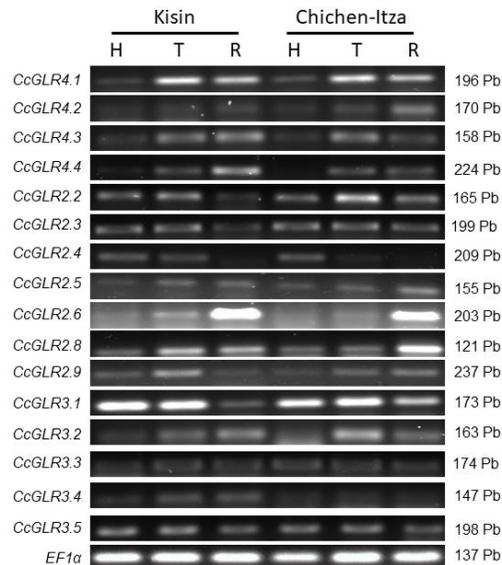


Figura 3. 2. Perfil de expresión de los *CcGLRs* de chile habanero mediante PCR punto final. Las muestras de ADNc provienen de las dos variedades de chile habanero Mayan Kisin y Chichen-Itzá. Los tejidos vegetativos utilizados son H: Hoja, T: Tallo y R: Raíz.

Las secuencias que no mostraron un perfil de expresión son los *CcGLR*4.5, 2.1, 2.7 y 2.8. Éstos posiblemente pasaron a través de algunos de los procesos, como duplicación genética, retrotransposición del ARNm procesado y mutaciones puntuales que dieron como resultado la presencia de pseudogenes (Cheetham et al., 2019).

El diagrama de Venn muestra cómo se distribuye la expresión de los *CcGLRs* en hoja, tallo y raíz en las dos variedades de chile habanero (**Figura 3.3**). En el caso de Mayan Kisin, la mayoría de los *CcGLRs* fueron identificados en tallo y raíz con seis *CcGLRs* identificados, seguido por hoja y tallo donde se identificaron cinco y cuatro secuencias *CcGLRs*, respectivamente. Solo se identificó una secuencia en raíz que es específica para este tejido. En la variedad “Chichen Itzá” la expresión fue diferente, seis secuencias se expresaron en tallo y raíz, seis secuencias se identificaron en los tres tejidos, una secuencia en hoja y tallo, una secuencia en hoja y una en raíz.

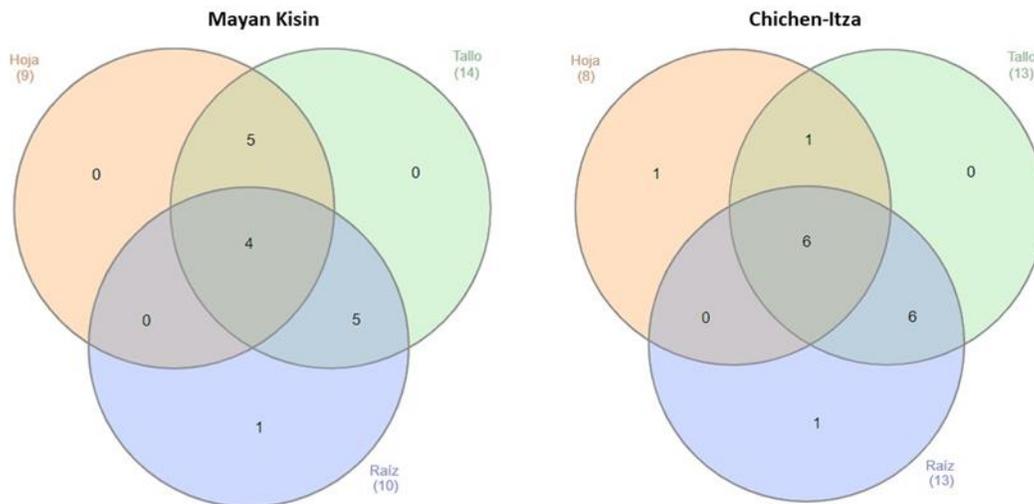


Figura 3. 3. Diagrama de Venn sobre la presencia de los CcGLRs en hoja, tallo y raíz. Para éste análisis se tomaron en cuenta de las dos variedades de chile habanero en estudio. La herramienta en línea utilizada se encuentra en <http://www.interactivenn.net/>.

Realizando un análisis general del diagrama de Venn, se observa que en la variedad Mayan Kisin 14 CcGLRs están presentes en tallo, 10 secuencias en raíz y solo nueve secuencias en hoja. En Chichen-Itzá se puede observar la presencia de 13 secuencias en tallo, 13 en raíz y ocho secuencias en hoja (**Figura 3.3**).

En frutos de plantas cultivadas en suelo negro (SN) y suelo rojo (SR) los resultados del transcriptoma mostraron la presencia de siete CcGLRs de las 19 secuencias identificadas en el genoma (**Figura 3.4**). Los CcGLRs 4.1, 3.1, 3.2, y 3.5 mostraron un aumento en los frutos de plantas que crecieron en SR, comparadas con el SN. Únicamente el CcGLR2.8 mostró un leve aumento en su expresión en SN comparado con SR. Esto sugiere la flexibilidad que tienen los CcGLR frente a condiciones diferentes del entorno. Los CcGLR2.8 y 3.3 presentaron el mismo nivel de expresión en los dos tipos de suelo.

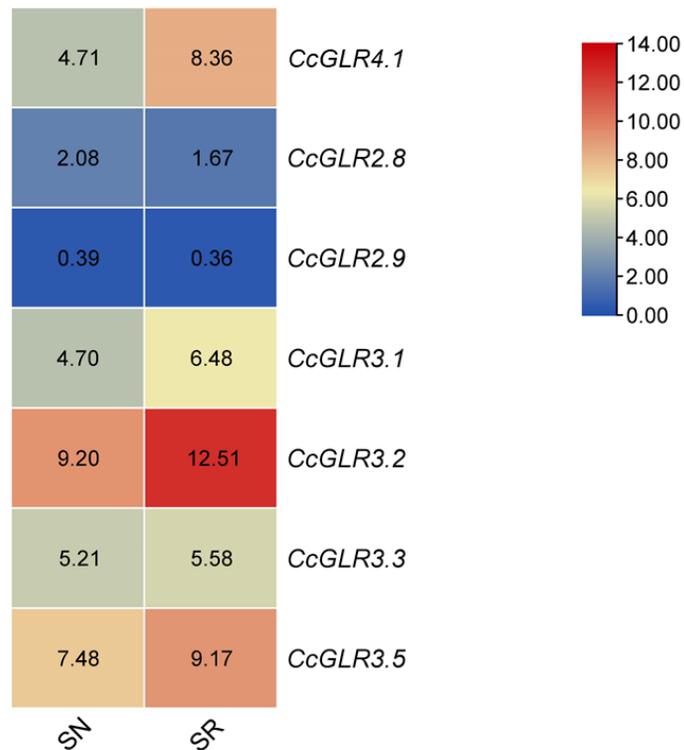


Figura 3. 4. Perfil de expresión de los *CcGLRs* de chile habanero. Los valores de expresión se obtuvieron de los datos del transcriptoma de frutos de las plantas creciendo en los dos tipos de suelo (SN y SR). El número de los recuadros representa el valor de FPKM (fragmentos por kilobase de transcritos por millones de reads mapeados). La imagen se construyó con TbTools y a un costado se muestra el rango que va de azul a rojo, de menor a mayor expresión, respectivamente.

Discusión

En relación con la expresión constitutiva de ciertos *CcGLRs* en hojas, tallos y raíces, estudios similares en *Arabidopsis* han identificado genes reguladores que desempeñan un papel clave en el desarrollo y la respuesta al estrés en diferentes tejidos (Zhang *et al.*, 2013). La expresión diferencial entre los tejidos en las variedades de chile habanero sugiere

funciones específicas para cada gen en procesos fisiológicos distintos. La ausencia de expresión en algunos *CcGLRs*, sugiriendo la posible formación de pseudogenes, coincide con observaciones en otros sistemas biológicos donde procesos evolutivos llevan a la inactivación de genes no funcionales (Kovalenko & Patrushev, 2018).

El análisis de expresión diferencial entre las variedades Mayan Kisin y Chichen itza destaca la plasticidad genética y la variabilidad intraespecífica, respaldando hallazgos en estudios de diversidad genética en plantas (Frankham, 2005).

La variación en la expresión de *CcGLRs* en respuesta a diferentes tipos de suelo coincide con investigaciones que destacan la plasticidad genética de las plantas en la adaptación a condiciones cambiantes (Marschner, 2011). La respuesta diferencial de los *CcGLRs* sugiere una adaptación funcional a la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Rus et al., 2006).

Comparando los resultados de expresión en suelos negro y rojo, se observan similitudes con estudios en tomates que han demostrado cambios en la expresión génica relacionados con la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Kang *et al.*, 2011). Esto respalda la hipótesis de que la variación en la expresión de *CcGLRs* en los frutos puede ser una respuesta a las condiciones del suelo.

CAPITULO IV

Efecto del NaCl sobre el perfil de expresión de los CcGLRs

Introducción

La salinidad es uno de los factores abióticos principales que afectan la producción de los cultivos a nivel mundial (Gupta & Huang, 2014). A pesar de décadas de investigación en salinidad no se ha completado el rompecabezas sobre la totalidad de mecanismos de entrada de Na⁺ y las señales de respuesta a este ion (Isayenkov & Maathuis, 2019). A su vez, la mayoría de las investigaciones que se han generado en este campo se han realizado en *A. thaliana* (Zhao et al., 2020). Por esta razón, el conocimiento disponible no puede ser directamente extrapolado a cultivos de importancia agrícola, siendo glicófitas la mayoría de las plantas que se cultivan (Zelm et al., 2020). Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones en paralelo que nos permitan descifrar mecanismo de respuesta a la salinidad y, de esta manera, aportar conocimiento en esta área.

Estudios iniciales en el laboratorio identificaron una familia de proteínas denominada GLRs en chile habanero, una planta hortícola de importancia agro-industrial (León-García et al., 2024). Recientemente, se ha demostrado la participación de esta familia de proteínas en la respuesta al estrés salino. En *A. thaliana* se encontró que los AtGLR3.4 y AtGLR3.7 están involucrados en la respuesta al estrés salino durante la germinación de semillas, a través de la variación del Ca²⁺ citosólico (Wang et al., 2019; Cheng et al., 2018; Cheng et al., 2016).

En otros estudios, utilizando análisis transcriptómicos en plantas halófitas, se ha visto una variación en la expresión de diferentes GLRs (Xu et al., 2021; Yao et al., 2020), lo cual sugiere su participación durante el estrés. En un estudio reciente se ha demostrado la participación del AtGLR3.6 en la respuesta al estrés salino en *A. thaliana*, debido a que las plantas que sobre expresan el *AtGLR3.6* cuando son sometidas a 150 mM de NaCl muestran un mayor crecimiento de la raíz en comparación con las plantas controles (Silamparasan et al., 2023).

Los GLRs, al ser considerados canales catiónicos no selectivos, también se han considerado como una puerta de entrada del Na⁺ a la célula. En este capítulo se presentan los resultados del análisis de la expresión de los CcGLRs bajo condiciones o no de estrés

por NaCl en la variedad Mayan Kisin, ya que como se observó en el capítulo anterior, bajo condiciones de crecimiento sin estrés no se identificó una diferencia en la expresión entre la variedad Mayan Kisin (tolerante a la salinidad) y Chichen-Itzá (sensible a la salinidad).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Plantas de chile habanero de un mes de edad de la variedad Mayan Kisin, tolerante a la salinidad, se utilizó para los experimentos de salinidad. Se utilizaron 360 plántulas homogéneas en crecimiento y vigor, las cuales fueron repartidas en recipientes con medio Hoagland (400 ml) en condiciones de hidroponía, donde se colocaron 12 plántulas. Los tratamientos consistieron en 0, 3, y 24 h sin sal (controles) y 3 y 24 h con 150 mM de NaCl. De estos cinco tratamientos se sometieron cinco réplicas para cada uno. Las plantas fueron colectadas a los tiempos 0, 3 y 24 horas posteriores al inicio del estrés salino. Las plantas fueron diseccionadas en hoja, tallo y raíz y resguardadas a -80 °C.

4.2 Extracción de RNA y síntesis de ADNc

Las muestras de chile habanero variedad Mayan Kisin de hoja, tallo y raíz colectadas a los diferentes tiempos de estrés por NaCl fueron utilizadas para realizar extracción de ARN. La cantidad utilizada de tejido fueron 0.1 gramo de acuerdo protocolo de extracción “RNEASY MINI KIT QIAGEN” (Quiagen protocol). Las muestras fueron corridas en gel de agarosa al 1% y tenidas con bromuro de etidio.

La síntesis de la primera hebra de ADN se realizó con los reactivos “First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific®). Se tomó 1µg del ARN extraído de cada muestra y se le agrego oligo Dt, dNTPs, solución amortiguadora, transcriptasa reversa hasta completar un volumen con agua de 20 µl. Para inactivar la enzima se colocó por 60 minutos a 42 °c y finalmente 5 minutos a 70 °C

4.3 PCR punto final de los CcGLR bajo condiciones de estrés salino

En este experimento se utilizaron los tejidos de hoja y raíz de las variedades Mayan Kisin bajo los diferentes tratamientos de salinidad. Para la PCR (polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) de cada *CcGLR* se colocó 1 µl de ADNc de cada muestra, 1.25 µl del

amortiguador 10x, 0.5 μ l de 50 mM de $MgCl_2$, 0.5 μ l de dNTPs, 1 μ l de cada cebador específico, en sentido y antisentido (descritos en la **Tabla 2.1**) y 0.2 μ l de Taq DNA polimesase (5 u/ μ l). Las condiciones de polimerización fueron: 95 °C un minuto y 32 ciclos a 94 °C 30 segundos, la temperatura de alineamiento y polimerización corresponde con las características del par de oligonucleótidos utilizados (**Tabla 2.2**), y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Como control de carga, se amplificó al gen de la tubulina, usando los oligonucleótidos: en sentido (5'-GGAGGGTGAGTGAGCAGTTC-3') y en antisentido (5'-CTGCTGTGCGCATCCTGGTAT-3'), generando un amplicón de 156 pb.

4.4 PCR tiempo real de los CcGLRs en raíces bajo estrés por NaCl.

Los ADNc obtenidos de los tejidos de raíz de cada uno de los tratamientos se utilizaron para realizar qPCR tiempo real para cada gen. Para este experimento se utilizó el reactivo Maxima SYBR Green/rox. Se preparó un mix conteniendo los siguiente reactivos por muestra: 5 μ l del reactivo Maxima SYBR Green/rox, 0.3 μ l de los cebadores en sentido y antisentido de una solución stock de 10 μ M, 100 ng de ADNc y agua hasta un volumen de 10 μ l. Como control interno se utilizó al gen tubulina de chile habanero. Las secuencias son: El forward 5'-GGAGGGTGAGTGAGCAGTTC- 3' y el revers 5'-CTGCTGTGCGCATCCTGGTAT- 3'.

El programa de amplificación constó de los siguientes pasos; 95°C por 10 minutos, 95 °C por 15 seg, Tm de alineamiento (esta temperatura depende de los oligos utilizados, Tabla 2.1) 30 seg y 72 °C durante 20 seg. Los ciclos establecidos fueron 40. El equipo utilizado para llevar a cabo los experimentos fue un termociclador Eco (Illumina San Diego, Ca.)

4.5 Determinación del contenido de Na⁺ y K⁺

Las muestras de hojas, tallos y raíces cosechadas durante el tratamiento de estrés salino fueron secadas en una estufa a 65 °C durante 72 h hasta peso constante. Posteriormente, se pesaron 0.1 g de cada muestra vegetal, se colocaron en crisoles de porcelana y se calcinaron a 250 °C por una hora y luego tres horas a 500 °C. El siguiente paso fue realizar una digestión acida, se adicionó 5 ml de HCl al 40 % a cada muestra y ésta se evaporó con ayuda de una placa de calentamiento. A continuación, se agregó un ml de HCl al 100% y se aforó con agua desionizada a 25 ml. La concentración de Na⁺ y K⁺ de cada muestra se determinó en un espectrofotómetro de adsorción atómica modelo 2380 Perkin-Elmer

(Norwalk, CT, USA). Los resultados fueron utilizados para la determinación de la relación Na⁺/K⁺.

4.6 Identificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para la identificación de las especies reactivas de oxígeno se utilizó el reactivo H₂DCFDA que ha sido utilizado en plantas de 10 a 50 μM. En este experimento se utilizó el reactivo mencionado a 20 μM en amortiguador de fosfato.

Para la identificación de ROS se utilizó el reactivo fluoresceína reducida H₂DCFDA a 20 μM, utilizada en plantas de 10 a 50 μM con éxito, como indicador de ROS (Awwad et al., 2019; Fichman et al., 2019). Para el ensayo de ROS se utilizaron hojas de plantas sometidas a cada tratamiento. Las hojas fueron sumergidas en placas Elisa con 10 ml del amortiguador de fosfato conteniendo una concentración de 20 μM de H₂DCFDA, durante 30 minutos. Posteriormente, las hojas fueron enjuagadas con amortiguador de fosfato sin sonda y a continuación se procedió a visualizar las muestras en un espectrofotómetro (Chemi doc® Imaging System, USA). Se tomaron imágenes a cinco hojas de cada tratamiento.

4.7 Identificación de elementos en CIS que responden al estrés salino

Para este análisis se seleccionaron los *CcGLRs* que modificaron su expresión en respuesta a los tratamientos por NaCl. Los promotores fueron evaluados con las bases de datos PlanCare (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y New place (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) y posteriormente los datos fueron representados en imágenes con la herramienta TbTools.

4.8 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron mediante ANOVAs de una vía (Sigma plot, versión 14). La comparación se realizó aplicando una prueba de rango múltiple de Tukey (P<0.05).

Resultados

4.8 Morfología de las plantas de chile habanero bajo 150 mM de NaCl

Las plantas de chile habanero variedad Kisin fueron sometidas a estrés por NaCl en solución hidropónica. Las plantas de la variedad Kisin toleraron la concentración de 150 mM de NaCl durante todo el periodo evaluado (0 horas a 24 horas) sin mostrar un daño severo en su morfología (**Figura 4.1**)



Figura 4. 1 Plantas de la variedad Mayan Kisin bajo estrés por NaCl. Las plantas fueron sometidas durante un periodo de 3 y 24 horas sin o con 150 mM de NaCl. La colecta fue realizada en los tiempos 0, 3 y 24 horas de exposición a los tratamientos.

4.9 Extracción de RNA

Los resultados de las extracciones de ARN en hoja, tallo y raíz de los tres diferentes tiempos de estrés salino fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (p/v) y teñido con bromuro de etidio (**Figura 4.2**). En cada uno de los carriles se puede observar la presencia de la banda 28s y 18s que indica la integridad del ARN.

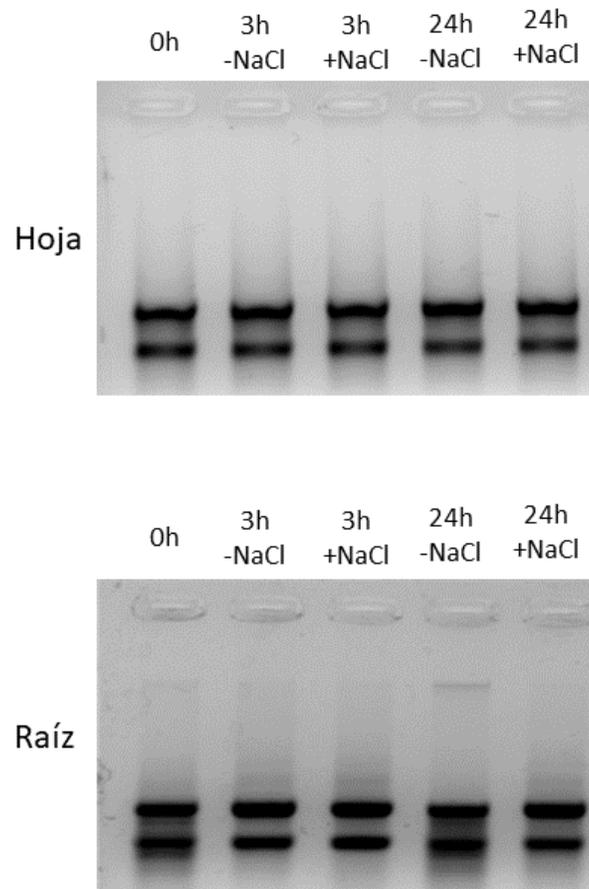


Figura 4. 2 Extracción de ARN de hojas y raíces de plantas de chile habanero. Las extracciones son de los tiempos 0, 3 y 24 horas sin o con 150 mM de NaCl.

4.10 Perfil de expresión de los GLRs bajo condiciones de salinidad por NaCl

La familia IV de los *CcGLRs* compuesta por cinco miembros (*GLR4.1*, *GLR4.2*, *GLR4.3*, *GLR4.4* y *GLR4.5*) muestran un perfil de expresión bastante diferente entre hoja y raíz. *CcGLR4.1* y *CcGLR4.2* son genes que merecen especial atención debido a que modifican su expresión en respuesta al estrés por NaCl. En raíz, el *CcGLR4.1* aumenta su nivel de expresión a las 3 h con 150 mM de NaCl, con respecto a su control al mismo tiempo. Sin embargo, a las 24 horas con estrés salino no se ve un aumento en el nivel de expresión y en hoja se mantiene constante la expresión. En el caso del *CcGLR4.2* también aumenta su expresión en raíz a las 3h de tratamiento con NaCl comparado con el control a 3h y a las 24 en el mismo tejido no se modifica la expresión. La expresión en hojas del mismo gen no

muestra una variación en el nivel de expresión a 3 y 24 h de estrés por NaCl. Otro gen que se modifica es el *CcGLR4.4*. Este aumenta su expresión en raíces a tres horas de estrés por NaCl, comparado con su respectivo control a 3h sin NaCl, pero no muestra ninguna otra variación en su expresión en los tratamientos restantes (**Figura 4.3**).

El *CcGLR4.3* no modifica su expresión en hoja ni en raíces, así como tampoco en alguno de los tiempos de estrés por NaCl. Por último, el *CcGLR4.5* no mostró expresión en ninguno de los tratamientos, ni controles (**Figura 4.3**).

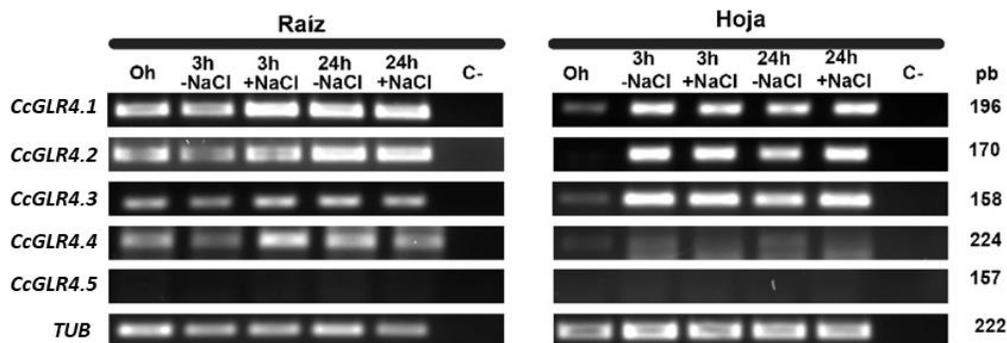


Figura 4. 3 perfil de expresión de los GLRs de la familia IV bajo condiciones de estrés salino. En el lado izquierdo se puede observar la expresión de los CcGLRs en raíces y en la parte izquierda de hojas. Como control interno se utilizó al gen tubulina.

Los perfiles de expresión de la familia II que comprenden los *CcGLR2.1*, *2.2*, *2.4*, *2.5*, *2.6* y *2.7* no mostraron una variación en raíz sin o con los tratamientos de NaCl (**Figura 4.4**). Los *CcGLR2.3*, *2.8* y *2.9* aumentaron el nivel de expresión en el tratamiento de 3h a 150 mM de NaCl con su respectivo control sin sal (3h-NaCl). En el caso de hoja, los *CcGLRs 2.2* y *2.4* presentaron un ligero aumento en el nivel de expresión a las tres horas de estrés por NaCl comparado con su control, aunque a las 24 horas no es evidente ningún cambio en el nivel de la expresión. Los *CcGLRs* restantes no mostraron ningún cambio en el nivel de expresión en el tejido de hoja.

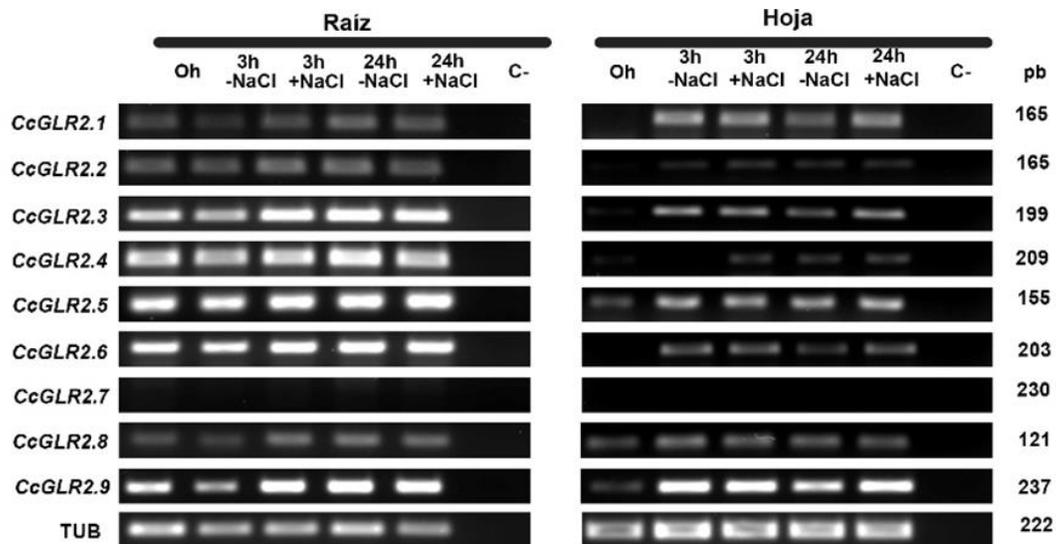


Figura 4. 4 Perfil de expresión de los CcGLRs de la familia II bajo condiciones de estrés salino. Como control interno se utilizó al gen tubulina. –NaCl: sin sal, +NaCl: con sal, C-: Control negativo-

Con respecto a la expresión de los CcGLRs de la familia III, los CcGLRs del 3.1 al 3.5 mostraron un aumento en el nivel de expresión en raíz en el tratamiento de 3 h a 150 mM de NaCl (**Figura 4.5**), aunque no hubo una variación en la expresión a las 24 h con tratamiento de NaCl. En hoja no se identificó una variación en el nivel de expresión de los CcGLRs en ninguno de los tiempos de estrés salino.

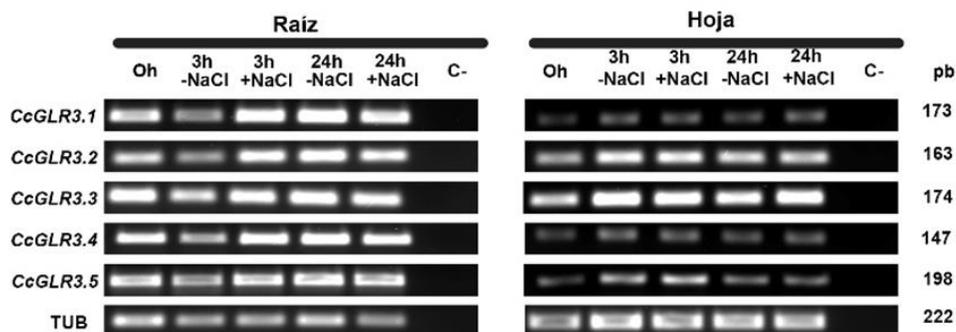


Figura 4. 5 Perfil de expresión de los CcGLRs de la familia III bajo condiciones de estrés salino. Como control interno se utilizó al gen tubulina. –NaCl: sin sal, +NaCl: con sal, C-: Control negativo-

4.11 Contenido de Na⁺ y K⁺ en hoja, tallo y raíz

Con respecto a K⁺ los resultados muestran que en hoja no hubo diferencia significativa en los contenidos de este ion en ninguno de los tratamientos evaluados (**Figura 4.6**). La única diferencia que se puede observar es en el tratamiento de 150 mM de NaCl a las 24 horas donde hubo una disminución aproximadamente del 40% con respecto a su testigo 24 h sin NaCl. La concentración promedio de este ion en los tratamientos es de alrededor de 6 gramos por kilogramo de peso seco. Sin embargo, en los resultados de los contenidos de Na⁺ se observa que hubo un aumento en los contenidos de este ion en hoja, tallo y raíz bajo los dos tiempos de tratamiento con NaCl (**Figura 4.7**).

En cuanto a la relación Na⁺/K⁺ también se puede observar un aumento en los valores a las 3 h de estrés por NaCl y que aumenta todavía más a las 24 horas de estrés salino, lo cual refleja una acumulación de Na⁺ conforme pasa el tiempo, pero que no es suficiente para desplazar a K⁺ (**Figura 4.8**).

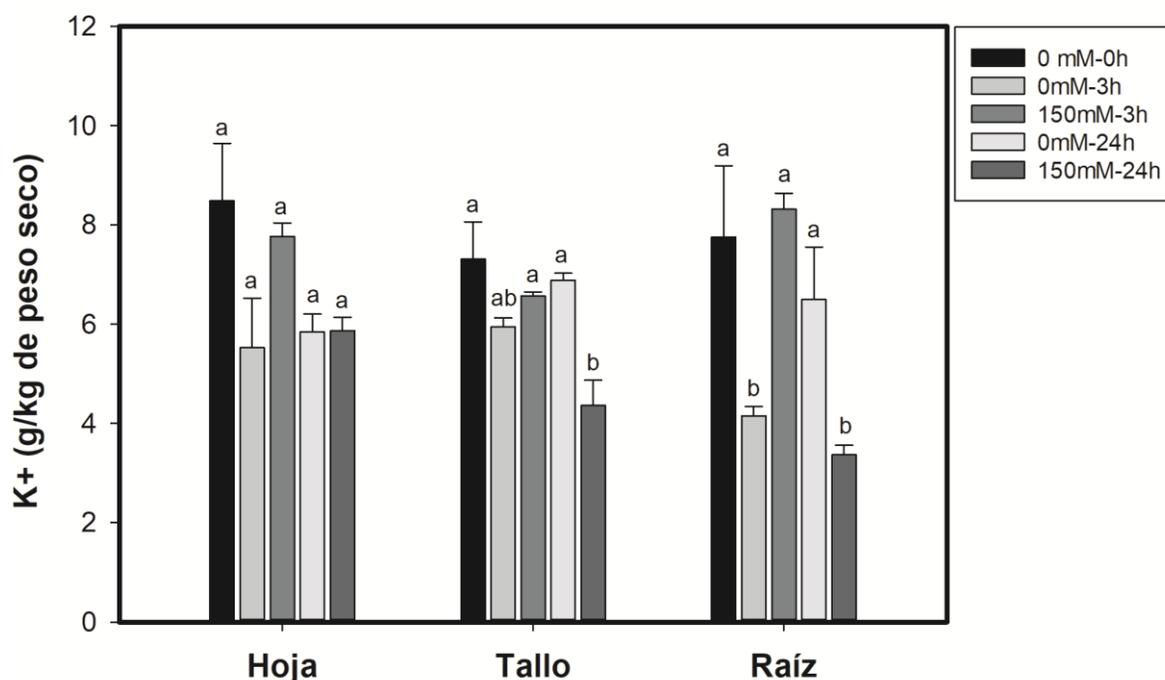


Figura 4. 6 Contenido de K⁺ en hoja, tallo y raíz de plantas sometidas a estrés por NaCl. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de un mismo tejido. H: Hoja, T: Tallo, R: Raíz. La gráfica fue creada en Sigmaplot v. 14.0 (P<0.05; prueba de Tukey).

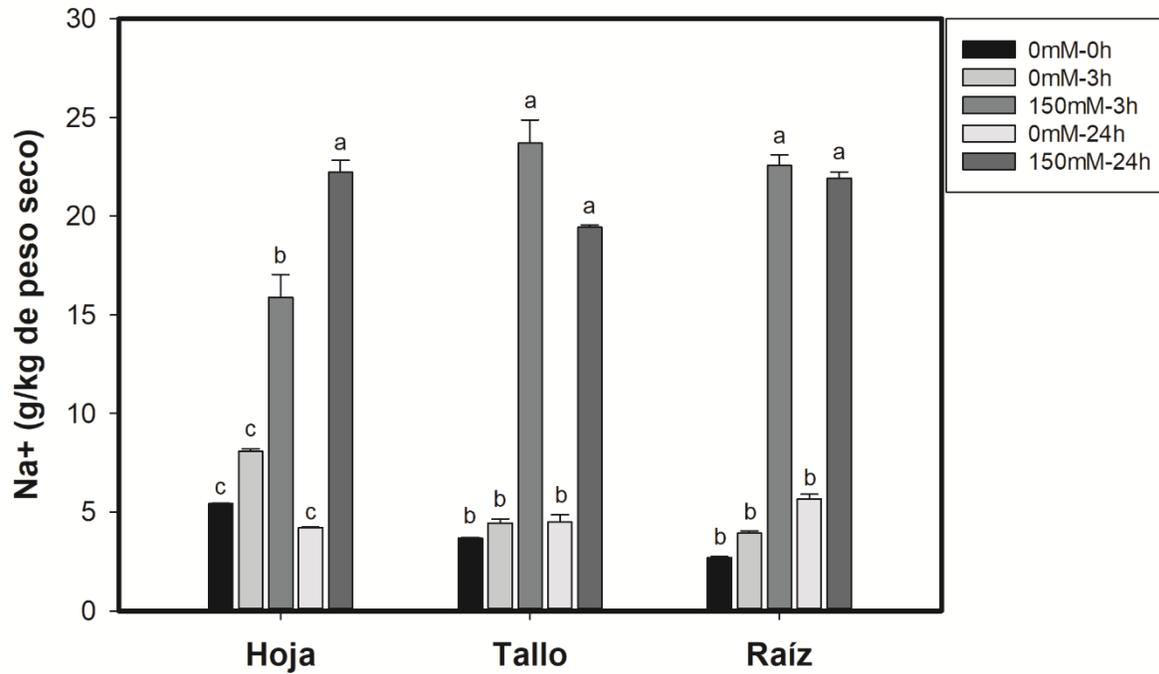


Figura 4. 7 Contenido de Na⁺ en hoja, tallo y raíz de plantas sometidas a estrés por NaCl. H: Hoja, T: Tallo, R: Raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de un mismo tejido. La gráfica fue creada en Sigmaplot v. 14.0 (P<0.05; prueba de Tukey).

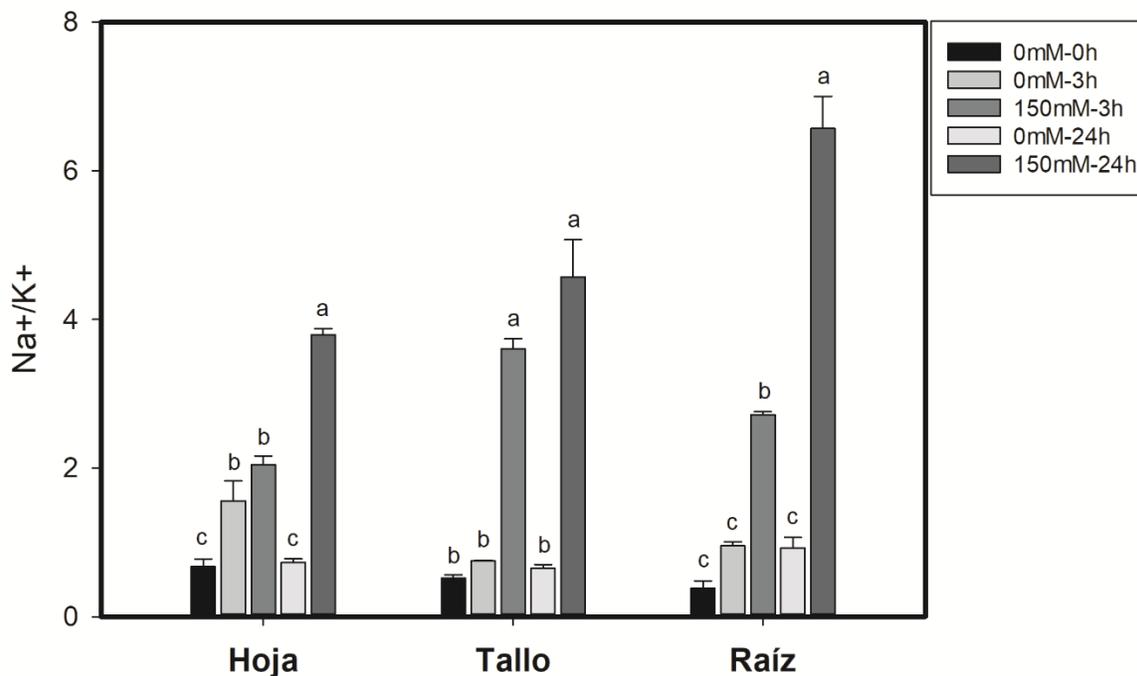


Figura 4. 8 Relación Na^+/K^+ en hoja, tallo y raíz de plantas sometidas a estrés por NaCl. H: Hoja, T: Tallo, R: Raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de un mismo tejido. La gráfica fue creada en Sigmaplot v. 14.0 ($P < 0.05$; prueba de Tukey).

4.12 Presencia de especies reactivas de oxígeno

Los resultados de la fluorescencia de las especies reactivas de oxígeno muestran indudablemente un aumento en las hojas de plántulas sometidas a estrés salino (**Figura 4.9**). Un ligero aumento se puede observar en las primeras 3h de estrés por 150 mM de NaCl, pero que ve su mayor aumento a las 24 horas del estrés por NaCl. De hecho, es interesante como a las 24 h de estrés por NaCl se presentan manchas muy fuertes de la sonda indicando una cantidad muy alta de ROS.

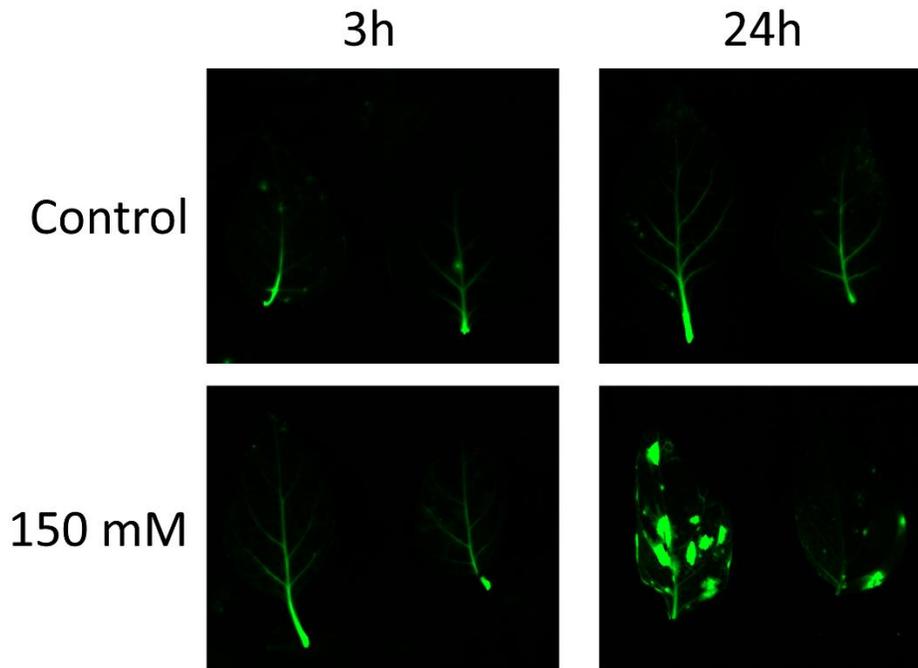


Figura 4. 9 Análisis de ROS en hojas de chile habanero. La sonda utilizada es H₂DCFDA. Las muestras se incubaron durante 30 minutos en la sonda y posteriormente las muestras fueron excitadas a 488 nm y visualizadas a 520 nm en un espectrofotómetro chemy doc2000®.

4.13 PCR en tiempo real de CcGLRs

Los *CcGLRs* 4.1, 4.2, 2.3, 2.5, 2.6, 2.9, 3.1, 3.2, 3.3 y 3.5 fueron seleccionados y evaluados en PCR tiempo real. Los resultados nos muestran que la totalidad de los genes son inducidos por los tratamientos con NaCl (3h+NaCl, 24h+NaCl) (**Figura 4.10**). El *CcGLR4.2* fue el que mostró el valor de expresión relativa más alto a las 24h con 150 Mm de NaCl. Comparado con el control de 24 horas sin NaCl hubo un aumento en la expresión de alrededor de 500%. Los *CcGLR2.6* y *2.9* mostraron un aumento en la expresión de alrededor del 200% a las 3 y 24 horas de estrés por NaCl, en contraste con su control de 3 y 24 horas sin sal. El *CcGLR 3.5* fue el que menos se expresó de todos los genes evaluados.

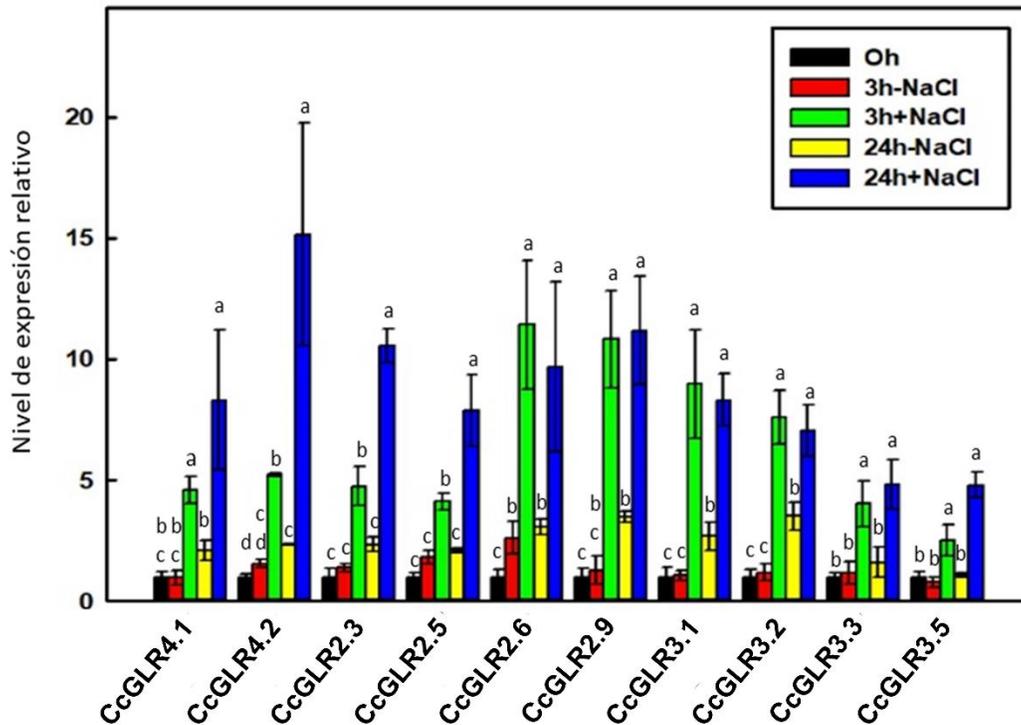


Figura 4. 10 PCR tiempo real de 10 *CcGLRs* en raíces de chile habanero bajo estrés por NaCl. El análisis estadístico fue realizado por gen. Letras diferentes significan diferencias significativas. La gráfica fue creada en Sigmaplot v. 14.0 ($P < 0.05$; prueba de Tukey).

4.14 Elementos en CIS que responden al estrés salino

Las 10 secuencias que se evaluaron por PCR tiempo real, en donde se observa que los tratamientos con NaCl inducen la expresión, fueron tomadas en cuenta para un análisis bioinformático final con el objetivo de identificar aquellos elementos en CIS posiblemente responsables de la inducción de la expresión en respuesta al estrés de los tratamientos.

En total se identificaron 16 elementos en Cis que responden al estrés hídrico por falta de agua (**Figura 4.11**), sin embargo, a pesar de que no está descrito ningún elemento de respuesta a estrés por NaCl, el déficit hídrico es uno de los componentes adherido al estrés salino.

Los elementos en CIS presentes en los promotores de los *CcGLRs* generalmente se encuentran distribuido a lo largo de los 2000 pb, a excepción de los *CcGLRs* 2.5, 3.3 y 3.5 que muestran zonas de mayor densidad de estos elementos en CIS.

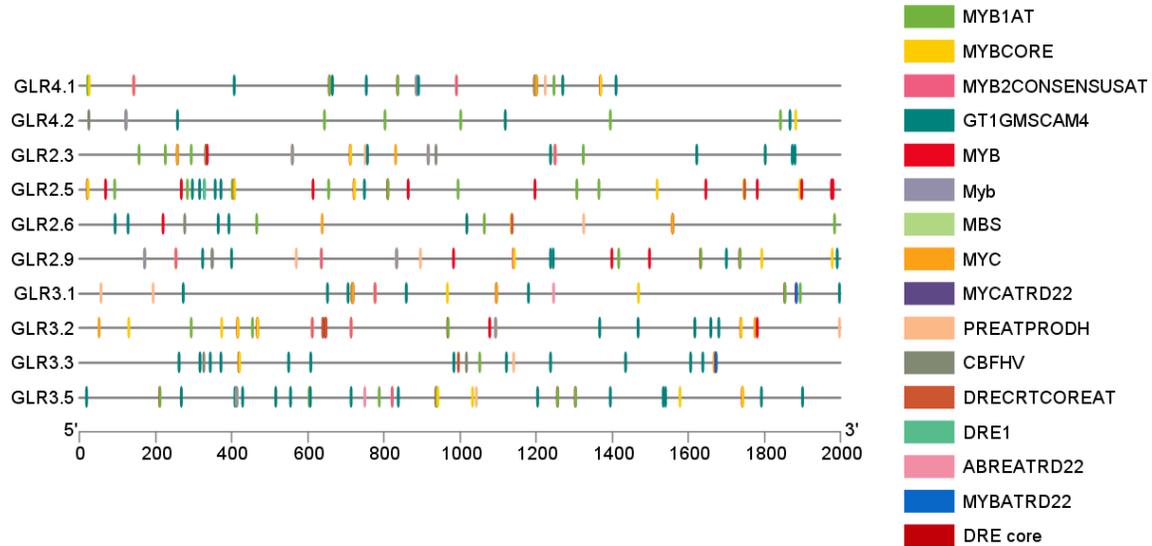


Figura 4. 11 Elementos en Cis presente en los promotores en respuesta al déficit hídrico. La imagen fue generada con TbTools.

Por otro lado, también se identificó la frecuencia de estos elementos en CIS presente en los promotores de los *CcGLRs* (Figura 4.12) y, de esta manera, conocer cuáles son aquellos elementos que más se repiten. El elemento en CIS "GT1GMSCAM4" está presente 16 veces en el *CcGLR*3.5, siendo el más frecuente de todos. Dentro de los elementos en CIS que menos se repiten tenemos a LRT y Myb.

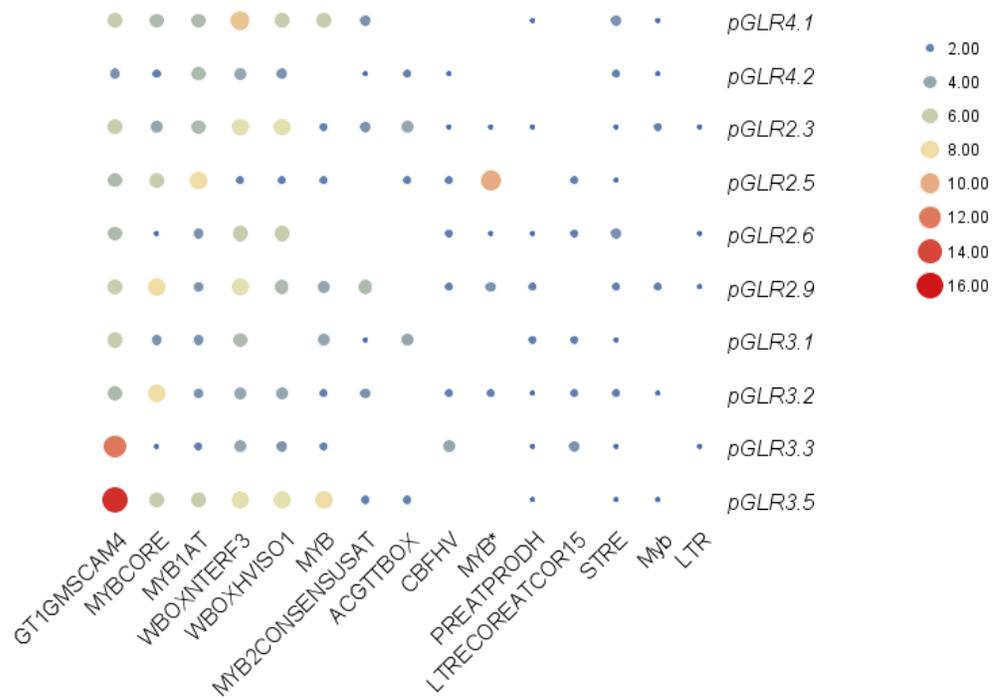


Figura 4. 12 Frecuencia de los elementos en CIS presentes en los promotores de los CcGLRs. Los datos fueron obtenidos de las bases de datos Plant CARE y NewPlace.

CAPITULO V

DISCUSIÓN GENERAL

Solanum lycopersicum (tomate) es la única solanácea donde se han identificados GLRs y con un menor número de secuencias (13), comparado con *A. thaliana* y *O. sativa* donde se han identificado 20 y 24 secuencias GLRs, respectivamente (Singh *et al.*, 2014; Chiu *et al.*, 2002). En *C. chinense* se identificaron 19 secuencias tipo GLRs, lo cual postula a esta especie vegetal como la segunda solanácea donde se realiza un escrutinio completo de estas proteínas. El tamaño de las secuencias identificadas se encuentra en un rango de 477 - 1132 aa; sin embargo, cabe destacar que la mayoría de las secuencias se encuentran por encima de 900 residuos aminoacídicos. En *A. thaliana* la longitud de las secuencias GLRs son muy similares, conteniendo alrededor de 900 residuos aa. En el caso de *O. sativa* también la mayoría de las secuencias presentan una longitud arriba de 900 aa, aunque es de destacar que dentro los GLRs de esta especie vegetal se encuentran secuencias muy cortas, como es el caso del OsGLR3.4 y OsGLR3.8 con 103 y 187 aa, respectivamente. En *C. chinense* las secuencias más cortas identificadas contiene 477 y 669 aa. Todas las secuencias cortas identificadas en especies vegetales donde se han estudiado contiene la presencia de por lo menos un dominio de unión a ligando, aunque carecen de todos los demás dominios característicos de los GLRs de plantas (Singh *et al.*, 2014).

Por otro lado, la similitud entre las secuencias de GLRs de plantas puede ser el resultado de mutaciones y duplicaciones génicas (Chiu *et al.*, 2002) que puede dar lugar a redundancia génica, lo cual complica el estudio de estos tipos de receptores. Los estudios bioinformáticos de la predicción de la localización subcelular de los CcGLRs se realizó con la ayuda de tres herramientas bioinformáticas en línea (DeepLoc, WoLF PSORT, Plant-mPLoc). Los resultados sugieren que todos los CcGLR se ubican en la membrana de las células; sin embargo, se necesita confirmar mediante experimentos biológicos que efectivamente solo se encuentran en un tipo de membrana. Por ejemplo, en *A. thaliana* el AtGLR3.4 mostró una localización subcelular en la membrana plasmática y en la membrana de los cloroplastos lo cual puede ser resultado de las diversas señales dentro de la proteína y de las necesidades metabólicas (Teardo *et al.*, 2011). En otra investigación, Teardo *et al.*, (2015) mostraron que el AtGLR3.5, a través del procesamiento alternativo, se obtenían dos variantes de este gen, cuyos productos daban lugar a la translocación de este receptor

a la membrana celular o la membrana de las mitocondrias. Estas investigaciones sugieren que se necesitan realizar más estudios para desentrañar cual es la localización subcelular de cada GLR, así como si esto es producto únicamente del proceso alternativo de los ARNm.

En el análisis de los promotores putativos de los *CcGLRs* se encontraron diferentes elementos en CIS que corresponden con patrones de respuesta a fitohormonas, respuesta a la luz, daño mecánico, estrés hídrico y respuesta al estrés salino. La presencia de elementos de respuesta al estrés salino abre una brecha para el conocimiento del papel de estos receptores en la respuesta a este estrés abiótico, ya que muy poco se conoce sobre esto. Uno de los antecedentes que muestran el papel de los GLR fue descrito en plantas de arroz (Lu *et al.*, 2014), en donde la sobre expresión del *OsGLR1.1* y *1.3* generan una gran tolerancia en plantas al estrés por déficit hídrico (componente del estrés salino). En otro estudio Wang *et al.*, (2019) mostraron el papel de los GLRs de *A. thaliana* en la salinidad. Estos estudios muestran que estas proteínas tienen un papel importante en la respuesta a la salinidad en plantas.

El número de secuencias identificadas en este trabajo muestra la presencia de 15 *CcGLRs* presentes en dos variedades de chile habanero (Kisin y Chichen-itza) con un perfil muy similar de expresión. Las secuencias identificadas son similares al número de secuencias reportadas para tomate donde se encontraron 13 (Aouini *et al.*, 2012). Los miembros de GLRs encontrados en estas dos solanáceas (chile habanero y tomate) son menores en comparación a especies alejadas evolutivamente donde se ha identificado esta familia de proteínas. En *A. thaliana* se identificaron 20 secuencias GLRs (Chiu *et al.*, 2002), lo cual representa un mayor número que las secuencias identificadas en las solanáceas donde se han estudiado. Sumado a esto, en arroz se identificaron 24 secuencias GLRs (Singh *et al.*, 2014) y más reciente se identificaron un mayor número de secuencias en las especies leñosas *F. vesca*, *P. bretschneideri*, *P. mume* y *P. pérsica* con 34, 36, 34 y 40 GLRs, respectivamente. Estos resultados indican cómo a través de la evolución el número de secuencias se ha reducido. Las secuencias que no mostraron un perfil de expresión son los *CcGLR4.5*, *2.1*, *2.7* y *2.8*. Estos posiblemente pasaron a través de alguno de los procesos como duplicación genética, retrotransposición del ARNm procesado y mutaciones puntuales que dieron como resultado la presencia de pseudogenes (Cheetham *et al.*, 2019).

Las secuencias identificadas en el genoma de chile habanero abren otra brecha de estudio para desenmascarar la función biológica que realizan en esta especie vegetal.

El diagrama de Venn da una idea de cómo está representado el perfil de expresión a través de hoja, tallo y raíz. En este podemos ver que tallo y raíz son los tejidos donde predominantemente se expresan los *CcGLRs*. En *A. thaliana* las 20 secuencias *GLRs* presentes en el genoma se expresan en raíz y solo algunos *GLRs* se expresan en otros tejidos evaluados (Chiu *et al.*, 2002). Este perfil de expresión es similar a la expresión encontrada en nuestro trabajo, aunque la diferencia radica en que la mayoría de *CcGLRs* están presentes en tallo, éste tejido no se evaluó en *A. thaliana*. Esta distribución de los *CcGLRs* a través de toda la planta nos sugiere que este tipo de proteínas tienen un papel importante a través de toda la planta.

La respuesta uniforme de los *CcGLRs* al estrés salino, como evidenciada por la inducción en la expresión tras tratamientos con NaCl, es congruente con estudios previos que destacan la implicación de los *GLRs* en las respuestas de las plantas al estrés. Investigaciones sobre *GLRs* en diversas especies, incluyendo *A. thaliana*, han resaltado su papel en la percepción de señales extracelulares y en la modulación de respuestas frente a estímulos abióticos, como el estrés salino (Weiland *et al.*, 2015). La expresión diferencial entre los miembros de la familia de los *CcGLRs* también encuentra apoyo en estudios que demuestran que diferentes *GLRs* pueden tener respuestas específicas a distintos estresores (Vincill *et al.*, 2012).

El análisis de elementos en CIS en los promotores de los *CcGLRs* revela una compleja red de regulación en respuesta al estrés salino. Destaca la presencia frecuente del elemento "GT1GMSCAM4" en el *CcGLR3.5*, sugiriendo su papel central en la adaptación al estrés. Estudios previos han resaltado la importancia de factores de transcripción MYB, como evidenciado por la presencia de "MYB1AT" y "MYB2CONSENSUSAT", así como la participación de la vía de regulación DRE, indicada por elementos como "DRE core" (Chen *et al.*, 2020; Gilmour *et al.*, 2000). La diversidad de elementos, como "MYC" y "PREATPRODH", señala la complejidad adaptativa del chile habanero ante condiciones salinas, destacando la interconexión de múltiples factores de transcripción y rutas de señalización (Shen *et al.*, 2003; Roy, 2016).

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- A través de análisis *in silico* se logró la identificación de 19 secuencias *GLRs* putativas en el genoma de *C. chinense*.
- De las 19 secuencias *CcGLRs*, 17 contiene todos los dominios característicos de los *GLRs* de plantas.
- El perfil de expresión de los *CcGLRs* muestra la presencia de 15 secuencias de esta familia de proteínas en chile habanero.
- 10 de las 19 secuencias modifican su nivel de expresión en respuesta a estrés por NaCl.

La identificación y caracterización de los *CcGLRs* en chile habanero proporciona una base sólida para investigaciones futuras que profundicen en su función específica y su papel en la adaptación de las plantas a estrés ambiental. Además, la comprensión detallada de los elementos en CIS relacionados con el estrés salino abre la puerta a manipulaciones genéticas y estrategias que permitan conocer específicamente cuales son esos elementos reguladores.

Las investigaciones futuras podrían centrarse en la caracterización funcional de los *CcGLRs* mediante técnicas como la sobreexpresión o el silenciamiento génico, lo que permitiría evaluar su impacto en la tolerancia al estrés salino. Además, la exploración de las interacciones proteína-proteína ayudarían a esclarecer las vías de señalización en las que están involucrados. La aplicación de técnicas avanzadas de biología molecular, como la edición génica CRISPR-Cas9, podría ofrecer herramientas poderosas para modificar selectivamente la expresión de *CcGLRs* y analizar sus efectos en condiciones de estrés salino. En última instancia, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones que contribuirán a la comprensión más profunda de la función y la regulación de los *CcGLRs* en el contexto del chile habanero y, por extensión, en otras plantas sometidas a condiciones adversas.

BIBLIOGRAFÍA

- Amin, I., Rasool, S., Mir, M. A., Wani, W., Masoodi, K. Z., & Ahmad, P. (2021). Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: a molecular approach. *Physiologia Plantarum*, 171(4). <https://doi.org/10.1111/ppl.13185>
- Amirjani, M. R. (2011). Effect of Salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *International Journal of Botany*, 7(1), 73–81. <https://doi.org/10.3923/ijb.2011.73.81>
- Aouini, A., Matsukura, C., Ezura, H., & Asamizu, E. (2012). Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*, 493(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.037>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Aslam, M., Qureshi, R. H., & Ahmed, N. (1993). A rapid screening technique for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 150(1), 99–107. <https://doi.org/10.1007/BF00779180>
- Aslam, Z., Jeschke, W. D., Barrett-Lennard, E. G., Setter, T. L., Watkin, E., & Greenway, H. (1986). Effects of external NaCl on the growth of *Atriplex amnicola* and the ion relations and carbohydrate status of the leaves. *Plant, Cell and Environment*, 9(7), 571–580. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11616320>
- Awwad, F., Bertrand, G., Grandbois, M., & Beaudoin, N. (2019). Reactive oxygen species alleviate cell death induced by thaxtomin a in *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Plants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/plants8090332>
- Bard, L., & Groc, L. (2011). Glutamate receptor dynamics and protein interaction: Lessons from the NMDA receptor. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 48, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.009>
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21), 3613–3634. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0990-9>
- Biłas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2016 127:2, 127(2), 269–287. <https://doi.org/10.1007/S11240-016-1057-7>

- Blumwald, E. (2000, August 1). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00112-5)
- Bojórquez-Quintal, E., Pottosin, I., & Martínez-Estévez, M. (2014). Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in plant science*, 5, 113284.
- Bojórquez-Quintal, E., Velarde-Buendía, A., Ku-González, Á., Carillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarría-Machado, I., ... Martínez-Estévez, M. (2014). Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00605>
- Carpici, E. B., Celik, N., & Bayram, G. (2009). Effects of salt stress on germination of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 8(19), 4918–4922. <https://doi.org/10.5897/AJB09.433f>
- Cheetham, S. W., Faulkner, G. J., & Dinger, M. E. (2019). Overcoming challenges and dogmas to understand the functions of pseudogenes. *Nature Reviews Genetics* 2019 21:3, 21(3), 191–201. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0196-1>
- Chen, G. Q., Cul, C., Mayer, M. L., & Gouaux, E. (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature*, 402(6763), 817–821. <https://doi.org/10.1038/45568>
- Chen, J., Jing, Y., Zhang, X., Li, L., Wang, P., Zhang, S., ... & Wu, J. (2016). Evolutionary and expression analysis provides evidence for the plant glutamate-like receptors family is involved in woody growth-related function. *Scientific Reports*, 6(1), 32013.
- Chen, J., Jing, Y., Zhang, X., Li, L., Wang, P., Zhang, S., ... Wu, J. (2016). Evolutionary and Expression Analysis Provides Evidence for the Plant Glutamate-like Receptors Family is Involved in Woody Growth-related Function. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep32013>
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., & Yu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 120-128.
- Cheng, Y., Tian, Q., & Zhang, W.-H. (2016). Glutamate receptors are involved in mitigating effects of amino acids on seed germination of *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 130, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.004>
- Cheng, Y., Zhang, X., Sun, T., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2018). Glutamate Receptor Homolog3.4 is Involved in Regulation of Seed Germination under Salt Stress in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 59(5), 978–988. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy034>

- Chiu, J. C., Brenner, E. D., DeSalle, R., Nitabach, M. N., Holmes, T. C., & Coruzzi, G. M. (2002). Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(7), 1066–1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004165>
- Cho, D., Kim, S. A., Murata, Y., Lee, S., Jae, S. K., Nam, H. G., & Kwak, J. M. (2009). De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3.1 impairs long-term Ca²⁺-programmed stomatal closure. *Plant Journal*, 58(3), 437–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03789.x>
- Colmer, T. D., Munns, R., & Flowers, T. J. (2005). Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(11), 1425. <https://doi.org/10.1071/EA04162>
- Cominelli, E., & Tonelli, C. (2009). A new role for plant R2R3-MYB transcription factors in cell cycle regulation. *Cell Research*, 19(11), 1231–1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.123>
- Cramer, G. R. (2002). Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Functional Plant Biology*, 29(5), 561–567. <https://doi.org/10.1071/PP01132>
- De Bortoli, S., Teardo, E., Szabò, I., Morosinotto, T., & Alboresi, A. (2016). Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms. *Biophysical Chemistry*, 218, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.07.004>
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrn2055>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7–61. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Donaldson, L., Ludidi, N., Knight, M. R., Gehring, C., & Denby, K. (2004). Salt and osmotic stress cause rapid increases in *Arabidopsis thaliana* cGMP levels. *FEBS Letters*, 569(1–3), 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.016>
- Dong, J., Chen, C., & Chen, Z. (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* (Vol. 51). Retrieved from <http://rana.stanford.edu/clustering/>
- Edel, K. H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J., & Hetherington, A. M. (2017, July). The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.020>
- Escalante-Magaña, C. A. (2020). Efecto del estrés salino (NaCl) sobre el metabolismo de la prolina (Pro) y el papel de este aa suplementado de manera exógena en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) [Tesis que presenta Camilo Andrés Escalante Magaña, en opción al título

- Fichman, Y., Miller, G., & Mittler, R. (2019). Whole-Plant Live Imaging of Reactive Oxygen Species. *Molecular Plant*, 12(9). <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.003>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005, August 1). Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. In *Biological Conservation* (Vol. 126, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
- Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., & Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*, 16(4), 433-442.
- Greger, I. H., Watson, J. F., & Cull-Candy, S. G. (2017). Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*, 94(4), 713–730. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.009>
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gutierrez-Castellanos, N., Da Silva-Matos, C. M., Zhou, K., Canto, C. B., Renner, M. C., Koene, L. M. C., ... De Zeeuw, C. I. (2017). Motor Learning Requires Purkinje Cell Synaptic Potentiation through Activation of AMPA-Receptor Subunit GluA3. *Neuron*, 93(2), 409–424. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.046>
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Plant responses and tolerance to salt stress: Physiological and molecular interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4810.
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022, April 27). Plant Responses and Tolerance to Salt Stress: Physiological and Molecular Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijms23094810>
- Hasegawa, P. M. (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.001>
- Heberle, H., Meirelles, V. G., 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), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Hernandez-Garcia, C. M., & Finer, J. J. (2014a). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, 217–218, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>

- Hernandez-Garcia, C. M., & Finer, J. J. (2014b, March 1). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2019, March 7). Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W., & Zhu, J. K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 12(9), 1667–1677. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.9.1667>
- Juven-Gershon, T., Hsu, J. Y., Theisen, J. W., & Kadonaga, J. T. (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.003>
- Kang, J., & Turano, F. J. (2003a). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6872–6877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030961100>
- Kang, J., & Turano, F. J. (2003b). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6872–6877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030961100>
- Kang, J., Mehta, S., & Turano, F. J. (2004). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* Regulates Abscisic Acid Biosynthesis and Signaling to Control Development and Water Loss. *Plant and Cell Physiology*, 45(10), 1380–1389. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch159>
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretzschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book*, 9. <https://doi.org/10.1199/tab.0153>
- Kang, S., Kim, H. B., Lee, H., Choi, J. Y., Heu, S., Oh, C. J., ... An, C. S. (2006). Overexpression in *Arabidopsis* of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated Ca²⁺ influx and delays fungal infection. *Molecules and Cells*, 21(3), 418–427. <https://doi.org/10.1159/000094288>
- Kapulnik, Y., Teuber, L. R., & Phillips, D. A. (1989). Lucerne (*Medicago sativa* L.) selected for vigor in a nonsaline environment maintained growth under salt stress. *Australian Journal of Agricultural Research*, 40(6), 1253–1259. <https://doi.org/10.1071/AR9891253>
- Kaveh, H., & Farsi, M. (2011). How Salinity Affect Germination and Emergence of Tomato Lines. *J. BIOL. ENVIRON. SCI.*, 5(15), 159–163. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/215594062>
- Kaymakanova, M. (2009). Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*phaseolus vulgaris* l.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23, 326–329.

<https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818430>

- Keisham, M., Mukherjee, S., & Bhatla, S. C. (2018). Mechanisms of sodium transport in plants—progresses and challenges. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 647.
- Keisham, M., Mukherjee, S., & Bhatla, S. C. (2018, February 25). Mechanisms of sodium transport in plants—Progresses and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijms19030647>
- Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., & Knight, M. R. (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the Arabidopsis root. *Plant Journal*, 23(2), 267–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2000.00786.x>
- Kim, S. A., Kwak, J. M., Jae, S. K., Wang, M. H., & Nam, H. G. (2001a). Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant and Cell Physiology*, 42(1), 74–84. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce008>
- Kim, S. A., Kwak, J. M., Jae, S. K., Wang, M. H., & Nam, H. G. (2001b). Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant and Cell Physiology*, 42(1), 74–84. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce008>
- Kim, S. A., Kwak, J., Jae, S. K., Wang, M. H., & Nam, H. (2001). Overexpression of the AtGluR2 Gene Encoding anArabidopsis Homolog of Mammalian Glutamate Receptors Impairs CalciumUtilization and Sensitivity to Ionic Stress in TransgenicPlants. *Plant and Cell Physiology*, 42(1), 74-84.
- Kovalenko, T. F., & Patrushev, L. I. (2018). Pseudogenes as Functionally Significant Elements of the Genome. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 83, Issue 11). <https://doi.org/10.1134/S0006297918110044>
- Lam, H.-M., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Meisel, L., Oliveira, I. C., Shin, M., & Coruzzi, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396(November), 125–126. <https://doi.org/10.1038/24066>
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 460, 525–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>
- Laynes, F. G., & Machado, I. D. L. C. E. (2019). Identificación de transcritos de Receptores de Glutamato en etapas ontogénicas de flores y frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones ambientales (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán). de Doctorado en Ciencias (Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)] Centro de Investigación Científica de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

- León-García, F., García-Laynes, F., Estrada-Tapia, G., Monforte-González, M., Martínez-Estevez, M., & Echevarría-Machado, I. (2024). In Silico Analysis of Glutamate Receptors in *Capsicum chinense*: Structure, Evolution, and Molecular Interactions. *Plants* 2024, Vol. 13, Page 812, 13(6), 812. <https://doi.org/10.3390/PLANTS13060812>
- Lerma, J., & Marques, J. M. (2013). Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron*, 80(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.09.045>
- Li, G., Wu, S., Cai, L., Wang, Q., Zhao, X., & Wu, C. (2013). Identification and mRNA expression profile of glutamate receptor-like gene in quinclorac-resistant and susceptible *Echinochloa crus-galli*. *Gene*, 531(2), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.013>
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Liu, H., Wang, Q., Liu, Y., Zhao, X., Imaizumi, T., Somers, D. E., ... & Lin, C. (2013). Arabidopsis CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), 17582-17587.
- Liu, J. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3730–3734. <https://doi.org/10.1073/pnas.060034197>
- Lomeli, H., Sprengel, R., Laurie, D. J., Köhr, G., Herb, A., Seeburg, P. H., & Wisden, W. (1993). The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Letters*, 315(3), 318–322. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81186-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81186-4)
- Lu, G., Wang, X., Liu, J., Yu, K., Gao, Y., Liu, H., ... Broglie, R. M. (2014). Application of T-DNA activation tagging to identify glutamate receptor-like genes that enhance drought tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 33(4), 617–631. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1586-7>
- Lü, W., Du, J., Goehring, A., & Gouaux, E. (2017). Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science*, 355(6331). <https://doi.org/10.1126/science.aal3729>
- M, A. H., A, S. J., M, B., M, M. H., Mohd, R. I., & A, S. (2010). Effect of salt stress on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9(13), 1911–1918. <https://doi.org/10.5897/ajb09.1526>
- Maas, E. V., Lesch, S. M., Francois, L. E., & Grieve, C. M. (1994). Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop Science*, 34(6), 1594–1603. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400060032x>
- Maathuis, F. J. M., Ahmad, I., & Patishtan, J. (2014, September 16). Regulation of Na⁺

- fluxes in plants. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00467>
- Madden, D. R. (2002). Ion Channel Structure the Structure and Function of Glutamate Receptor Ion Channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 91–101.
<https://doi.org/10.1038/nrn725>
- Manzoor, H., Kelloniemi, J., Chiltz, A., Wendehenne, D., Pugin, A., Poinssot, B., & Garcia-Brugger, A. (2013). Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Journal*, 76(3), 466–480. <https://doi.org/10.1111/tpj.12311>
- Maricq, A. V., Peckol, E., Driscoll, M., & Bargmann, C. I. (1995). Mechanosensory signalling in *C. Elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor. *Nature*, 378(6552), 78–81. <https://doi.org/10.1038/378078a0>
- Marschner, P. (2011). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*.
<https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, M. R. G., Latz, A., Lacombe, B., Hedrich, R., ... Becker, D. (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*, 222(3), 418–427. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1551-3>
- Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., ... Feijó, J. a. (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6028), 434–437.
<https://doi.org/10.1126/science.1201101>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Monaghan, D. T., Bridges, R. J., & Cotman, C. W. (1989). THE EXCITATORY AMINO ACID RECEPTORS: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties In the Function of the Central Nervous System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 365–401.
- Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500(7463), 422–426. <https://doi.org/10.1038/nature12478>
- Moyroud, E., Kusters, E., Monniaux, M., Koes, R., & Parcy, F. (2010). LEAFY blossoms. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.007>
- Mukherjee, S., & Manahan-Vaughan, D. (2013). Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology*, 66, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.005>
- Munir, N., Hasnain, M., Roessner, U., & Abideen, Z. (2022). Strategies in improving plant

- salinity resistance and use of salinity resistant plants for economic sustainability. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1877033>
- Munir, N., Hasnain, M., Roessner, U., & Abideen, Z. (2022). Strategies in improving plant salinity resistance and use of salinity resistant plants for economic sustainability. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(12), 2150-2196.
- Munns, R., & Gilliam, M. (2015, November 1). Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytologist*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.13519>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nguyen, C. T., Kurenda, A., Stolz, S., Chételat, A., & Farmer, E. E. (2018). Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201807049. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807049115>
- Ondrasek, G., Rathod, S., Manohara, K. K., Gireesh, C., Anantha, M. S., Sakhare, A. S., ... Horvatinec, J. (2022). Salt Stress in Plants and Mitigation Approaches. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 717, 11(6), 717. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11060717>
- Ondrasek, G., Rathod, S., Manohara, K. K., Gireesh, C., Anantha, M. S., Sakhare, A. S., ... & Horvatinec, J. (2022). Salt stress in plants and mitigation approaches. *Plants*, 11(6), 717.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056–4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>
- Popov, A. V., Kushnireva, L. A., Doronin, M. S., & Henley, J. M. (2017). Kainate receptors are the key to understanding synaptic plasticity, learning and memory (Review). *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, 9(4), 228–237. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.28>
- Reiner, A., & Levitz, J. (2018). Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*, 98(6), 1080–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
- Roy, S. (2016). Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant signaling & behavior*, 11(1), e1117723.
- Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., & Martínez-Estévez, M. (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*, 63(3), 70-76.

- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., & Salt, D. E. (2006). Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020210>
- Shahmuradov, I. A., Kh Umarov, R., & Solovyev, V. V. (2017). TSSPlant: a new tool for prediction of plant Pol II promoters. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1353>
- Shen, Y. G., Zhang, W. K., He, S. J., Zhang, J. S., Liu, Q., & Chen, S. Y. (2003). An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 923-930.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Zhu, J. K. (2002). The putative plasma membrane NA⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance NA⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 14(2), 465–477. <https://doi.org/10.1105/tpc.010371>
- Shrestha, A., Khan, A., & Dey, N. (2018). cis–trans Engineering: Advances and Perspectives on Customized Transcriptional Regulation in Plants. *Molecular Plant*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.008>
- Silamparasan, D., Chang, I. F., & Jinn, T. L. (2023). Calcium-dependent protein kinase CDPK16 phosphorylates serine-856 of glutamate receptor-like GLR3.6 protein leading to salt-responsive root growth in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1093472>
- Singh, A., Kanwar, P., Yadav, A. K., Mishra, M., Jha, S. K., Baranwal, V., ... Pandey, G. K. (2014). Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *FEBS Journal*, 281(3), 894–915. <https://doi.org/10.1111/febs.12656>
- Singh, S. K., Chien, C. Te, & Chang, I. F. (2016). The *Arabidopsis* glutamate receptor-like gene GLR3.6 controls root development by repressing the Kip-related protein gene KRP4. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1853–1869. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv576>
- Sobolevsky, A. I. (2015). Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *Journal of Physiology*, 593(1), 29–38. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264911>
- Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P., & Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462(7274), 745–756. <https://doi.org/10.1038/nature08624>
- Sun, C., Jin, L., Cai, Y., Huang, Y., Zheng, X., & Yu, T. (2019). L-Glutamate treatment enhances disease resistance of tomato fruit by inducing the expression of glutamate receptors and the accumulation of amino acids. *Food Chemistry*, 293(February), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.113>
- Tapken, D., & Hollmann*, M. (2008). *Arabidopsis thaliana* Glutamate Receptor Ion

- Channel Function Demonstrated by Ion Pore Transplantation.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.076>
- Teardo, E., Carraretto, L., Bortoli, S. De, Costa, A., Behera, S., Wagner, R., ... Szabo, I. (2015). Alternative Splicing-Mediated Targeting of the Arabidopsis GLUTAMATE RECEPTOR3.5 to Mitochondria Affects Organelle Morphology. *Plant Physiology*, 167(1), 216–227. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242602>
- Teardo, E., Carraretto, L., Wagner, S., Formentin, E., Behera, S., De Bortoli, S., ... & Szabò, I. (2017). Physiological characterization of a plant mitochondrial calcium uniporter in vitro and in vivo. *Plant physiology*, 173(2), 1355-1370.
- Teardo, E., Formentin, E., Segalla, A., Giacometti, G. M., Marin, O., Zanetti, M., ... Szabò, I. (2011). Dual localization of plant glutamate receptor AtGLR3.4 to plastids and plasmamembrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(3), 359–367. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2010.11.008>
- Topiol, S., Sabio, M., & Uberti, M. (2011). Exploration of structure-based drug design opportunities for mGluRs. *Neuropharmacology*, 60(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.08.001>
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor review. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Ultsch, A., Schuster, C. M., Laube, B., Betz, H., & Schmitt, B. (1993). Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 324(2), 171–177. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81387-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81387-F)
- Vincent, P., & Mulle, C. (2009, January 12). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.066>
- Vincill, E. D., Bieck, A. M., & Spalding, E. P. (2012). Ca²⁺ Conduction by an Amino Acid-Gated Ion Channel Related to Glutamate Receptors. *PLANT PHYSIOLOGY*, 159(1), 40–46. <https://doi.org/10.1104/pp.112.197509>
- Vincill, E. D., Clarin, A. E., Molenda, J. N., & Spalding, E. P. (2013). Interacting Glutamate Receptor-Like Proteins in Phloem Regulate Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(4), 1304–1313. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110668>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Wang, C. F., Han, G. L., Yang, Z. R., Li, Y. X., & Wang, B. S. (2022, April 7). Plant Salinity Sensors: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.859224>
- Wang, C. F., Han, G. L., Yang, Z. R., Li, Y. X., & Wang, B. S. (2022). Plant salinity

- sensors: Current understanding and future directions. *Frontiers in plant science*, 13, 859224.
- Wang, P. H., Lee, C. E., Lin, Y. S., Lee, M. H., Chen, P. Y., Chang, H. C., & Chang, I. F. (2019). The Glutamate Receptor-Like Protein GLR3.7 Interacts With 14-3-3 ω and Participates in Salt Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01169>
- Weiland, M., Mancuso, S., & Baluska, F. (2016). Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 43(1), 1–25. <https://doi.org/10.1071/FP15109>
- Willard, S. S., & Koochekpour, S. (2013). Glutamate, Glutamate Receptors, and Downstream Signaling Pathways. *Int. J. Biol. Sci.*, 9. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>
- Wudick, M. M., Michard, E., Nunes, C. O., & Feijó, J. A. (2018). Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates? *Journal of Experimental Botany*, 69(17), 4151–4163. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery153>
- Wudick, M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-santiago, P., Lizzio, M. A., Nunes, C. O., ... Feijó, J. A. (2018). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Plant Physiology*, 153(May), 533–536. <https://doi.org/10.1126/science.aar6464>
- Xiao, F., & Zhou, H. (2023). Plant salt response: Perception, signaling, and tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1053699. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1053699/BIBTEX>
- Xiao, F., & Zhou, H. (2023). Plant salt response: Perception, signaling, and tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1053699.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., & Zhu, J. K. (2001). The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress—and osmotic stress—responsive gene expression. *The Plant Cell*, 13(9), 2063–2083.
- Xu, Z., Wang, M., Ren, T., Li, K., Li, Y., Marowa, P., & Zhang, C. (2021). Comparative transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of salt tolerance in *Apocynum venetum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167(September), 816–830. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.043>
- Yao, Y., Zhang, X., Wang, N., Cui, Y., Zhang, L., & Fan, S. (2020). Transcriptome analysis of salt stress response in halophyte *Atriplex centralasiatica* leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2989-4>
- Yong, H. C., Chang, H. S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., & Luan, S. (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2), 661–677. <https://doi.org/10.1104/pp.002857>
- Zelm, E. Van, Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants.

ANNUAL REVIEW, 1–31.

- Zeng, L., & Shannon, M. C. (2000). Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. *Crop Science*, 40(4), 996–1003. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.404996x>
- Zhang, J., Cui, T., Su, Y., Zang, S., Zhao, Z., Zhang, C., ... & Luo, J. (2022). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of glutamate receptor-like gene (GLR) family in sugarcane. *Plants*, 11(18), 2440.
- Zhang, J., Cui, T., Su, Y., Zang, S., Zhao, Z., Zhang, C., ... Luo, J. (2022). Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Analysis of Glutamate Receptor-like Gene (GLR) Family in Sugarcane. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(18), 2440–2440. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11182440>
- Zhang, Q., Cheetamun, R., Dhugga, K. S., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., Shirley, N. J., ... & Fincher, G. B. (2014). Spatial gradients in cell wall composition and transcriptional profiles along elongating maize internodes. *BMC plant biology*, 14(1), 1-19.
- Zhang, X., Zhou, Y., Ding, L., Wu, Z., Liu, R., & Meyerowitz, E. M. (2013). Transcription repressor HANABA TARANU controls flower development by integrating the actions of multiple hormones, floral organ specification genes, and GATA3 family genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(1). <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107854>
- Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J. K., & Shabala, S. (2020, May 21). Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *Innovation(United States)*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>
- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4609.
- Zhou, H., Shi, H., Yang, Y., Feng, X., Chen, X., Xiao, F., ... & Guo, Y. (2023). Insights into plant salt stress signaling and tolerance. *Journal of Genetics and Genomics*.
- Zhou, H., Shi, H., Yang, Y., Feng, X., Chen, X., Xiao, F., ... Guo, Y. (2024). Insights into plant salt stress signaling and tolerance. *Journal of Genetics and Genomics*, 51(1), 16–34. <https://doi.org/10.1016/J.JGG.2023.08.007>
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 441–445. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00085-2)
- Zhu, M., & Li, X. (2023). Genome-wide identification of the glutamate receptor-like gene family in *Vanilla planifolia* and their response to *Fusarium oxysporum* infection. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2204654>
- Zhu, M., & Li, X. (2023). Genome-wide identification of the glutamate receptor-like gene family in *Vanilla planifolia* and their response to *Fusarium oxysporum* infection. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1), 2204654.
- Zhu, S., & Gouaux, E. (2017). Structure and symmetry inform gating principles of

ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 112, 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.034>

ANEXO

Tabla S1. Enlaces de donde se obtuvieron las anotaciones de proteínas para los análisis de ortología.

Especie	Base de datos
<i>Marchantia polymorpha</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Selaginella moellendorffii</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Amborella trichopoda</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Cinnamomum micranthum</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Solanum lycopersicum</i>	http://bioinformatics.cau.edu.cn/TomAP/index.html
<i>Solanum tuberosum</i>	http://plants.ensembl.org/Solanum_tuberosum/Info/Index
<i>Nicotiana tabacum</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Vitis vinifera</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Arabidopsis thaliana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Gossypium hirsutum</i>	https://www.cottongen.org/
<i>Fragaria vesca</i>	https://www.rosaceae.org/search/features
<i>Pyrus bretschneideri</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Prunus mume</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Prunus persica</i>	https://www.rosaceae.org/search/features
<i>Medicago truncatula</i>	http://www.plantgdb.org/MtGDB/
<i>Nelumbo nucifera</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Aquilegia coerulea</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Oryza sativa</i>	http://rice.uga.edu/
<i>Hordeum vulgare</i>	https://phytozome-next.jgi.doe.gov/
<i>Brachypodium distachyon</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Saccharum spontaneum</i>	https://plants.ensembl.org/index.html
<i>Zea mays</i>	https://plants.ensembl.org/index.html
<i>Dendrobium nobile</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Spirodela intermedia</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Cycas panzhihuaensis</i>	https://db.cngb.org/codeplot/datasets/PwRftGHfPs5qG3gE
<i>Adiantum capillus</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Physcomitrella patens</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Tabla S2. Valores de Ka, Ks y Ka/Ks en la comparación de las secuencias CDS de todas las especies con las secuencias de chile habanero. Seq_1: Secuencia 1 comparada; Seq_2: Secuencia 2 comparada. Todas las seq_1 pertenecen a chile habanero.

Seq_1		Seq_2		Comparacion	Ka	Ks	Ka_Ks
CcGLR2.3	PHU14982.1	Nicotiana tabacum	XP_016493185.1	N. Tab-C. chi	0.098084	0.310488	0.315902
CcGLR2.4	PHU14980.1	Nicotiana tabacum	XP_016454935.1	N. Tab-C. chi	0.107846	0.271493	0.397235
CcGLR2.4	PHU14980.1	Nicotiana tabacum	XP_016474840.1	N. Tab-C. chi	0.111956	0.294062	0.380723
CcGLR2.4	PHU14980.1	Nicotiana tabacum	XP_016474841.1	N. Tab-C. chi	0.104580	0.292087	0.358044
CcGLR2.4	PHU14980.1	Nicotiana tabacum	XP_016479175.1	N. Tab-C. chi	0.114600	0.272905	0.419925
CcGLR2.4	PHU14980.1	Nicotiana tabacum	XP_016479177.1	N. Tab-C. chi	0.110377	0.276337	0.399431
CcGLR2.4	PHU14980.1	Nicotiana tabacum	XP_016493185.1	N. Tab-C. chi	0.114471	0.301962	0.379091
CcGLR2.5	PHU14979.1	Nicotiana tabacum	XP_016454935.1	N. Tab-C. chi	0.131207	0.292910	0.447942
CcGLR2.5	PHU14979.1	Nicotiana tabacum	XP_016474840.1	N. Tab-C. chi	0.122656	0.284271	0.431476
CcGLR2.5	PHU14979.1	Nicotiana tabacum	XP_016474841.1	N. Tab-C. chi	0.126774	0.317116	0.399772
CcGLR2.5	PHU14979.1	Nicotiana tabacum	XP_016479175.1	N. Tab-C. chi	0.123257	0.311432	0.395774
CcGLR2.5	PHU14979.1	Nicotiana tabacum	XP_016479177.1	N. Tab-C. chi	0.121844	0.276671	0.440393
CcGLR2.5	PHU14979.1	Nicotiana tabacum	XP_016493185.1	N. Tab-C. chi	0.126525	0.318964	0.396675
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016445242.1	N. Tab-C. chi	0.116983	0.508835	0.229904
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016464132.1	N. Tab-C. chi	0.105381	0.435902	0.241754
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016489939.1	N. Tab-C. chi	0.130582	0.484587	0.269471
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016489940.1	N. Tab-C. chi	0.130142	0.482615	0.269661
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016489941.1	N. Tab-C. chi	0.130582	0.484587	0.269471
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016503424.1	N. Tab-C. chi	0.131899	0.488370	0.270080
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nicotiana tabacum	XP_016512986.1	N. Tab-C. chi	0.098684	0.498488	0.197966
CcGLR2.7	PHU24790.1	Nicotiana tabacum	XP_016444430.1	N. Tab-C. chi	0.274300	1.272822	0.215506
CcGLR2.8	PHU24792.1	Nicotiana tabacum	XP_016444430.1	N. Tab-C. chi	0.283181	1.187297	0.238509
CcGLR2.9	PHU24793.1	Nicotiana tabacum	XP_016444430.1	N. Tab-C. chi	0.066824	0.279084	0.239439
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nicotiana tabacum	XP_016433019.1	N. Tab-C. chi	0.072878	0.224769	0.324236
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nicotiana tabacum	XP_016433020.1	N. Tab-C. chi	0.079740	0.229566	0.347352
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nicotiana tabacum	XP_016487103.1	N. Tab-C. chi	0.068733	0.232973	0.295026

CcGLR3.1	PHU12201.1	Nicotiana tabacum	XP_016487104.1	N. Tab-C. chi	0.073924	0.246449	0.299959
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016432721.1	N. Tab-C. chi	0.106304	0.566386	0.187688
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016432722.1	N. Tab-C. chi	0.106304	0.566386	0.187688
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016432723.1	N. Tab-C. chi	0.106304	0.566386	0.187688
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016433021.1	N. Tab-C. chi	0.042565	0.242715	0.175369
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016433022.1	N. Tab-C. chi	0.042565	0.242715	0.175369
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016433023.1	N. Tab-C. chi	0.038633	0.246046	0.157017
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016469271.1	N. Tab-C. chi	0.045713	0.255222	0.179112
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nicotiana tabacum	XP_016482578.1	N. Tab-C. chi	0.108438	0.579532	0.187113
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016433831.1	N. Tab-C. chi	0.305888	1.898552	0.161117
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016433833.1	N. Tab-C. chi	0.305888	1.898552	0.161117
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016433834.1	N. Tab-C. chi	0.305888	1.898552	0.161117
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016479927.1	N. Tab-C. chi	0.051095	0.223838	0.228268
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016479928.1	N. Tab-C. chi	0.051095	0.223838	0.228268
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016502595.1	N. Tab-C. chi	0.049964	0.218267	0.228910
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nicotiana tabacum	XP_016502603.1	N. Tab-C. chi	0.049964	0.218267	0.228910
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016432721.1	N. Tab-C. chi	0.053312	0.234272	0.227565
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016432722.1	N. Tab-C. chi	0.053312	0.234272	0.227565
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016432723.1	N. Tab-C. chi	0.053312	0.234272	0.227565
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016433021.1	N. Tab-C. chi	0.106883	0.493887	0.216412
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016433022.1	N. Tab-C. chi	0.106883	0.493887	0.216412
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016469271.1	N. Tab-C. chi	0.099698	0.545435	0.182787
CcGLR3.4	PHU19527.1	Nicotiana tabacum	XP_016482578.1	N. Tab-C. chi	0.058907	0.247057	0.238433
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016433831.1	N. Tab-C. chi	0.043906	0.336890	0.130326
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016433833.1	N. Tab-C. chi	0.043906	0.336890	0.130326
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016433834.1	N. Tab-C. chi	0.043906	0.336890	0.130326
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016456027.1	N. Tab-C. chi	0.064728	0.315103	0.205418
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016479927.1	N. Tab-C. chi	0.304203	1.746322	0.174197
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016479928.1	N. Tab-C. chi	0.304203	1.746322	0.174197
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016502595.1	N. Tab-C. chi	0.307136	1.658058	0.185239
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nicotiana tabacum	XP_016502603.1	N. Tab-C. chi	0.307136	1.658058	0.185239

CcGLR1.2	PHU26278.1	Vitis vinifera	CBI30649.3	V. vin-C. chi	0.391708	1.544240	0.253657
CcGLR1.3	PHU20786.1	Vitis vinifera	CBI20225.3	V. vin-C. chi	0.548529	2.311921	0.237261
CcGLR2.6	PHU08778.1	Vitis vinifera	CBI23992.3	V. vin-C. chi	0.263006	1.608772	0.163482
CcGLR3.1	PHU12201.1	Vitis vinifera	CBI28942.3	V. vin-C. chi	0.232069	1.207944	0.192119
CcGLR3.2	PHU12202.1	Vitis vinifera	CBI28943.3	V. vin-C. chi	0.210856	1.322590	0.159426
CcGLR3.3	PHU21095.1	Vitis vinifera	CBI21566.3	V. vin-C. chi	0.264392	1.521335	0.173790
CcGLR3.3	PHU21095.1	Vitis vinifera	CBI37733.3	V. vin-C. chi	0.291545	1.646795	0.177038
CcGLR3.3	PHU21095.1	Vitis vinifera	CBI40741.3	V. vin-C. chi	0.182092	0.935297	0.194689
CcGLR3.5	PHU26821.1	Vitis vinifera	CBI21566.3	V. vin-C. chi	0.222959	1.155570	0.192943
CcGLR3.5	PHU26821.1	Vitis vinifera	CBI37733.3	V. vin-C. chi	0.302849	1.904934	0.158982
CcGLR3.5	PHU26821.1	Vitis vinifera	CBI40741.3	V. vin-C. chi	0.302378	1.551860	0.194849
CcGLR2.6	PHU08778.1	Arabidopsis thaliana	AT2G29110	A. tha-C. chi	0.390053	2.144558	0.181880
CcGLR3.1	PHU12201.1	Arabidopsis thaliana	AT2G32400	A. tha-C. chi	0.355719	2.486624	0.143053
CcGLR3.2	PHU12202.1	Arabidopsis thaliana	AT1G05200	A. tha-C. chi	0.263099	3.389327	0.077626
CcGLR3.2	PHU12202.1	Arabidopsis thaliana	AT2G32390	A. tha-C. chi	0.277312	3.690618	0.075140
CcGLR3.5	PHU26821.1	Arabidopsis thaliana	AT1G42540	A. tha-C. chi	0.329891	3.265606	0.101020
CcGLR3.5	PHU26821.1	Arabidopsis thaliana	AT3G51480	A. tha-C. chi	0.287872	1.933175	0.148911
CcGLR1.2	PHU26278.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D10G003450.1	G. hir-C. chi	0.407907	1.811997	0.225115
CcGLR1.4	PHU20798.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D05G020760.1	G. hir-C. chi	0.402165	2.029344	0.198175
CcGLR2.6	PHU08778.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A07G003890.1	G. hir-C. chi	0.315802	1.974043	0.159977
CcGLR3.1	PHU12201.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A13G009810.1	G. hir-C. chi	0.267672	1.375842	0.194551
CcGLR3.1	PHU12201.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009290.1	G. hir-C. chi	0.268482	1.331840	0.201587
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.1	G. hir-C. chi	0.218686	1.453881	0.150415
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.2	G. hir-C. chi	0.222634	1.629383	0.136637
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.3	G. hir-C. chi	0.229786	1.508468	0.152331
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.4	G. hir-C. chi	0.218686	1.453881	0.150415
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.5	G. hir-C. chi	0.222634	1.629383	0.136637
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.6	G. hir-C. chi	0.218686	1.453881	0.150415
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G016770.7	G. hir-C. chi	0.222634	1.629383	0.136637
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A13G009800.1	G. hir-C. chi	0.225988	1.455494	0.155265
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A13G009800.2	G. hir-C. chi	0.225988	1.455494	0.155265
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A13G009800.3	G. hir-C. chi	0.229694	1.537957	0.149350
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D12G017030.1	G. hir-C. chi	0.220303	1.508311	0.146060
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D12G017030.2	G. hir-C. chi	0.224949	1.653939	0.136008

CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D12G017030.3	G. hir-C. chi	0.220303	1.508311	0.146060
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D12G017030.4	G. hir-C. chi	0.224949	1.653939	0.136008
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.1	G. hir-C. chi	0.222497	1.478757	0.150462
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.10	G. hir-C. chi	0.224162	1.582966	0.141609
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.12	G. hir-C. chi	0.224162	1.582966	0.141609
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.13	G. hir-C. chi	0.224162	1.582966	0.141609
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.15	G. hir-C. chi	0.224162	1.582966	0.141609
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.2	G. hir-C. chi	0.222497	1.478757	0.150462
CcGLR3.2	PHU12202.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D13G009280.4	G. hir-C. chi	0.222497	1.478757	0.150462
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.1	G. hir-C. chi	0.300455	2.665514	0.112720
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.2	G. hir-C. chi	0.300455	2.665514	0.112720
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.7	G. hir-C. chi	0.300455	2.665514	0.112720
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A05G018230.1	G. hir-C. chi	0.208327	1.337251	0.155788
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A05G018230.5	G. hir-C. chi	0.208327	1.337251	0.155788
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A05G018230.7	G. hir-C. chi	0.208327	1.337251	0.155788
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A05G018230.8	G. hir-C. chi	0.208327	1.337251	0.155788
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G001330.4	G. hir-C. chi	0.297338	1.645266	0.180724
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G001330.5	G. hir-C. chi	0.298635	1.661749	0.179711
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G001330.6	G. hir-C. chi	0.297338	1.645266	0.180724
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A12G001330.7	G. hir-C. chi	0.297338	1.645266	0.180724
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A13G006510.1	G. hir-C. chi	0.299717	1.788865	0.167546
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D05G018240.1	G. hir-C. chi	0.197512	1.265940	0.156020
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D05G018240.2	G. hir-C. chi	0.201893	1.265142	0.159582
CcGLR3.3	PHU21095.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D05G018240.3	G. hir-C. chi	0.197512	1.265940	0.156020
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.1	G. hir-C. chi	0.231831	1.578424	0.146875
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.2	G. hir-C. chi	0.231831	1.578424	0.146875
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.3	G. hir-C. chi	0.213725	1.584109	0.134918
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.4	G. hir-C. chi	0.213725	1.584109	0.134918
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.5	G. hir-C. chi	0.213725	1.584109	0.134918
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_A02G019470.7	G. hir-C. chi	0.231831	1.578424	0.146875
CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D05G018240.1	G. hir-C. chi	0.318912	1.732789	0.184045

CcGLR3.5	PHU26821.1	Gossypium hirsutum	Ghir_D05G018240.3	G. hir-C. chi	0.318912	1.732789	0.184045
CcGLR1.2	PHU26278.1	Fragaria vesca	mrna10719.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.443657	1.672817	0.265215
CcGLR1.4	PHU20798.1	Fragaria vesca	mrna09108.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.406516	1.928256	0.210821
CcGLR2.6	PHU08778.1	Fragaria vesca	mrna08666.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.393156	1.929023	0.203811
CcGLR2.9	PHU24793.1	Fragaria vesca	mrna07476.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.549228	2.819903	0.194768
CcGLR3.1	PHU12201.1	Fragaria vesca	mrna23938.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.267814	1.161966	0.230484
CcGLR3.2	PHU12202.1	Fragaria vesca	mrna23938.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.218905	1.572473	0.139211
CcGLR3.3	PHU21095.1	Fragaria vesca	mrna13028.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.316321	1.675267	0.188818
CcGLR3.3	PHU21095.1	Fragaria vesca	mrna31504.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.177583	1.364437	0.130151
CcGLR3.5	PHU26821.1	Fragaria vesca	mrna13028.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.260447	1.312841	0.198384
CcGLR3.5	PHU26821.1	Fragaria vesca	mrna31504.1-v1.0- hybrid	F. ves-C. chi	0.300209	1.832781	0.163800
CcGLR1.2	PHU26278.1	Pyrus bretschneideri	XP_009346968.2	P. bre- C. chi	0.452972	2.280110	0.198662
CcGLR1.4	PHU20798.1	Pyrus bretschneideri	XP_048436857.1	P. bre- C. chi	0.385589	2.309365	0.166967
CcGLR2.6	PHU08778.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359058.2	P. bre- C. chi	0.306210	1.639518	0.186768
CcGLR3.1	PHU12201.1	Pyrus bretschneideri	XP_009353277.2	P. bre- C. chi	0.260917	1.349206	0.193385
CcGLR3.1	PHU12201.1	Pyrus bretschneideri	XP_048435099.1	P. bre- C. chi	0.258567	1.322757	0.195475
CcGLR3.2	PHU12202.1	Pyrus bretschneideri	XP_018502306.2	P. bre- C. chi	0.224183	1.512629	0.148208
CcGLR3.2	PHU12202.1	Pyrus bretschneideri	XP_048434097.1	P. bre- C. chi	0.212591	1.661120	0.127980
CcGLR3.2	PHU12202.1	Pyrus bretschneideri	XP_048434098.1	P. bre- C. chi	0.212591	1.661120	0.127980
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359616.2	P. bre- C. chi	0.287672	2.400104	0.119858
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359617.2	P. bre- C. chi	0.287672	2.400104	0.119858
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_009369789.1	P. bre- C. chi	0.307286	2.582692	0.118979
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_009369790.1	P. bre- C. chi	0.307286	2.582692	0.118979
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_009369792.1	P. bre- C. chi	0.307286	2.582692	0.118979
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_009372603.2	P. bre- C. chi	0.163476	1.329954	0.122919
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_048443978.1	P. bre- C. chi	0.290626	2.429335	0.119632
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_048443981.1	P. bre- C. chi	0.287672	2.400104	0.119858
CcGLR3.3	PHU21095.1	Pyrus bretschneideri	XP_048443991.1	P. bre- C. chi	0.287672	2.400104	0.119858
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359611.2	P. bre- C. chi	0.298265	1.671521	0.178439
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359616.2	P. bre- C. chi	0.227318	1.542660	0.147355
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359617.2	P. bre- C. chi	0.227318	1.542660	0.147355

CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009359749.3	P. bre- C. chi	0.305350	1.738389	0.175651
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009369789.1	P. bre- C. chi	0.250237	1.557066	0.160710
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009369790.1	P. bre- C. chi	0.250237	1.557066	0.160710
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009369792.1	P. bre- C. chi	0.250237	1.557066	0.160710
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_009372603.2	P. bre- C. chi	0.324068	1.870565	0.173246
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_048443978.1	P. bre- C. chi	0.229875	1.549036	0.148399
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_048443981.1	P. bre- C. chi	0.227318	1.542660	0.147355
CcGLR3.5	PHU26821.1	Pyrus bretschneideri	XP_048443991.1	P. bre- C. chi	0.227318	1.542660	0.147355
CcGLR1.2	PHU26278.1	Prunus mume	XP_008225189.1	P. mum-C. chi	0.407592	1.757533	0.231911
CcGLR1.4	PHU20798.1	Prunus mume	XP_008220344.1	P. mum-C. chi	0.381285	1.575402	0.242024
CcGLR2.6	PHU08778.1	Prunus mume	XP_016647455.1	P. mum-C. chi	0.315830	1.485139	0.212660
CcGLR3.1	PHU12201.1	Prunus mume	XP_008230072.1	P. mum-C. chi	0.244134	1.296879	0.188247
CcGLR3.2	PHU12202.1	Prunus mume	XP_008230074.1	P. mum-C. chi	0.208874	1.298180	0.160897
CcGLR3.2	PHU12202.1	Prunus mume	XP_016649448.1	P. mum-C. chi	0.208874	1.298180	0.160897
CcGLR3.2	PHU12202.1	Prunus mume	XP_016649449.1	P. mum-C. chi	0.208874	1.298180	0.160897
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus mume	XP_008235912.1	P. mum-C. chi	0.287337	1.829404	0.157066
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus mume	XP_008237957.1	P. mum-C. chi	0.164489	1.205354	0.136465
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus mume	XP_008241916.1	P. mum-C. chi	0.287384	1.838766	0.156292
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus mume	XP_008241917.1	P. mum-C. chi	0.287384	1.838766	0.156292
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus mume	XP_008241918.1	P. mum-C. chi	0.287384	1.838766	0.156292
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus mume	XP_016651759.1	P. mum-C. chi	0.287384	1.838766	0.156292
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008237957.1	P. mum-C. chi	0.300659	1.480785	0.203040
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008241916.1	P. mum-C. chi	0.233088	1.258172	0.185259
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008241917.1	P. mum-C. chi	0.233088	1.258172	0.185259
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008241918.1	P. mum-C. chi	0.233088	1.258172	0.185259
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008241922.1	P. mum-C. chi	0.287861	1.421432	0.202514
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008241923.1	P. mum-C. chi	0.287861	1.421432	0.202514
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_008241924.2	P. mum-C. chi	0.280247	1.402392	0.199835
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus mume	XP_016651759.1	P. mum-C. chi	0.233088	1.258172	0.185259
CcGLR1.2	PHU26278.1	Prunus persica	Prupe.4G056600	P. per	0.417386	1.911721	0.218330
CcGLR1.4	PHU20798.1	Prunus persica	Prupe.1G434800	P. per	0.386848	1.541128	0.251016
CcGLR2.6	PHU08778.1	Prunus persica	Prupe.1G399600	P. per	0.324041	1.495951	0.216612

CcGLR3.1	PHU12201.1	Prunus persica	Prupe.3G217800	P. per	0.244568	1.302216	0.187809
CcGLR3.2	PHU12202.1	Prunus persica	Prupe.3G217900	P. per	0.211716	1.303673	0.162400
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus persica	Prupe.5G008300	P. per	0.166151	1.209801	0.137338
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus persica	Prupe.7G106900	P. per	0.295072	1.826536	0.161547
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus persica	Prupe.7G184200	P. per	0.291483	1.926496	0.151302
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus persica	Prupe.7G184600	P. per	0.274389	2.024521	0.135533
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus persica	Prupe.7G223100	P. per	0.286329	1.960691	0.146035
CcGLR3.3	PHU21095.1	Prunus persica	Prupe.8G180400	P. per	0.280534	1.891737	0.148295
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus persica	Prupe.7G106900	P. per	0.235835	1.219248	0.193427
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus persica	Prupe.7G184200	P. per	0.235272	1.233151	0.190789
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus persica	Prupe.7G184600	P. per	0.230976	1.273105	0.181428
CcGLR3.5	PHU26821.1	Prunus persica	Prupe.7G223100	P. per	0.226328	1.263776	0.179089
CcGLR1.2	PHU26278.1	Medicago truncatula	MTR_4g087925	M. tru-C. chi	0.459016	1.647093	0.278683
CcGLR1.3	PHU20786.1	Medicago truncatula	MTR_5g059920	M. tru-C. chi	0.465788	1.830549	0.254453
CcGLR2.6	PHU08778.1	Medicago truncatula	MTR_3g105610	M. tru-C. chi	0.325803	1.433014	0.227355
CcGLR3.1	PHU12201.1	Medicago truncatula	MTR_2g088430	M. tru-C. chi	0.285451	1.829474	0.156029
CcGLR3.2	PHU12202.1	Medicago truncatula	MTR_2g088450	M. tru-C. chi	0.240781	1.461909	0.164703
CcGLR3.3	PHU21095.1	Medicago truncatula	MTR_3g115910	M. tru-C. chi	0.205869	1.442589	0.142708
CcGLR3.3	PHU21095.1	Medicago truncatula	MTR_8g073210	M. tru-C. chi	0.316960	3.406223	0.093053
CcGLR3.5	PHU26821.1	Medicago truncatula	MTR_3g115910	M. tru-C. chi	0.329092	1.976448	0.166507
CcGLR3.5	PHU26821.1	Medicago truncatula	MTR_5g024350	M. tru-C. chi	0.287283	1.721379	0.166891
CcGLR3.5	PHU26821.1	Medicago truncatula	MTR_8g073210	M. tru-C. chi	0.267654	1.599358	0.167351
CcGLR1.2	PHU26278.1	Nelumbo nucifera	XP_010279203.1	N. nuc-C.chi	0.400207	2.272529	0.176106
CcGLR2.2	PHU14985.1	Nelumbo nucifera	XP_010259753.1	N. nuc-C.chi	0.327443	2.558682	0.127974
CcGLR2.6	PHU08778.1	Nelumbo nucifera	XP_019051431.1	N. nuc-C.chi	0.307593	2.041491	0.150671
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nelumbo nucifera	XP_010276020.1	N. nuc-C.chi	0.263249	1.382759	0.190380
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nelumbo nucifera	XP_010276021.1	N. nuc-C.chi	0.263249	1.382759	0.190380
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nelumbo nucifera	XP_010276022.1	N. nuc-C.chi	0.263249	1.382759	0.190380
CcGLR3.1	PHU12201.1	Nelumbo nucifera	XP_010276024.1	N. nuc-C.chi	0.263249	1.382759	0.190380
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nelumbo nucifera	XP_010267709.1	N. nuc-C.chi	0.249299	1.722573	0.144724
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nelumbo nucifera	XP_010276016.1	N. nuc-C.chi	0.209810	1.429573	0.146764
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nelumbo nucifera	XP_010276017.1	N. nuc-C.chi	0.209810	1.429573	0.146764
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nelumbo nucifera	XP_019055573.1	N. nuc-C.chi	0.209810	1.429573	0.146764
CcGLR3.2	PHU12202.1	Nelumbo nucifera	XP_019055574.1	N. nuc-C.chi	0.209810	1.429573	0.146764
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266230.1	N. nuc-C.chi	0.204037	1.403681	0.145358
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266231.1	N. nuc-C.chi	0.204037	1.403681	0.145358
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266233.1	N. nuc-C.chi	0.204879	1.412467	0.145051
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266234.1	N. nuc-C.chi	0.199022	1.400513	0.142106

CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266236.1	N. nuc-C.chi	0.231066	1.830415	0.126237
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266237.1	N. nuc-C.chi	0.231066	1.830415	0.126237
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010266238.1	N. nuc-C.chi	0.231066	1.830415	0.126237
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010270513.1	N. nuc-C.chi	0.245945	1.776062	0.138478
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010276016.1	N. nuc-C.chi	0.309572	2.448444	0.126436
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_010276017.1	N. nuc-C.chi	0.309572	2.448444	0.126436
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_019054358.1	N. nuc-C.chi	0.204037	1.403681	0.145358
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_019054360.1	N. nuc-C.chi	0.263253	1.581382	0.166470
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_019054892.1	N. nuc-C.chi	0.249255	1.425762	0.174822
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_019055573.1	N. nuc-C.chi	0.309572	2.448444	0.126436
CcGLR3.3	PHU21095.1	Nelumbo nucifera	XP_019055574.1	N. nuc-C.chi	0.309572	2.448444	0.126436
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266230.1	N. nuc-C.chi	0.293271	1.627805	0.180163
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266231.1	N. nuc-C.chi	0.293271	1.627805	0.180163
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266233.1	N. nuc-C.chi	0.289475	1.672746	0.173054
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266234.1	N. nuc-C.chi	0.294335	1.637132	0.179787
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266236.1	N. nuc-C.chi	0.268304	1.747851	0.153505
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266237.1	N. nuc-C.chi	0.268304	1.747851	0.153505
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010266238.1	N. nuc-C.chi	0.268304	1.747851	0.153505
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010270513.1	N. nuc-C.chi	0.274850	1.722603	0.159555
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010276016.1	N. nuc-C.chi	0.350146	2.216049	0.158005
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_010276017.1	N. nuc-C.chi	0.350146	2.216049	0.158005
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_019054358.1	N. nuc-C.chi	0.293271	1.627805	0.180163
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_019054360.1	N. nuc-C.chi	0.264169	1.543056	0.171198
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_019055573.1	N. nuc-C.chi	0.350146	2.216049	0.158005
CcGLR3.5	PHU26821.1	Nelumbo nucifera	XP_019055574.1	N. nuc-C.chi	0.350146	2.216049	0.158005
CcGLR1.2	PHU26278.1	Aquilegia coerulea	PIA57964.1	A. coe-C. chi	0.430832	2.492190	0.172873
CcGLR1.4	PHU20798.1	Aquilegia coerulea	PIA30588.1	A. coe-C. chi	0.442786	2.275974	0.194548
CcGLR2.2	PHU14985.1	Aquilegia coerulea	PIA37057.1	A. coe-C. chi	0.326588	2.140530	0.152573
CcGLR3.1	PHU12201.1	Aquilegia coerulea	PIA27509.1	A. coe-C. chi	0.292150	1.463015	0.199691
CcGLR3.2	PHU12202.1	Aquilegia coerulea	PIA27510.1	A. coe-C. chi	0.216288	1.568860	0.137863
CcGLR3.2	PHU12202.1	Aquilegia coerulea	PIA27511.1	A. coe-C. chi	0.223393	1.402751	0.159254
CcGLR3.2	PHU12202.1	Aquilegia coerulea	PIA27513.1	A. coe-C. chi	0.216288	1.568860	0.137863
CcGLR3.2	PHU12202.1	Aquilegia coerulea	PIA27514.1	A. coe-C. chi	0.198461	1.539917	0.128878
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA27510.1	A. coe-C. chi	0.312514	3.785111	0.082564
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA27513.1	A. coe-C. chi	0.321486	6.351160	0.050618
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA46686.1	A. coe-C. chi	0.255250	2.203769	0.115824
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA46687.1	A. coe-C. chi	0.262830	2.182925	0.120403

CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA46688.1	A. coe-C. chi	0.262830	2.182925	0.120403
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA46690.1	A. coe-C. chi	0.219172	1.587718	0.138042
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA46691.1	A. coe-C. chi	0.237712	1.607046	0.147918
CcGLR3.3	PHU21095.1	Aquilegia coerulea	PIA46692.1	A. coe-C. chi	0.230155	1.553355	0.148166
CcGLR3.4	PHU19527.1	Aquilegia coerulea	PIA27512.1	A. coe-C. chi	0.228919	1.234820	0.185386
CcGLR3.5	PHU26821.1	Aquilegia coerulea	PIA46687.1	A. coe-C. chi	0.286227	1.792206	0.159706
CcGLR3.5	PHU26821.1	Aquilegia coerulea	PIA46688.1	A. coe-C. chi	0.286227	1.792206	0.159706
CcGLR3.5	PHU26821.1	Aquilegia coerulea	PIA46692.1	A. coe-C. chi	0.318190	1.464856	0.217216
CcGLR2.2	PHU14985.1	Oryza sativa	Os09g0429500	O. sat- C. chi	0.453649	2.519497	0.180055
CcGLR3.2	PHU12202.1	Oryza sativa	Os06g0680500	O. sat- C. chi	0.311552	2.817834	0.110564
CcGLR3.3	PHU21095.1	Oryza sativa	Os02g0117500	O. sat- C. chi	0.354503	2.462571	0.143956
CcGLR2.2	PHU14985.1	Hordeum vulgare	HORVU5Hr1G063500	H. vul-C. chi	0.456038	2.408139	0.189373
CcGLR3.4	PHU19527.1	Hordeum vulgare	HORVU2Hr1G045730	H. vul-C. chi	0.321989	1.863139	0.172821
CcGLR3.3	PHU21095.1	Brachypodium distachyon	BRADI_5g19560v3	B. dis-C. chi	0.311847	3.343620	0.093266
CcGLR2.6	PHU08778.1	Dendrobium nobile	KAI0511173.1	D. nob-C. chi	0.443055	1.885257	0.235010
CcGLR3.1	PHU12201.1	Dendrobium nobile	KAI0495185.1	D. nob-C. chi	0.346458	2.701434	0.128250
CcGLR3.2	PHU12202.1	Dendrobium nobile	KAI0529678.1	D. nob-C. chi	0.294638	2.647771	0.111278
CcGLR3.3	PHU21095.1	Dendrobium nobile	KAI0528776.1	D. nob-C. chi	0.304777	1.931115	0.157824
CcGLR3.3	PHU21095.1	Dendrobium nobile	KAI0528778.1	D. nob-C. chi	0.304626	1.797849	0.169439
CcGLR3.5	PHU26821.1	Dendrobium nobile	KAI0528776.1	D. nob-C. chi	0.336735	2.068321	0.162806
CcGLR3.5	PHU26821.1	Dendrobium nobile	KAI0528778.1	D. nob-C. chi	0.333096	1.984622	0.167839
CcGLR2.6	PHU08778.1	Cycas panzihuaensis	CYCAS_006223	C. pan-C. chi	0.543000	2.532958	0.214374
CcGLR3.5	PHU26821.1	Cycas panzihuaensis	CYCAS_008738	C. pan-C. chi	0.410973	2.063399	0.199173

Tabla S3. Elementos en CIS presentes en los CcGLRs

Elementos en CIS	Sequence	CIS x elementos	Cis Total x categoria
TATABOX3	TATTAAT	23	1812
TATABOX5	TTATTT	128	
TATAPVTRNALEU	TTTATATA	16	
TATABOXOSPAL	TATTTAA	28	
AT~TATA-box	TATATAAA	6	
CAAT-box	CAAT	311	
CAAT-box	CAAAT	127	
CAAT-box	CCAAT	45	
CAAT-box	CCCAATTT	3	
CAAT-box	TGCCAAC	2	
CAAT-box	CAACCAACTCC	1	
TATA	TATAAAAT	19	
TATA-box	TATATA	163	
TATA-box	ATATAT	75	
TATA-box	TATA	389	
TATA-box	taTATAAAtc	13	
TATA-box	TATAA	151	
TATA-box	TACAAAA	20	
TATA-box	ATTATA	40	
TATA-box	ATATAA	58	
TATA-box	TATAAAA	25	
TATA-box	TATAAA	69	
TATA-box	TATATAA	14	
TATA-box	ccTATAAAaa	10	
TATA-box	TATAAAT	18	
TATA-box	TATACA	30	
TATA-box	TATTTAAA	11	
TATA-box	TAAAGATT	4	
TATA-box	TATAAATA	5	
TATA-box	TACATAAA	5	
TATA-box	TATAAGAA	2	
TATA-box	TATATTTATATTT	1	
LECPLEACS2	TAAAATAT	9	
ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGKC	1	

Categoría funcional

luz
desarrollo
Abiotico
biotico
Hormona
Promotor
no conocido

ARFAT	TGTCTC	8
AUXREPSIAA4	KGTCCCAT	1
CAREOSREP1	CAACTC	29
CPBCSPOR	TATTAG	32
ERELEE4	AWTTCAAA	9
GADOWNAT	ACGTGTC	1
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	60
T/GBOXATPIN2	AACGTG	21
TATCCACHVAL21	TATCCAC	6
GAREAT	TAACAAR	33
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTCC	10
DRE2COREZMRAB17	ACCGAC	10
MYBGAHV	TAACAAA	17
CATATGGMSAUR	CATATG	22
GARE1OSREP1	TAACAGA	9
GARE2OSREP1	TAACGTA	3
ATHB6COREAT	CAATTATTA	1
SBOXATRBCS	CACCTCCA	3
ABREOSRAB21	ACGTSSSC	1
OPAQUE2ZMB32	GATGAYRTGG	1
ABRE	ACGTG	50
ABRE	AACCCGG	1
ABRE	TACGGTC	3
ABRE4	CACGTA	15
as-1	TGACG	84
AT~ABRE	TACGTGTC	2
AuxRR-core	GGTCCAT	3
CARE	CAACTCCC	1
CARE	CAACTCAC	5
CGTCA-motif	CGTCA	42
ERE	ATTTTAAA	19
ERE	ATTCATA	4
F-box	CTATTCTCATT	1
GARE-motif	TCTGTTG	7
P-box	CCTTTTG	4
TATC-box	TATCCCA	2
TCA	TCATCTTCAT	8
TCA-element	CCATCTTTTT	10
TCA-element	TCAGAAGAGG	2
TGA-box	TGACGTAA	3
TGA-element	AACGAC	14

Unnamed_1	CGTGG	27	4255
-300CORE	TGTAAAG	13	
ABRERATCAL	MACGYGB	30	
ACGTABOX	TACGTA	28	
ACGTATERD1	ACGT	274	
ANAERO1CONSENSUS	AAACAAA	46	
ANAERO3CONSENSUS	TCATCAC	5	
BOXIINTPATPB	ATAGAA	48	
CACTFTPPCA1	YACT	679	
CARGCW8GAT	CWWWWWWWWG	32	
CGACGOSAMY3	CGACG	28	
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	24	
DOFCOREZM	AAAG	664	
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	58	
E2FCONSENSUS	WTTSSCSS	7	
EMHVCHORD	TGTAAAGT	5	
GTGANTG10	GTGA	219	
HEXAMERATH4	CCGTCG	5	
L1BOXATPDF1	TAAATGYA	7	
MYBCOREATCYCB1	AACGG	42	
MYBPLANT	MACCWAMC	8	
MYBPZM	CCWACC	23	
NODCON2GM	CTCTT	110	
NRRBNEXTA	TAGTGGAT	3	
POLASIG1	AATAAA	152	
POLASIG2	AATTAAA	65	
POLASIG3	AATAAT	73	
POLLEN1LELAT52	AGAAA	278	
QELEMENTZMZM13	AGGTCA	7	
RAV1AAT	CAACA	133	
RHERPATEXPA7	KCACGW	29	
SEBFCONSSTPR10A	YGTGCWC	8	
SURECOREATSULTR11	GAGAC	35	
SV40COREENHAN	GTGGWWHG	13	
TAAAGSTKST1	TAAAG	174	
TATCCAOSAMY	TATCCA	21	
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAY	11	
NODCON1GM	AAAGAT	56	
CGCGBOXAT	VCGCGB	16	
RAV1BAT	CACCTG	12	
AACACOREOSGLUB1	AACAAAC	22	

SREATMSD	TTATCC	21
SEF3MOTIFGM	AACCCA	24
CTRMCAV35S	TCTCTCTCT	4
SEF1MOTIF	ATATTTAWW	19
SITEIATCYTC	TGGGCY	12
SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	19
ACGTOSGLUB1	GTACGTG	3
CMSRE1IBSPOA	TGGACGG	1
HEXMOTIFTAH3H4	ACGTCA	12
TGACGVMAMY	TGACGT	12
RYREPEATLEGUMINBOX	CATGCAY	9
RYREPEATGMGY2	CATGCAT	9
RYREPEATBNNAPA	CATGCA	9
CELLCYCLESC	CACGAAAA	2
RBCSCONSENSUS	AATCCA	6
POLLEN2LELAT52	TCCACCATA	1
CANBNNAPA	CNAACAC	17
PROLAMINBOXOSGLUB1	TGCAAAG	3
2SSEEDPROTBANAPA	CAAACAC	5
CARGATCONSENSUS	CCWWWWWWGG	2
GLMHVCHORD	RTGASTCAT	1
GT1MOTIFPSRBCS	KWGTGRWAAWRW	4
CCA1ATLHCB1	AAMAATCT	12
RGATAOS	CAGAAGATA	1
BS1EGCCR	AGCGGG	1
CEREGLUBOX1PSLEGA	TGTTAAAGT	1
EVENINGAT	AAAATATCT	2
SITEIOSPCNA	CCAGGTGG	1
TGTCACACMCUCUMISIN	TGTCACA	1
CEREGLUBOX2PSLEGA	TGAAAAC	7
XYLAT	ACAAAGAA	9
SURE1STPAT21	AATAGAAAA	6
BP5OSWX	CAACGTG	7
5659BOXLELAT5659	GAAWTTGTGA	1
REBETALGLHCB21	CGGATA	5
WUSATAg	TTAATGG	2
S2FSORPL21	CCATACATT	1
MSACRCYM	AGACCGTTG	1
TELOBOXATEEF1AA1	AAACCCTAA	2
UP2ATMSD	AAACCCTA	2
CEREGLUBOX3PSLEGA	TGTA AAAAGT	1

SURE2STPAT21	AATACTAAT	1		
-300ELEMENT	TGHAAARK	36		
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	220		
SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	106		
AMYBOX1	TAACARA	26		
AAGAA-motif	GAAAGAA	37		
A-box	CCGTCC	3		
AC-I	(T/C)C(T/C)(C/T)ACC(T/C)ACC	1		
AC-II	CCACCAACCCCC	1		
ARE	AAACCA	65		
AT-rich element	ATAGAAATCAA	2		
CAT-box	GCCACT	5		
CCAAT-box	CAACGG	5		
circadian	CAAAGATATC	3		
dOCT	CACGGATC	1		
GC-motif	CCCCCG	2		
GCN4_motif	TGAGTCA	1		
HD-Zip 3	GTAAT(G/C)ATTAC	1		
MBSI	aaaAaaC(G/C)GTTA	1		
MBSI	TTTTTACGGTTA	1		
O2-site	GATGATGTGG	4		
O2-site	GTTGACGTGA	1		
O2-site	GATGACATGG	1		
RY-element	CATGCATG	1		
Unnamed_1	GAATTTAATTAA	5		
Unnamed_14	TCCACGTAGA	4		
EBOXBNNAPA	CANNTG	194		1566
GATABOX	GATA	326		
GT1CONSENSUS	GRWAAW	375		
IBOX	GATAAG	11		
IBOXCORE	GATAA	111		
IBOXCORENT	GATAAGR	8		
INRNTPSADB	YTCANTYY	80		
TBOXATGAPB	ACTTTG	33		
ZDNAFORMINGATCAB1	ATACGTGT	3		
SORLIP1AT	GCCAC	15		
-10PEHVPSBD	TATTCT	41		
SORLIP2AT	GGGCC	7		
HDZIP2ATATHB2	TAATMATTA	8		
SORLREP3AT	TGTATATAT	8		
AT1BOX	AATATTTTTATT	1		

BOXCPSAS1	CTCCAC	3
SORLIP4AT	GTATGATGG	1
SORLIP5AT	GAGTGAG	2
LBOXLERBCS	AAATTAACCAA	1
SORLIP3AT	CTCAAGTGA	1
REALPHALGLHCB21	AACCAA	51
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	1
ACE	GACACGTATG	2
ACE	GCGACGTACC	1
ACE	CTAACGTATT	1
AE-box	AGAAACTT	6
AE-box	AGAAACAA	7
AT1-motif	AATTATTTTTATT	1
ATC-motif	AGTAATCT	2
ATC-motif	AGCTATCCA	1
ATCT-motif	AATCTAATCC	2
Box 4	ATTAAT	45
Box II	TGGTAATAA	1
Box II	ACACGTAGA	1
CAG-motif	GAAAGGCAGAC	1
chs-CMA1a	TACTTAA	10
chs-CMA2a	TCACTGA	1
chs-Unit 1 m1	ACCTAACCCGG	2
GA-motif	ATAGATAA	7
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	1
GATA-motif	GATAGGA	4
GATA-motif	GATAGGG	1
GATA-motif	AAGATAAGATT	2
GATA-motif	AAGGATAAGG	1
GATT-motif	CTCCTGATTAGC	1
G-box	CACGTG	24
G-box	TACGTG	30
G-Box	CACGTT	21
G-box	CACGTC	6
G-box	TAACACGTAG	3
G-box	TAAACGTG	1
G-box	CACGAC	4
GT1-motif	GGTTAA	28
GT1-motif	GGTTAAT	6
GT1-motif	GTGTGTGAA	1
I-box	TAGATAACC	2

I-box	GTATAAGGCC	1		
I-box	atGATAAGGTC	1		
I-box	TGATAATGT	1		
I-box	gGATAAGGTG	3		
I-box	AGATAAGG	2		
LAMP-element	CTTTATCA	1		
LS7	CAGATTTATTTT	1		
MRE	AACCTAA	10		
Sp1	GGGCGG	2		
TCCC-motif	TCTCCCT	3		
TCT-motif	TCTTAC	32		
Unnamed_1	GGATTTTACAGT	1		
WRKY71OS	TGAC	209		838
ARR1AT	NGATT	364		
BIHD1OS	TGTCA	69		
BOXLCOREDPCAL	ACCWWCC	16		
WBOXPCWRKY1	TTTGACY	19		
WBOXATNPR1	TTGAC	86		
WBOXNTCHN48	CTGACY	13		
MYB1LEPR	GTTAGTT	13		
GCCCORE	GCCGCC	3		
PALBOXPPC	YTYMMCMAMCMMC	2		
PALBOXLPC	YCYACCWACC	1		
AT-rich sequence	TAAAATACT	3		
box S	AGCCACC	2		
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	4		
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	10		
W box	TTGACC	9		
WRE3	CCACCT	15		
S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA	20	328	
MARTBOX	TTWTWTTWTT	79		
MARARS	WTTTATRRTTW	5		
NAPINMOTIFBN	TACACAT	12		
ACGTCBOX	GACGTC	10		
TOPOISOM	GTNWAYATTNATNNG	1		
S1FSORPL21	ATGGTATT	3		
MARABOX1	AATAAAAYAAA	7		
INTRONLOWER	TGCAGG	2		
AAGAA-motif	gGTAAGAAA	10		
CTAG-motif	ACTAGCAGAA	1		
MYC	CAATTG	12		

Myc	TCTCTTA	9	
NON	CAACGGCCACG	1	
Unnamed__16	GCTGCCCGTC	1	
Unnamed__2	AACCTAACCT	4	
Unnamed__2	CCCCGG	2	
Unnamed__4	CTCC	136	
Unnamed__6	taTAAATATct	4	
WUN-motif	AAATTACT	7	
WUN-motif	TTATTACAT	2	
WBOXHVIS01	TGACT	75	
GT1GMSCAM4	GAAAAA	114	
MYB1AT	WAACCA	100	
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	50	
MYBCORE	CNGTTR	112	
MYCATRD22	CACATG	13	
P1BS	GNATATNC	8	
PREATPRODH	ACTCAT	25	
QARBNEXTA	AACGTGT	7	
WBOXNTERF3	TGACY	98	
CBFHV	RYCGAC	31	
MYBATRD22	CTAACCA	5	
LTRECOREATCOR15	CCGAC	25	
DRECRTCOREAT	RCCGAC	13	
CRTDREHVCFB2	GTCGAC	10	
AGMOTIFNTMYB2	AGATCCAA	1	
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	4	
ANAERO4CONSENSUS	GTTTHGCAA	2	
AMYBOX2	TATCCAT	5	
IRO2OS	CACGTGG	4	
LTREATLTI78	ACCGACA	3	
ABREATRD22	RYACGTGGYR	2	
ACGTTBOX	AACGTT	38	
DRE core	GCCGAC	3	
DRE1	ACCGAGA	2	
LTR	CCGAAA	13	
MBS	CAACTG	22	
MYB	TAACCA	70	
MYB	CAACAG	26	
Myb	TAACTG	21	
MYB	CAACCA	29	
MYB recognition site	CCGTTG	5	

MYC	CATGTG	13	
MYC	CATTG	9	
STRE	AGGGG	23	
WUN-motif	AAATTCTT	4	
WUN-motif	AAATTCCT	2	
WUN-motif	AAATTACTA	1	