



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio del efecto de los D-aminoácidos sobre el
crecimiento de plántulas de chile habanero
(*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

ANGELICA ANAHI SERRALTA INTERIAN

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2014



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 titulado ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del la Dra. Ileana Echevarría Machado, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

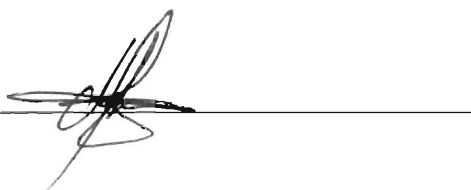
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Noviembre de 2014

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: I.B.Q. ANGELICA ANAHI SERRALTA INTERIAN

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Estudio de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que contribuyen a la variabilidad en la respuesta del sistema radical a distintas fuentes de nitrógeno en *Capsicum chinense*" bajo la dirección del Dra. Ileana Echevarría Machado.

AGRADECIMIENTOS

La vida es un camino que recorreremos cada día y que nos lleva por diferentes senderos, algunas veces serán hermosos y placenteros y otras, sombríos y difíciles de transitar; sin embargo, en ese recorrido nos encontramos con personas que de alguna manera nos acompañan en esos momentos. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo que sin ellas no hubiera sido posible.

Agradezco primeramente a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este tiempo, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia de Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría a través de la beca No. 474112. Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por brindarme la oportunidad de realizar estos estudios y por el espacio otorgado durante mi estancia.

Le doy gracias a mis padres: Fredy Serralta y Landy Interian, por haberme dado la oportunidad de cumplir con mis metas, por los valores que me han inculcado y haberme dado el legado más importante de la vida que es la educación, por lo cual les estaré eternamente agradecida; también me gustaría agradecer a mis hermanos: Andrea, Diana y Jhonatan por ser una parte muy importante de mi vida y por su apoyo incondicional en los momentos difíciles. A mis abuelitos que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado y brindándome su apoyo, en especial a mi abuelita que aunque no se encuentre físicamente con nosotros, siempre estará presente en mis recuerdos.

Le agradezco a la familia Rodríguez Contreras, en especial a la profesora Teresa Contreras, por brindarme un lugar donde vivir, por todo por su apoyo y por considerarme parte de su familia, gracias por su confianza, comprensión y amistad.

Un agradecimiento especial a la Dra. Ileana Echevarría Machado, directora de esta tesis, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma; pero sobre todo por brindarme su apoyo lo largo de estos años, por su confianza, por motivarme en los

momentos difíciles, por haberme tenido la paciencia necesaria y por el tiempo que ha dedicado a mi formación. Por todos los conocimientos que me ayudo a adquirir y sus invaluable consejos para la realización de la tesis la cual fue financiada a través del proyecto CONACYT N° 169041 titulado “Estudio de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que contribuyen a la variabilidad en la respuesta del sistema radical a distintas fuentes de nitrógeno en *Capsicum chinense* Jacq.” que esta bajo su dirección.

Agradezco el apoyo, el interés mostrado por mi trabajo y las valiosas sugerencias recibidas de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada. También me gustaría agradecer la ayuda recibida del Dr. Juan Carlos Pineda Cortez, por sus consejos y sugerencias para la mejora del trabajo, su disposición e interés brindados.

Le agradezco al Dr. Manuel Martínez Estévez y al Dr. Felipe Vázquez Flota, por sus consejos y recomendaciones en la revisión del documento de tesis. Al Dr. Manuel Martínez por sus sugerencias brindadas en los seminarios de grupo que ayudaron a mejorar el trabajo de tesis y a mi formación.

Gracias a la M.C. Mildred Carrillo Pech por haber compartido conmigo sus conocimientos para la realización de los experimentos, por sus consejos, gracias por su confianza y apoyo incondicional, pero sobre todo gracias por tu amistad.

Le agradezco al M.C. Javier García Villalobos por su ayuda en el montaje de la metodología para la determinación de los D-aminoácidos y por enseñarme el manejo del HPLC, por todo su tiempo y sugerencias.

Le agradezco a la M.C. Fátima Medina Lara, por su ayuda en el manejo de winRhizo y por la amistad y confianza depositadas en mí. A la M.C. Lucila Sánchez Cach por su amistad y consejos para la mejora de la tesis y material prestado para la realización de los experimentos.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del laboratorio la Dra. Gladys Santiago por todos sus consejos y amistad y por enseñarme a como realizar los cultivos en hidroponía y utilización del Sigma plot, a la Dra. Nancy Ruiz por su amistad y consejos en el manejo del HPLC, a Emmanuel, Fanny, Luis Fernando, Marta, Camilo, Víctor, Luz

María y Luis Garnica por todos los buenos y malos momentos compartidos, por su amistad y sugerencias, por motivarme en los momentos de desesperación. A todos los del laboratorio 7, gracias por hacer de su familia, una familia para mí.

DEDICATORIAS

A mis padres

Por haberme brindado la vida y forjado valores en mi persona, porque es una pequeña manera de agradecer lo mucho que me han dado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
BIBLIOGRAFÍA	3
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 FORMAS DE NITRÓGENO EN EL SUELO	5
1.3 PRESENCIA DE D-AMINOÁCIDOS EN LA NATURALEZA	8
1.3.1 PRESENCIA Y FUNCIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN LAS PLANTAS	9
1.3.2 PRESENCIA Y FUNCIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN BACTERIAS.....	11
1.3.3 PRESENCIA Y FUNCIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN MAMÍFEROS	13
1.3.4 PRESENCIA Y FUNCIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN INSECTOS Y OTROS ANIMALES.....	15
1.4 METABOLISMO DE LOS D-AMINOÁCIDOS.....	15
1.4.1 RACEMIZACIÓN.....	16
1.4.2 TRANSAMINACIÓN.....	18
1.4.3 DEGRADACIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS	19
1.5 ESTRUCTURA DEL SISTEMA RADICULAR Y SUS MODIFICACIONES EN RESPUESTA A LA PRESENCIA EXÓGENA DE NUTRIENTES	19
1.6 RECEPTORES DE GLUTAMATO EN PLANTAS	22
1.7 MODELO DE ESTUDIO: CHILE HABANERO	24

1.7.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	25
HIPOTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
JUSTIFICACIÓN	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
BIBLIOGRAFÍA	30
CAPÍTULO II	49
EFFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE CHILE HABANERO (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) EN CONDICIONES <i>in vitro</i>	49
2.1 INTRODUCCIÓN	49
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	50
2.2.2 DESINFESTACIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	50
2.2.3 TRATAMIENTO CON LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	50
2.2.4 TRATAMIENTO CON L-AMINOÁCIDOS EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	51
2.2.5 CURVA DOSIS-RESPUESTA	52
2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52

2.3.1 EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE CHILE HABANERO EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	52
2.3.2 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA RAÍZ PRIMARIA DE LAS PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO	60
2.3.3 RESPUESTA ESTEREOESPECÍFICA DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO A LOS AMINOÁCIDOS.....	61
2.3.4 CURVA DOSIS-RESPUESTA	63
2.4 CONCLUSIÓN	66
BIBLIOGRAFÍA	67
CAPÍTULO III	71
EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO CRECIENDO EN CONDICIONES DE HIDROPONIA	71
3.1 INTRODUCCIÓN	71
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	72
3.2.1.1 DESINFESTACIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	72
3.2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE CHILE HABANERO CRECIENDO EN CONDICIONES DE HIDROPONÍA.....	72
3.2.2.1 EFECTO DE MEZCLAS DE D-AMINOÁCIDOS	72
3.2.2.2 EFECTO DE D-AMINOÁCIDOS INDIVIDUALES	74
3.2.3 ANÁLISIS DE NITRATOS, AMINOÁCIDOS TOTALES Y PROTEÍNAS TOTALES	74

3.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
3.3 RESULTADOS	75
3.3.1 EFECTO DE MEZCLAS DE D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EN CONDICIONES DE HIDROPONÍA.....	75
3.3.2 VARIABILIDAD DEL EFECTO DE LAS MEZCLAS DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO DENTRO DE LA ESPECIE	80
3.3.3 EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LAS MEZCLAS DE D-AMINOÁCIDOS SOBRE LA CONCENTRACIÓN ENDÓGENA DE METABOLITOS NITROGENADOS	85
3.3.4 EFECTO DE D-AMINOÁCIDOS INDIVIDUALES SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE METABOLITOS NITROGENADOS DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EN CONDICIONES DE HIDROPONIA	86
3.4 DISCUSIÓN	89
BIBLIOGRAFÍA	94
CAPÍTULO IV	99
TOMA DE D-AMINOÁCIDOS POR LAS RAÍCES DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO	99
4.1 INTRODUCCIÓN	99
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	100
4.2.1 ESTABLECIMIENTO DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS.....	100
4.2.2 TOMA DE D-AMINOÁCIDOS	101
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102

4.3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS POR HPLC	102
4.3.2 TOMA DE D-AMINOÁCIDOS EN EL MEDIO	108
4.4 CONCLUSIONES.....	116
BIBLIOGRAFÍA	117
CAPÍTULO V	121
DISCUSIÓN GENERAL	121
BIBLIOGRAFÍA	126
CAPÍTULO VI	131
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	131
CONCLUSIONES	131
PERSPECTIVAS.....	132
ANEXOS.....	135

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura del peptidoglicano de <i>Escherichia coli</i>	12
Figura 1.2 Tipo y concentración de D-aminoácidos presentes en los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana	12
Figura 1.3 Racemización catalizada por una base.....	17
Figura 1.4 Racemización catalizada por un ácido	18
Figura 1.5 Tipos de tejido que conforman la raíz de <i>Arabidopsis</i>	20
Figura 1.6 Sistema radicular de la planta, dividido en zonas o regiones que llevan a cabo diferentes funciones.....	21
Figura 1.7 Estrategia experimental..	29
Figura 2.1 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-alifático sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero).....	54
Figura 2.2 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-aromático sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero.....	55
Figura 2.3 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-polar sin carga sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero	57
Figura 2.4 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-cargado positivamente sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero	58
Figura 2.5 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-cargado negativamente sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero.....	59
Figura 2.6 Cambios significativos en el crecimiento de raíz primaria	61
Figura 2.7 Efecto estereoespecífico de los aminoácidos sobre el crecimiento radicular..	62

Figura 2.8 Dosis inhibitoria de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz primaria, evaluada al cuarto día de tratamiento	64
Figura 3.1 Efecto de diferentes condiciones de nitrógeno sobre el crecimiento de chile habanero (variedad Séminis)	76
Figura 3.2 Diferencias morfológicas y de crecimiento entre plántulas de chile habanero de la variedad Séminis creciendo durante 28 días en diferentes condiciones de nitrógeno ..	79
Figura 3.3 Diferencias morfológicas y de crecimiento entre plántulas de la variedad Mayan Chan creciendo durante 28 días en distintas condiciones de nitrógeno	82
Figura 3.4 Diferencias morfológicas y de crecimiento en plántulas de la variedad Mayan Ek creciendo durante 28 en diferentes condiciones de nitrógeno.....	84
Figura 3.5 Efecto de tratamientos de nitrógeno sobre los niveles de nitrato, aminoácidos totales y proteínas totales en plántulas de chile habanero de la variedad Séminis	86
Figura 3.6 Diferencias morfológicas y de crecimiento entre plántulas de chile habanero de la variedad Seminis creciendo durante 28 días en los tratamientos de nitrógeno	89
Cuadro 4.1 Modificaciones realizadas a la metodología propuesta por Cho <i>et al.</i> (2011)	101
Figura 4.1 Cromatogramas de los D-aminoácidos obtenidos con los diferentes modificadores ácidos [0.005 g/100 ml].....	103
Figura 4.2 Cromatogramas de los D-aminoácidos obtenidos con las diferentes relaciones de MeOH/H ₂ O con 0.005 g/100ml de H ₃ PO ₄ , a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min.....	104
Figura 4.3 Cromatogramas de los D-aminoácidos obtenidos con las diferentes velocidades de flujo en una fase móvil 60:40 MeOH/H ₂ O con 0.005 g/100ml de H ₃ PO ₄ , a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min.....	105
Figura 4.4 Cromatogramas de los L/D aminoácidos utilizando una fase móvil de 60:40 MeOH/H ₂ O + 0.005 g/100 ml H ₃ PO ₄ y a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min.	106

Figura 4.5 Curva de calibración de D-Val, D-Leu y D-Glu	107
Figura 4.6 Curva de calibración de D-Val y D-Leu	108
Figura 4.7 Toma de D-Val por las raíces de plántulas de chile habanero expuestas a diferentes intervalos de tiempo	110
Figura 4.8 Cromatogramas de la coinyección de la D-Val a los medios del experimento de toma correspondientes a las 4 y 6 horas de tratamiento	113
Figura 4.9 Toma de D-Leu por las raíces de plántulas de chile habanero expuestas a diferentes intervalos de tiempo.	114

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1 Porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz primaria obtenido a la mínima dosis inhibitoria de los D-aminoácidos, a las 96 horas de exposición.....	64
Cuadro 3.2 Efecto de las mezclas de los D-aminoácidos sobre parámetros fisiológicos de crecimiento en la variedad Mayan Chan.....	81
Cuadro 3.3 Efecto de las mezclas de los D-aminoácidos sobre parámetros fisiológicos de crecimiento en la variedad Mayan Ek.	83
Cuadro 3.4 Efecto de diferentes condiciones de nitrógeno sobre algunos parámetros de crecimiento aéreo y radicular de chile habanero, variedad Seminis, creciendo en condiciones de hidroponía.....	88

ABREVIATURAS

Ácido aspártico	Asp
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄
Ácido glutámico	Glu
Ácido perclórico	HClO ₄
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄
Alanina	Ala
Área foliar	AF
Área radicular	AR
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Cisteína	Cys
Fenilalanina	Phe
Glutamina	Gln
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Longitud radicular total	LRT
Metanol	MeOH

Metionina	Met
Nitrógeno	N
Prolina	Pro
Raíces laterales	RL
Raíz primaria	RP
Serina	Ser
Tirosina	Tyr
Treonina	Thr
Triptófano	Trp
Valina	Val

RESUMEN

Todos los aminoácidos, con excepción de la glicina, tienen dos isómeros ópticos: L- y D-enantiómeros. Los D-aminoácidos son menos abundantes en la naturaleza que los correspondientes L-enantiómeros, los cuales son predominantes en las moléculas biológicas. Sin embargo, los D-aminoácidos ocurren naturalmente en bacterias, insectos, moluscos, gusanos de tierra, mamíferos, plantas y otros organismos, donde son sintetizados por enzimas como las D-aminoácido oxidasa, transaminasas y racemasas. La presencia de los D-aminoácidos en los tejidos de las plantas puede explicarse también a través de la toma a partir del suelo por las raíces. Aunque la relevancia fisiológica de estas sustancias ha sido documentada en algunos organismos, la importancia de los D-aminoácidos para el desarrollo de las plantas es desconocida. Para investigar el efecto de los D-aminoácidos en el crecimiento, se utilizó como modelo de estudio al chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), el cual crece en la península de Yucatán, donde gran parte de los suelos son arcillosos, poco profundos, con alto contenido de materia orgánica, pH alcalino y bajos en nitrógeno inorgánico. Para ello, se evaluó el efecto de 18 D-aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz primaria de plántulas cultivadas *in vitro*. Los resultados indicaron que el efecto fue dependiente del tipo y concentración del D-aminoácido. Tres de ellos influyeron en parámetros fisiológicos importantes para el crecimiento de la planta, como son la generación de raíces laterales (D-Leu), pelos radiculares (D-Cys) o cambios en la velocidad de crecimiento (D-Val). De igual manera, estos D-aminoácidos indujeron la proliferación radicular en tres variedades de chile habanero, así como un aumento en los niveles endógenos de metabolitos nitrogenados cuando se aplicaron en conjunto con una fuente de nitrógeno inorgánica durante 28 días. La D-Val y la D-Leu parecen ser las que mayor aportación tienen a este efecto, aunque provocaron efectos diferenciales sobre el crecimiento de la planta. La raíz de chile habanero presentó una mayor toma de D-Val, comparada con la D-Leu, en un período de seis horas y estas diferencias en la absorción podrían repercutir en sus respectivos efectos. Los resultados que se obtuvieron en esta tesis abren nuevos campos para el estudio de esta fuente orgánica de N, la cual está presente en los suelos y podrían afectar la producción de los cultivos, resultando interesante potenciar los efectos positivos de los D-aminoácidos y reducir los negativos para mejorar la producción de alimentos.

ABSTRACT

All amino acids with the exception of glycine, have two optical isomers: L- and D-enantiomers. D-amino acids are less abundant in nature than the corresponding L-enantiomers, which are prevalent in biological molecules. However, D-amino acids occur naturally in bacteria, insects, mollusks, earthworms, mammals, plants and other organisms, and are synthesized by enzymes such as D-amino acid oxidase, transaminase and racemases. The presence of D-amino acids in plant tissues can also be explained by their uptake from soil by the roots. Although the physiological relevance of these compounds has been documented in some organisms, the importance of the D-amino acid for the growth of plants is unknown. In order to determine the effect of D-amino acids on growth, habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) was used as a model. It grows in the Yucatan Peninsula, where most of the soil is clayish, shallow, with high organic matter, alkaline pH, and low inorganic nitrogen. The effect of 18 D-amino acids on the growth of the primary root from seedlings growing *in vitro* was evaluated. Results indicated that the effect depended on the type and concentration of D-amino acid used. Three of these compounds modified important physiological parameters that are involved in plant growth, such as the development of lateral roots (D-Leu), root hairs (D-Cys) or changes in the growth rate (D-Val). In a similar fashion, these D-amino acids induced root proliferation in three varieties of habanero pepper, as well as increased the levels of endogenous nitrogen metabolites when applied together with a source of inorganic nitrogen for 28 days. The D-Val and D-Leu appeared to be having a larger contribution to this effect, but provoked differential effects on plant growth. Habanero pepper roots had a higher uptake of D-Val, compared to that of D-Leu, over a six-hour period and these differences in absorption could affect their respective effects. The results obtained in this thesis open up new fields for the study of this novel organic source of N, which is present in soils and could affect crop production, which results interesting given the enhancement the positive effects of D-amino acids and reduces those negatives to improve food production.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista químico, los aminoácidos son ácidos orgánicos con un grupo amino en posición alfa. Según esta definición, los cuatro sustituyentes del carbono alfa ($C\alpha$) en un aminoácido son el grupo amino, el grupo carboxilo, un átomo de hidrogeno y una cadena lateral, que se representa como R y es característica de cada aminoácido.

En todos los aminoácidos proteicos, a excepción de la glicina, el $C\alpha$ es asimétrico y por lo tanto, son ópticamente activos. Esto indica que pueden ocupar dos arreglos diferentes, uno de la serie D y otro de la serie L; esta propiedad se conoce como quiralidad. Los aminoácidos proteicos son invariablemente de la serie L, los cuales participan activamente en el metabolismo nitrogenado. Por el contrario, aunque ha sido comprobada la existencia de los D-aminoácidos en diversos organismos, tales como bacterias, insectos, lombrices de tierra, mamíferos y plantas, se tiene poco conocimiento de su función en algunas de las formas de vida donde se han detectado (Brückner y Westhauser, 2003; Corrigan, 1969; Rosenberg y Ennor, 1960).

El interés de los investigadores en estos compuestos surgió a partir de la detección de altas concentraciones de D-Ser y D-Asp en el cerebro de mamíferos, cuyos niveles eran mayores incluso a algunos L-aminoácidos. Este conocimiento condujo a un incremento en el estudio de las funciones y el metabolismo de los mismos en dicho órgano (Fisher *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1993).

Por el contrario, la presencia y la función de los D-aminoácidos en las plantas han sido menos estudiadas; sin embargo, varios investigadores han demostrado su existencia en tejidos de hoja y raíz (Kullman *et al.*, 1999). También, el posible metabolismo de estos compuestos en los tejidos vegetales comienza a ser estudiado, donde enzimas como las racemasas, las D-aminoácido transaminasas y las D-aminoácido oxidasas han sido aisladas y caracterizadas para conocer su contribución al metabolismo de los D-aminoácidos en las plantas (Gholizadeh y Kohnehrouz, 2009; Gogami *et al.*, 2009; Funakoshi *et al.*, 2008; Fujitani *et al.*, 2006).

Aunque se ha demostrado la presencia de estos D-aminoácidos en algunas plantas, aún se desconoce el papel que pueden tener sobre el crecimiento y desarrollo de las mismas.

También, se ha sugerido que la presencia de los D-aminoácidos en las plantas podría deberse a su absorción por las raíces, a partir de suelos con alto contenido de materia orgánica (Bremner, 1950).

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), nuestro modelo de estudio, pertenece a la familia de las Solanáceas y es una especie hortícola de gran importancia nacional e internacional. La presencia de D-aminoácidos aún no ha sido reportada en los tejidos de esta especie. Durante este trabajo se quiere contestar la siguiente pregunta: ¿cuál es el efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de esta planta?

BIBLIOGRAFÍA

- Bremner, J.M. (1950). The amino acid composition of the protein material in soil. *Biochemical Journal*, 47, 538-542.
- Brückner, H. y T. Westhause (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43-55.
- Corrigan, J. (1969). D-amino acids in animals. *Science*, 164, 142-149.
- Fisher, G.H., N. Lorenzo, H. Abe, E. Fujita, W.H. Frey, W.H. Emory, M.M. Di Fiore y A. D'Aniello (1998). Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. *Amino Acids*, 15, 263-69.
- Fujitani, Y., T. Horiuchi, K. Ito y M. Sugimoto (2006). Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41, 1811-1812.
- Funakoshi, M., M. Serike, M. Katane, T. Furuchi, M. Yohda, T. Yoshikawa y H. Homma (2008). Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behavior during germination. *FEBS Letters*, 275, 1188-1200.
- Gholizadeh, A. y B.B. Kohnhrouz (2009). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an active fused D-amino acid oxidase from *Zea mays* L. *Biochemistry*, 74, 137-144.
- Gogami, Y., K. Ito, Y. Kamitani, Y. Matsushima y T. Oikawa (2009). Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry*, 70, 380-387.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, R. Konno, A. Niwa, Y. Yasumura, T. Oka y K. Takahashi (1993). Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Neuroscience Letters*, 152, 33-36.

Kullman, J.P., X. Chen y D.W. Armstrong (1999). Evaluation of the enantiomeric composition of amino acids in tobacco. *Chirality*, 11, 669-673.

Nagata, Y., H. Homma, M. Matsumoto y K. Imai (1999). Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by D-aspartate in rat Leydig cells. *FEBS Letters*, 454, 317-320.

Rosenberg, H. y A.H. Ennor (1960). The occurrence of free D-serine in the earthworm. *Biochemical Journal*, 79, 424-728.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Formas de nitrógeno en el suelo

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el crecimiento y el desarrollo de las plantas y es un constituyente de macromoléculas importantes de las células, tales como el ADN, el ARN, las proteínas, las clorofilas, los fitoreguladores como las auxinas y las citocininas (Hawkesford *et al.*, 2012). Muchas plantas pueden tomar y utilizar del suelo formas de N orgánico e inorgánico.

El nitrato (NO_3^-) es la principal forma de N inorgánico que es asimilada y tomada por la mayoría de los cultivos en suelos aireados, donde se puede encontrar en concentraciones entre 1 y 20 mol m^{-3} (Andrews *et al.*, 2013). El amonio (NH_4^+) puede ser otra importante fuente de N inorgánico en suelos menos aireados, mientras que los aminoácidos, algunos péptidos cortos y proteínas son fuentes de N orgánico en suelos con alto contenido de materia orgánica (Giuseffi *et al.*, 2012; Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2012). La urea es otra forma de N que es utilizada por las plantas y está en altas concentraciones debido a la excreción de orina de los animales o que es suministrada en los fertilizantes (Kraiser *et al.*, 2011).

Entre los nutrientes inorgánicos, el N es considerado el elemento que aumenta más la productividad de los cultivos. Una baja disponibilidad de N en los suelos es el mayor factor limitante del crecimiento de los cultivos. Para resolver la falta del nutriente, se utilizan fertilizantes nitrogenados inorgánicos, aunque a la larga han provocado problemas ambientales importantes (Butler *et al.*, 2012). Los iones de NO_3^- con carga negativa en los suelos son susceptibles a la lixiviación y pueden contaminar las aguas subterráneas, mientras el NH_4^+ puede conducir a la toxicidad en los suelos (Griffin *et al.*, 1995), inhibiendo el crecimiento de las raíces, reduciendo la toma de nutrientes y otros cationes (Rothstein y Cregg, 2005).

Los aminoácidos, por otro lado, son componentes importantes de la mezcla de N orgánico en el suelo (Stevenson, 1982) y por lo tanto, pueden ser fuentes naturales de C y N para los organismos del suelo. Muchos estudios asumen que sólo los L-aminoácidos son las

formas predominantes en el suelo; sin embargo, existe muy poca información acerca del metabolismo de los D-aminoácidos, debido a que la quiralidad es un factor que influye en la tasa de mineralización de estos compuestos (Waksman, 1932). También, se ha sugerido que los D-aminoácidos producidos por las bacterias se acumulan durante las transformaciones de los compuestos orgánicos en el suelo debido a su persistencia, relativa a sus correspondientes L-aminoácidos (O'Dowd y Hopkins, 1998; Wagner y Mutatkar, 1968).

Las plantas pueden asimilar aminoácidos del suelo; sin embargo, el papel de la raíz en la absorción de aminoácidos es muy poco entendido (Wilson *et al.*, 2013). Diversos estudios han confirmado que los aminoácidos son la fuente primaria de N para la vegetación en la tundra ártica (Kielland 1995, 1994), boreal (Persson y Näsholm, 2001) y alpina (Raab *et al.*, 1996). En estos ecosistemas, los aminoácidos tienden a ser las formas de N predominantes dada la baja tasa de mineralización (Öhlund y Näsholm, 2002). Un estudio reciente encontró que la distribución de aminoácidos en los suelos es bastante uniforme; los aminoácidos Asp y Glu, junto con sus amidas, Asn y Gln y dos aminoácidos neutros, Gln y Ala, son los más comunes (Senwo y Tabatabai, 1998). Algunos aminoácidos como Lys, Arg, His, Ala, Ser, Asp, Gln y Leu se presentan en altas concentraciones (Lipson y Näsholm, 2001) y su vida media en los suelos es de 1.7 a 28.7 h (Lipson *et al.*, 2001; Hadas *et al.*, 1992). Basados en la velocidad de mineralización de los suelos, se sugiere que los D-aminoácidos probablemente representen una pequeña fracción de los aminoácidos presentes, comparado con los L-isómeros, con la posible excepción de D-Ala (Hopkins y Ferguson, 1994).

1.2 Origen y concentración de los D-aminoácidos en el suelo

Los microorganismos secretan proteasas en el suelo, las cuales facilitan el rompimiento de las proteínas y los péptidos en sus unidades constituyentes (Owen y Jones, 2001) y, por lo tanto, se liberan aminoácidos en el suelo. La concentración de L-aminoácidos en el suelo está en un rango de 0.1 a 50 mM, en los suelos que son ricos en materia orgánica (Jones *et al.*, 2002). Por otro lado, Owen y Jones, (2001) reportaron que los L-aminoácidos en los suelos agrícolas se encontraban en un rango de concentración entre 1 y 100 μ M.

Los D-enantiómeros son menos abundantes en la naturaleza que los L-enantiómeros. En el suelo, los D-aminoácidos están presentes en forma de aminoácidos libres, o por la descomposición de materia orgánica (Schulten y Schnitzer, 1997). Gran parte de la literatura sobre los D-aminoácidos en los suelos se basa en su presencia en hidrolizados. Bremner (1950) encontró que entre el 1.4 y 1.7% del total de aminoácidos en el suelo consistía en D-enantiómeros. Más tarde, Pollock *et al.* (1977) informaron que podían alcanzar valores entre el 5 y 16% de los aminoácidos totales del suelo. Comparaciones de diferentes ecosistemas (praderas, sabanas nativas y tierra arable) reveló que la mayor concentración de los D-aminoácidos se encontró en pastizales (hasta 1520 mg kg⁻¹) (Amelung *et al.*, 2006; Brodowski *et al.*, 2004; Wichern *et al.*, 2004; Amelung y Zhang, 2001).

Los D-aminoácidos en el suelo pueden originarse a partir de una amplia gama de fuentes, incluyendo la pared celular de las bacterias (D-Ala y D-Glu ó D-Asp en algunas bacterias), heces fecales, antibióticos, insecticidas sintéticos (por ejemplo, fluvalinato), racemización biótica o abiótica, y la biomasa eucariota (protistas, plantas, hongos y animales) (Cuadro 1.1) (Amelung *et al.*, 2006; Frohlich y Wells, 2001; Friedman, 1999; Schleifer y Kandler, 1972).

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1 Presencia de los D-aminoácidos en el suelo a partir de diversas fuentes (modificado de Vranova *et al.*, 2011).

Origen	D-aminoácidos	Aportación de D-aminoácidos al suelo (%)
Pared celular de bacteria	Alanina	0.7%
Lombriz de tierra	Serina	20%
Orina	Alanina, Valina, Treonina, Leucina, Prolina, Serina, Ácido aspártico, Metionina, Fenilalanina, Ácido glutámico, Tirosina, Lisina	70% de cada aminoácido individual
Racemización • Biótica • Abiótica	Diferentes aminoácidos	5.4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ /año
Insecticidas sintéticos (Fluvalinato)	Valina	23.3%
Heces fecales	Alanina, Valina, Treonina, Prolina, Serina, Ácido aspártico, Fenilalanina, Ácido glutámico, Tirosina, Lisina	68% de cada aminoácido individual

Debido a que varios organismos y compuestos que contienen D-aminoácidos, se encuentran presentes en los suelos, la absorción de éstos por las plantas estaría mediada por la raíz, siendo este órgano de vital importancia para la entrada de todos los nutrimentos que contribuyen al desarrollo de la planta.

1.3 Presencia de D-aminoácidos en la naturaleza

Los D-aminoácidos se determinaron por primera vez en tejidos del cuerpo de insectos y molusco (Anclair y Patton, 1950). A partir de este primer reporte, estos compuestos han

sido detectados en organismos desde procarióticos hasta eucarióticos, como las plantas y los animales. Sin embargo, aún es poco lo que se conoce de su existencia y con excepción del cerebro de mamíferos, su función es desconocida.

A continuación se describen la presencia de los D-aminoácidos y su posible función en algunos organismos.

1.3.1 Presencia y función de los D-aminoácidos en las plantas

Las vías de biosíntesis de los aminoácidos son estereoespecíficas, por lo que se explica la presencia y abundancia de L-aminoácidos libres en las plantas, en lugar de los estereoisómeros D (Brückner y Westhauser, 2003). Aunque la existencia de los D-aminoácidos es poco conocida, se ha demostrado que ellos también se encuentran en las plantas. Su presencia se reportó por primera vez a principios de 1960s, donde se encontró que la N-malonil-D-alanina es común en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Zenk y Sherf, 1963). En manzanas, se ha descrito la presencia de este compuesto en concentraciones de alrededor de 0.8 mol/kg de peso fresco, variando la cantidad de acuerdo al grado de madurez del fruto (Zenk y Sherf, 1963).

Además, se han detectado formas conjugadas y libres de D-Glu, D-Ala y D-Asp en plántulas de guisantes (*Pisum sativum*) (Ogawa *et al.*, 1977), granos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y flores de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) (Erbe y Brückner, 2000). La D-Ala, se ha detectado en arroz (*Oryza australiensis* Domin) (Manabe, 1985) y en *Phalaris tuberosa* L., donde las hojas contenían 0.4 mg/g de peso seco, siendo la forma D el 0.7% del total de este aminoácido (Frahn y Illman, 1975). Conjugados de aminoácidos con el ácido D- α -amino-n-butírico se detectaron en varias legumbre, como por ejemplo *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*, entre otras (Ogawa *et al.*, 1976).

Por otro lado, Gonami *et al.* (2009) realizaron un estudio para detectar la presencia de D-Ser en plantas de *Oryza sativa* L. y aislaron una serina racemasa. Estos autores sugieren que esta enzima pudiera estar involucrada en la formación de D-Ser y posterior degradación a piruvato y amonio (Gonami *et al.*, 2009).

Los D-aminoácidos libres se han determinado en gimnospermas de las familias botánicas Ginkgoaceae (ginkgo), Taxodiaceae (metasequoia) y Pinaceae (abeto). Los D-

aminoácidos también están presentes en monocotiledóneas de la familia *Arecaceae* (coco), *Bromeliácea* (piña) y *Poaceae* (gramíneas) y en dicotiledóneas de las familias *Aceraceae* (arce), *Anacardiaceae* (mango), *Brassicaceae* (berro), *Cactáceas* (nopales), *Caricaceae* (papaya) y *Cucurbitáceas* (melón de agua) (Brückner y Westhauser, 2003).

Además, la D-Ala, los ácidos D-Asp y D-Glu, así como la D-Ser, se encontraron en plántulas de guisante (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris* L.) en formas libre y conjugada (Rozan *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 1977). Se demostró que las frutas (manzanas, uvas, naranjas) y verduras (calabaza, zanahorias, ajos, tomates), así como los jugos correspondientes, contienen cantidades variables de D-aminoácidos, incluyendo D-Ala, D-Arg, D-Asp y D-Glu (Gandolfi *et al.*, 1994).

La existencia de formas libres de los D-aminoácidos ha sido detectada en gimnospermas y angiospermas en un rango de 0.2 a 8% en relación a su correspondiente L-aminoácido. Los aminoácidos D-Asp, D-Asn, D-Glu y D-Gln se pudieron determinar en la mayoría de las plantas, mientras que D-Pro, D-Val, D-Leu y la D-Lys solo se observaron en ciertas plantas (Brückner y Westhauser, 2003).

Estos son sólo algunos de los reportes de la presencia de estos isómeros en plantas. Al pasar de los años aún se sigue demostrando su presencia en otras especies de plantas y todavía queda por definir cuál es el papel que estos compuestos dentro de la planta.

Se ha reportado que los D-aminoácidos libres en el suelo pueden ser tomados por los microorganismos y por las raíces de las plantas (Svennerstam *et al.*, 2007; Hopkins y Ferguson 1994). Los microorganismos tienen la capacidad de metabolizar a los D-aminoácidos en mayor porcentaje que a sus L-enantiómeros (Hopkins y Ferguson, 1994). Sin embargo, las plantas poseen una baja capacidad para metabolizar los D-aminoácidos, lo cual podría causar una inhibición en su crecimiento (Aldag y Young, 1970).

Forsum *et al.* (2008) y Erikson *et al.* (2005) han reportado que los D-aminoácidos inhiben el crecimiento en algunas plantas (*Solanum esculentum*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Populus tremuloides*, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*). Sin embargo, la sensibilidad fue diferente entre ellas; en algunas, el crecimiento fue poco inhibido a concentraciones de 0.03 mM de D-Ser y fuertemente inhibido a 3 mM (Forsum *et al.*,

2008; Erikson *et al.*, 2005). En otras plantas (*Hordeum vulgare* y *Zea mays*), una inhibición total fue observada solamente hasta 30 mM de D-Ser. Aunque se ha reportado que los D-aminoácidos pueden tener un efecto tóxico para el crecimiento de las plantas, todavía este hecho no está bien sustentado (Näsholm *et al.*, 2009).

Recientemente, Gördes *et al.* (2011) han mostrado que ocurre una inhibición en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* provocado por D-aminoácidos (Ala, Arg, His, Ser, Trp y Tyr), el cual ocurrió a diferentes concentración. También encontraron que los D-aminoácidos suministrados al medio de cultivo fueron convertidos parcialmente a D-Ala y D-Glu, esto podría deberse a una racemización de los D-aminoácidos en los tejidos de la planta después de su absorción (Fujitani *et al.*, 2006). La desaminación de D-aminoácidos a ceto ácidos ha sido reportada en maíz y *Lolium* (Aldag y Young ,1970).

El isómero L- o D-Trp en el suelo puede ser convertido por microorganismos en ácido indolacético (IAA), el cual podría influenciar el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Martens y Frankenberger, 1993).

La D-Ser desempeña un papel activo en el crecimiento del tubo polínico *in vitro*. Curiosamente, es el agonista más activo del receptor de glutamato (GLR) en el tubo polínico de tabaco y *Arabidopsis* (Michard *et al.*, 2011).

1.3.2 Presencia y función de los D-aminoácidos en bacterias

En muchas bacterias, los D-aminoácidos producidos en cantidades significativas son la D-Ala y el D-Glu, los cuales están incorporados en los peptidoglicanos. Estos compuestos, son polímeros fuertes y elásticos de la pared celular bacteriana, los cuales son sintetizados y modificados por las proteínas de unión a penicilina. Los peptidoglicanos contrarrestan la presión osmótica celular, manteniendo la forma de la célula (Lam *et al.*, 2009).

Los peptidoglicanos se componen de los amino-azúcares N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unido a una cadena ramificada que contiene D-aminoácidos (Figura 1.1). Los D-aminoácidos en la pared celular bacteriana contribuyen a dar resistencia ante la digestión por enzimas proteolíticas (Friedman, 1999; Izaki *et al.*, 1968).

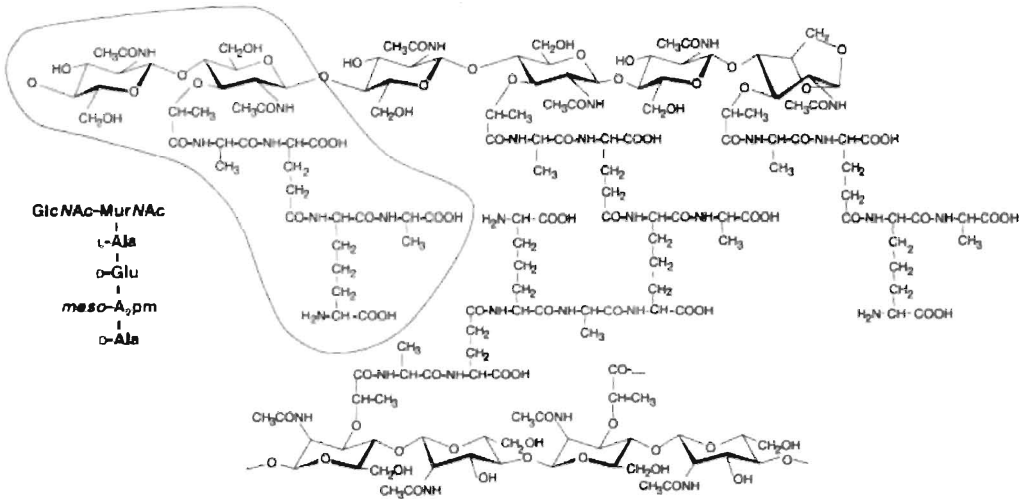


Figura 1.1 Estructura del peptidoglucano de *Escherichia coli* (tomado de Vollmer, 2007)

Además de la D-Al y el D-Glu, se han encontrado otros D-aminoácidos formando parte de los peptidoglucanos, variando según el tipo de bacteria, la concentración a la cual se encuentran y el tipo de D-aminoácido (Figura 1.2) (Lam *et al.*, 2009).

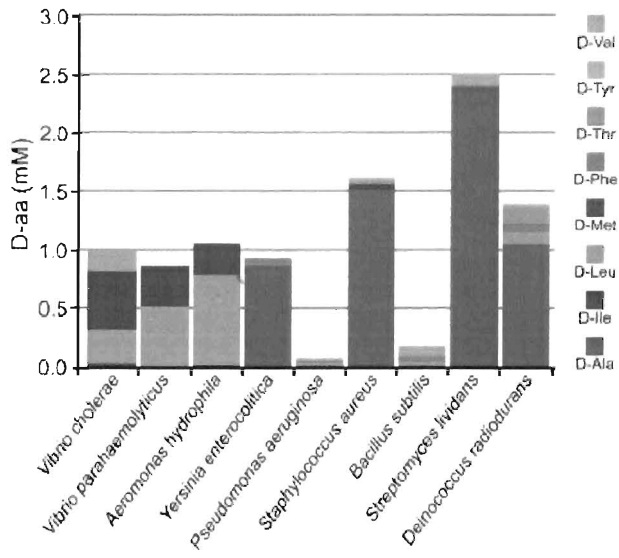


Figura 1.2 Tipo y concentración de D-aminoácidos presentes en los peptidoglucanos de la pared celular bacteriana (tomado de Lam *et al.*, 2009).

1.3.3 Presencia y función de los D-aminoácidos en mamíferos

Desde el primer reporte de la presencia de los D-aminoácidos en tejido animal (Anclair y Patton, 1950), se ha desencadenado la búsqueda de estos isómeros y de su posible función en estos organismos. Ahora se sabe, a través del empleo de métodos sensibles y selectivos, que estos compuestos están presentes en pequeñas cantidades (Schultz y Moini, 2003).

Con el avance de las técnicas analíticas, varios D-aminoácidos se encontraron en seres humanos, en especial el ácido D-Asp y la D-Ser. El D-Asp fue el primero encontrado en el cerebro de mamíferos y es uno de los más abundantes (Dunlop *et al.*, 1986). Este enantiómero regula la síntesis hormonal y la secreción en glándulas endocrinas (D'Aniello *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Con respecto a la D-Ser, el primer reporte fue en 1992, donde se encontró una gran cantidad de este aminoácido en el cerebro de rata (Hashimoto *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1992) y en la actualidad, se reconoce como un neuromodulador endógeno muy importante en el cerebro de mamíferos (Hamase *et al.*, 2009).

La D-Ser es abundante, específicamente en la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio y la amígdala de ratas. Este aminoácido fue detectado originalmente en las células gliales, pero también está presente en las neuronas (Kartvelishvily *et al.*, 2006). En cuanto a su metabolismo, se sabe que la D-Ser se puede sintetizar por acción de una serina racemasa y se degrada por medio de una D-aminoácido oxidasa.

En cuanto a su mecanismo de acción en el sistema nervioso central, se ha reportado que interacciona con el sitio de unión del coagonista N-metil-D-aspartato (NMDA) de los receptores de glutamato (GLR) del tipo NMDA (NMDA-GLR), modulando su actividad. Los NMDA-GLR están implicados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria neuronal, la migración celular y las enfermedades neuronales (Mori *et al.*, 2010).

El D-Asp se distribuye a lo largo de todo el cerebro; sin embargo, la cantidad de éste cambia durante el desarrollo (Katane y Homma, 2011). En el adulto, está presente en altos niveles en la glándula pineal y la pituitaria, y en bajos niveles en el cerebro, el

hipocampo, el hipotálamo, el cerebelo y el bulbo raquídeo. En la glándula pineal, el ácido D-Asp suprime la síntesis y secreción de melatonina (Katane y Homma, 2011; D'Aniello, 2007).

En la glándula pituitaria, el D-Asp induce repuestas diferentes dependiendo de su localización: en el lóbulo anterior aumenta la síntesis y la secreción de la prolactina, la hormona luteinizante o lutropina y la hormona del crecimiento; en el lóbulo intermedio suprime el nivel de una hormona estimulante de los melanocitos y, en el lóbulo posterior y el hipotálamo, modula la producción de oxitocina y vasopresina (D'Aniello, 2007).

Debido a que el D-Asp regula la actividad del NMDA-GLR, éste también funciona como un neuromodulador en el cerebro (Errico *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Además, ha sido demostrado que está involucrado en la neurogénesis y en el desarrollo del cerebro (Kim *et al.*, 2010; Wolosker *et al.*, 1999). Este aminoácido es sintetizado por la aspartato racemasa y degradado por la D-aspartato oxidasa (D'Aniello *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010).

La D-Ala está presente en altas concentraciones en la glándula pituitaria y el páncreas (Morikawa *et al.*, 2003) y en bajos niveles en otras regiones del cerebro. Los niveles de D-Ala en la glándula pituitaria, así como en el páncreas y la sangre, fluctúan con el ritmo circadiano: el nivel máximo durante el día es aproximadamente cuatro veces mayor que el nivel mínimo en la noche (Morikawa *et al.*, 2008). La D-Ala está presente en las células que contienen la hormona adreno corticotrópica, en la glándula pituitaria y en las células B de los islotes de Langerhans del páncreas durante la secreción de insulina (Etoh *et al.*, 2009; Morikawa *et al.*, 2007). Por lo tanto, se propone que la D-Ala pudiera tener alguna función en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre a través de la acción de la insulina (Hamase *et al.*, 2009).

La D-Leu se encuentra presente en el cerebro en niveles muy bajos. La glándula pituitaria, pineal, así como el hipocampo, tienen niveles ligeramente mayores de D-Leu que otras áreas del cerebro (Hamase *et al.*, 1997). La D-Pro y el D-Glu también se encuentran en el cerebro en concentraciones muy bajas (Yamanaka *et al.*, 2012; Kera *et al.*, 1995).

1.3.4 Presencia y función de los D-aminoácidos en insectos y otros animales

Una amplia variedad de péptidos biológicamente activos han sido aislados a partir de la piel de anfibios. Uno de estos compuestos, el heptapéptido dermorfina, presente en la piel de una rana de árbol de América del Sur, *Phyllomedusa sauvagei*, es un potente opiato cuyo receptor μ -opioide tiene una alta afinidad y selectividad por el mismo. Este péptido contiene D-Ala en la posición 2 y este residuo es esencial para la unión al receptor (Jilek *et al.*, 2005). También se ha reportado que en la piel de otros *Phyllome dusinae*, los péptidos opiato contienen un D-aminoácido. Mignogna *et al.* (1993) encontraron que las secreciones de la piel de la rana *Bombina variegata* contenía D-Ile.

Los péptidos con D-aminoácidos en sus secuencias también se han detectado en diferentes especies de invertebrados, como caracoles, arañas y crustáceos (Jilek *et al.*, 2005). Felbeck y Wiley (1987) detectaron la presencia de los D-aminoácidos Val, Asp y Ala en los tejidos de bivalvos marinos.

Por otro lado, la presencia de la D-Ser se ha reportado en lombrices, gusanos y otros insectos del orden Lepidoptera. Las evidencias sugieren que hay una baja cantidad de D-Ser en las primeras etapas de las larvas de Bombyx, que aumenta en la etapa de capullo y la pupación. Además, en los tejidos de pupa se cataliza la conversión de L-Ser a D-Ser, mientras que los tejidos larvales carecen de esta habilidad (Corrigan y Shivasant, 1966).

La D-Ala se ha encontrado en algunos moluscos y en *Oncopeltus fasciatus* (Auclair y Patton, 1950). A pesar de que se ha determinado la presencia de los D-aminoácidos en los diferentes organismos, lo único que se sabe es que pueden servir como mecanismo de defensa (Mignogna *et al.*, 1993); sin embargo, en la mayoría de los casos es desconocida su función.

1.4 Metabolismo de los D-aminoácidos

Las plantas son capaces de sintetizar todos los L-aminoácidos, mientras que los animales están limitados a la síntesis de ciertos aminoácidos solamente, los denominados no esenciales. Los aminoácidos restantes son adquiridos a través del alimento.

Las plantas sintetizan los aminoácidos a través de reacciones enzimáticas. En el caso de

los D-aminoácidos, se han reportado algunos mecanismos para su formación, donde intervienen enzimas tales como las racemasas, que convierten al L-aminoácido en D-aminoácido y viceversa, y las transaminasas, que convierten un D-aminoácido a otro diferente.

En las plantas se ha aislado y caracterizado una serina racemasa en *A. thaliana* (Fujitani *et al.*, 2006), de la cual se han encontrado genes ortólogos en monocotiledóneas (Fujitani *et al.*, 2007), así como una D-aminoácido transferasa (D-AAAt) en *A. thaliana* (Funakoshi *et al.*, 2008). Otra enzima que interviene en el metabolismo de los D-aminoácidos es la D-aminoácido oxidasa, la cual cataliza la degradación de los D-aminoácidos (Gholizadeh y Kohnehrouz, 2009).

A continuación, se describen alguna de las rutas metabólicas que participan tanto en la biosíntesis como en la degradación de los D-aminoácidos en diferentes organismos.

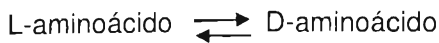
1.4.1 Racemización

La racemización es la reacción catalizada por la enzima racemasa, donde un L-aminoácido es convertido en un D-aminoácido, o viceversa. Tanto en los animales como en las plantas, se ha encontrado actividad de serina racemasa (Fujitani *et al.*, 2007, 2006; Wolosker *et al.*, 1999). En las plantas, la serina racemasa ha sido aislada y caracterizada a partir de *A. thaliana* en tejidos de raíz, roseta e inflorescencia y muestra una identidad de un 46%, 45%, 39% y 30% con las serinas racemasas aisladas de humano, ratón, *S. cerevisiae* y *E. coli*, respectivamente, presentando una masa molecular de 35 kDa (Fujitani *et al.*, 2006). Esta enzima también ha sido aislada a partir de la raíz de cebada y arroz; en estas especies se estima que posee una masa molecular de 35.7 kDa y una identidad de un 68%, 46%, 45% y 28% con las serinas racemasas de *Arabidopsis thaliana*, humano, ratón y *E. coli*, respectivamente. Sin embargo, esta enzima difiere entre monocotiledóneas (cebada y arroz) y dicotiledóneas (*Abidopsis thaliana*) según estudios filogenéticos; además, se ha demostrado que tiene actividades de racemasa y deshidratasa a la vez (conversión de serina a piruvato) (Fujitani *et al.*, 2007, 2006).

En el suelo, los L-aminoácidos pueden estar sujetos a una racemización a D-aminoácidos, la cual puede ser biótica o abiótica. La racemización abiótica se produce debido a factores

tales como el calor, el pH, la presencia de aldehídos, las sales, la radiación y los radicales. Por otro lado, la racemización biótica es catalizada por racemasas que se encuentran en el suelo (Friedman, 1999).

Existen dos tipos de racemización, aquella que es catalizada en presencia de una base y la otra que lo hace en presencia de un ácido. En la racemización catalizada por una base, ocurre la eliminación de un protón en el enlace C-H asimétrico del aminoácido para formar un intermedio carbanión. El átomo de carbono trigonal del carbanión se recombina con un protón del disolvente, regenerando una estructura tetraédrica (Figura 1.3). La reacción se escribe como:



El producto es racémico si puede tomar lugar en cualquier lado del carbanión, dando lugar a una mezcla equimolar de los isómeros L y D (Friedman, 1999).

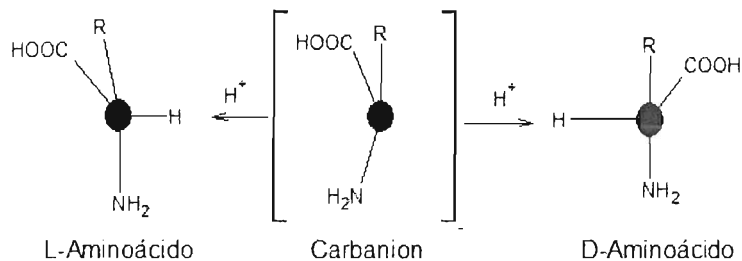


Figura 1.3 Racemización catalizada por una base. En esta imagen se muestra el mecanismo de eliminación y adición de un protón. El H^+ es sustraído del enlace C-H de un aminoácido para formar un carbanión con carga negativa, que ha perdido su asimetría original. El carbanión se puede recombinar con un protón del disolvente para regenerar el aminoácido original (tomado de Friedman, 1999).

Se ha reportado que la tasa de racemización depende de la forma en que se encuentren los aminoácidos en el suelo; si están libres, la racemización es más baja que si estuvieran unidos a un péptido. Por otro lado, cuando el pH es alcalino la racemización es más favorable al igual que entre temperaturas de 35-45°C (Friedman, 1999).

En la racemización catalizada por un ácido, ocurre una protonación de un grupo carboxilo del L-aminoácido para formar deshidroalanina y por último, por la adición de un protón

genera una mezcla equimolar de los isómeros D y L (Figura 1.4).

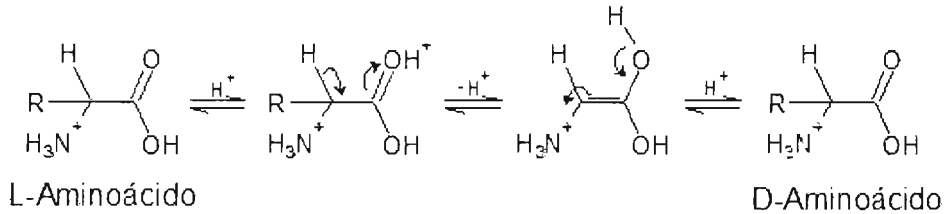


Figura 1.4 Racemización catalizada por un ácido. En esta reacción se observa un mecanismo de eliminación y adición de un protón. El carbanión se somete a una reacción para formar un sitio de unión a deshidroalanina, que reacciona con los hidrógenos activos y rota su grupo funcional (modificado de Friedman, 1999).

Otro mecanismo a partir del cual se puede generar un D-aminoácidos es la reacción de Maillard, que sustenta la formación de los D-aminoácidos en los alimentos. En este estudio, se demuestra que los D-aminoácidos son formados a partir de L-aminoácidos en soluciones acuosas a altas temperaturas (Kim y Lee, 2008).

1.4.2 Transaminación

Durante la transaminación ocurre la conversión de un L-aminoácido a otro por acción de una transaminasa. Para los D-aminoácidos es similar el funcionamiento, ya que por acción de una D-aminoácido transaminasa se cataliza la conversión de un D-aminoácido a otro D-aminoácido diferente.

En las plantas se ha clonado una D-aminotransferasa funcional en *A. thaliana*, una enzima potencialmente responsable del metabolismo de D-Asp y relacionada con la aparición de otros D-aminoácidos. Este es el primer reporte, en eucariotas, donde un ADNc de una D-aminotransferasa fue clonado y caracterizado funcionalmente. Esta enzima tiene una homología de 23.8%, 26.2% y 19.6% con las de *Bacillus* sp. YM-1, *Bacillus subtilis* y *Bacillus sphaericus*, respectivamente (Funakoshi *et al.*, 2008). Sin embargo, esta enzima se había encontrado anteriormente en plántulas de chícharo, adjudicándole la biosíntesis de D-Ala en los tejidos, pero no se caracterizó funcionalmente (Ogawa y Fukuda, 1973).

1.4.3 Degradación de los D-aminoácidos

En la degradación de los D-aminoácidos participa una enzima llamada D-aminoácido oxidasa; ésta es una flavoenzima que cataliza esteroespecíficamente la desaminación oxidativa del D-aminoácido a su correspondiente cetoácido, amonio y peróxido de hidrógeno (Tishkov y Khoronenkova, 2005). Se identificó por primera vez en tejidos de hoja y raíz de maíz, y genes homólogos de ésta han sido detectados en el genoma de arroz y *Arabidopsis*, donde se ha observado que la concentración de la enzima incrementa con la edad de la planta (Gholizadeh y Kohnehrouz, 2009).

La existencia de las enzimas es una vía para poder explicar la presencia de los D-aminoácidos en los tejidos de las plantas. Por otra parte, estos compuestos podrían ser tomados del suelo; debido a que es el lugar de donde las plantas absorben los nutrimentos para el crecimiento, donde un órgano de vital importancia que lleva a cabo estos procesos es la raíz.

1.5 Estructura del sistema radicular y sus modificaciones en respuesta a la presencia exógena de nutrientes

La raíz es uno de los órganos más importantes y adecuados para la captación de agua y nutrimentos, necesarios para la vida de la planta. La raíz se conforma por tres tipos de tejidos: epidermis, o capa superficial; tejido fundamental o córtex y estela o cilindro vascular, situado en el centro (Figura 1.5). Algunas células de la epidermis se modifican para desempeñar la función de absorción; de ellas, parten largas proyecciones tubulares llamadas pelos radicales que se sujetan al suelo. La raíz tiene un núcleo central formado por bandas radiales de xilema, que se extienden hacia el córtex externo, entre las cuales se forman hileras de floema.

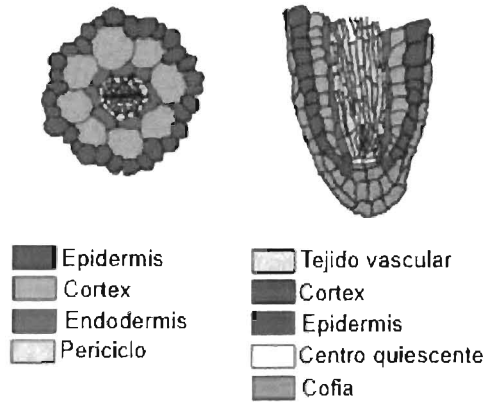


Figura 1.5 Tipos de tejido que conforman la raíz de *Arabidopsis*. Del lado izquierdo se presenta un corte transversal y del derecho uno longitudinal (tomado de Malamy y Benfey, 1997)

Las plantas son organismos sensibles que adaptan su morfología y órganos en desarrollo a las condiciones ambientales. La raíz puede variar su crecimiento de acuerdo al tipo de suelo y los nutrimentos que éste contenga (Harper *et al.*, 1991). El crecimiento del sistema radical es el producto de tres procesos: a) la división celular en el meristemo de la raíz primaria, que provoca el crecimiento en longitud por adición de nuevas células a la raíz, b) la formación de raíces laterales que aumenta la capacidad de exploración del sistema radical y c) la formación de pelos radiculares que incrementa el área total de la raíz primaria y las raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2003). A través de la modificación de estos tres procesos, las plantas pueden optimizar su arquitectura radical para aumentar la captación de recursos que se encuentran en el suelo (Figura 1.6).

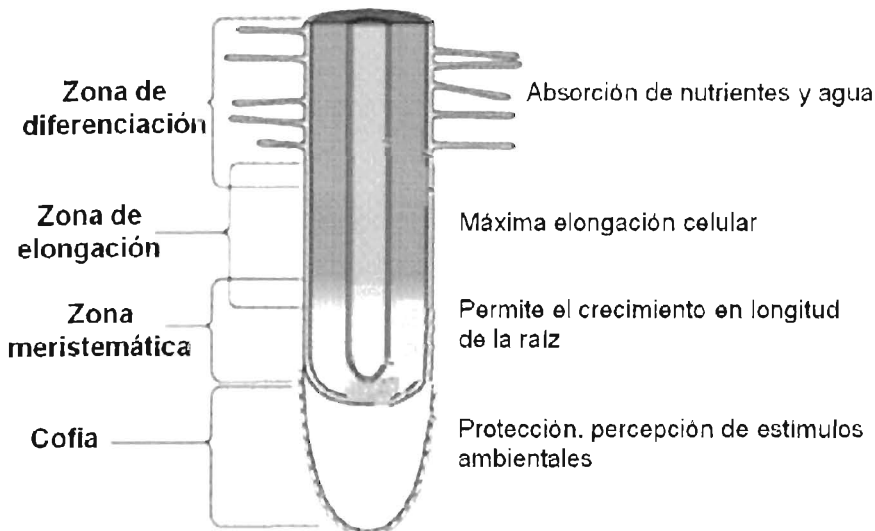


Figura 1.6 Sistema radicular de la planta, dividido en zonas o regiones que llevan a cabo diferentes funciones (comentarios a la derecha) (modificado de Purves *et al.*, 2008)

La configuración espacial del sistema radicular (número y longitud de órganos laterales), también llamada arquitectura de raíz, varía ampliamente dependiendo de las especies de plantas, la composición del suelo y particularmente, de la disponibilidad de agua y nutrimentos minerales (Smith y Smet, 2012; Malamy, 2005). En el caso del NO_3^- , se han realizado experimentos en los que se aplica de manera localizada, resultando en la estimulación de la longitud y el número de las raíces laterales. Estos estudios se han realizado en chícharo (Wiersum, 1958), trigo (Hackett, 1972), maíz (Granato y Raper, 1989) y chile habanero (Celis- Arámburo *et al.*, 2011). Por el contrario, Zhang *et al.* (1999), demostraron en plantas de *Arabidopsis* que a dosis altas de KNO_3^- (50 mol m^{-3}) se inhibía el crecimiento de las raíces laterales.

Por otra parte, aunque el efecto del NH_4^+ sobre la raíz primaria es menos conocido, Drew (1975) demostró que en plántulas de cebada este ión tenía efectos similares al nitrato. Este efecto fue igualmente observado por Lima *et al.* (2010), donde la formación de raíces laterales con NH_4^+ se estimulaba en *Arabidopsis thaliana*, siendo estas más densas y de menor longitud.

Las plantas modifican su arquitectura radicular para localizar parches de N orgánico en el

suelo; esta fuente puede ser en forma de aminoácidos (Walch-Liu *et al.*, 2006). Los aminoácidos al ser agregados exógenamente provocan un efecto inhibitorio a altas concentraciones, la Gly y el L-Glu provocaron tanto efectos positivos como negativos en el crecimiento de la raíz primaria de *Senecio vulgaris* (Skinner y Street, 1954). En *Avena sativa*, L-Val, L-Ser, L-Tyr, L-Ile, L-Leu y L-Thr redujeron el crecimiento longitudinal de las raíces (Leblanc *et al.*, 2008).

El ácido L-Glu, a pesar de inhibir el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*, promovió inmediatamente después la formación de raíces laterales (Walch-Liu *et al.*, 2006). Este evento no se observó en *Brassica napus* (Leblanc *et al.*, 2008). Por lo tanto, el efecto provocado en las plantas por estos compuestos depende de la especie, tipo de aminoácido y concentración en la que se encuentre (Harris *et al.*, 1959).

El L-Glu es una molécula señal en los mamíferos, y en 1998 se descubrió que *Arabidopsis* poseía una familia de genes tipo receptores de glutamato (GLR) que estaban relacionados con los receptores de glutamato del tipo inotrópico (iGluRs) de mamíferos (Lam *et al.*, 1998). También, se ha reportado que la aplicación externa del L-Glu en las plantas provoca cambios en la arquitectura radicular que han sido atribuidos como un efecto de señal (Walch-Liu y Forde, 2008), donde el ápice radicular puede percibir por medio de receptores a esta molécula, indicando la presencia de parches en el suelo ricos en nutrimentos (Walch-Liu *et al.*, 2006).

1.6 Receptores de glutamato en plantas

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) son canales catiónicos no selectivos que median la sinapsis excitatoria rápida en el sistema nervioso central de los vertebrados, y son permeables a calcio (Ca^+) y sodio (Na^+) (Kumar y Mayer, 2013). Estos receptores son complejos macromoleculares, formados por cuatro o cinco subunidades que pueden ser o no idénticas. Cada una tiene tres dominios transmembranales M1, M3 y M4 y una porción reentrante en la membrana M2 (Bigge, 1999).

Con base en su respuesta farmacológica a agonistas y antagonistas, estos receptores se dividen en cuatro familias en mamíferos: los de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), el de tipo kainato, el de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y el

de tipo delta (Meyer, 2006).

Entre sus características se encuentra el ser activados cuando interacciona un respectivo aminoácido con el sitio de unión, el cual varía según el receptor. Esto provoca una apertura del poro que permite el flujo de Ca^{2+} . La permeabilidad al Ca^{2+} varía entre los receptores, siendo baja en los del tipo AMPA y kainato, a comparación con los del tipo NMDA que son más permeables a Ca^{2+} , mientras que los delta no muestran actividad de canales iónicos.

A pesar de que los iGluRs fueron descritos primero en animales, sorprendentemente se han identificado otros putativos en plantas (Lam *et al.*, 1998). La similitud entre los genes *GLR* de plantas y los iGluRs de animales, en términos de estructura secundaria y topología transmembranal, se extiende por todos los dominios importantes que se conservan en los iGluRs de animales, incluyendo dos dominios de unión a ligando y los cuatro segmentos transmembranales (M1-M4) (Chiu *et al.*, 1999).

En plantas de *Arabidopsis*, se ha demostrado que estos receptores son selectivos a Glu y se han descubierto proteínas similares en arroz y rábano (Kang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). Un análisis filogenético sugiere que la señalización debida a aminoácidos donde participan los *GLRs* de plantas y de animales, puede ser un mecanismo primitivo que existió antes de la divergencia entre estos organismos (Chen *et al.*, 1999). Debido a la similitud con los iGluRs de animales, se sugiere que el homólogo en plantas funciona como un canal catiónico activado por Glu, Gly y D-Ser (Prince *et al.*, 2012).

Las funciones fisiológicas en las cuales están involucrados los iGluRs de las plantas son: la regulación del metabolismo carbono y N (Kang *et al.*, 2004), la respuestas a la luz (Kang y Turano, 2003), el control de la señalización por Ca^{2+} (Lam *et al.*, 1998), la regulación de la biosíntesis de fitoreguladores (Kim *et al.*, 2001), el balance hídrico (Kang y Turano, 2003), la coordinación de la actividad mitótica durante el desarrollo de la raíz (Li *et al.*, 2006; Walch-Liu *et al.*, 2006), el crecimiento del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011) y la respuesta a la toxicidad por el aluminio (Sivaguru *et al.*, 2003).

1.7 Modelo de estudio: chile habanero

La familia de las Solanaceae incluye un promedio de 25 especies y tiene su centro de origen en las regiones tropicales y subtropicales de América, las cuales fueron llevadas a distintas regiones del mundo (Long, 1998). Dentro de esta familia, se encuentra el género *Capsicum*, del cual se han reconocido cinco especies domesticadas (*C. baccatum* L., *C. pubescens* R., *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* L.) (Tun, 2001).

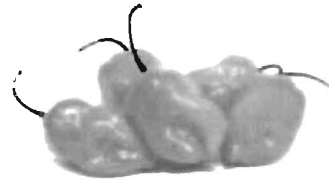
Ramírez y Vásquez (2007) señalan que los chiles se han convertido a nivel mundial en la hortaliza de mayor crecimiento en los últimos años, entre la cual se encuentra el chile habanero, que constituye una de las especies hortícolas de mayor importancia económica para los productores del estado de Yucatán. En el Estado se cosechan alrededor de 3,000 toneladas anuales (Sagarpa 2011), ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate (Tun, 2001).

El fruto se comercializa en fresco para su consumo directo o como materia prima para procesamiento industrial. El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica; se ha demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, vitaminas como la C, E y A y minerales (Guzmán *et al.*, 2004).

1.7.1 Clasificación taxonómica y condiciones de crecimiento

Esta especie se encuentra clasificada taxonómicamente de acuerdo a Tun (2001) de la siguiente manera:

Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledónea
Superorden	Sympetala
Orden	Tubiflorales
Familia	Solanáceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>C. chinense</i> Jacq.



El chile habanero se desarrolla mejor a una temperatura promedio superior a 24°C y no mayor a los 35°C, además de que debe haber poca variación entre las temperaturas diurnas y nocturnas, así como que la humedad aprovechable del suelo deber ser entre 80 y 90% (Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Pacheco-Méndez, 2005). Las bajas temperaturas (menos de 16°C) provocaron un menor y más lento crecimiento, disminuyendo de esta manera su redimiendo y calidad del fruto. Crece en suelos profundos y bien drenados, con textura entre franco limoso y franco arcilloso, con un pH desde 6.5 a 7.0, de un buen nivel de fertilidad y con una leve pendiente no menos de 8% para evitar áreas que se encharquen de una fuerte lluvia (Pacheco-Méndez, 2005).

En términos generales, el cultivo de chile habanero es exigente para potasio, nitrógeno, calcio, magnesio y fósforo, y los requerimientos nutritivos son de 250 kilogramos de nitrógeno, 100 kilogramos de fósforo, 300 kilogramos de potasio, 200 kilogramos de calcio y 100 kilogramos de magnesio durante todo el ciclo de producción (Prado, 2006), aunque éstos pueden variar de acuerdo al tipo de suelo, entre otros factores.

El cultivo de esta planta está limitado por factores climáticos que afectan la adaptación, desarrollo y producción del chile habanero en Yucatán, como lo son la precipitación y la temperatura, aunque la primera es la más determinante, ya que varía tanto en las distintas regiones del Estado como a lo largo del año (Ruiz-Lau *et al.*, 2011). El suelo es otro factor limitante para el cultivo de esta planta, debido a los terrenos carbonatados y a la presencia de afloramientos rocosos en la península (Borges *et al.*, 2008). Además, el 90% de los suelos de la Península presentan una concentración alta de materia orgánica (Ramírez, 2005).

HIPOTESIS

Cuando el chile habanero sea expuesto a la presencia exógena de D-aminoácidos, el crecimiento y desarrollo de las plántulas sufrirán cambios significativos con respecto a aquellas que no han sido tratadas con estos compuestos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de chile habanero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento radicular de plántulas de chile habanero en condiciones *in vitro*.

Determinar el efecto de dos mezclas de D-aminoácidos (D-Ala, D-Ser, D-Asp y D-Val, D-Leu, D-Cys) sobre el desarrollo y el contenido endógeno de metabolitos nitrogenados de plántulas de chile habanero creciendo en condiciones de hidroponía.

Evaluar la contribución individual de D-Val, D-Leu y D-Cys al efecto general obtenido con la mezcla de estos D-aminoácidos sobre el crecimiento.

Evaluar la toma de los D-aminoácidos (D-Val y D-Leu) por la raíz de chile habanero.

JUSTIFICACIÓN

El chile habanero es una especie hortícola de gran interés a nivel nacional e internacional, la cual es cultivada en suelos con un alto contenido de materia orgánica, pH neutro o ligeramente básico y en condiciones de temperatura elevada y con alta utilización de fertilizantes orgánico (gallinaza y cerdaza) durante su cultivo. A pesar de que no existe información al respecto, estas condiciones de cultivo favorecen la existencia de los D-aminoácidos en los suelos.

El 90% de los suelos de Yucatán donde se cultiva el chile habanero son altamente pedregosos y pobres en N inorgánico, aunque como se mencionó anteriormente, ricos en N orgánico. Los rendimientos que se alcanzan bajo estas condiciones son bajos, comparados con aquellos que se obtienen en los suelos profundos y menos pedregosos del Estado (5.31 ton ha⁻¹ anuales; Sagarpa, 2012). Estos rendimientos no logran

CAPÍTULO I

satisfacer las demandas que tiene este producto en los mercados locales, nacionales e internacionales, cada vez crecientes (20 ton ha⁻¹; Sagarpa, 2012).

Por otro lado, el chile habanero producido en Yucatán es codiciado en el mercado por su calidad, traducida en su excelente sabor, aroma y picor. Debido a estas características, al chile habanero de Yucatán le fue otorgada la Denominación de Origen (Diario Oficial de la Federación, 1991).

Entonces, una meta a lograr sería aumentar los rendimientos bajo estas condiciones de suelo. Para alcanzarla, se podrían diseñar nuevas estrategias de fertilización y condiciones de cultivo que sean amigables con el ambiente y que mantengan la excelente calidad del chile.

Con este proyecto, se pretende generar conocimiento acerca del efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento vegetativo y de raíces de chile habanero. Estos compuestos constituyen una fuente probable de N en los suelos en donde el chile habanero se cultiva, cuyo efecto sobre la planta no ha sido previamente estudiado. Los resultados que se generen se podrían incluir en futuros programas de mejoramiento agrícola del cultivo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

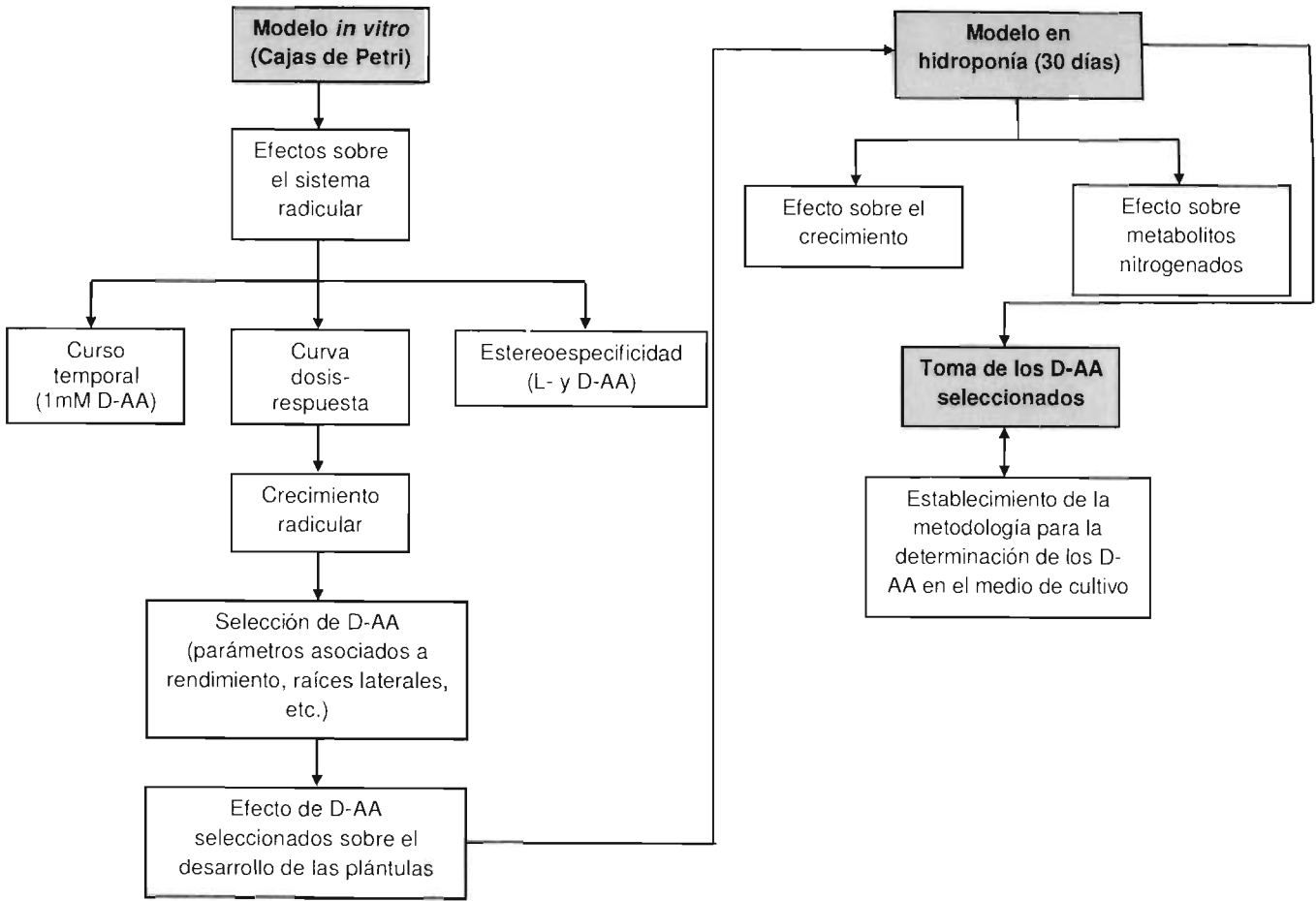


Figura 1.7 Estrategia experimental. Para lograr los objetivos se propone la siguiente estrategia experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Aldag, R. W. y J. L. Young (1970). D-amino acids in soil: Uptake and metabolism by seedling maize and ryegrass. *Agronomy Journal*, 62, 184-189.
- Amelung, W. y X. Zhang (2001). Determination of amino acid enantiomers in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 553-562.
- Amelung, W., X. Zhang y K.W. Flach (2006). Amino acids in grassland soils: climatic effect on concentrations and chirality. *Geoderma*, 130, 207-217.
- Anclair, J.L. y R. Patton (1950). On the occurrence of D-Alanine in the *haemolymph* of the milkweed bug, *oncopeltus fasciatus*. *Reviews of Canadian Biology*, 9, 3-8.
- Andrews, M., J.A. Raven y P.J. Lea (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology*, 163, 174-199.
- Bigge, C.F. (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 441-447.
- Borges-Gómez, L., C.L. Cervantes, N.J. Ruiz, F.S. Soria, R.O. Vicente y C.E. Villanueva (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Lationoamericana*, 28, 35-41.
- Bremner, J.M. (1950). The amino acid composition of the protein material in soil. *Biochemistry Journal*, 47, 538-542.

- Brodowski S., W. Amelung, I. Lobe y C.C. Du Preez (2004). Losses and biochemical cycling of soil organic nitrogen with prolonged arable cropping in the South African Highveld-evidence from D- and L-amino acids. *Biogeochemistry*, 71, 17-42.
- Brückner, H. y T. Westhause (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43-55.
- Butler, M.A. y S.F. Traynelis (1996). Native and recombinant NMDA receptors are cleaved by the serine protease thrombin. *Society for Neuroscience Abstract*, 22, 1761.
- Celis-Arámburo, T.J., M. Carrillo-Pech, L.A. Castro-Concha, M.L. Miranda-Ham, M. Martínez-Estévez y I. Echevarría-Machado (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1456-1464.
- Chen, G.Q., C. Cui, M.L. Mayer y E. Gouaux (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature*, 402, 817-21.
- Chiu, J., R. DeSalle, H.M. Lam, M. Lee y G. Coruzzi (1999). Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Molecular Biology and Evolution* 16, 826-838.
- Corrigan, J.J. y N.G. Shivasan (1966). The occurrence of certain D-amino acids in insects. *Biochemistry* 5, 1185-1190.
- D'Aniello, A. (2007). D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Research Reviews*, 53, 215-234.

- D'Aniello, A., M.M. Di Fiore, G.H. Fisher, A. Milone y A.Seleni (2000). Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *FASEB Journal*, 14, 699-714.
- D'Aniello, S., I. Somorjai, J. Garcia-Fernández, E. Topo y A. D'Aniello (2011). D-aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *FASEB Journal*, 25, 1014-1027.
- Drew, M.C. (1975). Comparison of effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on growth of seminal root system, and shoot, in barley. *New Phytologist*, 75, 479-490.
- Dunlop, D.S., A. Neidle, D. McHale, D.M. Dunlop y A. Lajtha (1986). The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142, 27-32.
- Erbe, T. y H. Bruckner (2000). Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *Journal of Chromatography A*, 881, 81-91.
- Erikson, O., M. Hertzberg y T. Näsholm (2005). The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 57, 425-433.
- Errico, F., M.T. Pirro, A. Affuso, P. Spinelli, M. De Felice, A. D'Aniello y R. Di Lauro (2006). A physiological mechanism to regulate D-aspartic acid and NMDA levels in mammals revealed by D-aspartate oxidase deficient mice. *Gene*, 37, 50-57.

-
- Etoh, S., K. Hamase, A. Morikawa, T. Ohgusu y K. Zaitzu (2009). Enantioselective visualization of D-alanine in rat anterior pituitary gland: localization to ACTH-secreting cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 217-223.
- Felbeck, H. y S. Wiley (1987). Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves. *Biology Bulletin*, 173, 252-259.
- Forsum, O., H. Svennerstam, U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179, 1058-1069.
- Frahn, J.L. y R.J. Illman (1975). The occurrence of D-alanine and D-alanine in *Phalaris tuberosa*. *Phytochemistry*, 14, 1464-1465.
- Friedman, M. (1999). Reviews: Chemistry, nutrition and microbiology of D-amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3457-3479.
- Frohlich, DR. y M.A. Wells (2001). Peptide amphipathy: a new strategy in design of potential insecticides. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37, 2-6.
- Fujitani, Y., T. Horiuchi, K. Ito y M. Sugimoto (2006). Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41, 1811-1812.
- Fujitani, Y., T. Horiuchi, K. Ito y M. Sugimoto (2007). Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. *Phytochemistry*, 68, 1530-1536.
-

- Funakoshi, M., M. Sekine, M. Katane, T. Furuchi, M. Yohda, T. Yoshikawa y H. Homma (2008). Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behavior during germination. *FEBS Journal*, 275, 1188-1200.
- Gandolfi, I., G. Palla, A. Dossena, S. Pueli y C. Savadori (1994). D-amino acids in fruit juices: a molecular marker of bacterial activity, heat treatments and shelf life. *Journal of Food Science*, 59, 152-154.
- Gholizadeh, A. y B.B. Kohnehourz (2009). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an active fused D-amino acid oxidase from *Zea mays* L. *Biochemistry*, 74, 137-144.
- Gioseffi, E., A. de Neergaard y J.K. Schjoerring (2012). Interactions between uptake of amino acids and inorganic nitrogen in wheat plants. *Biogeosciences*, 9, 1509-1518.
- Gogami, Y., K. Ito, Y. Kamitani, Y. Matsushima y T. Oikawa (2009). Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry*, 70, 380-387.
- Gördes, D., Ü. Kolukisaoglu y K. Thurow (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 40, 553-563.
- Granato, T.C. y C.D. Jr. Raper (1989). Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *Journal of Experimental Botany*, 40, 263-275.
- Griffin, K.L., W. Winner y B.R. Strain (1995). Growth and dry matter partitioning in loblolly

and ponderosa pine seedlings in response to carbon and nitrogen availability. *New Phytologist*, 129, 547-556.

- Guzmán, M.S., I. Torres, M. González, M.A. Mora, M.G. Herrera y D. Hernández (2004). Análisis preliminar de compuestos fenólicos y capsaicinoides en variedades de Chile con diferente capacidad pungente. Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya. Primera Convención Mundial del Chile 2004. pp. 115-122
- Hackett, C. (1972). A method of applying nutrients locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25, 1169-1180.
- Hadas, A., M. Sofer, J.A.E. Molina, P. Barak y C.E. Clapp (1992). Assimilation of nitrogen by soil microbial population: NH_4 versus organic N. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 137-143.
- Hamase, K., A. Morikawa, S. Etoh, Y. Tojo, Y. Miyoshi y K. Zaitzu (2009). Reviews: Analysis of small amounts of D-amino acids and the study of their physiological functions in mammals. *Analytical Sciences*, 25, 961-968.
- Hamase, K., H. Homma, Y. Takigawa, T. Fukushima, T. Santa y K. Imai (1997). Regional distribution and postnatal changes of D-amino acids in rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1334, 214-222.
- Harper, J.L., M. Jones, Hamilton y N.R. Sackville (1991). The evolution of roots and the problem of analyzing their behavior. *Plant Root Growth: and Ecological Perspective*. Blackwell Scientific Publications, 3-24.

- Harris, G.P. (1959). Amino acids as nitrogen sources for the growth of excised roots of red clover. *New Phytologist*, 58, 330-344.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, R. Konno, A. Niwa, Y. Yasumura, T. Oka, y K. Takahashi (1993). Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Neuroscience Letters*, 152, 33-36.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, T. Hayashi, N. Fujii, K. Harada, T. Oka y K. Takahashi (1992). The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Letters*, 296, 33-36.
- Hawkesford, M., W. Horst, T. Kichey, H. Lambers, J. Schjoerring, I. Skrumager Møller, P. White (2012). Functions of macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edn, pp. 135-189. Ed. P. Marschner. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Hopkins, D.W. y K.E. Ferguson (1994). Substrate induced respiration in soil amended with different amino acid isomers. *Applied Soil Ecology*, 1, 75-81.
- Huang, A.S., A. Beigneux, Z.M. Weil, P.M. Kim, M.E. Molliver, S. Blackshaw, R.J. Nelson, S.G. Young y S.H. Snyder (2006). D-Aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in D-aspartate oxidase-deficient mice. *Journal Neuroscience*, 26, 2814-2819.
- Izaki, K., M. Matsushashi y J.L. Strominger (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. *Journal Biology Chemistry*, 243, 3180-3192.

-
- Jilek, A., C. Mollay, C. Tippelt, J. Grassi, G. Mignogna, J. Müllegger, V. Sander, C. Fehrer, D. Barra y G. Kreil (2005). Biosynthesis of D-amino acid in peptide linkage by an enzyme from frog skin secretions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 4235-4239.
- Jones, D. L., A.G. Owen y J.F. Farrar (2002). Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1893-1902.
- Kang, J. y F.J. Turano (2003). 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, 6872-6877.
- Kang, J., S. Mehta y S.L. Turano (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 Cell Physiology*, 45, 1380-1389.
- Kang, S., B.H. Kim, H. Lee, J.Y. Choi, S. Heu, C.J. Oh, S.I. kwon y C.S. An (2006). Overexpression in *Arabidopsis* of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated Ca^{2+} influx and delays fungal infection. *Molecules and Cells*, 21, 418-427.
- Kartvelishvily, E., E. Shleper, L. Balan, E. Dumin y H. Wolosker (2006). Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 14151-14162.
- Katane, M. y H. Homma (2011). D-aspartate an important bioactive substance in mammals: a review from an analytical and biological point of view. *Journal of Chromatography B*, 879, 3108-3121.
-

- Kera, Y., H. Aoyama, H. Matsumura, A. Hasegawa, H. Nagasaki y R. Yamada (1995). Presence of free D-glutamate and D-aspartate in rat tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1243, 283-286.
- Kielland, K. (1994). Amino acid absorption by arctic plants: Implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecological Society of America*, 75, 2373-2383.
- Kielland, K. (1995). Landscape patterns of free amino acids in arctic tundra soils. *Biogeochemistry*, 31, 85-98.
- Kim, J.S. y Y.S. Lee (2008). Influence of pH on the antioxidant activity of melanoidins formed from different model systems of sugar/lysine enantiomers. *Food Science and Biotechnology*, 17, 1310-1315.
- Kim, P.M., H. Aizawa, P.S. Kim, A.S. Huang, S.R. Wickramasinghe, A.H. Kashani, R.K. Barrow, R.L. Haganir, A. Ghosh y S.H. Snyder (2010). Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102.
- Kim, S.A., J.M. Kwak, S.K. Jae, M.H. Wang y H.G. Nam (2001). Overexpression of the *AtGluR2* gene coding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant and cell physiology*, 42, 74-84.
- Kraiser, T., D.E. Gras, A.G. Gutierrez, B. Gonzalez y R.A. Gutierrez (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1455-1466.

-
- Kumar, J. y M.L. Mayer (2013). Functional insights from glutamate receptor ion channel structures. *Annual Review of Physiology*, 75, 313-337.
- Lam, H., D.C. Oh, F. Cava, C.N. Takacs, J. Clardy, M.A. de Pedro M.A. y M.K. Waldor (2009). D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science*, 325, 1552-1555.
- Lam, H.M., J. Chiu, M.H. Hsieh, L. Meisel, I.C. Oliveira, M. Shin y G. Coruzzi (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396, 125-126.
- Leblanc, A., H. Renault, J. Lecourt, P. Etienne, C. Deleu y E. Le Deunff (2008). Elongation changes of exploratory and root hairsystems induced by aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine affect nitrate uptake and BnNrt2.1 and BnNrt1.1 transporter gene expression in oilseed rape. *Plant Physiology*, 146, 1928-1940.
- Li, J., S. Zhu, X. Song, Y. Shen, H. Chen, J. Yu, K. Yi, Y. Liu, V.J. Karplus, P. Wu, X.W. Deng (2006). A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *The Plant Cell*, 18, 340- 349.
- Lima, J.E., S. Kojima, H. Takahashi y N. Von Wirén (2010). Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *The Plant Cell*, 22, 3621-3633.
- Lipson, D. A. y T. Näsholm (2001). The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, 128, 305-316.
- Lipson, D.A., T.K. Raab, S.K. Schmidt y R.K. Monson (2001). An empirical model of amino acid transformations in an alpine soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 189-198.
-

- Long, Z., H. Homma, J.A. Lee, T. Fukushima y T. Santa (1998). Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells. *FEBS Letters*, 434, 231-235.
- Lopez-Bucio, J., A. Cruz-Ramirez y L. Herrera-Estrella (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280-287.
- Malamy, J. y P. Benfey (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124, 33-44.
- Malamy, J.E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell and Environment*, 28, 67-77.
- Manabe, H. (1985). Occurrence of D-Alanyl-D-alanine in *Oryza australiensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 1203-1204.
- Martens, D.A. y W.T. Jr. Frankenberger (1993). Metabolism of tryptophan in soil. *Soil Biology Biochemistry*, 25, 1679-1687.
- Meyer, A., S. Eskandari, S. Grallath y D. Rentsch (2006). AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7197-7204.
- Michard, E., P. Lima, F. Borges, A. Silva, M. Portes, J. Carvalho, M. Gilliam, L. Liu, G. Obermeyer y J. Feijo (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*, 332, 434-437.
- Mignogna, G., M. Simmaco, G. Kreil y D. Barra (1993). Antibacterial and haemolytic

peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. EMBO Journal, 12, 4829-4832.

Mori, H. y R. Inoue (2010). Serine racemase knockout mice: review. Chemistry and Biodiversity, 7, 1573-1578.

Morikawa, A., K. Hamase y K. Zaitzu K. (2003). Determination of D-alanine in the rat central nervous system and periphery using columns with high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry, 312, 66-72.

Morikawa, A., K. Hamase, T. Ohgusu, S. Etoh, H. Tanaka, I. Koshiishi, Y. Shoyama y K. Zaitzu (2007). Immunohistochemical localization of D-alanine to b-cells in rat pancreas. Biochemical and Biophysical Research Communications, 355, 872-876.

Morikawa, A., K. Hamase, Y. Miyoshi, S. Koyanagi, S. Ohdo y K. Zaitzu (2008). Circadian changes of D-alanine and related compounds in rats and the effect of restricted feeding on their amounts. Journal of Chromatography B, 875, 168-173.

Näsholm, T., M.N. Högberg, P. Högberg y A. Nordin (2009). Carbon isotopes as proof for plant uptake of organic nitrogen: relevance of inorganic carbon uptake: replay to Rasmussen and Kuzyakov. Soil Biology and Biochemistry, 41, 1588-1589.

O'Dowd, R.W. y D.W. Hopkins (1998). Mineralization of carbon from D- and L-amino acids and D-Glucose in two contrasting soils. Soil Biology and Biochemistry, 30, 2009-2016.

Ogawa, T, M. Kimoto y K. Sasaoka (1977) Occurrence of α -aminobutyric acid in legume seedlings. Agricultural and Biological Chemistry, 40, 1661-1662.

CAPÍTULO I

- Ogawa, T. y M. Fukuda (1973). Occurrence of D-aminoacid aminotransferase in pea seedling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 52, 998-1002.
- Ogawa, T., N. Bando y K. Sasaoka K. (1976). Occurrence of α - amino-n-butyric acid in legume seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 1661-1662.
- Öhlund, J. y T. Näsholm (2002). Low nitrogen losses with a new source of nitrogen for cultivation of conifer seedlings. *Environmental Science and Technology*, 36, 4854-4859.
- Owen, A. G. y D.L. Jones (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 651-657.
- Pacheco-Méndez, J. A. (2005). Proceso de producción de chile habanero en salsa, a desarrollarse en el departamento del Petén. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Mecánica Industrial.
- Paungfoo-Lonhienne, C., J. Visser, T.G.A. Lonhienne y S. Schmidt (2012). Past, present and future of organic nutrients. *Plant and Soil*, 359, 1-18.
- Persson, J. y T. Nasholm (2002). Regulation of amino acid uptake in conifers by exogenous and endogenous nitrogen. *Planta*, 215, 639-644.
- Pollock, G.E., C.N. Cheng y S.E. Cronin (1977). Determination of the D and L isomers of some protein amino acids present in soils. *Analytical Chemistry*, 49, 2-7.
- Prado, U.G. (2006). Tecnología de producción comercial del chile habanero (*Capsicum*

chinense Jacq). Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, 43 p.

Price, P.B, J. Jelesko y S. Okumoto (2012). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Frontier Plant science*, 235, 1-10.

Purves, D.S., H.H. Craig, H.O. Gordon y D.M. Hillis (2008). *LIFE: The Science of biology*. Médica Panamericana, 8, 764.

Raab, T.K., D.A. Lipson y R.K. Monson (1996). Nonmycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia*, 108, 488-494.

Ramírez, G., S. Góngora, L. Pérez, L. Chel, T. González, J. Tun, E. Escalante, L. Rodríguez, J. Ledon, J. Castillo y H. López (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP- SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mocochoá, Yucatán; México.

Ramírez, M. M. y G.E. Vázquez (2007). Potencial de producción del chile habanero (*Capsicum chinense* Jack), en el sur de Tamaulipas. INIFAP Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Apartado Postal No. 31, Altamira, Tamaulipas., CP 89601, México.

Rothstein, D.E. y B.M. Cregg (2005). Effects of nitrogen form on nutrient uptake and physiology of Fraser fir (*Abies fraseri*). *Forest Ecology and Management*, 219, 69-80.

Rozan, P., Y. Kuo y F. Lambein (2000). Non protein amino acids in edible lentil and

garden pea seedlings. *Amino Acids*, 20, 319-324.

Ruiz-Lau, N., F. Medina-Lara y M. Martínez-Estévez (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*, 70-77.

Sagarpa (2011). *Agenda de innovación tecnológica para el estado de Yucatán*. 76 p.

Sagarpa (2012). *Agenda de innovación tecnológica para el estado de Yucatán*. 152 p.

Schleifer, K.H. y O. Kandler (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36, 407-477.

Schulten, H.R. y M. Schnitzer M. (1997). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility Soils*, 26, 1-15.

Schultz, C.L. y M. Moini (2003). Analysis of underivatized amino acids and their D/L-enantiomers by sheathless capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75, 1508-1513.

Senwo, Z.N. y M.A. Tabatabai (1998). Amino acid composition of soil organic matter. *Biology and Fertility of Soils*, 26, 235-242.

Sivaguru, M., S. Pike, W. Gassmann y T.I. Baskin (2003). Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiology*, 44, 67-75.

- Skinner, J. y H. Street (1954). Studies on the growth of excised rootsII. Observations on the growth of excised groundsel roots. *NewPhytologist*, 53, 44-67.
- Smith, S. y I. de Smet (2012). Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 367, 1441-1452.
- Stevenson, F.J. (1982). Nitrogen in agricultural soils. *Agronomy* no. 22. Madison, USA: Soil Science Society of America Inc.
- Svennerstam, H., U. Ganeteg, C. Bellini y T. Näsholm (2007). Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the Lysine, Histidine Transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiology*, 143, 1856-1860.
- Tishkov, V.L. y S.V. Khoronenkova (2005). D-amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism and practical application. *Biochemistry*, 70, 51-56.
- Tun, JC. (2001). Chile habanero, características y tecnología de producción. INIFAP, Yucatán, México.
- Vollmer, W., D. Blanot y M.A. Pedro (2007). Review: peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 149-167.
- Vranova, V., H. Zahradnickova, D. Janous, R.K. Skene, S. Matharu-Avtar, K. Rejsek y P. Formanek (2011). The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps. *Plant Soil*, 354, 21-39.

- Wagner, G.H. y V.K. Mutatkar (1968) Amino acid components of soil organic matter formed during humication of ^{14}C from glucose. Soil Science Society of America Proceedings, 32, 683- 684.
- Waksman, S.A. (1932). Principles of Soil Microbiology, 2nd ed. Baillière, Tindall and Cox, London.
- Walch-Liu, P. y B.G. Forde (2008). Nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonizes L-glutamate induced changes in root architecture. The Plant Journal, 54, 820-828.
- Walch-Liu, P., I.I. Ivanov, S. Filleur, Y. Gan, T. Remans y B.G. Forde (2006). Nitrogen regulation of root branching. Annals of Botany, 97, 875-881.
- Wang, H., H. Wolosker, J. Pevsner, S.H. Snyder y D.J. Selkoe (2000). Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. Journal of Endocrinology, 167, 247-252.
- Wiersum, L.K. (1958). Density of root branching as affected by substrate and separate ions. Acta Botanica Neerlandica, 7, 174-190.
- Wilson, A.R., P. Nzokou, D. Güney y S. Kulac (2013). Growth response and nitrogen use physiology of fraser fir (*Abies fraseri*), red pine (*Pinus resinosa*), and hybrid poplar under amino acid acid nutrition. New Forests, 44, 281- 295.
- Wischern, F., I. Lobe, W. Amelung, T. Müller, R.G. Joergensen y A. Buerkert (2004). Changes in amino acid enantiomers and microbial performance in soils from a

subtropical mountain oasis in Oman abandoned for different periods. *Biology and Fertility of Soil*, 39, 398-406.

Wolosker, H., S. Blackshaw y S.H. Snyder (1999). Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-Serine to regulate glutamate *N*-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 13409-13414.

Yamanaka, M., Y. Miyoshi, H. Ohide, K. Hamase y R. Konno (2012). D-amino acids in the brain and mutant rodents lacking D-amino acid oxidase activity. *Amino Acids*, 43, 1811-1821.

Zenk, M.H. y H. Sherf (1963). D-Tryptophan in höheren Pflanzen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 71, 737-738.

Zhang, H., A. Jennings, P.W. Barlow y B.G. Forde (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 6529-6534.

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE CHILE HABANERO (*CAPSICUM CHINENSE* JACQ.) EN CONDICIONES *IN VITRO*

2.1 INTRODUCCIÓN

Casi todos los compuestos biológicos con un centro quiral se producen naturalmente sólo en una forma estereoisomérica, D o L. Las células son capaces de sintetizar específicamente los isómeros L de los aminoácidos, debido a que el sitio activo de las enzimas es asimétrico, haciendo que las reacciones que catalizan sean estereoespecíficas. Por esta razón, los residuos de aminoácidos en las moléculas proteicas son exclusivamente L isómeros; sin embargo, aquellos con D-aminoácidos han sido encontrados en algunos organismos (Lehninger, 2004).

Las plantas contienen D-aminoácidos en forma libre o conjugada (Robinson, 1976). Estos aminoácidos pueden ser considerados como un constituyente principal de las plantas, aunque en un bajo porcentaje (Brückner y Westhauser, 2003).

A pesar de que se ha detectado la presencia de los D-aminoácidos en algunos organismos, no se conoce completamente su función en ellos. Existe mayor conocimiento acerca del papel de estos compuestos en animales y se ha reportado que participan en la síntesis y regulación hormonal, en procesos fisiológicos como la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria neuronal y como indicadores de edad, entre otros procesos (Mori *et al.*, 2010; Hamase *et al.*, 2009; Morikawa *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000; D'Aniello *et al.*, 1996; Dunlop *et al.*, 1986).

El efecto que los D-aminoácidos tienen sobre el desarrollo de las plantas es muy poco conocido. Se ha reportado que en *Arabidopsis thaliana* estos compuestos tienen un efecto sobre el crecimiento, ya sea positivo o negativo, dependiendo del tipo de D-aminoácido empleado. Por otro lado, se sabe que la D-Ser participa en el desarrollo del tubo polínico en esta misma planta (Gördes *et al.*, 2011; Michard *et al.*, 2011).

El objetivo de este capítulo fue determinar el efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero. Este órgano es de vital importancia en

la toma de nutrimentos, por lo que cualquier cambio morfológico que en él se presente puede representar un cambio importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la variedad naranja, la cual comercializa la empresa Séminis.

2.2.2 Desinfestación y germinación de las semillas

Para la desinfestación de las semillas, éstas se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se agregó alcohol al 80% (v/v), en agitación por cinco minutos. Posteriormente, el alcohol se retiró y se hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril, se agregó hipoclorito de sodio (Cloralex®), el cual fue diluido al 30% (v/v, 1.65% de hipoclorito) y se agitó durante 15 min. Las semillas se retiraron de esta solución y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas desinfestadas se mantuvieron en agua destilada durante 48 horas, en condiciones de oscuridad, a 4°C.

Para la germinación, las semillas estériles fueron transferidas a cajas de Petri estériles, en las que previamente se colocó una capa fina de algodón y papel filtro humedecido con 10 ml de H₂O destilada estéril. Las cajas de Petri se mantuvieron en condiciones controladas, a 25 °C en oscuridad para la germinación de las semillas.

2.2.3 Tratamiento con los D-aminoácidos sobre el crecimiento radicular en condiciones *in vitro*

Una vez que ocurrió la protrusión de la radícula (de 4 a 5 días), las plántulas fueron transferidas a cajas de Petri conteniendo el siguiente medio de crecimiento: medio basal NO: 23 mM ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 5.8, sacarosa al 0.5% (p/v), agar-agar al 1% (p/v) y las sales del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) diluidas 1:50.

Las fuentes inorgánicas de nitrógeno (N) del medio B5 (nitrato de potasio y sulfato de amonio) fueron eliminadas y se adicionó como única fuente de este elemento 0.5 mM de L-Glutamina (Gln). Este medio ha sido probado previamente en el laboratorio para evaluar el efecto de los L-aminoácidos sobre el crecimiento radicular de chile habanero.

Las cajas fueron colocadas en posición vertical, en condiciones de oscuridad, hasta que la raíz primaria alcanzó aproximadamente 2.2 ± 0.5 cm de longitud (aproximadamente cinco días). Previamente, se había seleccionado esta longitud de la raíz primaria para llevar a cabo experimentos con otras fuentes de N; raíces con un tamaño menor eran más sensibles a la transferencia a los medios de tratamiento, mientras que las raíces más largas no permitían evaluar el efecto de los compuestos por más de dos o tres días, dado el tamaño de las cajas de Petri disponibles.

Para evaluar el efecto de los D-aminoácidos, estas plántulas fueron transferidas a cajas de Petri que contenían el medio de crecimiento NO, al cual se le adicionó 1 mM del D-aminoácido a ensayar. En este experimento, se evaluaron 19 D-aminoácidos. Para ello, se prepararon soluciones madre acuosas de cada D-aminoácido (100 mM), las cuales fueron esterilizadas por filtración, adicionando alícuotas que correspondieran a una concentración final de 1 mM de cada aminoácido en el medio. El experimento se realizó en un cuarto de cultivo en condiciones controladas, en oscuridad y a 25 °C.

Como experimento testigo, se adicionó 1 mM KCl en lugar del D-aminoácido. En el laboratorio se ha caracterizado previamente el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero en presencia de KCl, demostrándose que no varía el crecimiento en una curva dosis respuesta desde 0.01 hasta 10 mM de este compuesto y que el crecimiento es similar en presencia de este compuesto que en presencia de 1 mM de KNO_3 (Celis-Arámburo *et al.*, 2011).

En este experimento, se evaluó el crecimiento de la raíz primaria diariamente hasta el día cuatro de tratamiento, siempre a la misma hora. La longitud total de la raíz primaria y el número y longitud de raíces laterales fueron evaluadas al décimo día de tratamiento. El crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales fue medido con una regla. Las cajas de Petri fueron escaneadas diariamente. Se utilizaron tres cajas de Petri por tratamiento, cada una conteniendo seis plántulas ($n=18$ plántulas) y los experimentos se repitieron en dos ocasiones.

2.2.4 Tratamiento con L-aminoácidos en condiciones *in vitro*

En este caso se evaluó el efecto del estereoisómero L sobre el crecimiento diario de la raíz primaria hasta el cuarto día. Para este experimento, se utilizó el modelo descrito en el punto 2.2.3 y los aminoácidos seleccionados fueron: L-Ser, L-Ala, L-Tyr, L-Asp, L-Asn y L-

Lys. Se utilizó una dosis de 1 mM de cada uno. Este experimento se llevó a cabo también con el estereoisómero D de cada uno de los aminoácidos seleccionados.

2.2.5 Curva dosis-respuesta

Para detectar la sensibilidad de la raíz de chile habanero a los D-aminoácidos, se realizaron curvas de dosis-respuesta. Se seleccionaron los D-aminoácidos: D-Ala, D-Ser, D-Asp, D-Met, D-Phe, D-Tyr, D-Asn y D-Lys y se probaron las concentraciones de 0.025 mM, 0.05 mM, 0.100 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM. También, se ensayaron los aminoácidos D-Gln, D-Arg, D-Glu a las concentraciones 1 mM, 2mM, 5 mM y 10 mM y la D-Val a 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM. Las dosis se seleccionaron con base en el efecto observado al utilizar 1 mM de cada uno. En este experimento se determinó el crecimiento diario de la raíz primaria hasta los cuatro días de tratamiento.

2.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias fueron comparadas por una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SIGMA STAT v.11.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento radicular de chile habanero en condiciones *in vitro*

Para una mejor comprensión y análisis, los resultados de este experimento se presentan divididos en cinco grupos de acuerdo al grupo R de los aminoácidos.

En la Figura 2.1 se presentan los resultados obtenidos para los aminoácidos con grupo R-alifático, entre los cuales se encuentra D-Ile, D-Pro, D-Met, D-Val, D-Leu y D-Ala (Figura 2.1A). El crecimiento de la raíz primaria de las plántulas durante las primeras 24 horas de tratamiento con la D-Ile (0.98 ± 0.06 cm, $P \leq 0.05$) y D-Pro (0.91 ± 0.09 cm, $P \leq 0.05$) fue similar al testigo con KCl (0.99 ± 0.15 cm, $P \leq 0.05$) (Figura 2.1B). En contraste, las plántulas tratadas con la D-Met (0.69 ± 0.14 cm, $P \leq 0.05$), la D-Val (0.68 ± 0.02 cm, $P \leq 0.05$), la D-Leu (0.54 ± 0.04 cm, $P \leq 0.05$) y la D-Ala (0.37 ± 0.06 cm, $P \leq 0.05$) presentaron una reducción significativa del crecimiento de la raíz primaria, comparada con el testigo, siendo este último aminoácido el que provocó el mayor efecto inhibitorio sobre la raíz

primaria a las 24 horas de exposición en este grupo.

A las 96 horas, la D-Ile (3.8 ± 0.12 cm, $P \leq 0.05$) y la D-Pro (3.53 ± 0.11 cm, $P \leq 0.05$) continuaron sin afectar el crecimiento de la raíz primaria, de manera similar al testigo a este tiempo (3.9 ± 0.49 cm, $P \leq 0.05$) (Figura 2.1C). Para el tratamiento con la D-Val (3.57 ± 0.17 cm, $P \leq 0.05$), se obtuvo un resultado interesante, dado que a las 96 horas la raíz primaria había crecido hasta valores similares a los observados en las plántulas testigo (Figura 2.1C). Esto significa, que la velocidad de crecimiento de la raíz primaria de estas plántulas a partir de las 24 horas y hasta las 96 horas tuvo que ser mayor a la de las plántulas testigo, debido a que en las primeras 24 horas este aminoácido redujo significativamente el crecimiento, como se observa en la Figura 2.1B. La D-Met (1.18 ± 0.29 cm, $P \leq 0.05$), la D-Leu (1.27 ± 0.17 cm, $P \leq 0.05$) y la D-Ala (0.39 ± 0.04 cm, $P \leq 0.05$) continuaron inhibiendo significativamente el crecimiento de la raíz primaria a las 96 horas. La inhibición provocada por la D-Met y la D-Leu fue similar, la cual fue de aproximadamente un 70 % con respecto al testigo a este tiempo de tratamiento. El mayor efecto inhibitorio fue el inducido por la D-Ala y fue de aproximadamente un 90 %. Además, como se muestra en la Figura 2.1, las raíces expuestas a D-Ala detuvieron su crecimiento a partir de las 24 horas de exposición al aminoácido. Este comportamiento sólo fue observado con este aminoácido en este grupo.

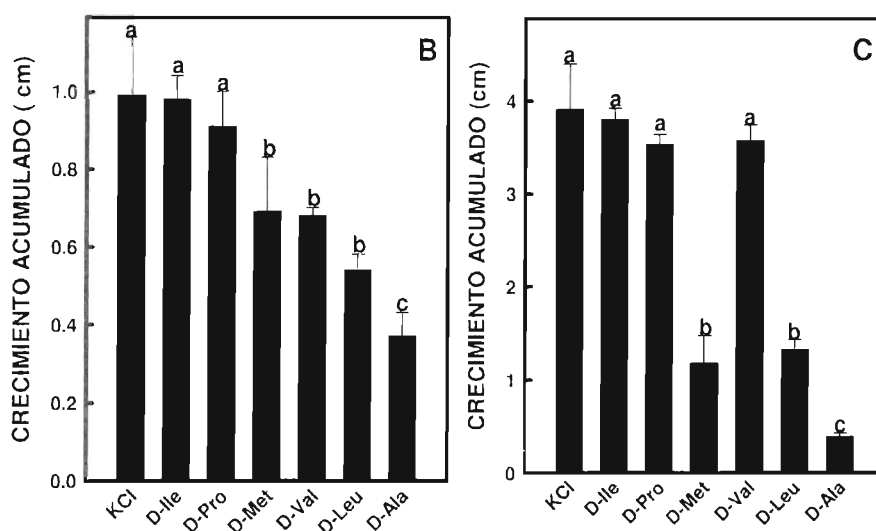
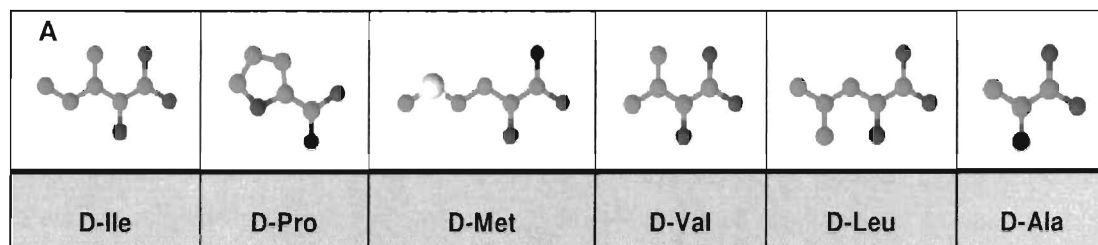


Figura 2.1 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-alifático sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero. A) Estructura química de los D-aminoácidos con grupo R-alifático: Ile, Pro, Met, Val, Leu, Ala. Las raíces de chile habanero fueron expuestas por 24 (B) y 96 (C) horas a 1 mM de los D-aminoácidos o 1 mM KCl (Testigo). En la figura se presenta el crecimiento acumulado de la raíz primaria. Los datos representan la media \pm ES de 18 plántulas y las barras con letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la Figura 2.2 se observa el crecimiento de la raíz primaria obtenido con los D-aminoácidos con grupo R-aromático (D-Trp, D-Phe y D-Tyr), cuya estructura química se muestra en la Figura 2.2 A. El D-Trp (0.85 ± 0.15 cm, $P \leq 0.05$) no indujo un efecto significativo sobre el crecimiento a las 24 horas de tratamiento comparado con el testigo (0.99 ± 0.15 cm, $P \leq 0.05$). Sin embargo, la D-Phe (0.63 ± 0.18 cm, $P \leq 0.05$) y la D-Tyr (0.25 ± 0.02 cm, $P \leq 0.05$) inhibieron significativamente el crecimiento a las 24 horas,

donde el efecto inhibitorio fue más significativo con la D-Tyr, siendo de aproximadamente un 75 % de inhibición a este tiempo (Figura 2.2 B).

A las 96 horas (Figura 2.2 C), se observó un patrón similar en el crecimiento de la raíz primaria, observándose que el D-Trp (3.47 ± 0.43 cm, $P \leq 0.05$) no inhibía significativamente el crecimiento, mientras que la D-Phe (1.77 ± 0.49 cm, $P \leq 0.05$) y la D-Tyr (1.02 ± 0.19 cm, $P \leq 0.05$) provocaban una inhibición de 55 y 74%, respectivamente, comparados con las plántulas testigo (3.91 ± 0.49 cm, $P \leq 0.05$). Como se puede observar el efecto inhibitorio que provocó la D-Tyr fue similar a las 24 y a las 96 horas, esto significa que el efecto máximo ocurrió a tiempos cortos, pero posteriormente las raíces continuaron su crecimiento.

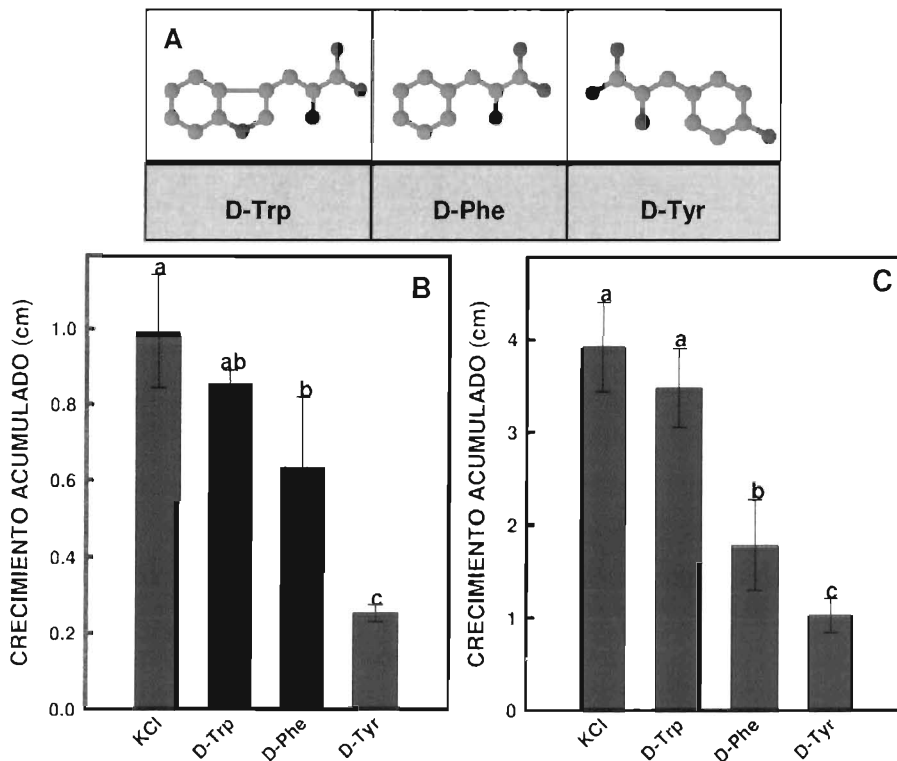


Figura 2.2 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-aromático sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero. A) Estructuras químicas de los D-aminoácidos con grupo R-aromático (D-Trp, D-Phe y D-Tyr). En esta figura se observa el crecimiento acumulado de la raíz primaria de chile habanero expuesta por 24 (B) y 96 horas (C) a 1 mM de los D-aminoácidos mencionados en la sección A o 1 mM KCl (Testigo). Los datos representan la

CAPÍTULO II

media \pm ES de 18 plántulas y las barras con letras diferentes representan diferencias significativas entre los diferentes D-aminoácidos por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 2.3 A se muestra el efecto de los D-aminoácidos con grupo R-polar sin carga (D-Gln, D-Asn, D-Ser, D-Thr y D-Cys). A las 24 horas (Figura 2.3 B), la D-Gln (0.72 ± 0.17 cm, $P \leq 0.05$) fue el único aminoácido de este grupo que no modificó significativamente el crecimiento radicular, en comparación con el testigo. El crecimiento fue similar entre los D-aminoácidos Gln, Asn (0.58 ± 0.19 cm, $P \leq 0.05$), Ser (0.56 ± 0.05 cm, $P \leq 0.05$) y Thr (0.52 ± 0.04 cm, $P \leq 0.05$), siendo la D-Cys (0.34 ± 0.03 cm, $P \leq 0.05$) el aminoácido que provocó una mayor inhibición en el crecimiento con respecto al testigo (0.99 ± 0.15 cm, $P \leq 0.05$).

A las 96 horas (Figura 2.3 C), se observó que la D-Gln (3.94 ± 0.3 cm, $P \leq 0.05$) no modificó el crecimiento de la raíz primaria, siendo éste similar al testigo (3.9 ± 0.49 cm, $P \leq 0.05$). Por otro lado, los D-aminoácidos Ser (1.46 ± 0.01 cm, $P \leq 0.05$), Thr (1.95 ± 0.2 cm, $P \leq 0.05$) y Cys (1.55 ± 0.35 cm, $P \leq 0.05$) tuvieron valores similares en el crecimiento de la raíz primaria, los cuales fueron significativamente menores con respecto a su testigo. Se observó que la D-Asn indujo la mayor inhibición en el crecimiento, alcanzando un valor de 0.99 ± 0.22 cm, $P \leq 0.05$.

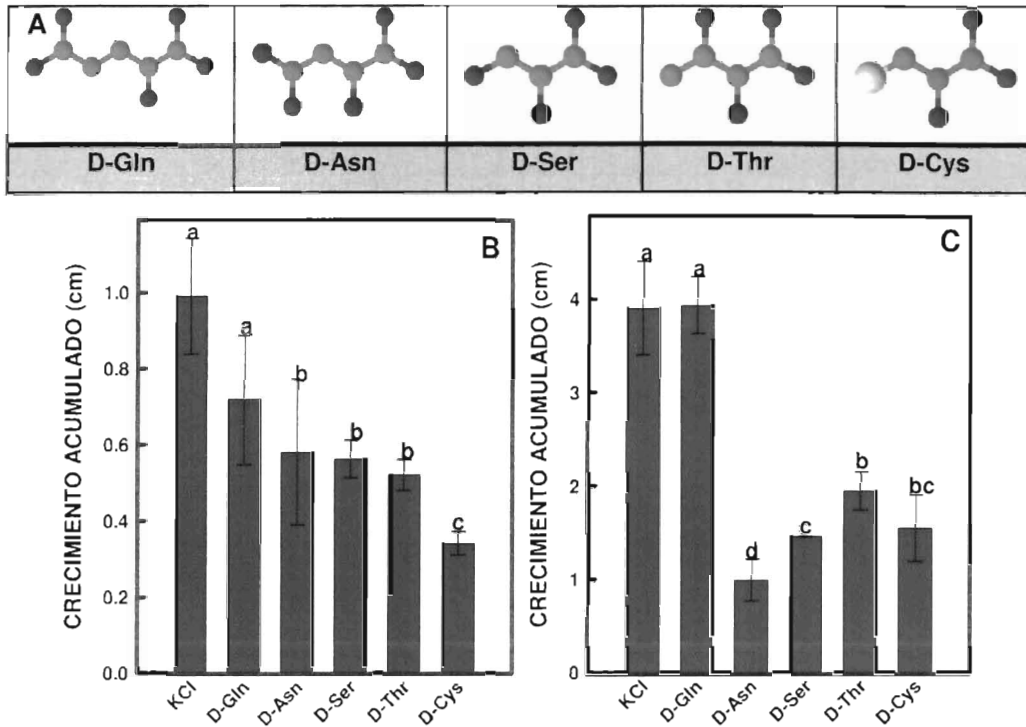


Figura 2.3 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-polar sin carga sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero. A) Estructuras químicas de los D-aminoácidos con grupo R-polar sin carga (D-Gln, D-Asn, D-Ser, D-Thr, D-Cys). En esta figura se observa el crecimiento acumulado de la raíz primaria de chile habanero expuesta por 24 (B) y 96 (C) horas a 1 mM de los D-aminoácidos mencionados en la sección A o 1 mM KCl (Testigo). Los datos representan la media \pm ES de 18 plántulas y las barras con letras diferentes representan diferencias significativas entre los diferentes D-aminoácidos (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la Figura 2.4 se presenta el efecto de los D-aminoácidos con grupo R-cargados positivamente (D-Arg, D-Lys y D-His, Figura 2.4 A). A las 24 horas (Figura 2.4 B) en el caso de la D-Arg (0.95 ± 0.21 cm, $P \leq 0.05$), el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero fue similar al del testigo, mientras que con la D-Lys (0.49 ± 0.05 cm, $P \leq 0.05$) y la D-His (0.47 ± 0.02 cm, $P \leq 0.05$) el crecimiento entre éstos fue similar, pero significativamente menor que el testigo. Este mismo comportamiento fue observado a las 96 horas de aplicación (Figura 2.4C).

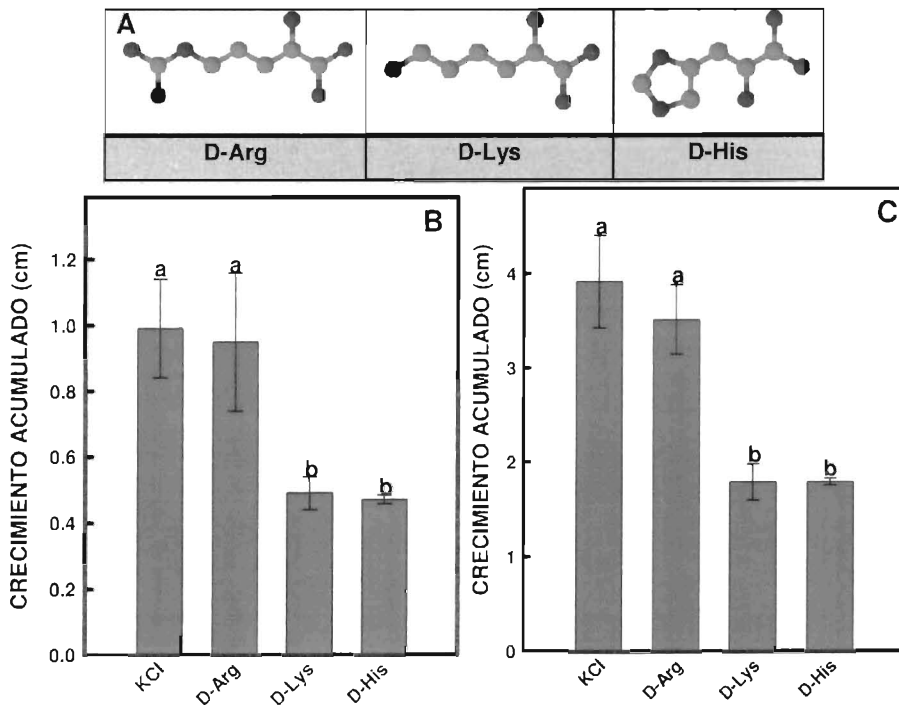


Figura 2.4 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-cargado positivamente sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero. A) Estructuras químicas de los D-aminoácidos con grupo R-cargados positivamente (D-Arg, D-Lys y D-His). El crecimiento acumulado de la raíz primaria de chile habanero expuesta por 24 (B) y 96 (C) horas a 1 mM de los D-aminoácidos mencionados en la sección A o 1 mM KCl (Testigo). Los datos representan la media \pm ES de 18 plántulas y las barras con letras diferentes representan diferencias significativas entre los diferentes D-aminoácidos (Tukey, $P \leq 0.05$).

En las gráficas de la Figura 2.5 se presenta el comportamiento de la raíz primaria de chile habanero expuesta a los D-aminoácidos con grupo R-cargados negativamente entre los cuales está el ácido D-Glu y el ácido D-Asp (Figura 2.5 A). A las 24 de exposición (Figura 2.5 B) se observa que las raíces tratadas con D-Glu (0.88 ± 0.3 cm, $P \leq 0.05$) tuvieron un crecimiento similar del testigo; por el contrario con el D-Asp se inhibió el crecimiento de la raíz, siendo éste de solamente 0.08 ± 0.03 cm, $P \leq 0.05$. A las 94 horas (Figura 2.5 C) de exposición, se observa que con el D-Glu (3.46 ± 0.09 cm, $P \leq 0.05$) la raíz primaria mantuvo un crecimiento similar al testigo (3.91 ± 0.49 cm, $P \leq 0.05$); sin embargo, con el D-

Asp se observa una detención en el crecimiento de la raíz primaria desde las 24 horas de exposición.

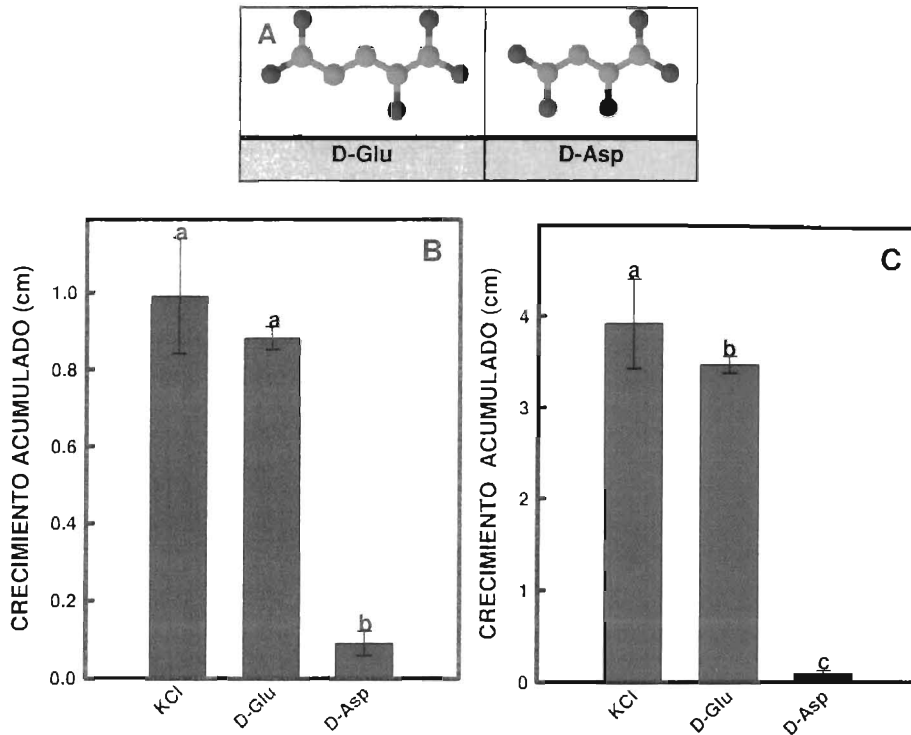


Figura 2.5 Efecto de los D-aminoácidos con grupo R-cargado negativamente sobre el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero. A) Estructuras químicas de los D-aminoácidos con grupo R-cargados positivamente (D-Glu y D-Asp). En esta figura se observa el crecimiento acumulado de la raíz primaria de chile habanero expuesta por 24 (B) y 96 (C) horas a 1 mM de los D-aminoácidos mencionados en la sección A o 1 mM KCl (Testigo). Los datos representan la media \pm ES de 18 plántulas, las barras con letras diferentes representan diferencias significativas entre los diferentes D-aminoácidos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Respecto al crecimiento acumulado de la raíz primaria después de cuatro días de tratamiento, se pudo observar que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en respuesta a la presencia exógena de los D-aminoácidos fue dependiente del tipo de aminoácido. Esta inhibición fue mayor con el D-Asp, con un 97% de inhibición, seguido por la D-Ala, la cual inhibió en un 85% aproximadamente con relación al KCl y en comparación con otros aminoácidos, tales como D-Ile, D-Val, D-Gln y D-Arg, los cuales no tuvieron una diferencia significativa comparada con el crecimiento observado en el testigo.

CAPÍTULO II

Inclusive se observa que entre los D-aminoácidos pertenecientes al mismo grupo, el efecto fue diferencial en cada caso.

En trabajos previos en donde las plantas han sido expuestas a la presencia exógena a los D-aminoácidos, se había observado que estos inhibían el crecimiento, por lo que se considera que son tóxicos para las plantas, debido a su baja o nula tasa de eliminación (Gördes *et al.*, 2011; Forsum *et al.*, 2008; Erikson *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha encontrado que los D-aminoácidos Val e Ile no afectan el crecimiento de las plantas (Erikson *et al.*, 2004). Esta respuesta coincide con la encontrada en este trabajo. Además, se ha reportado que estos aminoácidos pudieran ser una fuente de nitrógeno alternativa (Hill *et al.*, 2011).

2.3.2 Cambios morfológicos en la raíz primaria de las plántulas de chile habanero

Además de los cambios reportados en el crecimiento de la raíz primaria, la aplicación de los D-aminoácidos provocó cambios morfológicos en las raíces, los cuales variaron de acuerdo al tipo de D-aminoácido suministrado al medio (Anexo I).

Entre los cambios morfológicos más notorios, se encuentra la producción de raíces laterales provocado por la aplicación de la D-Leu, y el aumento de pelos radiculares que fue más notorio en el tratamiento con D-Cys, a partir del cuarto día de exposición (Figura 2.6A). Desde el punto de vista fisiológico, estos cambios son importantes para los aspectos nutricionales de la planta, debido a que ambas estructuras contribuyen al desarrollo de una mayor área de absorción de nutrientes (Gregory, 2006).

Otro cambio importante se observó en las raíces expuestas a la D-Tyr, donde ocurrió un oscurecimiento en algunas zonas de la raíz primaria a las 96 horas de tratamiento (Figura 2.6B); empero, el nuevo crecimiento de la raíz no presentó esta característica, el oscurecimiento solamente fue visible en la zona que estuvo durante más tiempo en contacto con el D-aminoácido. En este caso, la coloración podría deberse a una racemización de la D-Tyr a L-Tyr. Esta coloración estaría asociada a una acumulación de melanina, que es un compuesto encontrado en plantas y animales (Kim y Uyama, 2005), el que es sintetizado a partir de la L-Tyr por la enzima tirosinasa (Nerya *et al.*, 2003). En los organismo vivos, la melanina sirve como un sistema de defensa contra ataques, daño o lesiones que provienen de agentes externos (Nappi, 2010).

En cuanto al crecimiento de la raíz primaria, se puede destacar el provocado por la D-Val. A las 24 horas el crecimiento de la raíz primaria con este aminoácido fue menor al observado con el testigo; sin embargo, a las 96 horas se observa una recuperación en el crecimiento, igualando la longitud de la raíz primaria del testigo (Figura 2.6 C). Esta aceleración en el crecimiento radicular únicamente fue observada con las raíces expuestas a la D-Val.

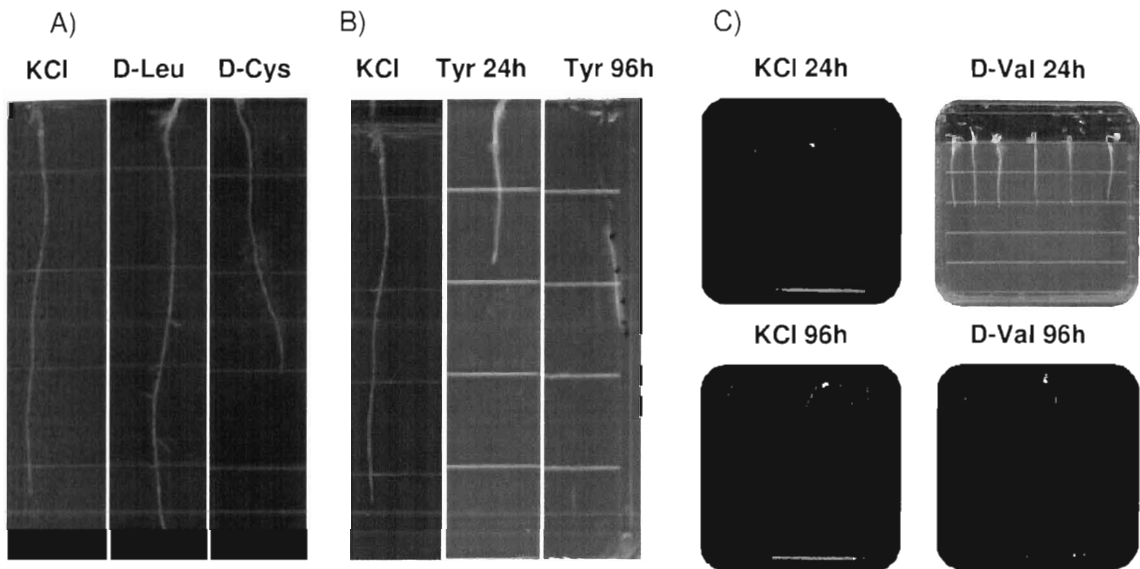


Figura 2.6 Cambios significativos en el crecimiento de raíz primaria. A) En la figura se observan cambios morfológicos en la raíz primaria, un aumento en el número de raíces laterales producido por la D-Leu (10 días de exposición al D-aminoácido), además un aumento en la producción de pelos radiculares causado por la D-Cys (cuatro días de exposición), B) Cambio de coloración de la raíz ocasionado por la exposición a la D-Tyr, C) Recuperación en el crecimiento de la raíz primaria ocasionado por la D-Val a las 96 horas de exposición.

2.3.3 Respuesta estereoespecífica de la raíz primaria de chile habanero a los aminoácidos

Debido a los cambios morfológicos y de crecimiento observados en las raíces de chile habanero por la aplicación exógena de los D-aminoácidos, se evaluó si esta respuesta pudiera ser similar con su estereoisómero L, por lo que se seleccionaron aquellos aminoácidos que provocaron un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz

primaria.

Los aminoácidos evaluados fueron: la L-/D- Ala, L -/D -Tyr, L -/D - Asp, L-/D- Asn, L-/D- Lys. En este experimento se observó que, a excepción de la L-Tyr, los L-aminoácidos ensayados no inhibieron significativamente el crecimiento de la raíz primaria a las 96 h de exposición (Figura 2.7).

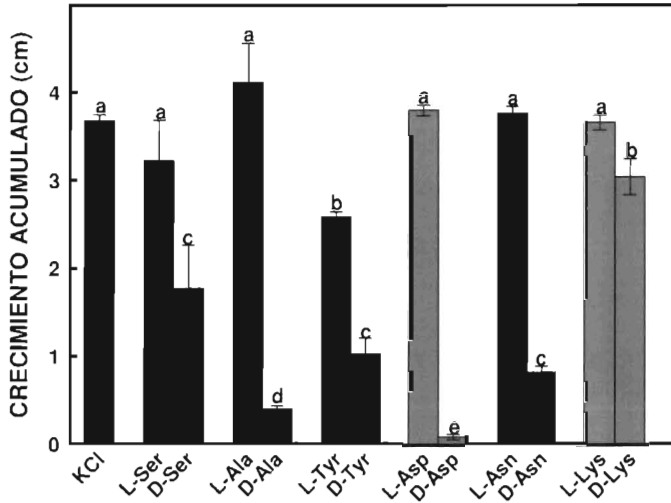


Figura 2.7 Efecto estereoespecífico de los aminoácidos sobre el crecimiento radicular. El experimento fue realizado utilizando 1 mM de los L- y D-aminoácidos o 1 mM de KCl (testigo). Los datos representan el valor promedio del crecimiento radicular (n=18 plántulas) a las 96 horas de tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

Mediante estos datos, se comprobó que el crecimiento de la raíz primaria depende del estereoisómero aplicado, donde de forma general el estereoisómero D fue más efectivo para inhibir el crecimiento.

El caso más notorio fue el observado con el L-Asp y el D-Asp donde el estereoisómero L no inhibe el crecimiento de la raíz primaria; sin embargo, el D-Asp fue el aminoácido que provocó un mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento, a comparación con todos los aminoácidos evaluados.

2.3.4 Curva dosis-respuesta

En este experimento, se utilizaron diferentes concentraciones de los D-aminoácidos anteriormente mencionados en la sección 2.2.4 de Materiales y Métodos para determinar la sensibilidad de la raíz primaria. En el anexo II se muestran los resultados obtenidos con estos aminoácidos a las 24 y 96 horas de exposición.

En la figura 2.8 se observa que la dosis de los D-aminoácidos Met, Tyr, Ser y Asn a la cual se inhibió el crecimiento fue a partir de 0.5 mM; sin embargo, la raíz primaria presentó una mayor sensibilidad a la D-Ala que inhibió el crecimiento a una dosis de 0.1 mM y el D-Asp al que la raíz fue más sensible debido a que inhibió el crecimiento a partir de 0.050 mM.

En el caso de la D-Phe, ésta inhibió el crecimiento de la raíz a partir de 1 mM, obteniendo un porcentaje de inhibición de 30% (Cuadro 2.1). La D-Val y el ácido D-Glu inhibieron el crecimiento a la misma concentración, la cual fue de 2 mM, obteniendo un porcentaje de inhibición de 28% y 47%, respectivamente (Cuadro 2.1). Con la D-Gln y la D-Arg se observó que la dosis inhibitoria fue de 5 mM para ambos, con valores de inhibición de 47% y 40%, respectivamente.

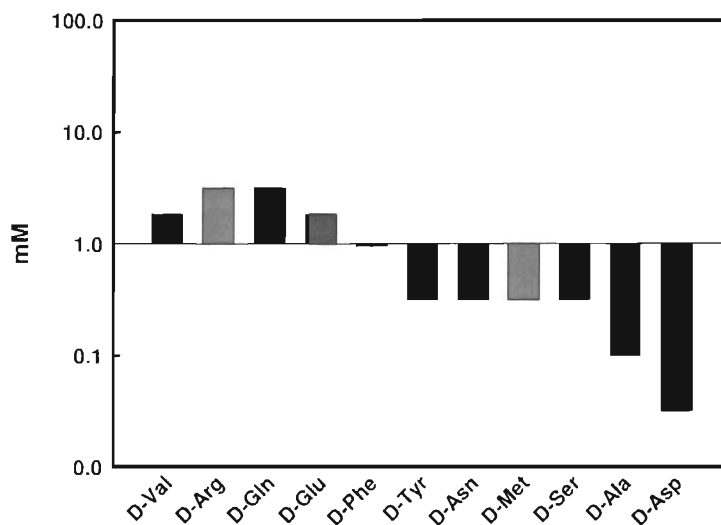


Figura 2.8 Dosis inhibitoria de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz primaria, evaluada al cuarto día de tratamiento. Los datos representan la concentración a la cual se inhibió el crecimiento de las raíces en presencia de los D-aminoácidos.

Cuadro 2.1 Porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz primaria obtenido a la mínima dosis inhibitoria de los D-aminoácidos, a las 96 horas de exposición. El 0% de inhibición correspondió al tratamiento testigo, el cual fue 1.0786 ± 0.04 cm, $P \leq 0.05$.

D-aminoácidos	Dosis Inhibitoria (mM)	% de inhibición
Ala	0.1	22.97 ± 6.61
Val	2	28.12 ± 5.82
Phe	1	30.18 ± 5.16
Met	0.5	31.56 ± 7.54
Tyr	0.5	33.53 ± 6.23

Asp	0.05	36.83 ± 8.18
Arg	5	40.41 ± 8.29
Ser	0.5	40.76 ± 3.57
Asn	0.5	43.77 ± 10.67
Glu	2	46.94 ± 9.06
Gln	5	74.97 ± 4.85

Los L-aminoácidos son los que se encuentran comúnmente en los seres vivos y hasta ahora, los más caracterizados, ya que se ha visto que pueden ser una fuente alternativa de N dando lugar a cambios en el crecimiento de las plantas (Hugh y Jeefferies, 2003).

Sin embargo, el crecimiento de las plántulas en presencia de los D-aminoácidos presentó diferencias en cuanto al crecimiento de la raíz primaria. Con los D-aminoácidos Val, Ile y Gln no se observó un efecto negativo en el crecimiento, por el contrario con la D-Ala y el D-Asp se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición con relación al resto de los tratamientos. La D-Val tampoco inhibió el crecimiento radicular en *Arabidopsis thaliana*, mientras que otros como D-Ala, D-Ser y D-Tyr sí lo hicieron y a una dosis menor a 1 mM. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió en chile habanero, el ácido D-Asp no inhibió el crecimiento en *Arabidopsis* (Gördes *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos sugieren que las raíces de chile habanero son más sensibles a la presencia de los D-aminoácidos que las de *Arabidopsis* (Gördes *et al.*, 2011).

2.4 CONCLUSIÓN

Los D-aminoácidos tienen un efecto sobre el crecimiento y la morfología de la raíz de chile habanero, el cual es dependiente de la concentración, el tiempo de exposición y el tipo de D-aminoácido. Se observó estereoespecificidad en la respuesta radicular a los aminoácidos, y en todos los tratamientos, las raíces fueron más sensibles a los D-estereoisómeros.

Los resultados demuestran que las raíces de chile habanero pueden modificar su crecimiento cuando se encuentran expuestas a los D-aminoácidos y sugieren que esta fuente orgánica de N podría afectar mecanismos como la absorción de nutrimentos a partir de su presencia y de su interacción con las raíces en suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Brückner, H. y T. Westhauser (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acid*, 24, 43-55.
- Celis Arámburo, Tde J, M. Carrillo Pech, L.A. Castro Concha, M.L Miranda Ham, M. Martínez Estévez y I. Echevarría Machado (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1456-1464.
- D'Aniello, A., A. Di Cosmo, C. Di Cristo, L. Annunziato, L. Petrucelli y G.H. Fisher (1996). Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Science*, 59, 97-104.
- Dunlop, D.S., A. Neidle, D. McHale, D.M. Dunlop y A. Lajtha (1986). The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142, 27-32.
- Erikson, O, M. Hertzberg y T.Näsholm T (2004). A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nature Biotechnology*, 22,455-458.
- Forsum, O., H. Svennerstam, U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179, 1058-1069.
- Gamborg, O.L., R.A Miller y O. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspensioncultures of soybean root cell. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
- Gördes, D., Ü. Kolukisaoglu y K. Thurow (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 40, 553-563.
- Gregory, P.J. (2006). *Plant root: growth, activity and interaction with soils*. Blackwell publishing, Oxford. 21p.
- Hamase, K., A. Morikawa, S. Etoh, Y. Tojo, Y. Miyoshi y K. Zaitzu (2009). Reviews: analysis of small amounts of D-amino acids and the study of their physiological functions in mammals. *Analytical Sciences*, 25, 961-968.

- Hill, P.W., R.S. Quilliam, T.H. DeLuca, J. Farrar, M. Farrell, P. Roberts, K.K. Newsham, D. Hopkins, R. Bardgett y D. Jones (2011). Acquisition and assimilation of nitrogen as peptide bound and D-enantiomers of amino acids by wheat. *PLoS ONE* 4: e19220.
- Hugh, H. y R. Jefferies (2003). Plant amino acid uptake, soluble N turnover and microbial N capture in soils of a grazed arctic salt marsh. *Ecology*, 91, 627-636.
- Kim, Y.J. y H. Uyama (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic source: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Molecular Life Science*, 62, 1707-1723.
- Michard, E., P. Lima, F. Borges, A. Silva, M. Portes, J. Carvalho, M. Gilliam, L. Liu, G. Obermeyer y J. Feijo (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*, 332, 434-437.
- Mori, H. y R. Inoue (2010). Serine racemase knockout mice: review. *Chemistry and Biodiversity*, 7, 1573-1578.
- Morikawa, A., K. Hamase, T. Ohgusu, S. Etoh, H. Tanaka, I. Koshiishi, Y. Shoyama y K. Zaitu (2007). Immunohistochemical localization of D-alanine to b-cells in rat pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355, 872-876.
- Nappi, A.J. (2010). Cellular immunity and pathogen strategies in combative interactions involving *Drosophila* host and their endoparasitic wasps. *Invertebrate Survival Journal*, 7, 198-210.
- Nelson, D.L y M.M Cox (2005). Amino acids, peptides and proteins, en: Lehninger: Principles of biochemistry. Omega, Barcelona. pp. 75-110.
- Nelson, D.L. y M.M. Cox (2004). Lehninger: Principles of Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company

Nerya, O., J. Vaya, R. Musa, S. Izrael, R. Ben-Arie y S. Tamir S. (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 5, 1201-1207.

Robinson, T. (1976). D-amino acids in higher plants. *Life Science*, 19, 1097-1102.

Wang, H., H. Wolosker, J. Pevsner, S.H. Snyder y D.J. Selkoe (2000). Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. *Journal of Endocrinology*, 167, 247-252.

CAPÍTULO III

EFFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO CRECIENDO EN CONDICIONES DE HIDROPONIA

3.1 INTRODUCCIÓN

El N es un macronutriente requerido en grandes cantidades por las plantas siendo el nitrato la mayor fuente de N inorgánico en los suelos agrícolas (Frink *et al.*, 1999). Comprende entre el 1.5 y 2% de su peso seco y aproximadamente el 16% del total de proteínas producidas. En los suelos, las plantas utilizan la raíz como órgano de percepción y adquisición de nutrientes y agua. La capacidad para la absorción de este nutriente por el sistema radicular está determinada por las adaptaciones fisiológicas y de desarrollo, donde un mayor número de ramificaciones permite una mayor exploración de un volumen de suelo y por ende, una mayor absorción (Zhang *et al.*, 2007).

Además de la absorción de N inorgánico, las plantas son capaces de absorber formas de N orgánico (Virtanen y Linkola, 1946); por ejemplo, en forma de aminoácidos (Persson y Näsholm, 2001). Aunque la afinidad de las raíces por la toma de aminoácidos se encuentra en el mismo rango que la de los microorganismos del suelo (Jämtgård *et al.*, 2008), muchos estudios sugieren que los aminoácidos son absorbidos preferentemente por las plantas, por lo que podrían ser una fuente potencial de N (Persson y Näsholm, 2001).

Los aminoácidos en el suelo se derivan de la descomposición de proteínas y péptidos procedentes de los organismos (Kielland *et al.*, 2007). Generalmente, los L-aminoácidos son los predominantes en los suelos; sin embargo, se ha reportado que algunos D-aminoácidos también son abundantes en ellos (D-Ser, D-Ala, D-Asp y D-Glu) (Vranova *et al.*, 2012).

Existen muy pocos estudios acerca del efecto de estos estereoisómeros sobre el crecimiento de las plantas y en su mayoría se describe un fuerte efecto inhibitorio en el crecimiento, particularmente en la planta modelo *Arabidopsis*, sugiriendo una competencia

CAPÍTULO III

entre los D-aminoácidos con las formas L para unirse a los ARNt o para inhibir competitivamente a las aminotransferasas (Forsum *et al.*, 2008). Con base en los resultados obtenidos en el capítulo anterior, el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de éstos sobre el crecimiento de la planta de chile habanero durante períodos de tiempo prologando (30 días).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

3.2.1.1 Desinfestación y germinación de las semillas

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de tres variedades, la naranja que comercializa la empresa Séminis y dos variedades yucatecas, la Mayan Chan y la Mayan Ek, de frutos rojo y naranja, respectivamente. Para la desinfestación y la germinación de las semillas se siguió el protocolo descrito en la sección 2.2.2 del capítulo II.

3.2.2 Evaluación del efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de chile habanero creciendo en condiciones de hidroponía

3.2.2.1 Efecto de mezclas de D-aminoácidos

Cuando ocurrió la protrusión de la radícula, las semillas se trasladaron a recipientes conteniendo vermiculita estéril para el crecimiento de la plántula. Se adicionó 50 ml de solución Hoagland (Richard-Morland *et al.*, 2008) semanalmente. Se colocaron en condiciones de fotoperiodo (16 h luz/ 8 hrs oscuridad) a una intensidad lumínica de $114 \mu\text{molm}^{-2} \text{seg}^{-1}$, a 25°C para el crecimiento de las plántulas durante 45 días. Posteriormente, las plántulas fueron retiradas cuidadosamente de la vermiculita evitando dañar las raíces, subsecuentemente se realizó tres lavados con agua estéril para limpiar los restos de vermiculita, después se trasladaron a condiciones de hidroponía durante cuatro días, colocándolas en un recipiente cubierto con papel aluminio para evitar el paso de la luz, el cual contenía 2 L de solución Hoagland a $\frac{1}{2}$ de su fuerza iónica.

Las plántulas, divididas en cuatro grupos, se transfirieron a un medio conteniendo la solución Hoagland sin fuente de N (Richard-Morland *et al.*, 2008) y se les aplicaron los tratamientos siguientes: **-N**: plántulas creciendo en ausencia de cualquier fuente de N,

adicionando 1 mM KCl para mantener los niveles de K en el medio; **+NI**: plántulas creciendo en presencia de 1 mM de KNO_3 + 0.3 mM de NH_4Cl como fuentes de N; **NI + M1**: plántulas creciendo en presencia de 1 mM de KNO_3 + mezcla 1 de D-aminoácidos a una concentración final de 0.3 mM (D-Ser, D-Ala y D-Asp, cada uno a 0.1 mM) y **NI + M2**: plántulas creciendo en presencia de 1 mM de KNO_3 + mezcla 2 de D-aminoácidos a una concentración final de 0.3 mM (D-Val, D-Leu, D-Cys, cada uno a 0.1 mM).

La selección de los aminoácidos componentes de la mezcla 1 se basó en aquellos que estuvieran presentes en el suelo a partir de más de una fuente, ya sea por heces fecales, orina, flora bacteriana, antibióticos o la lombriz de tierra, haciendo que su presencia en el suelo sea más probable que la de otros D-aminoácidos. El criterio para la selección de la mezcla 2 fue el efecto que éstos tuvieron sobre el sistema radicular de chile habanero en condiciones *in vitro*. A partir de los resultados del ensayo de todos los D-aminoácidos (capítulo II), se seleccionaron aquellos que provocaron cambios importantes sobre el sistema radicular de chile habanero; por ejemplo, la inducción de un mayor número de pelos radiculares, mayor número de raíces laterales, etc.

Las plántulas se mantuvieron en esta solución durante 30 días, bajo las condiciones controladas descritas previamente. El medio se cambió semanalmente. La cosecha del material se realizó a los 0, 7, 14 y 28 días y se evaluaron los siguientes parámetros: crecimiento (peso fresco y seco aéreo de la parte aérea y radicular, altura de la planta, número de hojas, área foliar, longitud radicular total, número de raíces laterales y área radicular) y contenidos de nitrato, aminoácidos totales y proteínas totales, como se describe posteriormente.

El peso seco aéreo y radicular fue determinado por secado del material en la estufa a 60 °C hasta peso constante. El área foliar y radicular, así como la longitud radicular total y el número de raíces laterales fueron determinados usando el programa WinRhizo (WinRhizo Pro). Para la determinación de los parámetros de crecimiento, se utilizaron cinco plántulas independientes, mientras que para los bioquímicos, se utilizó el material proveniente de 10 plántulas.

3.2.2.2 Efecto de D-aminoácidos individuales

Con base en las evaluaciones anteriores sobre el crecimiento de las plántulas, se seleccionó una variedad vegetal y una mezcla de aminoácidos para la repetición del experimento. Esta selección fue de acuerdo a los mejores resultados fisiológicos y bioquímicos obtenidos; en este caso se eligió la variedad naranja que comercializa la empresa Séminis y el tratamiento con la mezcla 2 de los D-aminoácidos (D-Val, D-Leu y D-Cys). Las plántulas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: **+NI**: 1 mM de KNO_3 + 0.1 mM de NH_4Cl ; **NI + M2**: 1 mM de KNO_3 + mezcla 2 de D-aminoácidos a una concentración final de 0.3 mM (tratamiento similar al experimento anterior); **NI + Val**: 1 mM de KNO_3 + 0.1 mM de D-Val; **NI + Leu**: 1 mM de KNO_3 + 0.1 mM de D-Leu y **NI + Cys**: 1 mM de KNO_3 + 0.1 mM de D-Cys.

Los tratamientos 3, 4 y 5 se diseñaron con el objetivo de conocer el efecto individual que tenían cada uno de los D-aminoácidos de la mezcla sobre el crecimiento de las plantas. Para este experimento, la cosecha del material se realizó en los días 0 y 28 de tratamiento y se evaluaron los parámetros de crecimiento y bioquímico descritos anteriormente.

3.2.3 Análisis de nitratos, aminoácidos totales y proteínas totales

Para la extracción de proteínas, se pulverizaron 0.5 g de raíz y hoja por separado con nitrógeno líquido, y luego se adicionaron 1% de polivinil pirrolidona (p/v) y el amortiguador de extracción (1.25 ml; 50 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8 y 1 mM β -mercaptoetanol). Posteriormente, se homogeneizó con un politrón y se centrifugó a 12000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y utilizó para la determinación de proteínas totales (mg g^{-1} peso fresco) por el método de Bradford (1976), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (BioRad, No. Cat. 5000006). Para la cuantificación, se realizó una curva patrón utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

El análisis de nitratos se realizó a partir de este extracto, de acuerdo a la metodología propuesta por Cawse (1967). Para la determinación de aminoácidos (mg g^{-1} peso fresco) se siguió la metodología de Yemm y Cocking (1955), usando una curva patrón de glutamato de potasio (Sigma-Aldrich).

Se realizaron tres extractos separados de tejidos de raíz y hoja y las evaluaciones se hicieron por triplicado.

3.2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SIGMA STAT v.11.3.3.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efecto de mezclas de D-aminoácidos sobre el crecimiento de plántulas de chile habanero en condiciones de hidroponía

En este primer experimento, se utilizaron dos mezclas de D-aminoácidos, la mezcla 1 (M1) integrada por los D-aminoácidos Ser, Ala y Asp, cuya presencia en los suelos sería más probable, y la mezcla 2 (M2) conteniendo a la D-Val, D-Leu y D-Cys, seleccionados a partir de los resultados *in vitro*, como se describió en Materiales y Métodos.

En la Figura 3.1 se presenta la cinética de crecimiento, con base en los pesos fresco y seco de las plántulas de chile habanero de la variedad Séminis, en presencia de diferentes condiciones de N. Las plántulas creciendo en presencia de N (+NI, NI + M1 y NI + M2) alcanzaron siempre un mayor crecimiento al día 28 de tratamiento, comparada con aquellas que lo hicieron en un medio que no contenía N (-N, Figura 3.1).

Cuando las plántulas fueron sometidas a una fuente de N, éstas aumentaron aproximadamente 0.38 g de peso fresco aéreo (3.2 veces más que el valor inicial al día 0) durante los 28 días de tratamiento, mientras que sólo aumentaron 0.06 g (1.3 veces) cuando no estuvieron en presencia de N durante ese mismo período (Figura 3.1 A). A los 28 días no se observaron diferencias significativas entre el peso fresco aéreo de aquellas plántulas creciendo en presencia de N inorgánico (+NI) y una mezcla de N inorgánico + N orgánico (Figura 3.1 A). Sin embargo, las plántulas creciendo en presencia de KNO_3 y la mezcla de los D-aminoácidos Ala, Ser y Asp (NI + M1) presentaron un mayor peso seco aéreo a los 28 días (20% mayor), que aquellas creciendo en presencia de N inorgánico solamente o N inorgánico + la mezcla 2 de D-aminoácidos (NI + M2, Figura 3.1 B).

También se observó un valor mayor de peso fresco radicular en aquellas plántulas creciendo en presencia de N inorgánico y la mezcla 1 de D-aminoácidos (NI + M1), el cual a los 28 días fue de aproximadamente 4.4 veces mayor al valor del día 0, mientras que sólo fue de 3.4 veces mayor en los tratamientos de N inorgánico solamente (+NI) o N inorgánico + la mezcla 2 de los D-aminoácidos (NI + M2, Figura 3.1 C). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el peso seco radicular a los 28 días entre las plántulas creciendo en cualquier forma de N (Figura 3.1 D).

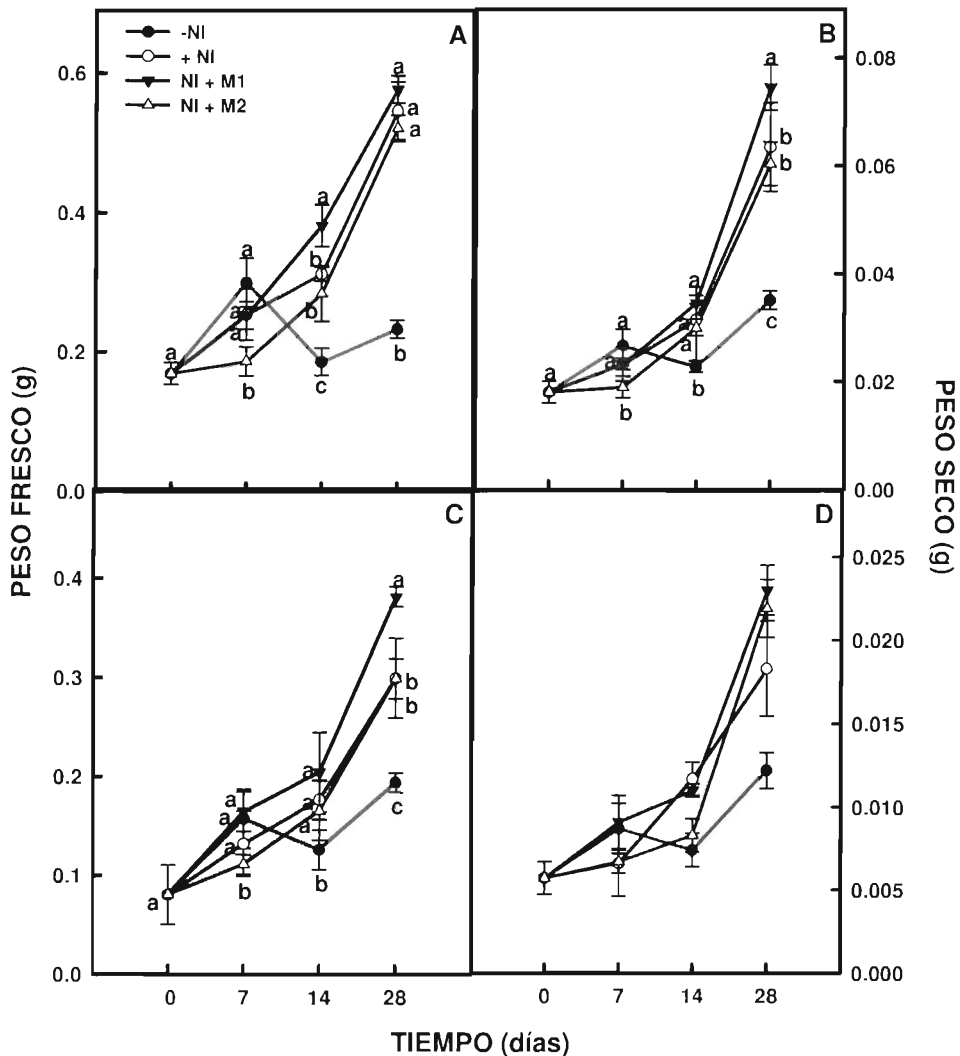


Figura 3.1 Efecto de diferentes condiciones de nitrógeno sobre el crecimiento

de chile habanero (variedad Séminis). Las plántulas crecieron durante 28 días en presencia de los diferentes tratamientos de N: -N, 1 mM de KCl (testigo sin N); +NI, 1 mM de KNO_3 + 0.3 mM de NH_4Cl (N inorgánico, NI); NI + M1, 1 mM de KNO_3 + 0.3 mM de la mezcla uno de los D-aminoácidos (D-Ala, D-Ser, D-Asp, cada uno a 0.1 mM) y NI + M2, 1 mM de KNO_3 + 0.3 mM de la mezcla dos (D-Val, D-Leu y D-Cys, cada uno a 0.1 mM). Las evaluaciones de peso fresco aéreo (A) y radicular (C) y pesos secos aéreo (B) y radicular (D) se realizaron a los 0, 7, 14 y 28 días de tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar ($n=5$). Letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos por día ($P<0.05$).

Para profundizar en el efecto que estos D-aminoácidos ejercieron sobre el crecimiento de las plántulas, se evaluaron parámetros como la altura de la planta, el área foliar (AF), el número de hojas, la longitud radicular total (LRT), el área radicular (AR) y el número de raíces laterales (RL). La altura y el número de hojas de las plántulas que no estuvieron expuestas a N (-N) fueron similares a la que tenían al inicio del experimento (D0), indicando que éstas no crecieron en tamaño, ni fueron capaces de formar nuevas hojas durante este período. No obstante, se observó un crecimiento en estas plántulas, medido en función del AF, LRT, número de RL y AR (Cuadro 3.1, Figura 3.2).

Las plántulas que fueron expuestas durante 28 días a alguna fuente de N presentaron mayor altura y número de hojas, comparadas con los testigos creciendo en ausencia de N y estos parámetros fueron similares entre aquellas plántulas creciendo en presencia de una fuente inorgánica de N (+NI) y aquellas que lo hicieron en una mezcla de fuente inorgánica y orgánica (NI + M1 y NI + M2) (Cuadro 3.1). De igual manera, el AF aumentó significativamente en aquellas plántulas que estuvieron en presencia de N durante 28 días, siendo entre 2.6 y más de 3 veces superior (dependiendo del tratamiento de N) en comparación con la que presentaron las plántulas creciendo en el tratamiento -NI. Las plántulas que presentaron la mayor AF fueron aquellas que estuvieron expuestas a la presencia de NI y la mezcla 2 de D-aminoácidos, siendo ésta significativamente mayor a la presentada por las plántulas sometidas a los tratamientos +NI y NI + M1 (Cuadro 3.1, Figura 3.2A).

Cuadro 3.1 Efecto de diferentes condiciones de nitrógeno sobre algunos parámetros de crecimiento aéreo y radicular de chile habanero, variedad Séminis, creciendo en condiciones de hidroponía. Las plántulas de chile habanero fueron expuestas durante 28 días a los tratamientos de nitrógeno descritos en la Figura 3.1. D0: evaluaciones realizadas a las plántulas antes de iniciar los tratamientos (día 0 de tratamiento). Los datos representan la media \pm error estándar (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.005$).

	Altura (cm)	No. de hojas	Área foliar (cm ²)	Longitud radicular total (cm)	No. de raíces laterales	Área radicular (cm ²)
D0	5.84 \pm 0.45 (b)	6.2 \pm 0.98 (b)	6.70 \pm 0.62 (d)	106.72 \pm 2.03 (d)	48.25 \pm 1.11(d)	3.42 \pm 0.12 (a)
-NI	5.77 \pm 0.60 (b)	6.5 \pm 0.50 (b)	9.49 \pm 0.16 (c)	142.30 \pm 2.46 (c)	87 \pm 2 (c)	5.63 \pm 0.10 (c)
+NI	7.90 \pm 0.68 (a)	9.4 \pm 0.80 (a)	24.88 \pm 2.54 (b)	136.77 \pm 16.44 (c)	151.33 \pm 12.82 (b)	7.15 \pm 0.06 (b)
NI + M1	7.75 \pm 0.60 (a)	9.60 \pm 0.50 (a)	25.78 \pm 2.25 (b)	255.94 \pm 10.29 (a)	151.33 \pm 11.89 (b)	11.75 \pm 0.86 (a)
NI + M2	7.86 \pm 0.51 (a)	9.4 \pm 0.50 (a)	28.87 \pm 1.54 (a)	221.43 \pm 5.87 (b)	167.25 \pm 3.88 (a)	11.41 \pm 0.74 (a)

La LRT y el AR fueron significativamente mayores en las plántulas que estuvieron fertilizadas con una mezcla de NI y orgánico (NI + M1 y NI + M2), comparadas con aquellas que lo estuvieron sólo con NI (+NI) (Cuadro 3.1). Sin embargo, el número de RL fue mayor solamente cuando las plántulas se expusieron a NI en conjunto con la mezcla 2 de los D-aminoácidos, y similar entre aquellas expuesta a N inorgánico y a N inorgánico + M1 (Cuadro 3.1, Figura 3.2B).

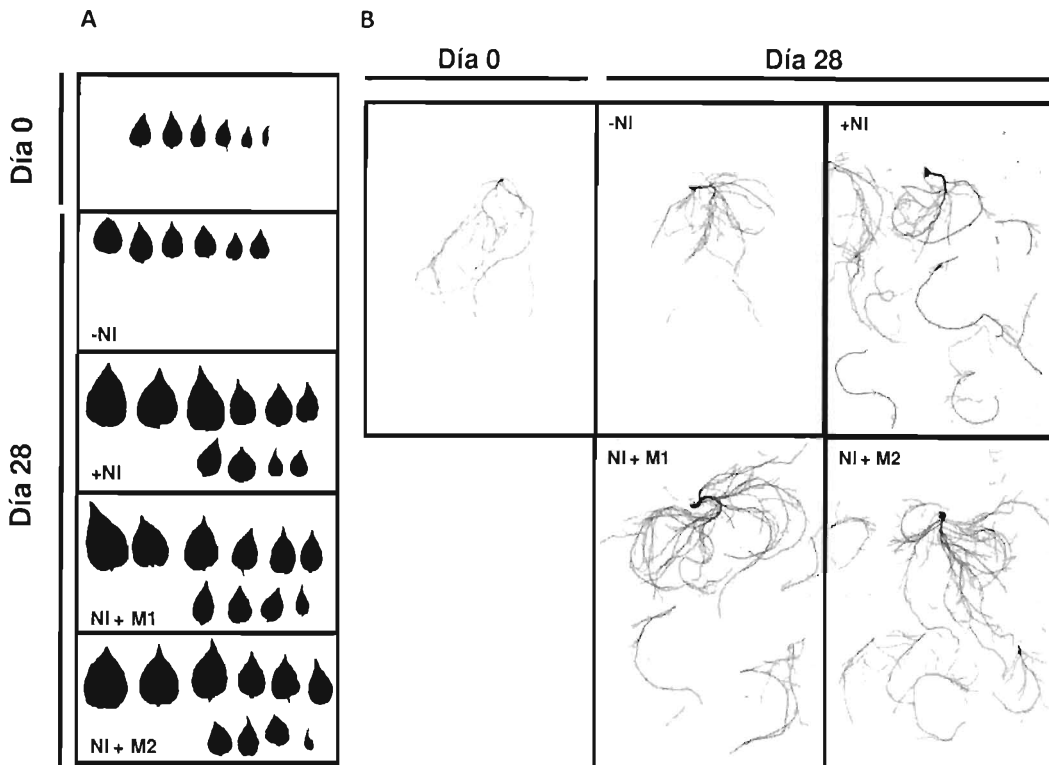


Figura 3.2 Diferencias morfológicas y de crecimiento entre plántulas de chile habanero de la variedad Séminis creciendo durante 28 días en diferentes condiciones de nitrógeno. Los tratamientos de N se describen en la Figura 3.1. Las imágenes representan las hojas (A) y el sistema radicular (B) de una plántula representativa de cinco por cada tratamiento, tomadas a los días 0 y 28 de tratamiento.

El crecimiento radicular como proceso que conlleva un costo energético, es dependiente de los carbohidratos sintetizados en la parte aérea. La capacidad fotosintética de la planta está directamente relacionada con el AF (Smeekens *et al.*, 2010; Hammond y White, 2011; Sairanen *et al.*, 2012). Debido a que el AF se modificó con los tratamientos de N, al igual que los tres parámetros evaluados de crecimiento radicular, se decidió evaluar las correlaciones entre los mismos. A partir de este estudio se obtuvieron R^2 igual a 0.74, 0.97 y 0.88 para el AF vs LRT ($y=0.115x-0.596$), el AF vs número de RL ($y=0.176x - 1.815$) y el AF vs AR ($y=2.473x - 0.272$), respectivamente. Estos resultados indicaron que la formación de nuevas RL fue el parámetro más correlacionado con el AF de la plántula en esta variedad.

La LRT está determinada por el número de RL y la elongación de las mismas y de la raíz primaria. A su vez, la LRT, así como otros parámetros que determinan la arquitectura radicular, tales como los pelos radiculares y el ángulo y distribución de RL, determinan el AR. Los resultados de correlación confirmaron estas afirmaciones, obteniéndose una alta correlación entre el AR y la LRT ($R^2=0.95$; $y=0.049x - 0.56$) y en menor medida entre el AR y el número de RL ($R^2=0.89$; $y=13.87x + 9.63$). La correlación entre la LRT y el número de RL fue menor a las anteriores ($R^2=0.79$; $y=0.66x + 5.75$), indicando que el aumento en la LRT no puede ser explicado solamente por la formación de nuevas RL, sino también por una mayor elongación de las mismas.

3.3.2 Variabilidad del efecto de las mezclas de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de plántulas de chile habanero dentro de la especie

Para conocer si los resultados obtenidos con las mezclas de los D-aminoácidos en la variedad Séminis podrían ser extrapolables a otras variedades dentro de la especie, el experimento anterior fue repetido usando dos variedades yucatecas de chile habanero: Mayan Chan y Mayan Ek. En esta ocasión, se analizaron los parámetros que tuvieron mayor variación en el experimento anterior, los cuales fueron AF, LRT, número de RL y AR.

En contraste con los datos obtenidos en la variedad Seminis, el AF para la variedad Mayan Chan se redujo aproximadamente 24% con los tratamientos que contenían las mezclas de los D-aminoácidos, comparadas con la que presentaban las plántulas que estuvieron en presencia únicamente de NI (Cuadro 3.2, Figura 3.3A). Sin embargo, ambas mezclas estimularon significativamente la LRT, el número de RL y el AR (Cuadro 3.2, Figura 3.3B). La LRT fue 76% y 51% mayor en las plántulas expuesta a NI + M1 o M2 de D-aminoácidos, respectivamente, comparadas con las expuestas únicamente a NI; mientras que ambas mezclas estimularon por igual el número de RL (120%) y el AR (30%) (Cuadro 3.2, Figura 3.3B).

En esta variedad, el AF no tuvo una gran correlación con la LRT ($R_2=0.45$), el número de RL ($R_2=0.48$) o el AR ($R_2=0.60$). Por otra parte, el AR nuevamente correlacionó en mayor medida con la LRT ($R_2=0.96$, $y=0.33x + 0.34$) y en menor con el número de RL ($R_2=0.82$,

$y=22.37x - 12.12$). La correlación entre la LRT y el número de RL fue ligeramente mayor ($R_2=0.85$, $y=0.78x - 8.07$) a la observada en la variedad Seminis.

Cuadro 3.2 Efecto de las mezclas de los D-aminoácidos sobre parámetros fisiológicos de crecimiento en la variedad Mayan Chan. Las plántulas fueron expuestas durante 28 días a los tratamientos de N descritos en la Figura 3.1. Los datos representan la media \pm error estándar ($n=5$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.005$).

Tratamiento	Área foliar (cm ²)	Longitud radicular total (cm)	No. de raíces laterales	Área radicular (cm ²)
-NI	6.51 \pm 0.47 (c)	151.54 \pm 7.11 (c)	79.5 \pm 4.92 (b)	5.33 \pm 0.19 (b)
+ NI	25.88 \pm 2.6 (a)	119.01 \pm 1.95 (d)	73.33 \pm 3.48 (b)	5.17 \pm 0.60 (b)
NI + M1	19.07 \pm 2.04 (b)	209.56 \pm 13.02(a)	150.67 \pm 7.69 (a)	6.90 \pm 0.59 (a)
NI + M2	19.90 \pm 0.41 (b)	180.41 \pm 8.12 (b)	172.33 \pm 8.37 (a)	6.58 \pm 0.33 (a)

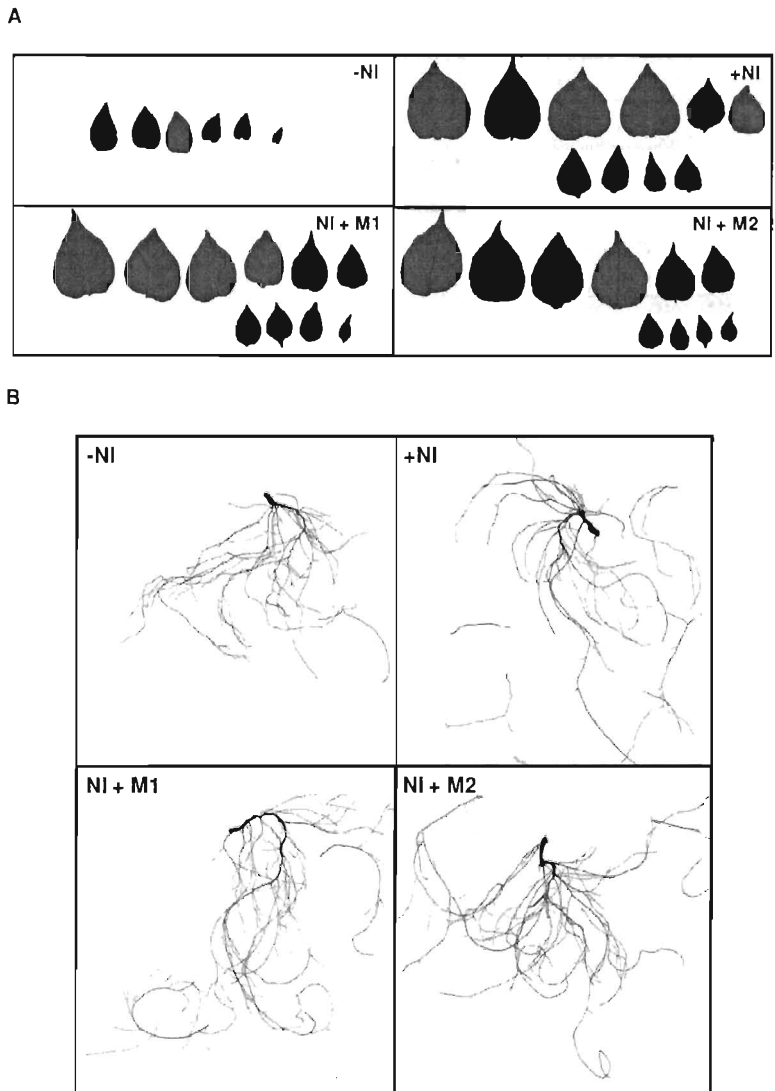


Figura 3.3 Diferencias morfológicas y de crecimiento entre plántulas de la variedad Mayan Chan creciendo durante 28 días en distintas condiciones de nitrógeno. Los tratamientos de N se describen en la Figura 3.1. Las imágenes representan las hojas (A) y el sistema radicular (B) de una plántula representativa de cinco por cada tratamiento, tomadas a los 28 días de tratamiento.

De manera similar a lo observado en la variedad Mayan Chan, la mezcla de los D-aminoácidos en conjunto con el N inorgánico disminuyó el AF significativamente (20%) en la variedad Mayan Ek, comparada con el tratamiento de N inorgánico (Cuadro 3.3, Figura

3.4A). Sin embargo, en cuanto al crecimiento radicular, la mezcla 2 de D-aminoácidos, compuesta por Val, Leu y Cys, fue la única capaz de estimular significativamente la LRT (22%), el número de RL (45%) y el AR(14%), con respecto a los valores obtenidos al usar N inorgánico como única fuente (Cuadro 3.3, Figura 3.4B). Al comparar los resultados obtenidos con la mezcla 1 de los D-aminoácidos y los del tratamiento con N inorgánico se observó que la presencia de esta fuente de N orgánica no modificó significativamente la LRT ni el número de RL, pero disminuyó el AR (Cuadro 3.3, Figura 3.4B).

Cuadro 3.3 Efecto de las mezclas de los D-aminoácidos sobre parámetros fisiológicos de crecimiento en la variedad Mayan Ek. Las plántulas fueron expuestas durante 28 días a los tratamientos de nitrógeno que se describieron en la Figura 3.1. Los datos representan la media \pm error estándar ($n=5$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.005$).

Tratamiento	Área foliar (cm ²)	Longitud radicular total (cm)	No. de raíces laterales	Área radicular (cm ²)
-NI	7.62 \pm 0.56 (c)	128.6 \pm 7.63 (c)	77 \pm 5 (c)	5.18 \pm 0.53 (d)
+ NI	26.39 \pm 1.07 (a)	199.42 \pm 16.03 (b)	116.33 \pm 12.13 (b)	10.26 \pm 0.43 (b)
NI + M1	19.99 \pm 0.96 (b)	208.62 \pm 1.14 (b)	105.67 \pm 2.67(b)	7.21 \pm 0.13 (c)
NI + M2	22.26 \pm 1.04 (b)	244.41 \pm 1.55 (a)	169 \pm 4.36 (a)	11.72 \pm 0.35 (a)

En cuanto a las correlaciones entre el AF y los parámetros de crecimiento radicular, éstas fueron muy similares a las obtenidas para la variedad Séminis; la mayor correlación se obtuvo con el número de RL ($R_2=0.90$, $y=0.11x - 1.79$), seguido del AR ($R_2=0.88$, $y=2.32x - 0.38$) y por último de la LRT ($R_2=0.76$, $y=0.16x + 0.55$). La correlación entre el AR y la LRT fue alta y similar a las otras dos variedades ($R_2=0.94$, $y=21.04x + 16.32$). En esta variedad se obtuvieron las correlaciones más altas entre el AR y el número de RL ($R_2=0.95$, $y=13.05x + 3.48$) y entre la LRT y el número de RL ($R_2=0.93$, $y=0.59x - 2.22$). Estos resultados indican que la formación de nuevas RL, más que la elongación radicular, es un proceso que contribuye de manera muy significativa en la LRT y el AR en esta variedad.

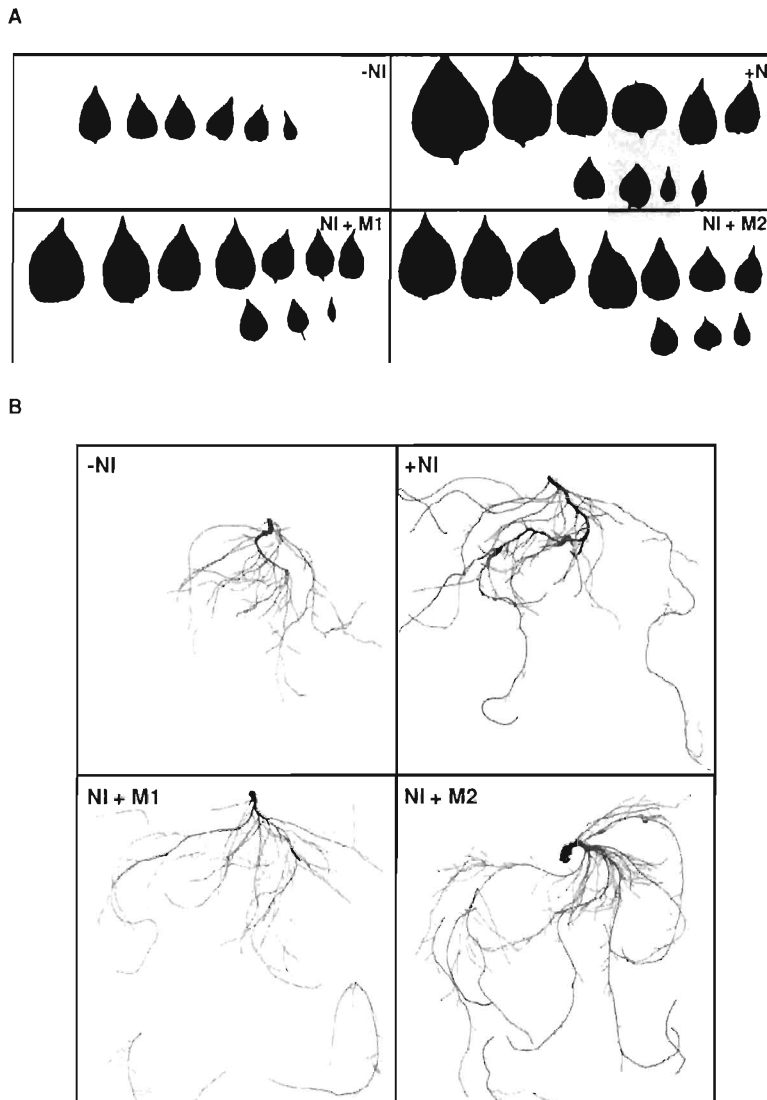


Figura 3.4 Diferencias morfológicas y de crecimiento en plántulas de la variedad Mayan Ek creciendo durante 28 en diferentes condiciones de nitrógeno. Los tratamientos de N se describen en la Figura 3.1. Las imágenes representan las hojas (A) y el sistema radicular (B) de una plántula representativa de cinco por cada tratamiento, tomadas a los 28 días de tratamiento.

3.3.3 Efecto de la aplicación de las mezclas de D-aminoácidos sobre la concentración endógena de metabolitos nitrogenados

Para determinar el efecto de los tratamientos de N sobre algunos componentes del metabolismo nitrogenado de la planta, se evaluaron los niveles de nitrato, aminoácidos y proteínas en las hojas y las raíces de las plántulas. Las determinaciones se hicieron en la variedad Seminis a los 28 días de tratamiento.

Como se puede observar en la Figura 3.5, el contenido de los metabolitos nitrogenados fue significativamente menor en las hojas y raíces de aquellas plántulas que crecieron en ausencia de una fuente de N (-N), comparado con las que lo hicieron en presencia de alguna fuente de N (+NI, NI + M1 y NI + M2).

De manera general, el contenido de nitrato fue siempre menor en las raíces que en las hojas, independientemente del tratamiento de N (Figura 3.5A). La mezcla 1 de D-aminoácidos no produjo un cambio significativo en este metabolito comparado con el tratamiento de N inorgánico, en ninguno de los órganos evaluados. Sin embargo, la mezcla 2 de D-aminoácidos aumentó la concentración de nitrato en un 54% y 8.7% en las raíces y hojas, respectivamente, con respecto a la presentada en las plántulas en presencia de N inorgánico (Figura 3.5A). Al igual que lo sucedido con el nitrato, la concentración de aminoácidos no varió en aquellas plántulas que estuvieron expuestas a la mezcla 1 de los D-aminoácidos, comparadas con las de N inorgánico. Sin embargo, la mezcla 2 aumentó en un 17% la concentración de estos metabolitos en las raíces, no así en las hojas (Figura 3.5B). El comportamiento en el contenido de proteínas en respuesta a los tratamientos de N fue similar al producido en el contenido de nitrato; esto fue, la mezcla 2 provocó un aumento de 65% y 20% en la concentración de proteína en la raíz y las hojas, respectivamente (Figura 3.5C).

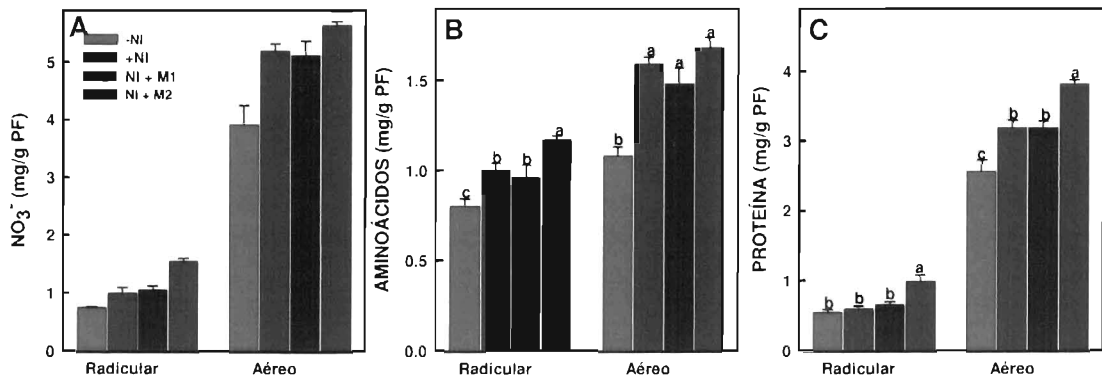


Figura 3.2 Efecto de tratamientos de nitrógeno sobre los niveles de nitrato, aminoácidos totales y proteínas totales en plántulas de chile habanero de la variedad Séminis. Las plántulas fueron sometidas a los tratamientos de nitrógeno que se describen en la Figura 3.1 y el contenido de nitrato (A), aminoácidos (B) y proteínas totales (C) fueron evaluados en las raíces y hojas a los 28 días de tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar ($n=6$). Las letras representan las diferencias significativas entre tratamiento ($P<0.05$).

3.3.4 Efecto de D-aminoácidos individuales sobre el crecimiento y el contenido de metabolitos nitrogenados de plántulas de chile habanero en condiciones de hidroponía

Los resultados de este experimento se expresaron como porcentaje con respecto al testigo creciendo en presencia de N inorgánico (NI), lo cual permite identificar claramente la contribución de cada D-aminoácido a la estimulación provocada por la mezcla de los mismos sobre los parámetros de crecimiento. Además, aunque las plántulas fueron tratadas de igual manera a los experimentos anteriores, en este experimento éstas presentaron una variación de aproximadamente 20% en los valores de crecimiento de la parte aérea y radicular a los 45 días de crecimiento (día 0 de tratamiento), debido fundamentalmente a la variación biológica entre lotes de semillas, las cuales no son certificadas.

Como se puede observar los porcentajes de estimulación en el AF, la LRT, el número de RL y el AR provocados por la adición de la mezcla 2 con relación a su testigo en presencia de N inorgánico fueron similares a los obtenidos en los experimentos previos (Cuadro 3.4, Cuadro 3.1).

La D-Val fue el único aminoácido que estimuló significativamente el AF de las plántulas cuando fue aplicado individualmente y la estimulación alcanzó valores similares a la provocada por la mezcla 2 (Cuadro 3.4, Figura 3.6A). Este resultado indica que es este D-aminoácido el responsable del efecto observado para la mezcla. Por otro lado, los tres D-aminoácidos indujeron, de manera individual, una estimulación significativa en la LRT, siendo la D-Leu el que más aportó a esta estimulación, seguido por la D-Val y la D-Cys (Cuadro 3.4, Figura 3.6B). Los resultados sugieren una sinergia entre los D-aminoácidos para provocar el efecto máximo sobre la LRT. Sin embargo, únicamente la D-Leu estimuló significativamente la formación de RL y esta estimulación fue mayor a la observada cuando se aplicó la mezcla de D-aminoácidos (Cuadro 3.4, Figura 3.6B). En cuanto al AR, tanto la D-Val como la D-Leu estimularon significativamente este parámetro, siendo este último el más efectivo (Cuadro 3.4, Figura 3.6A).

Cuadro 3.4 Efecto de diferentes condiciones de nitrógeno sobre algunos parámetros de crecimiento aéreo y radicular de chile habanero, variedad Seminis, creciendo en condiciones de hidroponía. Las plántulas de chile habanero fueron expuestas durante 28 días a los siguientes tratamientos de nitrógeno: **NI + M2**, 1 mM de KNO_3 + 0.3 mM de la mezcla 2 de D-aminoácidos, cada uno a 0.1 mM (D-Val, D-Leu, D-Cys); **NI+ D-Val**, 1 mM KNO_3 + 0.1 mM de D-Val; **NI + D-Leu**, 1 mM KNO_3 + 0.1 mM de D-Leu; **NI + D-Cys**, 1 mM KNO_3 + 0.1 mM de D-Cys. Los datos están expresados como porcentajes con respecto al tratamiento **+NI** (1 mM KNO_3 + 0.1 mM NH_4Cl). Los datos representan la media \pm error estándar ($n=10$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.005$).

Tratamiento	Área foliar	Longitud radicular Total	No. de raíces laterales	Área radicular
NI + M2	*16 \pm 2.81 (a)	*62 \pm 3.4 (a)	*11 \pm 4.41 (b)	*59 \pm 3.63 (b)
NI + D-Val	*18 \pm 2.44 (a)	*19 \pm 3.25 (c)	6 \pm 4.6 (b)	*12 \pm 2.68 (c)
NI + D-Leu	8 \pm 2.13 (b)	*31 \pm 4.75 (b)	*27 \pm 5.32 (a)	*32 \pm 6.06 (a)
NI + D-Cys	3 \pm 3.62 (c)	*12 \pm 4.84 (c)	4 \pm 5.07 (c)	5 \pm 4.02 (c)

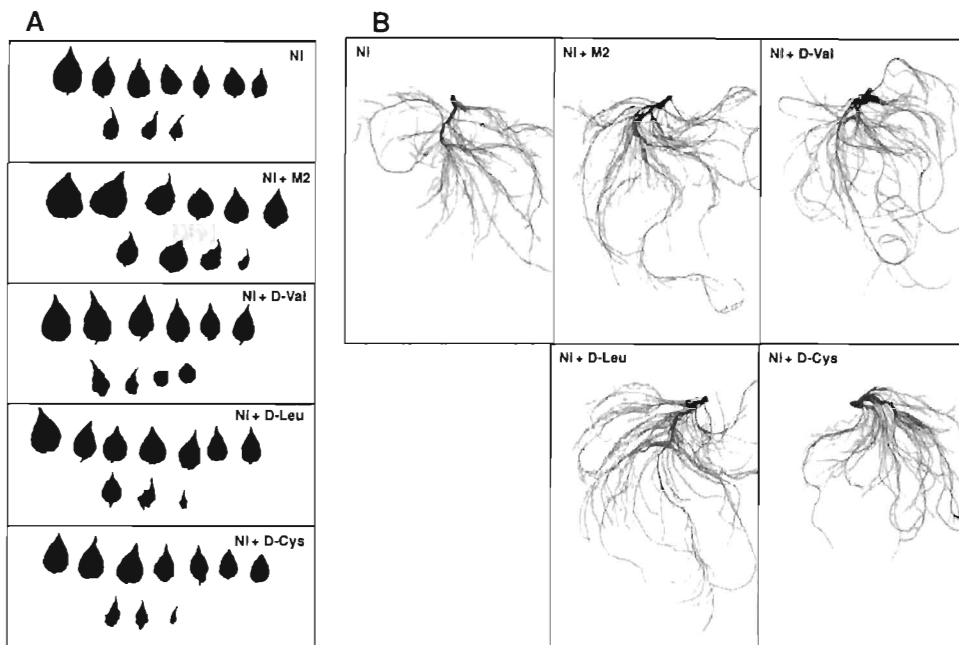


Figura 3.3 Diferencias morfológicas y de crecimiento entre plántulas de chile habanero de la variedad Seminis creciendo durante 28 días en los tratamientos de nitrógeno descritos en el Cuadro 3.4. Las imágenes representan las hojas (A) y el sistema radicular (B) de una plántula representativa de diez por cada tratamiento.

3.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se abordó el efecto de los D-aminoácidos sobre parámetros de crecimiento durante tratamientos largos de 28 días. Los D-aminoácidos pueden estar presentes en el suelo a diferentes concentraciones dependiendo del tipo de D-aminoácido, el tipo de suelo, las condiciones ambientales, etc. (Vranova *et al.*, 2012; Friedman, 1999; Jones y Darrah, 1994). La D-Ala, la D-Ser y el D-Asp son aminoácidos con mayor probabilidad de encontrarlos en el suelo, ya que forman parte de los microorganismos, de la materia orgánica como heces fecales, de la biomasa eucariótica, etc. (Amelung *et al.*, 2006; Frohlich y Wells, 2001). En este trabajo, se analizó el efecto

CAPÍTULO III

que estos aminoácidos, aplicados en forma de mezcla, pudieran tener sobre el crecimiento de chile habanero.

De los resultados obtenidos, se observó que la mezcla de estos D-aminoácidos puede inducir la proliferación radicular dependiendo de la variedad de chile habanero estudiada y en algunos casos, la formación de nuevas RL o la elongación de la misma y, de esta manera, aumentando el AR. Esta mezcla no tuvo un efecto significativo sobre el contenido endógeno de algunos metabolitos nitrogenados.

El modelo *in vitro* permitió observar cambios particulares en la RP de chile habanero inducidos por la aplicación de los D-aminoácidos, los cuales en la mayoría de los casos provocaron una inhibición en su crecimiento. Sin embargo, también fue posible observar cambios favorables sobre parámetros de crecimiento importantes para la absorción de nutrimentos en el suelo, como la generación de RL y pelos radiculares resultado de la aplicación de los D-aminoácidos Leu y Cys, respectivamente o una estrategia de detención temporal y posterior incremento en la velocidad de crecimiento de la RP, como ocurrió con la D-Val.

Por lo tanto, en este estudio también se evaluó el efecto de la D-Val, D-Leu y D-Cys sobre el crecimiento. Estos tres aminoácidos provocaron cambios significativos sobre el chile habanero que pudieran tener un impacto sobre la nutrición vegetal. Estos D-aminoácidos indujeron una gran proliferación radicular, efecto que fue general para las variedades estudiadas, aunque de magnitudes diferentes entre éstas. Además, esta mezcla aumentó significativamente los niveles endógenos de algunos metabolitos nitrogenados. Hasta el momento no existen reportes que indiquen el efecto fisiológico y bioquímico provocado por estos aminoácidos en otra especie vegetal. Se sabe que la mayoría de ellos inhibe el crecimiento de plántulas *in vitro* de *Arabidopsis* en diferentes grados (Gördes *et al.*, 2011; Forsum *et al.*, 2008). La D-Val no afecta el crecimiento de las raíces en *Arabidopsis*, en comparación con su estereoisómero (Forsum *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha reportado que en cultivos celulares de tabaco, la D-Cys no inhibe la toma de sulfato (Hart y Filner, 1969).

En este trabajo las plántulas únicamente se expusieron a 0.1 mM del D-aminoácido y en presencia de una cantidad significativa de N inorgánico (1 mM KNO₃). Por esta razón, se sugiere que los efectos de los D-aminoácidos observados en este trabajo, no son por el uso de estos compuestos como una fuente de N alterna para la nutrición de la planta. Sin embargo, éstos pudieran estar afectando parámetros fisiológicos, como se ha visto en el caso del D-Trp que puede ser convertido por los microorganismos del suelo a ácido indolacético y así influenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Martens y Frankenberger, 1993). Además, los D-aminoácidos conjugados con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético estimulan la elongación de coleoptilos en *Avena sativa* L. var Mariner y en los tejidos de soya (Davidonis *et al.*, 1982). En algodón se ha visto que promueven la abscisión de pétalos, así como la producción de etileno en tejidos axial y cotiledonar de plántulas de *Xantium pennsylvanicum* (Valdovinnos y Muir, 1965). La D-Val a altas concentraciones es tóxica para algunas bacterias; sin embargo, muchas enterobacterias son resistentes a ésta, sugiriendo su importancia para la colonización de un nicho ecológico (Valle *et al.*, 2008).

La rizósfera está ricamente poblada por microorganismos que subsisten con compuestos liberados de las raíces de las plantas y éstos, a su vez, pueden mejorar la absorción de nutrimentos por las raíces (Lugtenberg y Kamilova, 2009). De igual manera, los D-aminoácidos pueden ser tomados de la rizósfera por las plantas (Staswick, 2009).

En resumen, a partir de estos resultados se sugiere la importancia del modelo *in vitro* de cajas de Petri para detectar compuestos que pudieran tener efectos en el desarrollo posterior de la planta. En el suelo, estos aminoácidos se encuentran presentes debido a la existencia de microorganismos como *Bacillus subtilis* brevis, antibióticos o fertilizantes como el fluvalinato, que contiene un 23.3% de D-Val (Vranova *et al.*, 2012).

Por otro lado, en las variedades yucatecas Mayan Chan y Mayan Ek, la mezcla dos de estos D-aminoácidos no fue capaz de aumentar el AF a diferencia de lo que ocurre con la variedad Seminis. Los resultados sugieren que aunque la proliferación radicular es un efecto generalizado provocado por esta mezcla, el mecanismo por el cual las plantas adquieren la energía requerida para este crecimiento radicular puede ser diferente para cada variedad. Por ejemplo, en la variedad Seminis una mayor AF puede traducirse en

CAPÍTULO III

una mayor capacidad fotosintética y en consecuencia, en una mayor cantidad de carbohidratos sintetizados de novo que sean utilizados como fuente de energía para los procesos de crecimiento radicular. Sin embargo, en las variedades yucatecas un menor crecimiento en la parte aérea en función del AF podrá indicar una mayor translocación de carbohidratos hacia la raíz, como un mecanismo de compensación que permita un mayor crecimiento radicular. Estos cambios en la partición de biomasa en la planta en respuesta a diferentes fuentes de N ya han sido reportados previamente (Lonhienne *et al.*, 2014; Cambui *et al.*, 2011)

Cuando las variedades Mayan Chan, Mayan Ek y Seminis fueron sometidas a un déficit de N inorgánico durante 10 días, se observó que la variedad Mayan Ek pudo removilizar el N endógeno lo cual permitió tener mayor crecimiento en estas condiciones en comparación de las otras variedades (Santiago-Antonio *et al.*, 2014). Este trabajo confirma que estas variedades de chile habanero pueden presentar estrategias diferentes cuando son sometidas a distintas condiciones de N.

Cuando los D-aminoácidos fueron aplicados en forma individual, se observó que la D-Val y D-Leu fueron los aminoácidos responsables de los mayores efectos inducidos por la mezcla. Sin embargo, el efecto fue diferencial, siendo la D-Val más efectiva para inducir cambios en la parte aérea (aumento en el AF), mientras que la D-Leu lo fue para la proliferación radicular. Estos resultados sugieren que la D-Val y D-Leu pueden actuar mediante mecanismos diferentes, haciendo que las plantas de chile habanero sean más eficientes en el crecimiento, aún en presencia de una misma cantidad de N.

No hay estudios anteriores que demuestren el efecto ocasionado por la D-Val sobre el crecimiento radicular, pero con el NO_3^- se ha demostrado que esta fuente inorgánica de N induce el crecimiento radicular en *Arabidopsis*, actuando como una molécula señal que estimula la síntesis de citocininas en la raíz, las cuales se translocan hacia la parte aérea, induciendo la expansión en el área foliar (Sairanen *et al.*, 2012). El papel de la D-Val como un inductor de la síntesis de citocininas u otro fitoregulador o molécula señal que provocara este efecto en la parte aérea tendría que ser estudiado.

Hasta el momento, no existen reportes del efecto de la D-Leu sobre el crecimiento radicular, como el observado para chile habanero. La D-Leu podría estar actuando directamente para producir esta proliferación radicular, ya sea como señal que involucre o no cambios en fitoreguladores con un papel bien establecido en el proceso de formación de RL, tales como las auxinas. No se puede descartar una vía indirecta, por ejemplo favoreciendo la asociación con microorganismos que induzcan estos cambios en la raíz. Cambios en los microorganismos de la rizosfera en respuesta a la presencia de aminoácidos ya han sido previamente reportados (Leiman *et al.*, 2013; Moe, 2013; Hopkins *et al.*, 1996). La manera cómo este aminoácido puede modificar el crecimiento radicular deberá ser abordada en estudios posteriores.

Las mezclas de D-aminoácidos mejoran el crecimiento de las plántulas, aún estando en presencia de la misma cantidad de N inorgánico. También, estos cambios inducidos por los D-aminoácidos pudieran ser importantes en otros procesos tales como respuestas a estrés, por ejemplo déficit de nutrimentos, estrés hídrico, estrés salino, entre otros.

3.5 CONCLUSIONES

La mezcla dos de los D-aminoácidos (D-Val, D-Leu, D-Cys) produjo un mayor incremento del AF y AR, número de RL y LRT de las plántulas, en comparación con las tratadas únicamente con fuentes de N inorgánicas.

El contenido de metabolitos nitrogenados en las raíces y las hojas de las plántulas fue mayor con la mezcla dos de los D-aminoácidos.

En las plántulas tratadas con D-Val se observó un incremento en el área foliar, mientras que en las tratadas con D-Leu se indujeron cambios significativos en los parámetros fisiológicos en la parte radicular.

BIBLIOGRAFÍA

- Amelung, W. y X. Zhang (2006). Determination of amino acid enantiomers in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 553-562.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cambui, C.A., H. Svennerstam, L. Gruffman, A. Nordin, U. Ganeteg y T. Nasholm (2011). Patterns of plant biomass partitioning depend on nitrogen source. *PloS ONE*, 6, 1-7.
- Cawse, P.A. (1967). The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, 92, 311-315.
- Davidonis, G.H., R.H. Hamilton, R.P. Vallejo, R. Buly y R.O. Mumma (1982). Biological properties D-amino acid conjugates of 2, 4-D. *Plant physiology*, 70, 357-360.
- Forsum, O., H. Svennerstam, U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179, 1058-1069.
- Friedman, M. (1999). Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3457-3479.
- Frink, C., P. Waggoner y J. Ausubel (1999). Nitrogen fertilizer: Restrospect and prospect. *Proceedings of the national academy of sciences*, 96, 1175-1180.
- Frohlich, D.R. y M.A. Wells (2001). Peptide amphipathy: a new strategy in design of potential insecticides. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37, 2-6.

- Gördes, D., Ü. Kolukisaoglu y K. Thurow (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 40, 553-563.
- Hart, J.W. y P. Filner (1969). Regulation of sulfate uptake by amino acids in cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 44, 1253-1259.
- Hopkins, D.W., R.W. O'Dowd y R.S. Shiel (1996). Comparison of D- and L-amino acid metabolism in soil with differing microbial biomass and activity. *Soil biology and biochemistry*, 29, 23-29.
- Jämtgård, S., T. Näsholm y K. Huss-Danell (2008). Characteristics of amino acid uptake in barley. *Plant Soil*, 302, 221-231.
- Jones, D.L. y P.R. Darrah (1994). Amino acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 163, 1-12.
- Kielland, K., J.W. McFarland, R.W. Ruess y K. Olson (2007). Rapid cycling of organic nitrogen in taiga forest ecosystems. *Ecosystems*, 10, 360-368.
- Leiman, S.A., J.M. May, M.D. Lebar, D. Kahne, R. Kolter y R. Losick (2013). D-amino acids indirectly inhibit Biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 195, 5391-5395.
- Lonhienne, T., Y. Trusov, A. Young, D. Rentsch, T. Näsholm, S. Schmidt y C. Paungfoo-Lonhienne (2014). Effects of externally supplied protein on root morphology and biomass allocation in *Arabidopsis*. *Nature*, 4, 1-8, DOI: 10.1038.
- Lugtenberg, B. y F. Kamilova (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *The annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Martens, D.A. y W.T. Frankenber (1993). Metabolism of tryptophan in soil. *Soil biology and biochemistry*, 12, 1679-1687.

- Moe, L.A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 9, 1692-1705.
- Persson, J. y T. Näsholm (2001). Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. *Ecology Letters*, 4, 434-438.
- Richard-Molard, C., A. Krapp, F. Brun, B. Ney, F. Daniel-Vedele y S. Chaillou (2008). Plant response to nitrate starvation is determinate by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 59, 779-791.
- Sairanen, I., O. Novák, A. Pěncík, Y. Ikeda, B. Jones, G. Sandberg y K. Ljung (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 24, 4907-4916.
- Santiago Antonio, G., M.G. Lizama Gasca, M. Carrillo-Pech e I. Echevarría Machado (2014). Natural variation response to nitrate starvation among varieties of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Australian Journal of Crop Science*, 523-535.
- Staswick, P.E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiology*, 150, 1310-1321.
- Valdovinos, J.G. y R.M. Muir (1965). Effects of D and L amino acids on foliar abscission. *Plant Physiology*, 40,335-340.
- Valle, J., S. Da Re, S. Schmid, D. Skurnik, R. D'Ari y J.M. Ghigo (2008). The amino acid Valine is secreted in continuous-Flow bacterial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 190, 264-274.
- Virtanen, A.I. y H. Linkola (1946). Organic nitrogen compounds as nitrogen nutrition for

higher plants. *Nature*, 12, 158-515.

Vranova, V., H. Zahradnickova, D. Janous, K.R. Skene, A.S. Matharu, K. Rejseky P. Formanek (2012). The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps. *Plant Soil*, 354, 21-39.

Yemm, E.W. y E.C. Cocking (1955). The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, 80, 209-214.

Zhang, X., H. He y W. Amelung (2007). A GC/MS method for the assessment of ^{15}N and ^{13}C incorporation into soil amino acid enantiomers. *Soil biology and biochemistry*, 39, 2785-2796.

CAPÍTULO IV

TOMA DE D-AMINOÁCIDOS POR LAS RAÍCES DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO

4.1 INTRODUCCIÓN

El N es uno de los nutrimentos más importantes que está presente en los suelos y es un factor que limita el crecimiento de los cultivos (Schimel y Bennett, 2004). Existe mucha información acerca de la capacidad de las plantas para adquirir este N de los suelos como nitrato y amonio; sin embargo, en el suelo también podemos encontrar formas orgánicas, como los aminoácidos (Jones *et al.*, 2005; Schmidt y Stewart, 1997).

Diversos estudios han demostrado que todos los suelos contienen aminoácidos (Kranabetter *et al.*, 2007; Kielland *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2005; Raab *et al.*, 1996), pero su concentración varía entre los ecosistemas, encontrándose normalmente entre 0.01-10 μM (Jones *et al.*, 2005; Raab *et al.*, 1996), y en lugares que son ricos en materia orgánica en descomposición pueden alcanzar niveles milimolares (Öhlund y Näsholm, 2004). Aunque sus concentraciones son bajas, su alta velocidad de conversión sugiere que son una fuente de N importante en algunos ecosistemas (Jones y Kielland, 2002). Además de los L-aminoácidos, también se pueden encontrar los D-aminoácidos en los suelos, los cuales están presentes a menores concentraciones (Svennerstam *et al.*, 2007; Hopkins y Ferguson, 1994).

Para poder absorber los aminoácidos, las plantas tienen transportadores que están involucrados en su toma en las raíces (Svennerstam, 2008; Lee *et al.*, 2007; Hirner *et al.*, 2006; Persson y Näsholm, 2003), y se ha reportado que estas proteínas no discriminan entre los estereoisómeros L y D (Svennerstam, 2008). La toma de los aminoácidos por las raíces es un paso importante en la nutrición de las plantas (Jämtgård *et al.*, 2008), siendo la de los L-aminoácidos la más estudiada. Sin embargo, como se describió arriba y en otros trabajos, las raíces de las plantas también pueden absorber D-aminoácidos (Svennerstam *et al.*, 2007; Hopkins y Ferguson, 1994), pero tienen una baja capacidad para metabolizarlos, siendo ésta la causa de su toxicidad propuesta (Aldag y Young, 1970).

El objetivo de este capítulo fue estudiar la toma de los D-aminoácidos por las raíces de las plántulas de chile habanero, con el fin de determinar si estos aminoácidos son absorbidos por las raíces, para explicar su efecto sobre el crecimiento. Para esto se estableció la metodología de la detección y cuantificación de los D-aminoácidos por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Establecimiento de la metodología para la determinación de los D-aminoácidos

La detección de los D-aminoácidos se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), tomando como base la metodología propuesta por Cho *et al.* (2011). Estos autores utilizaron la columna quiral ChiroSil® RCA (+), de 15cm x 4.6 mm y de un tamaño de partícula de 5µm, preparada con un selector quiral de (+)-(18-crown-6)-ácido tetracarboxílico y las siguientes condiciones de corrida: fase móvil 70:30 v/v, MeOH/H₂O + 0.005 g/ml H₃PO₄, una velocidad de flujo de 0.8 ml/min y para la detección una longitud de onda UV de 210 nm. Usando estas condiciones, los autores reportaron una buena separación para los aminoácidos L-D-Phe, L/D-Met, L/D-His y L-D/Trp.

En este trabajo se establecieron las condiciones óptimas para la detección de los L/D aminoácidos de interés, ajustando parámetros como el tipo del ácido, la relación MeOH/H₂O y la velocidad de flujo de la fase móvil (Cuadro 4.1). La detección se realizó en todos los casos a una longitud de onda de 210 nm. Todos los análisis fueron desarrollados en el equipo Agilent Technologies Series 1200, con detector de arreglo de diodos. Se utilizó la misma columna ChiroSil RCA (+) usada por Cho *et al.* (2011).

Cuadro 4.1 Modificaciones realizadas a la metodología propuesta por Cho *et al.* (2011).

Pruebas	Fase móvil	Condiciones de corrida
Ácido	80:20 MeOH/H ₂ O + 0.005 g/100 ml de H ₂ SO ₄ , HClO ₄ ó H ₃ PO ₄	0.8 ml/min a 35 °C
Relación MeOH/ H₂O	50:50, 60:40 y 80:20 MeOH/H ₂ O + 0.005 g/100 ml de H ₃ PO ₄	0.8 ml/min a 35 °C
Velocidad de flujo	60:40 MeOH/H ₂ O + 0.005 g/100 ml de H ₃ PO ₄	0.5, 0.8 y 1 ml/min a 35 °C

La curva de calibración se realizó utilizando los estándares D-Val, D-Leu, D-Glu y D-Asp (Sigma Aldrich), los cuales fueron disueltos en la fase móvil. Las concentraciones que se emplearon fueron: 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM y 5 mM e fueron inyectados en un volumen de 40 µl.

También, se hicieron aplicaciones de ambos estereoisómeros, separados o mezclados, de cada aminoácido.

4.2.2 Toma de D-aminoácidos

Para estudiar la capacidad de toma de los D-aminoácidos por las raíces de chile habanero, se utilizaron plántulas de 45 días de la variedad Seminis, que habían estado creciendo en condiciones de hidroponía, como se describió en Materiales y Métodos del Capítulo III (sección 3.2.2.1). Para este experimento, se ensayaron los D-aminoácidos Val y Leu, ya que fueron los que provocaron mayores efectos sobre el crecimiento de las plántulas (ver resultados del Capítulo III).

Se colocaron las plántulas en un frasco que contenía 10 ml de la solución Hoagland a la mitad de su fuerza iónica más 1 mM del D-aminoácido (D-Leu ó D-Val) durante 0, 1, 2, 4 y 6 horas. Se usaron tres frascos, con tres plántulas por cada tiempo de muestreo. La solución de toma contenía 1 mM KNO₃, medio similar al experimento en hidroponía. El

medio fue liofilizado y disuelto en 0.5 mL de la fase móvil para su evaluación de la presencia del D-aminoácido por HPLC. Este experimento fue repetido dos veces.

Para la cuantificación, se realizó la curva de calibración con los estándares de D-Val y D-Leu, los cuales fueron disueltos en la misma solución de toma, usando las concentraciones 0.1 mM, 0.5 mM, 0.75 mM y 1 mM. De igual manera, esta solución fue liofilizada y disuelta en 0.5 mL de la fase móvil.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Estandarización de la detección de los D-aminoácidos por HPLC

Para establecer las condiciones adecuadas para la detección y separación de los D-aminoácidos por HPLC, se probaron diferentes modificadores ácidos en la fase móvil, como fueron: el ácido fosfórico (H_3PO_4), el ácido perclórico (HClO_4) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4), así como diferentes proporciones de MeOH/ H_2O y condiciones de velocidad de flujo.

En la Figura 4.1, se presentan los cromatogramas obtenidos para los D-aminoácidos D-Val (Figura 4.1 A, E, I), D-Leu (Figura 4.1B, F, J), D-Glu (Figura 4.1C, G, K) y D-Cys (Figura 4.1D, H, L) con los diferentes tipos de ácidos en la fase móvil. Como se muestra, se logró detectarlos con los tres ácidos ensayados, pero la altura y el ancho del pico fue dependiente del tipo de ácido utilizado en la fase móvil. A excepción del D-Glu (Figura 4.1 C), los D-aminoácidos eluidos con el ácido fosfórico (4.1 A-D) en la fase móvil, presentaron una altura y ancho de pico óptimas para permitir su mejor detección. En los cromatogramas correspondientes al ácido perclórico (4.1 E- H) y el ácido sulfúrico (4.1 I- L), se observa una altura del pico menor a la obtenida con el ácido fosfórico, además de una línea de corrida del disolvente irregular.

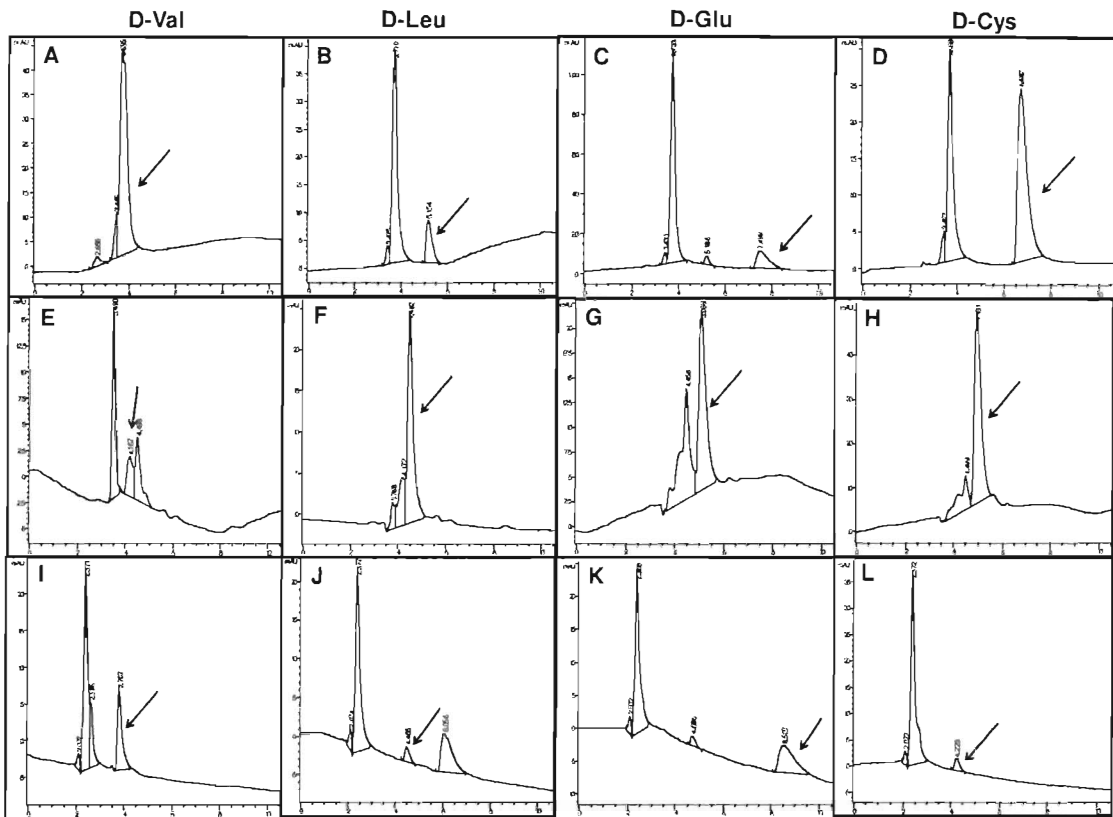


Figura 4.1 Cromatogramas de los D-aminoácidos obtenidos con los diferentes modificadores ácidos [0.005 g/100 ml]. Como fase móvil, se usó 80:20 MeOH/H₂O y una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. Los ácidos evaluados fueron el ácido fosfórico (A- D), el ácido perclórico (E- H) y el ácido sulfúrico (I- L). Los D-aminoácidos probados fueron 1 mM D-Val (A, E, I), 1mM D-Leu (B, F, J), 1 mM D-Glu (C, G, K) y 1 mM D-Cys (D, H, L).

A partir de estos resultados, se seleccionó al ácido fosfórico como el ácido componente de la fase móvil para las siguientes estandarizaciones. En la Figura 4.2 se observan los cromatogramas obtenidos para la relación MeOH/H₂O 50:50 (A-D), 60:40 (E-H) y 80:20 (I- L). En los cromatogramas de la Figura 4.2 A-D (relación 50:50), no se dio una elución correcta de los D-aminoácidos, puesto que se observó la aparición de varios picos que

CAPÍTULO IV

impedían distinguir cuál correspondía al tiempo de retención del D-aminoácido, no así con las otras dos relaciones de MeOH/H₂O evaluadas.

En la relación 80:20 (Figura 4.2 E-H), se observan los picos definidos para el respectivo D-aminoácido, pero estos se presentaban poco definidos (picos ancho y bajos), mientras que para la proporción 60:40 MeOH/H₂O, se aprecia una buena separación de los D-aminoácidos con picos más definidos (menor ancho de pico y mayor altura). Sin embargo, no se logró eluir a la D-Cys en esta relación, como se observa en la Figura 4.2H, donde se observaron otros picos que no correspondieron al tiempo de retención del D-aminoácido (6.680 min).

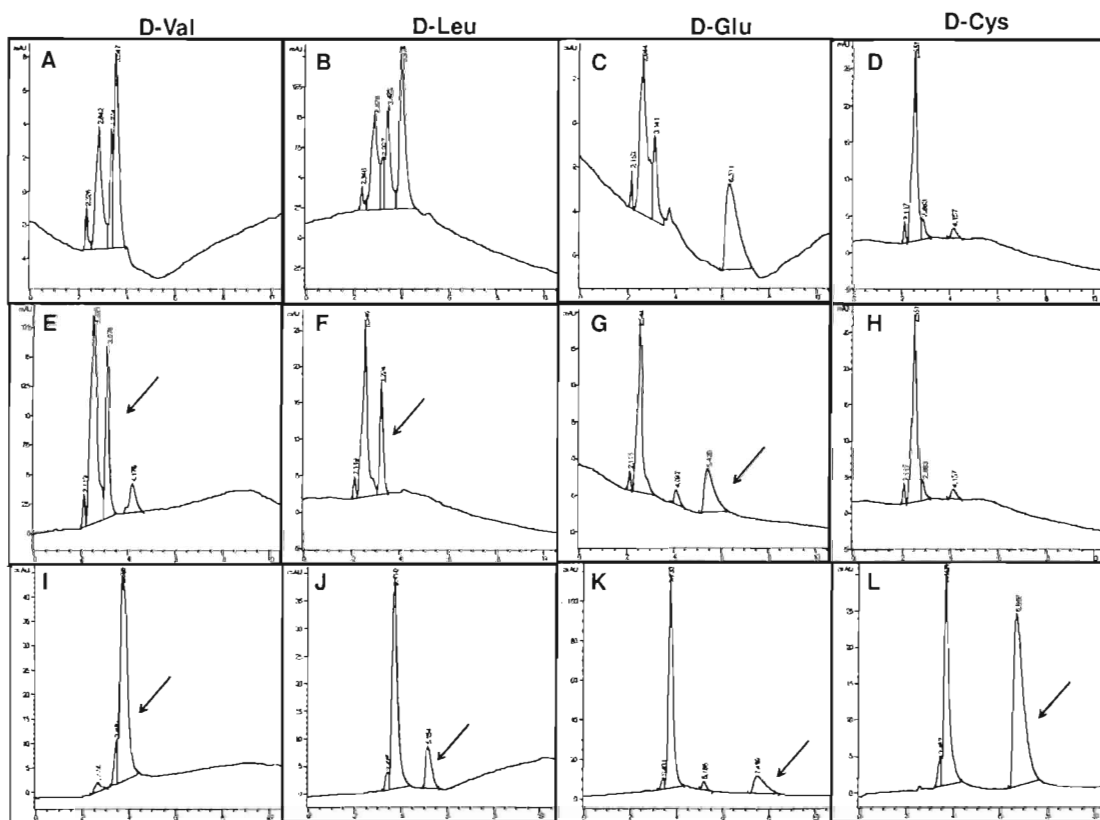


Figura 4.2 Cromatogramas de los D-aminoácidos obtenidos con las diferentes relaciones de MeOH/H₂O con 0.005 g/100ml de H₃PO₄, a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. Las proporciones evaluados fueron 50:50 (A-D), 60:40 (E-H) y 80:20 (I-L). Los D-aminoácidos probados fueron 1 mM D-Val (A, E, I), 1mM D-Leu (B, F, J), 1 mM D-Glu (C, G, K) y 1 mM D-Cys (D, H, L).

El tercer parámetro que se estandarizó fue la velocidad de flujo (Figura 4.3). La elución de los D-aminoácidos únicamente se llevó a cabo a un flujo de 0.8 ml/min (Figura 4.3 E-H), debido a que a otras velocidades [0.5 ml/min (Figura 4.3 A-D) y 1 ml/min (Figura 4.3 I-L)] no ocurrió una buena separación de los D-aminoácidos.

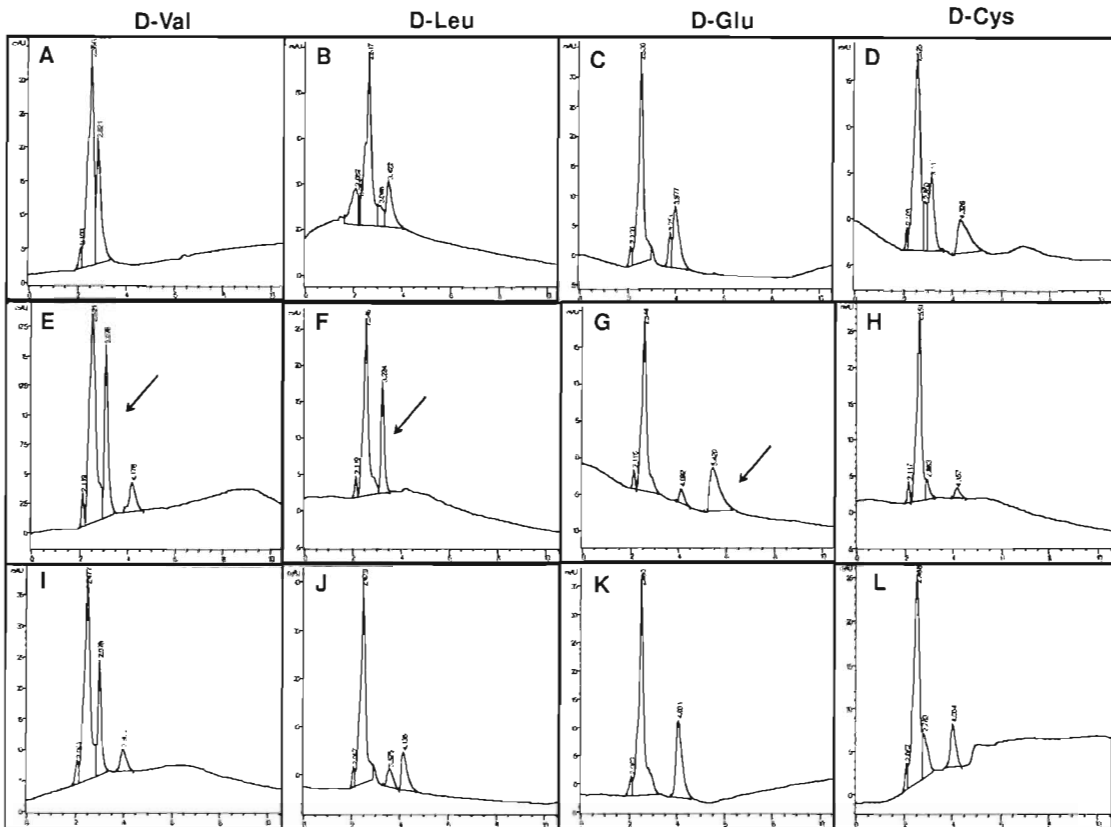


Figura 4.3 Cromatogramas de los D-aminoácidos obtenidos con las diferentes velocidades de flujo en una fase móvil 60:40 MeOH/H₂O con 0.005 g/100ml de H₃PO₄, a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. Las velocidades de flujo evaluados fueron 0.5 ml/min (A- D), 0.8 ml/min (E- H) y 2 ml/min (I- L). Los D-aminoácidos probados fueron 1 mM D-Val (A, E, I), 1mM D-Leu (B, F, J), 1 mM D-Glu (C, G, K) y 1 mM D-Cys (D, H, L).

Con base en estos datos, se determinó que los mejores parámetros para la detección y separación de los D-aminoácidos fueron: proporción de la fase móvil de 60:40 de MeOH/H₂O + 0.005 g/100 ml de H₃PO₄ y velocidad de flujo de 0.8 ml/min. En la Figura 4.4, se presentan los cromatogramas de los diferentes aminoácidos probados de la forma L y D (L/D-Val, L/D-Leu y L/D-Glu), los cuales presentan picos bien definidos y una buena

CAPÍTULO IV

separación entre las dos formas de los aminoácidos. En este caso, se descartó la detección de la D-Cys, debido a que no lograba eluir correctamente en estas condiciones.

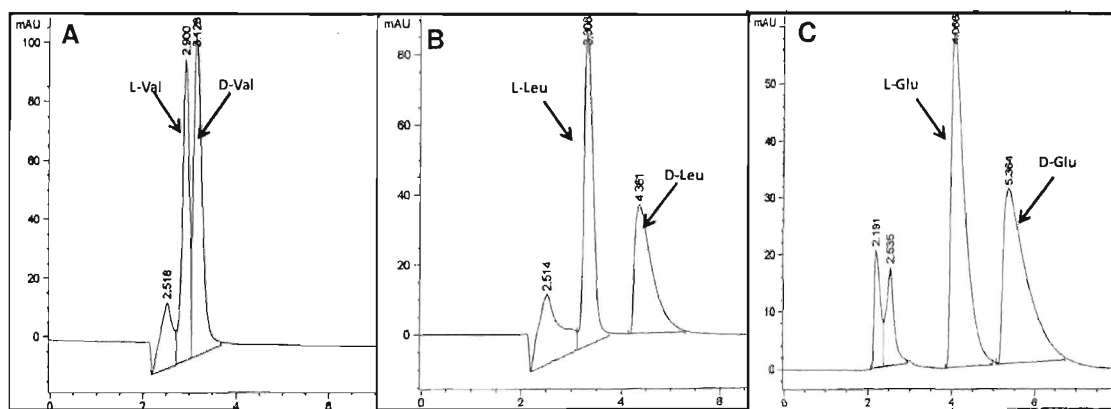


Figura 4.4 Cromatogramas de los L/D aminoácidos utilizando una fase móvil de 60:40 MeOH/H₂O + 0.005 g/100 ml H₃PO₄ y a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. El orden de elución de los aminoácidos en la columna es primero el L-aminoácido y posteriormente el D-aminoácido. A) L/D-Val, B) L/D-Leu y C) L/D-Glu. Se usó una concentración de 1 mM de los estándares de los aminoácidos, disuelto en la fase móvil.

Posteriormente, se realizó la curva de calibración a diferentes concentraciones de los respectivos D-aminoácidos, obteniendo valores de R cuadrada para D-Val, D-Leu y D-Glu de 0.998, 0.991 y 0.998, respectivamente (Figura 4.5).

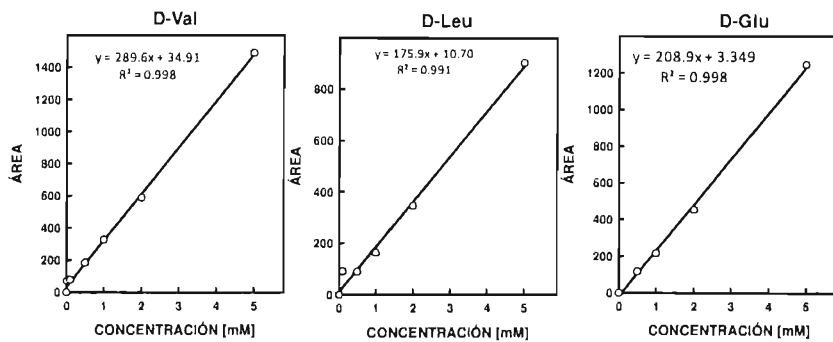


Figura 4.5 Curva de calibración de D-Val, D-Leu y D-Glu. Las gráficas representan el valor promedio del área bajo la curva de tres determinaciones con respecto a la concentración de los D-aminoácidos.

Para la identificación y determinación de los D-aminoácidos en los tejidos, suelos o medios de cultivo, varios autores han sugerido diversas metodologías (Gördes *et al.*, 2011; Svennerstam *et al.*, 2008; Brückner y Westhauser, 2003; Näsholm *et al.*, 2002), las cuales en su mayoría se basan en cromatografía líquida o acoplada a masas, hasta análisis con técnicas más avanzadas como el LC-QTOF (Cho *et al.*, 2011; Hyun *et al.*, 2005). En todas estas técnicas, se utilizan agentes derivatizantes o columnas específicas con el agente integrado a ellas (Gördes *et al.*, 2013; Gördes *et al.*, 2011; Hyun *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005; Steffek *et al.*, 2002). Sin embargo, las condiciones de corrida varían dependiendo de la técnica empleada.

El análisis realizado en este trabajo se basó en la técnica sugerida por Cho *et al.* (2011) con las adaptaciones mencionadas, donde el tipo de modificador ácido añadido a la fase móvil fue determinante. Este paso es necesario para la protonación del α -aminoácido, aumentando así la formación de un complejo diastomérico del α -aminoácido con el éter corona, factor clave para la identificación del aminoácido (Hyun *et al.*, 2005; Hyun 2003; Hyun *et al.*, 2002). En este sentido, los resultados demostraron que el uso del ácido fosfórico produjo los mejores resultados, ya que permitía una buena protonación de α -aminoácido, logrando así una mejor separación y detección.

4.3.2 Toma de D-aminoácidos en el medio

Una vez establecida la metodología para la detección y separación de los D-aminoácidos, se procedió a evaluar la toma de los aminoácidos en el medio como se indica en Materiales y Métodos. Para esto, se seleccionaron D-Val y D-Leu, dados los resultados obtenidos con las plantas en hidroponía. En esta ocasión, las curvas de calibración se realizaron adicionando diferentes concentraciones del D-aminoácido (menores al experimento anterior) al medio que contenía la solución Hoagland a mitad de su fuerza iónica y después de liofilizarlo, se disolvió en la fase móvil para su inyección en el HPLC (40 μ l de volumen de inyección). Al realizar esta variante, se obtuvo un valor de R cuadrada de 0.918 y 0.982 para las curvas de calibración de D-Val y D-Leu, respectivamente (Figura 4.4).

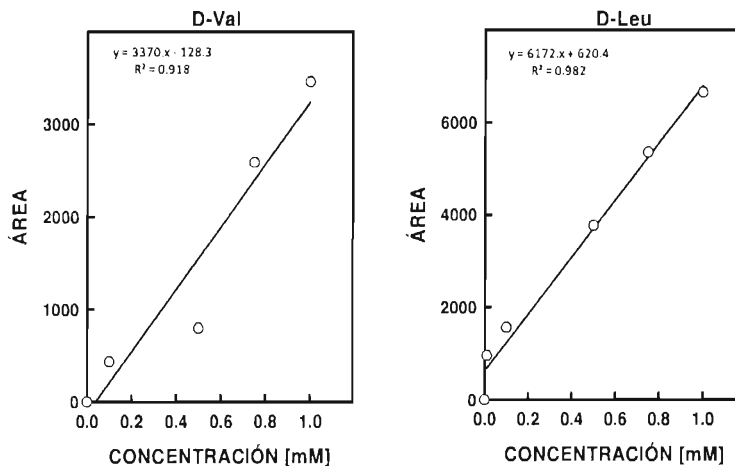


Figura 4.6 Curva de calibración de D-Val y D-Leu. Las gráficas representan el valor del área bajo la curva con respecto a la concentración de los D-aminoácidos de seis determinaciones. Concentraciones utilizadas para ambos D-aminoácidos: 0.1mM, 0.5mM, 0.75mM y 1mM.

Cuando se utilizó en el experimento de toma a la D-Val, se observó que entre el tiempo cero y la primera hora no hubo diferencia significativa entre la cantidad del aminoácido presente en el medio, al inicio y después de una hora (1.06 ± 0.03 mM y 1.06 ± 0.04 mM, respectivamente). A partir de la segunda hora se observó un incremento en la concentración del aminoácido en el medio, siendo este aumento mayor a las 4 horas (1.45

veces con respecto al valor inicial). A las seis horas, la concentración de la D-Val en el medio disminuyó aproximadamente un 7%, con respecto a los valores obtenidos a las 4 horas, alcanzando valores similares a los presentados en el medio de toma a las 2 horas de exposición de las plantas (Figura 4.5 A). Estos resultados indicarían que no se está llevando a cabo una toma de D-Val por las raíces de chile habanero, al menos no hasta las 4 horas de exposición.

El aumento en la cantidad de este D-aminoácido en el medio fue un comportamiento no esperado. Una posible explicación es la excreción de L- o D-Val por las raíces y/o la ocurrencia de una racemización. En los cromatogramas, se observó un pico con un tiempo de retención de 3.04 minutos correspondiente al D-aminoácido, el cual se mantenía en el medio a las cero, una y dos horas. Sin embargo, a las cuatro y seis horas, se observó un cambio en el tiempo de retención del aminoácido de 3.040 a 2.90 minutos que podría corresponder a la L-Val (Figura 4.5 B).

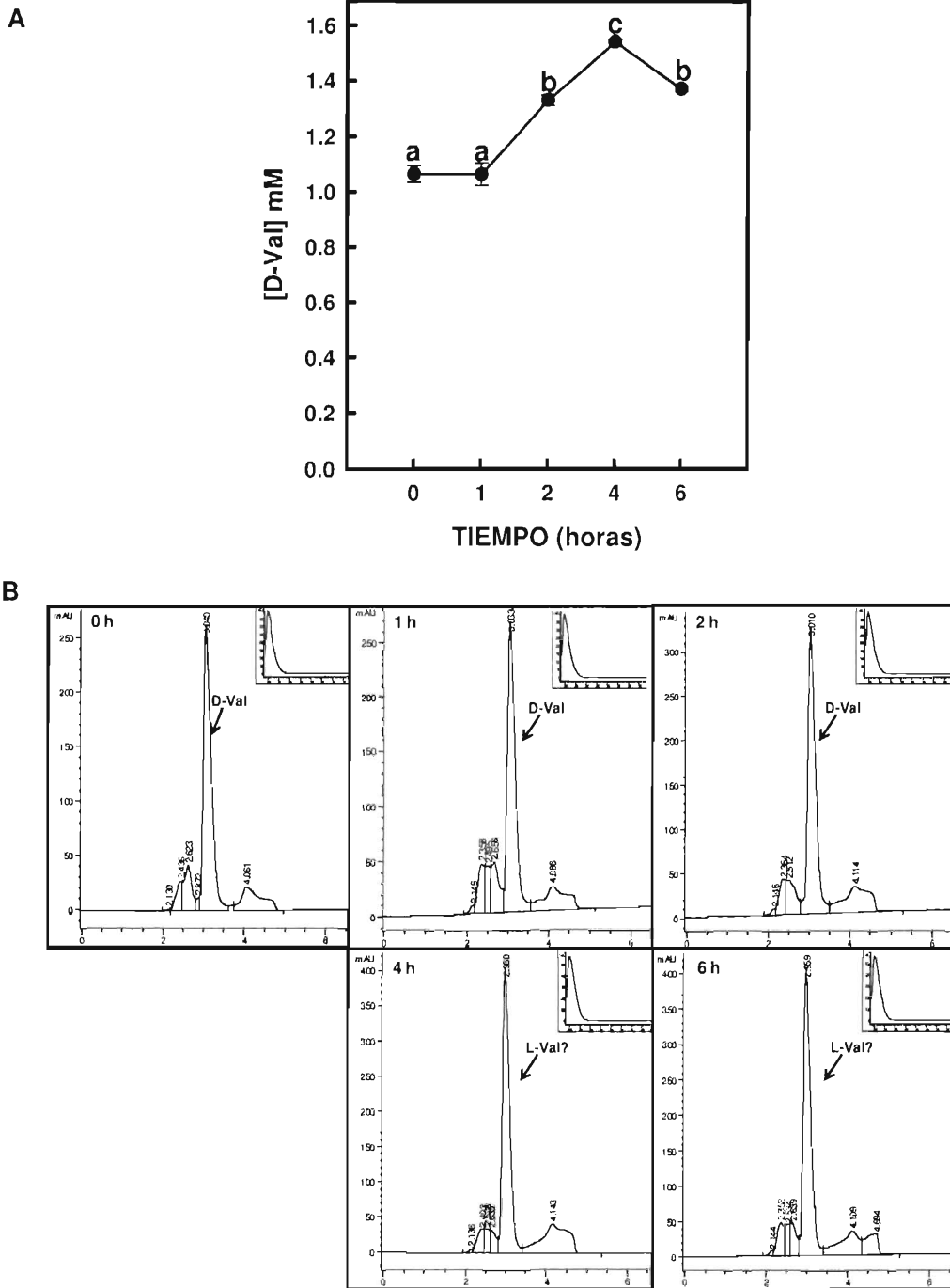


Figura 4.7 Toma de D-Val por las raíces de plántulas de chile habanero expuestas a diferentes intervalos de tiempo. A) Concentración de la D-Val en el

medio de toma después de 0, 1, 2, 4 y 6 horas de tratamiento. B) Cromatogramas de la presencia de D-Val en el medio de toma, con un tiempo de retención de aproximadamente 3.04 min a las diferentes tiempos de exposición. En los recuadros que aparecen al lado derecho de los cromatogramas, se observan los espectros de absorción de los aminoácidos.

Para corroborar si el aumento en la concentración del D-aminoácido en el medio y el cambio en el tiempo de retención podrían deberse a la presencia de una racemasa, que convierte a la D-Val a L-Val, se obtuvo que el espectro de absorción en cada intervalo de tiempo, comprobándose que no hay una diferencia entre ellos (Figura 4.5B). Además, se realizó una coinyección de los extractos de medio provenientes del tiempo 4 y 6 con 1 mM D-Val y posteriormente con 1 mM L-Val.

En la Figura 4.6 se observan los cromatogramas obtenidos en las coinyecciones a las 4 h y 6 horas de toma. El tiempo de retención de la D-Val en el medio correspondiente a las 4 horas fue de 3.066 min (Figura 4.6B) y al agregar 1 mM de D-Val, hubo un aumento en el área del pico sin modificarse el tiempo de retención (Figura 4.6C). En esta ocasión, sólo se observó un único pico que coincidió con el del estereoisómero D. Al adicionar 1 mM de L-Val a este medio, se distinguieron dos picos: uno con un tiempo de retención de 2.817 min que corresponde a la L-Val, y el otro que corresponde a la D-Val (Figura 4.6D). Al realizar el espectro de absorción de los picos con el tiempo de retención de 2.817 min y 3.066 min, se observan diferencias entre ambos que indican que son L-Val y D-Val, respectivamente. Con estos resultados se verificó que el pico a las cuatro y seis horas de tratamiento con el tiempo de retención de 2.960 min se debe a un desplazamiento del pico y no a la presencia de L-Val.

Otra explicación para el aumento en la concentración de la D-Val en el medio evaluado a las dos, cuatro y seis horas podría ser que el aminoácido no se estuviera tomando, pero aumentará su concentración por efecto de la toma de agua por las raíces. Es necesario señalar que el volumen final de medio después de cada tiempo de toma no fue medido, sino que todo el medio fue colectado y liofilizado, y después, se resuspendió en un volumen similar para cada tiempo (0.5 ml). Por ello, este experimento se debe repetir evaluando el volumen final de medio después de la toma por las raíces, para de esta manera tener un valor más preciso y descartar cambios en la concentración del aminoácido.

CAPÍTULO IV

Otra razón por la cual pudiera haber una mayor concentración en el medio, sería por la excreción de D-Val de las raíces. Aunque no hay evidencias reportadas de la excreción de los D-aminoácidos de las raíces, se sabe que entre los exudados se encuentran L-aminoácidos, azúcares, iones inorgánicos, etc, y éstos pudieran tener un efecto en la alta concentración observada, aunque tendría que estudiarse (Dakora y Phillips, 2002).

Con base en los datos obtenidos, se sugiere que la toma de D-Val por las raíces de chile habanero, si la hubiera, sería mínima, al menos durante las primeras 6 horas de exposición. Una respuesta similar fue observada en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* al realizarse la toma, junto con la D-Arg, D-Val y D-Ile (Forsum *et al.*, 2008), se sugiere que la toma de este D-aminoácido se llevaría a cabo de manera más lenta.

Por lo tanto, los cambios en el crecimiento de plantas en hidroponía tratadas con este aminoácido podrían deberse a la activación de mecanismos de señalización que permitan un mejor desarrollo.

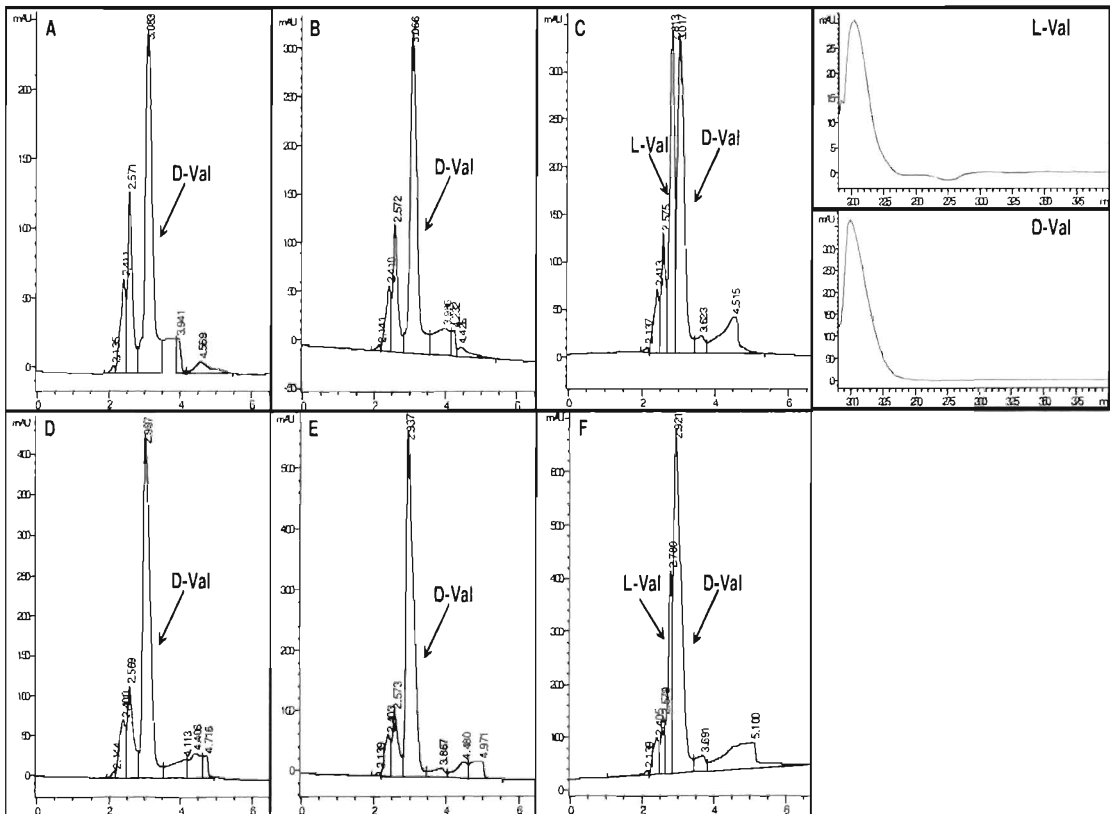


Figura 4.8 Cromatogramas de la coinyección de la D-Val a los medios del experimento de toma correspondientes a las 4 y 6 horas de tratamiento. A) Medio de la toma de D-Val 4 horas, B) medio de la toma de D-Val 4 horas + 1 mM D-Val, C) medio de la toma de D-Val 4 horas + 1 mM D-Val + 1 mM L-Val, D) medio de la toma de D-Val 6 horas, E) medio de la toma de D-Val 6 horas + 5 mM D-Val, F) medio de la toma de D-Val 6 horas + 1 mM D-Val + 5 mM de L-Val. A la derecha de las imágenes, se presentan los espectros de absorción correspondientes a la L-Val y la D-Val.

En cuanto a la toma de D-Leu, se observa en la Figura 4.7^a, la variación de la concentración del D-aminoácido en el medio a los diferentes intervalos de tiempo. No se observó una diferencia significativa en la concentración de este aminoácido en el medio a la primera hora de exposición, mientras que a las 2 horas, ésta aumentó significativamente. De igual manera a lo descrito anteriormente, este comportamiento pudiera deberse a que la D-Leu se está concentrando en el medio, producto de la toma de agua por las raíces. Sin embargo, al tiempo final del experimento la concentración de D-Leu en el medio se redujo 25% y 36% con respecto al tiempo 0 y a las 2 horas, respectivamente. Con base a lo anterior, se sugiere que no hay una absorción de este D-aminoácido en las primeras dos horas de exposición, pero a partir de este momento, este proceso pudiera ocurrir (Figura 4.7 A). Probablemente, una mayor toma de la D-Leu se presente a tiempos más largos de exposición.

En los cromatogramas correspondientes a la toma de D-Leu (Figura 4.7B), no se observan variaciones en el tiempo de retención (3.615 minutos aproximadamente) y el espectro de absorción a las diferentes horas de tratamiento, comprobándose así que el pico corresponde a la D-Leu.

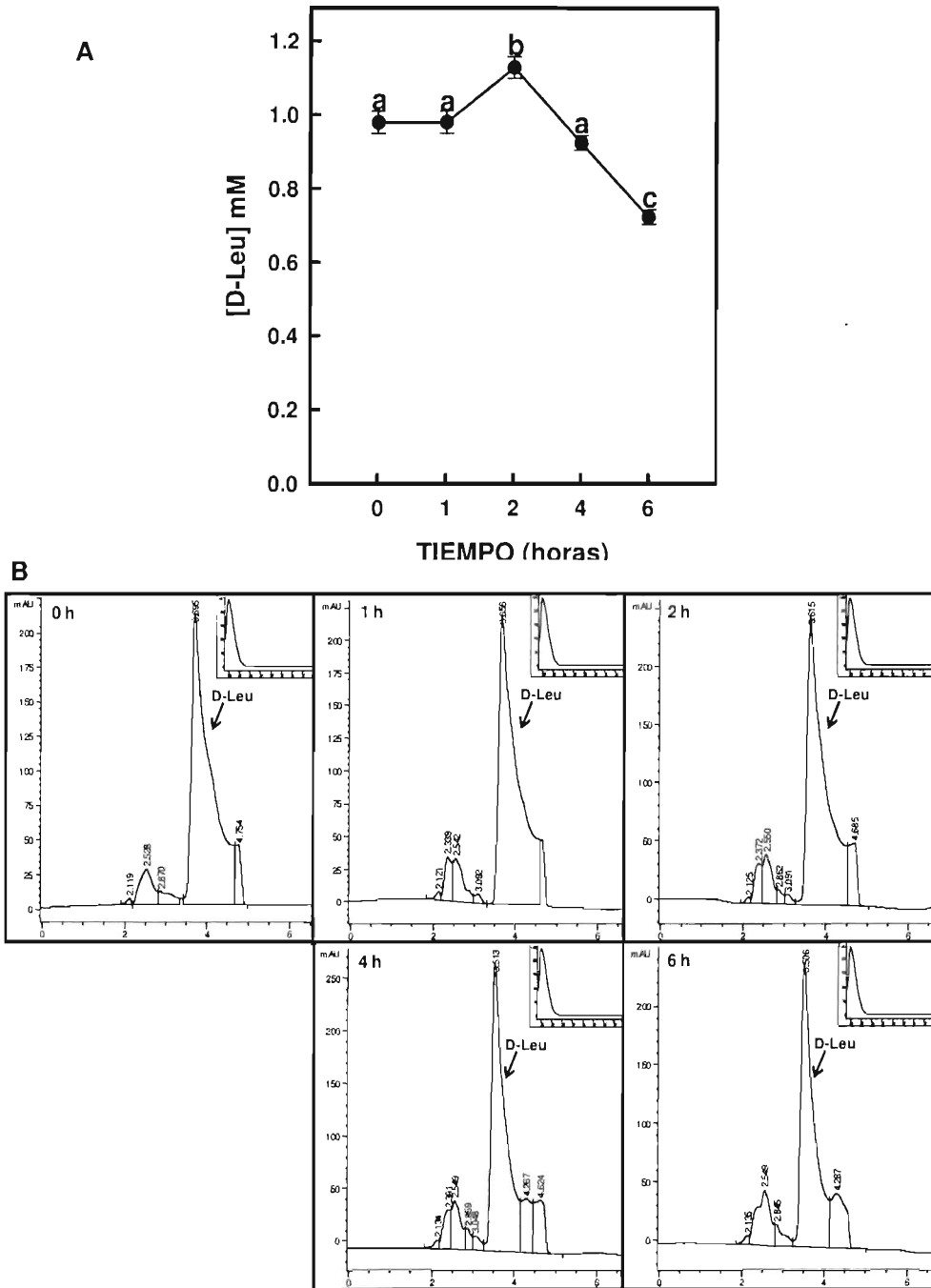


Figura 4.9 Toma de D-Leu por las raíces de plántulas de chile habanero expuestas a diferentes intervalos de tiempo. A) Concentración de la D-Leu en el medio de toma a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas de tratamiento. B) Cromatogramas de los medios, donde se observa el pico de D-Leu con un tiempo de retención de

aproximadamente 3.61 minutos, a las diferentes horas de tratamiento. Al lado derecho de los cromatogramas se observa el espectro de absorción correspondiente al aminoácido.

Con respecto a la D-Leu, se observó una disminución de la concentración del D-aminoácido con respecto al paso de tiempo, respuesta que no ha sido caracterizada anteriormente. Sin embargo, para fines de este trabajo se demuestra que este aminoácido está siendo absorbido por las raíces de las plántulas de chile habanero.

Esta toma podría deberse a la presencia de diversos transportadores en las raíces de chile habanero. Estos transportadores se han caracterizado en otros modelos y se sabe que no discriminan entre la forma L y D del aminoácido, además de expresarse en diferentes partes de la raíz, como en las células de la epidermis, pelos radicales, ápice radicular (*AtAAP1* y *AtAAP5*) y cortex y cofia (*AtLHT1*) (Lee *et al.*, 2007; Svennerstam *et al.*, 2007; Hinner *et al.*, 2006; Birnbaum *et al.*, 2003; Chen y Bush, 1997).

La toma de los D-aminoácidos Val y Leu por la raíz de chile habanero varió dependiendo del aminoácido, siendo ésta mayor con la D-Leu (Figura 4.7A, Figura 4.6A) a partir de las cuatro horas de tratamiento.

Trabajos sobre la toma de los D-aminoácidos se han realizado en plantas de *Arabidopsis* de 18 días, donde las raíces se colocaron en una solución con 0.5 mM CaCl₂ + 0.01 mM D-aminoácido. Los resultados señalan que para la D-Ser y D-Ala hay una absorción similar a sus correspondientes L-aminoácidos, pero significativamente más baja para D-Arg, D-Ile y D-Val. Los D-aminoácidos que fueron absorbidos en mayor cantidad inhibieron en mayor medida el crecimiento de las plántulas, en comparación de los que fueron menos absorbidos (Forsum *et al.*, 2008).

Las plantas tienen la capacidad de absorber D-aminoácidos, pero podrían no ser utilizados para su crecimiento (Forsum *et al.*, 2008; Svennerstam *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha encontrado que existen enzimas en las plantas que metabolizan a los D-aminoácidos, disminuyendo por tanto su aparente toxicidad (Gholizaden y Kohnehrouz, 2009; Funakoshi *et al.*, 2008; Fujitani *et al.*, 2006) y ayudando así a que sean asimilados por las plantas para contribuir con su crecimiento.

4.4 CONCLUSIONES

Se logró estandarizar la metodología para la determinación de los D-aminoácidos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La toma de D-Val por las raíces de chile habanero parece ser mucho menor a la de D-Leu, indicando una especificidad diferente de los transportadores para cada aminoácido en la raíz de chile habanero.

BIBLIOGRAFÍA

- Aldag, R.W. y J.L. Young (1970). D-amino acids in soils. I. Uptake and metabolism by seedling maize and ryegrass. *Agronomy Journal*, 62, 184-189.
- Birnbaum, K., D.E. Shasha, J.Y. Wang, J.W. Jung, G.M. Lambert, D.W. Galbraith y P.N. Benfey (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*, 302, 1956-1960.
- Brückner, H. y T. Westhauser (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43-55.
- Chen, L. y D.R. Bush (1997). LHT1, a Lysine- and Histidine- specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 115, 1127-1134.
- Cho, S., I. Lee, J. Kim, I.S. Hwang, S. Kim, K.M. Han, J.W. Kim, J.H. Lee, Y.K. Park, S.Y. Han y K.R. Chae (2011). Rapid determination of chiral amino acids by LC-Q-TOF Mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32, 4458-4461.
- Dakora, F.D y D.A. Phillips (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. *Plant and Soil*, 245, 35-47.
- Forsum, O., H. Svennerstam, U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179, 1058-1069.
- Fujitani, Y., N. Nakajima, K. Ishihara, T. Oikawa, K. Ito y M. Sugimoto (2006). Molecular and biochemical characterization of aserine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67, 668-674.
- Funakoshi, M., M. Sekine, M. Katane, T. Furuchi, M. Yohda, T. Yoshikawa y H. Homma (2008). Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behaviour during germination. *European Journal of Biochemistry*, 275, 1188-1200.
- Gholizadeh, A. y B.B. Kohnhrouz (2009). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an active fused D-amino acid oxidase from *Zea mays* L.

Biochemistry, 74, 137-144.

- Gördes D., G. Koch, K. Thurow y Ü. Kolukisaoglu (2013). Analyses of *Arabidopsis* ecotypes reveal metabolic diversity to convert D-amino acids. Springer Plus, 559, 1-11.
- Gördes, D., Ü. Kolukisaoglu y K.Thurow (2011). Uptake and conversion of D-amino acidsin *Arabidopsis thaliana*.Amino Acids, 40, 553-563.
- Hirner, A., F. Ladwig, H. Stransky, S.Okumoto, M. Keinath, A. Harms, W.B. Frommer y W. Koch (2006). *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinitytransporter for cellular amino acid uptakein both root epidermisand leaf mesophyll. Plant Cell, 18, 1931-1946.
- Hopkins, D.W. y K.E. Ferguson (1994). Substrate induced respirationin soil amended with different amino acid isomers. Applied Soil Ecology, 1, 75-81.
- Hyun, M.H., T. Guanghui y J.Y. Xue (2005). Unusual resolution of *N*- (3, 5-dinitrobensoyl1) α -amino acids on a chiral stationary phase based on (+)-(crown-6)-2, 3, 11, 12-tetracarboxylic acid. Journal of Chromatography A, 1097, 188-191.
- Hyun, M.H., Y.J. Cho y J.S. Jin (2002). Liquid chromatographic direct resolutionof β -amino acids on a chiral crown ether stationary phase. Journal of Separation Science, 25, 648-652.
- Hyun, M.H., Y.J. Cho, J.A. Kim y J.S. Jin (2003). Preparation and application ofa new modified liquid chromatographic chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3, 11,12-tetracarboxylic acid. Journalof Chromatography A, 984, 163-171.
- Hyun, M.H., Y.J. Cho, J.A. Kim y J.S. Jin (2011). Effect of the tethering groups of chiral stationary phases basedon (+)-(18-crown-6)-2,3, 11,12-tetracarboxylic acidon the liquid chromatographic resolution of β -Amino acids. Journal of Liquid Chromatographic and Related Technologies, 26, 1083-1094.
- Jämtgård, S., T.Näsholm y K. Huss-Danell (2008). Uptake of organic nitrogen by barley. Plant and Soil, 302, 221-231.

- Jones, D.L. y K. Kielland (2002). Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 209-219.
- Jones, D.L., D. Shannon, T. Junvee-Fortune y J.F. Farrar (2005). Plant capture of free amino acids is maximized under high soil amino acid concentrations. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 179-181.
- Jones, D.L., J.R. Healey, V.B. Wilett, J.F. Farrar y A. Hodge (2005). Dissolved organic nitrogen uptake by plants- an important N uptake pathway?. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 413-423.
- Kielland, K., J. McFarland y K. Olson (2006). Amino acid uptake in deciduous and coniferous taiga ecosystems. *Plant and Soil*, 288, 297-307.
- Kranabetter, J.M., C.R. Dawson y D.E. Dunn (2007). Indices of dissolved organic nitrogen ammonium and nitrate across productivity gradients of boreal forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 3147-3158.
- Lee, Y.H., J. Foster, J. Chen, L.M. Voll, A.P.M. Weber y M. Tegeder (2007). AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 50, 305-319.
- Näsholm, T., H.D. Kerstin y P. Högberg (2002). Uptake of organic nitrogen in the field by four agriculturally important plant species. *Ecology*, 81, 1155-1161.
- Persson, J. y T. Näsholm (2003). Regulation of amino acid uptake by carbon and nitrogen in *Pinus sylvestris*. *Planta*, 217, 309-315.
- Raab, T.K., D.A. Lipson y R.K. Monson (1996). Nonmycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia*, 108, 488-494.
- Schimel, J.P. y J. Bennett (2004). Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology*, 85, 591-602.

- Schmidt, S. y G.R. Stewart (1997). Water logging and fire impacts on nitrogen availability and utilization in a subtropical wet heathland wallum. *Plant Cell and Environment*, 20, 1231-1241.
- Steffeck, R.J., Y. Zelechonok y K.H. Gahm (2002). Enantio selective separation of racemic secondary amines on chiral crown ether-based liquid chromatography stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 947, 301-305.
- Svennerstam, H. (2008). Amino acid uptake in *Arabidopsis*- the transporters involved, kinetics of uptake and growth on amino acids. Doctoral Thesis. Faculty of Forest Sciences. Sweden. 145 p.
- Svennerstam, H., U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease. *New Phytologist*, 180, 620-630.
- Svennerstam, H., U. Ganeteg, C. Bellini y T. Näsholm (2007). Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the Lysine Histidine Transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiology*, 143, 1853-1860.
- Zhang, D., F. Li, D.H. Kim, H.J. Choi y M.H. Hyun (2005). Resolution of β -blockers on a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6) - 2, 3, 11, 12-tetracarboxylic acid: Unusual temperature effect. *Journal of Chromatography A*, 1083, 89-95.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

Tomando como escrutinio inicial el efecto de los D-aminoácidos sobre la raíz en cajas de Petri, se seleccionaron en este proyecto a la D-Valina, la D-Leucina y la D-Cisteína por su capacidad de inducir cambios en estructuras importantes de la raíz, como las raíces laterales y pelos radiculares. Los resultados demuestran que la adición de estos aminoácidos en conjunto con el contenido nitrato como fuente principal de Nitrógeno, aumentará el crecimiento de la planta y el contenido endógeno de metabolitos nitrogenados. Estos resultados son importantes por primera vez en plantas y demuestran que conociendo el efecto que los D-aminoácidos tienen sobre la fisiología de la planta se podrá mejorar el desarrollo aumentando los efectos positivos y reduciendo los negativos de las mismas.

El tema de la nutrición vegetal ha sido de gran interés durante décadas, tanto para comprender la fisiología vegetal en general, como para incrementar el crecimiento de los cultivos y el manejo de otras plantas domesticadas. Atención especial ha tenido el N pero ha sido considerado un factor limitante para el desarrollo de los ecosistemas (Epstein y Bloom, 2005). Las plantas no dependen solamente del nitrato y amonio para cubrir sus demandas de N, también se sabe pueden utilizar fuentes de N orgánico, como los L-aminoácidos (Forsum *et al.*, 2008; Näsholm *et al.*, 1998; Raab *et al.*, 1996; Kielland 1995). Con base en este conocimiento, se ha determinado presencia de los L-aminoácidos en el suelo y su efecto sobre las plantas. No debe olvidarse que también sus estereoisómeros D- están presentes en el suelo y en los tejidos vegetales, aunque en menor concentración.

A los D-aminoácidos se les ha adjudicado la propiedad de ser tóxicos para el crecimiento de las plantas (Näsholm *et al.*, 2009; Forsum *et al.*, 2008; Erikson *et al.*, 2004), pero es muy poco lo que realmente se conoce sobre sus efectos. En los resultados presentados en esta tesis, se muestra que en la mayoría de los casos ocurrió inhibición del crecimiento de la raíz primaria, cuando fue evaluado en condiciones *in vitro* y a tiempos cortos (Capítulo II), con respecto a las raíces que no contenían ninguna fuente de nitrógeno. De la misma manera, se observó que el efecto inhibitorio varió según la dosis y el tipo de D-

aminoácido aplicado. El efecto inhibitorio provocado por los D-aminoácidos podría deberse a una acumulación de los mismos en las plantas, debido a que éstos poseen una baja capacidad para metabolizarlos (Näsholm *et al.*, 2009), o también a que interfieren en el mecanismo de traducción de las proteínas, compitiendo con el L-aminoácido por la unión a los tRNA (Forsum *et al.*, 2008).

Sin embargo, la D-Leu y la D-Cys provocaron el desarrollo de un mayor número de raíces laterales y pelos radiculares (Figura 2.6 A, Capítulo II). Estas estructuras pueden favorecer la nutrición de la planta, debido que contribuyen a la absorción de los nutrimentos del suelo y la capacidad exploratoria de la raíz (Cervantes-García *et al.*, 2011; Péret *et al.*, 2009; López-Bucio *et al.*, 2003).

Otro comportamiento muy importante fue el observado con la D-Val, donde el crecimiento de la raíz disminuyó temporalmente (las primeras 24 horas) y luego, recuperarse a las 96 horas (Figura 2.6C, Capítulo II). Este comportamiento podría ser indicativo de que la planta percibió un ambiente favorable para absorber nutrimentos y, así, recuperar la tasa de crecimiento y continuar explorando otros sitios en el suelo. Si es así, ésta sería una respuesta adaptativa importante que le daría ventajas a la planta en un ambiente competitivo, particularmente en suelos con escasez de nutrimentos.

En la nutrición vegetal, el comportamiento de las raíces es muy importante puesto que son las estructuras primordiales para la absorción de los nutrimentos del suelo (Giehl *et al.*, 2013). Hasta la fecha, el efecto sobre el crecimiento radicular de chile habanero inducido por D-Val, D-Leu y D-Cys no ha sido descrito en otro modelo vegetal.

El análisis del crecimiento radicular en condiciones *in vitro* ha sido un modelo empleado frecuentemente en diferentes plantas para tener un acercamiento al comportamiento de determinadas moléculas sobre este órgano (Funakoshi *et al.*, 2008; Brückner y Westhauser, 2003). Sin embargo, este modelo no permite conocer el impacto que estos cambios podrían tener en el desarrollo de la planta, ya que no pueden ser realizados durante tiempos prolongados. Por esta razón, se decidió evaluar el efecto de los D-aminoácidos sobre plántulas de chile habanero creciendo en hidroponía, por un período mayor (30 días).

Las plantas están expuesta simultáneamente en el suelo a distintas fuentes de N, por lo que su respuesta puede ser influenciada además por la interacción entre éstas (McNickle *et al.*, 2013). En este trabajo, se decidió evaluar el efecto de la adición de una mezcla de D-aminoácidos en concentraciones micromolares a las plántulas que están creciendo en condiciones normales de nitrato (1 mM).

Sorprendentemente, los tres D-aminoácidos seleccionados en este trabajo a partir del análisis *in vitro*, D-Val, D-Leu y D-Cys, indujeron una mayor proliferación radicular en las tres variedades usadas de chile habanero, lo cual puede traducirse en mayores áreas de exploración y absorción de nutrimentos y agua en el suelo. Sin embargo, para los tres D-aminoácidos, cuya presencia podría ser más abundante en los suelos, como la D-Ser, D-Asp y D-Ala (Vranova *et al.*, 2012), la respuesta fue dependiente de la variedad. Las variedades yucatecas fueron colectadas en sitios contrastante en la península, en donde el tipo y la concentración de los D-aminoácido se desconoce. El comportamiento de estas variedades ante el déficit de N ha sido previamente caracterizado, demostrando que las mismas difieren en sus estrategias para contender con este estrés y sugerir la presencia de transportadores de nitrato específicos en sus raíces (Santiago-Antonio *et al.*, 2014).

A partir de los resultados obtenidos, se sugiere que el efecto que los D-aminoácidos sobre las plantas podría depender del tipo y la concentración de D-aminoácido que esté presente en los suelos donde se cultive y de la especie en cuestión, por lo que no se podrían generalizar los resultados obtenidos con un mismo aminoácido a otras plantas. Por ejemplo, contrario a lo que ocurrió en nuestro caso con los D-aminoácidos ensayados, la aplicación de glutamina y asparagina a *Arabidopsis*, dos de los aminoácidos que mejor toma esta especie (Forsum *et al.*, 2008), en conjunto con nitrato, redujo a la mitad su crecimiento, en comparación con aquellas que crecieron en presencia de nitrato únicamente (McNickle *et al.*, 2013). Una recomendación importante para llevar a cabo estos estudios sería el escrutinio del efecto de todos los aminoácidos sobre la planta modelo, en un sistema sencillo como las cajas de Petri y a partir de los resultados, seleccionar aquellos que sean más prometedores para impactar sobre la fisiología de la planta.

El aumento endógeno de los metabolitos nitrogenados en tejidos vegetativos que se observaron en aquellas plantas tratadas con la mezcla de D-Val, D-Leu y D-Cys es un

aspecto muy importante a tener en cuenta, ya que en varias especies altos niveles de aminoácidos y proteínas en estos tejidos han sido correlacionados con un mayor desarrollo de las plantas en condiciones de estrés (Ikramet *et al.*, 2012) y una mayor productividad (Suprayogi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Kade *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003).

En la literatura se señala que los aminoácidos son fuentes importantes de N para la planta en ecosistemas donde hay una gran cantidad de materia orgánica, ya que al igual que el nitrato conducen a un mejor desarrollo (Maathuis, 2009). Los cambios fisiológicos y bioquímicos ocasionados por estos D-aminoácidos no han sido reportados previamente, por lo que sería importante conocer cómo estos D-aminoácidos están ejerciendo su función. Se ha reportado que estos compuestos pueden provocar cambios en las asociaciones entre los microorganismos de la rizósfera y las raíces, ocasionando tal vez una mejor adquisición de nutrientes del suelo (Moe *et al.*, 2013). Debido a ello, un efecto indirecto de los mismos no puede ser descartado, sobre todo en condiciones de hidroponía. Sin embargo, el aumento en la formación de RL inducido por la D-Leu, en la formación de pelos radiculares inducido por la D-Cys, así como el efecto de la D-Val sobre el crecimiento de la raíz primaria fueron observados en condiciones estériles, por lo que podrían atribuirse cambios en los microorganismos alrededor de la raíz.

Por otra parte, el efecto provocado sobre el crecimiento de las plántulas de chile habanero podría deberse la existencia de enzimas que intervienen en el metabolismo de los D-aminoácidos como las racemasas, transaminasas y D-aminoácido oxidasas, las cuales pudieran estar localizadas en la raíz. Se han identificado y caracterizado racemasas que afectan la conversión del D-aminoácido a L-aminoácido en las raíces de *Arabidopsis thaliana*, arroz y cebada, las cuales son diferentes en su estructura dependiendo del tipo de planta (Fujitani *et al.*, 2007; Fujitani *et al.*, 2006). Otras enzimas como la D-aminoácido oxidasa, que degradan al D-aminoácido en un grupo amonio y peróxido de hidrogeno (Funakoshi *et al.*, 2008), también han sido detectadas en especies vegetales. Por otro lado, se ha demostrado que las bacterias poseen un mecanismo para la integración del D-aminoácido en su estructura, porque pudieran provocar algún efecto en las plantas (Moe *et al.*, 2013).

Los efectos de la D-Val y la D-Leu fueron específicos y diferenciales; el primero indujo un aumento en el área foliar, mientras que el segundo indujo mayor formación de raíces laterales y ambos aumentaron la longitud radicular total y el área radicular, siendo la D-Leu más efectiva. Este resultado sugiere que ambos D-aminoácidos pueden inducir mecanismos de señalización diferenciales que actúen en conjunto para una mayor adaptación de las plantas a diferentes condiciones nutrimentos en el suelo.

La D-Val está presente en las bacterias del suelo y en fertilizantes orgánicos como el fluvalinato (Amelung *et al.*, 2006), y sus efectos únicamente se han estudiado *in vitro* en plántulas de *Arabidopsis*, donde no inhibe el crecimiento de la raíz primaria (Forsum *et al.*, 2008). También, se ha reportado que puede provocar efectos inhibitorios en el crecimiento de las raíces cuando está en dosis por arriba de 1 mM (Gördes *et al.*, 2011).

La D-Leu parece ser tomada mejor que la D-Val por las raíces de chile habanero; estos cambios en la absorción de los D-aminoácidos podrían ser importantes en su función, como ha sido reportado previamente en *Arabidopsis* (Forsum *et al.*, 2008; Svennerstam *et al.*, 2008).

Todos estos resultados han abierto el panorama para sentar las bases sobre el papel de los D-aminoácidos en el crecimiento de plantas, en especial del chile habanero, ya que podrían estar presentes en los suelos y ser adsorbidos por las raíces. Este es el primer trabajo acerca de su papel sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos relacionados con el crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Amelung, W., X. Zhang y K.W. Flach (2006). Amino acids in grassland soils: climatic effect on concentrations and chirality. *Geoderma*, 130, 207-217.
- Brückner H. y T. Westhauser (2003). Chromatographic determination of L- and D- amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43-55.
- Cervantes García, J.G, M.G. Solís Guzmán y M. Martínez Trujillo (2011). Análisis del crecimiento de raíces primarias y raíces laterales de *Nicotiana tabacum* L. en condiciones de estrés generado por Cr (VI). *Biológicas*, 13, 65-69.
- Epstein, E. y A.J. Bloom (2005). Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Erikson, O., M. Hertzberg y T. Näsholm (2004). A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nature Biotechnology*, 22, 445-458.
- Forsum, O., H. Svennerstam, U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179, 1058-1069.
- Fujitani, Y., N. Nakajima, K. Ishihara, T. Oikawa, K. Ito y M. Sugimoto (2006). Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67, 668- 674.
- Fujitani, Y., T. Horiuchi, K. Ito y M. Sugimoto (2007). Serine racemases from barley, *Hordeumvulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: Gene cloning and recombinant protein characterization. *Phytochemistry*, 68, 1530-1536.
- Funakoshi, M., M. Sekine, M. katane, T. Furuchi, M. Yohda, T. Yoshikawa y H. Homma (2008). Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behavior during germination. *FEBS Journal*, 275, 1188-1200.

- Giehl, R.F.H., D.G. Benjamin y V.W. Nicolaus (2013). It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *Journal of Experimental Botany*, 65, 769-778.
- Gördes, D., Ü. Kolukisaoglu y K. Thurow (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 40, 553- 563.
- Ikram, S., M. Bedu, F. Daniel Vedele, S. Chaillou y F. Chardon (2012). Natural variation of *Arabidopsis* response to nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany*, 63, 91-105.
- Kade, M., A.J. Barneix, S. Olmos y J. Dubcovsky (2005). Nitrogen uptake and remobilization in tetraploid 'Langdon' durum wheat and a recombinant substitution line with the high grain protein gene Gpc-B1. *Plant Breeding*, 4, 343-349.
- Kielland, K. (1995). Landscape pattern of free amino acids in arctic tundra soils. *Biogeochemistry*, 31, 85-98.
- López Bucio, J., A. Cruz Ramírez y L. Herrera Estrella (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280-287.
- Maathuis, F. (2009). Physiological functions of mineral nutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 250-258.
- Maini, P. (2006). The experience of the first bioestimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *FertilitasAgrorum*, 1, 29-43.
- Moe, L.A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 9, 1692-1705.
- Näsholm, T., A. Ekblad, A. Nordin, R. Giesler, M. Högberg y P. Högberg (1998). Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, 392,914-916.

- Näsholm, T., K. Kielland y U. Ganeteg (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, 182, 31-48.
- Péret, B., B. de Rybel, I. Casimiro, I. Benkova, R. Swarup, I. Laplaze, T. Beeckman y M.J. Bennet (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14, 399-408.
- Raab, T.K., D.A. Lipson y R.K. Monson (1999). Soil amino acid utilization among species of the cyperaceae: plant and soil processes. *Ecology*, 80, 2408- 2419.
- Santiago Antonio, G., M.G. Lizama Gasca, M. Carrillo Peche I. Echevarría Machado (2014). Natural variation in response to nitrate starvation among varieties of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Australian Journal of Crop Science*, 4, 523-535.
- Suprayogi, Y., J.M. Clarke, R. Bueckert, F.R. Clarke y C.J. Pozniak (2011). Nitrogen remobilization and post-anthesis nitrogen uptake in relation to elevated grain protein concentration in durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 2, 273-282.
- Svennerstam, H., U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist*, 180, 620-630.
- Vranova, V., H. Zahradnickova, D. Janous, K.R. Skene, A.S. Matharu, K. Rejsek y P. Formanek (2012). The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps. *Plant Soil*, 354, 21-39.
- Wang, H., J.M. Clarke, T.N. McCaig y R.M. DePauw (2009). Physiology of genetic improvements in yield and grain protein of canadian western amber durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 9, 497- 500.
- Wang, H., T.N. McCaig, R.M. DePauw RM, F.R. Clarke y J.M. Clarke (2003). Physiological

characteristics of recent Canada western red spring wheat cultivars: components of grain nitrogen yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 4, 699-707.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se observó que los D-aminoácidos afectan el crecimiento de las plántulas *in vitro*, dependiendo de tipo del aminoácido, su concentración y su estereoespecificidad. La D-Ala y el D-Asp son los aminoácidos que inhibieron drásticamente el crecimiento de la raíz primaria (87 al 90% de inhibición con respecto al testigo sin aminoácidos). Otros aminoácidos provocaron efectos estimulatorios, como la D-Leu y la D-Cys, que generaron la producción de raíces laterales y pelos radiculares, respectivamente. El modelo *in vitro* es una buena herramienta para generar respuestas a corto plazo de los cambios detallados de la raíz en presencia de compuestos no estudiados anteriormente.

Los D-aminoácidos D-Val, D-Leu y D-Cys, aplicados en conjunto con nitrato, pueden favorecer el crecimiento de las plántulas de chile habanero en condiciones de hidroponía, particularmente provocando una proliferación radicular (mayor área radicular, longitud radicular total y número de raíces laterales). Así mismo, estos D-aminoácidos aumentaron los niveles de metabolitos nitrogenados en los tejidos de la planta. De estos D-aminoácidos, la Val y la Leu parecen ser los más efectivos para provocar esta respuesta. Cada uno por separado indujo cambios en el crecimiento de la planta que fueron específicos y la toma de éstos por las raíces de chile habanero parece también diferir, prefiriendo en este proceso a la D-Leu sobre la D-Val.

PERSPECTIVAS

En este trabajo, se caracterizó la respuesta de las plántulas de chile habanero a la aplicación de los D-aminoácidos y su intervención en el desarrollo fisiológico de las plantas de chile habanero. Sin embargo, aún queda por estudiar cuáles son los mecanismos utilizados por estos compuestos para modificar el crecimiento de chile habanero.

Una perspectiva importante sería el estudio de las enzimas que participan en el metabolismo de estos compuestos, como las racemasas, transaminasas y D-aminoácido oxidasas, las cuales podrían participar en esta respuesta. Así mismo, si estos compuestos están actuando como señales, una vía ya reportada en las plantas es la de la D-Ser, la cual se da a través de receptores de glutamato, por lo que se pueden llevar a cabo estudios farmacológicos (con agonistas y antagonistas de los mismos) que permitan demostrar la participación de estas proteínas.

Para saber si las modificaciones en el sistema radicular de chile habanero se deben a un efecto indirecto de estos compuestos, por la modificación de los microorganismos alrededor de la raíz, se sugiere caracterizar las bacterias y hongos que estén presentes en cada condición de N, cuando el experimento se desarrolla en hidroponía. Una vez caracterizados, se podrían aplicar inóculos de los mismos para saber si éstos son capaces por sí mismos de inducir proliferación radicular.

Con estos resultados se abren nuevos horizontes para el estudio del efecto de otros D-aminoácidos en el desarrollo de las plantas. El análisis de la presencia de estos compuestos en los suelos donde se cultiva el chile habanero, así como en los tejidos de la planta, podría ayudar a seleccionar otros D-aminoácidos y evaluar su efecto. De igual manera, se pudiera estudiar el efecto de la aplicación de extractos provenientes de fuentes naturales ricas en estos compuestos.

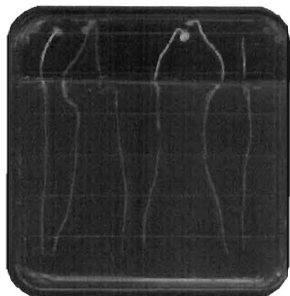
Se podría contemplar además escalar este experimento a condiciones de invernadero y/o campo para conocer si la aplicación de la mezcla 2 de los D-aminoácidos pudiera tener un impacto importante sobre los rendimientos del cultivo. Por otro lado, hay evidencia de la

función de los D-aminoácidos en condiciones de estrés ayudando a mejorar la respuesta de las plantas, por lo tanto se puede evaluar cuál es la función de éstos bajo estrés hídrico, salino, entre otros.

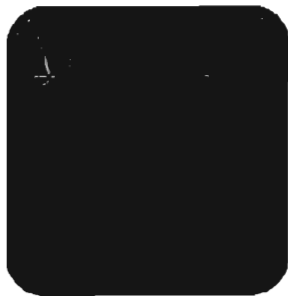
Estas serían algunas de las posibles áreas de estudio que llevarán a entender a los mecanismos por los que las plántulas de chile habanero, o las plantas en general, utilizan a los D-aminoácidos en su crecimiento y desarrollo. De esta forma, se proporcionarían herramientas que ayudaran a generar una nueva estrategia de fertilización orgánica a largo plazo, logrando así mitigar la contaminación de los suelos provocada por la fertilización con N inorgánico.

Anexo I. Morfología de las plántulas a las 96 horas en presencia de D-aminoácidos

KCl



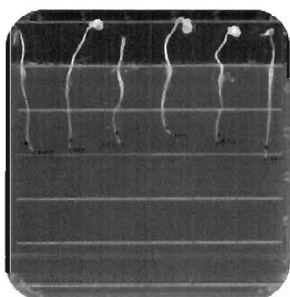
D-Ile



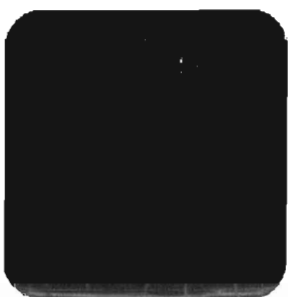
D-Val



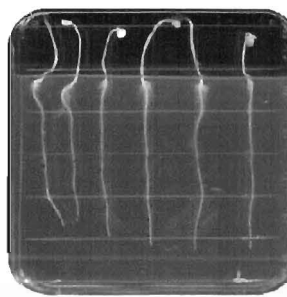
D-Ala



D-Gln



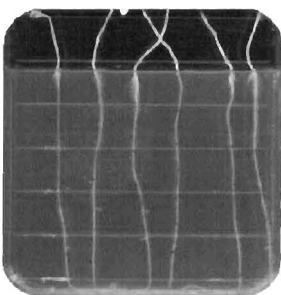
D-Ser



D-Cys



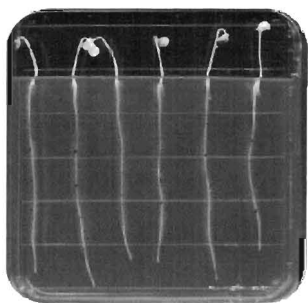
D-Glu



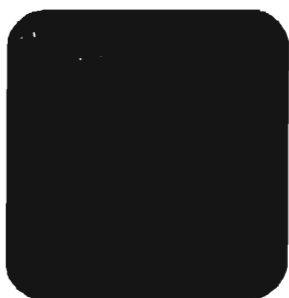
D-Asp



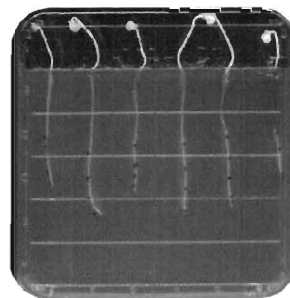
D-Trp



D-Phe



D-Tyr



ANEXO II. Curva dosis-respuesta del crecimiento de la RP en presencia de D-aminoácidos

