



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Identificación de transcritos de Receptores de
Glutamato en etapas ontogénicas de flores y frutos
de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo
diferentes condiciones ambientales.**

Tesis que presenta

Federico García Laynes

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de FEDERICO GARCÍA LAYNES titulado "Identificación de transcritos de Receptores de Glutamato en etapas ontogénicas de flores y frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones ambientales" **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** 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 de la Dra. ILEANA ECHEVARRÍA MACHADO, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. (Clelia de la Peña Seaman)

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de mayo de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Nombre: M.C. Federico García Laynes

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 “Identificación de transcritos de Receptores de Glutamato en etapas ontogénicas de flores y frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones ambientales”, en el que participaste bajo la dirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero iniciar agradeciendo a Dios por haberme prestado vida para poder culminar esta etapa tan importante para mi vida, por haberme dado un momento de respiro y por considerarme hijo suyo a pesar de mis imperfecciones y mi carácter.

Es de destacar la labor que realizaron mis padres Federico García y Martha Laynes, quienes me cuidaron desde muy temprana edad con el único objetivo de amarme, protegerme, educarme y conservarme la vida a pesar de lo injusto que es este mundo. Es por ello que agradezco que me hallan cuidado y que me enseñaran valores.

También agradezco a mi hermano Sergio, quien desde muy temprana edad y de la que me acuerdo muy bien, siempre cuidó de mí en la escuela y en muchos otros lugares. Aunque soy una persona de pocas palabras, siempre la compañía de mi hermano ha sido un refrigerio para mí. También agradezco a su novia Fany por su compañía.

Agradezco los momentos que pase con mis abuelos Juan y Rosa cuando era niño y por su cariño. A mis abuelos Efrain y Obdulia por cuidarme también durante mi infancia. Ellos fueron una parte importante durante mi desarrollo, por eso “gracias”.

Mis tíos: José Laynes, José García, Abraham, Angélica, Nidia, Irma y Margarita son un pilar importante pues me han brindado consejos y ayuda incondicional, por lo tanto, agradezco todos los buenos momentos pasados con ellos.

Quiero agradecer a la doctora Ileana Echevarría a quien admiro por sus cualidades como investigador, por ser mi asesora y por todos aquellos consejos que me han hecho ir mejorando mis habilidades, tanto en la parte teórica como en la parte experimental durante la maestría. Más que una asesora, a la doctora la considero una amiga. Agradezco los consejos y recomendaciones del doctor Manuel Martínez durante los tutoriales y en el escrito de esta tesis.

También agradezco a la Dra. Sara y la Dra. Virginia por sus consejos durante los tutoriales y en la revisión del documento de tesis. Agradezco también al doctor José Luis Andrade Torres por sus consejos durante la revisión de la tesis y por la facilidad de los equipos para medición de los parámetros ambientales.

La maestra Fátima Medina fue un apoyo muy importante en la parte estadística de mis resultados, así como en consejos de técnicas experimentales, es por ello que aprecio y agradezco su ayuda.

No cabe duda que la parte fotográfica de esta tesis fue resultado del maestro Ramón, a quien agradezco su ayuda y sus consejos. También agradezco su ayuda durante la parte experimental en el invernadero.

Agradezco a mis amigos del laboratorio: Anahí, Fabiola, Marta, Camilo, Jafet por todos esos buenos momentos compartidos durante estos dos años de maestría, pues la convivencia hizo muy amena y agradable nuestra estancia en el laboratorio.

Agradezco también la ayuda y compañía de mi novia Arale, por sus palabras de aliento y por comprensión.

Quiero agradecer también a Gilberto, Nacho, Ricardo, Kalet, Rut por su amistad incondicional.

Por último, y no menos importante, agradezco al CONACYT por la beca de maestría 618935 la cual me permitió dedicarme de tiempo completo a mi proyecto de investigación. También agradezco al CICY por las instalaciones prestadas, y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en donde realice la parte experimental de este proyecto.

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico a mis padres quienes creyeron en mí y no escatimaron esfuerzo alguno para que no me faltara nada. A ellos a los que nunca poder pagar todo lo que han hecho por mí.

A mi hermano Sergio quien siempre ha creído en mí y ha estado siempre dispuesto a darme su ayuda.

A las personas que en mi entorno hacen los días cada vez mejor y que siempre su deseo ha sido convertirme en una persona de provecho.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1. Receptores de glutamato (GluRs) en los mamíferos.....	3
1.2. Clasificación de los GluR en mamíferos.....	3
1.3. Agonistas y antagonistas de los iGluR	6
1.4. Regulación transcripcional de los <i>iGluRs</i>	7
1.5. Función de los iGluRs en animales	9
1.6. GLR en plantas.....	11
1.7. Localización de los GLRs en plantas	14
1.8. Función de los GLR en plantas.....	14
1.9. Regulación de la transcripción de los <i>GLRs</i> en plantas	17
1.10. Agonistas de los GLRs en plantas	19
1.11. Estrés hídrico y el papel de los GLRs bajo estas condiciones.....	19
1.12. Importancia del nitrógeno en la nutrición mineral y posible papel de los GLR en la percepción de dicho nutriente en las plantas	22
1.13. Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) como modelo de estudio.....	23
1.14. Factores que afecta la reproducción en chile habanero	24
1.15. Objetivo general.....	27
1.16. Objetivos específicos.....	27
1.17. Justificación	28
1.18. Estrategia experimental	29
CAPITULO 2.....	30
GLRs PRESENTES EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE CHILE HABANERO Y EL PERFIL DE EXPRESIÓN FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO.....	30
2.1. INTRODUCCIÓN.....	30
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.2.1. Identificación de secuencias tipo GLRs en el genoma de <i>Capsicum annuum</i>	32

2.2.2. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los <i>GLRs</i> de <i>C. chinense</i>	33
2.2.3. Material vegetal	35
2.2.4. Aplicación de los tratamientos de estrés y dosis de nitrógeno	36
2.2.5. Etiquetado de flores y colecta de frutos	37
2.2.6. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y el déficit hídrico sobre el peso fresco de las plantas	37
2.2.7. Análisis estadístico	38
2.2.8. Extracción de ARN a partir de cada estado de desarrollo de flor y fruto	38
2.2.9. Síntesis de la primera cadena de ADNc y PCR punto final de los <i>GLRs</i> en chile habanero	39
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
2.3.1. Condiciones ambientales dentro del invernadero y efecto de los tratamientos de riego sobre el potencial hídrico del suelo	41
2.3.2. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y de riego sobre la floración y fructificación de las plantas de chile habanero	45
2.3.3. Porcentaje de aborto floral en los diferentes tratamientos	47
2.3.4. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y de riego sobre la biomasa de las plantas	48
2.3.5. Análisis molecular	50
2.4. CONCLUSIÓN	55
CAPITULO 3	56
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS <i>CcGLRs</i> DE CHILE HABANERO	56
INTRODUCCIÓN	56
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS	56
3.1.1. Generación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	56
3.1.2. Amplificación de los <i>CcGLRs</i> identificados y purificación de los productos de PCR	57
3.1.3. Purificación de ADN plasmídico	58
3.1.4. PCRs y análisis de restricción de los fragmentos clonados	59
3.1.5. Secuenciación de los fragmentos clonados	60
3.1.6. Identificación de las secuencias completas en el genoma de <i>C. chinense</i> Jacq.	60

3.1.7. Análisis filogenético y porcentaje de identidad de las secuencias encontradas en el genoma de chile habanero	60
3.1.8. Identificación de dominios en los CcGLRs.....	61
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3.2.1. Plásmidos purificados.....	61
3.2.2. Análisis de restricción y PCR de los fragmentos clonados	62
3.2.3. Análisis de los productos secuenciados	64
3.2.4. Análisis filogenético de los CcGLRs identificados.....	66
3.2.5. Identificación de los dominios característicos en los CcGLRs	70
3.3. CONCLUSIÓN	74
CAPITULO 4.....	75
DISCUSIÓN GENERAL	75
BIBLIOGRAFÍA	79
CAPITULO 5.....	91
CONCLUSIONES GENERALES	91
PERSPECTIVAS.....	92
ANEXO I	93

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de los receptores de glutamato ionotrópicos de mamíferos.....	4
Figura 1.2. Estructura general de un receptor de glutamato inotrópico.....	5
Figura 1.3. Ensamblaje de un receptor de glutamato..	6
Figura 1.4. Elementos en los promotores de las subunidades NMDA, AMPA y KAINATO..	8
Figura 1.5. Organismos donde se han identificados iGluRs y secuencias homologas.....	10
Figura 1.6. Estructura general de los GLR de plantas..	11
Figura 1.7. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de GLRs e iGluRs.....	13
Figura 1.8. Procesos donde se induce la expresión de los GLRs en diferentes clados..	17
Figura 1.9. Mecanismo de respuesta al estrés hídrico a mediano y largo plazo.	21
Figura 1.10. La sobreexpresión de <i>OsGLR1.1</i> o <i>OsGLR1.3</i> , aumenta la tolerancia al estrés hídrico en plantas de arroz y <i>A. thaliana</i> ..	22
Figura 1.11. Diagrama experimental.	29
Figura 2.1 Dominio de unión al ligando S2 donde se diseñaron los oligonucleótidos.	34
Figura 2.2. Equipos para mediciones de los parámetros ambientales.....	36
Figura 2.3. Tratamientos y distribución de las plantas dentro del invernadero.....	37
Figura 2.4. Muestras de ARN extraídas a partir de botón floral, flor, frutos de 10, 25 y 45 días post-antesis (DPA).....	40
Figura 2.5. Perfil de expresión de los GLRs evaluados en los diferentes tejidos..	41
Figura 2.6. Registro de temperatura (A), humedad relativa (B) e intensidad lumínica (C) dentro del invernadero.....	43
Figura 2.7 Registro del potencial hídrico del suelo en MPa.....	44
Figura 2.8. Morfología de las plantas sometidas a estrés hídrico..	44
Figura 2.9. Numero de flores y frutos por planta bajo los tratamientos.....	45
Figura 2.10. Porcentaje de aborto floral en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de nitrógeno (1, 7.5 y 15 mM) y de riego (+R: con riego normal, -R: estrés hídrico).....	48
Figura 2.11. Efecto de los tratamientos sobre la fisiología de las plantas de chile habanero (var. Génesis®).....	50
Figura 2.12. Muestras de ARN de todos los estadios de los diferentes tratamientos.....	51

Figura 2.13. Perfiles de expresión de los <i>CcGLRs</i> en respuesta a la dosis de nitrógeno..	52
Figura 2.14. Perfiles de expresión de los <i>CcGLRs</i> en respuesta al estrés hídrico.....	53
Figura 3.1. Vectores utilizados para la clonación de los <i>CcGLRs</i>	59
Figura 3.2. Fraccionamiento de los plásmidos purificados en un gel de agarosa al 1 % (p/v) y teñidos con bromuro de etidio.	62
Figura 3.3. Digestión de pGEM®-T Easy para la liberación de fragmentos de <i>CcGLRs</i> ..	63
Figura 3.4. Amplificación por PCR punto final de los diez fragmentos <i>CcGLRs</i> clonados.	64
Figura 3.5. Árbol filogenético de GLRs de diferentes especies vegetales.	67
Figura 3.6. GLRs identificados en las diferentes especies vegetales.	69
Figura 3.7. Representación lineal de los dominios encontrados en 16 de los <i>CcGLRs</i> ..	70
Figura 3.8. Dominios transmembranales del <i>CcGLR2.5</i> de chile habanero.....	71
Figura 3.9. Porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos de los <i>CcGLRs</i> ...	73

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación de los receptores de glutamato de <i>Arabidopsis</i> en tres clados..	11
Cuadro 1.2. Descripción taxonómica del chile habanero.....	24
Cuadro 2.1. Características de los receptores de glutamato identificados en el genoma de <i>C. annuum</i> (<i>CaGLRs</i>)	33
Cuadro 2.2. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los 12 <i>GLRs</i> de <i>C. chinense</i>	34
Cuadro 2.3. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y de riego sobre la producción de biomasa de las plantas de chile habanero.	49
Cuadro 3.1. Secuencias completas de <i>CcGLRs</i> identificados en el genoma de <i>C. chinense</i> Jacq.....	65
Cuadro 3.2. Otras secuencias homologas identificadas en el genoma de <i>C. chinense</i> ..	65

ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AtGLR	Receptor tipo glutamato de <i>Arabidopsis thaliana</i>
CCNS	Canal catiónico no selectivo
DAT	Dominio amino terminal
DCT	Dominio carboxilo terminal
EcGLR	Receptor tipo glutamato de <i>Echinochloa crus-galli</i>
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
GLR	Receptor tipo glutamato
iGluR	Receptor de glutamato ionotrópico de animales
KAINATO	Ácido kaínico
M1- M4	Dominios transmembranales 1-4
mGluR	Receptor de glutamato metabotrópico de animales
NMDA	N-metil-D-aspartato
OsGLR	Receptor tipo glutamato de <i>Oryza sativa</i>
RsGLR	Receptor tipo glutamato de <i>Raphanus sativus</i>
S1 y S2	Dominios de unión a ligando
SIACON	Servicio de información agroalimentaria y pesquera
SIGLR	Receptor tipo glutamato de <i>Solanum lycopersicum</i>
SNC	Sistema nervioso central

RESUMEN

Los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs) son proteínas integrales de membrana que fueron inicialmente descubiertos en mamíferos y cuya función principal es llevar a cabo la mayoría de las neurotransmisiones excitatorias en el sistema nervioso central (SNC). Este tipo de proteínas se han relacionado con funciones tan esenciales como el aprendizaje, la memoria y el desarrollo de las redes neuronales. Una mala regulación de estas proteínas puede conducir a desórdenes neurológicos agudos, como la epilepsia y el Parkinson. Sorprendentemente, se han encontrado secuencias análogas a los iGluRs en el genoma de organismos que no poseen un SNC, como las bacterias y las plantas. A las secuencias identificadas en el genoma de las plantas se les denominó GLRs (receptores tipo glutamato). Entre las especies vegetales donde se han identificado estas proteínas se encuentran tomate, arroz, rábano, *Arabidopsis thaliana* y *Echinochloa cruz-galli*, siendo las de *A. thaliana* las más estudiadas. Los trabajos publicados sugieren que los GLRs participan en varios procesos biológicos de las plantas, como el desarrollo reproductivo, el balance carbono-nitrógeno, la respuesta al estrés hídrico, entre otros. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la posible participación de *GLR* de *Capsicum chinense* (CcGLRs) durante la ontogenia floral y del fruto de esta especie, a través de un acercamiento de sus perfiles de transcritos durante estos procesos. Los resultados mostraron que la expresión de 12 *CcGLR* fue dependiente del tipo de GLR y del estado de desarrollo. También, se observó que los niveles de transcritos de algunos de éstos se modifican cuando las plantas son sometidas a distintas dosis de nitrógeno y en condiciones de déficit hídrico. En un estudio más profundo y a partir de la clonación de 10 de estos fragmentos amplificados, se lograron identificar en el genoma de chile habanero un total de 22 secuencias con similitud a GLR. De éstas, 16 presentaron todos los dominios característicos de los GLR de plantas. Estos resultados abren nuevas rutas de estudios en la elucidación de la funcionalidad de estas proteínas en esta especie vegetal.

ABSTRACT

The ionotropic glutamate receptors (iGluRs) are integral membrane proteins that were initially discovered in mammals and whose main function is to carry out most of the excitatory neurotransmissions in the central nervous system (CNS). This type of proteins have been found to function in learning, memory and the development of neural networks. Dysregulation of these proteins can lead to acute neurological disorders, such as epilepsy and Parkinson's. Surprisingly, analogous sequences to iGluRs have been found in other organism's genomes that do not possess a CNS, such as bacteria and plants. The sequences identified in the genome of the plants were called GLRs (glutamate-like receptors). Among the plant species where these proteins have been identified are tomato, rice, radish, *Arabidopsis thaliana* and *Echinochloa cruz-galli*, being those of *A. thaliana* the most studied. Published data suggest that GLRs participate in several biological processes of plants, such as reproductive development, carbon-nitrogen balance, the response to water stress, among others. The aim of this project was to study the *Capsicum chinense* (CcGLRs) GLRs possible participation during the floral and fruit ontogeny of this specie, through their transcript profiles during these processes. The results showed that the expression of 12 CcGLRs were dependent on the type of GLR and the stage of development. Also, it was observed that the levels of transcripts of some of these genes are modified when the plants are subjected to different nitrogen doses and under conditions of water deficit. In a more extensive study we cloned 10 fragments of the CcGLRs, a total of 22 sequences with high similarity to GLR were identified in the genome of habanero pepper. Nevertheless, 16 presented all the characteristic domains of plant GLRs. These results give new insights and establish new ways in the study for the elucidation of the function of these proteins in this plant specie.

INTRODUCCIÓN

Los receptores de glutamato (GluRs), descubiertos inicialmente en mamíferos, median la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria en el sistema nervioso central (SNC) de estos organismos. En adición, a estos GluRs se les ha atribuido la participación en el desarrollo de la memoria y el aprendizaje, así como en la modulación de la formación de las redes neuronales (Monaghan *et al.*, 1989). Los GluRs son proteínas integrales de membranas constituidas por cuatro subunidades individuales diferentes o similares, para dar lugar a un complejo homo- o heterotetramérico (Mayer, 2006). Estos receptores son clasificados en dos grupos principales en los mamíferos: GluRs ionotrópicos (iGluRs) y GluRs metabotrópicos (mGluRs). Los iGluRs forma canales iónicos no selectivos que permiten el movimiento de iones tales como Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ a través de la membrana plasmática de las células post-sinápticas durante la sinapsis neuronal (Hollmann & Heinemann, 1994). De acuerdo con estudios farmacológicos, estas proteínas son subclasificadas en receptores tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato), tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y tipo KAINATO (ácido kaínico) (Flores-Soto *et al.*, 2012). En cambio, los mGluR no forman canales iónicos, sino que se acoplan a segundos mensajeros para llevar a cabo la producción de mensajeros intracelulares (Ozawa *et al.*, 1998).

Además de identificarse en animales e invertebrados, los iGluRs se han encontrado sorprendentemente también en organismos que carecen de SNC, como las plantas y las bacterias. El iGluR presente en bacteria (denominado GluR0) tiene la función de transportar K⁺. En plantas, a estas proteínas homólogas, se les denominó GLRs y hasta la fecha no se sabe con certeza el papel que desempeñan, aunque sus propiedades electrofisiológicas han sido demostradas (Kuner *et al.*, 2003; Maricq *et al.*, 1995).

Se ha reportado que en las plantas estas proteínas están implicadas en procesos como la arquitectura de la raíz (Vincill *et al.*, 2013), la homeostasis de calcio (Kim *et al.*, 2001), el estrés por salinidad (Singh *et al.*, 2014), la señalización por ácido abscísico (ABA), la apertura y el cierre de los estomas (Cho *et al.*, 2009), la defensa de las plantas frente a patógenos (Kang *et al.*, 2006), la señalización a larga distancia (Mousavi *et al.*, 2013), el gravitropismo (Miller *et al.*, 2010), el estrés por sequía (Lu *et al.*, 2014), la reproducción (Michard *et al.*, 2011), el balance carbono-nitrógeno (Kang & Turano, 2003), entre otros.

La sequía y la disminución de los nutrientes en el suelo son dos de los factores que más inciden en la disminución del rendimiento de los cultivos. El déficit de N es la principal causa de la disminución en los rendimientos de los cultivos, ya que es constituyente de macromoléculas esenciales para la célula, como aminoácidos, proteínas, nucleótidos y hormonas (Xu *et al.*, 2012; Anjum *et al.*, 2011). Se ha reportado que los GLR tienen un papel importante en la respuesta a tales condiciones adversas (Lu *et al.*, 2014; Michard *et al.*, 2011; Kang & Turano, 2003).

La gran mayoría de los resultados relacionados con la función de los GLRs se han centrado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En Solanaceas, donde pertenece el chile habanero, se ha reportado únicamente que en el genoma de tomate existen 13 genes con alta identidad a los GluRs de *Arabidopsis*; sin embargo, la función de estas proteínas en esta familia de plantas no ha sido estudiada. Tomando como base que algunos de los GluRs participan en la respuesta a estrés abiótico, el balance carbono-nitrógeno y en la reproducción en *Arabidopsis*, el objetivo de este proyecto fue estudiar cuáles genes *GluRs* se expresan en los órganos reproductivos de chile habanero y si esta expresión varía en las plantas sometidas a estrés abiótico, particularmente hídrico y nutricional. Se conoce, que, bajo estos estreses, el aborto floral en esta especie es mayor al 80% (Medina-Lara *et al.*, 2008), lo cual afecta grandemente la producción de esta hortaliza de gran importancia en México. El conocimiento de los perfiles de transcritos de los *GluRs* podrá permitir en un futuro tener un acercamiento de la funcionalidad de estas proteínas durante la floración y fructificación en esta especie.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Receptores de glutamato (GluRs) en los mamíferos

Los GluRs son complejas proteínas integrales de membrana distribuidas a lo largo del SNC de los mamíferos, donde constituyen el principal sistema de neurotransmisión. Estos GluRs reconocen un agonista específico y traducen el mensaje entrante en cambios de potenciales de membrana o en la síntesis de mensajeros intracelulares (Wroblewski & Danysz, 1989; Hollmann, 1994). Bajo esta base, se clasifica a los GluRs en ionotrópicos (iGluRs) y metabotrópicos (mGluRs). En los primeros, el sitio de reconocimiento del agonista se encuentra acoplado a un canal iónico y la activación provoca la apertura del canal, dando como resultado el paso de iones. En cambio, en los mGluRs el sitio de unión al ligando no está acoplado a un canal iónico, sino a una proteína de unión a GTP, cuya activación genera la síntesis de segundos mensajeros intracelulares (Wroblewski & Danysz, 1989).

Los GluRs funcionales están compuestos por el ensamblaje de cuatro subunidades idénticas o diferentes (Mayer, 2006). En los mamíferos, estas proteínas regulan una amplia gama de procesos en el cerebro, la medula espinal, la retina y la periferia del sistema nervioso. También, se sugiere que juegan papeles muy importantes en numerosas enfermedades neurológicas, lo cual ha llevado a un intenso escrutinio de investigación para revelar sus funciones dentro de estos organismos (Traynelis *et al.*, 2010).

Por otra parte, Monaghan *et al.*, (1989) mencionan que los GluRs pueden participar en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en el desarrollo de las redes neuronales, lo que los hace muy interesantes. Los estudios han sido mayormente desarrollados sobre los iGluRs. El desarrollo en la investigación de los mGluRs ha sido mucho más lento (Ozawa *et al.*, 1998).

1.2. Clasificación de los GluR en mamíferos

Los iGluRs son subclasificados de acuerdo con estudios farmacológicos y electrofisiológicos como receptores tipos: AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato), NMDA (N-metil-D-aspartato), KAINATO (ácido kaínico) y delta (δ) (los

receptores delta no tienen función de transporte) (Flores-Soto *et al.*, 2012; Traynelis *et al.*, 2010) (Figura 1.1A). En general, los iGluRs son los receptores que participan en la rápida transmisión sináptica, debido a la característica de formar canales catiónicos no selectivos (CCNS) (Schoepp *et al.*, 1999). Por otra parte, los mGluRs son clasificados en tres clases distintas (clase I, II, III), de acuerdo a estudios farmacológicos y por su similitud en la estructura primaria de las proteínas (Pin & Duvoisin, 1995).

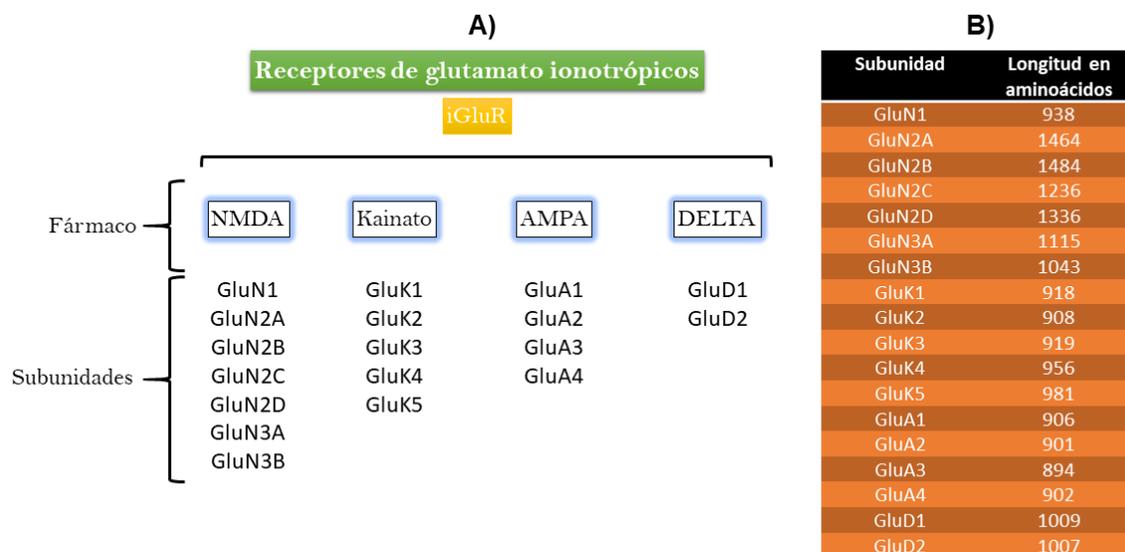


Figura 1.1. Clasificación de los receptores de glutamato ionotrópicos de mamíferos. A) Clasificación farmacológica y las subunidades de cada receptor. B) Longitud, en aminoácidos, de las subunidades mayores que se generan por procesamiento alternativo. Las subunidades que muestran procesamiento alternativo son GluA1, GluA2, GluA3, GluA4, GluK1, GluK2, GluK3 y GluN1 (modificado de Traynelis *et al.*, 2010).

En humanos se han descrito 18 subunidades diferentes de los iGluRs, las cuales presentan longitudes desde 900 residuos de aminoácidos hasta casi 1500 residuos (Figura 1.1B). Aunado a esto, la mayoría de las subunidades presentan variantes originadas por procesamiento diferencial del RNA, que aumenta el repertorio de subunidades totales que se pueden estructurar (Traynelis *et al.*, 2010). De las variantes de RNA por procesamiento alternativo se tiene que las cuatro subunidades pertenecientes a los del tipo AMPA muestran procesamiento alternativo (GluA1-GluA4), de los del tipo KAINATO las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3, y de los del tipo NMDA la subunidad GluN1. Las variantes obtenidas por este procesamiento alternativo dan lugar a dos o más RNA que

codifican a las subunidades de los receptores con propiedades farmacológicas diferentes lo que aumenta el repertorio de subunidades totales que se pueden estructurar (Dingledine *et al.*, 1999)

Los iGluRs están constituidos por cuatro subunidades individuales para formar el receptor membranar activo. A su vez, cada subunidad individual está conformada por los siguientes dominios: un dominio amino terminal (DAT), dos dominios de unión a ligando (S1, S2), cuatro dominios transmembranales (M1, M2, M3 y M4) y un dominio carboxilo terminal (DCT) (Dingledine *et al.*, 1999; Madden, 2002) (Figura 1.2).

Los iGluRs son heterotetrámeros formados por distintas subunidades de la misma clasificación, ya sea NMDA, KAINATO o AMPA, lo que les da a los receptores funcionales diferentes propiedades farmacológicas (Flores-Soto *et al.*, 2012). El ensamblaje de las cuatro subunidades es la forma funcional del receptor, tanto para percibir las señales de moléculas agonista, como la formación del canal iónico.

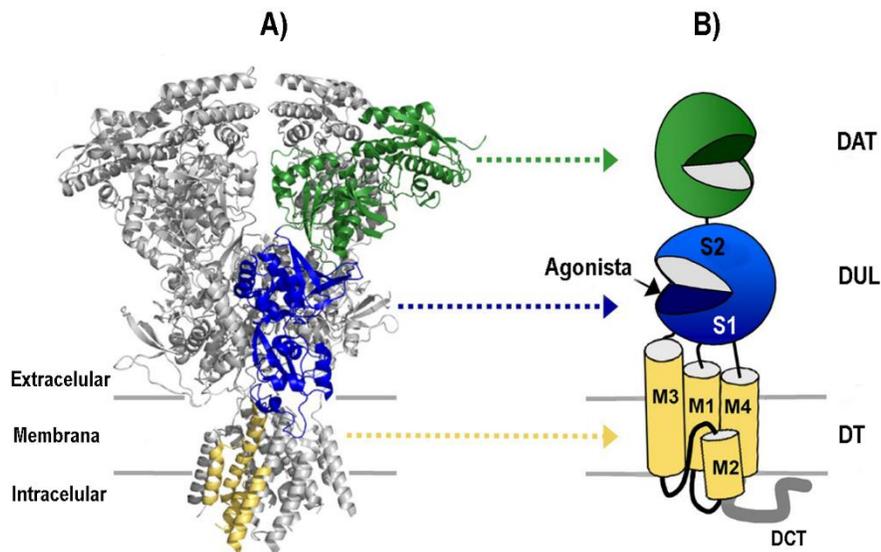


Figura 1.2. Estructura general de un receptor de glutamato inotrópico. A) Arquitectura molecular de un dímero de un iGluR (la unión de dos subunidades de receptores de glutamato). En color verde se muestra un dominio amino terminal (DAT), en azul los dominios de unión a ligando (S1 y S2), respectivamente, y en amarillo los dominios transmembranales (M1-M4). B) Representación esquemática de una subunidad del receptor donde se muestra el DAT, los DUL, los dominios transmembranales (M1, M2, M3 y M4) y el dominio carboxilo terminal (DCT). (Modificado de Yuan *et al.*, 2015).

De acuerdo con Madden (2002), el ensamblaje del receptor funcional comienza con la formación de dímeros a través de la interacción de los DAT de cada subunidad del receptor. Posteriormente, dos dímeros son unidos a través de interacciones entre los dominios S2 y los transmembranales (se le conoce como dímero de dímeros), dando lugar al complejo tetramérico que forma el GluR funcional (Figura 1.3).

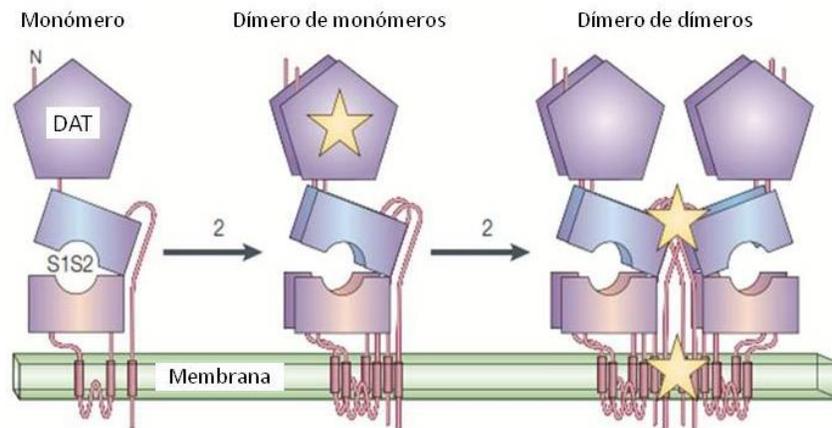


Figura 1.3. Ensamblaje de un receptor de glutamato. DAT: dominio amino terminal, S1/S2: dominios de unión al ligando (Modificado de Madden, 2002).

El DAT se encuentra en el lado extracelular de la membrana y se le ha atribuido la función de regular la desactivación, la desensibilización y el ensamble específico de los receptores. También, contiene la secuencia señal que los transporta a la membrana (Kuusinen *et al.*, 1999; Ayalon & Stern-Bach, 2001). El dominio de unión al ligando se encuentra consecutivo al DAT, también hacia el lado extracelular de la membrana, y está formado por dos secuencias (S1 y S2) que funcionan con un mecanismo de percepción de señal similar a “venus atrapamoscas”. La unión del agonista en el sitio específico provoca la apertura del canal a través de un cambio conformacional (Mao *et al.*, 1982).

Los dominios M1- M4 forman el canal iónico, el cual se encuentra cerrado en ausencia del agonista y se abre en su presencia. El DCT en mamíferos se ha encontrado que interacciona con proteínas citoplasmáticas, probablemente para la regulación del receptor (Traynelis *et al.*, 2010; Vissel *et al.*, 2001).

1.3. Agonistas y antagonistas de los iGluR

El L-glutamato es el agonista universal de los GluRs, ya que tiene la capacidad de activar tanto los iGluR como los mGluR. Posteriormente, se han identificado otras moléculas que

tienen la capacidad de funcionar como agonistas. Se demostró que el L-aspartato y la L-lisina tienen la función de activar los iGluRs del tipo NMDA (Dingledine *et al.*, 1999).

Traynelis *et al.*, (2010) mencionan que, en adición a glutamato, un número de moléculas que se encuentran naturalmente, tales como el ácido iboténico, willardiine y homólogos, así como análogos de AMPA, activan a los receptores tipo AMPA y KAINATO. Para los receptores de tipo KAINATO se ha encontrado que aparte de AMPA y ácido kaínico como agonistas, también son sensibles a willardiine y a los homólogos ACPA ((R,S)-2-amino-3-(3-carboxi-5-metil-4-isoxazol)), neoDH, (neodisiherbaína), entre otros. Por otra parte, también se ha encontrado que aminoácidos como glicina, L-serina, D-serina, L-alanina, D-alanina, D-cicloserina, y derivados de alanina, funcionan como agonistas de los iGluR tipo NMDA (Traynelis *et al.*, 2010).

Kleckner & Dingledine (1988) demostraron que los receptores tipo NMDA son únicos entre la familia de receptores de glutamato, ya que se requiere la unión simultánea de glicina y glutamato para la activación del receptor.

Los antagonistas de los iGluR típicamente poseen un grupo α -amino conectado por un sistema de anillo heterocíclico a una molécula ácida. Los primeros antagonistas competitivo ampliamente usado para los receptores tipo AMPA fueron las quinoxalinodionas: CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona), DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona) y el NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoiil-benzo (F) quinoxalina), los cuales fueron también altamente selectivos sobre los receptores NMDA, pero antagonizaron los receptores tipo KAINATO (Traynelis *et al.*, 2010).

1.4. Regulación transcripcional de los *iGluRs*

La regulación de la transcripción de los *iGluRs* en mamíferos es un proceso estrictamente controlado por diversos factores, como lo son los estímulos ambientales, modificaciones epigenéticas y los factores en *cis* y *trans*, que determinan la transcripción de los genes (Traynelis *et al.*, 2010).

Usando herramientas como ensayos de unión proteína-ADN, inmunoprecipitación y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, se han dado grandes avances en la comprensión de los elementos promotores que controlan la expresión y cómo los estímulos ambientales pueden modificar el nivel de transcripción de ciertos *iGluRs*. A pesar de estos

avances, aún permanecen preguntas que no han podido ser respondidas, tales como: ¿cuáles son los mecanismos que controlan la expresión en células específicas y en respuesta al desarrollo? (Traynelis *et al.*, 2010; Dingledine *et al.*, 1999).

Los iGluRs comparten características comunes, como: contienen múltiples sitios de inicio de la transcripción, promotores sin caja TATA y un alto contenido de GC. También, los extremos 5' UTR tienen un rango de entre 200 a 1,200 pb y varios genes contienen uno o más elementos ricos en GC que son reconocidos por el factor de transcripción Sp1 (specificity protein 1,) cerca del sitio de inicio de la transcripción. Otros elementos *in cis* que se han encontrado dentro del promotor son los reconocidos por los factores de transcripción NFkB (nuclear factor kappa beta), CRE (Cis-regulatory elements), AP1/2 (Activator protein 1 or 2), Tbr-1 (T-Box, Brain 1), NRF-1 (Nuclear respiratory factor 1) y RE1/NRSE (repreing element neuron-restrictive silencer element) (Figura 1.4), los cuales son activados en respuesta a la actividad neuronal (Carrasco & Hidalgo, 2006; Wang *et al.*, 2007; Cohen & Greenberg, 2008; Lubin *et al.*, 2008).

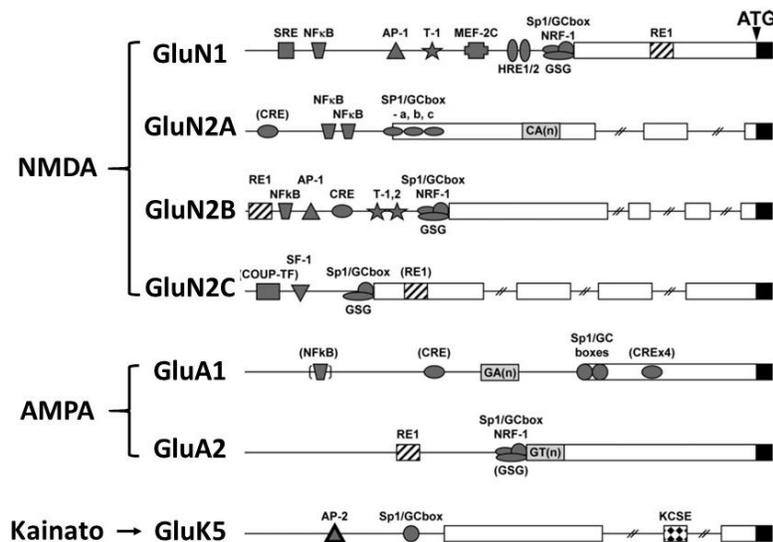


Figura 1.4. Elementos en los promotores de las subunidades NMDA, AMPA y KAINATO. Se muestran las regiones proximales del promotor de GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C pertenecientes a los receptores NMDA, los GluA1 y GluA2 perteneciente a los AMPA y GluK5 perteneciente a los receptores de KAINATO. Los promotores son mostrados como líneas delgadas y los intrones con líneas delgadas con líneas en diagonal. La secuencia 5'UTR son representadas por barras en blanco y la barra en negro designa el sitio de inicio

de la región codificante. Los elementos regulatorios en paréntesis necesitan ser confirmados experimentalmente (Modificada de Traynelis *et al.*, 2010).

1.5. Función de los iGluRs en animales

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

Los del tipo NMDA han sido los más estudiados dentro de los iGluRs. Estos receptores han sido implicados en varios procesos neurológicos, que abarcan desde la memoria y el aprendizaje, hasta problemas neurodegenerativos (Traynelis *et al.*, 2010). Por otro lado, Bard & Groc, (2011) mencionan que la principal actividad de estos receptores se centra en la plasticidad neuronal. Estos procesos son el resultado de una fina regulación del flujo de entrada de Ca^{2+} en las neuronas o de una desregulación, respectivamente, llevadas a cabo por este tipo de receptores (Lau & Tymianski, 2010). En otro estudio Bard y Groc, (2011) demostraron que los receptores del tipo NMDA son capaces de transportar Na^+ , Ca^{2+} y K^+ .

Los receptores tipo KAINATO tienen una alta homología con los receptores del tipo AMPA y están relacionado con la regulación de las transmisiones sinápticas excitatorias. Estas proteínas son activadas por la unión de KAINATO dando como resultado el flujo de entrada de cationes y la liberación de los neurotransmisores de la célula pre-sináptica de forma controlada (Pinheiro & Mulle, 2006; Lee *et al.*, 2001).

Estos receptores tipo KAINATO participan en diversos procesos como la integración sináptica, la plasticidad neuronal, la regulación de la liberación de los neurotransmisores y el control de la excitabilidad neuronal (Pinheiro & Mulle, 2006). Sin embargo, una desregulación de estos receptores puede conducir a graves problemas neurológicos, como la epilepsia, el autismo, el retraso mental, la esquizofrenia, la enfermedad de Huntington, la depresión, desordenes bipolares, entre otras anomalías (Vincent & Mulle, 2009; Lerma & Marques, 2013).

Por otra parte, los receptores tipo AMPA son los encargados de la mayoría de las neurotransmisiones excitatorias del SNC. Para desencadenar la señal, el glutamato se une

al sitio de unión al ligando, dando como resultados la apertura del poro y el paso de los cationes (puede ser Na⁺, K⁺, y/o Ca²⁺) (Traynelis *et al.*, 2010). Dentro de las funciones a las que se han ligado estas proteínas están el aprendizaje y la memoria (Derkach *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando existen problemas de regulación en este tipo de receptores se pueden desencadenar enfermedades graves, similares a las anteriores, como la epilepsia, la esquizofrenia, el retraso mental, entre otras (Traynelis *et al.*, 2010)

En resumen, como puede observarse, muchos de los procesos realizados por estos receptores son muy parecidos y las consecuencias del mal funcionamiento de estas proteínas también conduce a desórdenes neurológicos parecidos.

Sorprendentemente, secuencias homologas a los iGluRs se han identificado en diferentes organismos como invertebrados, plantas y bacterias (Figura 1.5). En bacterias se encontró un receptor de glutamato homólogo al de los animales (GluR0), el cual tiene la función de transportar K⁺ cuando el L-glutamato se une al sitio de unión al ligando de GluR0. Una diferencia estructural muy marcada es que los receptores bacterianos no contienen el largo dominio N-terminal de los receptores eucarióticos (Chen *et al.*, 1999).

En los invertebrados *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* también han sido identificados iGluRs, los cuales participan en la función locomotora de estos organismos (Maricq *et al.*, 1995; Ultsch *et al.*, 1993). Por último, en las plantas también fueron identificadas secuencias homologas a estas proteínas (Lam *et al.*, 1998).

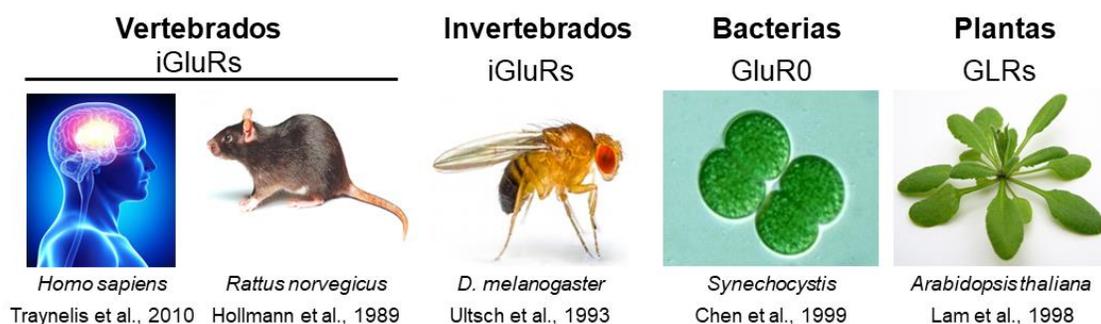


Figura 1.5. Organismos donde se han identificados iGluRs y secuencias homologas. En los vertebrados e invertebrados las secuencias de los iGluRs son muy parecidas y realizan funciones esenciales en estos organismos. En bacterias y plantas se han encontrado secuencias homologas a los iGluRs.

1.6. GLR en plantas

Los receptores de glutamato en plantas (GLRs) fueron identificados por primera vez en el genoma de *Arabidopsis thaliana* en un análisis de comparación de secuencia de nucleótidos, en los cuales se demostró que existía una gran similitud con los receptores tipo AMPA, tipo KAINATO y tipo NMDA de animales. Lo más sorprendente es que los GLRs de plantas tienen los mismos dominios que los iGluRs (Figura 1.6) (Lam *et al.*, 1998).

Posteriormente, después de la finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *A. thaliana*, se identificaron 20 GLRs, los cuales fueron clasificados en tres clados (I, II y III) de acuerdo con análisis filogenético (Cuadro 1.1) donde se utilizaron secuencias de iGluRs de animales y el receptor de bacteria GluR0 (Chiu *et al.*, 2002).

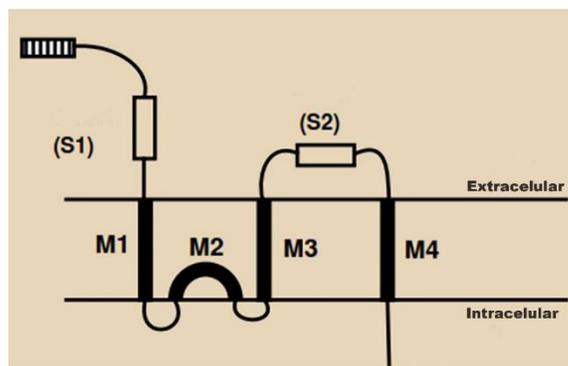


Figura 1.6. Estructura general de los GLR de plantas. En la figura se observa el dominio amino terminal (la parte final de la proteína en el lado extracelular), los dominios de unión al ligando GlnH1 y GlnH2 (en animales son S1 y S2), los cuatro dominios transmembranales (M1- M4) y el dominio carboxilo terminal en la parte intracelular (Chiu *et al.*, 2002).

Hasta la fecha, se han caracterizado GLRs en otras plantas de importancia agrícola, como tomate y arroz. En tomate se identificaron 13 GLRs (SIGluR), los cuales fueron también divididos en tres clados distintos como en *Arabidopsis* (Aouini *et al.*, 2012). En arroz se identificaron 24 secuencias (OsGLRs, Singh *et al.*, 2014), en rábano solo un GLR (Kang *et al.*, 2006) y en gramíneas se identificó también un GLR en la planta *Echinochloa crus-galli* (Li *et al.*, 2013).

Cuadro 1.1. Clasificación de los receptores de glutamato de *Arabidopsis* en tres clados. ^aLam *et al.*, 1998, ^bChiu *et al.*, 2002, ^cprocesamiento alternativo de

AF038557, ^dKim *et al.*,2001, ese encuentra depositado en GenBank como AF167355 (Modificado de Chiu *et al.*, 2002).

Clado	GLR	Nombre previo	cDNA	Variante de RNA	
I	<i>AtGLR1.1</i>	<i>AtGLR1^a</i>	AF079998	AY072065	
	<i>AtGLR1.2</i>		AY072064		
	<i>AtGLR1.3</i>				
	<i>AtGLR1.4</i>		AY072066		AY072067
II	<i>AtGLR2.1</i>	<i>AtGLR3^a</i>	AY072068		
	<i>AtGLR2.2</i>				
	<i>AtGLR2.3</i>				
	<i>AtGLR2.4</i>				
	<i>AtGLR2.5</i>				
	<i>AtGLR2.6</i>				
	<i>AtGLR2.7</i>	<i>Glur9</i>	AY072069		
	<i>AtGLR2.8</i>		AJ311495		
	<i>AtGLR2.9</i>				
III	<i>AtGLR3.1</i>	<i>AtGLR2^a, ACL1^c</i>	AF079999	AF038557	
	<i>AtGLR3.2</i>		<i>AtGluR2^d</i>		AF159498
	<i>AtGLR3.3</i>				
	<i>AtGLR3.4</i>	<i>AtGLR4^a, GLUR3^e</i>	AF167355		AY072070
	<i>AtGLR3.5</i>		<i>AtGLR6</i>		
	<i>AtGLR3.6</i>				
	<i>AtGLR3.7</i>	<i>AtGLR5</i>	AF210701		

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

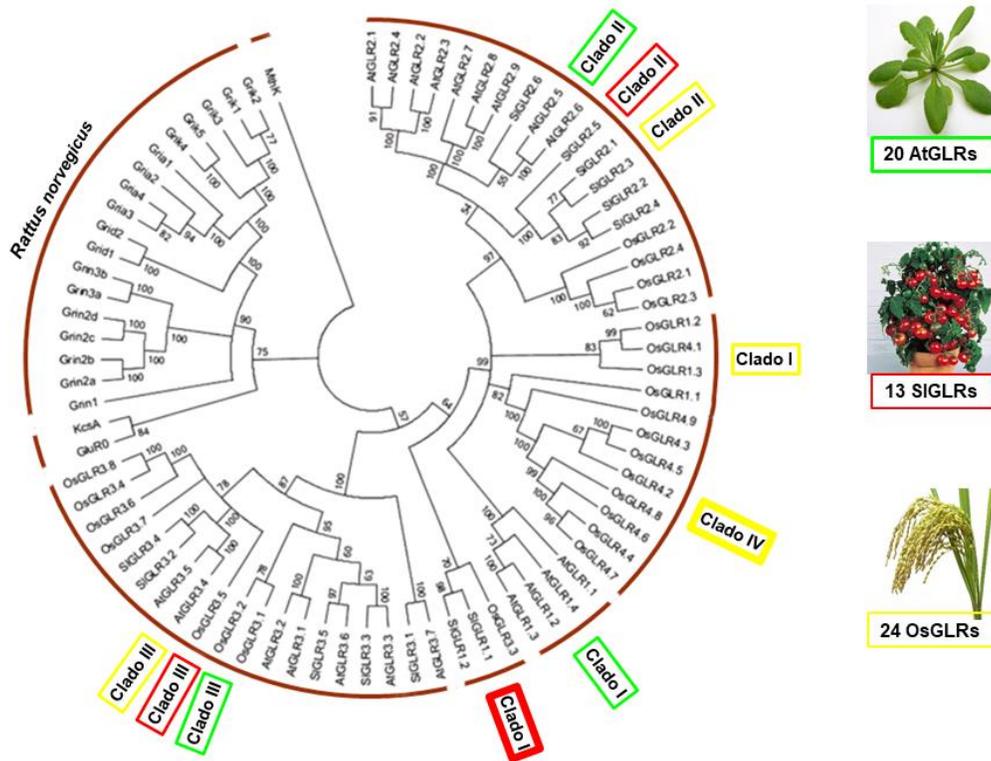


Figura 1.7. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de GLRs e iGLuRs. Las secuencias analizadas fueron: 20 de *A. thaliana* (AtGLR), 24 de *O. sativa* (OsGLR), 23 de *S. lycopersicum* (SIGLR), una de la cianobacteria *Synechocystis* (GluR0), dos de canales de potasio procarionticos (KcsA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

En el árbol filogenético se puede observar que los clados II y III son los más conservados entre las especies vegetales estudiadas y que solamente el clado I de cada una de las especies estudiadas se encuentran separados. Por otra parte, el clado IV de *O. sativa* se encuentra agrupado con el clado I de la misma especie. La estrecha relación del clado I y II de las especies vegetales estudiadas posiblemente sea resultado de que surgieron a partir de un ancestro común o que han ido aumentando su número a través del proceso de duplicación génica (Weiland *et al.*, 2016).

A pesar de que ya se han descubierto algunos GLR en plantas, la función que desempeñan en el reino vegetal no ha sido definida totalmente. Por ello, se requieren más estudios para identificar y caracterizar GLRs presentes en otras especies vegetales.

1.7. Localización de los GLRs en plantas

En animales los iGLRs se encuentran principalmente en las membranas post-sinápticas de las neuronas que se distribuyen a lo largo del SNC, donde llevan a cabo su función (Zhu & Gouaux, 2017). En plantas aún hay pocos reportes sobre la localización celular de los GLRs. De las 20 secuencias reportadas en *A. thaliana*, solo los AtGLR 1.2, 1.4, 3.2, 3.3 y 3.4 han sido identificados en la membrana plasmática (Meyerhoff *et al.*, 2005; Tapken & Hollmann, 2008; Teardo *et al.*, 2011; Vincill *et al.*, 2013; Wudick *et al.*, 2018a). Aunque inicialmente se pensó que solo se encontrarían en las membranas plasmáticas, ahora se sabe que pueden estar localizadas en las membranas de otros organelos. Teardo *et al.*, (2011) mostraron evidencias, a través de análisis bioquímicos y genéticos, de la presencia del AtGLR3.4 en las membranas de los cloroplastos de *Arabidopsis* y tabaco. En mitocondrias se encontró la presencia del AtGLR3.5 (Teardo *et al.*, 2015). Estas proteínas también fueron detectadas en las membranas de las células espermáticas y en vacuolas de las células del tubo polínico de *A. thaliana* (Wudick, *et al.*, 2018b). Estos resultados muestran una diversificación en la localización de los GLRs en las células, lo que puede ser resultado de múltiples funciones que pueden estar llevando a cabo; sin embargo, falta mucho trabajo por realizar para descubrir totalmente su función.

1.8. Función de los GLR en plantas

Elucidar la función de los GLRs ha sido una tarea muy difícil, debido a los problemas de clonación y expresión en sistemas heterólogos, así también al alto grado de redundancia que existe entre ellos. Sin embargo, desde el descubrimiento por primera vez de los GLRs en plantas (*Arabidopsis*), se han hecho esfuerzos con la finalidad de determinar su función biológica (Weiland *et al.*, 2016).

Vincill *et al.*, (2013) encontraron que las proteínas AtGLR3.2/AtGLR3.4 de *A. thaliana* participan en el desarrollo de raíces laterales, ya que líneas mutantes en sus genes da como resultado una formación de raíces laterales aberrante. Por otro lado, líneas mutantes de *A. thaliana* que sobreexpresan un gen GLR encontrado en rábano (RsGLR) presentaron cambios morfológicos como necrosis en los bordes de las hojas, estatura enana y múltiples inflorescencias secundarias (Kang *et al.*, 2006).

En plantas de arroz, a través de ensayos de microarreglos, se encontró que los genes *GLRs* participan en el estado reproductivo. Los ensayos muestran que cuatro genes (OsGLR3.1,

OsGLR3.6, OsGLR4.7 y OsGLR4.9) son regulados positivamente cuando la planta entra en la fase reproductiva y su expresión se mantuvo en diferentes estados del desarrollo de la panícula, lo que sugiere que pueden tener alguna función en este proceso (Singh *et al.*, 2014). En *A. thaliana*, los genes *GLRs* también juegan un papel importante en la reproducción, ya que líneas mutantes de los genes *AtGLR1.2* o *AtGLR3.7* muestran una disminución en el número de semillas por silicua (Tansel *et al.*, 2011). Por otro lado, Teardo *et al.*, (2015) mencionan una variante del procesamiento alternativo del gen *AtGLR3.5* que participa en la regulación de la senescencia en plantas, ya que mutantes de *A. thaliana* en este gen aceleraron su senescencia, un proceso importante para dar lugar a estructuras nuevas en las plantas.

Líneas transgénicas de *A. thaliana*, que sobreexpresaban el gen *AtGLR3.2*, mostraron efectos fisiológicos de deficiencia de Ca^{2+} , como color marrón en la planta y necrosis en las puntas de las hojas, lo que nos muestra la implicación de este GLR en la homeostasis de Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2001).

Interesantemente, se ha descubierto también la participación de los genes *GLRs* en respuesta a estrés abiótico. El gen *AtGLR3.4* de *A. thaliana* incrementa su expresión de tres a seis veces en las hojas, en respuesta a estrés por frío y daño mecánico, comparado con la línea silvestre. Este gen también aumentó su expresión en protoplastos de células epidérmicas cuando fueron sometidos a estrés osmótico con tratamientos de polietilenglicol. Sin embargo, al adicionar un bloqueador de canales de Ca^{2+} a las plantas que son sometidas a estrés por frío, los niveles de expresión de *AtGLR3.4* no se modificaron (Meyerhoff *et al.*, 2005). Este resultado sugiere que las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} son las que determinan la regulación de la expresión de este gen. En arroz, Singh *et al.*, (2014) encontraron que, bajo condiciones de estrés, como frío, sequía y salinidad, se indujo la expresión de los genes *OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.6*, *OsGLR4.7* y *OsGLR4.9*, a través de ensayos de microarreglos, lo que muestra la versatilidad de los *GLRs* a los diferentes tipos de estrés. En otra investigación, la sobreexpresión de los genes *OsGLR1.1* y *OsGLR1.3* en plantas de *A. thaliana* produjo plantas altamente resistentes a la sequía (Lu *et al.*, 2014), un problema actual muy importante que limita la producción en los cultivos.

La señalización por ABA, una hormona importante en plantas durante episodios de respuesta a estreses medioambientales, la abscisión de las hojas, la apertura estomática,

entre otras funciones (Cutler *et al.*, 2010), parece ser un punto de regulación clave a través del cual los genes GLRs ejercen su función. Kang *et al.*, (2004) demostraron que el gen *AtGLR1.1* está implicado en los procesos de germinación de la semilla y crecimiento de la raíz, dependientes de ABA. Esto se demostró a través de líneas mutantes de *A. thaliana* que fueron sometidas a ABA de forma exógena, y que mostraban retardo en los procesos mencionados. Por otra parte, *AtGLR3.5* tiene la función de contrarrestar el efecto del retraso en la germinación producido por ABA en semillas de *A. thaliana* (Schopfer *et al.*, 2015).

Sorprendentemente, se sugiere que las plantas pueden tener un papel de comunicación a largas distancias y de forma rápida, de una manera similar a como sucede en el SNC de mamíferos. Vincill *et al.*, (2013) encontraron que los productos de los genes *AtGLR3.2* y *AtGLR3.4* se encuentran únicamente en el floema de plantas de *A. thaliana* y que líneas mutantes de este gen dan como resultado una sobreproducción y colocación aberrante de los primordios radicales. Este fenotipo aberrante de los primordios radicales puede deberse a la concentración de Ca^{2+} , que se sugiere es controlada por los aminoácidos disponibles en el floema y que, en última instancia, funcionan como agonistas de los GLRs.

Unos de los antecedentes más fuertes que demuestran la hipótesis de la señalización rápida y a larga distancia es la que proporciona Mousavi *et al.*, (2013). En esta investigación, utilizando herramientas de electrofisiología y líneas mutantes, se demostró que los genes *AtGLR3.2*, *AtGLR3.3* y *AtGLR3.6* participan en la comunicación a larga distancia de una hoja a otra.

Por último y, de gran importancia, es la participación de los GLRs en la defensa de las plantas. Líneas mutantes de *A. thaliana* que sobreexpresaban el gen *RsGLR* de rábano fueron resistentes a la infección por *Botrytis cinerea*, sugiriendo que la proteína *RsGLR* está involucrado en la respuesta inmune (Kang *et al.*, 2006).

Como hemos observado hasta aquí, varios GLRs han sido estudiados y se ha encontrado que participan en muchas funciones (Figura 1.8); sin embargo, aún queda mucho camino por recorrer en la elucidación de la totalidad de funciones de estas proteínas.

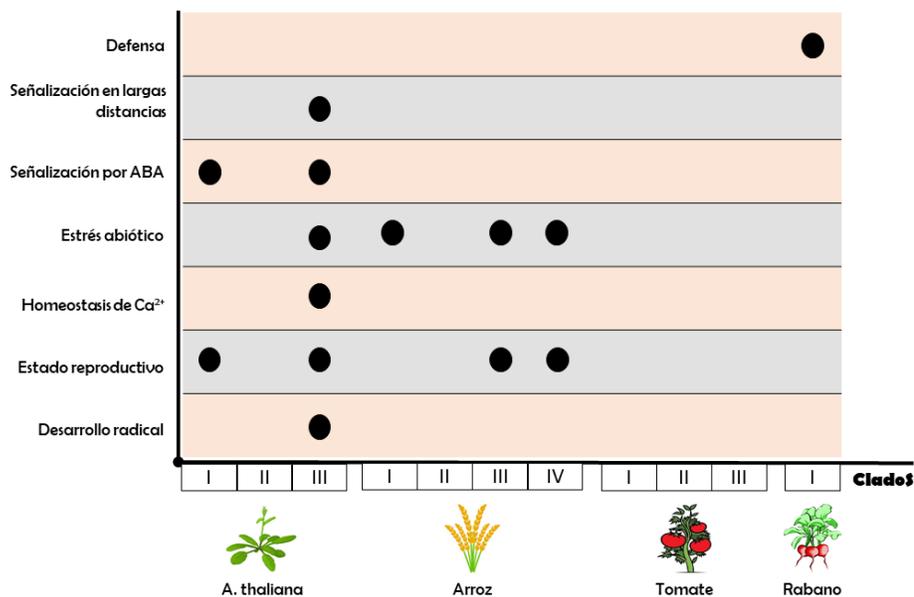


Figura 1.8. Procesos donde se induce la expresión de los GLRs en diferentes clados. Como puede observarse en la imagen, los GLRs tienen una gran versatilidad de expresión. En tomate, aun no hay información.

1.9. Regulación de la transcripción de los GLRs en plantas

En mamíferos, la abundancia de los iGluR dentro de la célula se regula por un balance entre la transcripción, la traducción, las modificaciones postraduccionales y la degradación. La regulación transcripcional de los genes iGluR ha sido objeto de estudio. En la actualidad se conoce que la expresión de los genes iGluR ocurre específicamente en el tejido cerebral y que es regulada por diversos estímulos medioambiental (Nath *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se sabe sobre la regulación transcripcional de sus ortólogos en plantas (GLRs).

En *A. thaliana* todos los genes GLR identificados se expresan (Chiu *et al.*, 2002). Además, se sabe que existen al menos dos variantes de procesamiento alternativo para los genes *AtGLR2.5* y *AtGLR3.5*, lo cual incrementa el repertorio de combinaciones entre subunidades para la formación de un receptor activo (Chiu *et al.*, 2002; Teardo *et al.*, 2015).

Los miembros de los clados I y III de *A. thaliana* se expresaron en hojas, raíz, flores y silicua, a excepción de *AtGLR3.6* que no se expresó en las hojas. Los genes pertenecientes al clado II se expresaron fundamentalmente en la raíz; no obstante, también fueron detectados

en otros tejidos. Los genes *AtGLR2.4*, *2.7* y *2.8* y los *AtGLR2.3*, *2.5*, *2.7* y *2.8* mostraron un nivel bajo de expresión en silicua y hojas respectivamente. Solo un miembro de este clado (*AtGLR2.5*) se expresó en todos los tejidos (Chiu *et al.*, 2002). En tomate, de los 13 genes *SIGLRs* localizados en el genoma, solo cuatro se expresaron. Los genes del clado I *SIGLR1.1* y *1.2* tuvieron un mayor nivel de expresión en raíz y frutos maduros. Por otro lado, únicamente un gen del clado II (*SIGLR2.2*) mostró un alto nivel de expresión en hojas, y el del clado III *SIGLR3.1* también se expresó fundamentalmente en hojas y tallos (Aouini *et al.*, 2012).

En arroz solo un gen del clado I (*OsGLR1.1*) se expresó en hojas y durante algunos estados del desarrollo reproductivo. Los miembros del clado II no mostraron una expresión considerable y del clado III los genes *OsGLR3.1*, *3.2*, *3.5*, *3.6* y *3.7* se expresaron en hoja, raíz y diferentes estados del desarrollo de la silicua. Del clado IV, los genes *OsGLR4.7* y *4.9* se expresaron de forma considerable en hoja, raíz y silicua (Singh *et al.*, 2014). Con respecto al único gen encontrado en rabano (*RsGLR1*) y en *E. cruss-galli* (*EcGLR1*) se sabe que se expresan por la identificación de los ADNc; sin embargo, no se ha realizado una evaluación minuciosa para entender la regulación transcripcional.

A través de análisis *in silico* se han identificado las ubicaciones de los GLRs en los cromosomas de tres especies vegetales. En *A. thaliana*, los 20 genes GLRs se encuentran distribuidos en los cromosomas del uno al cinco; en tomate en los cromosomas 2, 4, 5, 6, 7 y 8; en arroz en los cromosomas 2, 4, 6, 7 y 9 (Aouini *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2014). El conocimiento de la ubicación de los *GLRs* en los cromosomas puede ayudar a entender y a explicar la diversidad de los mismos por eventos de duplicación. Además, muy posiblemente la regulación de la transcripción de los genes *GLRs* en tándem sea muy parecida (Chiu *et al.*, 2002).

Roy y Mukherjee, (2016) identificaron los elementos en cis de la región promotora de cada uno de los GLRs de *A. thaliana*. Los elementos en cis RAV1-A y GATA se encontraron en 19 de los 20 *AtGLR* (a excepción del *AtGLR2.4*). De acuerdo con el análisis, a RAV1-A se le asocia el factor de transcripción AB13/VP1, el cual está asociado con la regulación de genes de respuesta a ABA durante el desarrollo de la semilla y cierre estomático. Por otra parte, el motivo GATA es un elemento de respuesta a la luz que también está asociado con

el control de la transcripción dependiente de nitrato. Lo anterior sugiere que los GLRs podrían estar involucrados en varios procesos celulares.

1.10. Agonistas de los GLRs en plantas

En la actualidad no se sabe exactamente cuáles son los agonistas de los GLRs en plantas, aunque hay una gran similitud en secuencia y dominios a los iGluRs de animales. A pesar de ello, se sugiere que lo encontrado para mamífero no puede ser extrapolado para los de planta, ya que hay pequeñas diferencias dentro del sitio de unión al ligando entre estos dos tipos de receptores, lo cual puede repercutir enormemente en su capacidad de interacción con diferentes agonistas (Weiland *et al.*, 2016). Una diferencia notable en los iGluRs es que el residuo aminoacídico Thr655 es altamente conservado y parece ser crucial para la unión de L-glutamato, mientras que los GLRs de *Arabidopsis* poseen fenilalanina en esta posición. Por ello, se ha sugerido que la glicina y, no el L-glutamato, juega el papel principal de activación de todos los GLRs de *A. thaliana* (Dubos *et al.*, 2003).

Sin embargo, muchos agonistas potenciales para los GLRs han salido a la luz. Se ha reportado que la despolarización de la membrana y el flujo de entrada de Ca^{2+} no solo son llevados a cabo por la aplicación de L-glutamato y glicina, sino también por asparagina, serina, alanina, cisteína, metionina y el glutatión (Dennison y Spalding, 2000; Qi *et al.*, 2006; Stephens *et al.*, 2008; Vincill *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Tapken *et al.*, 2013).

Weiland *et al.*, (2016) mencionan que los agonistas potenciales para los GLR de *A. thaliana* pueden ser: glutamato, glicina, asparagina, alanina, L-serina, D-serina, cisteína, glutamina, metionina, triptófano, tirosina, treonina, leucina, fenilalanina, glutatión, BMAA (beta-N-metilamino-L-alanina) y ácido cinurénico.

1.11. Estrés hídrico y el papel de los GLRs bajo estas condiciones

El estrés hídrico es uno de factores ambientales que inciden en la disminución de la productividad de los cultivos y que por lo tanto afecta la seguridad alimentaria global. El estrés hídrico provoca en las plantas una serie de cambios, a diferentes niveles: fisiológico, bioquímico y genético, con la finalidad de contrarrestar el estrés. Sin embargo, bajo esta condición ocurre un gasto de energía enorme que se ve reflejado en el desarrollo y producción de las plantas (Lisar *et al.*, 2012).

El estrés hídrico se puede presentar bajo diferentes condiciones: cuando en el suelo hay un déficit de agua, hay una alta salinidad o la tasa de transpiración por las hojas es muy alta. Esta situación provoca daños en las plantas, que incluyen la reducción en el crecimiento, los rendimientos, la integridad de la membrana, la actividad fotosintética, la nutrición e induce un estrés secundario que es el oxidativo (Lisar *et al.*, 2012; Anjum *et al.*, 2011).

Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación a la sequía. Estos mecanismos de adaptación se dividen en respuestas a largo y a corto plazo. Dentro de la respuesta a corto plazo, se consideran el cierre de los estomas, la disminución en la asimilación de carbono y la expresión de genes de respuesta a estrés. Los mecanismos de respuestas a corto plazo que se producen en tejidos de crecimiento y diferenciación son: el reconocimiento de señales por las raíces, la respuesta mediada por genes, y la inhibición del crecimiento. Por último, la respuesta a corto plazo mediada por las raíces incluye las señales directas de un déficit de agua, respuesta génica y ajuste osmótico (Anjum *et al.*, 2011).

Por otro lado, dentro de los mecanismos de adaptación a largo plazo se consideran la inhibición del crecimiento de los brotes, la reducción del área de transpiración, la respuesta génica, la aclimatación metabólica, el ajuste osmótico, el mantenimiento de la turgencia y el incremento del crecimiento de las raíces (Figura 1.9) (Chaves *et al.*, 2003).

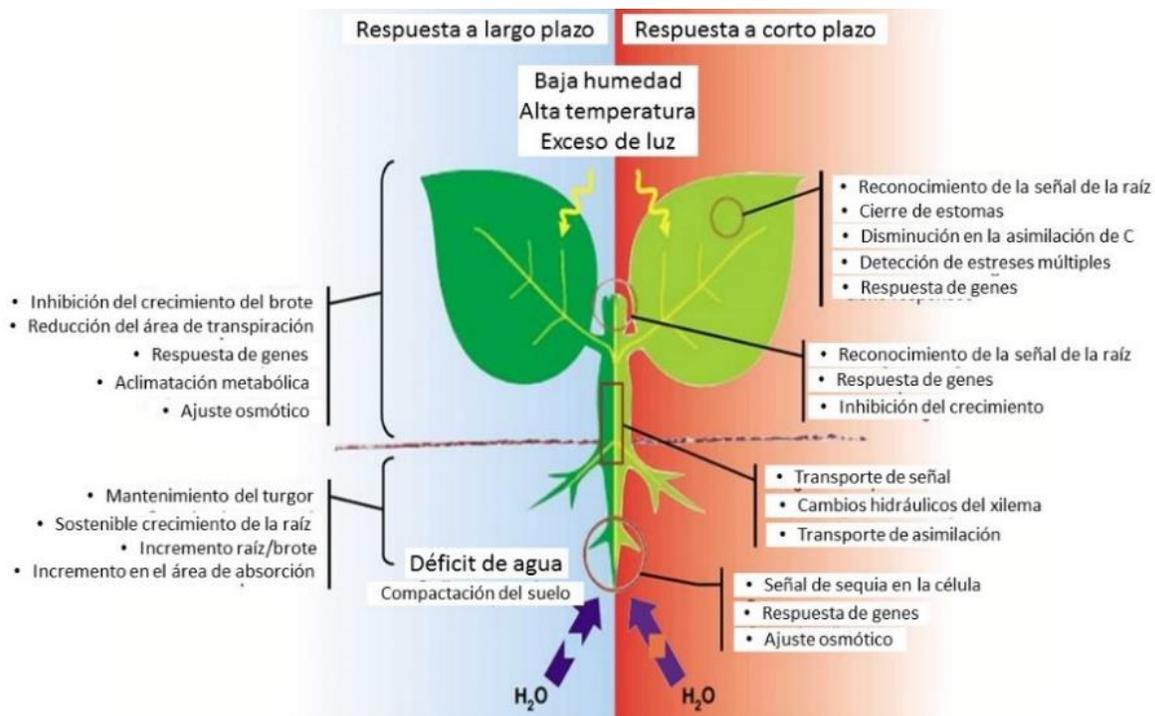


Figura 1.9. Mecanismo de respuesta al estrés hídrico a mediano y largo plazo (Modificado de Chaves *et al.*, 2003).

La respuesta de la planta a las condiciones de estrés hídrico es amplia y se han encontrado proteínas que participan en respuesta a este tipo de estrés. En un análisis de identificación de transportadores de calcio en arroz se identificaron 24 GLRs y a través de experimentos con microarreglos se encontró que ocho genes (*OsGLR1.1*, *OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.5*, *OsGLR3.6*, *OsGLR3.7*, *OsGLR4.7* y *OsGLR4.9*) modificaron su expresión en condiciones de estrés hídrico (Singh *et al.*, 2014). Por otra parte, se realizó un estudio, donde se llevó a cabo la sobreexpresión de los *OsGLR1.1* y *OsGLR1.3* en plantas de arroz, así también como en *A. thaliana*, lo que dio como resultado un incremento en la tolerancia al estrés hídrico en las líneas transgénicas que sobreexpresaron cualquiera de los dos genes (Figura 1.10) (Lu *et al.*, 2014). Esta investigación resalta la importancia de mecanismos fundamentales para la tolerancia al estrés hídrico en monocotiledóneas y dicotiledóneas, donde proteínas con estructura y función similares, pueden funcionar de manera similar en respuesta a un estrés ambiental.

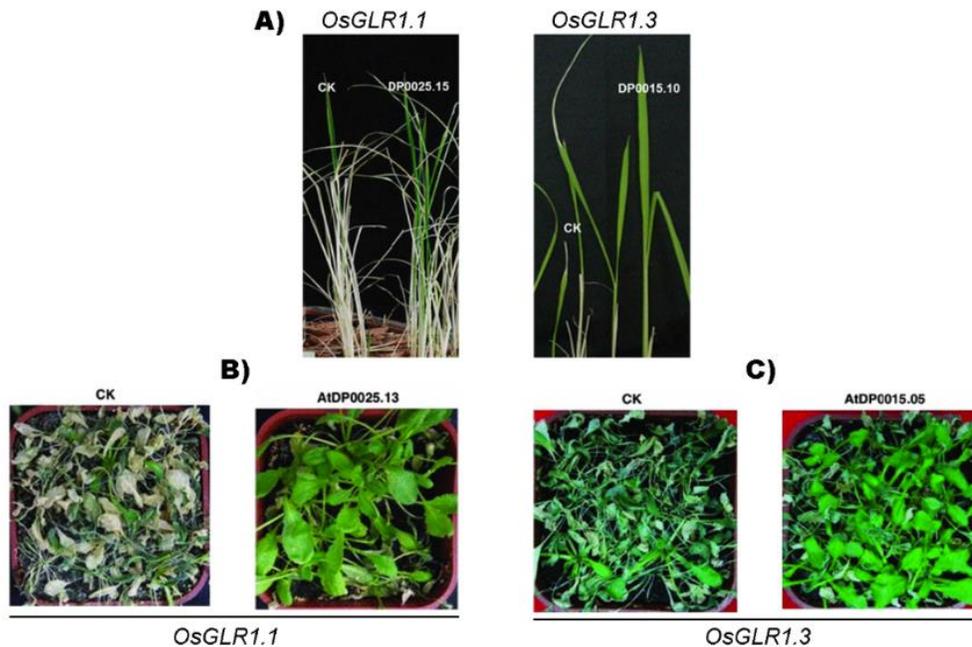


Figura 1.10. La sobreexpresión de *OsGLR1.1* o *OsGLR1.3*, aumenta la tolerancia al estrés hídrico en plantas de arroz y *A. thaliana*. A) A la izquierda se observa el fenotipo de plantas de arroz que sobreexpresan a *OsGLR1.1* (línea DP0025.15) y a la derecha plantas que sobreexpresan a *OsGLR1.3* (línea DP0015.10), que se comparan con sus respectivos testigos (plantas silvestres, CK). B) La sobreexpresión de *OsGLR1.1* en plantas de *A. thaliana* (línea AtDP0025.13) y en C) la sobreexpresión de *OsGLR1.3* (línea AtDP0015.05), aumentan la tolerancia al estrés hídrico cuando se comparan con sus respectivos testigos (CK). El estrés hídrico al que se sometieron las plantas fue de 15 días sin riego para las plantas de arroz y 13 para las de *A. thaliana*. (Lu *et al.*, 2014).

1.12. Importancia del nitrógeno en la nutrición mineral y posible papel de los GLR en la percepción de dicho nutriente en las plantas

El nitrógeno es el principal elemento limitante para el crecimiento, desarrollo y producción de los cultivos, por lo que debe ser suministrado en grandes cantidades durante todo el ciclo de vida de las plantas. La importancia radica en que el nitrógeno es constituyente de muchos componentes celulares, como los aminoácidos, nucleótidos, enzimas, coenzimas entre otras. Una deficiencia en el suministro de nitrógeno provoca rápidamente la detención del desarrollo de la planta y la presencia de síntomas debido a la deficiencia (Tegeder & Masclaux-Daubresse, 2017; Gojon, 2017).

Durante muchas décadas la aplicación en grandes cantidades de nitrógeno aumentó los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, en la actualidad este enfoque ya no puede seguir

utilizándose, debido a la severa contaminación medioambiental generada y por la elevación excesiva en el costo de los fertilizantes nitrogenados. Es por ello que actualmente se llevan a cabo numerosos esfuerzos en la investigación sobre cultivos que presenten una alta eficiencia en el uso de este nutrimento (Xu *et al.*, 2012). Para lo cual es necesario primero comprender los mecanismos básicos que controlan la adsorción y asimilación de este nutrimento.

Se ha encontrado una nueva familia de receptores que pueden participar en la regulación de la toma de nitrógeno, a través de la percepción del balance carbono-nitrógeno. Estas proteínas son los GLRs de plantas. Kang y Turano, (2003) encontraron que semillas de *A. thaliana* deficientes en la expresión de *AtGLR1.1* inhibieron su germinación cuando existía un desbalance en el balance carbono-nitrógeno del medio. Cuando solo se agregó sacarosa al medio de germinación, las semillas de la línea defectuosa en *AtGLR1.1* no germinaron, comparado con las semillas de plantas silvestres que no tuvieron problemas de germinación. Este proceso fue restaurado en la línea defectuosa de *AtGLR1.1* cuando se estableció el balance del carbono-nitrógeno. En otra investigación se encontró que las proteínas *AtGLR3.4* y *AtGLR3.2* están presentes en el floema de plántulas de *A. thaliana* y que la mutación de dichas proteínas tiene como resultado la colocación aberrante de los primordios de raíces laterales (Vincill *et al.*, 2013).

Por su parte Gent y Forde, (2017) mencionan que posiblemente la planta monitorea el contenido de nitrógeno interno a través de este tipo de receptores, ya que hay evidencia de que pueden ser activados por múltiples aminoácidos, así también que estos receptores pueden estar controlando el nitrógeno que es almacenado en los órganos sumidero (como los frutos), ya que son tejidos que demanda este nutriente en grandes cantidades.

1.13. Chile habanero como modelo de estudio

El chile habanero es un excelente modelo para estudios genéticos y bioquímicos, ya que ha demostrado ser un cultivo que sobrevive a una amplia variedad de estreses abiótico (como altas temperaturas), es una planta de ciclo rápido y sus frutos son apreciados a nivel nacional e internacional (Garruña-Hernández *et al.*, 2014; Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

Esta planta pertenece al género *Capsicum* y se clasifica dentro de la familia de las Solanáceas (Cuadro 1.2). El estado juvenil de esta planta se encuentra en un intervalo de 46 a 84 días, la floración ocurre aproximadamente a los 85 días y la fase de fructificación

posterior a los 130 días después de la germinación (Garruña-Hernández *et al.*, 2014). Estos estados pueden variar en función de las condiciones climáticas en las que se encuentre el cultivo. Produce frutos simples llamados bayas, los cuales son huecos y en cuyo interior se encuentra la semilla adherida a la placenta. Sus flores son hermafroditas y tienen de cinco a ocho pétalos, entre cinco a ocho estambres y de dos a cuatro pistilos (Lopez-Riquelme, 2003).

Cuadro 1.2. Descripción taxonómica del chile habanero (Pérez-Castañeda *et al.*, 2015)

Reino	Planta
Subreino	Plantas
División	Angiosperma
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanáceas
Genero	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>C. chinense</i>

El chile habanero es un cultivo de importancia económica y cultural para la península de Yucatán. En México ha pasado de ser solo un símbolo de identidad nacional que resalta la virilidad y picardía, a ser un cultivo de importancia en la industria alimentaria y farmacéutica (López *et al.* 2009).

De acuerdo con datos obtenidos del Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>) la producción de chile habanero en México ha ido en aumento, desde 38 toneladas registradas en el año 1999, hasta 10, 216 toneladas en 2014, debido a una creciente demanda nacional e internacional. De acuerdo con Ruiz-Lau *et al.*, (2011), México exporta chile habanero en forma de salsas, al mercado de Estados Unidos y Canadá.

1.14. Factores que afecta la reproducción en chile habanero

En el género *Capsicum* la reproducción es afectada por diversos factores como la calidad y cantidad de luz, la concentración de CO₂, la temperatura, la humedad relativa del aire, la disponibilidad de agua y el suministro de nutrientes (Wubs *et al.*, 2009). La disponibilidad

de agua y el suministro de nutrientes son de los principales factores que afectan el proceso reproductivo, debido a que, tanto los nutrientes como el agua, se necesitan para todos los procesos metabólicos desencadenados por todas las células en cada instante (Clarkson y Hanson, 1980).

Está documentado que el estrés por falta de agua repercute severamente en los rendimientos de las plantas. Esta afectación es generada como consecuencia de la disminución de CO₂, la disminución del tamaño de la hoja y del tallo, la disminución del potencial de agua y la turgencia de la célula (Lisar *et al.*, 2012; Anjum *et al.*, 2011). Con respecto al suministro de nutrientes, existen 16 elementos (N, K, Ca, Mg, P, S, Si, Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo) que son indispensables para que la planta complete su ciclo de vida (Clarkson & Hanson, 1980; Taiz & Zeiger, 2002); sin embargo, el nitrógeno es el que se necesita en mayor cantidad debido a que está presente en la mayoría de las biomoléculas de la célula (Tegeđer & Masclaux-Daubresse, 2017; Gojon, 2017). Por lo tanto, se necesita un buen control de los dos parámetros mencionados para que los órganos reproductivos lleguen hasta el establecimiento y maduración de los frutos.

En Chile habanero se ha demostrado que el estrés hídrico y la falta de nitrógeno repercuten en los procesos reproductivos, conduciendo al aborto en las etapas que abarcan desde flor en anthesis hasta frutos de 14 días post-antesis (Wubs *et al.*, 2009). Jaimez *et al.*, (2000) mencionan que un déficit hídrico de seis días en plantas de Chile habanero reduce el número de flores de 98 (plantas con riego cada tres días) a 57, y un estrés de nueve días reduce el número hasta 37. La producción de frutos también se ve afectada a los seis y nueve días con una producción de 11 y ocho toneladas/hectárea, respectivamente, comparadas con las plantas regadas cada tres días que tuvieron una producción de 18 toneladas/hectárea (datos de un año desde el trasplante). Por otro lado, Ruiz-Lau *et al.*, (2011) mencionan que un estrés hídrico de siete y nueve días disminuye la producción de flores a 145 y 135 respectivamente, comparado con las plantas control que mantienen una producción de 185 flores por planta. De la misma manera, los rendimientos de 16 frutos por planta (plantas testigo sin estrés hídrico) disminuyen a 11 y 10 en los tratamientos de siete y nueve días de déficit hídrico (registro de dos meses). En *C. annuum*, una publicación de Showemimo y Olarewaju, (2007) menciona que un estrés de 14 días sin irrigación produce una pérdida de hasta el 99 % en los rendimientos de fruto, lo cual es una pérdida total del cultivo.

Con respecto al papel que el nitrógeno ejerce sobre la reproducción de plantas de chile habanero, solo se encontró la publicación de Medina-Lara *et al.*, (2008), donde se menciona que el aumento en el número de flores por planta es dependiente de un incremento en la concentración de nitrógeno (NH_4^+). Se observó que a 1 mM de NH_4^+ se obtiene un rendimiento semanal de 76 flores por planta, y cuando se aumenta la dosis de fertilización a 15 mM, la producción semanal aumenta hasta 173 flores/planta.

Por lo tanto, los resultados anteriores nos muestran que chile habanero se ve afectado fuertemente por factores como la falta de agua y la disponibilidad de nitrógeno. Estos grandes cambios sugieren que para que esta especie realice los ajustes necesarios para llevar a cabo la producción de flores y frutos bajo estas condiciones, debe existir una gigantesca variación en la regulación de la expresión de genes relacionados con estos eventos. Por lo que este distintivo, hace de esta especie un excelente modelo para el estudio de genes relacionados con dichas respuestas.

1.15. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la posible participación de los *CcGLRs* en la ontogenia floral y del fruto de (*C. chinense* Jacq.), a través de un acercamiento de sus perfiles de transcritos durante estos procesos.

1.16. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar las respuestas a los tratamientos de las diferentes dosis de nitrógeno y el estrés hídricos sobre la producción de flores y frutos en chile habanero.
2. Identificar y analizar la expresión de los *CcGLRs* en diferentes estados ontogénicos de flores y frutos de plantas creciendo bajo condiciones ambientales normales, en estrés hídrico y diferentes dosis de nitrógeno.
3. Clonación de los fragmentos amplificados y análisis bioinformático de los *CcGLRs*.

1.17. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se han sugerido múltiples funciones de los GLRs en plantas, como su participación en la defensa contra patógenos, desarrollo, metabolismo del carbono, homeostasis de calcio y estrés abiótico. Estos resultados indican que estas proteínas pueden participar en estos procesos, lo cual ha estado relacionado con la posible existencia de múltiples combinaciones de subunidades de los GLRs para conformar el receptor activo.

En un primer estudio con *A. thaliana*, se ha sugerido que estas proteínas pueden tener una función importante en procesos reproductivos en las plantas. Sin embargo, los cambios en los niveles de transcritos de estos genes durante la floración y fructificación no han sido estudiados en alguna especie vegetal.

En el género *Capsicum* hasta el momento no hay reportes de la posible función de estas proteínas. En chile habanero la disponibilidad de nitrógeno y el estrés hídrico perturban los procesos reproductivos. Por lo tanto, evaluar el nivel de expresión de proteínas involucradas en el balance carbono-nitrógeno y estrés hídrico, como lo son los GLRs, en los estados de desarrollo reproductivo contribuiría a un mayor conocimiento de los procesos que regulan la formación de flores y frutos en el chile habanero.

1.18. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 1.11 se presenta el diseño experimental general de este proyecto.

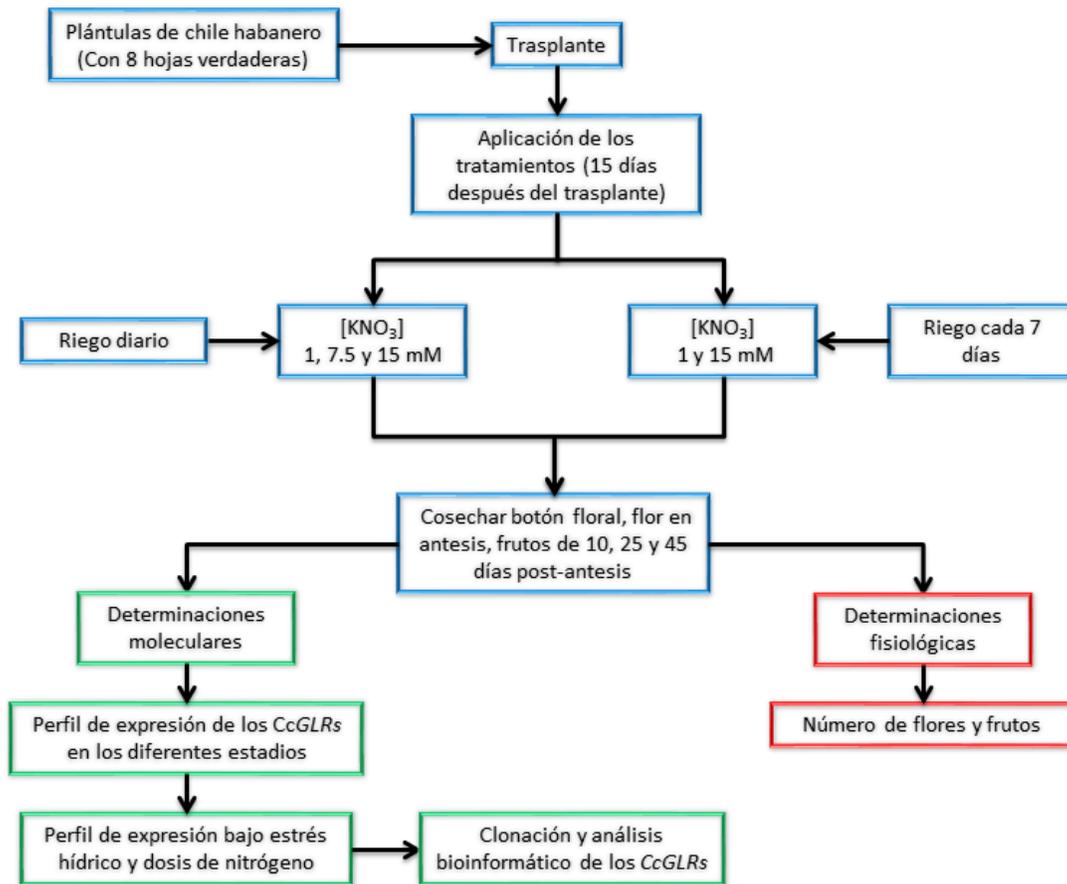


Figura 1.11. Diagrama experimental.

CAPITULO 2

GLRs PRESENTES EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE CHILE HABANERO Y EL PERFIL DE EXPRESIÓN FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO.

2.1. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones realizadas sobre los GLRs de plantas sugieren que participan en múltiples procesos, dentro de los que podemos destacar la senescencia, la geminación, la apertura y cierre estomático, el foto y gravitropismo, la homeostasis de calcio, la reproducción, el balance carbono-nitrógeno, la respuesta a estrés por sequía, entre otros (Weiland *et al.*,2016).

Muy pocos estudios abordan el papel que juegan los GLRs durante los procesos reproductivos de plantas. Sin embargo, las investigaciones realizadas demuestran que estas proteínas pueden tener una función importante en estas etapas del desarrollo. Michard *et al.*, (2011) demostraron la implicación de los AtGLR1.2 y AtGLR3.7 en este proceso, ya que líneas mutantes en esos genes resultaron en esterilidad masculina parcial en *A. thaliana*, que fue notable en la reducción del número de semillas por silicua. También, estas mutantes mostraron una morfología aberrante de los tubos polínicos.

La expresión de los GLR también se ha observado en estructuras reproductivas. Por ejemplo, Aouini *et al.*, (2012) identificaron 13 SIGLR en el genoma y demostraron que SIGLR1.1, SIGLR1.2 y SIGLR3.1 son expresados en flores y estados del desarrollo del fruto.

Con respecto al balance carbono-nitrógeno se ha encontrado que los GLRs juegan un papel importante en *A. thaliana* durante la geminación de semillas. Líneas transgénicas que sobreexpresan secuencias en antisentido sobre AtGLR1.1 (*antiAtGLR1.1*) no germinan cuando existe un desbalance en la fuente carbono-nitrógeno comparado con las semillas de la línea silvestre, las cuales germinaron bajo estas condiciones. Por otra parte, Vincill *et al.*, (2013) demostraron la expresión específica en el floema de los AtGLR3.2 y AtGLR3.4, y al obtener mutantes de los mismos, éstas mostraron una sobreproducción y posicionamientos aberrante de los primordios de raíces laterales. Estos autores concluyeron que los aminoácidos presentes en el tejido vascular podrían estar actuando a

través de los heterotetrámeros formados por los *AtGLR3.2/AtGLR3.4* percibiendo el balance de carbono y nitrógeno con el fin de regular el desarrollo radical.

En el caso de GLRs implicados en la respuesta de la planta al estrés por sequía muy pocas investigaciones se han llevado a cabo. En arroz y *A. thaliana* la sobreexpresión de los *OsGLR1.1* y *OsGLR1.3* dan como resultado plantas que tienen una mayor tolerancia al estrés hídrico (Lu *et al.*, 2014). En otra investigación, Singh *et al.*, (2014) encontraron que en condiciones de estrés por sequía los *OsGLR1.1*, *OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.5*, *OsGLR3.6*, *OsGLR3.7*, *OsGLR4.7* y *OsGLR4.9* modificaron su expresión.

Se sugiere que los ligandos o agonistas de los GLRs son aminoácidos y por lo tanto pueden estar funcionando como sensores del estado nutricional de las plantas a través de señales llevadas a cabo por Ca^{2+} (Vincill *et al.*, 2013). Por tanto, conocer cuáles GLRs modifican su expresión bajo condiciones variadas de disponibilidad de nitrógeno, así como en estrés hídrico permitiría una comprensión más amplia de cuales GLRs están implicados en la respuesta de la planta, a nivel reproductivo, para hacer frente a los cambios ambientales.

El poco conocimiento que se tiene sobre los GLRs de plantas durante la reproducción se ha realizado en *A. thaliana* (Michard *et al.*, 2011) y transferir ese conocimiento a especies vegetales diferentes es difícil, particularmente para aquellas de importancia agrícola que no pertenecen a la familia de esta planta modelo.

El chile habanero es una planta de importancia económica y cultural para el estado de Yucatán, ya que sus frutos son valorados por sus colores, aroma y lo más resaltante de esta variedad “su picor” (Rodríguez *et al.*, 2013; Ruiz-Lau *et al.*, 2011). Sin embargo, en el género *Capsicum* está documentado que la disminución en los rendimientos de frutos en gran parte es consecuencia del aborto floral. El aborto floral se presenta en los estados de flores en antesis hasta frutos de 14 días posteriores a la antesis (Wubs *et al.*, 2009) y se ha observado que el estrés y la disponibilidad de nitrógeno son factores que inciden en la reproducción de este género.

Específicamente, sobre chile habanero existe muy poca información acerca del efecto del estrés hídrico y la disponibilidad de nitrógeno en la reproducción. Ruiz-Lau *et al.*, (2011) mencionan que un estrés hídrico de siete y nueve días disminuye los rendimientos de flores/planta a 144 y 135 respectivamente, cuando se comparan con las plantas con riego

normal que contenían 185 flores/planta (en un periodo de registro de dos meses). La producción de frutos también se vio afectada, observándose 11 y 10 frutos en los tratamientos de siete y nueve días de déficit hídrico, respectivamente.

En la evaluación del efecto del nitrógeno sobre la reproducción de chile habanero, Medina-Lara *et al.*, (2008) mencionan que el aumento en la producción de flores y frutos es dependiente de un aumento en la disponibilidad de nitrógeno. A 1 mM de NH_4^+ se obtuvieron 76 flores y 13 frutos/planta (en un periodo de 2 meses) y conforme se aumentó la dosis aumentaron los rendimientos. A una dosis límite de 15 mM se obtuvo una producción de 173 flores y 159 frutos/planta.

Por lo tanto, estos grandes cambios en la producción de flores y frutos, como consecuencias del estrés hídrico y la disponibilidad de nitrógeno, tienen que ser regidos en gran parte por enormes variaciones en los perfiles transcriptómicos (Ohama *et al.*, 2017; Gent & Forde, 2017). Esto da lugar a un excelente modelo vegetal para el estudio de genes y proteínas que estén implicados en los procesos reproductivos.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la presencia de *CcGLRs* putativos y su nivel de expresión en cinco etapas del desarrollo reproductivo de chile habanero (botón floral, flor en antesis y frutos de 10, 25 y 45 días pos-antesis), cuando lograr perturbar los procesos reproductivos en chile habanero a través del estrés hídrico y diferentes dosis de nitrógeno con la finalidad de.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Identificación de secuencias tipo GLRs en el genoma de *Capsicum annuum*

Trece secuencias de *SlGLRs* identificadas y caracterizadas en el genoma de tomate (Aouini *et al.*, 2012) fueron tomadas como base para la identificación de proteínas homologas en el genoma de *C.annuum*. A través de un análisis de comparación de secuencias de nucleótidos entre los *GLRs* identificados en *S. lycopersicum* y el genoma de *C. annuum*, se identificaron 12 secuencias en este último que contenían todos los dominios característicos de los *GLRs* (M1-M4, S1, S2, carboxilo y amino terminal). La base de datos utilizada para la búsqueda de las secuencias fue SOL Genomics Network (<http://www.solgenomics.net>).

Las características de los *GLRs* encontrados en el genoma de *C. annuum* se muestran en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Características de los receptores de glutamato identificados en el genoma de *C. annuum* (*CaGLRs*)

Gen	Cromosoma	Longitud (pb)	Número de accesión
<i>CaGLR1.1</i>	4	2733	CA04g18670
<i>CaGLR1.2</i>	2	2787	CA02g04450
<i>CaGLR2.1</i>	6	2934	CA06g15760
<i>CaGLR2.2</i>	6	2868	CA06g15640
<i>CaGLR2.3</i>	6	2901	CA06g15750
<i>CaGLR2.4</i>	6	2523	CA06g15660
<i>CaGLR2.5</i>	6	2832	CA06g15650
<i>CaGLR3.1</i>	7	2724	CA07g12240
<i>CaGLR3.2</i>	7	2832	CA07g12250
<i>CaGLR3.3</i>	4	2838	CA04g22950
<i>CaGLR3.4</i>	4	2808	CA04g07100
<i>CaGLR3.5</i>	2	2811	CA02g20070

2.2.2. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los *GLRs* de *C. chinense*

Teniendo como base que la variación entre genomas de variedades del género *C. annuum* y *C. chinense* es muy baja (0.35 - 1.85 %) (Kim *et al.*, 2014), se utilizó la región S2 (dominio de unión al ligando) de cada receptor, para llevar a cabo el diseño de oligonucleótidos (Figura 2.1). El software utilizado para el diseño fue Oligo.net y se tomaron en cuenta que los oligonucleótidos mantuvieran un 50 % de GC, así como la verificación de no formar estructuras secundarias que interfirieran en la reacción. Diseños en esta región fueron llevados a cabo por Aouini *et al.*, (2012) obteniendo exitosamente la identificación de los 13 *SIGLRs*.

En total se diseñaron 12 pares de oligonucleótidos para la amplificación de los *CaGLRs* de *C. chinense*, con secuencias generalmente de 20 pb, amplicones desde 113 a 337 pb de longitud y temperaturas por encima de los 50 °C (Cuadro 2.2).

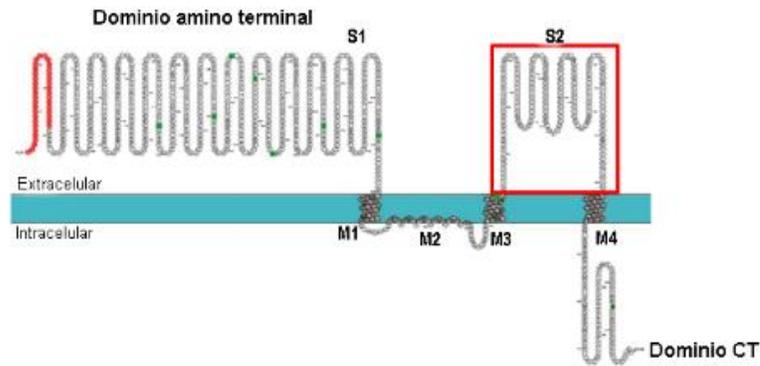


Figura 2.1 Dominio de unión al ligando S2 donde se diseñaron los oligonucleótidos. En el cuadro rojo se marca la región S2 y en un extremo, hacia el amino terminal (también en rojo) está el péptido señal de excreción (modificado de Weiland *et al.*,2016).

Cuadro 2.2. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los 12 GLRs de *C. chinense*.

Nombre cebador	Secuencia	Tm (°C)	Amplión (pb)
F_GLR1.1	TCAAGCCAGAGAACATCAAG	51.3	306
R_GLR1.1	CAACTGATGAAGAAGAGCAA		
F_GLR1.2	GGACGATTATCCAAAGGAAC	52.6	295
R_GLR1.2	GAGGCTATCTGTTTCATCGG		
F_GLR2.1	CAAATTCAGGAGTTACAGCA	51.4	251
R_GLR2.1	TAAACTCTCCCTCCATCACC		
F_GLR2.2	AGAATGGAGAATATGTTGGG	50.7	258
R_GLR2.2	TTACAAGTCCAAAGCCAGCA		
F_GLR2.3	GAGGAGTTATCGCACATTGG	52.6	161
R_GLR2.3	CGGCAGCTTTGTACATTGGA		
F_GLR2.4	AGAGGAAGTAAAAATGGAGG	50.8	266
R_GLR2.4	GCCATTCCATCTTTTGTTC		
F_GLR2.5	TAAAAATGGAGGTGTTGCTG	51	200
R_GLR2.5	TCGTAATCTCTCCTTGCTTC		
F_GLR3.1	GACATTCTCAACATAGCTCCA	50.5	113
R_GLR3.1	TCATCAACAACCTGCCATCAC		
F_GLR3.2	AGAAAGGTCCGCAAGGTGGT	56.4	209
R_GLR3.2	TTGGAGGTCGCCGTTTCTG		
F_GLR3.3	TGCAGAACGGTATTGGAG	54.1	337
R_GLR3.3	GTCTAAACTGCACGCACTTC		
F_GLR3.4	TCATTGGGGAGCTACGTGTT	52.6	266
R_GLR3.4	TGACAGTTGAAGGATAGCAG		
F_GLR3.5	TCAGTTGGGTTTATTGCTC	52.6	270
R_GLR3.5	TGTC AATAGCGAGAGGAGAG		

2.2.3. Material vegetal

El establecimiento de las plantas de chile habanero y el desarrollo del experimento se llevó a cabo entre los meses de septiembre del 2017- marzo del 2018.

Semillas de chile habanero (de la variedad Génesis fueron sembradas en una charola de unicel (capacidad de 200 cavidades) conteniendo peat moss como sustrato con buena humedad. La charola fue cubierta con una bolsa negra y se dejó en un cuarto de cultivo durante seis días a 25 °C. Después de iniciada la germinación de las plántulas, la charola fue destapada y se colocó en condiciones de fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad). Las plántulas fueron regadas con agua hasta que aparecieron las primeras hojas verdaderas, momento en el que se inició la fertilización una vez a la semana con @Miracle-Gro, un fertilizante que contiene macro y micronutrientes. Cuando las plantas cumplieron un mes y contenían alrededor de ocho hojas verdaderas, se seleccionaron 60 plántulas de igual tamaño y se trasplantaron en macetas de bolsas que contenían ocho kilogramos de suelo rojo.

Las macetas conteniendo las plántulas fueron colocadas en el invernadero (CICY) y se inició el registro de la temperatura, la intensidad lumínica y la humedad relativa con una estación meteorológica portátil HOBO® (Onset Corp, Bourne, MA, EEUU; Figura 2.2A) proporcionada por el doctor José Luis Andrade Torres. Este equipo realiza una lectura cada 10 segundos y genera un dato promedio de los tres parámetros cada 10 min, cuyos datos son ingresado en una base de datos EXCEL. Por otra parte, las mediciones del potencial hídrico del suelo fueron registradas con un equipo WP4 (Decagon Devices, Pullman, WA, EEUU; Figura 2.2B).

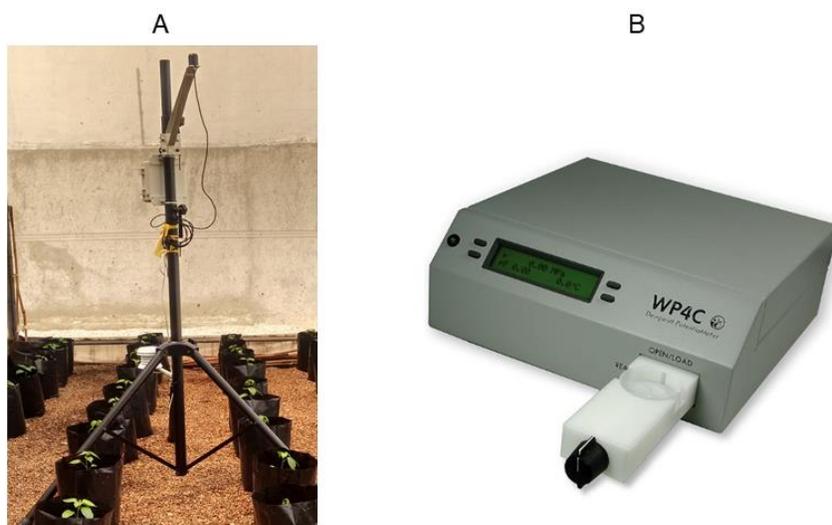


Figura 2.2. Equipos para mediciones de los parámetros ambientales. **A)** Estación meteorológica HOBOT. **B)** Equipo WP4C para la medición del potencial hídrico.

2.2.4. Aplicación de los tratamientos de estrés y dosis de nitrógeno

A los 15 días después del trasplante, las plantas de chile habanero fueron divididas en cuatro lotes (cada lote consistió en ocho plantas) y se sometieron a estrés hídrico y variaciones en la fertilización con nitrógeno. Los tratamientos fueron: T1 (1 mM KNO_3 + R): fertilización con 1 mM KNO_3 en condiciones de riego diario, T2: (1 mM KNO_3 - R): fertilización con 1 mM KNO_3 en condiciones de riego cada siete días, T3 (7.5 mM KNO_3 + R): fertilización con 7.5 mM de KNO_3 en condiciones de riego normal, T4 (15 mM KNO_3 + R): fertilización con 15 mM de KNO_3 en condiciones de riego diario y T5 (15 mM KNO_3 - R): fertilización con 15 mM de KNO_3 en condiciones de riego cada siete días.

La concentración de KNO_3 fue ajustada en el medio Hoagland (Hoagland and Arno, 1938), a su fuerza completa de sales a pH 6.8, al cual se le retiró la fuente nitrogenada y ésta se ajustó a 1, 7.5 o 15 mM usando KNO_3 . La concentración de K fue ajustada a 15 mM en todos los tratamientos, usando KCl. La aplicación del fertilizante se realizó semanalmente hasta la finalización del experimento. Durante los dos primeros meses la fertilización se realizó con 500 ml de medio Hoagland a la concentración de KNO_3 determinada por el tratamiento en cada maceta. Posterior a los dos meses la fertilización se realizó con un litro de medio Hoagland debido a una mayor demanda de nutrientes por parte la planta.

Por cada tratamiento se usaron 12 plantas, que se dividieron en bloques de cuatro plantas y se distribuyeron dentro del espacio del invernadero (Figura 2.3).



Figura 2.3. Tratamientos y distribución de las plantas dentro del invernadero

2.2.5. Etiquetado de flores y colecta de frutos

Cuando el 50% de las plantas había comenzado la floración se inició el etiquetado diario de las flores en el momento de anthesis y este proceso se extendió hasta los dos meses desde el inicio del etiquetado. Para el análisis estadístico para evaluar la producción de flores y frutos por planta (análisis fisiológico), se utilizaron seis de las 12 plantas de cada tratamiento. Las seis plantas restantes se utilizaron para la colecta del material vegetal para llevar a cabo los experimentos moleculares. Los frutos de las flores etiquetadas se colectaron cuando cumplieron 45 días post-antesis y el número de estos frutos fue registrado.

2.2.6. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y el déficit hídrico sobre el peso fresco de las plantas

Para evaluar el crecimiento de las plantas, se pesó la parte aérea, la parte radical y los frutos provenientes de las plantas de cada tratamiento. Esta evaluación se realizó con plantas (cinco por cada tratamiento) de 150 días después del trasplante.

2.2.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de producción de flores y frutos por planta, así como el peso fresco de las plantas se sometieron a un análisis estadístico de varianza con ANOVA y la diferencia entre las medias fueron comparadas con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico Sigma Plot. El análisis estadístico para la producción de flores y frutos se realizó con seis plantas de casa tratamiento. En el caso del peso fresco se utilizaron cinco plantas de cada tratamiento.

2.2.8. Extracción de arn a partir de cada estado de desarrollo de flor y fruto

Para llevar a cabo los experimentos moleculares, se utilizaron los siguientes materiales biológicos: botón floral, flor en antesis y frutos de 10, 25 y 45 días pos-antesis (DPA). Las colectas se realizaron en tres momentos diferentes dentro del período de evaluación. En cada colecta, se tomaron cinco muestras de los diferentes estados de desarrollo, las cuales provenían de plantas distintas y se pulverizaron con nitrógeno líquido, cuidando que las muestras no se descongelaran. De las muestras pulverizadas se pesó 0.1 gramo y se procedió a realizar la extracción de ARN utilizando el reactivo de Trizol®.

Después de la adición del Trizol®, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 12,000 x g a 4 °C por cinco minutos, y a continuación el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 200 µl de cloroformo y se homogenizó en un vortex, y se dejó en reposo durante tres minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g a 4° C por 15 minutos. La fase acuosa se colocó en tubos nuevos y el ARN se precipitó, añadiendo 500 µl de isopropanol. Se homogenizó y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 x g a 4° C por 10 minutos y la pastilla conteniendo el RNA total fue lavada dos veces con etanol al 75 % (v/v) y centrifugada cada vez a 12,000 x g a 4 °C por cuatro minutos. Después de secar por 10 minutos, la pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua grado biología molecular. La pureza y calidad del RNA fueron evaluadas en un NanoDrop 2000 ThermoFisher scientific y a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

2.2.9. Síntesis de la primera cadena de adnc y pcr punto final de los *glrs* en chile habanero

El RNA total fue tratado con DNAsa I (ThermoFisher scientific) siguiendo el protocolo del proveedor. Para la síntesis de la primera hebra de DNA se utilizó el juego de reactivos “first strand cDNA synthesis kit (ThermoFisher Scientific®), usando la transcriptasa reversa SuperScript III y los oligonucleótidos dT (20 bp).

Para la PCR (polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) de cada *CcGLR* se colocó 1 µl de ADNc de cada muestra, 1.25 µl del amortiguador 10x, 0.5 µl de 50 mM de MgCl₂, 0.5 µl de dNTPs, 1 µl de cada cebador específico, en sentido y antisentido (descritos en el cuadro 2.2) y 0.2 µl de Taq DNA polimesase (5 u/µl). Las condiciones de polimerización fueron: 95 °C un minuto y 32 ciclos a 94 °C 30 segundos, la temperatura de alineamiento y polimerización corresponde con las características del par de oligonucleótidos utilizados (cuadro 2.2), y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Como control de carga, se amplificó al gen de la *tubulina*, usando los oligonucleótidos: (5'-TGAGGTTTGATGGTGCTCTG-3') y en antisentido (5'-GTAGTTGATGCCGCACTTGA-3'), generando un amplicón de 347 pb.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo un experimento preliminar con los siguientes objetivos: familiarizarse en el crecimiento de las plantas de chile habanero en condiciones de invernadero y en el etiquetado de las flores, así como en la extracción de ARN total de diferentes tejidos de flor y fruto. En este experimento, los tratamientos de nitrógeno y de riego se aplicaron al inicio de la floración y se utilizaron 1 y 7.5 mM de KNO₃, así como riego diario (testigo) y cada siete días, para cada condición de nitrato.

En este primer experimento se obtuvo que la dosis de nitrógeno no influyó en el número de flores y frutos producidos. Sin embargo, los tratamientos de déficit hídrico disminuyeron la producción de flores y frutos en aproximadamente un 50% (datos no mostrados). A partir de estos resultados, se decidió, en el segundo experimento, iniciar los tratamientos de nitrógeno y de déficit hídrico 15 días después del trasplante, para que una vez que iniciara el proceso de floración (15 días después de iniciado los tratamientos) se pudieran observar más diferencias, especialmente en el efecto del nitrógeno. Además, dado que el aumento

en la dosis de nitrógeno de 1 a 7.5 mM no provocó grandes cambios, ni se observó una protección del aumento de la dosis de nitrógeno sobre el efecto del estrés hídrico, se decidió aumentar la dosis de nitrógeno hasta 15 mM.

Sin embargo, se logró extraer con éxito el RNA total de estas muestras (Figura 2.4) y se hizo un ensayo de PCR punto final para tener un primer acercamiento de los *CcGLR* que estaban expresándose en estos tejidos de chile habanero. Para este análisis se tomaron los tejidos a partir de plantas tratadas con 1 mM de KNO_3 y con riego diario. Como se observa en la Figura 2.5, siete de los 12 *CcGLRs* se expresaron en estos tejidos, siendo *CcGLR1.1* y los de la familia III, *CcGLR3.1* – 3.4 los mayormente expresados.

Este experimento sirvió como base entonces para establecer el experimento central de este trabajo, usando tres concentraciones de N (1, 7.5 y 15 mM) y dos condiciones de riego: diario y cada siete días. El déficit hídrico se aplicó únicamente a los tratamientos extremos de nitrógeno: 1 y 15 mM, debido a condiciones de espacio en el invernadero y a que, como se planteó anteriormente, el tratamiento de 7.5 mM fue similar al de 1 mM.

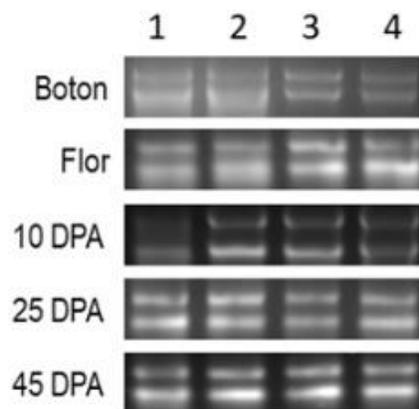


Figura 2.4. Muestras de ARN extraídas a partir de botón floral, flor, frutos de 10, 25 y 45 días post-antesis (DPA). En la columna 1 se muestran las extracciones del tratamiento 1 mM de KNO_3 + R; Columna 2: 1mM de KNO_3 - R; Columna 3: 7.5 mM de KNO_3 + R; Columna 4: 7.5mM de KNO_3 – R.

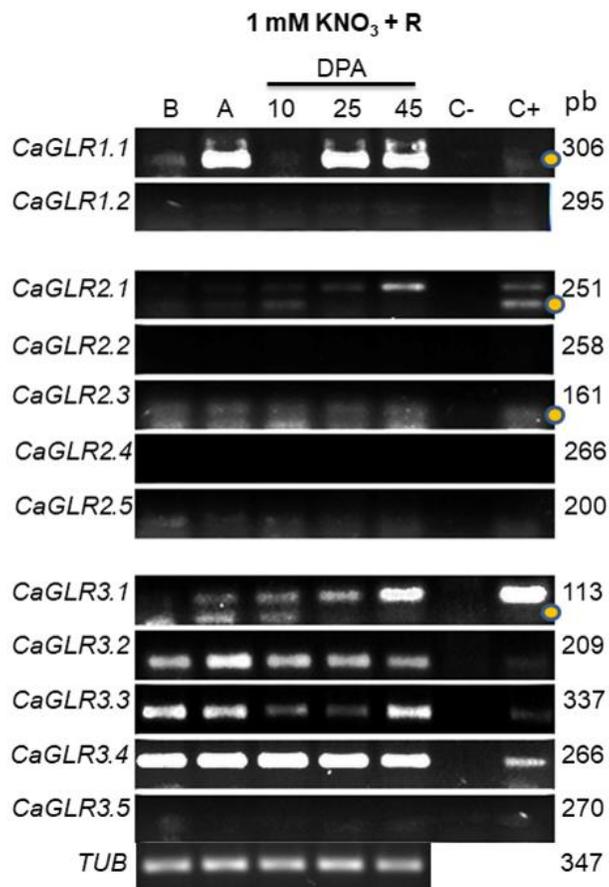


Figura 2.5. Perfil de expresión de los GLRs evaluados en los diferentes tejidos. En la figura se muestran la amplificadas de los doce GLRs evaluados por PCR punto final en los cinco estados del desarrollo reproductivo. Todas las amplificaciones se realizaron a 32 ciclos y como control interno se utilizó a tubulina. Los círculos en amarillo señalan la posición que corresponde con el tamaño correcto del amplicon. C+: control positivo (ADNc de *C. annuum*). C-: Control negativo.

2.3.1. Condiciones ambientales dentro del invernadero y efecto de los tratamientos de riego sobre el potencial hídrico del suelo

Los parámetros ambientales dentro del invernadero se registraron con una estación meteorológica HOBO®, como se describió en los materiales y métodos. La temperatura, intensidad lumínica y humedad relativa se muestran en la Figura 2.6. Durante las primeras cuatro semanas la temperatura se mantuvo con una máxima de alrededor de 35 °C durante el día y alrededor de 25 °C durante la noche; sin embargo, durante las siguientes semanas fue disminuyendo hasta llegar a una mínima de alrededor de 17 °C en la semana 16. A

partir de las siguientes semanas este parámetro fue paulatinamente aumentando durante las siguientes semanas como puede observarse de las semanas 20 a 23 (Figura 2.6A).

La humedad relativa se mantuvo dentro de un promedio del 70% y 80% durante la mayoría de las semanas, solo mostrando variaciones durante la semana cuatro y diecisiete, en donde aumentó sus valores por encima del 80% (Figura 2.6B). En el caso de la intensidad lumínica se registró el valor máximo y mínimo. Este parámetro mantuvo una tendencia parecida a los valores de la temperatura. Durante las primeras cuatro semanas la intensidad lumínica máxima registrada mostró los valores más altos durante el día, con valores entre 400 y 480 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, para posteriormente disminuir hasta alrededor de 300 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en las semanas 15 a 19 (Figura 2.6C).

Los potenciales hídricos de las plantas sometidas a estrés se mantuvieron por debajo de -1.3 MPa después de la semana ocho de iniciar los tratamientos, como se puede observar en la Figura 2.7. En las medidas de potencial hídrico del suelo, Lozano y Fonseca, (2016), mencionan que cuando los potenciales hídricos del suelo se encuentran por debajo de -1.3 MPa, la disponibilidad de agua libre es igual a 0%.

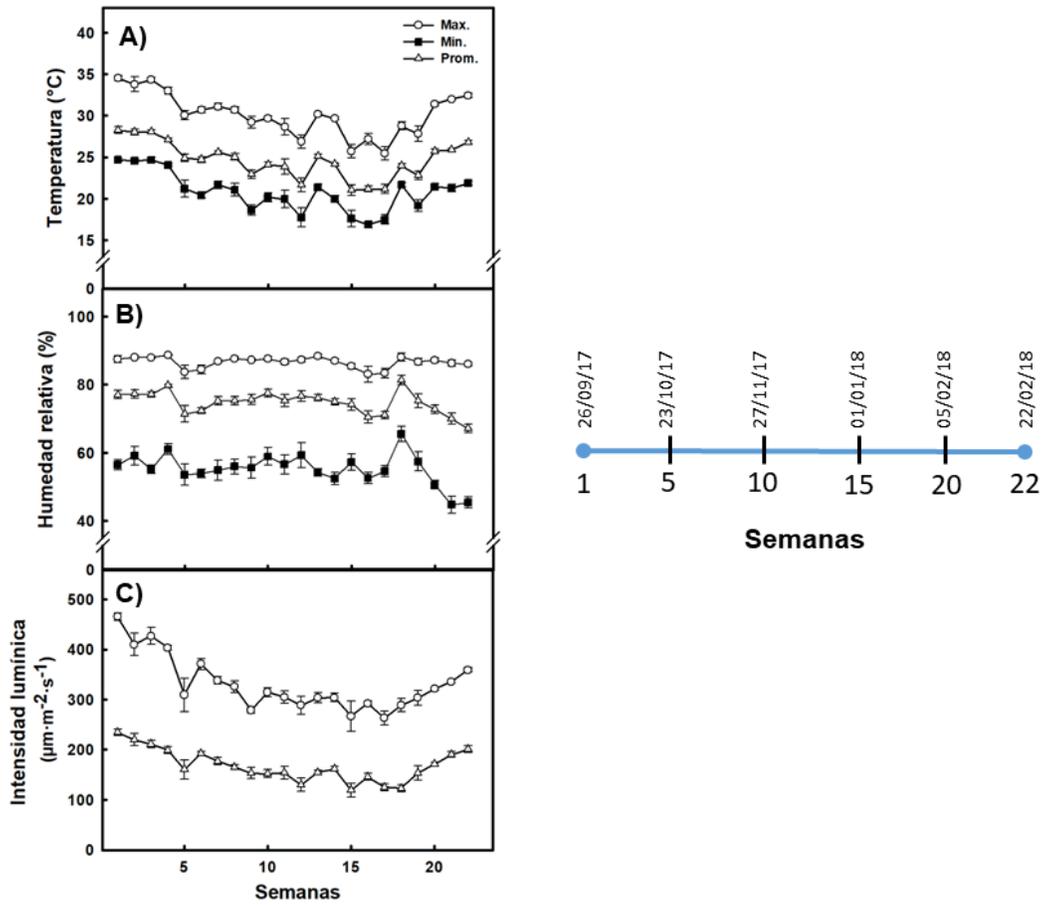


Figura 2.6. Registro de temperatura (A), humedad relativa (B) e intensidad lumínica (C) dentro del invernadero. En la parte derecha se muestra la correspondencia en semanas con la fecha equivalente.

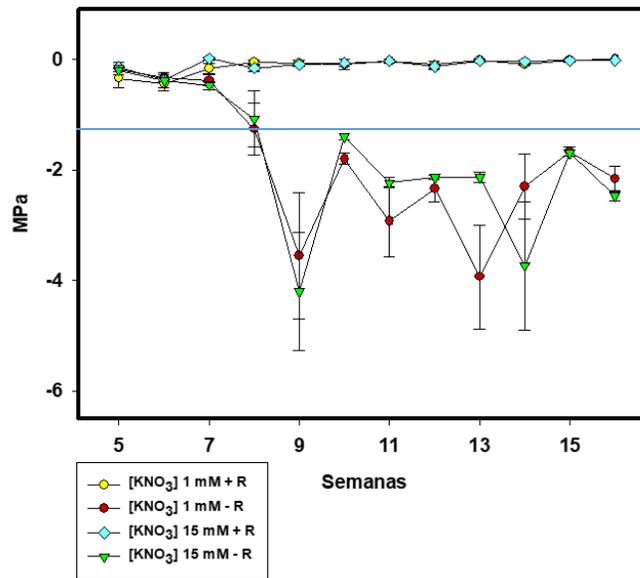


Figura 2.7 Registro del potencial hídrico del suelo en MPa. Se muestra el ES. Cada tratamiento es simbolizado por una marca distintiva como se observa en la parte inferior de la figura. La línea azul hace referencia a un potencial hídrico de -1.3 MPa, el cual corresponde con un 0% de disponibilidad de agua.

Estos datos corroboran que las plantas sometidas a riego cada siete días, estuvieron en efecto, en déficit hídrico (Figura 2.8). Sin embargo, una vez que se le adicionaba el riego, éstas lograban recuperarse rápidamente, demostraron que con este tratamiento no alcanzaron el punto de marchitez permanente.



Figura 2.8. Morfología de las plantas sometidas a estrés hídrico. Se muestra la parte aérea de una planta perteneciente al tratamiento 1 mM de KNO₃ - R.

2.3.2. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y de riego sobre la floración y fructificación de las plantas de chile habanero

Contrario a lo esperado, el número de flores disminuyó significativamente cuando aumentó la concentración de nitrógeno a 7.5 y 15 mM, con respecto al número producido en las plantas sometidas a 1 mM (Figura 2.9A). Estos resultados contrastan con los datos reportados por Medina-Lara *et al.*, (2008), donde mencionan que el número de flores en chile habanero variedad (jaguar) aumentó al aumentar la concentración de nitrógeno (NH_4^+) de 1mM a 15 mM. Sin embargo, la diferencia en la respuesta de producción de flores puede ser consecuencias de la diferente fuente de nitrógeno utilizada y a la variedad de chile habanero utilizada.

La diferencia entre variedades puede tener repercusión en la respuesta de la planta a los regímenes de fertilización con nitrógeno. En dos variedades de *C. annuum* (paprika y Hazera 1195) la respuesta de la planta a distintos regímenes de fertilización nitrogenada fue diferente (Xu *et al.*, 2001; Aminifard *et al.*, 2012). En la variedad Hazera 1195 el aumento de la fertilización de 3 a 9 mM de nitrógeno indujo un aumento en la producción de flores por planta, mientras que en la variedad “paprika” no se observó este aumento, ni usando mayores dosis de nitrógeno.

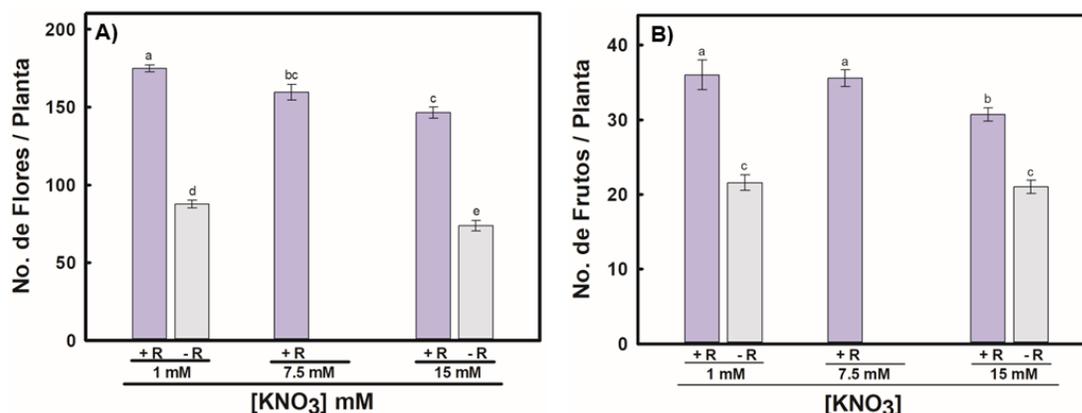


Figura 2.9. Numero de flores y frutos por planta bajo los tratamientos. En **A)** se muestra el número de flores/planta y en **B)** el número de frutos/planta. +R: con riego normal, -R: estrés hídrico. Letras diferentes significan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Se muestra el error estándar (ES). El registro de flores se realizó durante un periodo de 60 días.

Al aplicar los tratamientos de déficit hídrico, se redujo de manera drástica el número de flores por planta (Figura 2.9A). Las plantas fertilizadas con 1 mM de KNO₃ en condiciones

de estrés hídrico mostraron una reducción del 50 % en la producción de frutos, comparado con el tratamiento a la misma concentración de KNO_3 en condiciones de riego normales. El mismo porcentaje de reducción fue observado con la dosis de fertilización de 15 mM de KNO_3 .

Estos resultados muestran que el estrés por sequía es el factor que más impacto tuvo en la producción de flores. Está documentado que el estrés hídrico puede disminuir hasta el 79 % de la producción de flores en *C. annuum* variedad L5962-2 (Showemimo *et al.*, 2007). También, Jaimez *et al.*, (2000) mostraron que el número de flores por planta disminuye desde 20 flores por planta en condiciones de riego, hasta cuatro flores por planta en estrés hídrico (durante un registro de una semana).

La producción de frutos siguió un patrón muy similar al de la producción de flores (Figura 2.9B). El aumento en la concentración de nitrógeno de 1 mM a 7.5 mM de KNO_3 en condiciones de riego normales no mostró diferencias en la producción de frutos por planta; sin embargo, a un régimen de 15 mM de KNO_3 se observó una disminución de 36 a 21 frutos por planta, comparado con el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en las mismas condiciones de riego (en un periodo de 60 días).

Con respecto a los tratamientos de estrés hídrico (1 mM de KNO_3 – R y 15 mM de KNO_3 – R) se observó una disminución drástica en el número de frutos por planta. El tratamiento a 1 mM de KNO_3 en condiciones de estrés hídrico mostró una reducción del 40.2 % en la producción de frutos comparado con el tratamiento bajo el mismo régimen de fertilización, pero en condiciones de riego normales. En cambio, el tratamiento en estrés hídrico, regado con 15 mM de KNO_3 mostró una reducción menor, correspondiendo al 32.33 % con el tratamiento a la misma dosis más condiciones de riego normal (Figura 2.9B).

En resumen, las condiciones de fertilización no tuvieron un efecto positivo sobre los rendimientos de los frutos. Contrario a lo establecido por algunas investigaciones en el género *Capsicum* donde la concentración de nitrógeno hasta una dosis límite puede aumentar los rendimientos. Xu *et al.*, (2001) encontraron en *C. annuum* (var. Hazera 1195) que el aumento de la dosis de nitrógeno de 3 mM a 6 mM de urea puede aumentar los rendimientos, aunque la producción se reduce cuando aumenta la concentración a 9 mM. Por otro lado, Medina-Lara *et al.*, (2008) mostraron que en Chile habanero el aumento en la concentración de nitrógeno (en forma de amonio) de 1 mM a 15 mM aumentaba los

rendimientos de 13 a 59 frutos por planta durante un periodo de seis semanas. Sin embargo, el aumento de la dosis más allá de 15 mM de urea disminuía los rendimientos.

En este trabajo, la disminución del rendimiento de frutos al aumentar la dosis de nitrógeno puede deberse a múltiples factores. Por ejemplo, una fertilización basada exclusivamente en nitrato como fuente de nitrógeno, podría no ser la mejor recomendación para aumentar la producción en chile habanero. También, un factor importante es la intensidad lumínica del invernadero, la cual fue relativamente baja. Esto implicaría que a pesar de que pudiera haber una cantidad adecuada de nitrógeno en la planta, los esqueletos de carbono podrían ser una etapa limitante para aumentar los rendimientos de producción de frutos.

Por otro lado, está bien documentado que el déficit hídrico es uno de los estreses que más afectación ejerce sobre los rendimientos de los cultivos. En *C. annuum* (variedad L5962-2) la falta de agua de riego por 14 días pudo causar la pérdida de hasta el 99 % de la producción de frutos (Showemimo *et al.*, 2007). En chile habanero un estrés de nueve días puede disminuir la producción hasta el 62 % (Jaimez *et al.*, 2000).

2.3.3. Porcentaje de aborto floral en los diferentes tratamientos

El porcentaje de aborto floral fue alto (~79%) y similar en todas las dosis de nitrógeno, en las plantas sometidas a riego diario (Figura 2.10). Cuando se aplicó el déficit hídrico, se observó una ligera disminución en el aborto floral cuando las plantas estaban sometidas a 1 mM, pero no fue estadísticamente significativa a la presentada por las plantas sometidas a esta misma concentración de nitrógeno, pero a riego diario. Sin embargo, cuando las plantas fueron fertilizadas con 15 mM y sometidas a déficit hídrico, el porcentaje de aborto floral disminuyó significativamente a 69.7% (Figura 2.10). Este resultado sugiere que una mayor dosis de nitrógeno favoreció el establecimiento del fruto en las plantas sometidas al estrés hídrico

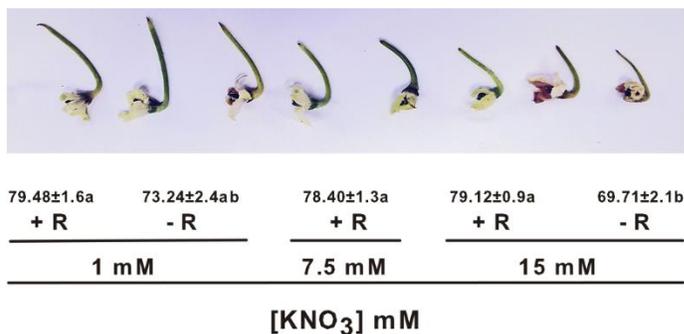


Figura 2.10. Porcentaje de aborto floral en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de nitrógeno (1, 7.5 y 15 mM) y de riego (+R: con riego normal, -R: estrés hídrico). Letras diferentes significan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Se muestra el error estándar (ES).

Estos resultados indican que el proceso reproductivo efectivamente se afectó por el estrés hídrico y por la dosis más alta de nitrógeno aplicada.

2.3.4. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y de riego sobre la biomasa de las plantas

Dado que el aumento en la dosis de fertilizante nitrogenado no tuvo un impacto sobre el rendimiento, evaluado a través del número de flores y frutos producidos, se quiso profundizar en el efecto de este aumento de nitrógeno sobre la biomasa de la planta. Para ello, se usaron las plantas de chile habanero de 150 días post-trasplante (luego de terminar con la evaluación del número de flores y frutos por plantas) y fueron divididas en parte aérea, radical y frutos contenido en el momento de la colecta. El peso fresco de cada parte fue registrado.

El peso fresco aéreo aumentó de una manera dependiente de la dosis de KNO_3 . Los aumentos correspondieron a 24 y 40% con 7.5 y 15 mM de nitrógeno, respectivamente, comparado a las plantas fertilizadas con 1 mM. Sin embargo, el peso fresco radical disminuyó en aproximadamente un 23% al aumentar la dosis a 7.5 mM y permaneció similar a este valor cuando se aumentó la dosis a 15 mM de nitrato. Los frutos presentes en las plantas al momento de la colecta (abarcando los frutos pequeños verdes hasta los maduros) mostraron un aumento de peso de 68% y 57% para los tratamientos fertilizados con 7.5 y 15 mM de KNO_3 respectivamente en condiciones de riego normales comparado con el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en las mismas condiciones de riego (Cuadro 2.3, Figura 2.11).

Cuando las plantas se sometieron a un déficit hídrico se observó una disminución del 40 y el 19% de la biomasa total para los tratamientos de 1 y 15 mM de nitrato respectivamente comparado con el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en condiciones de riego diario. La mayor reducción en el tratamiento de 1 mM se obtuvo para el peso fresco (41%) y radical (42%), comparada con la del fruto (13%), mientras que para 15 mM la mayor reducción se obtuvo

para la parte aérea (51%), seguida por la del fruto (46%) y por último la de la raíz (25%) (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Efecto de los tratamientos de nitrógeno y de riego sobre la producción de biomasa de las plantas de chile habanero. Se muestra el valor promedio \pm el error estándar (n=5 plantas). Letras diferentes significan diferencias significativas (Prueba de Tukey, $P \leq 0.05$).

Tratamiento	PESO FRESCO (g)			
	AÉREO	FRUTO	RAÍZ	TOTAL
1 mM + R	106.80 \pm 4.45c	48.10 \pm 4.10b	52.45 \pm 0.69a	159.25 \pm 3.78c
1 mM - R	63.40 \pm 1.86e	41.95 \pm 4.38b	30.45 \pm 1.19d	93.85 \pm 1.48e
7.5 mM + R	140.45 \pm 3.91b	150.22 \pm 19.60a	40.50 \pm 3.65bc	180.95 \pm 4.61b
15 mM + R	177.80 \pm 6.44a	113.62 \pm 14.39a	42.87 \pm 3.73b	220.66 \pm 6.87a
15 mM - R	86.85 \pm 1.88d	61.57 \pm 7.56b	32.26 \pm 3.12cd	119.12 \pm 3.55d

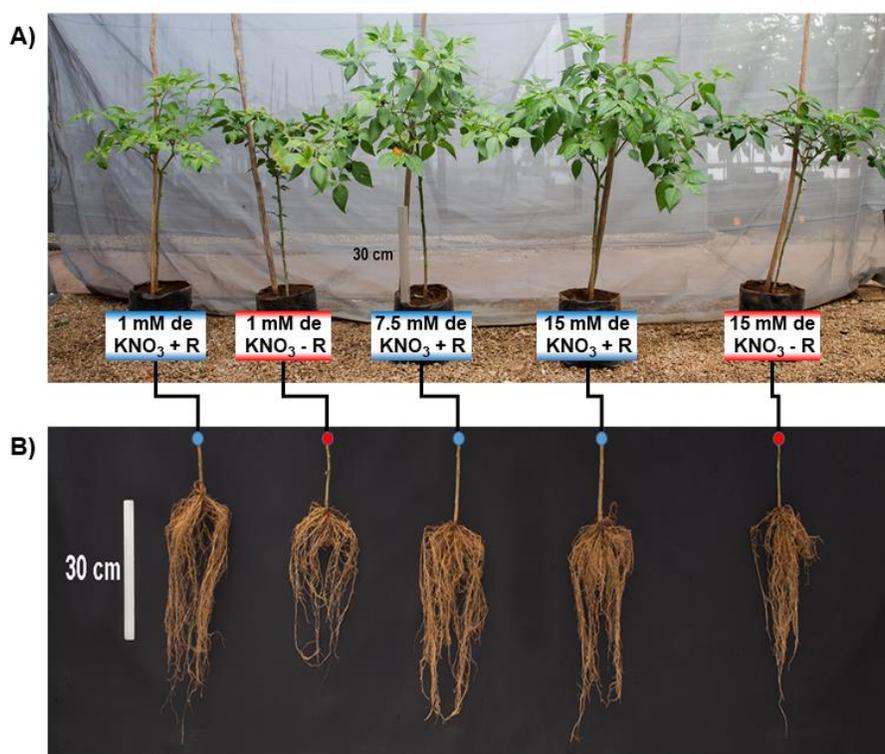


Figura 2.11. Efecto de los tratamientos sobre la fisiología de las plantas de chile habanero (var. Génesis®). En **A)** se tomó una planta representativa al finalizar el registro y colecta de cada tratamiento. En **B)** al finalizar el experimento la raíz de las plantas de **A)** fueron colectadas.

El menor crecimiento de las plantas en el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en condiciones de riego normales puede ser resultado de la baja dosis de nitrógeno, ya que el nitrógeno es un elemento de importancia primaria en la nutrición y cuya presencia se encuentra en la estructura de la mayoría de las biomoléculas (Tegeder *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2012).

Por otra parte, la disminución de biomasa en respuesta al estrés hídrico, puede ser resultado de las perturbaciones clásicas provocadas por la falta de agua, como son el cierre de los estomas, daño al sistema fotosintético, disminución en el potencial hídrico de las hojas, que en consecuencia da lugar a una baja disponibilidad de CO_2 para la producción de azúcares y disminución radical en el transporte de nutrientes que se impulsa por el agua (Osakabe *et al.*, 2014; Anjum *et al.*, 2011).

2.3.5. Análisis molecular

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de seis órganos del mismo tejido (botón, flor, fruto de 10, 25 o 45 días pos-antesis) y a partir de cada tratamiento al que fueron sometidas las plantas en este segundo experimento. A continuación, en la Figura 2.12 se muestra la calidad del RNA total extraído.

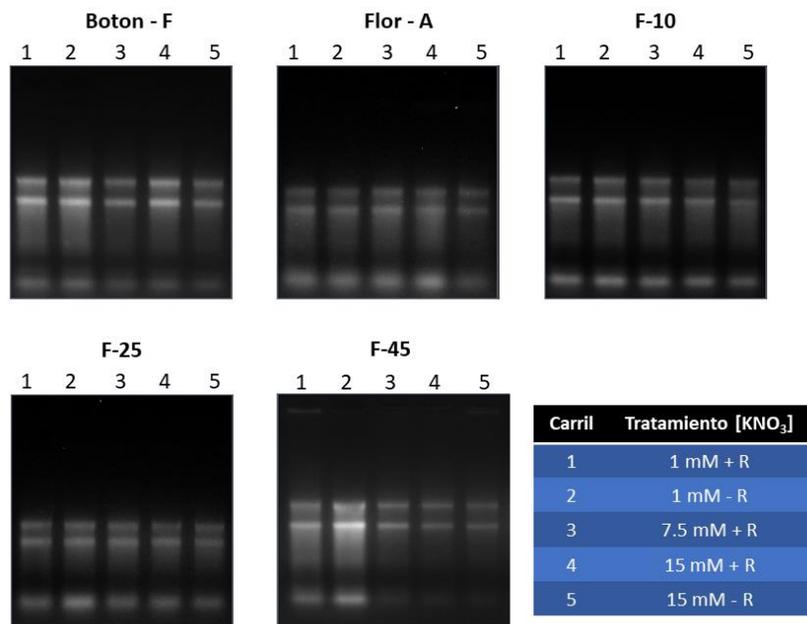


Figura 2.12. Muestras de ARN de todos los estadios de los diferentes tratamientos. Las muestras de ARN fueron fraccionadas en geles de agarosa al 1 % y teñidas con bromuro de etidio. En cada uno de los geles se puede observar las bandas de los ARNs de 18 y 28S. Boton-F: botón floral, Flor-A: flor en antesis, F-10: frutos de 10 días pos-antesis, F-25: frutos de 25 días pos-antesis, F-45: frutos de 45 días pos-antesis.

Con estas muestras de ARN se procedió a realizar la síntesis de ADNc, que se utilizó para los análisis de expresión.

Los resultados de las amplificaciones por PCR punto final se presentan en la Figura 2.13. De los dos miembros de la familia I, se observó expresión únicamente del *CcGLR1.1*, mientras que de la familia II, se observaron los genes *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3* y *CcGLR2.5*, y de la familia III se expresaron *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4*. De forma general, los mayores niveles de transcritos fueron observados para los genes de la familia III, especialmente para el *CcGLR3.2* y en los primeros estadios de desarrollo floral y del fruto, disminuyendo durante la maduración de éste (Figura 2.13).

Es interesante que la variación en la dosis de nitrógeno mostró efecto en la modificación de la expresión de siete *CcGLRs*. Como se observa, los *CcGLR1.1* y *CcGLR2.3* mostraron una mayor expresión en el tratamiento a 7.5 mM de KNO₃. El *CcGLR1.1* sostuvo el aumento en la expresión en botón floral, en cambio el *CcGLR2.3* elevó su expresión durante los primeros tres estados del desarrollo evaluados y mostró una disminución en frutos de 25 y

45 días pos-antesis. Los *CcGLR3.1* y *CcGLR3.2* mostraron una mayor expresión en el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en comparación con los otros tratamientos. De nueva manera, el aumento se vio reflejado durante los primeros tres estados del desarrollo reproductivo evaluados. Algo muy importante a destacar es que el *CcGLR3.2* disminuyó su expresión conforme aumentó la concentración de nitrógeno. Los genes *CcGLR3.3* y el *CcGLR3.4* mostraron una mayor expresión en el tratamiento con la dosis más alta de nitrógeno (15 mM de KNO_3), únicamente en botones florales. Por último, el *CcGLR3.5* únicamente fue detectado en los tratamientos de 7.5 y 15 mM de KNO_3 , durante los primeros tres estados evaluados.

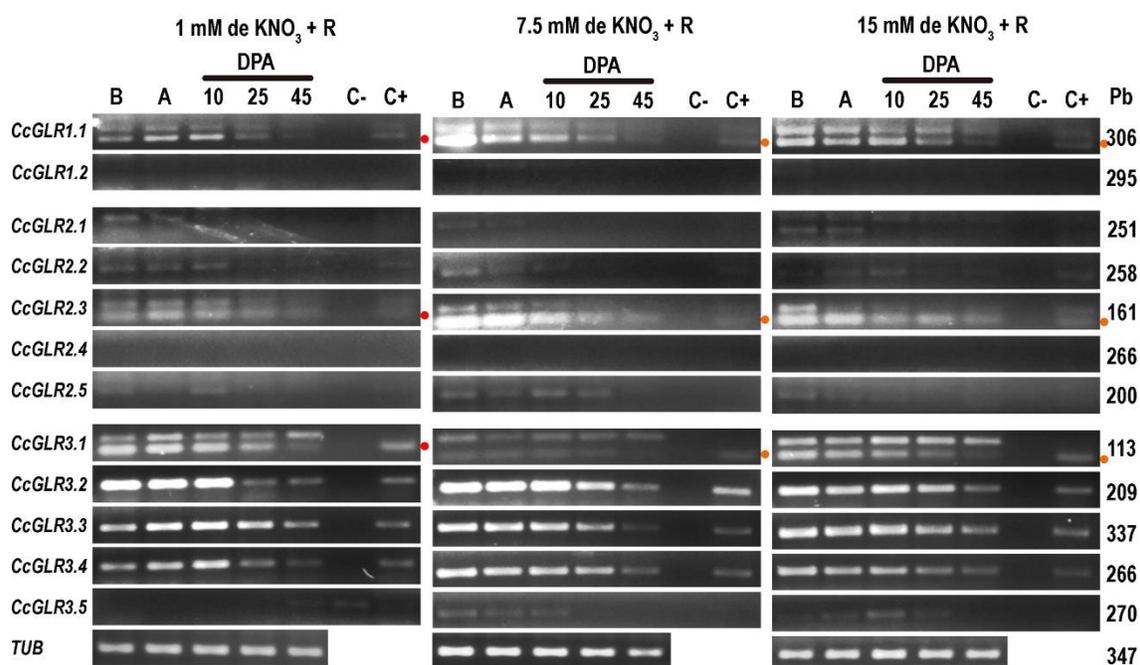


Figura 2.13. Perfiles de expresión de los *CcGLRs* en respuesta a la dosis de nitrógeno. B: botón floral, A: flor en antesis, DPA: días pos-antesis. En círculos rojos se señala la banda que corresponde al tamaño esperado, particularmente cuando se observó un doblete de bandas. Como control interno se utilizó a tubulina.

En los tratamientos de estrés hídrico (1 mM de KNO_3 – R y 15 mM de KNO_3 – R) se observó una variación en el perfil de expresión de los *CcGLRs* en los dos regímenes de fertilización que se aplicaron. En el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en condiciones de estrés hídrico, *CcGLR2.3*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4* aumentaron su expresión considerablemente en condiciones de déficit hídrico (Figura 2.14). Es de destacar que el

En animales se conoce que los iGluRs están constituidos por el ensamblaje de cuatro subunidades individuales del receptor (Traynelis *et al.*, 2010). En plantas se ha sugerido que también la formación del receptor activo se lleva a cabo a través del ensamblaje de cuatro subunidades (Price *et al.*, 2013). Es importante recalcar que en cada tejido evaluado en este trabajo existe la presencia de transcritos de más de cuatro *CcGLRs* que se expresan al mismo tiempo y cuyos productos proteicos pudieran formar parte del receptor activo.

Estos resultados concuerdan con lo publicado sobre la participación de los GLRs de plantas en el balance carbono-nitrógeno y en el estrés hídrico (Kang & Turano, 2003; Lu *et al.*, 2014), ya que perturbando estas condiciones a través de la variación del nitrógeno y el estrés hídrico modificó el nivel de transcritos de algunos *CcGLRs*. En otra investigación Singh *et al.*, (2014) encontraron que en condiciones de estrés por sequía los *OsGLR1.1*, *OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.5*, *OsGLR3.6*, *OsGLR3.7*, *OsGLR4.7* y *OsGLR4.9* modificaron su expresión.

Diversas investigaciones sugieren que estos receptores pueden participar como sensores de aminoácidos (Vincill *et al.*, 2013; Hilleary & Gilroy, 2018) y, tras su activación, desencadenar un flujo de calcio en la célula con la finalidad de responder a un estímulo medioambiental determinado. Nosotros sugerimos que estos cambios de expresión pueden ser debido a los estímulos provocados por la variación en las concentraciones de nitrógeno y el estrés hídrico, y que estos receptores de chile habanero (*CcGLRs*) pueden estar actuando como sensores de la disponibilidad de carbono-nitrógeno (aminoácidos) en la decisión de abortar o no las flores de chile habanero.

Aunque se sabe muy poco del papel que estos receptores juegan durante la reproducción y bajo las condiciones contrastantes de nitrógeno y estrés hídrico que se manejaron este experimento, nuestros resultados abren una brecha al conocimiento sobre el papel que posiblemente estén jugando estos receptores en esta especie vegetal.

2.4. CONCLUSIÓN

La variación de la dosis de nitrógeno tuvo poco efecto en los rendimientos de flores y frutos. Sin embargo, una alta concentración (15 mM de KNO₃) disminuyó el porcentaje de aborto floral.

El estrés hídrico tuvo efectos negativos en la producción de flores y frutos, reduciendo el número de ambos en aproximadamente el 50%. Por lo tanto, con los tratamientos aplicados de estrés hídrico y dosis de nitrógeno se logró modificar los procesos reproductivos en chile habanero.

En los diferentes estadios de la flor y el fruto se observó la expresión de ocho *CcGLRs*. Los perfiles de expresión de algunos *CcGLRs* (*CcGLR1.1*, *CcGLR2.1*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4*) cambiaron en respuesta a las condiciones de nitrógeno y el estrés hídrico. La mayor variación en el perfil de expresión se reflejó en los tratamientos de estrés hídrico.

CAPITULO 3

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS CcGLRs DE CHILE HABANERO

INTRODUCCIÓN

El primer reporte que indicó la presencia de GLRs en las plantas fue el publicado por Lam *et al.*, (1998), quienes mencionaron la existencia de secuencias homólogas a los iGluRs de animales. Posterior a la liberación del genoma completo de *A. thaliana* se identificaron 20 secuencias AtGLRs en esta especie, las cuales se dividieron en tres clados distintos (Chiu *et al.*, 2002). En otras especies vegetales, tales como tomate, arroz, rabano y la gramínea *Echinochloa cruz-galli* también se han identificado GLRs (Singh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Aouini *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2006).

En el género *Capsicum* no hay datos publicados sobre la presencia y función de estos GLRs. En nuestro laboratorio se identificaron 12 secuencias homologas a los receptores de glutamato en el genoma de *C. annuum* (datos no publicados). Además, como se describió en el capítulo anterior, los transcritos de estos genes se pueden expresar en la flor y el fruto de chile habanero.

Sin embargo, al inicio de este trabajo no se había liberado aún el genoma de chile habanero, es por ello que se tuvo que iniciar esta investigación a partir de secuencias de *Capsicum annuum*. El objetivo de este capítulo fue clonar los fragmentos amplificados de los CcGLRs, y a partir del análisis de estas secuencias identificar otras con homologías en el genoma de chile habanero y realizar el análisis bioinformático de las mismas.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Generación de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α

Para llevar a cabo la clonación de los fragmentos de los CcGLRs identificados, se llevó a cabo la generación de células competentes de *E. coli* DH5 α . El protocolo utilizado se encuentra en la liga https://openwetware.org/wiki/RbCl_competent_cell.

Para el procedimiento se utilizaron dos soluciones (RF1 y RF2) que contenían diferentes sales y glicerol para mantener la viabilidad celular. Células en resguardo de *E. coli* cepa

DH5 α se estriaron en cajas de Petri conteniendo medio LB s33lido, las cuales se dejaron toda la noche a 37 33C. Se pic33 una colonia del medio s33lido y se utiliz33 para inocular 3 ml de medio LB l33quido. El in33culo se dej33 en una incubadora con agitaci33n a 200 rpm (37 33C) durante toda la noche. Un ml de este cultivo se utiliz33 para inocular 100 ml de medio LB l33quido est33ril el cual se coloc33 en la incubadora con agitaci33n a 37 33C (200 rpm). La densidad 33ptica a 600 nan33metros (DO₆₀₀) fue registrada cada 30 minutos hasta que el cultivo alcanz33 un valor de 0.5. A continuaci33n el cultivo se introdujo en tubos de centrifuga y se enfri33 en hielo para detener la divisi33n celular. Se obtuvo una pastilla despu33s de la centrifugaci33n a 4,200 rpm por 10 minutos a 4 33C, la cual se resuspendi33 en 33 ml del buffer RF1 de forma suave. Las c33lulas de incubaron 15 minutos en hielo. Se llev33 a cabo una centrifugaci33n a 2,000 rpm por 15 minutos a 4 33C. Se decant33 el sobrenadante y la pastilla se resuspendi33 en 4 ml del buffer RF2 y se dej33 15 minutos en hielo y a continuaci33n se realizaron al33cuotas de 100 μ l en tubos eppendorf de 1.5 ml. Por 33ltimo, las c33lulas se almacenaron a -80 33C.

3.1.2. Amplificaci33n de los *CcGLRs* identificados y purificaci33n de los productos de PCR

Los fragmentos de los *CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3*, *CcGLR3.4* y *CcGLR3.5* se amplificaron con las condiciones descritas en el Cuadro 2.2, a partir de ADNc de flores en anthesis del tratamiento 1 mM de KNO₃ + R. Se procedi33 a realizar la amplificaci33n a partir de este tejido debido a que fue donde se mostr33 la amplificaci33n de todos los *CcGLRs* que se desean clonar.

Los productos de PCR de los fragmentos amplificados se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.5 % y se ti33nieron con bromuro de etidio. A continuaci33n, para cada banda de inter33s se realiz33 la recuperaci33n del material gen33tico contenido en el gel de agarosa con el kit de QIAEX II33 Gel Extraction Kit, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor.

Los productos de PCR purificados a partir de geles de agarosa de los *CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3*, *CcGLR3.4* y *CcGLR3.5* se clonaron en el vector comercial "pGEM33-T Easy" y "pJET1.2/blunt".

Los fragmentos de los *CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3*, *CcGLR3.4* y *CcGLR3.5* se ligaron en el vector pGEM33-T Easy con el siguiente procedimiento. En un

tubo de PCR se agregó 5 µl del amortiguador, 1 µl del vector pGEM®-T Easy, 1 µl del producto de PCR purificado y la enzima T4 DNA ligase (3 units/µl). La mezcla de reacción se aforó a 10 µl, se homogenizó, se dejó a temperatura ambiente por una hora y después por ocho horas a 4 °C.

En cambio, los fragmentos de los *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3* y *CcGLR3.1* se ligaron en el vector pJET1.2/blunt con el siguiente procedimiento. En un tubo de PCR se adicionó 10 µl del amortiguador de la reacción, 1 µl del producto de PCR purificado, 1 µl de DNA Blunting Enzyme y se aforó con agua grado biología molecular a 18 µl. La mezcla se homogenizó con ayuda de una pipeta y se incubó a 70 °C durante cinco minutos. Luego el tubo con la mezcla se mantuvo en hielo para agregar los siguientes reactivos. Se agregó 1 µl del vector pJET1.2/blunt, 1 µl de la T4 DNA Ligase y finalmente se aforó con agua hasta un volumen de 20 µl. La mezcla se homogenizó y se dejó a temperatura ambiente durante dos horas.

La transformación de las células de *E. coli* DH5α con cualquiera de los dos vectores comerciales (“pGEM®-T Easy” o “pJET1.2/blunt”), con su respectivo fragmento ligado, se realizó utilizando el protocolo de choque térmico de Froger & Hall, (2007) con pequeñas modificaciones. Tubos de células competentes se removieron del ultracongelador (-80 °C) y se descongelaron en hielo. Se adicionó 1 µl del plásmido y se homogenizó suavemente para evitar el daño a las células. Las células se incubaron durante 20 minutos en hielo y posteriormente se les impuso un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos e inmediatamente se colocaron en hielo por dos minutos. Se adicionaron 900 µl del medio LB líquido y se dejaron en una incubadora con agitación a 37 °C y 200 rpm durante hora y media. Cien µl de las células fueron esparcidas en cajas de Petri con medio LB sólido conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, X-GAL e IPTG en el caso de utilizar a el vector pGEM®-T Easy. Cuando la transformación se llevó a cabo con el vector pJET1.2/blunt no se les adicionaron estos reactivos. Por último, las cajas de Petri se dejaron de manera invertida en una incubadora a 37 °C durante 12 horas.

3.1.3. Purificación de ADN plasmídico

El proceso de purificación para cada uno de los fragmentos clonado se realizó utilizando el juego de reactivos QIAprep® Spin Miniprep Kit, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una vez obtenido el ADN plasmídico, su concentración se verificó en un

espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific) y la calidad a través del fraccionamiento en geles de agarosa al 1 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.

3.1.4. PCRs y análisis de restricción de los fragmentos clonados

A partir del ADN plasmídico purificado, se llevaron a cabo las amplificaciones para fragmento, de acuerdo a las características descritas en el capítulo anterior. Los productos de PCR fueron fraccionados en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) para verificar la presencia del fragmento de interés.

Se realizaron análisis de restricción de los ADN plasmídicos purificados para verificar la presencia de los fragmentos de los *CcGLRs* de chile habanero. En el caso del vector pGEM®-T Easy, para la liberación de los fragmentos clonados (*CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3*, *CcGLR3.4* o *CcGLR3.5*) se utilizó únicamente a la enzima de restricción *EcoRI* (BioLabs®), pues corta en los dos extremos (Figura 3.1A). Para la liberación de los fragmentos de interés en el vector pJET1.2/blunt donde se clonaron los fragmentos *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3* y *CcGLR3.1* se utilizaron las enzimas de restricción *XhoI* (invitrogen®) y *HindIII* (BioLabs®) (Figura 3.1B).

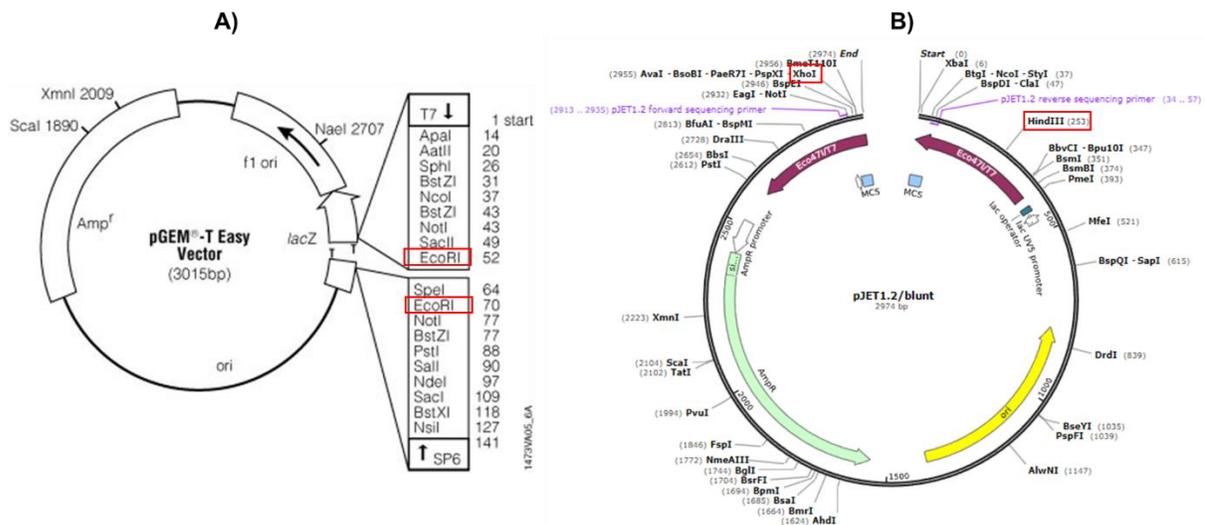


Figura 3.1. Vectores utilizados para la clonación de los *CcGLRs*. En **A)** se muestra el mapa del vector de clonación pGEM®-T Easy y en **B)** el vector pJET1.2/blunt.

3.1.5. Secuenciación de los fragmentos clonados

Las clonas que dieron positivo a los análisis de PCR y liberación de fragmentos con enzimas de restricción se mandaron a secuenciar a la empresa MACROGEN siguiendo las especificaciones requeridas. En tubos eppendorf de 1.5 ml se agregó 100 ng del ADN plasmídico, 1 µl de cebador forward y 1 µl de cebador reverse de secuenciación (cebadores M13 en el caso de pGEM®-T Easy y cebadores pGET para el caso de pJET1.2/blunt) y por último se aforaron a 10 µl. Se mandaron a secuenciar dos clonas de cada uno de los 10 *CcGLRs* clonados con los oligonucleótidos en sentidos y en antisentido, a excepción del *CcGLR3.2*, del cual se secuenciaron tres clonas en sentido y en antisentido. En total se mandaron a secuenciar 42 muestras.

3.1.6. Identificación de las secuencias completas en el genoma de chile habanero

Con los resultados de la secuenciación y aprovechando la liberación del genoma de chile habanero (<http://genome.pepper.snu.ac.kr/>) se procedió a la identificación de la secuencia codificante completa. Para ello se descargó de la base de datos Pepper Genome platform el archivo de las secuencias codificantes de chile habanero, el cual fue cargado en el software "BioEdit Sequence Alignment Editor".

A través de comparaciones realizadas con los fragmentos de los *CcGLRs* clonados y los *GLRs* reportados para tomate se buscaron las secuencias completas con el mayor porcentaje de homología. Se registraron todas las secuencias con alto porcentaje de homología.

3.1.7. Análisis filogenético y porcentaje de identidad de las secuencias encontradas en el genoma de chile habanero

Las secuencias completas de aminoácidos se alinearon utilizando el software MEGA 7.0 opción ClustalW con los siguientes parámetros: Gap Opening Penalty= 30 (GOP por sus siglas en inglés); Gap Extension penalty= 0.2 (GEP por sus siglas en inglés), matriz de sustitución de aminoácidos= BLOSUM 30. El árbol fue construido por el método de Neighbour-Joining (NJ, por sus siglas en inglés) usando el modelo de distancia-P (Saitou & Nei., 1987). Los valores de BOOTSTRAP fueron derivados de 1000 réplicas. Las secuencias utilizadas fueron 20 *AtGLRs* de *A. thaliana*, 13 *SIGLRs* de tomate, 24 *OsGLRs* de arroz, un *RsGLR* de rabano, 12 *CaGLR* de *C. annuum*, dos secuencias de bacterias

homologas a los iGluRs de animales como grupos externos (anexo I) y las 22 secuencias putativas encontradas en el genoma de chile habanero.

Por último, se obtuvo el porcentaje de identidad utilizando la herramienta “Clustal omega” (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) disponible en línea, usando el método de alineamiento por pares.

3.1.8. Identificación de dominios en los CcGLRs

Las secuencias de aminoácidos de los CcGLRs putativos identificados en el genoma de chile habanero fueron analizados con la herramienta online InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) y Motif Scan (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). Este análisis se llevó a cabo con la finalidad de encontrar los dominios característicos de los GLRs de plantas.

Los dominios transmembranales de los CcGLRs se identificaron con “TMpred” (<https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED>) y “TMHMM” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), las cuales son herramientas en línea que permiten identificar dominios transmembranales de proteínas.

Utilizando el software DOG 2.0 se realizó el diseño lineal de los dominios encontrados para los CcGLRs que mostraban todos los dominios reportados en GLRs de plantas (DAT, S1, S2, M1-M4 y DCT).

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1. Plásmidos purificados

Los ADN plasmídicos purificados con los diferentes fragmentos de los *CcGLRs* fueron fraccionados en un gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. De cada fragmento clonado de los *CcGLRs* se purificaron cinco colonias. En la Figura 3.2 se muestra el fraccionamiento de plásmidos purificados de pGEM®-T Easy conteniendo algunos de los fragmentos.

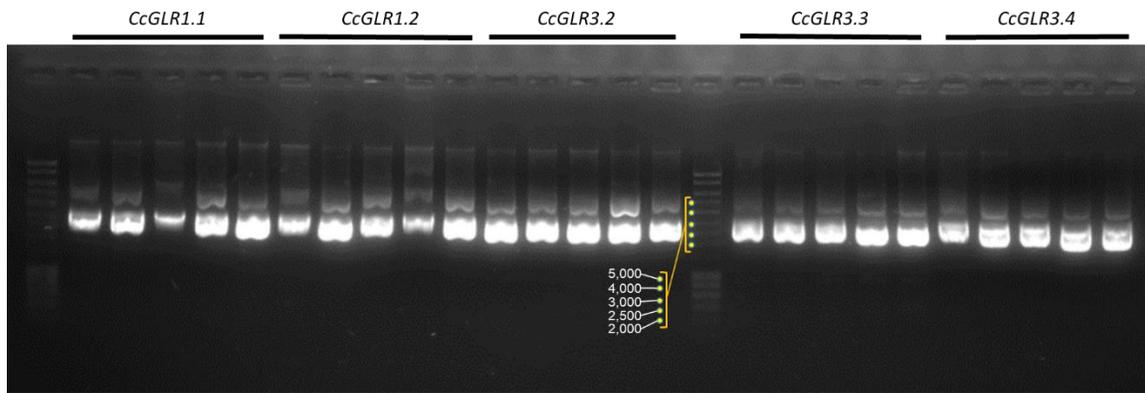


Figura 3.2. Fraccionamiento de los plásmidos purificados en un gel de agarosa al 1 % (p/v) y teñidos con bromuro de etidio. En la imagen se presentan los fragmentos para cinco de los *CcGLRs*, presentando cinco clones de cada uno. El gel se desarrolló a 80 V durante 50 minutos.

El tamaño de los plásmidos purificados se encuentra alrededor de los 3000 pb, lo que concuerda con el tamaño del vector pGEM®-T Easy el cual tiene una longitud de 3015 pb. También pueden observarse bandas por encima de los 3000 pb las cuales son las estructuras concatenadas, así como también podrían corresponder a las topologías de las diversas copias de los plásmidos.

3.2.2. Análisis de restricción y PCR de los fragmentos clonados

Los resultados muestran la liberación de los fragmentos de interés contenidos en el vector pGEM®-T Easy utilizando a la enzima EcoRI para la digestión de los extremos. En la Figura 3.3 se muestra la liberación de los fragmentos de los *CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR3.3* o *CcGLR3.5*.

Se realizaron análisis de restricción para verificar la presencia de los fragmentos de interés. Para liberar los fragmentos contenidos en el vector pGEM®-T Easy se utilizó únicamente la enzima de restricción EcoRI, ya que corta en los dos extremos (Figura 3.3). En el caso del vector binario pJET1.2/blunt se utilizaron las enzimas XhoI y HindIII para la restricción y liberación de los fragmentos.

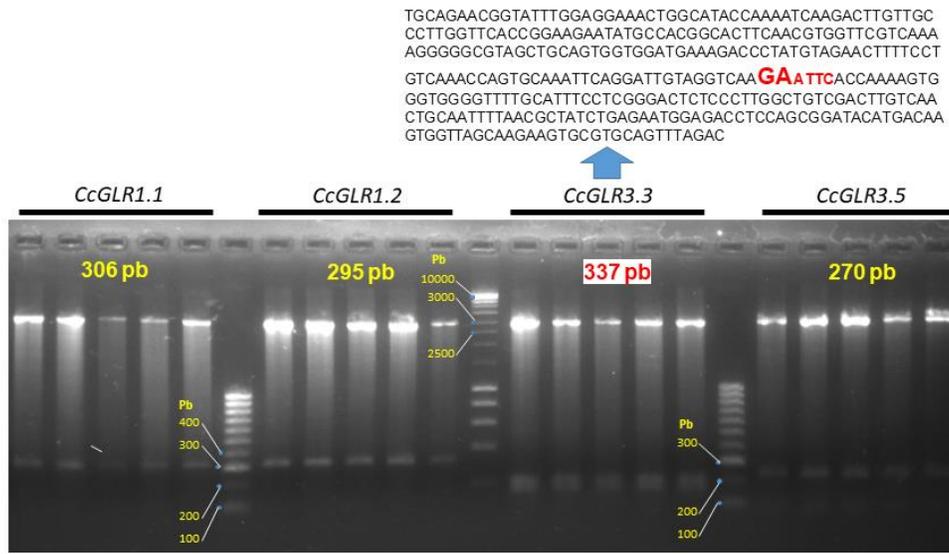


Figura 3.3. Digestión de pGEM®-T Easy para la liberación de fragmentos de *CcGLRs*. En esta figura se muestra la restricción con la enzima EcoRI para la liberación de *CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR3.3* o *CcGLR3.5* del plásmido. Arriba de las bandas (en color amarillo) se muestra el tamaño correspondiente del inserto liberado. En color rojo se muestra el tamaño correcto para el *CcGLR3.3*; sin embargo, dentro de la secuencia existe un sitio de corte para la enzima EcoRI, por lo que se generan dos fragmentos: uno de 188 pb y el segundo de 149 pb (por eso se observa un doblete).

En los resultados de las amplificaciones a partir de los plásmidos donde se clonaron los diez *CcGLRs* se observó la amplificación de todos, como se ilustra en la Figura 3.4. Todas las bandas de los amplicones concuerdan con los tamaños correspondientes. Éstas fueron las clonas que se seleccionaron para la secuenciación, a excepción del *CcGLR3.2*, en la cual se identificó otra clona que mostraba la amplificación deseada.

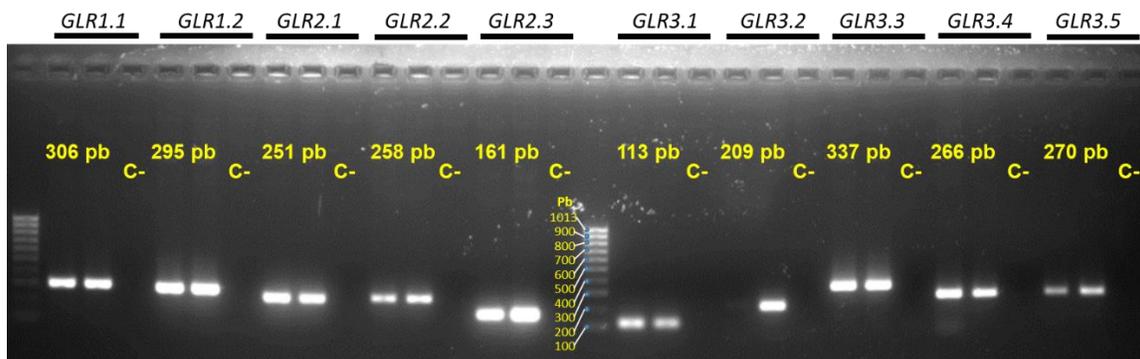


Figura 3.4. Amplificación por PCR punto final de los diez fragmentos *CcGLRs* clonados. Las amplificaciones fueron realizadas a 32 ciclos. En amarillo se muestra el tamaño del amplicon generado. C-: control negativo

3.2.3. Análisis de los productos secuenciados

Los resultados de la secuenciación mostraron que efectivamente los fragmentos de los 10 *CcGLRs* fueron clonados en los vectores “pGEM®-T Easy” o “pJET1.2/blunt”. Las secuencias de los amplicones que se obtuvieron fueron analizadas con “Multalin”, una herramienta disponible online (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Los resultados muestran que existe una homología del 100% en la secuencia de aminoácidos para *CcGLR1.2*, *CcGLR2.1*, *CcGLR3.1* y *CcGLR3.3* con las secuencias de *C. annuum*, en donde se realizó inicialmente el diseño de los oligonucleótidos. Los *CcGLR1.1* y *CcGLR3.4* mostraron una sustitución en un aminoácido, el *CcGLR2.3* una sustitución de cuatro aminoácidos, el *CcGLR3.2* una sustitución de seis aminoácidos y el *CcGLR2.2* una sustitución de siete aminoácidos, todos con respecto a su contraparte de *C. annuum* (anexo II). Estas pequeñas variaciones pueden ser resultado de diferencias reales dentro de la secuenciación entre el genoma de *C. chinense* y *C. annuum*, o también ser resultado de errores de secuenciación que no se pueden descartar.

Con los resultados de la secuenciación de los fragmentos clonados y teniendo a favor la liberación del genoma completo de chile habanero (<http://passport.pepper.snu.ac.kr/?t=PGP>), se emprendió la búsqueda de las secuencias completas de chile habanero utilizando el software “Bioedit”. Los resultados mostraron que efectivamente había una secuencia con alta homología con cada uno de los fragmentos clonados (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Secuencias completas de CcGLRs identificados en el genoma de *C. chinense* Jacq. La búsqueda de las secuencias completas se realizó a través de alineamientos locales (BLASTP), utilizando la secuencia de los fragmentos clonados.

Fragmento clonado	Secuencia de <i>C. chinense</i>	% de similitud	Tamaño (pb)
GLR 1.1	>CC.CCv1.2.scaffold622.73	100.00-(306/306)	2706
GLR 1.2	>CC.CCv1.2.scaffold675.39	100.00-(295/295)	2787
GLR 2.1	>CC.CCv1.2.scaffold123.128	100.00-(251/251)	2937
GLR 2.2	>CC.CCv1.2.scaffold123.125	99.00-(256/257)	3399
GLR 2.3	>CC.CCv1.2.scaffold123.138	97.10-(151/155)	2826
GLR 3.1	>CC.CCv1.2.scaffold254.11	100.00-(113/113)	2724
GLR 3.2	>CC.CCv1.2.scaffold254.12	100-(209/209)	2832
GLR 3.3	>CC.CCv1.2.scaffold575.98	100.00-(337/337)	2838
GLR 3.4	>CC.CCv1.2.scaffold513.10	99.00-(265/266)	777
GLR 3.5	>CC.CCv1.2.scaffold494.11	99.00 (265/266)	2811

Con las secuencias completas de los CcGLRs que se identificaron en el genoma de chile habanero y con las secuencias ya reportadas para tomate (SIGLRs) se emprendió la búsqueda de otras secuencias con alto porcentaje de homología. Los resultados arrojaron 12 secuencias (Cuadro 3.2) con alto porcentaje de homología a las secuencias identificadas en *C. chinense* y a las reportadas para tomate. Estas secuencias también fueron sometidas a BLASTP en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se encontró que contenían dominios de unión a glutamato homólogos a los de plantas (GLRs) o animales (iGluRs)

Cuadro 3.2. Otras secuencias homologas identificadas en el genoma de *C. chinense*

Secuencia de <i>C. chinense</i>	Tamaño (pb)
>CC.CCv1.2.scaffold622.56	2706
>CC.CCv1.2.scaffol622.69	2706
>CC.CCv1.2.scaffold123.131	2901
>CC.CCv1.2.scaffold123.126	2877
>CC.CCv1.2.scaffold123.132	846
>CC.CCv1.2.scaffold12.59	1146
>CC.CCv1.2.scaffold467.31	753
>CC.CCv1.2.scaffold235.60	717
>CC.CCv1.2.scaffold123.130	1599
>CC.CCv1.2.scaffold1118.34	2748
>CC.CCv1.2.scaffold885.2	2742
>CC.CCv1.2.scaffold1118.31	3339

En total se identificaron 22 secuencias CcGLRs en el genoma de *C. chinense* con tamaños que van de los 717 pb hasta los 3,339 pb.

3.2.4. Análisis filogenético de los CcGLRs identificados

Las secuencias de aminoácidos se sometieron a un alineamiento en MEGA7.0 y posteriormente a un análisis filogenético con las secuencias ya reportadas de GLRs para tomate, arroz, *A. thaliana*, rábano, dos secuencias de bacterias homologas a los receptores de glutamato ionotrópico de animales como grupos externos (anexo I) y las 22 secuencias putativas (anexo III) encontradas en el genoma de chile habanero (Figura 3.5).

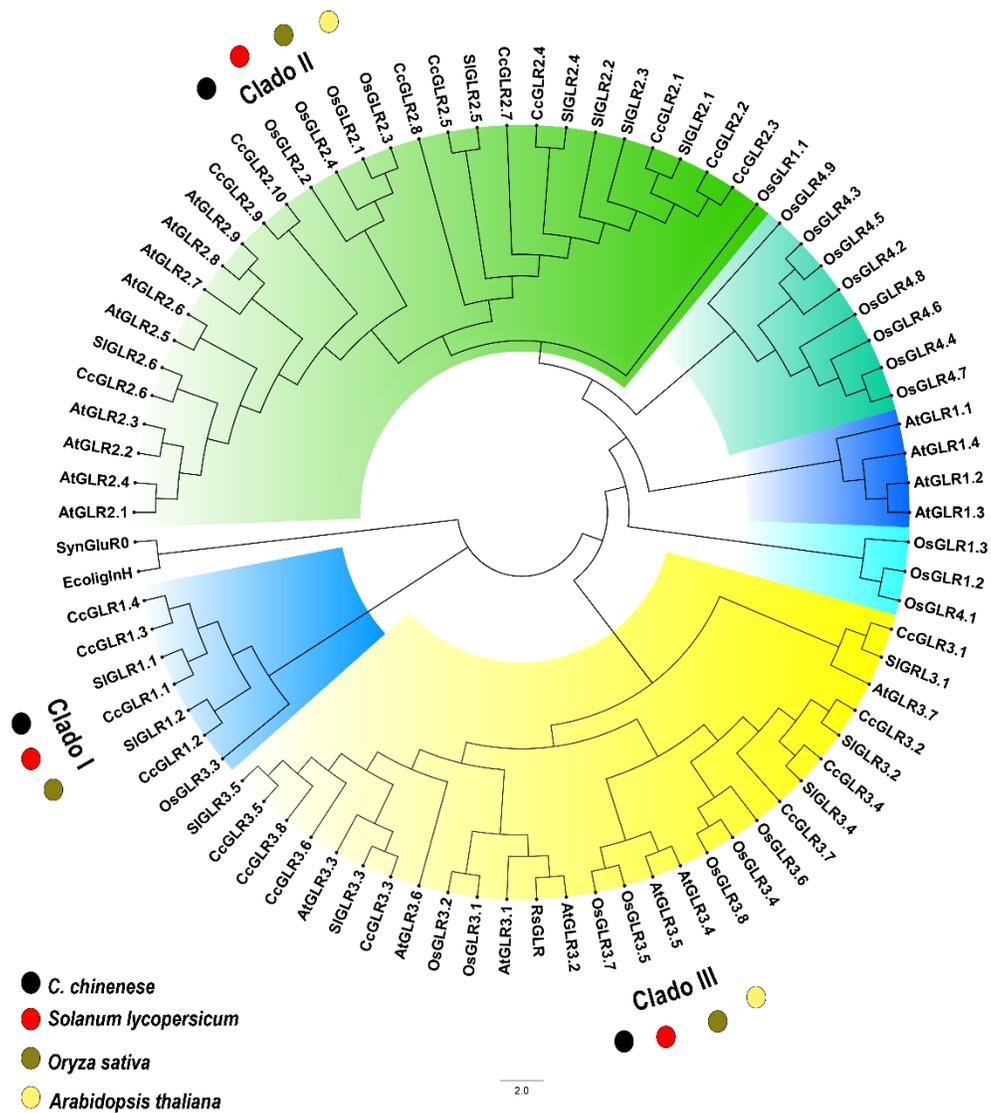


Figura 3.5. Árbol filogenético de GLRs de diferentes especies vegetales. Para el diseño del arbor se utilizaron secuencias de *A. thaliana*, de arroz, tomate, rabano y las 22 secuencias identificadas en el genoma de chile habanero. El árbol fue construido con el método de neighbour-joining con delección por pares y valores de bootstrap a partir de 1000 réplicas

Las secuencias homólogas encontradas en el genoma de chile habanero fueron nombradas de acuerdo al clado donde se agruparon y a la secuencia con la que mostraron más homología (Figura 3.5, anexo III).

Cuatro secuencias CcGLRs (CcGLR1.1-1.4) se agruparon en el clado I reportado para tomate (Aouini *et al*, 2012). Este clado no es compartido con los miembros de *Arabidopsis*,

reforzando lo reportado anteriormente por Aouini *et al.*, (2012), donde estos autores plantean que las solanáceas tienen un nuevo clado I, que lo pueden haber adquirido durante la evolución o que el clado I de *Arabidopsis* se perdió en esta familia de plantas. Se destaca también que los miembros de este clado para Chile habanero fueron el doble a los encontrados en tomate. Cercano al clado I de las solanáceas se encontró a OsGLR3.3 de arroz (Figura 3.5).

Diez secuencias de Chile habanero se agruparon en el clado II (CcGLR2.1-2.10), constituyendo así el clado más grande de Chile habanero. En este clado, tres miembros de Chile habanero (CcGLR2.6, CcGLR2.9 y CcGLR2.10) y uno de tomate (SIGLR2.6) se agruparon dentro del mismo clado de todos los miembros del clado II *Arabidopsis* y muy cercanos a cuatro miembros de arroz (OsGLR2.1-2.4). En un clado aparte, aunque también fue considerado como clado II, se agruparon los siete miembros restantes de Chile habanero (CcGLR2.1-2.5, CcGLR2.7-2.8) y los cinco de tomate (SIGLR2.1-2.5) (Figura 3.5).

En el clado III se agruparon ocho secuencias de Chile habanero (CcGLR3.1-3.8) y junto con ellas también se agruparon secuencias de *Arabidopsis*, tomate y arroz, siendo éste el clado más compartido entre todas las especies analizadas.

Demidchik *et al.*, (2002) mencionan que los GLRs de plantas posiblemente surgieron a partir de los canales de potasio de bacterias y que de ese punto se ramificaron a plantas y animales (iGluRs). Con respecto a las secuencias de animales, que es donde se han emprendido la mayoría de las investigaciones para develar las funciones que cumplen en estos organismos, existen divisiones farmacológicas, las cuales son: los del tipo NMDA, AMPA y KAINATO. En las del tipo NMDA, de acuerdo a un análisis de comparación de secuencias de aminoácidos realizado por Chiu *et al.*, (2002), se agrupan las 20 secuencias encontradas en el genoma de *A. thaliana*, con lo que sugirió que podía existir una relación con respecto a la función entre las secuencias de plantas y animales.

De acuerdo al árbol filogenético, de las 22 secuencias encontradas en el genoma de Chile habanero 18 se agrupan en los clados II y III de *A. thaliana*. Las funciones en las que están involucradas estas secuencias son en la arquitectura de la raíz (Vincill *et al.*, 2013), la senescencia (Teardo *et al.*, 2015), el gravitropismo (Miller *et al.*, 2010), la homeostasis de calcio (Kim *et al.*, 2001), la respuesta a estrés por frío (Meyerhoff *et al.*, 2005), la respuesta

a estrés por sequía (Singh *et al.*, 2014), el metabolismo del carbono (Vincill *et al.*, 2013), entre otros.

Realizando un análisis de las secuencias reportadas de *GLRs* en las especies vegetales donde se han caracterizado (*S. lycopersicum*, *A. thaliana* y *O. sativa*) junto con las 22 secuencias identificadas en este trabajo en *C. chinense*, se puede observar la distribución por clados (Figura 3.6). Como puede observarse el mayor número de *GLRs* es liderado por la monocotiledónea *O. sativa*; sin embargo, es la única especie vegetal que contiene un clado IV. Por otro lado, existe una variación en el número de *GLRs* por clados en las dos especies de solanáceas, es decir, *C. chinense* y *S. lycopersicum*. En el clado I *C. chinense* tiene el mismo número de *GLRs* que *A. thaliana* y en el clado III el mismo que *O. sativa*. El número de *GLRs* de *C. chinense* presentes en el clado II son diez, siendo la especie vegetal con más secuencias.

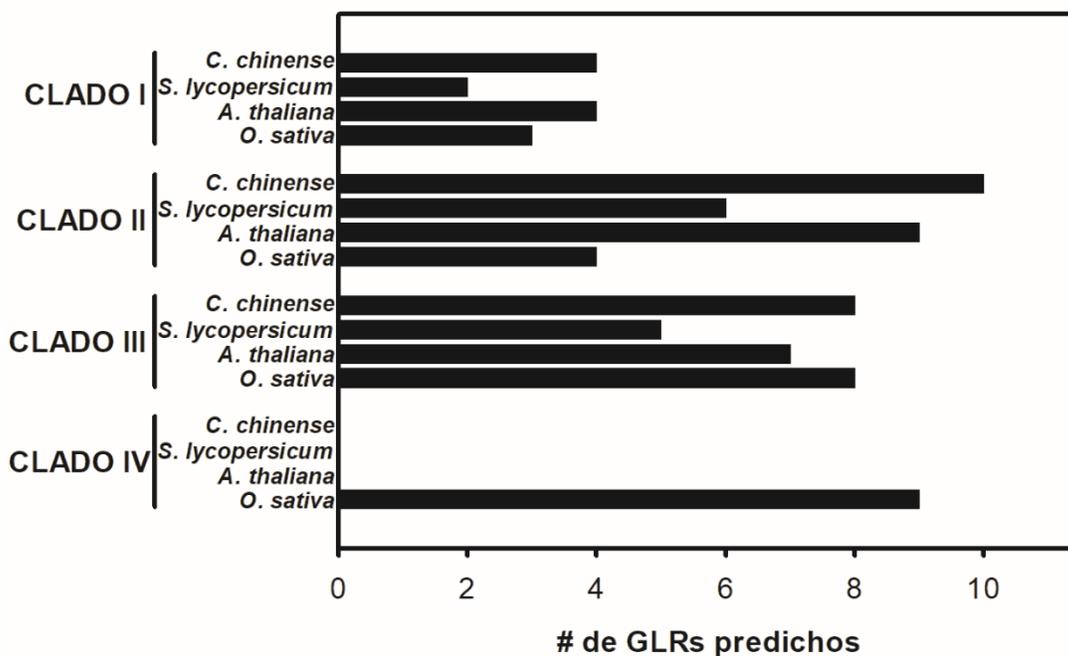


Figura 3.6. *GLRs* identificados en las diferentes especies vegetales. Los *GLRs* de cada especie vegetal están divididos por clados.

La gran diferencia en el número de secuencias reportadas en *C. chinense* (22) con respecto al número de secuencias reportadas en *S. lycopersicum*, deja cuestiones a su paso sobre, si hay presencia de más *GLRs* en el genoma de *S. lycopersicum*.

3.2.5. Identificación de los dominios característicos en los CcGLRs

Los resultados de la búsqueda de los dominios característicos utilizando la herramienta “InterPro” disponible online (anexo IV), arrojaron que, de las 22 secuencias identificadas en chile habanero, solo 16 contenían todos los dominios característicos de los GLRs de plantas. Estas secuencias pertenecen a los tres clados: en el clado I se presentaron cuatro secuencias, en el II ocho y en el III cuatro (Figura 3.7).

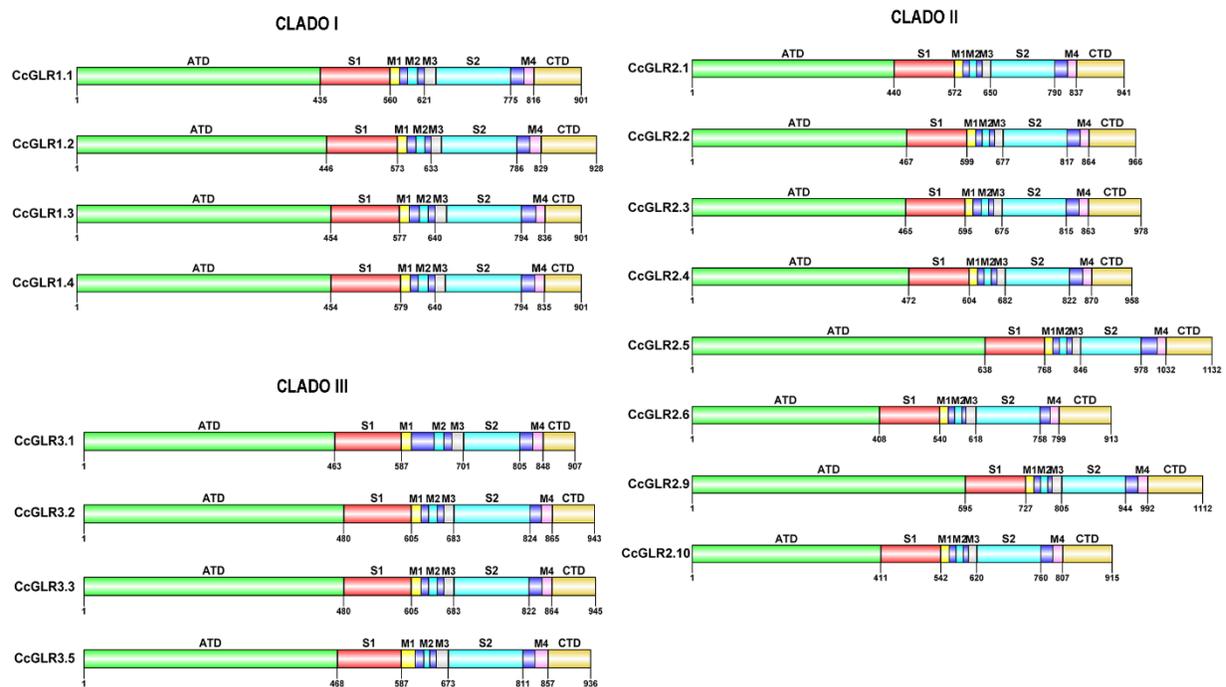


Figura 3.7. Representación lineal de los dominios encontrados en 16 de los CcGLRs. Solo estos CcGLRs contienen todos los dominios característicos de los GLRs de plantas. En la parte inferior de los dominios se representan las longitudes en aminoácidos. El diseño se realizó con el programa DOG 2.0.

El rango de tamaños de las regiones codificantes fue de 717 a 3399 pb. Sin embargo, todas las secuencias que codificaban a proteínas que contenían todos los dominios se encontraron por encima de los 2700 pb.

Los dominios transmembranales de la Figura 3.8, se obtuvieron a través del análisis con TMpred y TMHMM. Los resultados mostraron la presencia de los tres dominios transmembranales (M1, M3 y M4) y un dominio que no atraviesa completamente la membrana M2 en 16 de las 22 secuencias identificadas (Figura 3.8, anexo IV). De las seis secuencias restantes, cuatro contienen algún dominio transmembranal y dos secuencias no contiene ninguno. Sería interesante investigar estas secuencias incompletas, ya que al tener dominios de unión a glutamato sin tener todos los dominios característicos de plantas, podrían cooperar en los procesos del censado de aminoácidos para desencadenar el flujo de Ca^{2+} como ha sido reportado para estas proteínas (Okuma *et al.*, 2016; Vincill *et al.*, 2012).

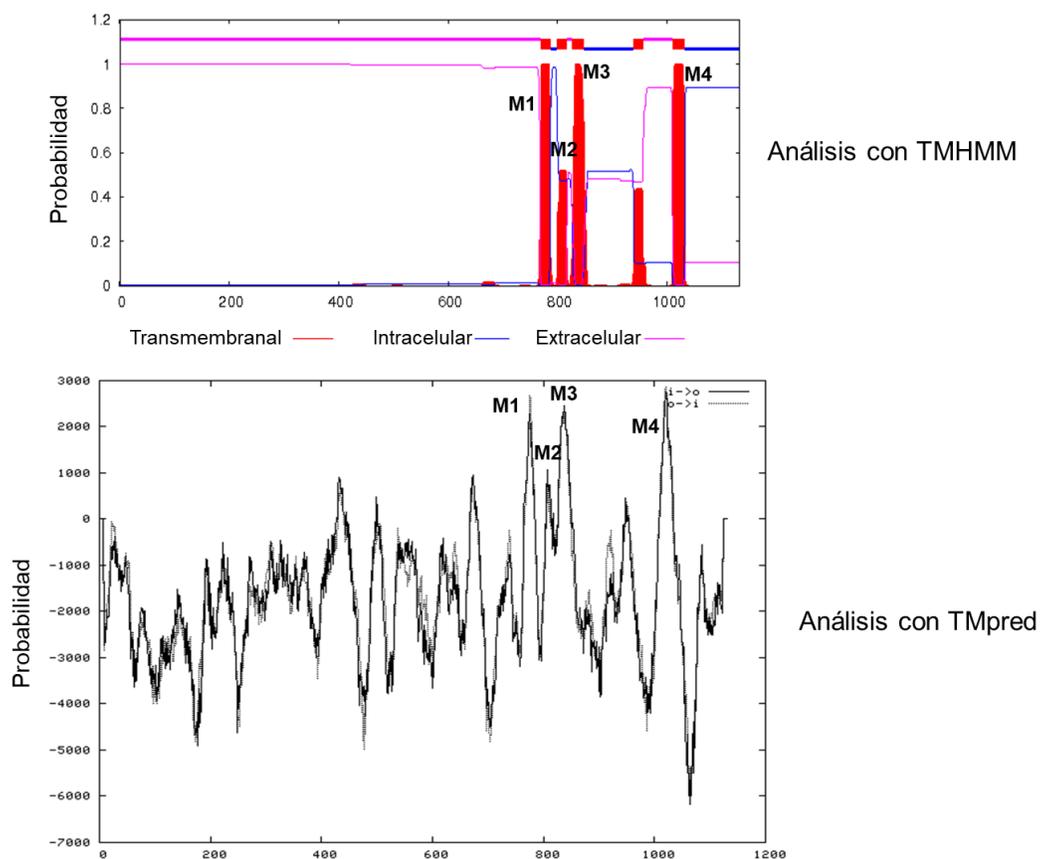


Figura 3.8. Dominios transmembranales del CcGLR2.5 de chile habanero. La búsqueda se realizó con TMHMM y con TMpred.

Al realizar el análisis con la secuencia completa de las 16 proteínas que presentaron todos los dominios, los resultados muestran que los porcentajes máximos de identidad entre los CcGLRs del mismo clado, fueron de 87, 84 y 59% para los clados I, II y III, respectivamente (Figura 3.9). Sin embargo, el porcentaje máximo de identidad entre clados diferentes disminuyó drásticamente a 37% para la comparación entre los miembros del clado I y II y III y más aún (32%) entre los clados I y III.

En el caso de los dominios de unión a ligando S1 y S2 también se observa la misma tendencia. Como ocurre con el análisis de la proteína completa, los miembros del clado III son más divergentes que el resto, ya que el máximo de identidad que se encontró fue de 61 y 73% para S1 y S2, respectivamente, comparado con un 93% y 90% encontrado para estos dominios dentro de los miembros del clado I, el menos divergentes (Figura 3.9).

La región más conservada dentro de la proteína fue la que corresponde al poro, el dominio transmembranal M2. Los máximos de identidad entre miembros de un mismo clado fueron 100, 100 y 83% para los clados I, II y III, respectivamente. Esta región fue idéntica entre los miembros CcGLR1.1 y CcGLR1.3 del clado I y entre los miembros del clado II CcGLR2.1, 2.2, 2.3 y 2.5. Este resultado sugiere que la selectividad iónica podría ser idéntica dentro de cada uno de estos grupos.

Interesantemente, al analizar esta región del poro, el máximo porcentaje de identidad obtenido al comparar proteínas que pertenecían a clados diferentes, superó los valores mínimos de identidad obtenidos al comparar los miembros dentro de un mismo clado. Esto indica que algunos miembros de un clado se pueden parecer más a miembros de otro clado que a los del mismo al que pertenecen.

Por ejemplo, al comparar los miembros del clado I con los del III se presentó un 59% de identidad máxima, el cual fue mayor al 31% de identidad mínima presentada dentro de los miembros del clado I. Esto se debió a que CcGLR1.2 se pareció más en esta región (59% de identidad) a CcGLR2.2 y 2.3 que a CcGLR1.1, 1.3 y 1.4 (31% de identidad con todos). De igual manera, entre el clado I y III se presentó el valor más alto de identidad (63%) entre clados diferentes y este se produjo entre las proteínas CcGLR1.2 y CcGLR3.3 y 3.2. Esto significa que la proteína CcGLR1.2 es diferente en la región del poro a aquellas que pertenecen a su clado y tiene un parecido mayor con las del clado III.

También resulta interesante el bajo porcentaje de identidad presentado en esta región dentro del clado III, cuyo valor menor correspondió al 13%. Este fue presentado por la proteína CcGLR3.1, la cual fue muy poco conservada en esta región a cualquier miembro de su clado; en este caso su mayor porcentaje de identidad lo presentó con CcGLR3.5 y fue de únicamente un 25%. Al compararla con los demás miembros de otros clados tampoco se obtuvo un parecido importante con éstos; siendo los valores más altos de un 13% de identidad. Esto hace a CcGLR3.1 un blanco de estudio muy importante, en cuanto a su selectividad por los cationes.

A partir de esta figura también se puede concluir que es el dominio S2 el que está determinando la pertenencia de un miembro CcGLR a un clado determinado, ya que los porcentajes de identidad máximo entre clados diferentes nunca superaron a aquellos mínimos dentro de cada clado. En otras palabras, las máximas diferencias entre las proteínas se reflejaron entre las que pertenecían a clados diferentes, y no entre las de un mismo clado (Figura 3.6)

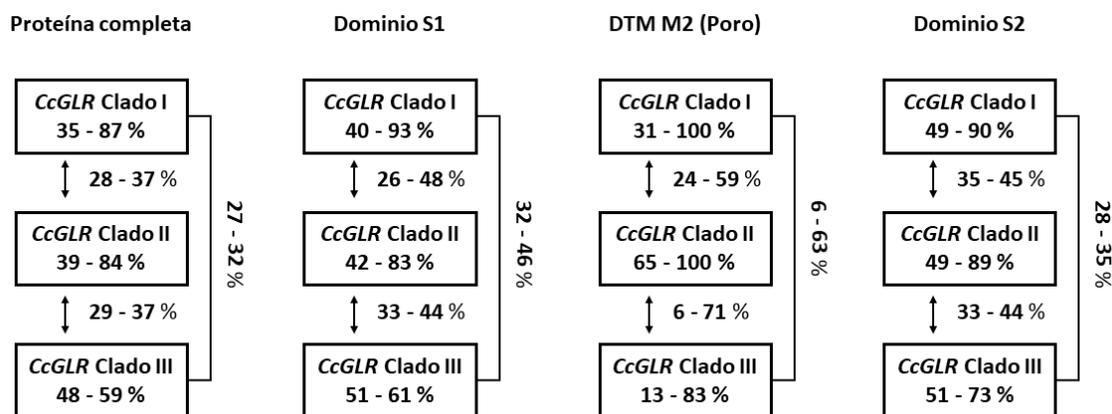


Figura 3.9. Porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos de los CcGLRs. Los porcentajes de identidad se obtuvieron para la secuencia codificante completa, los dominios de unión a ligando (S1 y S2) y el dominio M2. Se presentan los rangos de identidad, del menor al mayor valor encontrado para cada grupo analizado

3.3. CONCLUSIÓN

Se clonaron 10 fragmentos de secuencias homólogas a los GLRs de plantas, las cuales tienen porcentajes de homología mayor al 90 % con las secuencias reportadas para *C. annuum*.

Con las secuencias clonadas y con las secuencias GLRs reportadas para tomate y *Arabidopsis* se identificaron 22 secuencias en el genoma de chile habanero. Estas secuencias se agruparon en tres clados distintos.

El análisis bioinformático mostró que 16 de las 22 secuencias contienen todos los dominios característicos de los CcGLRs de plantas.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN GENERAL

En este proyecto se planteó perturbar el proceso reproductivo en chile habanero como se mencionó anteriormente, a través de la modificación en la disponibilidad de nitrógeno y estrés hídrico. En un experimento preliminar se obtuvo que un aumento en la concentración de nitrógeno hasta 7.5 mM no provocó grandes cambios en la producción de flores y frutos. Por lo tanto, se planteó realizar un segundo experimento con una dosis mayor de nitrógeno (15 mM de KNO_3), tomando como base lo establecido por Medina-Lara *et al.*, (2008), quienes mencionan que 15 mM es la concentración donde se logra la producción máxima de flores y frutos por planta. En este segundo experimento se establecieron los tratamientos 1 mM de $\text{KNO}_3 + \text{R}$, 1 mM de $\text{KNO}_3 - \text{R}$, 7.5 mM de $\text{KNO}_3 + \text{R}$, 15 mM de $\text{KNO}_3 + \text{R}$ y 15 mM de $\text{KNO}_3 - \text{R}$, nuevamente con la finalidad de modificar los procesos reproductivos.

Los resultados de este segundo experimento mostraron que el estrés hídrico disminuyó los rendimientos de flores y frutos alrededor del 50 %. Los resultados de la disminución del número de flores y frutos por planta en respuesta al estrés hídrico concuerdan con lo establecido por Showemimo *et al.*, (2007) quienes mostraron que el estrés hídrico puede disminuir hasta el 79 % la producción de flores en *C. annuum* variedad "L5962-2". También Jaimez *et al.*, (2000) mostraron que el número de flores por planta disminuye desde 20 flores por planta en condiciones de riego, hasta cuatro flores por planta en estrés hídrico (durante un registro de una semana). Con respecto a la formación de fruto está documentado que este factor es uno de los que mayor afectación ejerce sobre el rendimiento. En *C. annuum* (variedad L5962-2) un estrés hídrico de 14 días puede causar la pérdida de hasta el 99 % de la producción (Showemimo *et al.*, 2007). En chile habanero un estrés de nueve días puede disminuir la producción hasta el 62 % (Jaimez *et al.*, 2000). Sin embargo, los mecanismos involucrados en esta reducción aún no se conocen.

Los resultados del efecto del nitrógeno sobre la producción de flores y frutos señalan que conforme aumenta la dosis de nitrógeno hay una tendencia a la disminución del número de flores y frutos. Esto contrasta con lo establecido por Medina-Lara *et al.*, (2008), donde la concentración de nitrógeno (NH_4^+) aumenta de forma lineal la producción de flores, hasta una concentración límite en plantas de chile habanero variedad jaguar. Esto puede ser

resultado de la fórmula de nitrógeno disponible, ya que en nuestro experimento se utilizó KNO_3 . Algo muy importante de mencionar es que existe una concentración límite de producción en respuesta a la dosis de nitrógeno. En *C. annuum* variedad Hazera 1195 Xu *et al.*, (2001) demostraron que el aumento de la fertilización de 3 a 9 mM de nitrógeno daba como resultado un aumento en la producción de flores por planta; sin embargo, Aminifard *et al.*, (2012) mostraron que la variedad paprika de *C. annuum* no muestra un aumento en el número de flores por planta a pesar de que se apliquen altas dosis de nitrógeno al suelo (150 kg / hectárea). Por lo tanto, la tendencia a la disminución en el número de flores por planta en respuesta al aumento en la dosis de nitrógeno puede ser debido a factores genéticos de la planta.

Los resultados del primer y segundo experimento muestran que una afectación en la reproducción de chile habanero en respuesta al estrés hídrico y la dosis de nitrógeno aplicada. Por lo tanto, estos grandes cambios en la producción de flores y frutos como consecuencias del estrés hídrico y la disponibilidad de nitrógeno, tienen que ser regidos en gran parte por enormes variaciones en los perfiles transcriptómicos (Ohama *et al.*, 2017; Gent & Forde, 2017). Esto da lugar a un excelente modelo vegetal para el estudio de genes y proteínas que estén implicados en los procesos reproductivos.

En este proyecto se planteó la identificación de GLRs y el nivel de expresión en cinco etapas del desarrollo reproductivo, que abarcaron botón floral, flor en antesis, frutos de 10, 25 y 45 días pos-antesis bajo los tratamientos de dosis de nitrógeno y estrés hídrico.

En el segundo lote de plantas, donde se obtuvieron los cinco estados del desarrollo reproductivo (botón floral, flor en antesis, frutos de 10, 25 y 45 días pos-antesis), los resultados mostraron la presencia de nueve *CcGLRs* en el tratamiento fertilizado con una dosis de 1 mM de KNO_3 en condiciones de riego diario. Los *CcGLR1.1*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4* mantuvieron su expresión a lo largo de los cinco tejidos evaluados, aunque en mayor nivel de expresión pudo visualizarse durante las etapas de botón floral, flor en antesis y frutos de 10 días pos-antesis. En cambio, los *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3* y *CcGLR2.5* solo mostraron expresión durante los tres primeros estados del desarrollo reproductivo.

En los tratamientos donde se modificaron las concentraciones de nitrógeno, el perfil de expresión de los GLR mostro diferencias. La expresión de *CcGLR1.1*, *CcGLR2.3*,

CcGLR3.1, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3*, *CcGLR3.4* y *CcGLR3.5* fue diferente en los tres regímenes de fertilización. Los *CcGLR1.1*, *CcGLR2.3* mostraron una alta expresión en el tratamiento a 7.5 Mm de KNO_3 , principalmente en los tejidos de botón floral, flores en antesis y frutos de 10 días pos-antesis. En este mismo tratamiento y en botón floral los *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4* mostraron también un mayor nivel de expresión comparado con los demás tratamientos. Estos resultados refuerzan la teoría sobre que estos recetores están involucrados en el balance carbono nitrógeno. En *A. thaliana* se encontró que semillas de una línea mutante de *AtGLR1.1* (*antiAtGLR1.1*) colocadas en un medio desbalanceado en carbono-nitrógeno no germinan (Kang & Turano, 2003). En nuestro estudio el *CcGLR1.1* modificó drásticamente su expresión en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno, por lo que puede ser un candidato para estudiar su papel bajo estas condiciones. Por lo tanto, nuevos estudios y nuevas estrategias experimentales son necesarias para develar como estos receptores están involucrados en el censado de nitrógeno-carbono dentro de la planta.

Los tratamientos en estrés hídrico también mostraron variación en el perfil de expresión de los *CcGLRs* cuando se comparaban con su contraparte en condiciones de riego normal bajo la misma condición de fertilización. En el tratamiento a 1 mM de KNO_3 en condiciones de estrés hídrico los *CcGLRs* que mostraron variación en el nivel de expresión fueron *CcGLR2.3*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4*. Todos mostraron un aumento en la expresión bajo condiciones de déficit hídrico y algo de destacar es que el aumento fue visible a través de todos los estados de desarrollo evaluados.

Por otro lado, en el tratamiento a 15 mM de KNO_3 en condiciones de estrés hídrico los *CcGLRs* que mostraron variación en el nivel de expresión.

Cuando se aumenta la dosis de nitrógeno en condiciones de estrés hídrico se observa la mayor variación en los perfiles de expresión, cuando se compara con el tratamiento a la misma concentración de KNO_3 , pero en condiciones de riego normal. Los *CcGLR1.1*, *CcGLR2.1*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3* y *CcGLR3.4* aumentaron su expresión considerablemente en los tejidos de botón floral, flor en antesis y frutos de 10 días pos-antesis comparado con el tratamiento en las mismas condiciones de fertilización, más condiciones de riego normal.

Existen reportes del papel que cumplen los GLR frente a condiciones de estrés hídrico. En arroz y *Arabidopsis* la sobreexpresión de los *OsGLR1.1* y *OsGLR1.3* da como resultado plantas que tienen una mayor tolerancia al estrés hídrico (Lu *et al.*, 2014). En otra investigación, Singh *et al.*, (2014) encontraron que en condiciones de estrés por sequía los *OsGLR1.1*, *OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.5*, *OsGLR3.6*, *OsGLR3.7*, *OsGLR4.7* y *OsGLR4.9* modificaron su expresión. En nuestro perfil de expresión bajo condiciones de estrés hídrico, se modificó la expresión de *CcGLRs* del clado I y III, los cuales serían candidatos ideales para estudiar su papel frente a este factor abiótico de gran importancia.

De los genes que se analizaron en este trabajo, diez (*CcGLR1.1*, *CcGLR1.2*, *CcGLR2.1*, *CcGLR2.2*, *CcGLR2.3*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2*, *CcGLR3.3*, *CcGLR3.4* y *CcGLR3.5*) fueron clonados y secuenciados y se comprobó a través del análisis de identidad que correspondían a su homólogo en *C. annuum*, de los cuales se partió para el diseño de los cebadores.

Aprovechando la liberación reciente del genoma de chile habanero, se realizó la búsqueda de otras secuencias homologas a las secuencias completas ya identificadas (las 12 secuencias clonadas) y las secuencias reportadas para *S. lycopersicum*. Los resultados mostraron la presencia de 10 secuencias más que contenían dominios de unión a glutamato. A través de un análisis filogenético las 22 secuencias fueron agrupadas en tres clados (I, II, y III). Dieciocho secuencias se agruparon en el clado II y III, y solo cuatro secuencias se agruparon en el clado I. De las 22 secuencias encontradas, 16 contenían todos los dominios característicos de los GLR de plantas (Lam *et al.*, 1998). Las 16 secuencias que contienen todos los dominios provienen de los tres clados de *C. chinense* y es de importancia la búsqueda de la función biológica que llevan a cabo dentro de esta especie vegetal. Las seis secuencias restantes no contienen todos los dominios, sin embargo, también es importante su investigación, ya que contiene los dominios de unión a glutamato.

BIBLIOGRAFÍA

- Aminifard, M. H., Aroiee, H., Nemati, H., Azizi, M., & Khayyat, M. (2012). Effect of nitrogen fertilizer on vegetative and reproductive growth of pepper plants under field conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 35(2), 235–242.
- Anjum, S., Xie, X., & Wang, L. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026–2032.
- Aouini, A., Matsukura, C., Ezura, H., & Asamizu, E. (2012). Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*, 493(1), 36-43.
- Ayalon, G., & Stern-Bach, Y. (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron*, 31(1), 103-113.
- Bard, L., & Groc, L. (2011). Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 48(4), 298-307.
- Bhuvanewari, G., Sivaranjani, R., Reeth, S., & Ramakrishnan, K. (2013). Original Research Article Application of Nitrogen and Potassium efficiency on the growth and yield of chilli *Capsicum annum* L. *Journal of Microbiology*, 2(12), 329–337.
- Carrasco, M. A., & Hidalgo, C. (2006). Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell calcium*, 40(5-6), 575-583.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239–264.
- Chen, G. Q., Cul, C., Mayer, M. L., & Gouaux, E. (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature*, 402(6763), 817–821.
- Chiu, J. C., Brenner, E. D., DeSalle, R., Nitabach, M. N., Holmes, T. C., & Coruzzi, G. M. (2002). Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular biology and evolution*, 19(7), 1066-1082.

- Cho, D., Kim, S. A., Murata, Y., Lee, S., Jae, S. K., Nam, H. G., & Kwak, J. M. (2009). De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3. 1 impairs long-term Ca²⁺ programmed stomatal closure. *The Plant Journal*, 58(3), 437-449.
- Clarkson, D. T., & Hanson, J. B. (1980). The Mineral Nutrition of Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 239–298.
- Cohen, S., & Greenberg, M. E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 183-209
- Demidchik, V., Davenport, R. J., & Tester, M. (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 67–107.
- Dennison, K. L., & Spalding, E. P. (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1511-1514.
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 101–113.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 51(1), 7-62.
- Dubos, C., Huggins, D., Grant, G. H., Knight, M. R., & Campbell, M. M. (2003). A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *The Plant Journal*, 35(6), 800-810.
- Ferrara, A., Lovelli, S., Di Tommaso, T., & Perniola, M. (2011). Flowering, growth and fruit setting in greenhouse bell pepper under water stress. *Journal of Agronomy*, 10(1), 12-19.
- Fischer, W. N., André, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitzkreuz, K., & Frommer, W. B. (1998). Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science*, 3(5), 188-195.

- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301-310.
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments*, 6(6).
- Garruña-Hernández, R., Canto, A., Mijangos-Cortés, J. O., Islas, I., Pinzón, L., & Orellana, R. (2012). Changes in flowering and fruiting of Habanero pepper in response to higher temperature and CO₂. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(3–4), 802–808.
- Garruña-Hernández, R., Orellana, R., Larque-Saavedra, A., & Canto, A. (2014). Understanding the physiological responses of a tropical crop (*Capsicum chinense* Jacq.) at high temperature. *PLoS ONE*, 9(11), 111402.
- Gent, L., & Forde, B. G. (2017). How do plants sense their nitrogen status? *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2531–2540.
- Gojon, A. (2017). Nitrogen nutrition in plants: rapid progress and new challenges. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2457–2462.
- Henley, J. M. (1994). Kainate-binding proteins: phytoeny, structures and possible functions. *Trends in pharmacological sciences*, 15(6), 182-190.
- Hilleary, R., & Gilroy, S. (2018). Systemic signaling in response to wounding and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 43, 57–62.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1938) The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation*, 347, 32.
- Hodge, A. (2004). The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New phytologist*, 162(1), 9-24.
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience*, 17(1), 31-108.

- Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W., & Heinemann, S. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, 342(6250), 643-648.
- Houamed, K. M., & Kuijper, J. L. (1991). Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science*, 252(5010), 1318.
- Jaimez, R. E., Vielma, O., Rada, F., & García-Núñez, C. (2000). Effects of water deficit on the dynamics of flowering and fruit production in *Capsicum chinense* Jacq in a tropical semiarid region of Venezuela. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 185(2), 113–119.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1), 100-105.
- Kang, J., & Turano, F. J. (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*, 100(11), 6872-6877.
- Kang, J., Mehta, S., & Turano, F. J. (2004). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1. 1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant and Cell Physiology*, 45(10), 1380-1389.
- Kang, S., Kim, H. B., Lee, H., Choi, J. Y., Heu, S., Oh, C. J., ... An, C. S. (2006). Overexpression in *Arabidopsis* of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated Ca^{2+} influx and delays fungal infection. *Molecules and Cells*, 21(3), 418–427.
- Kant, S., Bi, Y.-M., & Rothstein, S. J. (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1499–1509.
- Kaur, G., & Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61(2), 201–209.
- Kim, S. A., Kwak, J. M., Jae, S. K., Wang, M. H., & Nam, H. G. (2001). Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate

- receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant and Cell Physiology*, 42(1), 74–84.
- Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., ... Choi, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, 46(3), 270–278.
- Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867), 835.
- Kuner, T., Seeburg, P. H., & Guy, H. R. (2003). A common architecture for K⁺ channels and ionotropic glutamate receptors?. *Trends in neurosciences*, 26(1), 27-32.
- Kuusinen, A., Abele, R., Madden, D. R., & Keinänen, K. (1999). Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 28937-28943.
- Labanauskas, C. K., Shouse, P., Stolzy, L. H., & Handy, M. F. (1981). Protein and free amino acids in field-grown cowpea seeds as affected by water stress at various growth stages. *Plant and Soil*, 63(3), 355-368.
- Lam, H. M., Chiu, J., Hsieh, M. H., Meisel, L., Oliveira, I. C., Shin, M., & Coruzzi, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396(6707), 125-126.
- Latournerie-moreno, L., & Pérez-gutiérrez, J. L. A. A. (2018). Caracterización Fenológica Y Fisiológica De Variedades Experimentales De Chile Habanero Con Alto Potencial Agronómico Phenological and Physiological Characterization of Experimental Habanero Pepper Varieties With High Agronomic Potential. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(1), 67–74.
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 460, 525–542.
- Lee, C. J., Kong, H., Manzini, M. C., Albuquerque, C., Chao, M. V., & MacDermott, A. B. (2001). Kainate Receptors Expressed by a Subpopulation of Developing Nociceptors Rapidly Switch from High to Low Ca²⁺Permeability. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4572–4581.

- Lerma, J., & Marques, J. M. (2013). Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron*, 80(2), 292–311.
- Li, F., Wang, J., Ma, C., Zhao, Y., Wang, Y., Hasi, A., & Qi, Z. (2013). Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in Arabidopsis. *Plant physiology*, 162(3), 1497-1509.
- Li, G., Wu, S., Cai, L., Wang, Q., Zhao, X., & Wu, C. (2013). Identification and mRNA expression profile of glutamate receptor-like gene in quinclorac-resistant and susceptible Echinochloa crus-galli. *Gene*, 531(2), 489-495.
- Li, J., Zhu, S., Song, X., Shen, Y., Chen, H., Yu, J., ... & Deng, X. W. (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(2), 340-349.
- Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. (2012). Water stress in plants: causes, effects and responses. In *Water stress*. Intechopen.
- López Riquelme, G. O. (2003). Chilli. Especia del nuevo mundo. *Ciencias*, (069).
- López, P. G., Canto, A. F., & Santana, N. B. (2009). El reto biotecnológico del chile habanero. *Ciencia*, 60, 30-35.
- Lozano, J. G., & Fonseca, L. P. M. (2016). Respuestas fisiológicas de Theobroma cacao L. En etapa de vivero a la disponibilidad de agua en el suelo. *Acta Agronómica*, 65(1), 44–50.
- Lu, G., Wang, X., Liu, J., Yu, K., Gao, Y., Liu, H., ... & Mao, G. (2014). Application of T-DNA activation tagging to identify glutamate receptor-like genes that enhance drought tolerance in plants. *Plant cell reports*, 33(4), 617-631.
- Lubin, F. D., Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *Journal of Neuroscience*, 28(42), 10576-10586.

- Macías Rodríguez, H., Muñoz Villalobos, J. A., Velásquez Valle, M. A., Potisek Talavera, M. del C., & Villa Castorena, M. M. (2013). Habanero pepper: growing description in the yucatan peninsula. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, XII(2), 37–43.
- Madden, D. R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 91-101.
- Mao, B., Pear, M. R., McCammon, J. A., & Quioco, F. A. (1982). Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model. *Journal of Biological Chemistry*, 257(3), 1131-1133.
- Maricq, A. V., Peckol, E., Driscoll, M., & Bargmann, C. I. (1995). Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor. *Nature*, 378(6552), 78.
- Mayer, M. L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, 440(7083), 456-462.
- Medina-Lara, F., Echevarría-Machado, I., Pacheco-Arjona, R., Ruiz-Lau, N., Guzmán-Antonio, A., & Martínez-Estevez, M. (2008). Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 43(5), 1549-1554.
- Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, M. R. G., Latz, A., Lacombe, B., Hedrich, R., ... Becker, D. (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*, 222(3), 418–427.
- Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., & Feijó, J. A. (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*, 332(6028), 434-437.
- Miller, N. D., Brooks, T. L. D., Assadi, A. H., & Spalding, E. P. (2010). Detection of a gravitropism phenotype in glutamate receptor-like 3.3 mutants of *Arabidopsis thaliana* using machine vision and computation. *Genetics*, 186(2), 585–593.
- Monaghan, D. T., Bridges, R. J., & Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 29(1), 365-402.

- Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500(7463), 422–426.
- Murray, D. R. (1983). Changes in free amino acid and amide composition during fruit and seed development of garden pea, *Pisum sativum* L. *New Phytologist*, 93(1), 33-41.
- Nath, A., Vetrovec, G. W., Cowley, M. J., Newton, M., DiSciascio, G., Mukharji, J., & Lewis, S. a. (2010). Glutamate receptor review. *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis*, 14(1), 37–40.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science*, 22(1), 53-65.
- Okuma, E., Murata, Y., Pei, Z., Kwak, J. M., Kong, D., Hu, H., ... Munemasa, S. (2016). L-Met Activates Arabidopsis GLR Ca 2 + Channels Upstream of ROS Production and Regulates Stomatal Report L-Met Activates Arabidopsis GLR Ca 2 + Channels Upstream of ROS Production and Regulates Stomatal Movement. *CellReports*, 17(10), 2553–2561.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*, 54(5), 581-618.
- Pérez-Castañeda, L. M., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., & Mayek-Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 117-128.
- Pin, J. P., & Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34(1), 1-26.
- Pinheiro, P., & Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 457–482.

- Price, M. B., Kong, D., & Okumoto, S. (2013). Inter-subunit interactions between Glutamate-Like Receptors in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(12), e27034.
- Qi, Z., Stephens, N. R., & Spalding, E. P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*, 142(3), 963-971.
- Reynolds, H. L., & D'Antonio, C. (1996). The ecological significance of plasticity in root weight ratio in response to nitrogen: Opinion. *Plant and Soil*, 185(1), 75–97.
- Roy, B. C., & Mukherjee, A. (2016). Computational analysis of the glutamate receptor gene family of Arabidopsis thaliana. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1102(September), 1–21.
- Roy, S. S., Khan, M. S. I., & Pall, K. K. (2011). Nitrogen and Phosphorus Efficiency on the Fruit Size and Yield of Capsicum. *J Exp Sci*, 2(1), 32–37.
- Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., & Martínez-Estévez, M. (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 62(3), 70–78.
- Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Minero-García, Y., Zamudio-Moreno, E., Guzmán-Antonio, A., Echevarría-Machado, I., & Martínez-Estévez, M. (2011). Water Deficit Affects the Accumulation of Capsaicinoids in Fruits of Capsicum chinense Jacq. *HortScience*, 46(3), 487-492.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Salvioli, A., Zouari, I., Chalot, M., & Bonfante, P. (2012). The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit. *BMC plant biology*, 12(1), 44.
- Schoepp, D. D., Jane, D. E., & Monn, J. A. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 38(10), 1431-1476.
- Showemimo, F. A., & Olarewaju, J. D. (2007). Drought tolerance indices in Sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Atmospheric Environment*, 1, 29–33.

- Showler, A. T. (2009). Free amino acid profiles in reproductive and rind portions of cotton fruiting bodies. *Subtropical Plant Science*, 61, 37-48.
- Singh, A., Kanwar, P., Yadav, A. K., Mishra, M., Jha, S. K., Baranwal, V., & Pandey, G. K. (2014). Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *The FEBS journal*, 281(3), 894-915.
- Stephens, N. R., Qi, Z., & Spalding, E. P. (2008). Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the GLR3.3 and GLR3.4 genes. *Plant physiology*, 146(2), 529-538.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). Essential nutrients, deficiencies, and plant disorders. *Plant Physiol*, 3, 93-109.
- Tapken, D., & Hollmann, M. (2008). Arabidopsis thaliana glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *Journal of molecular biology*, 383(1), 36-48.
- Tapken, D., Anschütz, U., Liu, L. H., Huelsken, T., Seebohm, G., Becker, D., & Hollmann, M. (2013). A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Sci. Signal.*, 6(279), ra47-ra47.
- Teardo, E., Carraretto, L., Bortoli, S. De, Costa, A., Behera, S., Wagner, R., Szabo, I. (2015). Alternative Splicing-Mediated Targeting of the Arabidopsis glutamate receptor 3.5 to Mitochondria Affects Organelle Morphology. *Plant Physiology*, 167(1), 216–227.
- Teardo, E., Formentin, E., Segalla, A., Giacometti, G. M., Marin, O., Zanetti, M., ... & Szabò, I. (2011). Dual localization of plant glutamate receptor AtGLR3. 4 to plastids and plasmamembrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(3), 359-367.
- Tegeder, M., & Masclaux-Daubresse, C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist*, 217(1), 35-53.
- Thanapornpoonpong, S. N., Vearasilp, S., Pawelzik, E., & Gorinstein, S. (2008). Influence of various nitrogen applications on protein and amino acid profiles of amaranth and quinoa. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11464-11470.

- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496.
- Ultsch, A., Schuster, C. M., Laube, B., Betz, H., & Schmitt, B. (1993). Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*: primary structure of a putative NMDA receptor protein expressed in the head of the adult fly. *FEBS letters*, 324(2), 171-177.
- Vatsa, P., Chiltz, A., Bourque, S., Wendehenne, D., Garcia-Brugger, A., & Pugin, A. (2011). Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production. *Biochimie*, 93(12), 2095-2101.
- Villa Castorena, M., Catalán Valencia, E. A., Inzunza Ibarra, M. A., Román López, A., Macías Rodríguez, H., & Cabrera Rodarte, D. (2014). Producción hidropónica de chile habanero en invernadero.
- Vincent, P., & Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*, 158(1), 309-323.
- Vincill, E. D., Bieck, A. M., & Spalding, E. P. (2012). Ca²⁺ conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant physiology*, 159(1), 40-46.
- Vincill, E. D., Clarin, A. E., Molenda, J. N., & Spalding, E. P. (2013). Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(4), 1304-1313.
- Vissel, B., Krupp, J. J., Heinemann, S. F., & Westbrook, G. L. (2001). A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nature neuroscience*, 4(6), 587-596.
- Wang, J. Q., Fibuch, E. E., & Mao, L. (2007). Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *Journal of neurochemistry*, 100(1), 1-11.
- Wang, L., Xu, R., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Tu, Y., & Zeng, X. (2010). Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123(4), 1259-1266.

- Weiland, M., Mancuso, S., & Baluska, F. (2016). Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 43(1), 1-25.
- Wroblewski, J. T., & Danysz, W. (1989). Modulation of glutamate receptors: molecular mechanisms and functional implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 29(1), 441-474
- Wubs, A. M., Heuvelink, E., & Marcelis, L. F. M. (2009). Abortion of reproductive organs in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.): A review. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(5), 467–475.
- Wudick(a), M. M., Michard, E., Nunes, C. O., & Feijó, J. A. (2018). Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates? *Journal of Experimental Botany*, 69(17), 4151–4163.
- Wudick(b), M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M. A., Nunes, C. O., ... & Pantoja, O. (2018). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science*, 360(6388), 533-536.
- Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, 63, 153-182.
- Xu, G., Wolf, S., & Kafkafi, U. (2001). Interactive effect of nutrient concentration and container volume on flowering, fruiting, and nutrient uptake of sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition*, 24(3), 479–501.
- Yuan, H., Low, C. M., Moody, O. A., Jenkins, A., & Traynelis, S. F. (2015). Ionotropic GABA and glutamate receptor mutations and human neurologic diseases. *Molecular pharmacology*, 88(1), 203-217.
- Zhu, S., & Gouaux, E. (2017). Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 112, 11–15.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

Los tratamientos de estrés hídrico y variación en la disponibilidad de nitrógeno afectan la reproducción en plantas de chile habanero. El estrés hídrico fue el factor que tuvo un mayor efecto negativo en los rendimientos de flores y frutos por planta. Sin embargo, en el tratamiento con mayor concentración de nitrógeno (15 mM de KNO₃), más condiciones de estrés hídrico se observa una disminución en el porcentaje de aborto floral.

Inicialmente se identificaron siete secuencias homologas a los receptores de glutamato en los diferentes estadios del desarrollo reproductivo evaluados de chile habanero a través de PCR punto final. También se observó que la expresión de los *CcGLRs* fue diferente para cada estadio.

A través de la réplica de dos experimentos se demostró que la variación en la disponibilidad de nitrógeno (KNO₃) y condiciones de estrés hídrico modifican el perfil de expresión de los *CcGLRs* en los diferentes tejidos evaluados.

Los 10 fragmentos secuenciados de chile habanero (*CcGLRs*) tienen un alto porcentaje de homología (> 90%) con las secuencias de *C. annuum* que se utilizaron como base para el diseño de los oligonucleótidos.

Teniendo a favor la liberación del genoma de chile habanero, mediante un análisis de comparación de secuencia se identificaron en total 22 *CcGLRs*. En un análisis filogenético las secuencias se dividieron en tres clados. Diez secuencias *CcGLRs* se agruparon en el clado II y ocho secuencias en el clado III, junto con las secuencias reportadas de *A. thaliana*, mientras que las cuatro secuencias restantes se agruparon en el clado I de tomate.

Todas las secuencias identificadas contienen un dominio de unión a glutamato, sin embargo, solo 16 contienen todos los dominios característicos de los GLRs de plantas.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se identificaron *CcGLRs* en diferentes estados del desarrollo reproductivo a través de PCR punto final, sin embargo, aún hace falta la corroboración de los resultados a través de PCR tiempo real.

Es de importancia también llevar a cabo el diseño de cebadores para la identificación de las secuencias restantes identificadas en el genoma de chile habanero y evaluar sus perfiles de transcritos a través de la reproducción. Con los resultados obtenidos se pueden seleccionar los *CcGLRs* de interés para posteriores análisis.

Esto abre un campo de estudio hacia la elucidación de la función de estas proteínas a través de técnicas bioquímicas y electrofisiológicas. También, se demostró que los perfiles de expresión en los tejidos evaluados se modifican en condiciones de estrés hídrico y variación en la dosis de nitrógeno.

Por lo tanto, saber la función de los *CcGLRs* y conocer si interactúan con otras proteínas sería una perspectiva importante en la comprensión de las actividades que realizan en el metabolismo celular y en la planta completa.

Por último y no menos importante, la localización celular a través de la tecnología del ADN recombinante y técnicas fluorescentes permitiría llevar a cabo estudios más dirigidos sobre los *CcGLRs*.

ANEXO I

Tabla 1. Características y número de accesoión de las secuencias utilizadas para el diseño del árbol filogenético. aa: aminoácidos

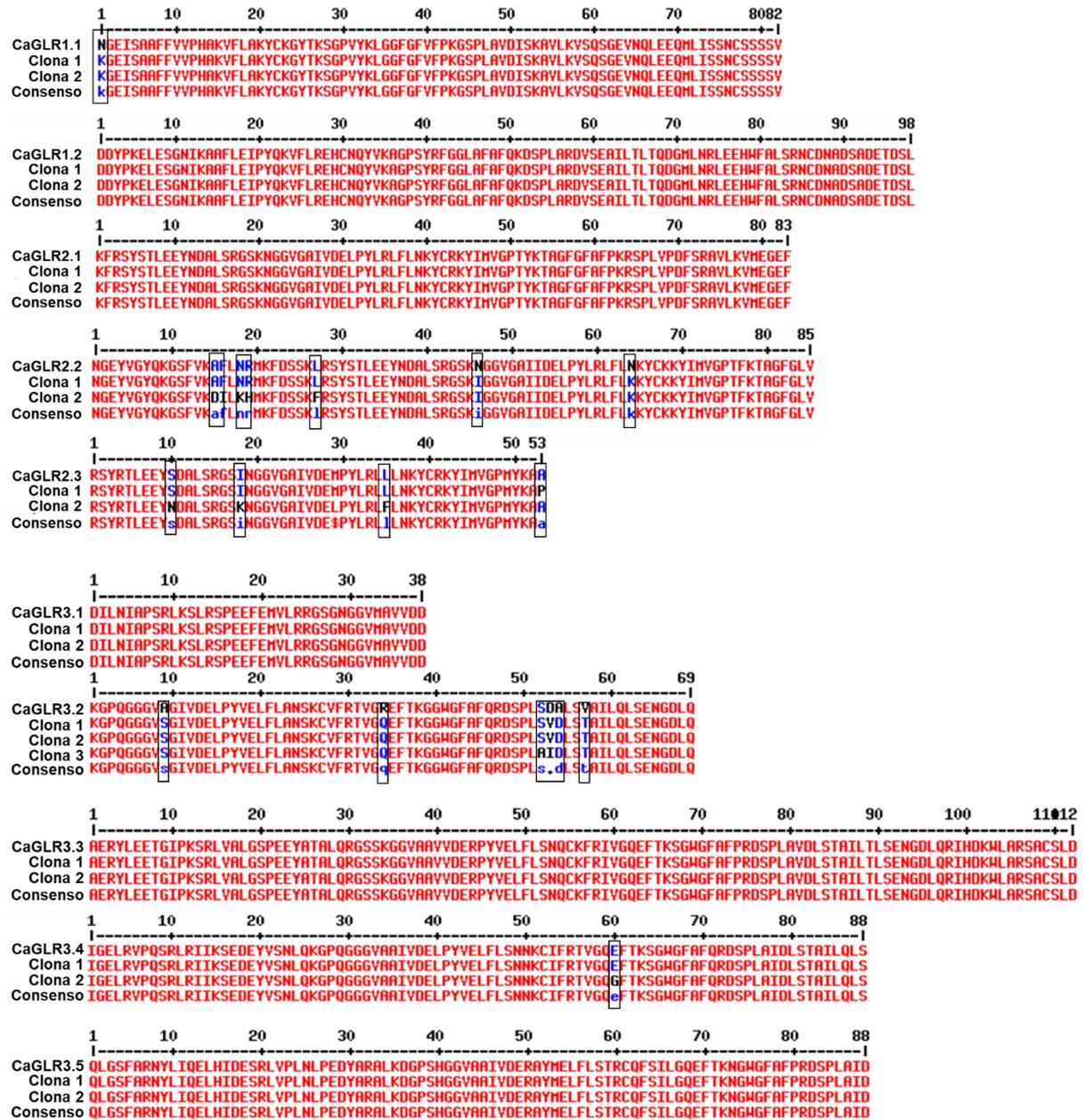
Gen	Cromosoma	Longitud (pb)	Número de accesoión	Base de datos	aa	Número de accesoión
<i>SIGLR1.1</i>	4	2742	AB623193	NCBI	914	BAL15046
<i>SIGLR1.2</i>	2	2778	AB623194	NCBI	926	BAL15047
<i>SIGLR2.1</i>	6	2898	AB623195	NCBI	966	BAL15048
<i>SIGLR2.2</i>	6	2943	AB623196	NCBI	981	BAL15049
<i>SIGLR2.3</i>	6	2889	AB623197	NCBI	963	BAL15050
<i>SIGLR2.4</i>	6	2952	AB623198	NCBI	984	BAL15051
<i>SIGLR2.5</i>	6	2856	AB623199	NCBI	952	BAL15052
<i>SIGLR2.6</i>	8	2727	AB623200	NCBI	909	BAL15053
<i>SIGLR3.1</i>	7	2601	AB623201	NCBI	867	BAL15054
<i>SIGLR3.2</i>	7	2805	AB623202	NCBI	935	BAL15055
<i>SIGLR3.3</i>	4	2427	AB623203	NCBI	809	BAL15056
<i>SIGLR3.4</i>	5	2508	AB623204	NCBI	836	BAL15057
<i>SIGLR3.5</i>	2	2877	AB623205	NCBI	959	BAL15058
<i>AtGLR1.1</i>	3	2427	AT3G04110	TAIR	809	-
<i>AtGLR1.2</i>	5	2604	AT5G48400	TAIR	868	-
<i>AtGLR1.3</i>	5	2583	AT5G48410	TAIR	861	-
<i>AtGLR1.4</i>	3	2586	AT3G07520	TAIR	862	-
<i>AtGLR2.1</i>	5	2706	AT5G27100	TAIR	902	-
<i>AtGLR2.2</i>	2	2763	AT2G24720	TAIR	921	-
<i>AtGLR2.3</i>	2	2688	AT2G24710	TAIR	896	-
<i>AtGLR2.4</i>	4	2697	AT4G31710	TAIR	899	-
<i>AtGLR2.5</i>	4	2490	AT5G11210	TAIR	830	-
<i>AtGLR2.6</i>	5	2721	AT5G11180	TAIR	907	-
<i>AtGLR2.7</i>	2	2859	AT2G29120	TAIR	953	-
<i>AtGLR2.8</i>	2	2844	AT2G29110	TAIR	948	-
<i>AtGLR2.9</i>	2	2823	AT2G29100	TAIR	941	-
<i>AtGLR3.1</i>	2	2856	AT2G17260	TAIR	952	-
<i>AtGLR3.2</i>	4	2739	AT4G35290	TAIR	913	-
<i>AtGLR3.3</i>	1	2802	AT1G42540	TAIR	934	-
<i>AtGLR3.4</i>	1	2880	AT1G05200	TAIR	960	-
<i>AtGLR3.5</i>	2	2697	AT2G32390	TAIR	899	-
<i>AtGLR3.6</i>	3	2712	AT3G51480	TAIR	904	-
<i>AtGLR3.7</i>	2	2766	AT2G32400	TAIR	922	-

(Continuación del **anexo I**)

Gen	Cromosoma	Longitud (pb)	Numero de accesión	Base de datos	aa	Numero de accesión
<i>OsGLR1.1</i>	9	2853	LOC_Os09g26160	RGAP	951	-
<i>OsGLR1.2</i>	2	2967	LOC_Os02g54640	RGAP	989	-
<i>OsGLR1.3</i>	9	2868	LOC_Os09g26144	RGAP	956	-
<i>OsGLR2.1</i>	9	2802	LOC_Os09g25960	RGAP	934	-
<i>OsGLR2.2</i>	9	2859	LOC_Os09g25980	RGAP	953	-
<i>OsGLR2.3</i>	9	2850	LOC_Os09g25990	RGAP	950	-
<i>OsGLR2.4</i>	9	2745	LOC_Os09g26000	RGAP	915	-
<i>OsGLR3.1</i>	2	2835	LOC_Os02g02540	RGAP	945	-
<i>OsGLR3.2</i>	4	2817	LOC_Os04g49570	RGAP	939	-
<i>OsGLR3.3</i>	6	2850	LOC_Os06g06130	RGAP	950	-
<i>OsGLR3.4</i>	6	312	LOC_Os06g13730	RGAP	104	-
<i>OsGLR3.5</i>	6	2538	LOC_Os06g46670	RGAP	846	-
<i>OsGLR3.6</i>	7	2871	LOC_Os07g01310	RGAP	957	-
<i>OsGLR3.7</i>	7	1914	LOC_Os07g33790	RGAP	638	-
<i>OsGLR3.8</i>	9	564	LOC_Os09g31160	RGAP	188	-
<i>OsGLR4.1</i>	6	1419	LOC_Os06g08880	RGAP	473	-
<i>OsGLR4.2</i>	6	2013	LOC_Os06g08890	RGAP	671	-
<i>OsGLR4.3</i>	6	2109	LOC_Os06g08900	RGAP	703	-
<i>OsGLR4.4</i>	6	708	LOC_Os06g08910	RGAP	236	-
<i>OsGLR4.5</i>	6	1194	LOC_Os06g08930	RGAP	398	-
<i>OsGLR4.6</i>	6	1050	LOC_Os06g09050	RGAP	350	-
<i>OsGLR4.7</i>	6	1092	LOC_Os06g09090	RGAP	364	-
<i>OsGLR4.8</i>	6	1467	LOC_Os06g09120	RGAP	489	-
<i>OsGLR4.9</i>	6	2049	LOC_Os06g09130	RGAP	683	-
<i>RsGLR</i>	-	2748	AY328911	NCBI	916	AAQ02674
<i>CaGLR1.1</i>	4	2733	CA04g18670	SGN	911	-
<i>CaGLR1.2</i>	2	2787	CA02g04450	SGN	929	-
<i>CaGLR2.1</i>	6	2934	CA06g15760	SGN	978	-
<i>CaGLR2.2</i>	6	2868	CA06g15640	SGN	956	-
<i>CaGLR2.3</i>	6	2901	CA06g15750	SGN	967	-
<i>CaGLR2.4</i>	6	2523	CA06g15660	SGN	841	-
<i>CaGLR2.5</i>	6	2832	CA06g15650	SGN	944	-
<i>CaGLR3.1</i>	7	2724	CA07g12240	SGN	908	-
<i>CaGLR3.2</i>	7	2832	CA07g12250	SGN	944	-
<i>CaGLR3.3</i>	4	2838	CA04g22950	SGN	946	-
<i>CaGLR3.4</i>	4	2808	CA04g07100	SGN	936	-
<i>CaGLR3.5</i>	2	2811	CA02g20070	SGN	937	-
<i>EcolignH</i>	-	747	X14180	NCBI	249	CAA32382
<i>SynGluR0</i>	-	1194		NCBI	398	BAA17851

Anexo II

Figura 1. Alineamiento de los fragmentos de los CcGLRs secuenciados con sus homólogos en *C. annum*. En recuadros negros se señalan los aminoácidos diferentes.



Anexo III

Tabla 2. Secuencias encontradas en el genoma de chile habanero. Se muestra el número de accesión y el nombre que se determinó de acuerdo al análisis filogenético.

CLAVE DE ACCESIÓN	NOMBRE	TAMAÑO (PB)
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD622.73	CcGLR1.1	2706
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD675.39	CcGLR1.2	2787
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD622.56	CcGLR1.3	2706
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD622.69	CcGLR1.4	2706
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.138	CcGLR2.1	2826
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.131	CcGLR2.2	2901
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.128	CcGLR2.3	2937
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.126	CcGLR2.4	2877
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.125	CcGLR2.5	3399
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD885.2	CcGLR2.6	2742
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.130	CcGLR2.7	1599
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD123.132	CcGLR2.8	846
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD1118.31	CcGLR2.9	3339
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD1118.34	CcGLR2.10	2748
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD254.11	CcGLR3.1	2724
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD254.12	CcGLR3.2	2832
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD575.98	CcGLR3.3	2838
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD513.10	CcGLR3.4	777
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD494.11	CcGLR3.5	2811
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD235.60	CcGLR3.6	717
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD12.59	CcGLR3.7	1146
>CC.CCV1.2.SCAFFOLD467.31	CcGLR3.8	753

Anexo IV

Tabla 3. Dominios identificados en los CcGLRs utilizando InterPro y MotifScan. Los dominios mostrados en la tabla son los característicos de los CcGLRs de plantas. DAT: dominio amino terminal, S1 y S2: dominios de unión a ligando, M1-M4: dominios transmembranales, DCT: dominio carboxilo terminal. En paréntesis se enmarca el tamaño en aminoácidos de cada dominio.

Receptor	DAT	S1	M1	M2	M3	S2	M4	DCT
CcGLR1.1	1-435	436-559 (123)	560-577 (18)	591-609 (19)	621-641 (21)	642-775 (133)	799-816 (17)	817-901 (84)
CcGLR1.2	1-446	447-572 (125)	573-590 (18)	606-622 (17)	633-651 (19)	652-786 (134)	809-829 (21)	830-928 (98)
CcGLR1.3	1-454	455-576 (121)	577-594 (18)	612-628 (17)	640-660 (21)	661-794 (133)	820-836 (17)	837-901 (64)
CcGLR1.4	1-454	455-578 (123)	579-596 (18)	610-628 (19)	640-658 (19)	659-794 (135)	818-835 (18)	836-901 (65)
CcGLR2.1	1-440	441-571 (130)	572-590 (19)	604-620 (17)	632-650 (19)	651-790 (139)	818-837 (20)	838-941 (103)
CcGLR2.2	1-467	468-598 (130)	599-618 (20)	632-648 (16)	659-677 (19)	678-817 (139)	845-864 (20)	865-966 (101)
CcGLR2.3	1-465	466-594 (128)	595-612 (18)	630-646 (17)	657-675 (19)	676-815 (139)	843-863 (21)	864-978 (114)
CcGLR2.4	1-472	473-603 (130)	604-622 (19)	636-652 (17)	664-682 (19)	683-822 (139)	851-870 (20)	871-958 (87)
CcGLR2.5	1-638	639-767 (128)	768-786 (19)	800-816 (17)	828-846 (19)	847-978 (131)	1013-1032 (20)	1032-1132 (100)
CcGLR2.6	1-408	409-539 (130)	540-577 (18)	572-588 (17)	597-618 (22)	619-758 (139)	780-799 (20)	800-913 (113)
CcGLR2.7	1-330	331-408 (93)	425-443 (19)	458-476 (19)	485-503 (19)			504-532 (28)
CcGLR2.8	1-73'	74-260 (186)						261-281 (20)
CcGLR2.9	1-595	596-726 (130)	727-745 (19)	759-775 (17)	784-805 (22)	806-944 (138)	971-992 (22)	993-1112 (119)
CcGLR2.10	1-411	412-541 (129)	542-560 (19)	575-591 (17)	602-620 (19)	621-760 (139)	786-807 (22)	808-915 (107)
CcGLR3.1	1-463	464-586 (122)	587-605(19)	647-665 (19)	680-701 (22)	702-805 (103)	829-848 (20)	849-907 (58)
CcGLR3.2	1-480	481-604 (123)	605-623 (19)	637-653 (17)	665-683 (19)	684-824 (140)	845-865 (21)	866-943 (77)
CcGLR3.3	1-480	481-604 (123)	605-623 (19)	637-653 (17)	665-683 (19)	684-822 (138)	846-864 (19)	865-945 (80)
CcGLR3.4	1-37	38-164 (126)						165-258 (93)
CcGLR3.5	1-468	469-586 (117)	587-612 (25)	628-639 (11)	651-673 (22)	674-811 (137)	833-857 (24)	858-936 (78)
CcGLR3.6	1-14		15-31 (17)			54-144		145-238 (93)
CcGLR3.7	1-10		11-33 (23)			34-181 (147)	205-223 (19)	224-381 (157)
CcGLR3.8	1-8	9-62'	63-81 (19)	120-138 (19)		139-220 (81)		