



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Identificación de la presencia y actividad de  
posibles receptores ionotrópicos de glutamato en  
raíces de *Capsicum annuum* a través de un  
acercamiento farmacológico y molecular**

Tesis que presenta

Fabiola Guadalupe León García

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología

Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

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 Fabiola Guadalupe León García titulado “Identificación de la presencia y actividad de posibles receptores ionotrópicos de glutamato en raíces de *Capsicum annuum* a través de un acercamiento farmacológico y molecular” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del(a) Dr.(a) Ileana Echevarría Machado, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

Dr. Clelia de la Peña Seaman  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 21 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: Fabiola Guadalupe León García

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 la presencia y actividad de posibles receptores ionotrópicos de glutamato en raíces de *Capsicum annuum* a través de un acercamiento farmacológico y molecular en el que participaste bajo la dirección del Dra. Ileana Echevarría Machado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por permitirme ser parte de esta institución e incursionar en esta área de conocimiento.

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por las instalaciones y equipos brindados.

Al CONACYT por la beca otorgada N° 619085

### **A mi asesora, Ileana Echevarría**

Gracias por aceptar ser la Directora de mi Tesis y encaminarme hacia esta meta, gracias por todas las lecciones de vida que pregona con la viveza de su corazón y la firmeza de su experiencia, por los regaños y felicitaciones recibidas, por su entrega y entusiasmo, pero sobre todo por ser un ejemplo para todos nosotros.

### **A mi comité Tutor**

Gracias al Dr. Manuel Martínez, al Dr. Enrique Castaño y al Dr. Juan Carlos Pineda por haberme acompañado estos dos años y enriquecer mi formación a través de su experiencia. Gracias por su asistencia, entrega y entusiasmo en cada examen tutorial; sus consejos, sus cuestionamientos y sus felicitaciones me motivaron siempre a seguir mejorando. Gracias al Dr. Isaac Zepeda por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en la Universidad de la Ciénega de Michoacán de Ocampo para la realización de los estudios electrofisiológicos de este trabajo, por su hospitalidad y la de su familia.

### **A mis amigos del laboratorio 7**

Mis más sinceros agradecimientos a cada uno, por tantos momentos compartidos que enriquecieron esta gran experiencia con risas, vivencias, comidas, su propia experiencia y conocimientos, pero sobre todo por su amabilidad, paciencia y voluntad para ayudarme cuando lo requerí, gracias Any, Fede, Martita, Camilo, Jafet y Manuel.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre, mi hermana y a Jesús; todo lo que hago es para ustedes.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1. GENERALIDADES DE LOS GLRs.....	3
1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.....	5
1.3. FUNCIONAMIENTO DE LOS iGluRs .....	6
1.4. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	7
1.5. PROCESOS EN LOS QUE SE ENCUENTRAN INVOLUCRADOS LOS GLRs DE PLANTAS.....	8
1.6. FARMACOLOGÍA DE LOS GLRs.....	10
1.6.1. POSIBLES AGONISTAS DE GLRs EN PLANTAS.....	11
1.6.2. USO DE ANTAGONISTAS DE LOS iGluRs PARA EL ESTUDIO DE LOS GLRs DE PLANTAS .....	12
1.7. PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS GLRs.....	14
1.8. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS CANALES IÓNICOS.....	15
1.9. EXPRESIÓN DE LOS GLRs EN PLANTAS .....	17
1.10. GLRs EN SOLANÁCEAS .....	18
<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>22</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>26</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL EN <i>C. annuum</i></b> .....	<b>26</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>26</b>
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28

2.1.1. MATERIAL VEGETAL.....	28
2.1.2. DESINFESTACIÓN Y GERMINACIÓN.....	28
2.1.3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LOS PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO RADICAL EN <i>C. annuum</i> .....	28
2.1.4. CURVA DOSIS-RESPUESTA Y CURSO TEMPORAL .....	30
2.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
2.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO RADICAL EN <i>C. annuum</i> EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i> .....	31
2.2.1.1. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA RP .....	31
2.2.1.2. EFECTOS SOBRE LA FORMACIÓN DE ÓRGANOS LATERALES ....	37
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>41</b>
<b>ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS GLRS EN <i>C. annuum</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>41</b>
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
3.1.1. BÚSQUEDA EN LA BASE DE DATOS DE GENES DE <i>GLR</i> DE <i>C. annuum</i> , RECUPERACIÓN DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	42
3.1.2. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES DE <i>CaGLRs</i> .....	43
3.1.3. REGIÓN PARA EL DISEÑO DE CEBADORES .....	44
3.2. RESULTADOS.....	44
3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE GLRs EN <i>C. annuum</i> .....	44
3.2.2. FILOGENIA DE LOS <i>CaGLRs</i> .....	44
3.2.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS <i>CaGLRs</i> .....	47
3.2.4. LOCALIZACIÓN EN EL CROMOSOMA .....	48
3.2.5. POSIBLES INTERACCIONES DE LOS <i>CaGLR</i> CON OTRAS PROTEÍNAS .....	49
3.2.7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR .....	52
3.2.8. REGIÓN PARA EL DISEÑO DE LOS CEBADORES. ....	53
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>55</b>



<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS <i>CaGLRS</i></b> .....	<b>55</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>55</b>
4.1. MATERIALES Y MÉTODOS .....	57
4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	57
4.1.2. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) .....	58
4.1.3. MEDICIONES DE FLUJO DE Ca <sup>2+</sup> CON LA TÉCNICA MIFE .....	59
4.1.4. SEÑALIZACIÓN DE CALCIO CON CALCIUM ORANGE (CaO) .....	62
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	63
4.2.1. NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS 12 <i>CaGLR</i> EN LAS TRES DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ DE <i>C. annuum</i> .....	63
4.2.2. MEDICIONES DE FLUJO de Ca <sup>2+</sup> EN RAÍCES DE <i>C. annuum</i> .....	65
4.2.3. SEÑALIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN RAÍCES DE <i>C. annuum</i> CON CaO .....	71
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>76</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>81</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>93</b>
<b>ANEXO I. CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS UTILIZADAS PARA EL DISEÑO DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO</b> .....	<b>91</b>

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AMPA	Ácido propiónico- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
AP-5	Ácido 2-Amino-5-fosfonopentanoico
AP-7	Ácido 2-amino-7-fosfopentanoico
AtGLR	Receptor "Tipo" Glutamato de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BMAA	Beta-metilamino-l-alanina
CaGLR	Receptor "Tipo" Glutamato de <i>Capsicum annuum</i>
CaO	Calcium Orange
CMOT	Tiocionato 2-(4-cloro-3-metilfenil)-2-oxoetil
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
DDPD	Diona 1-(2,6-dimetilfenil)-2,5-dihidro-1H-pirrole-2,5
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
Gavestinol	Ácido 4,6-dicloro-3-[(1E)-3-oxo-3-(fenilamino)-1-propenil]-1H-indol-2-carboxílico
GLR	Receptor de plantas parecidos a los receptores ionotrópicos de glutamato de mamíferos
iGluR	Receptor ionotrópico de Glutamato
KA	Ácido kaínico
L-689, 500	Trans-2-Carboxi-5,7-dicloro-4-fenilamino carbonil amino-1,2,3,4-tetrahydroquinolina
LPRL	Longitud promedio de raíces laterales
LTRL	Longitud total de raíces laterales

mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MIFE	Estimación de flujo iónico por microelectrodos
MK-801	Maleato de (5S,10R) -(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina
MNQX	Diona 5,7-dinitro-quinoxalina-2,3
N	Nitrógeno
NMDA	N-metil-D-aspartico
NMR	Resonancia magnética nuclear
NRL	Número de raíces laterales
NSCC	Canales catiónicos no selectivos
OsGLR	Receptor "Tipo" Glutamato de <i>Oryza sativa</i>
PA	Potencial de acción
PHCC	N-fenil-7-(hidroximino) ciclopropano [b] cromen-1 <sup>a</sup> -carboxamida)
PRL	Primordios de raíces laterales
RL	Raíces laterales
RP	Raíz primaria
SDZ 220-040	Ácido (S)- $\alpha$ -Amino-2',4'-dicloro-4-hidroxi-5-(fosfonometil)-[1,1'-bifenil]-3-propanoico
SGN	Sol Genomic Network
SIGLR	Receptor "Tipo" Glutamato de <i>Solanum lycopersicum</i>
SNC	Sistema Nervioso Central

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Árbol filogenético de los genes GLR de <i>Arabidopsis</i> . .....	<b>4</b>
<b>Figura 1.2.</b> Representación de la organización de los dominios presentes en los iGluRs de mamíferos.....	<b>6</b>
<b>Figura 1.3.</b> Cambios conformacionales que representan el funcionamiento de un iGluR.. .....	<b>7</b>
<b>Figura 1.4.</b> Esquema representativo de la técnica MIFE.. .....	<b>17</b>
<b>Figura 1.5.</b> Árbol filogenético basado en los alineamientos a partir de secuencias de aminoácidos de SIGLRs y AtGLRs (Modificado de Aouini <i>et al.</i> , 2012).....	<b>19</b>
<b>Figura 1.6.</b> Modelo estructural de los seis dominios conservados en los GLRs.....	<b>20</b>
<b>Figura 1.7.</b> Estrategia experimental para seguir en el proyecto para el cumplimiento de los objetivos.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.1.</b> Representación de segmentación de cajas con medio de tratamiento para el estudio de las raíces. ....	<b>29</b>
<b>Figura 2.2.</b> Efecto de los agonistas (NMDA y Gly) de los GLR tipo NMDA, sobre el crecimiento acumulado de la RP de chile serrano.....	<b>32</b>
<b>Figura 2.3.</b> Efecto de los agonistas (NMDA y Gly) de los GLR tipo NMDA, sobre el crecimiento acumulado de la RP al cuarto día de tratamiento.....	<b>33</b>
<b>Figura 2.4.</b> Efecto de la curva dosis-respuesta del AP-5 sobre el crecimiento de la RP de chile serrano. ....	<b>34</b>
<b>Figura 2.5.</b> Efecto de AMPA y DNQX sobre el crecimiento acumulado diario de la RP.. .....	<b>36</b>
<b>Figura 2.6.</b> Efecto de AMPA y DNQX sobre el crecimiento de la RP.....	<b>37</b>
<b>Figura 2.7.</b> Efecto de los agonista de los GLR del tipo NMDA sobre la formación y crecimiento de RL.....	<b>37</b>

<b>Figura 2.8.</b> Efecto de AP-5 1 mM sobre la formación y desarrollo de RL al día 10 de exposición. Los valores representan la media $\pm$ ES, n = 18-24 plántulas.....	<b>39</b>
<b>Figura 2.9.</b> Efecto de AMPA y DNQX sobre la formación y crecimiento de raíces laterales al día 10 de exposición.....	<b>40</b>
<b>Figura 3.1.</b> Árbol filogenético basado en los alineamientos a partir de las secuencias de aminoácidos de cinco diferentes especies.....	<b>46</b>
<b>Figura 3.2.</b> Dominios conservados en las secuencias de aminoácidos de <i>CaGLR</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 3.3.</b> Organización de los dominios transmembranales de <i>CaGLR</i> basada en el análisis con TMPred..	<b>48</b>
<b>Figura 3.4.</b> Mapa de la posición de los <i>CaGLRs</i> en los cromosomas de <i>C. annuum</i> ..	<b>49</b>
<b>Figura 3.5.</b> Interacción proteína-proteína <i>in silico</i> . Este análisis se realizó usando el programa bioinformático STRING .....	<b>52</b>
<b>Figura 3.6.</b> Predicción de los posibles sitios de fosforilación en los GLRs de chile serrano..	¡Error! Marcador no definido.
<b>Figura 4.1.</b> Pre-acondicionamiento para las mediciones de flujo con la técnica MIFE..	<b>60</b>
<b>Figura 4.2.</b> ARN total obtenido de raíces de <i>C. annuum</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 4.3.</b> Cambios en los niveles de transcritos de los <i>CaGLRs</i> en las diferentes zonas de la raíz de <i>C. annuum</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 4.4.</b> Imagen de pantalla de un registro original de MIFE en la raíz de <i>C. annuum</i> ..	<b>66</b>
<b>Figura 4.5.</b> Efecto de los fármacos sobre los flujos de $Ca^{2+}$ en la zona madura de la raíz de <i>C. annuum</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 4.6.</b> Efecto de los fármacos sobre los flujos de $Ca^{2+}$ en la zona madura de la raíz de <i>C. annuum</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 4.7.</b> Efecto de los fármacos sobre los flujos de $Ca^{2+}$ en la zona madura de la raíz de <i>C. annuum</i> .....	<b>69</b>

<b>Figura 4.8.</b> Efecto de los fármacos sobre los flujos de $\text{Ca}^{2+}$ en la zona madura de la raíz de <i>C. annuum</i> .....	<b>70</b>
<b>Figura 4.9.</b> Efecto de los fármacos sobre los flujos de $\text{Ca}^{2+}$ en la zona madura de la raíz de <i>C. annuum</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 4.10.</b> Raíces de <i>C. annuum</i> testigo (sin CaO: a la izquierda y con CaO: a la derecha). .....	<b>72</b>
<b>Figura 4.11.</b> Variaciones de calcio intracelular en raíces de <i>C. annuum</i> bajo diferentes tratamientos de aminoácidos y el agonista NMDA.....	<b>73</b>
<b>Figura 4.12.</b> Variaciones de calcio intracelular en raíces de <i>C. annuum</i> bajo diferentes tratamientos a 40X.....	<b>73</b>
<b>Figura 4.14.</b> Variaciones de calcio intracelular en raíces de <i>C. annuum</i> incubadas con 0.1 mM de Glu + 0.2 mM de MK-801.....	<b>74</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1.</b> Posible participación de GLRs en diferentes funciones vegetales. ....	<b>9</b>
<b>Cuadro 1.2.</b> Dominios encontrados en SIGLRs y AtGLRs .....	<b>21</b>
<b>Cuadro 1.3.</b> Listado de los compuestos farmacológicos a utilizar en este proyecto. ..	<b>25</b>
<b>Cuadro 3.1.</b> Receptores de glutamato de <i>C. annuum</i> (CaGLRs).....	<b>45</b>
<b>Cuadro 3.2.</b> Proteínas de referencia utilizadas para el análisis de interacción proteína-proteína, el organismo en el que se encuentran y su valor de bitscore. ....	<b>50</b>
<b>Cuadro 3.3.</b> Predicción <i>in silico</i> de la localización subcelular de los GLRs de <i>C. annuum</i> . .....	<b>52</b>
<b>Cuadro 3.4.</b> Cebadores diseñados a partir de las secuencias de los CaGLRs.....	<b>54</b>
<b>Cuadro 4.1.</b> Fármacos aplicados sobre las raíces de <i>C. annuum</i> .....	<b>61</b>
<b>Cuadro 4.2.</b> Fármacos aplicados sobre las raíces de <i>C. annuum</i> usando el fluoróforo CaO.....	<b>62</b>

## RESUMEN

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) son proteínas integrales de membrana que, al ser activados por una molécula señal (agonista), funcionan como canales catiónicos no selectivos (NSCC, por sus siglas en inglés) y median respuestas sinápticas rápidas entre neuronas. Inicialmente fueron descubiertos en mamíferos, en los cuales se clasificaron en tres tipos, de acuerdo a sus propiedades farmacológicas: N-metil-D-aspartico (NMDA), receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y kainato (KA). Más tarde, la presencia de estas proteínas fue descubierta en organismos que no poseían sistema nervioso central (SNC), como las plantas. En la actualidad se sabe que son una familia de genes integrada por 20 miembros en *Arabidopsis thaliana*, 24 en *Oryza sativa* y 13 en *Solanum lycopersicum*. En estudios iniciales, se ha demostrado que las funciones de estas proteínas en las plantas son muy diversas, abarcando eventos de crecimiento, reproducción y respuesta a estrés, entre otros. Por ello, se hace necesario contar con un mayor número de estudios sobre las mismas en diferentes especies vegetales, si se quiere regular procesos vitales de la biología vegetal. Hasta la fecha, no existe conocimiento de la presencia y la función de estas proteínas en especies del género *Capsicum*. Para analizar su funcionalidad, se emplean fármacos (agonistas y antagonistas) reguladores de la actividad de los iGluRs de animales; sin embargo, poco se sabe del efecto de los mismos sobre los receptores de plantas parecidos a los iGluRs (GLR). En este proyecto, se hizo uso de estos compuestos para determinar el papel de estas proteínas en el crecimiento radical de *Capsicum annuum*. Además, se evaluó la presencia y actividad de posibles GLRs en raíces de esta especie mediante el uso de técnicas moleculares y electrofisiológicas. En conjunto, los resultados indicaron que estas proteínas están involucradas en el crecimiento y la proliferación radical de este tipo de chile y que varios miembros de esta familia pueden conferir una gran versatilidad dentro de la respuesta de las raíces a diferentes aminoácidos en el suelo.



## ABSTRACT

The ionotropic glutamate receptors (iGluRs) are integral membrane proteins activated by a signal molecule (agonist) and do they work as non-selective cationic channels (NSCCs) mediating rapid synaptic responses between neurons. Initially, they were discovered in mammals, in which they were classified into three types, according to their pharmacological properties: N-methyl-D-aspartic acid (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole receptors (AMPA) and kainate (KA). Later, the presence of these proteins was discovered in organisms that did not possess central nervous system (CNS), like plants. It is now known that they are a family of genes composed of 20 members in *Arabidopsis thaliana*, 24 in *Oryza sativa* and 13 in *Solanum lycopersicum*. In early studies, it has been shown that the functions of these proteins in plants are very diverse, including growth, reproduction and stress response events, among others. Therefore, it is necessary to have a greater number of studies on the same in different plant species, if you want to regulate vital processes of plant biology. To date, there is no knowledge of the presence and function of these proteins in species of the genus *Capsicum*. To analyze its functionality, drugs (agonists and antagonists) regulating the activity of the animals iGluRs are used; however, little is known about their effect on the receptors of plants similar to the iGluRs (GLR). In this project, these compounds were used to determine the role of these proteins in the radical growth of *Capsicum annuum*. In addition, the presence and activity of possible GLRs in roots of this species was evaluated through the use of molecular and electrophysiological techniques. Overall, the results indicated that these proteins are involved in the growth and radical proliferation of this type of pepper and that several members of this family can confer great versatility in the response of the roots to different amino acids in the soil.

## INTRODUCCIÓN

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) son asociaciones de proteínas en la membrana que al ser activados por una molécula señal (agonista) funcionan como canales catiónicos no selectivos (NSCC). En un inicio los iGluRs fueron descubiertos en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, caracterizados por mediar respuestas sinápticas rápidas entre neuronas; la unión del glutamato (L-Glu) (entre otros aminoácidos) a su receptor resulta en un cambio conformacional de la proteína que permite la apertura del canal y el paso de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Kew y Kemp, 2005).

Los iGluRs son proteínas estructuralmente complejas formadas por al menos cuatro subunidades idénticas (homotetrámero) o diferentes (heterotetrámero) que forman un poro central permeable a cationes. Cada subunidad cuenta con los siguientes seis dominios: cuatro transmembranales (M1, M2, M3 y M4), dos extracelulares de unión al ligando (S1 y S2), un N-terminal y un C-terminal (Dingledine *et al.*, 1999).

Los iGluRs de mamíferos se pueden clasificar farmacológicamente en tres familias distintas, de acuerdo con el agonista que los activa: receptores tipo N-metil-D-aspartico (NMDA), receptores tipo propianato de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y receptores tipo kainato (KA) (Dingledine *et al.*, 1999).

La primera evidencia de la presencia de receptores parecidos a los iGluRs (GLRs, por sus siglas en inglés) en organismos que no poseen SNC viene del descubrimiento de una familia de 20 genes en *Arabidopsis thaliana* (Lam *et al.*, 1998), que poseían una alta identidad con los iGluRs. Estos genes fueron clasificados en tres clados: I, II y III, de acuerdo a su similitud de secuencia (Chiu *et al.*, 2002). Ellos codifican proteínas que poseen entre 800 y 960 aminoácidos y cada receptor presenta un peso molecular de aproximadamente 100 kDa (Weiland *et al.*, 2016). Hasta la fecha se conoce que los GLRs de *Arabidopsis* (AtGLRs) actúan como sensores y mediadores de señalizaciones en respuesta a aminoácidos.

Los agonistas de los GLRs de plantas aún no han sido elucidados; sin embargo, se considera a L-Glu como el principal agonista, aunque recientemente se ha sugerido a la Glicina (Gly) como un mejor agonista que el L-Glu (Kwaaitaal *et al.*, 2011). Otros aminoácidos, tales como D-Ser (Michard *et al.*, 2011), L-Met, L-Trp, L-Phe, L-Leu, L-Tyr, L-Asp y L-Thr (Tapken *et al.*, 2013a) y el tripéptido glutatona (Li *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2006) también han sido propuestos como posibles agonistas.

Los análisis de expresión de los *AtGLRs* indican que los *GLRs* del clado I (*AtGLR1.1-1.4*) y III (*AtGLR3.1-3.7*) se expresan en todos los tejidos a excepción de dos *AtGLRs* (*AtGLR 3.2* y *3.4*); mientras que cinco de los nueve miembros del clado II (*AtGLR2.1-2.9*) se expresan exclusivamente en raíz (Chiu *et al.*, 2002). Para los *GLR* de *Solanum lycopersicum*, se observó la expresión de cuatro genes (*SIGLR1.1, 1.2, 2.2* y *3.1*) en las raíces, aunque *SIGLR1.1* fue más específico para este órgano (Aouini *et al.*, 2012).

Hasta hoy, el uso de agonistas y antagonistas para el estudio de los *GLRs* de plantas es muy limitado y en su mayoría se usa por el conocimiento previo de su efecto sobre los *iGluRs*. La hipótesis para el uso de estos es que los sitios de unión de estos fármacos en los *iGluR* se encuentran conservados en los *GLR* de plantas.

El género *Capsicum*, que es nativo de América subtropical y tropical, es una de las plantas cultivadas más importantes en el mundo y comprende cerca de 30 especies, entre las cuales figuran cinco como las de mayor importancia agrícola: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., y *C. pubescens*. A nivel mundial, *C. annuum* es el más cultivado y el más importante económicamente (Wang y Bosland, 2006). La siembra puede efectuarse en cualquier tipo de suelo con humedad y un correcto drenaje.

Hasta la fecha, no se han identificado *GLRs* dentro del género de *Capsicum*, por lo que en este proyecto se pretende identificar la presencia de *GLRs* tipo NMDA en raíces de chile serrano (*Capsicum annuum* var. CM334) mediante el uso de técnicas moleculares y productos farmacológicos como aminoácidos, agonistas de los *iGluRs* de animales, así como antagonistas y bloqueadores, para identificar los agonistas verdaderos de los mismos.

## CAPÍTULO 1

### ANTECEDENTES

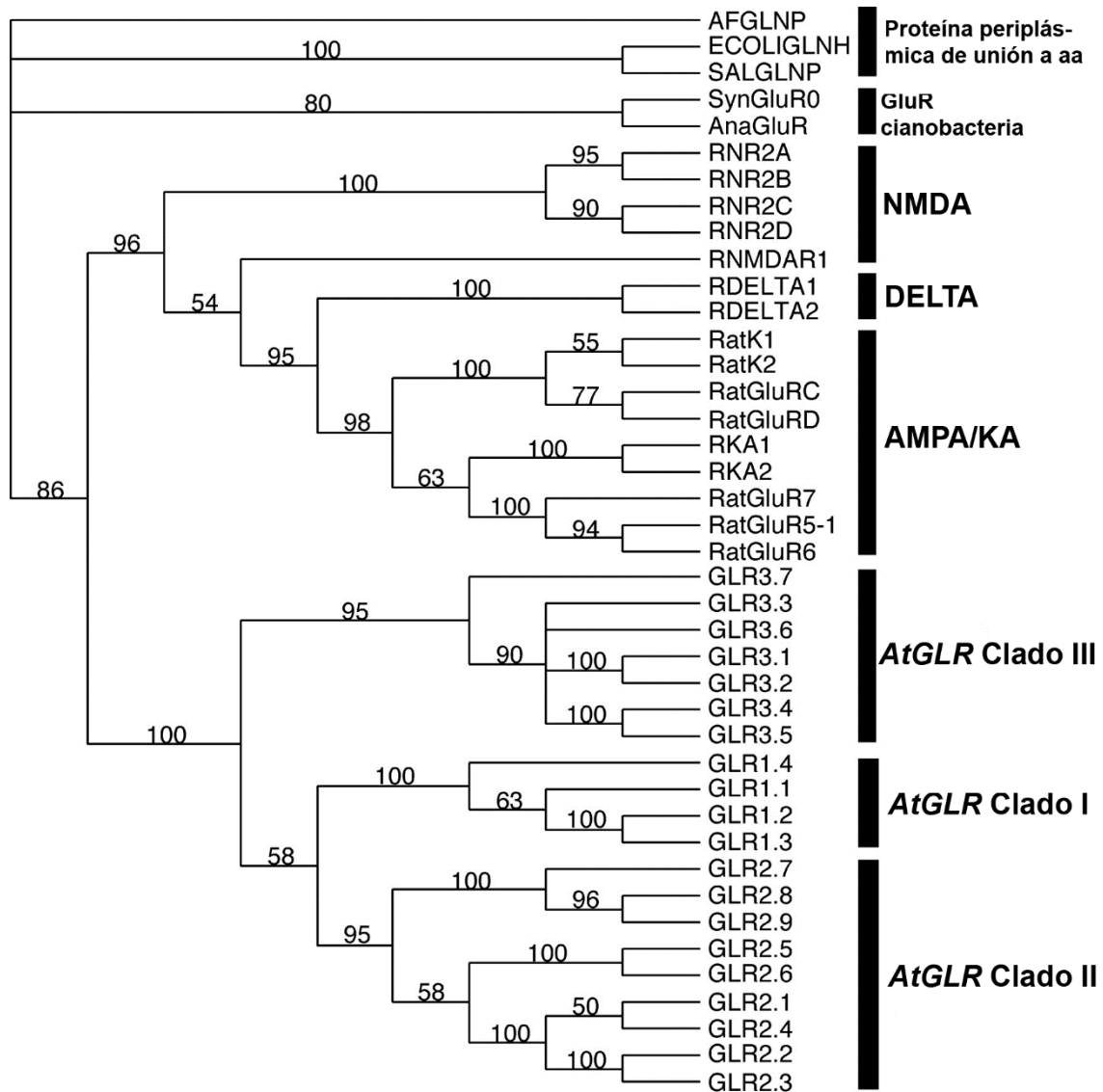
#### 1.1. GENERALIDADES DE LOS GLRs

El L-Glu es el neurotransmisor excitatorio mayoritario en el SNC en mamíferos y activa la señalización mediante su unión a GluRs (receptores de glutamato) (Watkins y Jane, 2006). En los mamíferos estas proteínas se clasifican en dos tipos generales: los del tipo ionotrópico (iGluR) y los del tipo metabotrópico (mGluR) (Sarwat *et al.*, 2017).

Los mGluR no forman canales iónicos pero su unión con el agonista los activa induciendo la aparición de segundos mensajeros (Kew y Kemp, 2005). Por su parte, los iGluRs forman canales iónicos que, en presencia y unión de un ligando, se activan formando un poro permitiendo el paso de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Se sitúan principalmente en las membranas pre y postsinápticas de las neuronas y median respuestas sinápticas rápidas entre neuronas en animales. Éstos a su vez se clasifican en cuatro principales grupos basados en sus propiedades farmacológicas, que se definen por las acciones despolarizantes de los agonistas selectivos AMPA, KA, NMDA y delta. Este último grupo no muestra actividad de canal catiónico y no une a L-Glu (Davenport, 2002).

En los mamíferos estos receptores comprenden una familia de 18 genes que codifican para dichas proteínas y su ensamblaje forma receptores funcionales. Se han identificado siete proteínas para el tipo NMDA (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A y GluN3B), cuatro para el tipo AMPA (GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4), cinco para los del tipo KA (GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 y GluK5) y dos para los delta (GluD1 y GluD2). El ensamblaje del receptor activo se lleva a cabo únicamente entre subunidades del mismo grupo (Dingledine *et al.*, 1999; Traynelis *et al.*, 2010).

En la década de los 90's se encontraron genes *GLRs* en los genomas de invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (Maricq *et al.*, 1995) y *Drosophila melanogaster* (Ultsch *et al.*, 1993) y posteriormente en el de plantas (Chiu *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2002). Este descubrimiento captó la atención de los investigadores, pues a diferencia de los animales estos organismos no presentan un SNC. En *Arabidopsis* se descubrió una familia de genes compuesta por 20 *AtGLRs*, divididos filogenéticamente dentro de tres distintos clados (Figura 1.1) (Chiu *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2002).



**Figura 1.1.** Árbol filogenético de los genes GPCR de *Arabidopsis*. Los 20 GPCRs del tipo ionotrópico se agruparon en tres clados diferentes (Tomado de Chiu *et al.*, 2002).

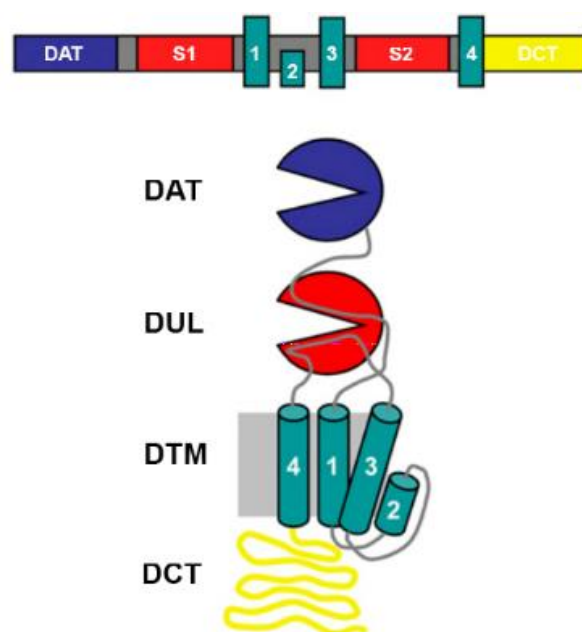
Hasta la fecha, se han detectado además 24 genes en *Oryza sativa* (*OsGLRs*, Li *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2014), 13 en *S. lycopersicum* (*SIGLRs*, Aouini *et al.*, 2012), uno en *Raphanus sativus* (*RsGLRs*, Kang *et al.*, 2004) y uno en una gramínea silvestre (*EcGLR*, Li *et al.*, 2013). Este último solo se sugiere a base de predicciones pues aún no se han realizado análisis experimentales que prueben su función como un NSCC.

## 1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Los GLRs son proteínas integrales de membrana formadas por la combinación de al menos cuatro subunidades independientes necesarias para ser considerados funcionales, pudiendo ser homo o heterotetrámeros (Price *et al.*, 2012; Roy y Mukherjee, 2016; Weiland *et al.*, 2016). Esta combinación de subunidades les confiere diferentes propiedades fisiológicas y farmacológicas.

Al igual que en animales, los GLRs de plantas están conformados por cuatro dominios transmembranales, tres de los cuales atraviesan completamente la membrana (M1, M3 y M4) y uno la atraviesa parcialmente (M2) y, dos dominios extracelulares (S1 y S2), los cuales constituyen el sitio de unión al ligando. Además, dentro de su estructura contiene un dominio N-terminal que se encuentra expuesto al lado exterior de la membrana tanto en animales como en plantas, así como un dominio C-terminal ubicado hacia el lado intracelular de la membrana (Figura 1.2) (Lam *et al.*, 1998; Dingledine *et al.*, 1999). La presencia de los dominios S1 y S2 permite que un solo GLR sea capaz de unir hasta dos agonistas, de modo que un receptor funcional puede unir hasta ocho agonistas, si estuviera conformado por un tetrámero.

Los AtGLRs presentan una similitud entre el 16% (en la región de unión a ligando, S1 y S2) y 63 % (en los dominios transmembranales M1-M4) con los receptores NMDA de mamíferos (Lam *et al.*, 1998) y cada subunidad está compuesta entre 800 y 960 aminoácidos, con una masa molecular de 100 kDa aproximadamente (Weiland *et al.*, 2016).



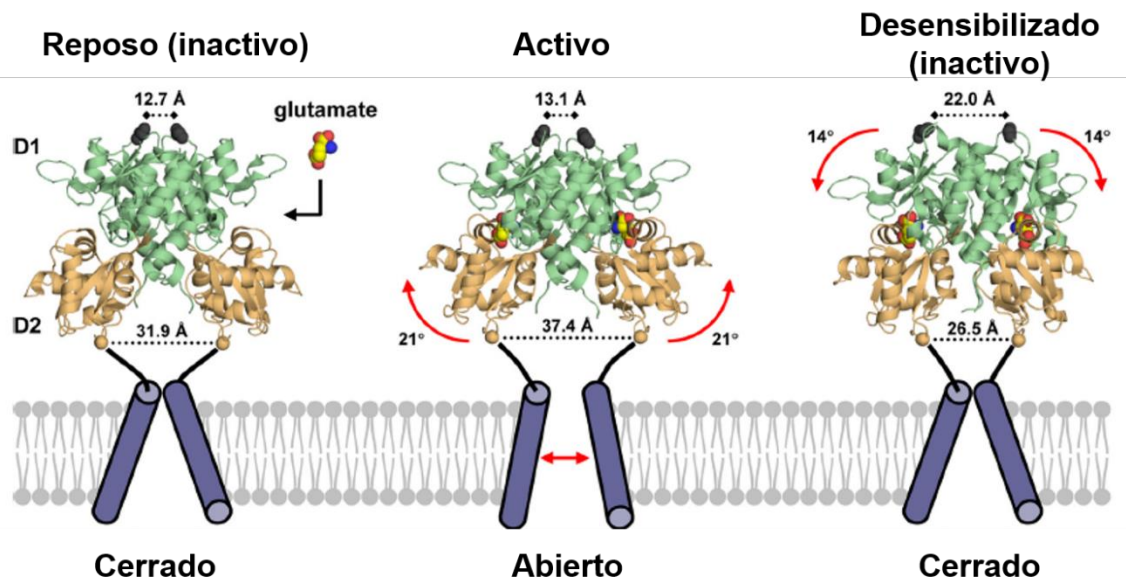
**Figura 1.2.** Representación de la organización de los dominios presentes en los iGluRs de mamíferos. La secuencia primaria contiene cuatro dominios transmembranales (1-4), dos de unión al ligando (S1 y S2), un dominio N-terminal (NTD) y un dominio C-terminal (CTD) (Modificado de Sarwat *et al.*, 2017).

El dominio M2 forma el poro por donde ocurre el flujo de iones y su baja similitud entre animales y plantas ha causado diversas dudas acerca de su verdadera capacidad de conductancia de iones. Por el contrario, con más de un 61% de similitud, el dominio M3 es considerado el más altamente conservado en los GLRs en plantas e iGluRs en animales (Lam *et al.*, 1998).

Hasta la fecha no se ha aislado el complejo a partir de algún tejido vegetal y sus componentes no han sido identificados. Las evidencias que sustentan la existencia de los multímeros se han basado en metodologías como el uso de anticuerpos (Turano *et al.*, 2002), FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Vincill *et al.*, 2012; 2013) y métodos derivados del doble híbrido (Price *et al.*, 2012). Al estudiar las posibles interacciones de 15 de los 20 AtGLRs se constató que AtGLR1.1, 2.1 y en menor grado AtGLR1.4 y 3.4 formaban interacciones homoméricas, mientras que varias subunidades (Ej. AtGLR1.1, 2.1, 2.9, 3.2 y 3.4) interaccionaban con otras múltiples subunidades (Price *et al.*, 2012). La formación de homomultímero también fue demostrado para OsGLR3.1 de arroz (Li *et al.*, 2006).

### 1.3. FUNCIONAMIENTO DE LOS iGluRs

Está bien establecido que los iGluRs en animales pasan por tres estados conformacionales: I) En ausencia de un ligando los receptores permanecen en reposo, y por tanto, el canal se encuentra cerrado, II) en presencia y unión del ligando, el receptor pasa a un estado activado y el poro se abre para permitir el paso de los cationes y III) en presencia de la unión prolongada del ligando con el receptor, este último pasa de un estado activo a desensibilizado, cerrando el canal, aunque el ligando aún esté presente (Figura 1.3) (Traynelis *et al.*, 2010).



**Figura 1.3.** Cambios conformacionales que representan el funcionamiento de un iGluR. Las imágenes son con base a un iGluR de tipo AMPA y muestran los tres estados por los que atraviesa un canal en ausencia y presencia de su ligando (Modificado de Traynelis *et al.*, 2010).

Los iGluRs actúan como canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que la unión del agonista a su receptor dirige a una reorientación de las hélices transmembranales conduciendo a un cambio conformacional, seguido por la consecuente apertura del canal y el paso de los cationes a través de él. Una vez abierto, el canal se desensibiliza por un nuevo cambio conformacional que modifica el ángulo del sitio de unión lo que automáticamente detiene el flujo de cationes por su interior cerrando el poro; los receptores del tipo no-NMDA (AMPA/KA) presentan una rápida desensibilización; por el contrario, los receptores NMDA se desensibilizan más lentamente (Davenport, 2002).

#### 1.4. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Las subunidades de los GLRs están sujetas a modificaciones postraduccionales y dichas modificaciones dan lugar a una alta diversidad estructural y funcional. Tal es el caso de *AtGLR3.5* que, como consecuencia del procesamiento diferencial, se obtienen dos isotipos de éste, uno que se dirige a la membrana mitocondrial interna conteniendo una secuencia señal N-terminal y el otro que se localiza en los cloroplastos (Teardo *et al.*, 2015).

Las proteínas 14-3-3 regulan cientos de proteínas funcionales mediante su interacción



con cinasas, fosfatasas y receptores de membrana, entre ellos, los iGluRs, provocando cambios en su actividad y localización subcelular (Fu *et al.*, 2000; Weiland *et al.*, 2016). De los 20 GLRs de *Arabidopsis*, 17 contienen sitios de unión a proteínas 14-3-3 y cinco de ellos (AtGLR1.2, 2.1, 2.9, 3.4 y 3.7) interactúan con proteínas 14-3-3 (Chang *et al.*, 2009).

La fosforilación de los iGluRs es un mecanismo clave que regula la función de los canales iónicos, así como su reciclado, degradación, localización o incluso movilidad; dicha modificación se presenta en la región C-terminal de los receptores (Chen y Roche, 2007).

### **1.5. PROCESOS EN LOS QUE SE ENCUENTRAN INVOLUCRADOS LOS GLRs DE PLANTAS**

La unión de un agonista a su receptor resulta en la activación de éste, desencadenando el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática y como consecuencia, cascadas de señalización que afectan diferentes procesos fisiológicos en las plantas. Por ejemplo, se ha sugerido que estas proteínas participan en el balance C/N, los cambios en la arquitectura radical, la señalización por estrés, por calcio y por ácido abscísico (ABA), el desarrollo de la planta, la interacción planta-patógeno, así como en la fotosíntesis (Weiland *et al.*, 2016).

*AtGLR1.1* está involucrado en la relación C/N y en la señalización por ABA. Kang y Turano (2003) demostraron que plantas transformadas de *Arabidopsis* que contenían una secuencia antisentido *AtGLR1.1* presentaron aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en comparación con las plantas control. Además, las semillas que contenían la secuencia antisentido de este gen no germinaron en presencia de sacarosa, como fuente de C, pero el fenotipo fue restaurado después de una coincubación con  $\text{NO}_3^-$ , como fuente de N. También, la presencia de sacarosa disminuyó el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo del C, como hexoquinasa 1 (*HXK1*), en las plantas transformadas en relación con el testigo (Kang y Turano, 2003).

Por otro lado, también se han asociado a los GLRs con procesos relacionados con la fotosíntesis debido a su ubicación en hojas. Usando un anticuerpo específico generado contra GLRs de la familia 3, se demostró la localización de los miembros de dicha familia en cloroplastos de hojas de espinaca, donde los experimentos electrofisiológicos indican despolarización de la membrana provocada por L-Glu, indicativo de entrada de iones de

calcio. Posteriormente, los autores evaluaron si estos GLRs participaban en la regulación de la fotosíntesis; y demostraron que la evolución del oxígeno en los cloroplastos se inhibió un 50% cuando se aplicó 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), un antagonista competitivo de los iGluR del tipo AMPA/KA (Teardo *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que los GLRs participan en respuestas a estrés abiótico. Por ejemplo, el estrés osmótico o por frío estimularon la expresión de *AtGLR3.4*, independiente de la concentración de ABA, pero dependiente de calcio (Meyerhoff *et al.*, 2005).

Los GLR en plantas igualmente están implicados en el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana plasmática, así como en el desarrollo vegetativo. *AtGLR1.2* y *AtGLR3.7* modularon el gradiente de  $Ca^{2+}$  citosólico a través de su activación por su unión con D-Ser, y como consecuencia modificó el crecimiento y la morfogénesis del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011). Kim *et al.* (2001), observaron que al sobreexpresar a *AtGLR3.2* en *Arabidopsis* se producía sensibilidad a  $Ca^{2+}$  y a otros cationes como  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$ . Por otra parte, cuando *AtGLR3.7* y *AtGLR1.1* fueron expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, se pudo observar una mayor conductancia a través de la membrana plasmática de los cationes  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  (Roy *et al.*, 2008; Tapken y Hollmann, 2008). *AtGLR3.1* participa en la generación de flujo de calcio en células guardas (Cho *et al.*, 2009).

La sobreexpresión de *RsGluR* en *R. sativus* inhibió el crecimiento de un hongo patógeno necrótico *Botrytis cinérea*, demostrando que los GLRs están implicados en funciones relacionadas a la interacción planta-patógeno (Kang *et al.*, 2006).

Los GLRs también se han visto involucrados en la morfología de la raíz. En el 2006, Li y colaboradores identificaron un gen *GLR* en *O. sativa*, el *GLR 3.1*, que se sugiere participa en el desarrollo radical como un regulador de la proliferación celular y muerte celular en el ápice de la raíz. Miller *et al.*, (2010) igual aportaron información acerca de la participación de los GLRs en la morfogénesis de la raíz de *Arabidopsis* buscando cambios en el crecimiento de la misma, y demostraron que *GLR3.3* participa en el gravitropismo. La activación de *AtGLR3.6* indujo acortamiento del meristemo radical disminuyendo la actividad mitótica (Singh *et al.*, 2016).

A continuación, se presenta un resumen de las funciones reportadas de los GLRs en plantas (Cuadro 1.1).

**Cuadro 1.1.** Posible participación de GLRs en diferentes funciones vegetales.

Subunidad	Técnicas	Fenotipo	Fuente
AtGLR1.1	Expresión de un constructo antisentido AtGLR1.1	Modificación del metabolismo carbono/nitrógeno	Kang & Turano (2003)
AtGLR1.1, AtGLR1.4	Expresión heteróloga y caracterización electrofisiológica en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	Aumento en las corrientes de Ca <sup>2+</sup> en ovocitos	Tapken & Hollmann (2008)
AtGLR1.4	Expresión heteróloga y caracterización electrofisiológica en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	Produjo corrientes de entrada de Ca <sup>2+</sup> estimuladas por nueve aminoácidos	Tapken <i>et al.</i> (2013)
AtGLR1.2, AtGLR3.7	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	Fueron activados por D-Ser y median flujo de Ca <sup>2+</sup> induciendo elongación del tubo polínico	Michard <i>et al.</i> (2011)
AtGLR3.1	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN; sobreexpresión en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Participa en la generación de flujo de Ca <sup>2+</sup> en células guardas necesarias para el cierre estomático dependientes de canales iónicos	Cho <i>et al.</i> , (2009)
AtGLR3.2, AtGLR3.4	Sobreexpresión en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Forman canales heteroméricos y afectan el desarrollo de raíces laterales por señales de Ca <sup>2+</sup> en el floema	Vincill <i>et al.</i> , (2013)
AtGLR3.3	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	Fue defectuoso en la elevación de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cit</sub> inducido por aminoácidos	Qi <i>et al.</i> , (2006)
AtGLR3.3	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	Involucrado en señales de defensa de la planta y control de gravitropismo de raíces	Manzoor <i>et al.</i> , (2013), Miller <i>et al.</i> , (2010)
AtGLR3.3, AtGLR3.4	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	Corrientes de Ca <sup>2+</sup> inducidas por aminoácidos fueron modificadas en knockout <i>atglr3.3</i> y <i>atglr3.4</i>	Stephens <i>et al.</i> , (2008)
AtGLR3.4	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	Las mutantes presentan mayor sensibilidad al estrés salino durante la germinación de las semillas debido a una mayor acumulación de Na <sup>+</sup> y un aumento en el calcio inducido por NaCl	Cheng <i>et al.</i> , (2018)
AtGLR3.4	Expresión transitoria de GLR3.4::GFP en la epidermis de cebolla	Expresión de AtGLR3.4, independiente de la concentración de ABA, pero dependiente de calcio	Meyerhoff <i>et al.</i> , (2005)
AtGLR3.4	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> con GLR3.4 fusionado a GFP; expresión heteróloga y caracterización electrofisiológica en células animales (HEK293T)	Está presente en membrana plasmática; su expresión en células animales dio como resultado corrientes de flujo de Ca <sup>2+</sup> independiente de voltaje, activada por aminoácidos	Vincill <i>et al.</i> , (2012)
AtGLR3.6	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	La línea knockout presentó un tamaño pequeño del meristemo radical y disminuyó la actividad mitótica	Singh <i>et al.</i> , (2016)
AtGLR3.7	Sobreexpresión en <i>Arabidopsis thaliana</i> ; expresión heteróloga y caracterización electrofisiológica en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	Falta de activación inducida por aminoácidos; aumento de la conductancia constitutiva de los ovocitos Ba <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> y Na <sup>+</sup>	Roy <i>et al.</i> , (2008)
OsGLR3.1	Genética inversa a través de mutagénesis por inserción de T-ADN	Knockout <i>glr3.1</i> mostró una disminución de tamaño del centro quiescente y una mayor tinción de Azul de Evans en la punta de la raíz, lo que sugiere una mayor muerte celular	Li <i>et al.</i> , (2006)
PpGLR1, PpGLR2	Generación de genes knockouts por recombinación homóloga	Knockout <i>glr1-19</i> , <i>glr2-11</i> y una doble mutante <i>glr1/2</i> mostraron defectos en la quimiostasis y reproducción	Ortiz-Ramírez <i>et al.</i> , (2017)

## 1.6. FARMACOLOGÍA DE LOS GLRs

El uso de la farmacología para el estudio de los GLRs revela, en parte, las funciones de la ya mencionada familia de proteínas. Como ya se mencionó en el [apartado 1.2](#), el dominio de unión a ligando de los GLRs de plantas comparte homología con los iGluRs de mamíferos, de ahí nace el interés de investigar si los GLRs de plantas responden igual a sus homólogos en presencia de agonistas y antagonistas que ya han sido elucidados para los iGluRs en mamíferos.

### 1.6.1. POSIBLES AGONISTAS DE GLRs EN PLANTAS

Los verdaderos agonistas de los GLRs de plantas aún no han sido elucidados, aunque en un principio, se consideró a L-Glu como el principal agonista de los GLRs, dado que despolariza la membrana plasmática en células de la raíz de *Arabidopsis* (Dennison y Spalding, 2000). Este papel también se ha sugerido para la Gly, aminoácido conocido como co-agonista que actúa sinérgicamente con L-Glu en la regulación del flujo iónico en los iGluRs del tipo NMDA, dado su homología con los iGluRs en animales. Para las plantas, ambos aminoácidos en conjunto regulan la elongación de hipocótilos en *A. thaliana*, así como la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular; mientras que aspartato y alanina no manifiestan un efecto importante. Además, usando predicciones bioinformáticas, se proporcionó evidencia de que los iGluRs poseen una Treonina (L-Thr) en la posición 655 altamente conservada en todos los mamíferos y parece ser crucial para la unión de L-Glu. En cambio, en esta posición se encuentra una fenilalanina en los AtGLRs, lo cual provoca que la Gly, en lugar del L-Glu, pudiera unirse más fácilmente a este sitio como agonista de los GLRs (Dubos *et al.*, 2003).

Tres años más tarde, Qi *et al.* (2006), demostraron que Glu y Gly desencadenan corrientes de  $Ca^{2+}$  en mutantes *glr3.3* y como consecuencia se despolariza el potencial de membrana. En este estudio también se sugiere que L-Ala, L-Ser, L-Asn, L-Cys y glutatona ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-Gly) pueden fungir como agonistas de los receptores, ya que inducen cambios en el potencial de membrana, así como en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . En células de tabaco también se ha observado una elevación en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular cuando las mismas son tratadas con L-Glu (Vatsa *et al.*, 2011a).

Los microtúbulos de la raíz de *A. thaliana* respondieron fuertemente a NMDA, induciendo su despolimerización después del tratamiento con dicho fármaco, y este efecto fue similar al observado con L-Glu. Este aminoácido indujo la despolarización de la membrana plasmática (Sivaguru *et al.*, 2003); sin embargo, este efecto no fue observado con aspartato. Así mismo, el NMDA, Glu y Gly desencadenaron el flujo de cationes, y la adición simultánea de L-Glu y Gly produjeron un efecto sinérgico en esta especie (Krol *et al.*, 2007). Estos resultados indican que este receptor puede actuar de una manera similar a los del tipo NMDA de mamífero, teniendo tanto a la Gly como al L-Glu como agonistas.

Meyerhoff *et al.* (2005), sugirieron que L-Glu, L-Asn, L-Ser y Gly podrían ser agonistas del receptor AtGLR3.4 en células del mesófilo en *A. thaliana*, dado que estos

aminoácidos indujeron corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos tejidos. Por otro lado, Ni *et al.*, (2016) usaron un sistema de luminiscencia, basado en acuaporina, para probar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en raíces de arroz tratadas con siete diferentes aminoácidos como posibles agonistas. El experimento arrojó que Glu era el único que desencadenaba flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las raíces y este efecto incrementaba a mayores dosis de dicho aminoácido.

Se ha demostrado que en tabaco y en *Arabidopsis*, la D-Ser participa en el crecimiento del tubo polínico, actuando como un agonista activo de los GLR (Michard *et al.*, 2011). Siete de los veinte aminoácidos estándares, L-Met, L-Trp, L-Phe, L-Leu, L-Tyr, L-Asp y L-Thr (Tapken *et al.*, 2013) actuaron como agonistas, despolarizando la membrana en hojas de *Arabidopsis* a través de un AtGLR1.4. En este trabajo, la L-Met no sólo fue el agonista más efectivo sino el más potente, mientras que L-Asp fue el agonista menos potente.

En resumen, los GLR de plantas parecen diferenciarse grandemente de los de mamífero, en cuanto a la especificidad por los agonistas. Si bien, esta especificidad es muy estricta en los de mamífero, los de plantas parecen activarse por diferentes aminoácidos, lo cual puede otorgarle una mayor versatilidad de funciones a estas proteínas de plantas.

### **1.6.2. USO DE ANTAGONISTAS DE LOS iGluRs PARA EL ESTUDIO DE LOS GLRs DE PLANTAS**

Los estudios en plantas usando antagonistas de los iGluRs sugieren que los GLRs pueden participar en la transducción de señales durante diversos procesos celulares. Son varios los antagonistas que se han utilizado para el estudio de los GLRs en plantas, siendo en algunos casos contradictorios los resultados obtenidos y dependientes de la especie vegetal, el tipo de antagonista, la concentración, etc.

Lam *et al.* (1998), estudiaron las respuestas de *Arabidopsis* ante la presencia de 6,7-dinitroquixalina-2,3 diona (DNQX), un antagonista selectivo del tipo no NMDA. Ellos observaron que las plántulas que crecieron en condiciones de luz y en presencia del antagonista mostraban un alargamiento de hipocótilos y una reducción en la síntesis de la clorofila, comparada con las plántulas creciendo en oscuridad y en ausencia del DNQX. Años más tarde, Dubos *et al.*, (2003), formularon una hipótesis basada en que si DNQX como antagonista inducía la elongación del hipocótilo, entonces la aplicación simultánea de éste con agonistas conocidos de los iGluRs debería revertir este efecto, y evidentemente observaron lo descrito en su hipótesis. Los AtGLRs pueden mediar las señales de transmisión de la luz; la aplicación de DNQX y del agonista beta-metilamino-

I-alanina (BMAA), a las plantas resultó en la elongación del hipocótilo, la disminución en la apertura angular entre los cotiledones, así como en las cantidades de clorofila (Kang *et al.*, 2004).

El DNQX también está involucrado en la inhibición de la germinación de semillas de una línea *antiAtGLR1.1* (Kang y Turano, 2003), así como en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria (RP) y la formación y el desarrollo de raíces laterales (RL) (Singh y Chang, 2018). Por otro lado, el ácido 2-Amino-5-fosfopentanoico (AP-5), antagonista iGluR del tipo NMDA que se une al sitio de Glu, y el CNQX inhibieron el crecimiento del tubo polínico en tabaco, así como el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana de las células del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011). También, en *Arabidopsis*, el CNQX inhibió el crecimiento de la RP y de las RL (Singh y Chang, 2018). Por otro lado, el DNQX, el (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina maleato (MK-801), un antagonista de los iGluRs del tipo NMDA que se une al sitio del poro, y AP-5, no antagonizaron el efecto inhibitorio de L-Glu sobre el crecimiento de la RP de *A. thaliana* (Walch-Liu *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Dubos *et al.*, (2003) se obtuvo que el DNQX disminuyó la elevación en la concentración de  $Ca^{2+}$  que fue inducida por el tratamiento simultáneo de L-Glu y Gly. Este último y el CNQX inhibieron las corrientes de  $Ca^{2+}$  inducidas por L-Met a través de AtGLR1.4 (Tapken *et al.*, 2013a). Meyerhoff *et al.*, (2005), obtuvieron que el DNQX, el CNQX así como el 5,7-dinitro-quinoxalina-2,3-diona (MNQX), antagonista de los iGluR del tipo NMDA, redujeron las corrientes de  $Ca^{2+}$  dependientes de L-Glu en células del mesófilo en *A. thaliana*.

En arroz, Ni *et al.*, (2016) demostraron que el flujo de  $Ca^{2+}$  desencadenado por L-Glu fue mediado por los GRLs presentes en esta especie (OsGLR); ya que este flujo se reducía al tratar el tejido con los antagonistas CNQX y DNQX.

AP-5 y ácido 2-amino-7-fosfopentanoico (AP-7) son antagonistas competitivos de la familia de los receptores NMDA y son ampliamente utilizados. Sivaguru *et al.*, (2003) demostraron que el antagonista AP-5 compite por el sitio de unión del agonista. También, AP-5 inhibió fuertemente el flujo de  $Ca^{2+}$  inducido por el polipéptido criptogenina en células de tabaco, mientras que el MK-801 y el DNQX fueron menos efectivos (Vatsa *et al.*, 2011b). Los potenciales de acción (PA) que fueron inducidos por Gly se bloquearon por la aplicación de AP-5; mientras que los inducidos por L-Glu fueron inhibidos por la aplicación de DNQX y AP-5 (Krol *et al.*, 2007).

La aplicación del BMAA parece alterar la morfogénesis temprana de las plantas de *A. thaliana*, inhibiendo el crecimiento de la raíz y la apertura de los cotiledones cuando se aplica luz (Brenner *et al.*, 2000; Walch-Liu *et al.*, 2006). Además, este compuesto causó una rápida despolarización de la membrana, indicando un posible papel como ligando de GLRs (Brenner *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2009). L-Glu y BMAA revirtieron la inhibición de la germinación de semillas de *Arabidopsis* provocada por DNQX (Kang y Turano, 2003)

Un trabajo más extenso del estudio de los fármacos que regulan a los GLR es el realizado por Forde y colaboradores en el 2013. Estos autores usaron una batería de más de 80 fármacos, entre ellos agonistas y antagonistas de los iGluRs para evaluar su efecto sobre el crecimiento radical en *Arabidopsis*. Muchos de sus datos no fueron detallados en su publicación, debido a que no tuvieron una respuesta reproducible, comentado así por estos autores. Sin embargo, ellos describieron cambios en la morfología y la respuesta gravitrópica de la raíz en presencia de PHCC (N-fenil-7-(hidroximino) ciclopropa [b] cromen-1<sup>a</sup>-carboxamida), un antagonista de los mGluR, y de ácido propanóico -(S)- $\alpha$ -Amino-2', 4'-dicloro-4-hidroxi-5-fosfometil)-[1,1'-bifenil]-3-(SDZ 220-040), un antagonista competitivo de los iGluRs tipo NMDA que se une al sitio de L-Glu. Además, al usar 2-(4-cloro-3-metilpenil)-2-oxoetil tiocinato (CMOT) y 1-(2,6-dimetilfenil)-2,5-dihidro-1H-pyrrole-2,5-diona (DDPD), antagonistas de los iGluRs, se previno la respuesta inhibitoria que ejerce el L-Glu sobre la RP de *Arabidopsis*; mientras que el SDZ 220-040, inhibió ligeramente el crecimiento de la RP e indujo agravitropismo de la misma (Forde *et al.*, 2013).

## 1.7. PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS GLRs

La conducción de iones a través de canales y transportadores dentro y fuera de las células es un proceso indispensable para la vida de las plantas. En los mamíferos, los iGluRs presentan preferencia hacia la conducción de ciertos iones; por ejemplo, los tipo AMPA y KA (No-NMDA) son más permeables a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> que a Ca<sup>2+</sup>; mientras que los del tipo NMDA son más permeables a Ca<sup>2+</sup> (Dingledine *et al.*, 1999). En animales, el mecanismo de unión al agonista es insensible a voltaje, aunque se ha demostrado que los receptores tipo NMDA presentan un bloqueo por Mg<sup>2+</sup> dependiente a voltaje, y los receptores tipo AMPA y KA muestran corrientes debido a la regulación por poliaminas (Davenport, 2002).

Sin embargo, se conoce que los GLRs de plantas carecen del motivo de selectividad

iónica (el sitio QRN) que tienen los de animales, este sitio es importante en la determinación de la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y a su bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$  (Nagata *et al.*, 2004). Por lo tanto, podría esperarse que la permeabilidad a ciertos cationes se vea afectado por la ausencia del sitio QRN.

Una de las principales preguntas planteadas después del descubrimiento de los GLRs en plantas, fue si estos últimos eran capaces de conducir iones a través de la membrana de manera similar a su contraparte con animales. Dennison y Spalding en el 2000, descubrieron que la membrana plasmática de *Arabidopsis* se despolariza por la acción del L-Glu.

Kim *et al.* (2001), observaron que al sobreexpresar a *AtGLR3.2* en *Arabidopsis* se producía la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , pero más interesante la sensibilidad a otros cationes como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Dichos resultados los llevaron a concluir el posible papel de los GLRs como NSCC. Cuando *AtGLR3.7* fue expresado en ovocitos de *Xenopus*, se pudo observar una mayor conductancia a través de la membrana plasmática de los cationes  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (Roy *et al.*, 2008), demostrando una vez más la posibilidad de que los GLRs de plantas actúan como NSCC. *AtGLR1.1* y *AtGLR1.4* fueron permeable a  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (Tapken *et al.*, 2013a; Tapken y Hollmann, 2008). Igualmente, *AtGLR1.2* y *AtGLR3.7* están implicados en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, modulando el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediante su interacción con D-Ser (Michard *et al.*, 2011). La permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  también ha sido demostrada para *AtGLR3.3* y *3.4* (Qi *et al.*, 2006; Stephens *et al.*, 2008; Vincill *et al.*, 2012).

Se sugiere que la principal actividad de los GLRs es permitir el flujo de cationes a través de la membrana. L-Glu induce la despolarización de la membrana plasmática, sinónimo de que el potencial de la membrana es más positivo que el potencial de equilibrio a  $\text{K}^+$  o sea, más cargas positivas están entrando al citosol (Dubos *et al.*, 2005; Sivaguru *et al.*, 2003) y DNQX impidió dicha despolarización. Un efecto similar fue observado por Meyerhoff *et al.*, (2005), ya que los antagonistas DNQX, CNQX y MNQX redujeron las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de Glu en células del mesófilo en *A. thaliana*. También, se ha reportado que L-Glu activa corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en protoplastos de raíces de *Arabidopsis* (Demidchik *et al.*, 2004).

## 1.8. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE CANALES IÓNICOS

La dinámica de la actividad eléctrica de las plantas, incluida la señalización eléctrica,



puede ser usado para describir la totalidad de corrientes iónicas en un sistema biológico y hasta hace poco se le denominó, en el contexto de las ciencias ómicas, “electroma” (De Loof, 2016; Souza *et al.*, 2017). La principal parte de las dinámicas del electroma vegetal es el flujo de iones a través de las membranas; de tal manera que la bicapa lipídica puede ser considerada como un capacitor dieléctrico que divide el exterior celular del citosol; de esta forma, los iones y las moléculas cargadas no pueden cruzar libremente a través de las membranas, y algunos de ellos lo hacen a través de canales, poros, bombas iónicas o transportadores (Toledo *et al.*, 2019).

Los iones que atraviesan la superficie de un tejido en solución son transportados hacia o desde la superficie por difusión de altas concentraciones a bajas concentraciones o por flujo de masa. Además, las fuerzas eléctricas influyen sobre ésta, por lo tanto, el movimiento de dicho ion obedece al movimiento de altos potenciales electroquímicos a bajos potenciales electroquímicos.

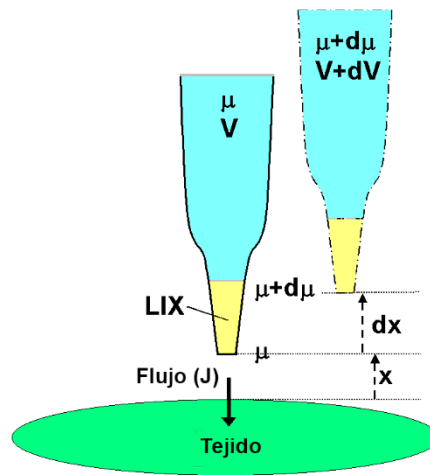
Las técnicas utilizadas para el estudio del transporte de iones van desde la espectroscopía de NMR (resonancia magnética nuclear), marcadores fluorescentes, patch-clamp, así como varios tipos de electrodos selectivos a ciertos iones (Shabala *et al.*, 2006). La técnica de patch-clamp se usa para medir transporte iónico a través de la membrana y para llevar a cabo los ensayos se parte de protoplastos de las células de interés (Newman, 2012). Más recientemente, se ha implementado la técnica MIFE (Estimación de Flujo Iónico por Microelectrodos) para este objetivo, contando con diferentes ventajas por encima de las antes mencionadas, debido a que es una herramienta novedosa y útil para la medición de flujos iónicos *in situ*, de forma no invasiva, cerca de la raíz de plantas completas permitiendo estudiar tolerancia a estrés oxidativo en raíces de cebada (Pottosin *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019), o incluso un tipo de célula a partir de la generación de protoplastos (Shabala *et al.*, 1998; Newman, 2001).

En MIFE los flujos son una estimación de la diferencia de potencial electroquímico medido por un electrodo en dos posiciones, y el flujo neto ( $J$ ) del ion ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) puede ser calculado usando la ecuación de Nernst:

$$J = c u z F g \left( \frac{dV}{dx} \right)$$

Donde  $c$  es la concentración del ion ( $\text{mol m}^{-3}$ );  $u$  es la movilidad del ion ( $\text{m s}^{-1}$  por Newton  $\text{mol}^{-1}$ );  $z$  es la valencia del ion;  $F$  es el número de Faraday ( $96\,500 \text{ C mol}^{-1}$ );  $g$  es un factor calculado a partir de la pendiente de Nernst por el electrodo durante la calibración;

$dV$  es el gradiente de voltaje medido por el electrómetro entre las dos posiciones (V); y  $dx$  es la distancia entre las dos posiciones (m) (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Esquema representativo de la técnica MIFE. El microelectrodo selectivo de iones es movido suavemente entre dos posiciones cerca de la superficie de la raíz (o el tejido) (Modificado de Newman, 2001). Esta técnica es explicada en el texto.

## 1.9. EXPRESIÓN DE LOS GLRs EN PLANTAS

El primer análisis de expresión de los GLRs en plantas fue realizado por Chiu y colaboradores en el 2002. Por medio de un estudio de RT-PCR, estos autores evaluaron los niveles de transcritos de todos los 20 *AtGLRs* en tres diferentes tejidos: hojas, raíces y silicua. Los GLRs del clado I (*AtGLR1.1-1.4*) y III (*AtGLR3.1-3.7*) se expresaron en todos los tejidos, mientras que cinco (*AtGLR2.1-2.3*, *AtGLR2.6* y *AtGLR2.9*) de los nueve miembros del clado II (*AtGLR2.1-2.9*) se expresaron exclusivamente en raíz (Chiu *et al.* 2002). Estos datos fueron reforzados por Roy *et al.* (2008), en donde ellos obtuvieron que los 20 genes se expresaron en raíces completas. Además, estos autores evaluaron la expresión de los *AtGLRs* en tres diferentes tipos de células de las hojas de *Arabidopsis* a través de la técnica MEX (Micro Expression amplification), la cual permitió analizar simultáneamente la expresión de cinco a seis GLR en una sola célula. A través de este trabajo, se comprobó que el *AtGLR3.7* fue el único que se expresó siempre en todos los tipos de células y plantas utilizadas.

En el caso de *S. lycopersicum*, la expresión de cuatro genes (*SIGLR1.1*, *1.2*, *2.2* y *3.1*) de la familia de receptores se evaluó en diferentes tejidos de la planta dando como resultado que todos se expresaron en raíces, aunque *SIGLR1.1* fue más específico para

este órgano, en comparación con los otros órganos (Aouini *et al.*, 2012).

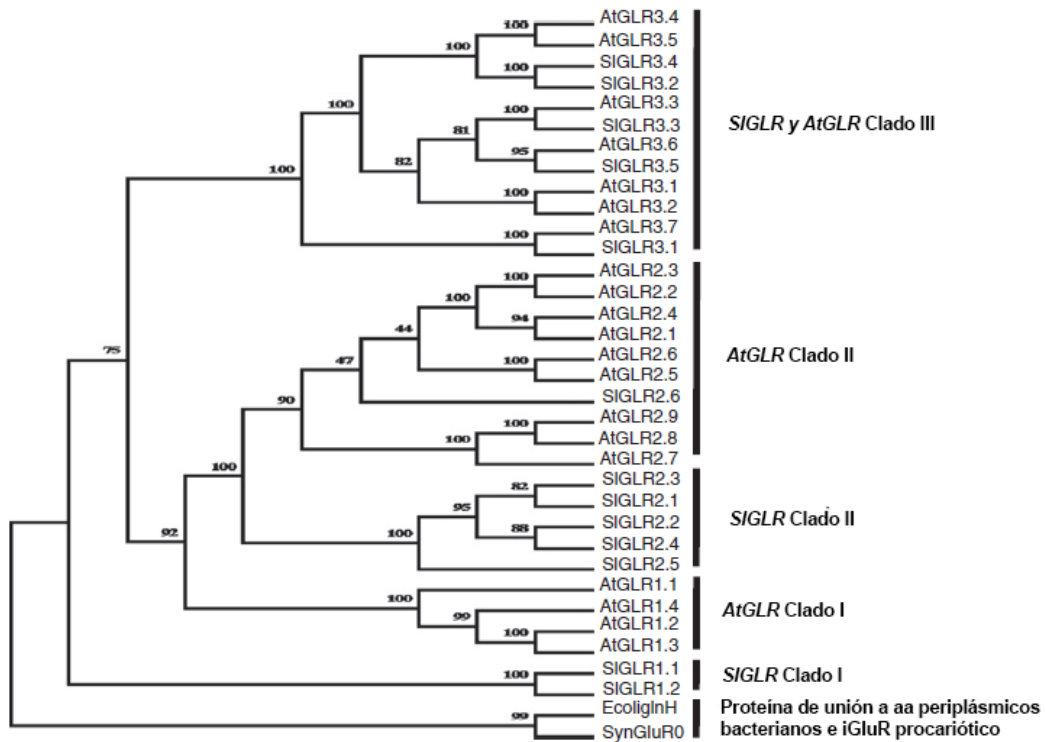
Además, de los 24 genes *OsGLRs* encontrados en el genoma de arroz, seis de ellos (*OsGLR3.1*, *OsGLR3.2*, *OsGLR3.5-3.7* y *OsGLR4.9*) se expresaron en la raíz (Ni *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014).

### **1.10. GLRs EN SOLANÁCEAS**

Las Solanáceas son una familia de plantas que comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2700 especies. Entre las especies alimenticias más importantes pertenecientes a esta familia se encuentran: papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*) y los chiles (*Capsicum*) (Cabañas *et al.*, 2005).

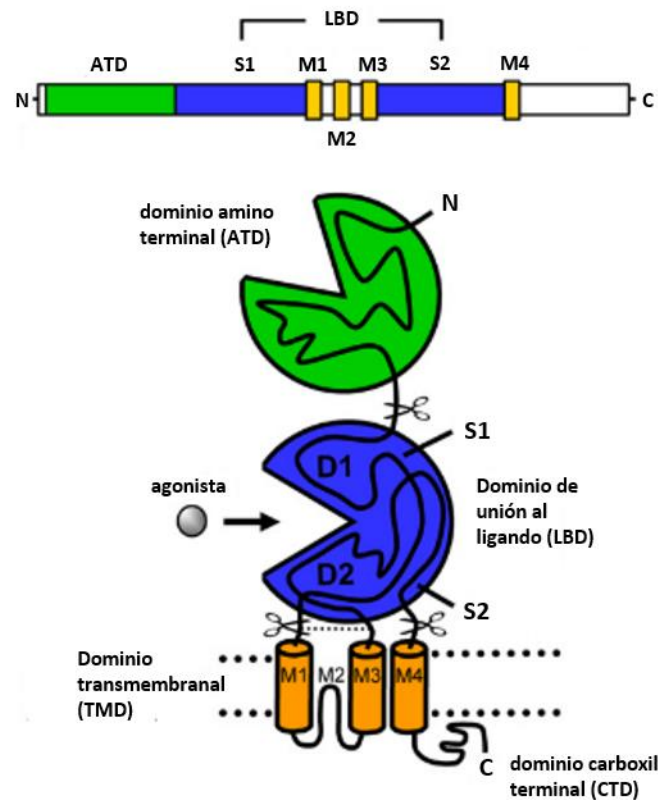
Hasta el día de hoy, únicamente se han estudiado los GLR de tomate (*S. lycopersicum*). En esta especie han sido identificados 13 *GLRs*, los cuales fueron agrupados en tres clados: Clado I (*SIGLR1.1* y *SIGLR1.2*), Clado II (*SIGLR2.1-2.6*) y Clado III (*SIGLR3.1-3.5*) (Aouini *et al.*, 2012).

Los análisis filogenéticos indicaron que los clados II y III en esta especie fueron homólogos a los de *Arabidopsis*. Sin embargo, estos análisis revelaron la existencia de un clado específico para tomate; es decir, la divergencia de otro clado (Clado I) anterior a la evolución de los otros clados (II y III), el cual es representado por dos genes (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Árbol filogenético basado en los alineamientos a partir de secuencias de aminoácidos de SIGLRs y AtGLRs (Modificado de Aouini *et al.*, 2012). En este trabajo, se usaron como grupos externos a SynGluR0 y EcolignH, un receptor de glutamato de la cianobacteria *Synechocystis* sp. y una proteína de unión a aminoácidos periplásmicos bacterianos GlnH, respectivamente.

Todos los genes *SIGLR* presentaron las características estructurales típicas de los GLRs de *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1998, Chiu *et al.*, 1999), cuatro dominios transmembranales (M1-M4), dos dominios extracelulares, una región N-terminal (con el aminoácido fenilalanina conservado en un 12.8%) normalmente llamado GlnH1 o S1, así como otro dominio entre M3 y M4, nombrado GlnH2 o S2 (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Modelo estructural de los seis dominios conservados en los GLRs. Dominios transmembranales (M1-M4) y extracelulares (S1-S2) (Adaptado de Traynelis *et al.*, 2010).

Los 13 SIGLRs presentan tres dominios en común: IPR001638 (proteína bacteriana de unión a soluto extracelular), IPR001828 (receptor de unión a ligando extracelular) e IPR001320 (iGluR). Estos dominios se encontraron también en las proteínas de *Arabidopsis*, motivo por el cual esos genes se consideraron que codifican para GLRs en tomate. También, se presentaron dominios específicos para algunas de estas proteínas: IPR017103 (GLR, planta), encontrado en casi todos los receptores, exceptuando a SIGLR1.1 y SIGLR1.2; IPR002455 (GPCR, receptor acoplado a proteínas g, familia 3, receptor GABA, tipo B) e IPR000337 (GPCR, familia 3), los cuales fueron detectados en cuatro receptores (SIGLR3.1, 3.3, 3.4 y 3.5) (Cuadro 1.2). GABA, como ligando, puede unirse al dominio IPR002455 y activar los GLRs de plantas (Bouché, Lacombe y Fromm, 2003).

Los GLRs de plantas cuentan con un dominio N-terminal extracelular que hasta ahora no se sabe su función en plantas, aunque sí que presenta homología con el dominio de

unión al ligando de mGluR y de receptores GABA (Aouini *et al.*, 2012).

En general, todos los SIGLRs comparten los mismos dominios predichos para los GLRs de *Arabidopsis*: IPR001638, IPR001828, IPR001320, IPR17103, IPR002455 e IPR000337 (Aouini *et al.*, 2012) (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2.** Dominios encontrados en SIGLRs y AtGLRs (Aouini *et al.*, 2012).

ID de InterPro	Descripción	Proteínas SIGLRs
IPR001638	Proteína de unión a soluto extracelular	13
IPR001828	Receptor de unión al ligando extracelular	13
IPR001320	Receptor de glutamato ionotrópico	13
IPR17103	Receptor de glutamato ionotrópico, plantas	11 (Clado II y III)
IPR002455	GPCR (Receptores acoplados a proteínas G), receptor ácido $\gamma$ -aminobutírico, tipo B	SIGLR3.1, 3.3 y 3.5
IPR000337	GPCR	SIGLR3.4

Hasta hoy, el uso de agonistas y antagonistas para el estudio de los GLRs de plantas es muy limitado; además, los verdaderos agonistas de estos receptores en estos organismos aún no han sido elucidados en las especies en las que se ha detectado su presencia, tal es el caso de *A. thaliana*, *O. sativa* y *S. lycopersicum*.

## HIPOTESIS

Si al tratar las raíces con agonistas y/o antagonistas de GLRs se modifica la arquitectura

radical, entonces los GLR regulan eventos de desarrollo en este órgano.

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la presencia y actividad de posibles GLRs en raíces de *C. annuum* a través de un acercamiento farmacológico y molecular.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar los cambios morfológicos inducidos en la raíz de *C. annuum* al exponerla a la presencia de agonistas y antagonistas de los receptores de glutamato mediante el establecimiento de un sistema de microfenotipación *in vitro*.
- Determinar la presencia de transcritos de *GLRs* en la raíz de *C. annuum*.
- Determinar la actividad de GLRs en raíces de *C. annuum* en presencia y/o ausencia de agonistas y antagonistas.

## JUSTIFICACIÓN

Una correcta nutrición mineral de las plantas está altamente relacionada con su arquitectura radical; ésta determina el área de suelo disponible para eventos esenciales como la absorción de agua y nutrimentos, y esta actividad a su vez está fuertemente ligada a los transportadores y canales en las membranas de las células radicales. Por lo tanto, estudiar las proteínas que regulan los procesos de desarrollo de la raíz, permitiría en un futuro aumentar la eficiencia de las plantas en la absorción de nutrientes y agua, haciendo que incrementen los rendimientos de las mismas. En la actualidad esta eficiencia es alrededor del 30%; esto quiere decir que el 70% de los nutrientes que se aplican a los cultivos no son consumidos por las plantas y se lixivian al manto freático, contaminando el ambiente.

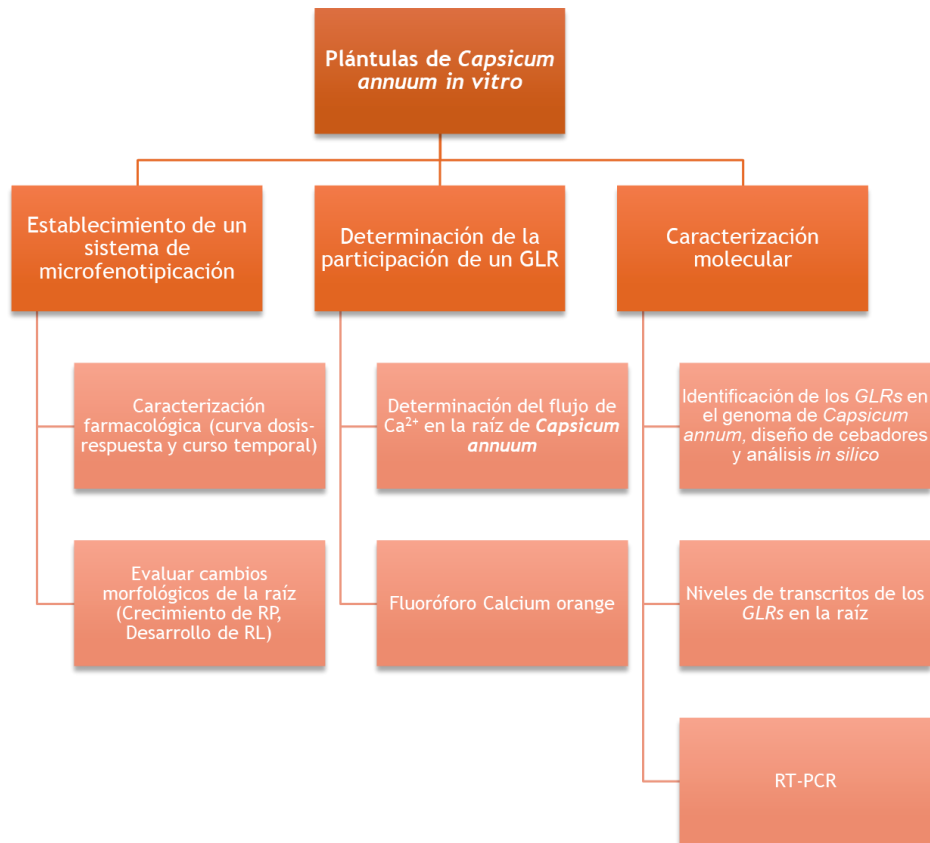
Los antecedentes indican que los GLRs pueden participar en la regulación de la arquitectura radical de la planta modelo *Arabidopsis*, permitiendo el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular a través de su activación por la unión a ligandos (agonistas) específicos, que en su mayoría suelen ser aminoácidos. Dada la versatilidad que presentan estas proteínas en las plantas, en cuanto a sus agonistas e interacción entre subunidades para formar el receptor activo, se hace necesario estudiar las mismas en plantas no modelos, especialmente aquellas de importancia agrícola, con el objetivo de poder aplicar este conocimiento para lograr un incremento en los rendimientos agrícolas, de una manera saludable al ambiente. En particular, el descubrimiento de que en la familia de las solanáceas existe un clado de los GLR que parece ser diferente a los reportados para *Arabidopsis* y arroz, sugiere que en *Capsicum*, otro miembro de las solanáceas, estos receptores pudieran presentar respuestas o funciones especiales que requieren ser estudiadas, para aumentar el conocimiento de las mismas en estos organismos.

Además, teniendo en mente que diferentes plantas pueden estar expuestas a una batería de aminoácidos específicos, dada por las características distintas de los suelos donde éstas se cultivan, es necesario expandir el conocimiento de estas proteínas y de sus posibles agonistas a especies vegetales que pueden cultivarse en suelos pobres en nutrientes. De esta forma, el impacto aplicable de este conocimiento para incrementar la eficiencia en el uso de nutriente en estas especies es mayor; tal es el caso para el género *Capsicum*, el cual se cultiva en 1.7 millones de hectáreas en todo el mundo.



## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación, se presenta un resumen de la estrategia experimental de este trabajo (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Estrategia experimental a seguir en el proyecto para el cumplimiento de los objetivos.

En este proyecto se pretende contestar la pregunta ¿Cuáles GLRs están presentes en las raíces de *C. annuum*?, a través de la farmacología, principalmente. En el Cuadro 1.3 se resumen los principales compuestos farmacológicos que se usarán tanto para las actividades de fisiología, como para electrofisiología y microscopía confocal.

**Cuadro 1.3.** Listado de los compuestos farmacológicos a utilizar en este proyecto.

		Número de Catálogo TOCRIS	Peso Molecular	Nombre del fármaco	Propiedades
Receptores AMPA	Agonista	1074	267.08	(RS)-AMPA hidrobromide	Agonista selectivo de AMPA. Forma de AMPA más soluble en agua
Receptores NMDA	Agonista	114	165.15	NMDA	Agonista selectivo de receptor NMDA
	Antagonista	106	197.13	D-AP5	Antagonista NMDA competitivo <u>ampliamente utilizado</u>
		2348	428.71	Gavestinol	Potente y selectivo antagonista que actúa en el sitio de unión a la glicina del receptor NMDA.
		742	380.23	L-689, 560	Antagonista muy potente al sitio de unión glicina-NMDA
		1251	451.7	SDZ 220-040	Antagonista NMDA potente y competitivo
Receptores kainato	Agonista	222	213.33	Ácido kaínico	Agonista selectivo de receptores kainato; excitante potente y neurotoxina

## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL EN *C. annuum*

#### INTRODUCCIÓN

En los animales el principal neurotransmisor excitatorio liberado durante la sinapsis en el SNC es el L-Glu (Watkins y Jane, 2006). Se sabe que ejerce su función a través de su unión a receptores, en donde los del tipo ionotrópico (iGluR) son los que más aportan a dicha función. Estos receptores son divididos en dos clases, de acuerdo a sus propiedades farmacológicas: los iGluRs del tipo NMDA y el no-NMDA (AMPA y KA), los cuales no reconocen al NMDA, como agonista, pero sí a AMPA o a KA. En mamíferos fue necesario hacer estudios mediante el uso de herramientas farmacológicas para identificar y separar funcionalmente a estos receptores, de tal forma que el NMDA y el AMPA son compuestos sintéticos, y el KA se extrae de ciertas algas, destacando que ninguna de estas sustancias se encuentra en el cerebro (Lerma *et al.*, 1997).

Las plantas requieren de agua y nutrientes para un adecuado crecimiento y necesitan adquirir estos compuestos de una forma eficiente, por lo que un correcto desarrollo radical es importante para esto. Se ha sugerido que los GLRs participan en eventos de regulación del desarrollo de este órgano (Sivaguru *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Walch-Liu *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2010; Vincill *et al.*, 2013; Forde y Roberts, 2014).

L-Glu, agonista de los iGluRs de mamíferos, inhibe el crecimiento de la RP y estimula la aparición y crecimiento de RL en *A. thaliana*, mientras que DNQX y MNQX, antagonistas de los iGluRs, inhiben la elongación de la RP (Walch-Liu *et al.*, 2006). Contrario a estos resultados, otros trabajos han reportado que L-Glu, NMDA y AMPA estimulan el crecimiento en longitud de la RP (LRP), así como la densidad de las RL (DRL) en este mismo modelo vegetal; y el DNQX inhibió este efecto (Singh y Chang, 2018).

En el caso de las plantas, los verdaderos agonistas de estos receptores aún no han sido elucidados en las especies en las que se ha detectado su presencia. Se ha propuesto a L-Glu y Gly (Dubos *et al.*, 2003), L-Gln, L-Met, L-Thr, L-Phe, L-Tyr (Tapken *et al.*, 2013b), la glutatona (Li *et al.*, 2013) y la D-Ser (D-Serina) (Michard *et al.*, 2011), entre otros, como agonistas de los GLRs en plantas. De igual forma, mediante el uso de sistemas de expresión heteróloga se sugirieron a L-Ala, L-Asn, L-Cys, L-Glu, Gly y L-Ser como agonistas, ya que dichos aminoácidos produjeron la despolarización de la membrana en raíces de *Arabidopsis* (Qi *et al.*, 2006).

Además, la gama de compuestos agonistas y antagonistas de los GLRs es muy diversa debido a las variadas combinaciones entre subunidades para formar el receptor funcional, eso hace más difícil su estudio por lo que hasta el momento son contados los trabajos donde se identifiquen dichas proteínas por medio de farmacología y su efecto morfológico en las raíces de las plantas.

Como un primer acercamiento a responder la pregunta biológica realizada en este trabajo ¿Cuál población de GLRs están presentes en la raíz de *C. annuum*?, se procedió a caracterizar el efecto de una batería de fármacos, identificados como agonistas y antagonistas de los iGluRs de mamíferos, sobre parámetros del crecimiento radical en plantas de chile serrano bajo condiciones *in vitro*. Hasta el momento, no existe un estudio de la participación de estas proteínas en la regulación del crecimiento de esta especie.

## **2.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1.1. MATERIAL VEGETAL**

Se utilizaron semillas de chile serrano (*C. annum*, var. CM334), donadas por el M.C. Ramón Souza Perera.

### **2.1.2. DESINFESTACIÓN Y GERMINACIÓN**

Para la desinfección de las semillas, se siguió el protocolo de Celis-Arámburo *et al.*, (2011). Se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se agregó alcohol al 80 % (v/v), en agitación por cinco min (min). Posteriormente, el alcohol se retiró y se hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril, se agregó hipoclorito de sodio (Cloralex®), el cual fue diluido al 30 % (v/v, 5% NaOCl) y se agitó durante 15 min. Las semillas se retiraron de esta solución y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas desinfestadas se mantuvieron en agua destilada durante 48 h, en condiciones de oscuridad, a 4 °C.

Para la germinación, las semillas estériles fueron transferidas a cajas de Petri estériles, en las que previamente se colocó una capa fina de algodón y papel filtro humedecido con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Las cajas de Petri se mantuvieron a 25 ± 2 °C en oscuridad para que ocurriera la germinación de las semillas.

### **2.1.3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LOS PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO RADICAL EN *C. annum***

Una vez que ocurrió la protrusión de la radícula (de cinco a seis días), las semillas se transfirieron a cajas de Petri de 9 cm conteniendo medio de crecimiento basal NO (25 ml por caja de Petri): 23 mM ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 5.7, sacarosa al 0.5% (p/v), agar-agar al 1% (p/v) y las sales del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) diluidas 1:50.

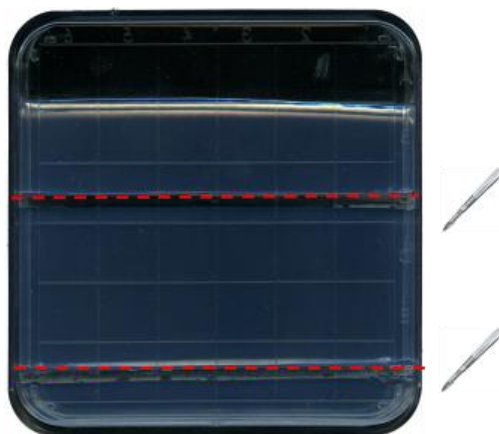
Las fuentes inorgánicas de N del medio B5 (nitrato de potasio y sulfato de amonio)

fueron eliminadas y se adicionó como única fuente de este elemento  $1 \text{ mM KNO}_3$ . Las cajas fueron colocadas en posición vertical, en condiciones de oscuridad, hasta que la RP alcanzó aproximadamente  $2.3 \pm 0.2 \text{ cm}$  de longitud (aproximadamente cuatro días).

Previo a la evaluación de los fármacos se probaron dos sistemas de crecimiento de las plántulas, 1) Cajas de Petri segmentadas y, 2) Pre-incubación de plántulas en un volumen de  $2.0 \text{ ml}$ . El precio de los fármacos es muy elevado y las cantidades por envase son muy pequeñas, por lo que cuando se hacen estos estudios de farmacología se procuran usar volúmenes pequeños, es por eso que se adecuó el sistema de crecimiento de las raíces.

### 1) Cajas de Petri segmentadas:

Para evaluar el efecto de los fármacos, las plántulas cuya RP medía  $2.3 \pm 0.2 \text{ cm}$  fueron transferidas a cajas de Petri cuadradas de  $10 \text{ cm}$  que contenían el medio de crecimiento NO ( $25 \text{ ml}$  por caja). El medio fue segmentado en tres partes; en la parte superior se colocó la raíz de manera que únicamente su ápice estuviera en contacto con el segmento medio, al cual se le adiciona el fármaco para el estudio dejándose difundir toda la noche y posteriormente pasar las raíces a las cajas con tratamiento y un tercer segmento inferior (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Representación de segmentación de cajas con medio de tratamiento para el estudio de las raíces. Las cajas fueron segmentadas en tres partes, y el fármaco fue difundido en el segmento medio. Los anchos de los segmentos superior, medio e inferior fueron:  $2.0$ ,  $3.5$  y  $1.2 \text{ cm}$ , respectivamente. La separación entre cada segmento es de aproximadamente  $2 \text{ mm}$ .

### 2) Pre-incubación de plántulas en un volumen de $2.0 \text{ ml}$ :

Para evaluar el efecto de los fármacos, las plántulas de igual grado de desarrollo fueron

transferidas a un medio de pre-incubación por 30 min. Para los tratamientos, este medio contenía al fármaco a evaluar diluido en H<sub>2</sub>O destilada estéril, y para el testigo, se adicionó únicamente H<sub>2</sub>O destilada estéril; posterior al tiempo de incubación, las plantas se pasaron a cajas de Petri cuadradas con 35 ml de medio de crecimiento basal NO, descrito anteriormente.

Para ambos sistemas de crecimiento, una vez transferidas las plántulas en las cajas de Petri cuadradas, los experimentos se realizaron en un cuarto de cultivo en condiciones controladas, en fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad), intensidad de luz de 114  $\mu\text{M s}^{-1} \text{cm}^{-2}$  y temperatura a  $25 \pm 2$  °C.

En estos experimentos se evaluó con una regla el crecimiento de la RP diariamente hasta el día cinco de tratamiento. La aparición y el crecimiento de RL fueron evaluadas al décimo día. Las cajas de Petri fueron escaneadas a los cuarto y décimo días de crecimiento. Se utilizaron tres cajas de Petri por tratamiento, cada una conteniendo seis plántulas (n=18 plántulas).

#### **2.1.4. CURVA DOSIS-RESPUESTA Y CURSO TEMPORAL**

Los receptores del tipo NMDA necesitan tanto a L-Glu como a Gly para su activación y NMDA es el fármaco utilizado para su estudio, ya que se une al mismo sitio que Glu en el receptor. Para identificar el posible papel de un GLR tipo NMDA sobre el crecimiento de la raíz en *C. annuum*, así como para detectar la sensibilidad de la raíz de chile serrano a estos compuestos, se realizaron cuatro tratamientos: un testigo conteniendo únicamente medio basal NO descrito en el apartado 2.1.3; el fármaco NMDA, Gly, así como la combinación de ambos (NMDA + Gly) a una dosis de 1 mM en todos los casos. La dosis fue fijada de acuerdo a los datos reportados en la literatura.

Con el fin de estudiar no sólo el efecto del agonista NMDA, sino también su efecto antagónico se procedió a evaluar el resultante de la adición de un antagonista de los receptores del tipo NMDA, AP-5, sobre el crecimiento de las raíces, a una única dosis de 1 mM.

Por otro lado, se incluyó el efecto que tiene la posible participación de receptores del tipo AMPA sobre el desarrollo radical bajo la presencia de su propio agonista AMPA, así como de un antagonista competitivo específico de estos receptores, DNQX, ambos a una dosis de 0.5 mM.

Los experimentos de dosis respuesta únicamente fueron realizados con NMDA y AP-5. Los experimentos basados en NMDA incluyeron, igual que en el de curso temporal, cuatro tratamientos, cada uno a diferentes concentraciones; un tratamiento testigo conteniendo únicamente medio basal NO; NMDA a 250, 500 y 1000 mM, Gly a esas mismas concentraciones y por último un tratamiento que incluye la adición de ambos compuestos, NMDA 250 mM + Gly 250 mM, NMDA 500 mM + Gly 500 mM y NMDA 1000 mM + Gly 1000 mM. Para el AP-5, se probaron las concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu$ M.

### **2.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias fueron comparadas por la prueba de *Tukey* ( $P \leq 0.05$  o  $P \leq 0.001$ ), utilizando el paquete estadístico SIGMA STAT v.12.

## **2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO RADICAL EN *C. annuum* EN CONDICIONES *IN VITRO***

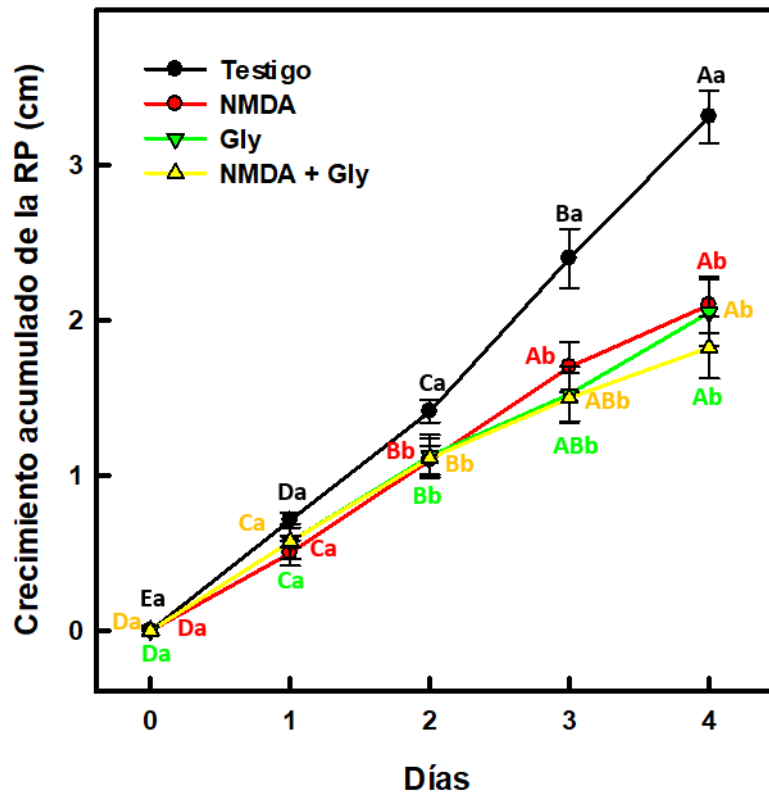
#### **2.2.1.1. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA RP**

Para estudiar el papel de un GLR del tipo NMDA sobre el crecimiento de la RP de chile serrano, el experimento se desarrolló en el modelo de las cajas segmentadas, e inicialmente se usó una concentración de 1 mM de los agonistas NMDA y Gly, por separado y en mezclas. El crecimiento de la RP fue evaluado diariamente.

En la Figura 2.2 se observa el crecimiento de la RP hasta las 96 h de tratamiento con estos fármacos. Cuando se evaluó el efecto de los agonistas sobre el tiempo, no se observaron diferencias en el crecimiento de la RP entre las plántulas testigos y tratadas durante los primeros dos días de exposición (Figura 2.2). Sin embargo, después de este tiempo, se observó un efecto inhibitorio en las plántulas tratadas con los fármacos, con



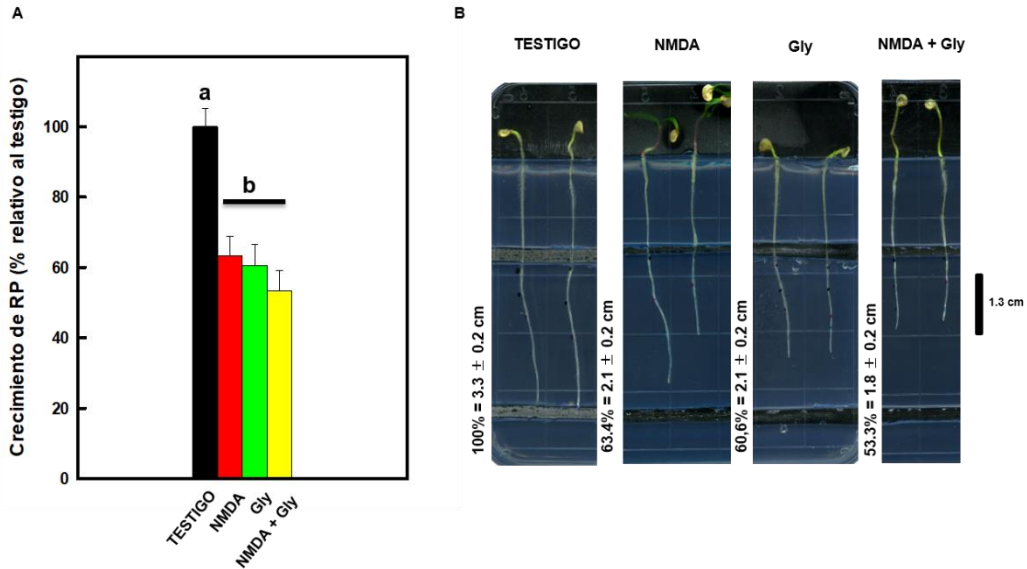
respecto al testigo. Esta diferencia se presentó más marcada al cuarto día, donde el crecimiento de la RP de las plántulas tratadas con NMDA, Gly y NMDA + Gly fue menor que el testigo ( $3.3 \pm 0.2$  cm), respectivamente.



**Figura 2.2.** Efecto de los agonistas (NMDA y Gly) de los GLR tipo NMDA, sobre el crecimiento acumulado de la RP de chile serrano. En este experimento, se usó una dosis de 1 mM de cada agonista, por separado o una mezcla de éstos. Los valores representan la media  $\pm$  ES ( $n = 18$  plántulas). Letras mayúsculas y minúsculas diferentes representan diferencia significativa (Tukey's,  $P \leq 0.05$ ) dentro de un mismo tratamiento por día o entre tratamientos en un mismo día, respectivamente.

El crecimiento acumulado de la RP al cuarto día fue de  $2.1 \pm 0.2$ ,  $2.1 \pm 0.2$  y  $1.8 \pm 0.2$  cm, para las plántulas sometidas a los tratamientos de NMDA, Gly y NMDA + Gly, respectivamente. Estos valores correspondieron a un 63.4, 60.6 y 53.3 % con respecto al crecimiento que tuvieron las raíces testigos ( $3.3 \pm 0.2$  cm) (Figura 2.3). Aunque se observó un crecimiento ligeramente menor en el tratamiento que contenía la mezcla, con respecto a los tratamientos individuales, estos valores no fueron estadísticamente diferentes. Como se puede observar en la Figura 2.3B, al cuarto día, todas las raíces se

encontraban aún dentro del segmento medio, donde estaban expuestas a los tratamientos.



**Figura 2.3.** Efecto de los agonistas (NMDA y Gly) de los GLR tipo NMDA, sobre el crecimiento acumulado de la RP al cuarto día de tratamiento. El experimento fue desarrollado en condiciones similares al de la Figura 2.2. A) Los datos del crecimiento acumulado al cuarto día se presentan en porcentajes de crecimiento con respecto al testigo creciendo en ausencia de los fármacos (100 % = 3.3 ± 0.2 cm). B) Cambios morfológicos en la RP. La fotografía muestra una imagen representativa de dos plantas (n=6 plántulas) por caja (n=3-4 cajas). Los valores representan la media ± ES, n = 18-24 plántulas. Letras diferentes en A) representan diferencia significativa (Tukey's,  $P \leq 0.05$ ).

En trabajos previos, en donde las plantas fueron expuestas a la presencia exógena de Gly, se observó que este aminoácido inhibió el crecimiento de la RP en una solanácea igual que *C. annuum*, chile habanero. Esta inhibición fue inducida por una disminución en el tamaño de las células (Dominguez-May *et al.*, 2013).

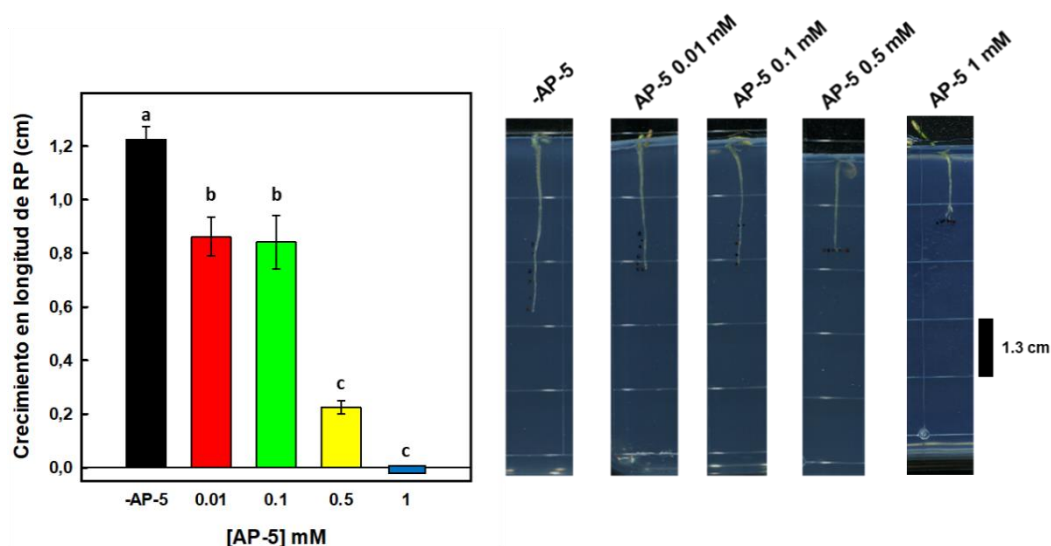
Existe en la literatura un número reducido de trabajos que describen cambios morfológicos inducidos por la aplicación de NMDA en plantas, o incluso AMPA y KA. Uno de ellos, fue apenas publicado el año pasado. Dicho fármaco estimuló el crecimiento de la RP en *Arabidopsis* (Singh y Chang, 2018). Estos resultados son contradictorios a los observados en este proyecto, aunque ambos fueron desarrollados bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, ambas especies pertenecen a familias de plantas

diferentes y los autores no discuten a detalle cómo desarrollaron el experimento y el porqué de este comportamiento en su especie modelo.

El NMDA se une al sitio de unión del L-Glu en los GLR. Es importante señalar que el L-Glu, inhibe drásticamente el crecimiento de la RP en *Arabidopsis*, al disminuir la actividad mitótica en el meristemo apical (Walch-Liu *et al.*, 2006; Forde *et al.*, 2013). Sin embargo, este aminoácido no provocó cambios significativos en el crecimiento de la RP en chile habanero (Dominguez-May *et al.*, 2013), lo cual hace sugerir que existen diferencias importantes en los componentes de la familia de GLR entre estas especies.

Para este estudio, también se usó el AP-5. En este experimento, las raíces fueron incubadas a diferentes dosis de este compuesto, y colocadas posteriormente en las cajas de Petri para el crecimiento de las plántulas, en ausencia del fármaco (modelo de pre-incubación). El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de bloquear los receptores presentes en la membrana plasmática de las células de la raíz.

El AP-5 inhibió el crecimiento de la RP de chile serrano de una manera dependiente de la dosis. Al quinto día de tratamiento, se obtuvo un crecimiento de la RP correspondiendo a  $0.86 \pm 0.07$ ,  $0.84 \pm 0.09$  y  $0.23 \pm 0.03$  cm para las dosis de 0.01, 0.1 y 0.5 mM, respectivamente; estos valores fueron significativamente menores a los presentados por el tratamiento testigo ( $1.23 \pm 0.04$  cm). Una dosis de 1 mM inhibió completamente el crecimiento de la RP (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Efecto de la curva dosis-respuesta del AP-5 sobre el crecimiento de la RP de chile serrano. Las concentraciones de AP-5 usadas fueron 0.01, 0.1, 0.5 y 1 mM. Los valores representan la media  $\pm$  ES, (n = 18-24) plántulas del crecimiento

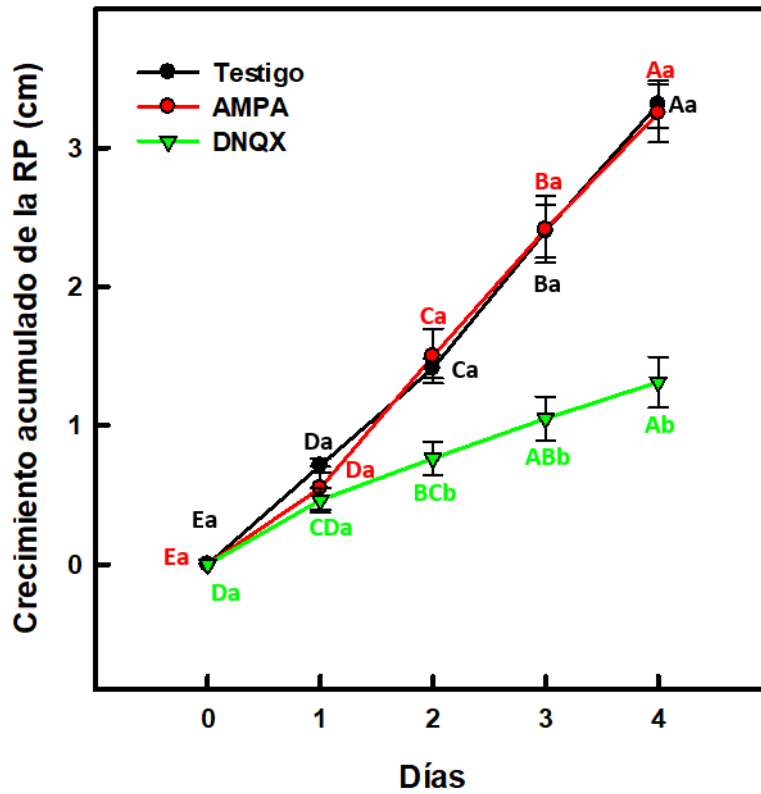
acumulado al quinto día de tratamiento. Letras diferentes representan diferencia significativa basada en la prueba de Tukey's,  $P \leq 0.05$ . Las fotos muestran una imagen representativa de una plántula por tratamiento.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por otro grupo de trabajo, donde la aplicación de AP-5 a plántulas de *Arabidopsis* no afecta el crecimiento de la RP (Walchliu y Forde, 2007).

El AP-5, como se describió anteriormente, es un antagonista que en animales se une al mismo sitio que el L-Glu (o NMDA) en los receptores del tipo NMDA. Dado esto, es de esperarse que su comportamiento sea antagónico al ocasionado por NMDA. Es decir, se esperaba que AP-5 estimulara el crecimiento de la RP, pero no fue así, puesto que ambos, agonista y antagonista inhibieron a la RP de *C. annuum*. Este resultado sugiere, que, en el caso de chile, podrían tratarse de GLRs diferentes a los de mamíferos, o quizás el sitio de L-Glu en el receptor no es específico para AP-5, pudiendo este último unirse a otro receptor y por tanto desencadenar la misma respuesta.

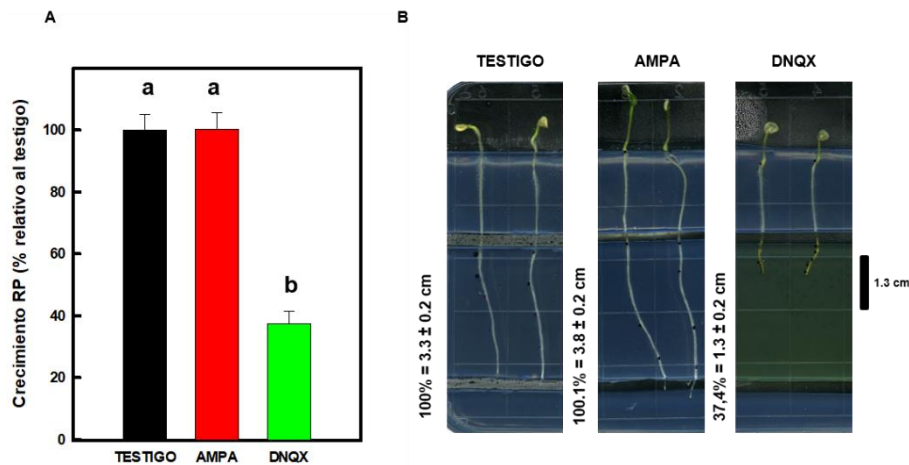
Además de los fármacos específicos para el receptor NMDA, se realizaron ensayos con un agonista (AMPA) y un antagonista (DNQX) de los receptores AMPA, ambos a una dosis única de 0.05 mM. Este experimento se desarrolló en las cajas segmentadas, similar al de NMDA.

El crecimiento de la RP de las plántulas tratadas con AMPA fue similar al testigo. En cambio, el antagonista DNQX inhibió significativamente el crecimiento a partir del segundo día (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Efecto de AMPA y DNQX sobre el crecimiento acumulado diario de la RP. Los valores representan la media  $\pm$  ES ( $n = 18$  plántulas). Letras mayúsculas y minúsculas diferentes representan diferencia significativa (Tukey's,  $P \leq 0.05$ ) dentro de un mismo tratamiento por día o entre tratamientos, en un mismo día, respectivamente.

Cuando el crecimiento acumulado fue evaluado al cuarto día, no se logró observar cambios significativos en el mismo con el tratamiento con AMPA, mientras que DNQX inhibió en un 62.6% el crecimiento de la raíz (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Efecto de AMPA y DNQX sobre el crecimiento de la RP. A) Crecimiento acumulado de RP hasta el cuarto día de tratamiento con AMPA y DNQX. Los datos se presentan en porcentaje de crecimiento con respecto al testigo (100 % correspondió a  $3.3 \pm 0.2$  cm). Los valores representan la media  $\pm$  ES,  $n = 18-24$  plántulas. Letras diferentes representan diferencia significativa basada en la prueba de Tukey's,  $P \leq 0.05$  en relación con el testigo. B) Efecto morfológico de las raíces al cuarto día de tratamiento.

El AMPA también estimuló ligeramente el crecimiento de la RP de *Arabidopsis* (Singh y Chang, 2018), mientras que el DNQX inhibió su crecimiento (Walch-Liu y Forde, 2007). DNQX es un antagonista competitivo de los GLR de animales, lo que significa que se une al mismo sitio que L-Glu (o AMPA) en los iGluRs del tipo AMPA, por tanto, al igual que en el ejemplo anterior se esperaba un efecto antagónico entre ambos.

A diferencia de AP-5 con NMDA, los resultados obtenidos con AMPA y DNQX sugieren que existen GLRs similares, en cuanto a su funcionamiento, a los de mamíferos, que son compatibles con AMPA y DNQX puesto que el primero estimula el crecimiento de la RP, mientras que el segundo la inhibe.

### 2.2.1.2. EFECTOS SOBRE LA FORMACIÓN DE ÓRGANOS LATERALES

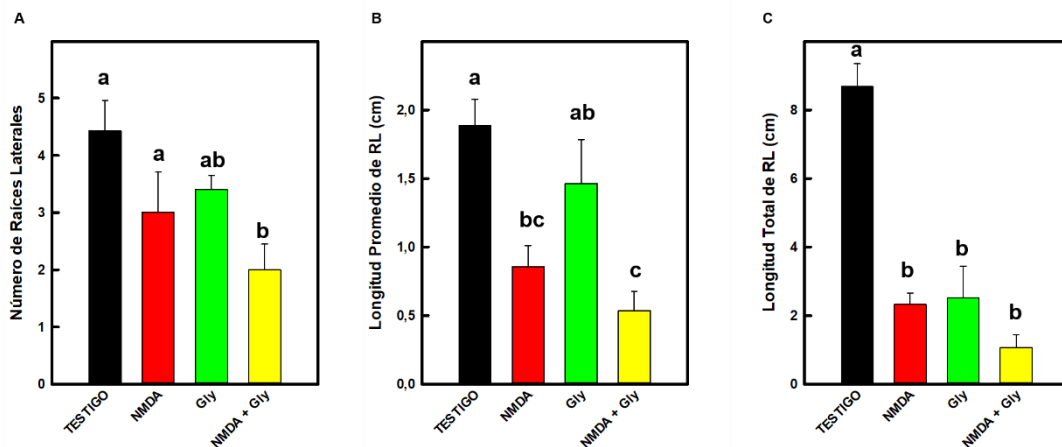
La formación de RL es un determinante primordial en la arquitectura radical y ésta impacta en la toma eficiente de agua, así como la adquisición de nutrientes. La formación de RL depende de eventos moleculares y celulares específicos que se llevan a cabo en la zona más diferenciada de la RP. Estas raíces se originan a partir de las células del periciclo, en donde se forman los primordios de RL (PRL). En este evento intervienen las hormonas (Ej. Auxinas) y diversos factores de transcripción (Ej. LBD16

y LBD18) (Rybel *et al.*, 2009). A su vez, el desarrollo y la emergencia de los PRL, así como el crecimiento de las RL son procesos regulados por eventos y moléculas diferentes. En este trabajo se evaluaron la formación (número de RL, NRL) y el crecimiento (en longitud) de las RL en respuesta a los fármacos.

Tanto el NMDA como la Gly no inhibieron significativamente el NRL, mientras que la mezcla de ambos fármacos lo hizo en un 54 % ( $2.0 \pm 0.4$ ,  $P \leq 0.05$ ), con respecto al testigo ( $4.4 \pm 0.5$ ,  $P \leq 0.05$ ) (Figura 2.7.).

Una planta puede tener un número reducido de RL, pero puede presentar una mayor elongación de éstas, este parámetro se mide a través de la longitud promedio de RL (LPRL). La presencia de NMDA y Gly por separado inhibieron este parámetro (55 % =  $0.86 \pm 0.2$  cm, 23 % =  $1.46 \pm 0.3$  cm, respectivamente), mientras que el tratamiento conjunto NMDA + Gly inhibió en mayor porcentaje el crecimiento de las mismas (71 % =  $0.54 \pm 0.1$  cm,  $P \leq 0.05$ ), en comparación con el testigo (100 % =  $1.88 \pm 0.2$  cm;  $P \leq 0.05$ ).

A su vez, la longitud total de RL (LTRL) está determinada por el NRL y la LPRL. Este parámetro es importante pues representa el área superficial a la que tiene acceso las raíces de las plantas para absorber agua y nutrientes. NMDA y Gly inhibieron significativamente la LPRL, comparadas con el testigo (100 % =  $8.68 \pm 0.7$  cm;  $P \leq 0.05$ ); NMDA lo redujo en un 73 % ( $2.33 \pm 0.3$  cm;  $P \leq 0.05$ ), y Gly un 71 % ( $2.53 \pm 0.9$  cm;  $P \leq 0.05$ ), y el conjunto de ambos en un 88 % ( $1.08 \pm 0.4$  cm;  $P \leq 0.05$ ).



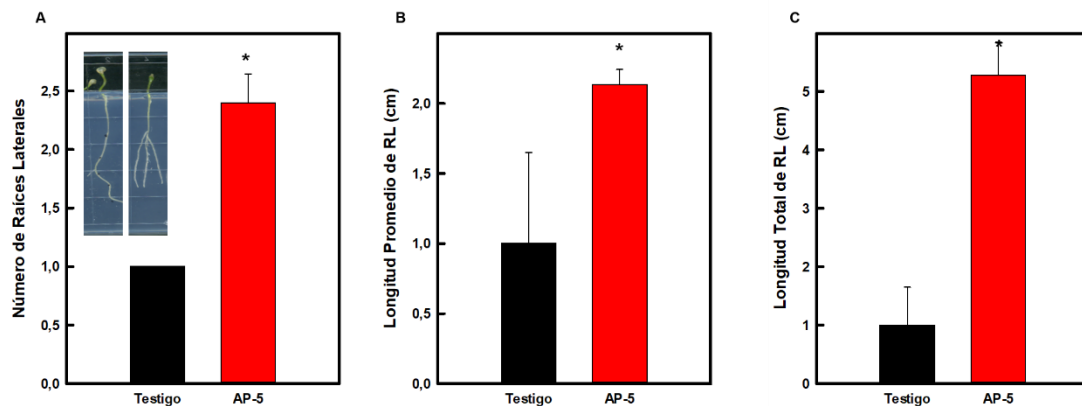
**Figura 2.7.** Efecto de los agonistas de los GLR del tipo NMDA sobre la formación y crecimiento de RL. En este experimento se utilizaron tres diferentes tratamientos (1 mM NMDA, 1 mM Gly y 1 mM NMDA + Gly). A) Número de RLs. B) Longitud promedio de RL y C) Longitud total de RL al décimo día de tratamiento. Los valores

representan la media  $\pm$  ES,  $n = 18-24$  plántulas. Letras diferentes representan diferencia significativa (Prueba de Tukey's,  $P \leq 0.05$ ).

Nuevamente, este resultado fue contradictorio al observado para *Arabidopsis* (Singh y Chang, 2018).

Por otro lado, la aplicación de 1 mM de AP-5, favoreció la formación de RL ( $2.4 \pm 0.2$ ;  $P \leq 0.05$ ) en comparación con el testigo ( $1.0 \pm 0.0$ ;  $P \leq 0.05$ ) (Figura 2.8).

AP-5 también favorece el crecimiento en longitud promedio ( $2.1 \pm 0.1$  cm;  $P \leq 0.05$ ) y en longitud total ( $5.28 \pm 0.6$  cm;  $P \leq 0.05$ ) en comparación con el testigo ( $1.00 \pm 0.7$  cm;  $P \leq 0.05$ ) y ( $1.00 \pm 0.7$  cm;  $P \leq 0.05$ ), respectivamente (Figura 2.8).



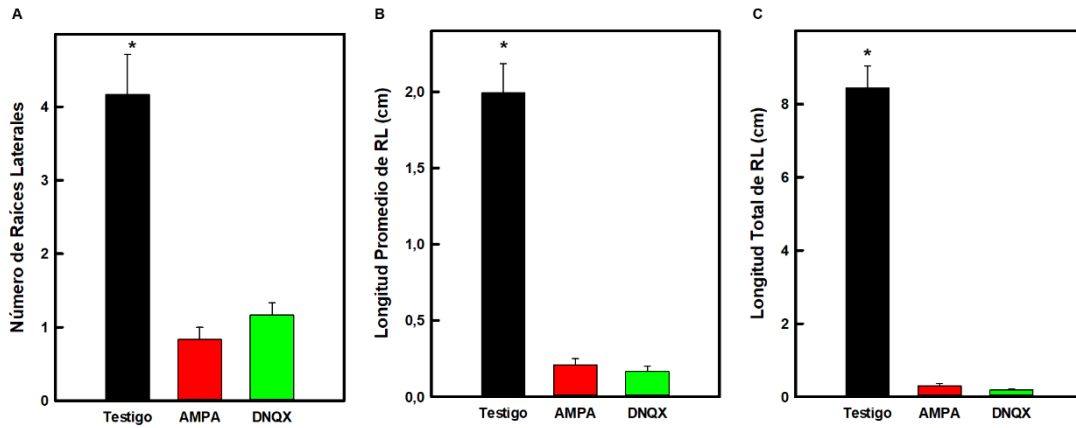
**Figura 2.8.** Efecto de AP-5 1 mM sobre la formación y desarrollo de RL al día 10 de exposición. Los valores representan la media  $\pm$  ES,  $n = 18-24$  plántulas. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto al testigo (Prueba de Tukey's,  $P \leq 0.05$ ).

Como se demostró, NMDA y AP-5 provocaron un claro efecto antagónico sobre la formación y crecimiento de RL en chile habanero. Estos resultados sugieren que receptores GLR del tipo NMDA están regulando estos eventos en chile y que este tipo de proteínas tiene conservados los sitios de unión a ambos fármacos. Esta sugerencia no puede ser hecha para aquellos que participan en el crecimiento de la RP en esta especie.

El efecto de AMPA y DNQX sobre la formación y crecimiento de RL también fue evaluado. AMPA inhibió la formación de RL ( $0.83 \pm 0.2$ ;  $P \leq 0.05$ ), la LPRL ( $0.21 \pm 0.04$  cm;  $P \leq 0.05$ ) y la LTRL ( $0.3 \pm 0.06$  cm;  $P \leq 0.05$ ), con respecto al testigo ( $4.17 \pm 0.5$  cm;



$P \leq 0.05$ ),  $(1.99 \pm 0.2 \text{ cm}; P \leq 0.05)$  y  $(8.43 \pm 0.6 \text{ cm}; P \leq 0.05)$ , respectivamente. El mismo efecto fue observado con DNQX. Este último inhibió el NRL ( $1.17 \pm 0.2 \text{ cm}; P \leq 0.05$ ), la LPRL ( $0.17 \pm 0.03 \text{ cm}; P \leq 0.05$ ) y la longitud total de las mismas ( $0.18 \pm 0.03 \text{ cm}; P \leq 0.05$ ) (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Efecto de AMPA y DNQX sobre la formación y crecimiento de raíces laterales al día 10 de exposición. Los valores representan la media  $\pm$  ES,  $n = 18-24$  plántulas. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto al testigo (Prueba de Tukey's,  $P \leq 0.05$ ).

En resumen, el efecto antagónico entre el agonista y el antagonista no fue observado en este caso. Este resultado sugiere que la participación de un receptor del tipo AMPA en el crecimiento y desarrollo de RL no es clara.

En *Arabidopsis*, mutantes *glr3.2* y *glr3.4* produjeron dos veces más PRLs que la planta silvestre, y se demostró que afecta el desarrollo de RLs por señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el floema (Vincil *et al.*, 2013).

## CAPÍTULO 3

### ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS GLRS EN *C. annuum*

#### INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas se han descubierto diversos genes que codifican proteínas GLRs en organismos que carecen de SNC, como en invertebrados (Ultsch *et al.*, 1993; Maricq *et al.*, 1995), en plantas (Chiu *et al.*, 1999; Aouini *et al.*, 2012; Weiland *et al.*, 2016) y cianobacterias (Chen *et al.*, 1999).

El primer trabajo en sugerir que las plantas contienen GLRs fue el de Lam *et al.*, (1998). Estos autores descubrieron en el genoma de *A. thaliana* 20 secuencias homólogas a los iGluRs de mamíferos, las cuales fueron agrupadas en tres diferentes clados. Estas secuencias conservan los dominios característicos de la familia de proteínas de los iGluRs, que son cuatro dominios transmembranales (M1-M4) y dos dominios de unión al ligando (S1-S2) (Chiu *et al.*, 2002).

Varios estudios realizados hasta la fecha comprueban la existencia de estas proteínas en diferentes especies de plantas, además de *Arabidopsis*. Tal es el caso del descubrimiento de 24 genes en *O. sativa* (OsGLR). En un trabajo inicial, se descubrió que OsGLR3.1 está estrechamente relacionado con los GLRs del clado III de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006). Más tarde, Singh *et al.*, (2014) identificaron los otros 23 genes en *Oryza*, aparte del identificado por el grupo de Li (2006). Mediante un análisis bioinformático, estos autores clasificaron a los genes de acuerdo a los clados antes caracterizados para *Arabidopsis*. Ellos detectaron la aparición de un nuevo clado, que no era compartido por *Arabidopsis*, al cual lo nombraron clado IV. Éste estaba conformado por nueve OsGLRs. Estos autores sugieren que posiblemente esos genes divergieron de su origen común y más tarde se expandieron en un solo grupo a través de la duplicación cromosómica, ya que ocho de los nueve miembros de este grupo están en duplicación en tándem (Singh *et al.*, 2014).

En 2012, se identificaron 13 secuencias de GLRs en el genoma de *S. lycopersicum* (SIGLR) (Aouini *et al.*, 2012). Estas secuencias presentaron una serie de dominios similares a los AtGLR. Las 13 secuencias se ubicaron en los seis diferentes cromosomas de tomate; cinco genes que pertenecieron al clado II se encontraron en tándem en el cromosoma seis, mientras que SIGLR2.6 fue el único de ese clado que se ubicó en el cromosoma ocho. Este análisis sugirió que este gen es uno ancestral del

clado II, mientras que el resto de este clado son productos de duplicación de genes. También, se ha identificado una secuencia con similitud a GLR en *R. sativus* pero su función aún no ha sido comprobada (Kang *et al.*, 2006).

Se sugiere que la estructura del complejo receptor funcional de las plantas esté formada por cuatro subunidades independientes (Price *et al.*, 2012; Roy y Mukherjee, 2016; Turano *et al.*, 2002; Vincill *et al.*, 2013), pudiendo ser homo o heterotetrámero. No obstante, hasta el momento no se ha podido aislar este complejo a partir de algún tejido vegetal y sus componentes no han sido identificados.

Con base a los resultados obtenidos en el anterior capítulo, se sugiere la participación de GLRs en la modificación de la arquitectura radicular de chile serrano en presencia de aminoácidos y fármacos de los iGluRs en mamíferos. Por ello, llevar a cabo un análisis *in silico* de la presencia de GLRs en esta especie brindaría un acercamiento predictivo de los posibles comportamientos y funciones de estas proteínas.

En este capítulo se abordó la posible existencia de genes *GLRs* en el genoma de *C. annuum*, encontrándose 12 secuencias que codifican para estas proteínas. El chile serrano pertenece a la familia de las solanáceas y particularmente dentro del género *Capsicum* no se ha reportado hasta el momento genes para esta familia de proteínas.

### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.1. BÚSQUEDA EN LA BASE DE DATOS DE GENES DE *GLR* DE *C. annuum*, RECUPERACIÓN DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para identificar genes *GLR* putativos en *C. annuum* se usaron como consulta los genes *GLR* de *S. lycopersicum* (SIGLR) (Anexo I) previamente reportados (Aouini *et al.*, 2012), los cuales fueron recuperados de National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se realizó una búsqueda tipo BLASTN en la base de datos de Sol Genomics Network (SGN, <https://solgenomics.net/>) en el genoma de Pepper Genome y en la base de datos de Pepper Genome (versión 2.0, <http://peppersequence.genomics.cn/page/species/index.jsp>) para verificar que las secuencias fueran iguales. En ambos casos se usaron los parámetros predeterminados por los programas.

Para llevar a cabo el análisis filogenético se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de aminoácidos que presentaban una longitud completa, usando el programa ClustalW MEGA 6.0. Los alineamientos incluyeron las secuencias de aminoácidos encontradas para *C. annuum* (12), y las de otras cuatro especies que han sido previamente caracterizadas: 13 secuencias de *S. lycopersicum* (SIGLR) (Aouini *et al.*, 2012), 20 secuencias de *A. thaliana* (AtGLR) recuperadas de Arabidopsis Information Resource (TAIR, <https://www.Arabidopsis.org/>) (Lam *et al.*, 1998), 24 secuencias de *O. sativa* (OsGLR) de Rice Genome Annotation Project (RGAP, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>) (Li *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2014), una única secuencia de *R. sativus* (RsGLR) recuperada de (NCBI, [National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) (Kang *et al.*, 2006) (Anexo I). Como secuencias externas, se usaron el GLR de la cianobacteria *Synechocystis* sp. (SynGluR0, número de acceso: BAA17851) y la proteína de unión a los aminoácidos periplásmicos bacterianos GlnH (EcolignH, número de acceso: X14180). El árbol filogenético se construyó usando el método de Neighbour-Joining (NJ), utilizando el modelo de p-distance con pairwise deletion y los valores Bootstrap fueron obtenidos a partir de 1000 réplicas corridas.

### 3.1.2. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS GENES DE *CaGLRs*

Las regiones transmembranales se predijeron mediante el uso del programa bioinformático TMPred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) (Hofmann y Stoffel, 1993). Para la detección de la presencia de dominios conservados en las proteínas se realizó un DeltaBlast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La localización en el cromosoma de los *CaGLRs* se obtuvo de la base de datos de SGN, en el genoma de Pepper Genome.

La predicción de las posibles proteínas que pudieran estar interaccionando con los *CaGLRs* se realizó con la herramienta bioinformática STRING (versión 10.0, <http://string-db.org/>).

Para conocer la localización subcelular putativa de estas proteínas se usaron varias herramientas bioinformáticas como Bacello (<http://qpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>), YLoc (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), Cell-Ploc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>), EuLoC (<http://euloc.mbc.nctu.edu.tw/>), PSI (<http://bis.zju.edu.cn/psi/>) y Euk-mPloc 2.0

(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>).

### 3.1.3. REGIÓN PARA EL DISEÑO DE CEBADORES

Con las regiones transmembranales que arrojó el programa bioinformático de TMPred, así como las posiciones de cada región, se procedió a realizar el diseño de cebadores para posteriores análisis. De esta forma, la región que se escogió para el diseño de los cebadores fue la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio extracelular S2; es decir, el dominio localizado entre los dominios transmembranales M3 y M4. Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa Oligo.

## 3.2. RESULTADOS

### 3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE *GLRs* EN *C. annuum*

Para identificar *GLRs* en *C. annuum* se realizó una búsqueda en la base de datos de Sol Genomic Network en el genoma de Pepper Genome y en la base de datos de Pepper Genome usando a los genes de *SIGLRs*, previamente reportados. Los 13 genes *SIGLRs* (Aouini *et al.* 2012) fueron introducidos individualmente en ambas bases de datos y se realizó un BLASTN. Las secuencias con mayor similitud fueron seleccionadas como posibles candidatos. De este estudio, se obtuvieron 14 secuencias de *CaGLRs*, siendo identificadas 12 secuencias con longitud completa (Cuadro 3.1), y dos más que estaban incompletas (CA06g15740 y CA0615720, no mostradas). Para todos los análisis posteriores se seleccionaron únicamente las 12 secuencias completas encontradas.

### 3.2.2. FILOGENIA DE LOS *CaGLRs*

Se realizó un análisis filogenético para analizar la relación que guardan entre sí las familias de *SIGLR*, *AtGLR*, *RsGLR*, *OsGLR* y la de *CaGLR*. A partir de estos resultados, se le asignó una nomenclatura a los *CaGLRs* (Cuadro 3.1), de acuerdo con su mayor identidad con los *GLRs* de tomate, la especie más cercana a *Capsicum*. Como se observa en el análisis filogenético, los *CaGLRs* se clasificaron en tres clados. Los tres clados mostraron homología con las demás especies diferentes y únicamente *Oriza sativa* presentó un clado adicional, el IV, el cual se separó de resto de los *GLRs*

identificados en planta.

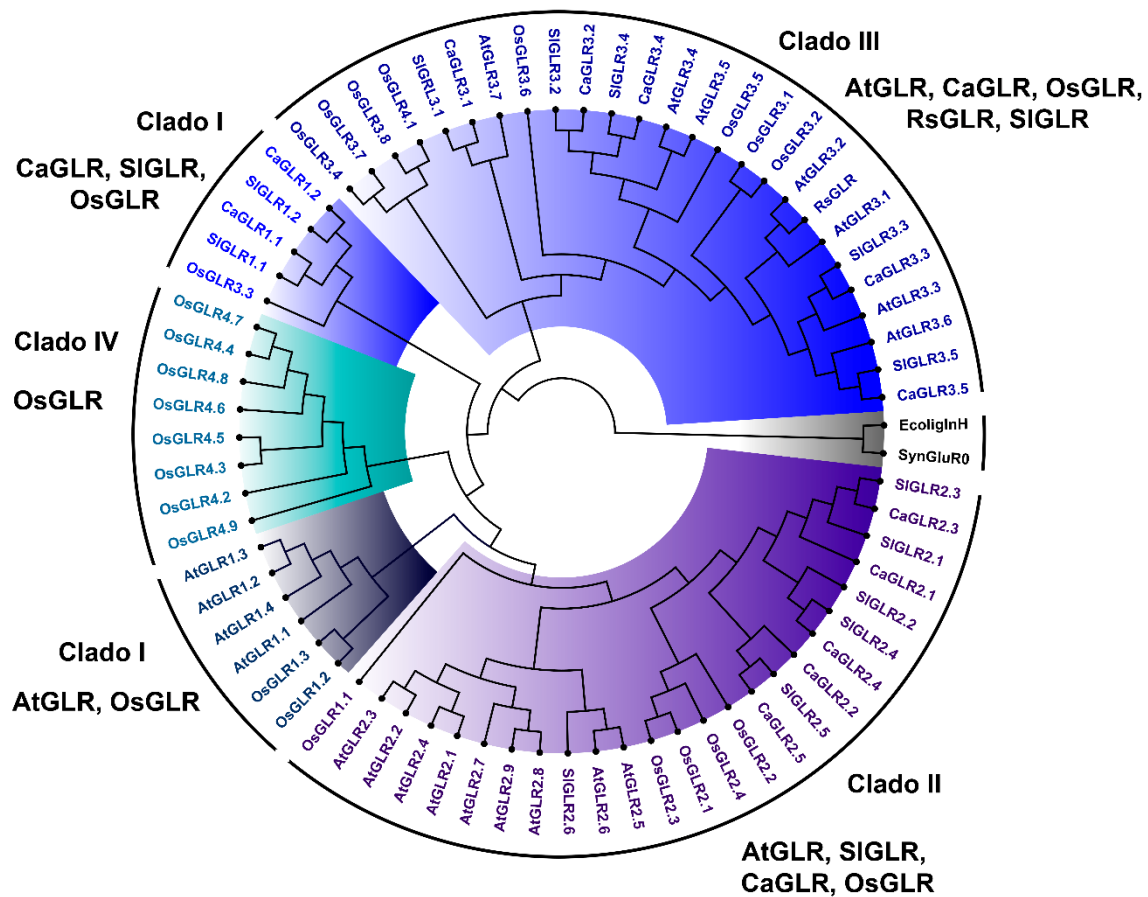
**Cuadro 3.1.** Receptores de glutamato de *C. annuum* (CaGLRs).

Gene	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

El Clado I es compartido por las proteínas de *O. sativa* y *A. thaliana*, sugiriendo que las mismas pueden ser muy similares para estas dos especies vegetales. Sin embargo, en este clado no se encontraron miembros pertenecientes a las solanáceas (*S. lycopersicum* y *C. annuum*). Las proteínas de las solanáceas fueron agrupadas en un Clado aparte, el cual también fue nombrado I, siguiendo la nomenclatura reportada por Aouini *et al.*, (2012) para las de *S. lycopersicum*. En este clado I de las solanáceas también se agrupó la proteína de arroz OsGLR3.3 (Figura 3.1).

El Clado II tiene una rama que incluye a toda la Familia II de *Arabidopsis* (*AtGLR2.1-2.9*) y a un único miembro de tomate (*SIGLR2.6*), mientras que los otros miembros se ubicaron en un brazo cercano a este clado. En este brazo se ubicaron, por un lado, todos los miembros de chile serrano y el resto de los de tomate, y muy cercano los del clado II de arroz. Los resultados de este clado indican que las proteínas de las solanáceas, excepto *SIGLR2.6*, se encuentran más cercanas a las de las monocotiledóneas como arroz, mientras que las de *Arabidopsis* fueron más distantes a éstas, evolutivamente

En relación con el clado III, se observó que es compartido entre todas las especies (*S. lycopersicum*, *O. sativa*, *C. annuum*, *R. sativus* y *A. thaliana*).

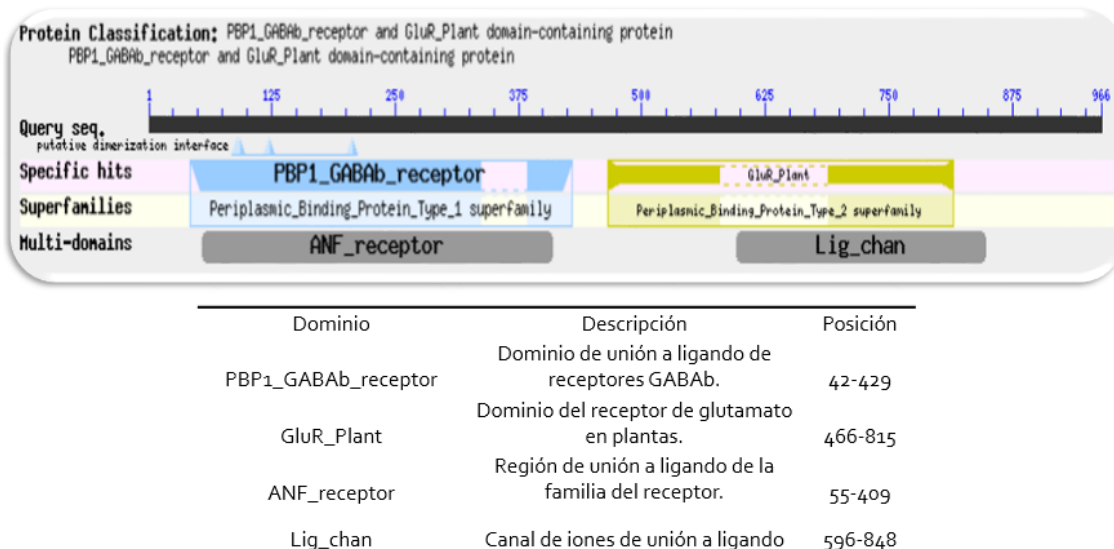


**Figura 3.1.** Árbol filogenético basado en los alineamientos a partir de las secuencias de aminoácidos de cinco diferentes especies: 20 *AtGLRs* de *A. thaliana*, 13 *SIGLRs* de *S. lycopersicum*, 24 *OsGLRs* de *O. sativa*, 1 *RsGLRs* de *R. sativus* y 12 *CaGLRs* de *C. annuum*. El análisis se realizó utilizando MEGA6. Un receptor de glutamato de la cianobacteria *Synechocystis* sp. (*SynGluR0*) y una proteína de unión a aminoácidos periplásmicos bacterianos *GlnH* (*EcoligInH*) se incluyeron como

grupos externo. El árbol se construyó usando el método de Neighbour-Joining (NJ), empleando el modelo de p-distance con pairwise deletion y los valores Bootstrap fueron obtenidos a partir de 1000 réplicas corridas.

### 3.2.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS CaGLRs

Se determinaron los dominios estructurales presentes en los CaGLR con la herramienta en línea de DeltaBlast. Los dominios que estuvieron presentes en todos los CaGLRs fueron: PBP1\_GABAb\_receptor (dominio de unión a ligando de receptores GABAb), GluR\_Plant (dominio del receptor de glutamato en plantas) y ANF\_receptor (dominio extracelular de unión a ligando). También, un cuarto dominio estuvo presente en todos los CaGLRs, que fue el Lig\_chan (Canal de iones de unión al ligando) (Figura 3.2). Se hizo una revisión de los dominios conservados en *Arabidopsis* y en *C. annuum* y los tres principales dominios igual están presentes en ambas especies.

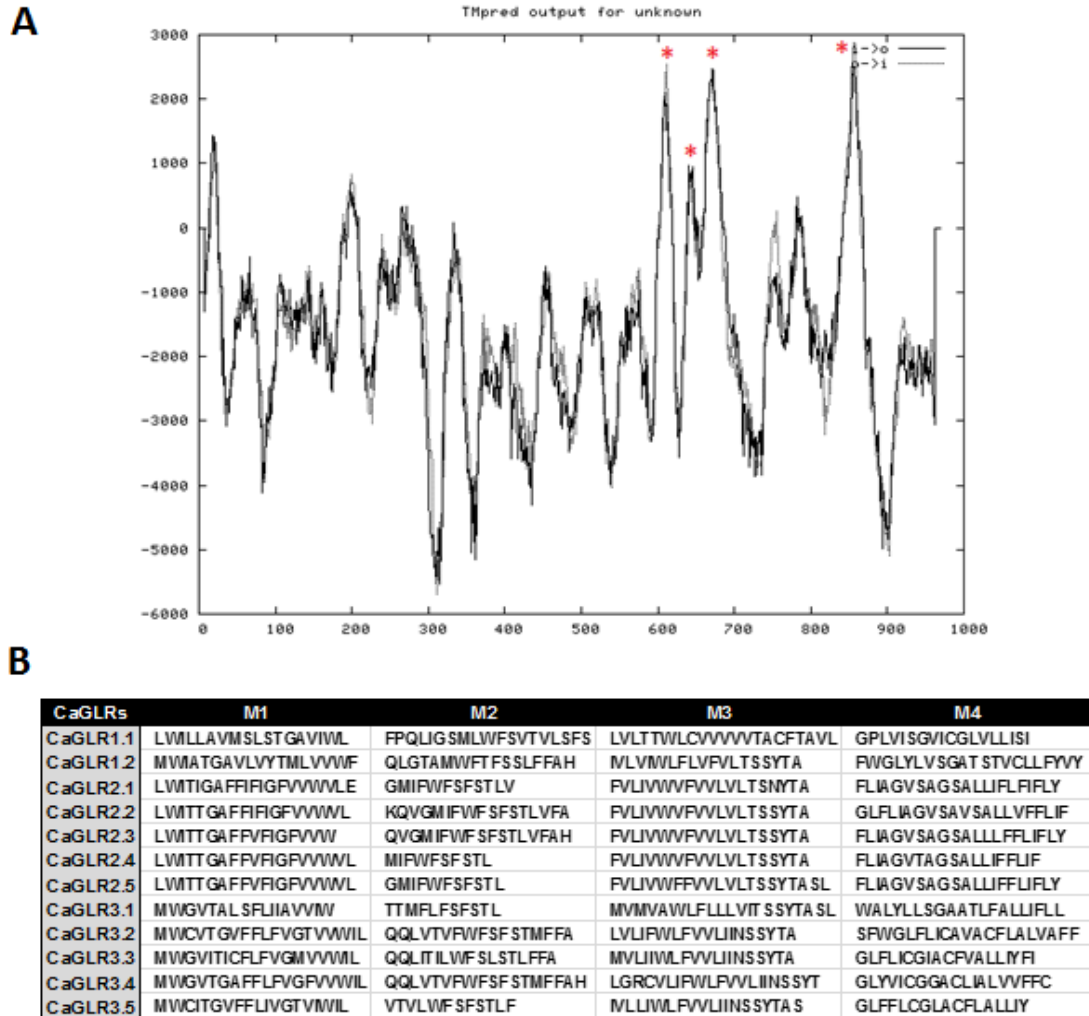


**Figura 3.2.** Dominios conservados en las secuencias de aminoácidos de CaGLR. Los dominios que se repitieron para los 12 CaGLRs fueron cuatro, un dominio de unión a ligando a receptores GABA (PBP1\_GABAb\_receptor), un dominio de receptor de glutamato en plantas (GluR\_Plant), otro dominio de unión a ligando de la familia del receptor (ANF\_receptor) y, por último, el dominio de unión al ligando (Lig\_chan). La parte superior de la figura muestra como ejemplo el resultado para la proteína CaGLR2.3.

En cuanto al perfil de hidrofobicidad, los resultados indican la presencia de cuatro regiones transmembranales en los 12 CaGLRs (Figura 3.3) por lo que a modo de ejemplo únicamente se presenta el resultado del CaGLR2.3. Las regiones hidrofóbicas



se encuentran por arriba del valor de cero y las cuatro regiones transmembranales están en orden (M1-M4) indicadas con asteriscos rojos, correspondiendo a las posiciones: M1 (597-613), M2 (630-646), M3 (657-675) y M4 (843-863) que se predijeron con los programas bioinformáticos (Figura 3.3a). Las secuencias deducidas de aminoácidos de cada una de las regiones transmembranales se presentan en la Figura 3.3b.

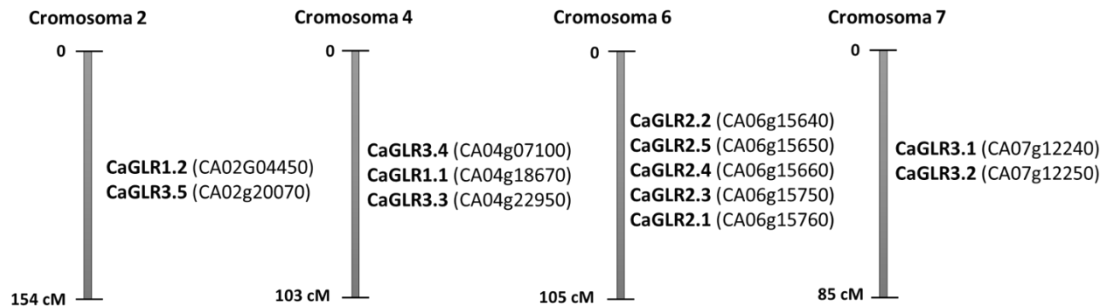


**Figura 3.3.** Organización de los dominios transmembranales de CaGLR basada en el análisis con TMPred. A) Perfil de hidrofobicidad de CaGLR2.3, como ejemplo. B) Secuencias de aminoácidos de las cuatro regiones transmembranales de los GLRs de *C. annuum* predichas por el programa. M1-M4: Regiones transmembranales. Los asteriscos en A representan las cuatro regiones transmembranales.

### 3.2.4. LOCALIZACIÓN EN EL CROMOSOMA

Los genes *CaGLR1.2* y *CaGLR3.5* se ubicaron en el cromosoma dos, los genes

*CaGLR1.1*, *CaGLR3.3* y *CaGLR3.4* en el cromosoma cuatro, los genes *CaGLR2.1-2.5* en el cromosoma seis y, por último, los genes *CaGLR3.1* y *3.2* se localizaron en el cromosoma siete (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Mapa de la posición de los CaGLRs en los cromosomas de *C. annuum*. Los 12 genes están repartidos en los diferentes cromosomas de esta especie. Las barras verticales indican los cromosomas y su posición está dada en centimorgan (cM).

Este análisis pudiera sugerir que aquellos genes que se encuentran ubicados de manera cercana en un mismo cromosoma podrían ser genes cuya expresión puede ocurrir bajo una misma condición, pero no así los que se encuentran en cromosomas diferentes como *CaGLR3.4* y *CaGLR 3.5*. Además, la familia del Clado III está repartido en tres cromosomas y eso puede dar una enorme versatilidad funcional.

### 3.2.5. POSIBLES INTERACCIONES DE LOS CaGLR CON OTRAS PROTEÍNAS

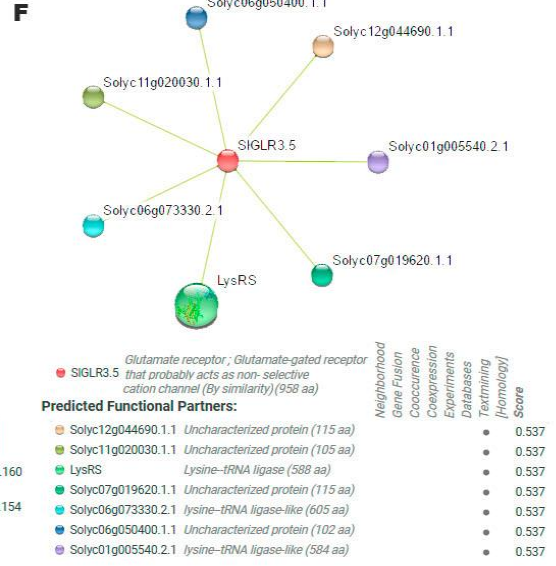
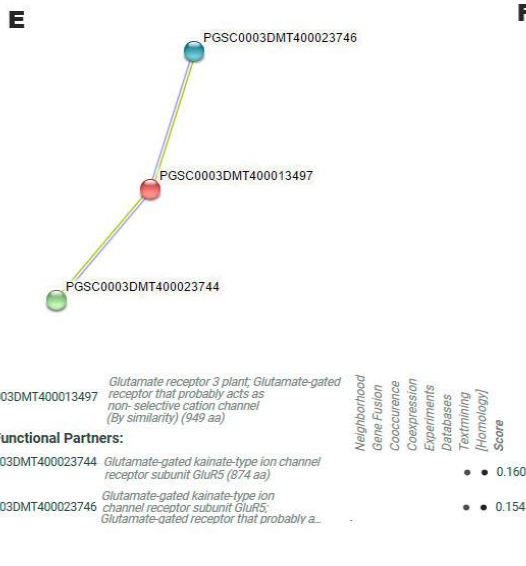
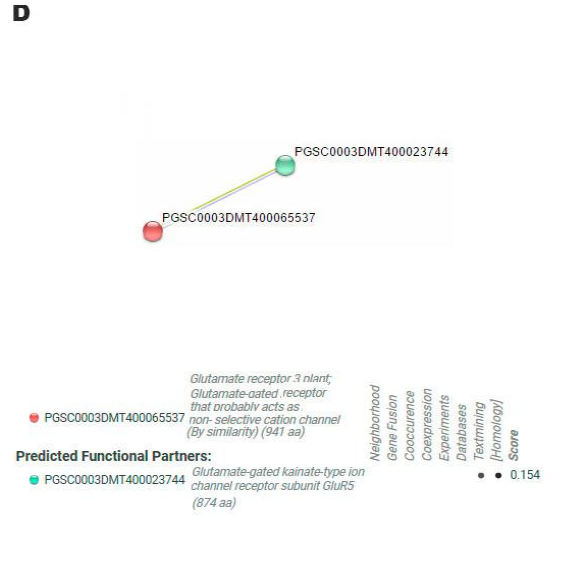
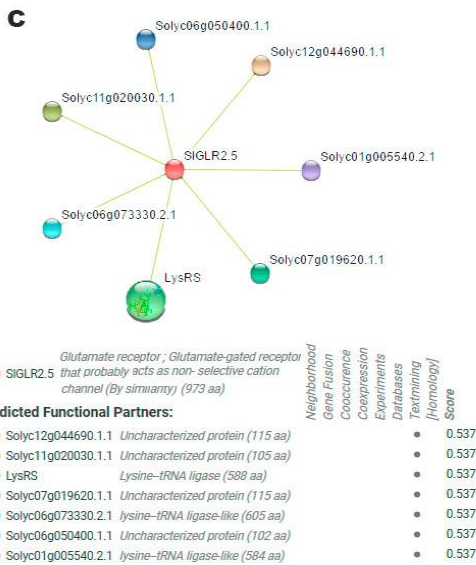
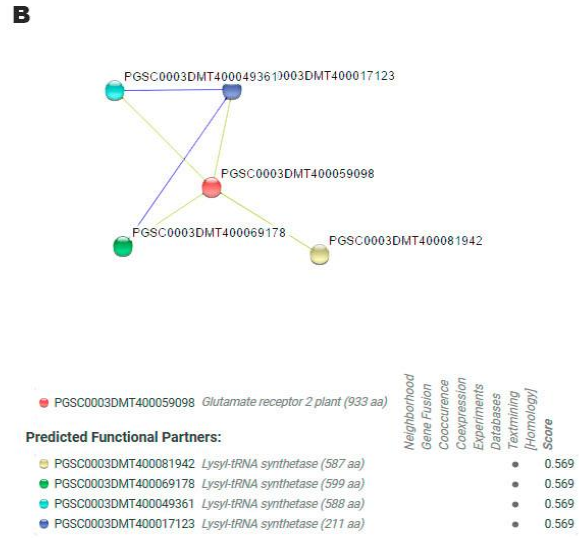
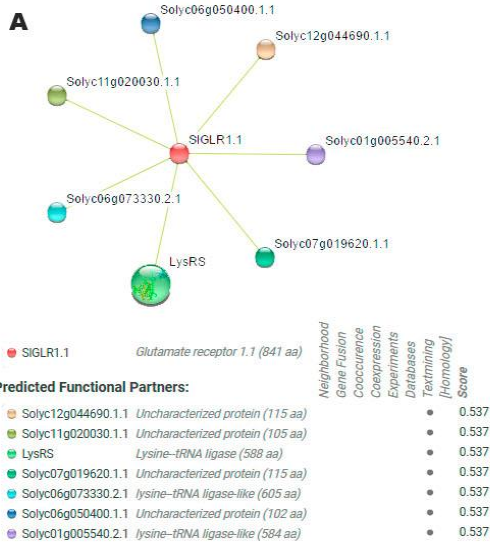
Se realizó un estudio *in silico* por medio del programa STRING de la posible interacción de los *CaGLRs* con otras proteínas. Para este análisis se utilizaron las secuencias aminoacídicas de los 12 *CaGLRs* y el programa arrojó la interacción de únicamente seis *CaGLRs*: el *CaGLR1.1*, *CaGLR1.2*, *CaGLR2.5*, *CaGLR3.2*, *CaGLR3.4* y *CaGLR3.5*.

Para el análisis de interacción de cada *CaGLR* con otras proteínas se utilizó una proteína como referencia. Esta proteína es seleccionada por el usuario una vez que STRING realiza una búsqueda en su base de datos y otorga una lista con diferentes proteínas con sus respectivos valores de bitscore, de acuerdo con la similitud con la secuencia que el usuario proporcionó. Para este caso, se utilizaron como referencia aquellas proteínas con el mayor valor de bitscore para cada *CaGLR* (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.2.** Proteínas de referencia utilizadas para el análisis de interacción proteína-proteína, el organismo en el que se encuentran y su valor de bitscore.

Proteína de interés	Proteína de referencia	Organismo	Bitscore
CaGLR1.1	SIGLR1.1	Solanum lycopersicum	1434
CaGLR1.2	PGSC0003DMT400059098	Solanum tuberosum	1656
CaGLR2.5	SIGLR2.5	Solanum lycopersicum	1530
CaGLR3.2	PGSC0003DMT400065537	Solanum tuberosum	1795
CaGLR3.4	PGSC0003DMT400013497	Solanum tuberosum	1715
CaGLR3.5	SIGLR3.5	Solanum lycopersicum	1788

A continuación, se muestran las posibles interacciones de los CaGLRs con otras proteínas (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Interacción proteína-proteína *in silico*. Este análisis se realizó usando el programa bioinformático STRING. A) Análisis de la posible interacción de *CaGLR1.1* con otras proteínas. Se utilizó a *SIGLR1.1* de *S. lycopersicum* como referencia. B) Análisis de la posible interacción de *CaGLR1.2* con otras proteínas. En este análisis se usó a una proteína de *S. tuberosum* (PGSC0003DMT400059098). C) Posible interacción de *CaGLR2.5* con otras proteínas, utilizando a *SIGLR2.5* de *S. lycopersicum* como referencia. D) Análisis de la posible interacción de *CaGLR3.2* con otras proteínas. Como referencia se utilizó a una proteína de *S. tuberosum* (PGSC0003DMT400065537). E) Análisis de la posible interacción de *CaGLR3.4* con otras proteínas. Para este análisis se tomó a PGSC0003DMT400013497 de *S. tuberosum* como referencia. F) Análisis de la posible interacción de *CaGLR3.5* con otras proteínas. El análisis se realizó usando a *SIGLR 3.5* de *S. lycopersicum* como referencia.

Los resultados indican que estas proteínas también interaccionan con ligasas de lisina-tRNA, las cuales son enzimas que participan en la síntesis del aminoacil-ARNt de lisina utilizado durante la síntesis de proteínas. El análisis *in silico* también sugiere la posible interacción con una subunidad (GluR5) del receptor de canal iónico de tipo kainato en *S. tuberosum*, según la base de datos de STRING posiblemente funciona como un NSCC (Figura 3.5).

### 3.2.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Según la bibliografía los GLRs en plantas son transportados a las membranas (Weiland *et al.*, 2015). El péptido señal dentro de la región N-terminal de cuatro *AtGLR* (*AtGLR3.1*, *AtGLR3.2*, *AtGLR3.6* y *3.7*) indican al menos una entrada a la ruta secretora, mientras que *AtGLR3.3*, *3.4* y *3.5* pueden encontrarse en varios organelos de la célula como cloroplastos y mitocondrias (Teardo *et al.*, 2010, 2011). Un GLR de *O. sativa* (*OsGLR3.1*) y *R. sativus* (*RsGLR*) también incluyen péptidos señal para entrar a la vía secretora (Weiland *et al.*, 2016). Los resultados aquí obtenidos indican la posible localización de los CaGLRs en membrana plasmática, cloroplasto, ruta secretora e incluso en núcleo (Cuadro 3.3).

**Cuadro 3.3.** Predicción *in silico* de la localización subcelular de los GLRs de *C. annuum*. Donde C: Cloroplastos, N: Núcleo, RS: Ruta secretoria, MP: Membrana plasmática.

Proteína	YloC	TargetP	Cello	Cell-Ploc 2.0	EuLoC	PSI	Euk-mPloc2.0
CaGLR1.1	C	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR1.2	RS	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR2.1	C	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR2.2	C	-	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR2.3	RS	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR2.4	C	-	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR2.5	RS	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR3.1	RS	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR3.2	C	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR3.3	C	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR3.4	C	RS	MP	MP	MP	MP	MP
CaGLR3.5	RS	-	MP	MP	MP	MP	MP

### 3.2.7. REGIÓN PARA EL DISEÑO DE LOS CEBADORES.

Para este proyecto se decidió diseñar los cebadores para cada secuencia de CaGLRs entre las regiones transmembranales M3 y M4, que es donde se localiza el dominio S2 de unión al ligando, siendo ésta una región poco conservada.

La secuencia de los cebadores diseñados para cada uno y sus características se pueden apreciar en el cuadro 3.4, a continuación.

**Cuadro 3.4.** Cebadores diseñados a partir de las secuencias de los CaGLRs.

Nombre cebador	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)	Amplificación (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	GCCATTCCATCTTTTTGTTT		
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	TTGGAGGTCCGCGTTTTCTG		
F_GLR3.3	TGCAGAACGGTATTTGGAG	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	TGTCAATAGCGAGAGGAGAG		

## CAPÍTULO 4

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS *CaGLRS*

#### INTRODUCCIÓN

Poco después del descubrimiento de la existencia de secuencias que codifican a iGluRs en plantas mediante herramientas bioinformáticas, se demostró que los 20 *AtGLRs* se expresan en raíz, 14 en brotes y 12 en flores (Chiu *et al.*, 2002). En otro estudio, se evaluó la expresión de los *AtGLRs* en tres diferentes tipos de células de hojas de esta especie y se demostró la expresión simultánea de cinco a seis GLR en una sola célula. El *AtGLR3.7* fue el único que se expresó siempre en todos los tipos de células y plantas utilizadas (Roy *et al.*, 2008).

A lo largo de las investigaciones han surgido estudios que sugieren y comprueban la existencia de estas proteínas en diferentes especies de plantas, además de *Arabidopsis*. Tal es el caso del descubrimiento de 24 genes en arroz (Li *et al.*, 2006; Singh *et al.*, (2014). Mediante un análisis bioinformático, se determinó que, en esta especie monocotiledónea, se encuentra un nuevo clado, el clado IV, conformado por nueve miembros OsGLRs. Singh *et al.*, (2014) sugirieron que posiblemente esos genes divergieron a partir de un origen común y más tarde se expandieron en un solo grupo a través de la duplicación cromosómica, ya que ocho de los nueve miembros de este grupo están en duplicación en tándem (Singh *et al.*, 2014). Además, todos se expresan preferentemente en raíz, aunque tres de ellos muestran mayor expresión en este tejido (Ni *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014).

En el genoma de tomate, una especie cercana a nuestro modelo de estudio, se han encontrado 13 *SIGLR* y fue reportada la expresión de cuatro de ellos (*SIGLR1.1*, *1.2*, *2.2* y *3.1*). Los autores comentan que la expresión del resto de los miembros fue muy baja en los tejidos. Estos cuatro genes se expresaron en la raíz de tomate, aunque *SIGLR1.1* fue más específico para raíces en comparación con los otros órganos, así como respecto a los otros *SIGLRs* evaluados (Aouini *et al.*, 2012).

Una de las principales preguntas para los investigadores ha sido si los GLR de las plantas son capaces de conducir iones a través de la membrana, de manera similar a su contraparte en animales. Kim *et al.*, (2001) observaron que al sobreexpresar a



*AtGluR2* en *Arabidopsis* se producía sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , de igual manera que a otros cationes como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Cuando *AtGLR3.7* fue expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*, se observó una mayor conductancia a través de la membrana plasmática de los cationes  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (Roy *et al.*, 2008), mientras que con la expresión de *AtGLR1.1* y *AtGLR1.4* fueron permeables a  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (Tapken *et al.*, 2013a; Tapken y Hollmann, 2008) y *AtGLR1.2* y *AtGLR3.7* modularon el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediante su interacción con D-Ser (Michard *et al.*, 2011). La permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  también ha sido demostrada para *AtGLR3.3* y *3.4* (Qi *et al.*, 2006; Stephens *et al.*, 2008; Vincill *et al.*, 2012).

Además, se han usado agonistas y antagonistas para el estudio de la actividad de los GLRs. L-Glu despolariza la membrana plasmática de raíces de *Arabidopsis* (Dennison y Spalding, 2000; Dubos *et al.*, 2003; Sivaguru *et al.*, 2003) y DNQX impide dicha despolarización. En esta misma especie, se demostró que en protoplastos de raíces el L-Glu tiene el mismo efecto (Demidchik *et al.*, 2004). Un efecto similar fue observado por Meyerhoff *et al.*, (2005), ya que DNQX, CNQX, así como MNQX reducen corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de L-Glu en células del mesófilo en *A. thaliana*.

L-Glu causa PAs (Felle y Zimmermann, 2007a). Sorprendentemente, se detectaron PAs inducidos por NMDA, L-Glu y Gly en una hepática, una planta no vascular muy antigua (Krol *et al.*, 2007).

Además, otros trabajos también han reportado el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por efecto de L-Glu (Dubos *et al.*, 2003; Teardo *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2016) en raíces de *Arabidopsis*, y en hojas de la misma planta por aplicación de neomicina (un agonista de los iGluRs del tipo NMDA) (Zhu *et al.*, 2013). También, Singh *et al.*, (2016) por medio de una mutante de *glr3.6* de *Arabidopsis* demostraron que se inhibe la luminiscencia emitida por aecuatorina, y por tanto, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los análisis realizados en los capítulos anteriores sugieren que en el genoma de *C. annuum* existen al menos 12 secuencias GLR agrupadas en tres diferentes clados, todas presentan dominios de unión a ligando, dominios de GLR y dominios de unión a ligando de receptores GABA. El perfil de hidrofobicidad arrojó que todas las secuencias poseen cuatro dominios transmembranales. Además, NMDA, Gly, AMPA, DNQX y AP-5 inducen cambios en la morfología de la raíz, y se sugiere que lo hacen a través de GLRs.

Por ello, en este capítulo se muestra el análisis de los niveles de transcritos de los 12 genes GLR, así como su actividad por medio de la electrofisiología y microscopía

confocal.

## 4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para ambos experimentos (expresión y actividad) se utilizaron semillas de chile serrano (*C. annuum* var. CM334). Para la desinfección de las semillas, se siguió el protocolo de Célis-Arámburo *et al.* (2011).

Para la germinación, las semillas estériles fueron transferidas a cajas de Petri estériles, en las que previamente se colocó una capa fina de algodón y papel filtro humedecido con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Las cajas de Petri se mantuvieron a 25±2°C en oscuridad para la germinación de las semillas.

Una vez que ocurrió la protrusión de la radícula (de cuatro a cinco días), las semillas se transfirieron a cajas de Petri de 9 cm conteniendo medio de crecimiento basal NO (25 ml por caja de Petri): 23 mM ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 5.7, sacarosa al 0.5% (p/v), agar-agar al 1% (p/v) y las sales del medio B5 (Garmborg *et al.*, 1968) diluidas 1:50. Las fuentes inorgánicas de N del medio B5 (nitrato de potasio y sulfato de amonio) fueron eliminadas y se adicionó como única fuente de este elemento 1 mM KNO<sub>3</sub>. Las cajas fueron colocadas en posición vertical, en condiciones de oscuridad para el crecimiento de las plántulas.

Para el caso de análisis de los niveles de transcritos, las cosechas se realizaron el día seis post-germinación, cuando la RP tenía aproximadamente 5.5 - 6.0 cm de longitud. Se procedió a dividir la raíz en tres zonas a partir del ápice de la raíz: Z<sub>1</sub>: 4 a 6 cm, Z<sub>2</sub>: 2 a 4 cm y Z<sub>3</sub>: 0 a 2 cm (Fig. 5.2) para la posterior extracción de ARN. Estas plántulas fueron usadas para todos los análisis de niveles de transcritos posteriores.

Para el caso de análisis de actividad de los GLRs, se utilizaron raíces de igual longitud que las anteriores. La actividad de los posibles GLRs en la raíz de *C. annuum* fue determinada con dos técnicas diferentes, una de ellas por MIFE y la otra por Microscopía confocal con un fluoróforo sensible a calcio. Ambas técnicas se describen posteriormente.

#### 4.1.2. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Para la extracción de ARN total, se utilizó la metodología de TRIZOL, en la cual se tomó entre 70 a 100 mg de tejido de raíz pulverizado de cada zona de la raíz, descrita previamente. Se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadió 1 ml del reactivo TRIZOL (Invitrogen). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12 000 g a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se le adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó manual y vigorosamente y se incubó por 2-3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12 000 g por 15 min a 4 °C. A la fase acuosa se le adicionó 500 µl de isopropanol y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12 000 g por 10 min a 4 °C, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó a 7 500 g (8 500 rpm) por 5 min a 4 °C. La pastilla se dejó secar de 10 a 15 min y se resuspendió el ARN total en 30 µl de agua estéril.

Para la cuantificación del ARN total (v/v) las muestras se leyeron espectrofotométricamente a 260 nm en el equipo NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC). La integridad del ARN fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v), teñido con bromuro de etidio.

Para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico, el ARN total fue tratado con DNAsa Invitrogen, incubando 15 min a temperatura ambiente e inactivado con EDTA 25 mM, por 10 min a 65 °C. Posteriormente, se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante la transcripción reversa. Cada reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl, el cual contenía 1 µg/µl de ARN, 1 µl de Oligo dT [50 µM] y 1 µl de dNTP's [10 mM]. La mezcla se homogenizó e incubó a 65 °C durante 5 min, colocándose posteriormente a 4 °C durante 3 min. Para la reacción se adicionó 4 µl del amortiguador 5X de la enzima Superscrip II (Invitrogen), 2 µl de DTT [0.1 M] y 1 µl de RNAsa out [400 U/µl] (Invitrogen); seguidamente se homogenizó y se incubó a 42 °C durante 5 min. Por último, a la mezcla se le adicionó 1 µl de la enzima Superscrip II (Invitrogen) y se dejó reaccionar a 42 °C durante 50 min. Para detener la reacción, la mezcla fue incubada a 70 °C durante 15 min.

Una vez obtenida la primera cadena de ADNc se procedió a evaluar los niveles de transcritos de los 12 CaGLRs, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos sintetizados previamente, los cuales fueron diseñados con base a la secuencia de ADNc de cada CaGLR (Apartado 2.2.8; Cuadro 3.4). La mezcla de reacción contenía 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> [50

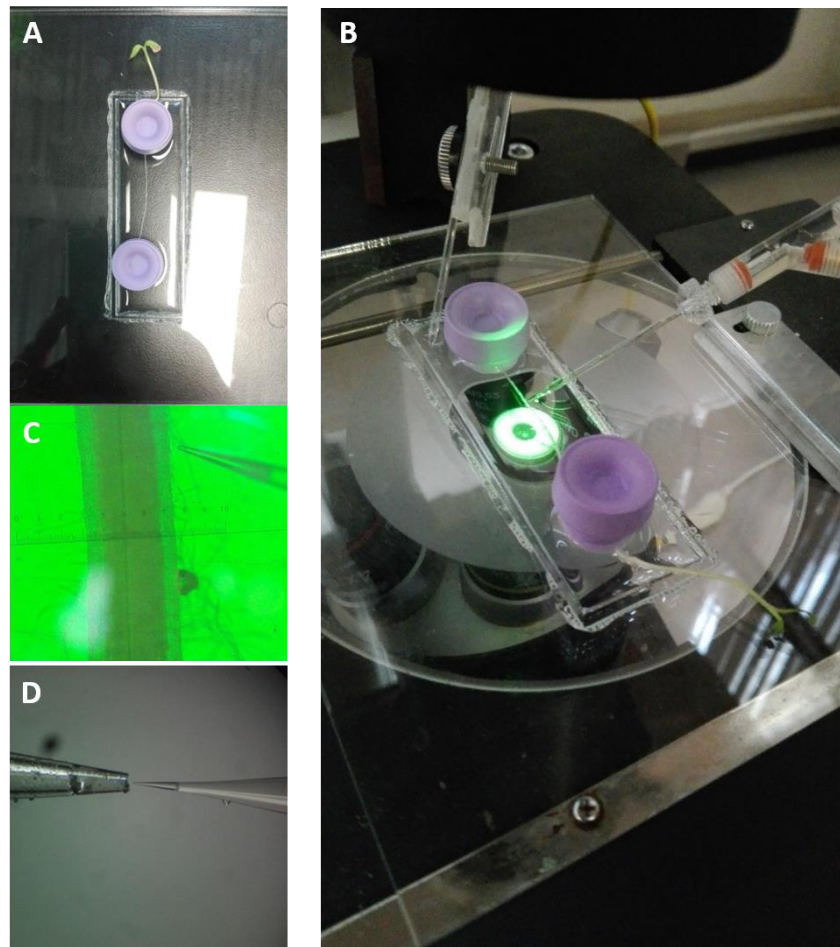
mM], 1.0  $\mu$ l de dNTP's [10 mM], 2.0  $\mu$ l del Oligo forward, 2.0  $\mu$ l del oligo reverse, 0.2  $\mu$ l de la enzima Taq Platinum [5 U/ $\mu$ L] (Invitrogen), 1.0  $\mu$ L de ADNc [1  $\mu$ g/ $\mu$ l].

El programa de PCR fue el siguiente: 95 °C por 1 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 75 °C por 40 seg, 72 °C por 10 min y la PCR se desarrolló en un termociclador My Cycler (BIO-RAD). Como control de carga se utilizó al gen de la tubulina. Para visualizar los posibles fragmentos amplificados por PCR, la muestra respectiva se fraccionó en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) en 50 ml de TAE 1X, adicionando 0.8  $\mu$ l de bromuro de etidio.

#### 4.1.3. MEDICIONES DE FLUJO DE $\text{Ca}^{2+}$ CON LA TÉCNICA MIFE

Los experimentos de MIFE se realizaron en la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCEMICH) en una estancia realizada con el Dr. Isaac Zepeda Jazo. Las bases de esta técnica se explican en el Apartado 1.8. Las plántulas de aproximadamente 6 cm se transfirieron a la cámara de medición y se fijaron en posición horizontal (Fig. 4.1a). Se agregó 3 ml de la solución de medición (0.5 mM KCl, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM MES, 2 mM TRIS Base; pH 6.0) a la cámara y se esperó 30 min para su estabilización. Posteriormente, la cámara de medición conteniendo a la raíz se colocó en la base de un microscopio invertido. El electrodo de medición fijo a un micromanipulador, se localizó perpendicularmente al eje de la RP a 50  $\mu$ m de la superficie de la zona madura, a 1-2 cm del ápice de la raíz (Figura 4.1b-c) más un electrodo de referencias colocado a corta distancia en la solución del baño.

Los microelectrodos para la técnica fueron elaborados en varios pasos de estiración y corte, secado y recubrimiento con tributil clorosilano. El electrodo previamente llenado con una solución apropiada (back-filling: 500 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) se coloca en contacto por un segundo con la resina ion selectiva (LIX de Calcio/ (-) -(R, R)-N, N0- (Bis(11-etoxicarbonil) undecil)-N, N0-4,5-tetrametil-3,6-dioxaoctanodiamida), para el llenado de la punta unos pocos micrómetros (Figura 4.1d). Después de esto, los electrodos fueron calibrados utilizando soluciones estándares con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de 100, 250 y 500  $\mu$ M, obteniendo una correlación superior a 0.999 se procedió a iniciar con la medición de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 4.1.** Pre-acondicionamiento para las mediciones de flujo con la técnica MIFE. A) Plántulas de aproximadamente 6 cm en la cámara de medición; B) Montaje de la cámara de medición en el microscopio invertido, C) Posicionamiento del electrodo a 50  $\mu\text{m}$  de la raíz y D) Cargado del LIX en la punta del microelectrodo.

Al inicio, los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  se midieron durante 5 min, y posteriormente de 30-60 min después de la aplicación del agonista (Glu, Gly, Glu + Gly, NMDA, NMDA +Gly, AMPA, L-Met y D-Ser) a evaluar (Cuadro 4.1).

**Cuadro 4.1.** Fármacos aplicados sobre las raíces de *C. annuum*.

<b>Fármacos</b>	<b>Concentración</b>	<b>Efecto</b>
<b>Glu</b>	0.1, 1.0 y 10 mM	Agonista de los iGluRs
<b>Gly</b>	0.1, 1.0 y 10 mM	Agonista de los iGluRs
<b>NMDA</b>	1.0 mM	Agonista de los iGluRs tipo NMDA
<b>NMDA + Gly</b>	1.0 mM	Agonistas de los iGluRs tipo NMDA
<b>AMPA</b>	1.0 mM	Agonista de los iGluRs tipo AMPA
<b>L-Met</b>	1.0 mM	Agonista de los iGluRs
<b>D-Ser</b>	1.0 mM	Agonista de los iGluRs
<b>AP-5</b>	0.1 mM	Antagonista de los iGluRs del sitio de Glu tipo NMDA
<b>SDZ 220-040</b>	0.1 mM	Antagonista de los iGluRs del sitio de Glu tipo NMDA
<b>Gavestinol</b>	1.0 mM	Antagonista de los iGluRs del sitio de Gly tipo AMPA
<b>L -689, 560</b>	1.0 mM	Antagonista de los iGluRs del sitio de Gly tipo AMPA
<b>Nifedipina</b>	0.1 mM	Bloqueador de canales de calcio

Para los estudios farmacológicos específicos con antagonistas de los iGluRs así como el bloqueador de canales de calcio, se aplicó directamente 0.1 mM de Glu + 0.1 mM de Gly entre el min 5 y el min 8 aproximadamente, según fue el caso. Seguidamente se aplicó el antagonista (AP-5, SDZ 220-040, Gavestinol, L-689-500 y Nifedipina) (Cuadro 4.1) min después de la respuesta de entrada de flujo con la hipótesis de que el

antagonista competiría con el agonista desplazándolo del lugar de unión al receptor y como consecuencia la disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Unos min después se aplicó Nifedipina para determinar si, en caso de existir una disminución en la entrada de calcio, ésta sería debida no solo a los GLRs sino a otros canales de calcio en la membrana de las células en la raíz de chile serrano.

#### 4.1.4. SEÑALIZACIÓN DE CALCIO CON CALCIUM ORANGE (CaO)

Para evaluar los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en raíces de *C. annuum*, se utilizó el indicador Calcium Orange (CaO) (C3015, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Las plántulas antes descritas, fueron incubadas en 1 mL de la solución de tinción (5  $\mu\text{M}$  de amortiguador MES-Na (pH 6.0), 1 mM CaO) y adicionada con diferentes fármacos (Cuadro 4.2). Después de 60 min de tratamiento, las plántulas testigo y tratadas con los diferentes fármacos se colocaron en portaobjetos en la misma solución de tinción. La fluorescencia se observó en un microscopio confocal FluoView<sup>TM</sup> FV1000 (Olympus, Japón). Se utilizaron dos lentes, uno UPLFLN 20X0 y otro UPLFLN 40X0 (aceite) y una velocidad de escaneo de 10  $\mu\text{s}$ /pixel. El fluoróforo tiene una longitud de excitación y de emisión de 549 y 576, respectivamente. Las imágenes en Z tienen una resolución de 512 X 512 pixeles.

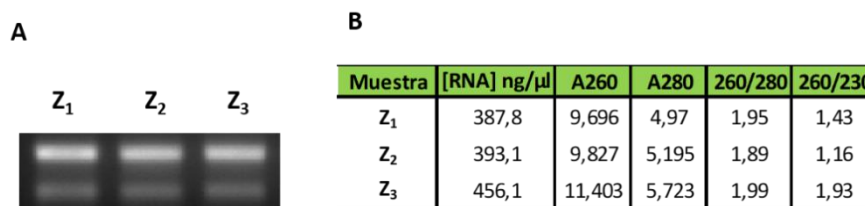
**Cuadro 4.2.** Fármacos aplicados sobre las raíces de *C. annuum* usando el fluoróforo CaO.

Fármacos	Concentración	Efecto
<b>Glu</b>	0.1 mM	Agonista de los iGluRs
<b>Gly</b>	0.1 mM	Agonista de los iGluRs
<b>NMDA</b>	0.1 mM	Agonista de los iGluRs tipo NMDA
<b>NMDA + Gly</b>	0.1 mM	Agonistas de los iGluRs tipo NMDA
<b>L-Met</b>	1.0 mM	Agonista de los iGluRs
<b>D-Ser</b>	1.0 mM	Agonista de los iGluRs
<b>Glu + MK-801</b>	0.1 mM; 200 $\mu\text{M}$	Antagonista de los iGluRs del sitio de Glu tipo NMDA que se une al sitio del poro

## 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2.1. NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS 12 *CaGLR* EN LAS TRES DIFERENTES ZONAS DE LA RAÍZ DE *C. annuum*

Como se puede observar en la Figura 4.2, las bandas de ARN se visualizan definidas e íntegras.

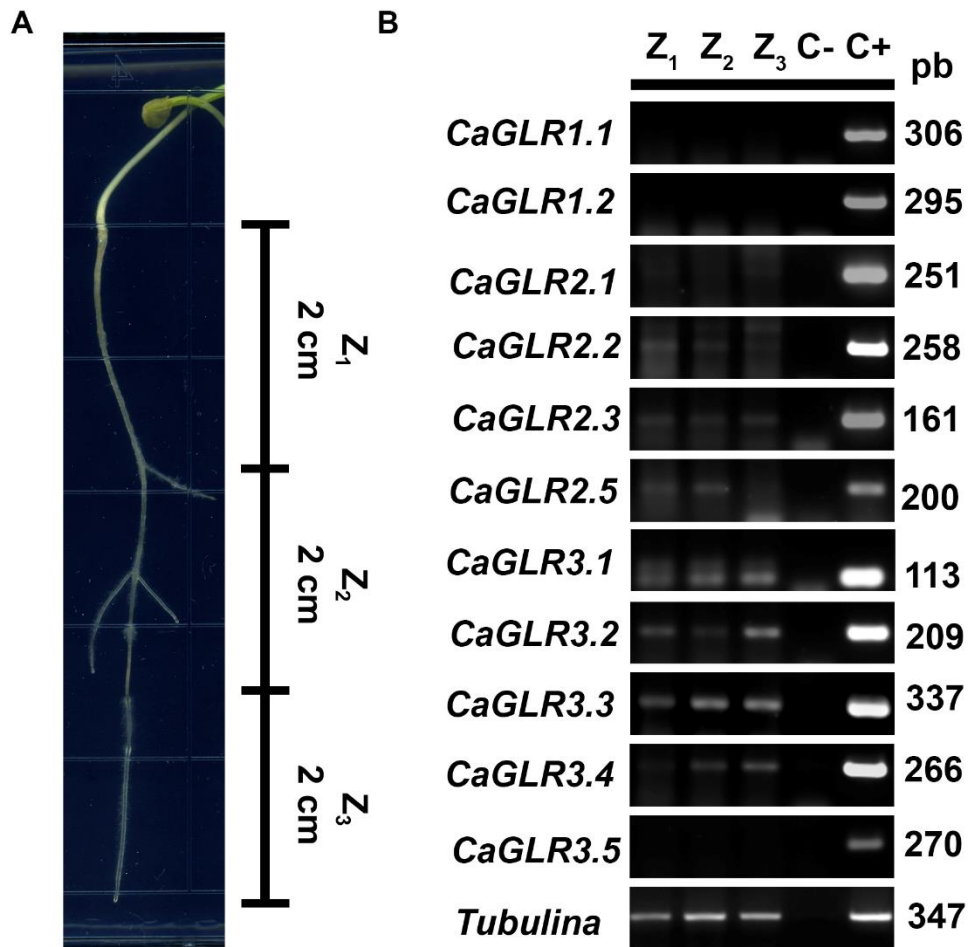


**Figura 4.2.** ARN total obtenido de raíces de *C. annuum*. A) Para las tres zonas se aplicó 1.0 μg/ μl de ARN total en cada muestra. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; B) Cuantificación del ARN por espectrofotometría.

El objetivo de este experimento fue determinar cuáles *CaGLR* se expresaban en la raíz y en qué zona de la misma.

En la Figura 4.3 se pueden observar los cambios obtenidos en los niveles de transcritos de las tres familias de *CaGLRs* en las raíces de *C. annuum*. Cuatro de los 13 genes no se expresaron en la raíz, los dos de la Familia I (*CaGLR1.1-CaGLR1.2*) así como *CaGLR3.5*. Además, todos los genes restantes muestran expresión en todas las zonas. Sin embargo, *CaGLR2.1-CaGLR2.3*, *CaGLR3.1-CaGLR3.4*, tienden a aumentar su expresión entre la Z<sub>2</sub> y la Z<sub>3</sub>, misma zona en la que se hicieron las mediciones de flujo catiónico con MIFE (Capítulo V).





**Figura 4.3.** Cambios en los niveles de transcritos de los CaGLRs en las diferentes zonas de la raíz de *C. annuum*. Plántulas de *C. annuum* creciendo durante seis días en condiciones *in vitro* en oscuridad fueron seccionadas en tres partes, cada una de 2 cm (Z<sub>1</sub>-Z<sub>3</sub>); y posteriormente se extrajo el ARN de cada zona de la raíz. A) Representación esquemática de las zonas de la raíz primaria; Z<sub>1</sub> (cerca a la parte aérea), Z<sub>2</sub> (parte media) y Z<sub>3</sub> (cerca al ápice). B) Niveles de transcritos de las tres familias de CaGLRs en las diferentes zonas de la raíz primaria. Se usó el gen constitutivo tubulina como control de carga. En la figura se muestra el tamaño (pb) esperado para cada gen. C-: sin el cDNA. C+: con el ADN plasmídico conteniendo insertado un fragmento de cada gen.

A partir de estos resultados se concluye que algunos *CaGLRs* se expresan en la raíz y pueden modificar su expresión de acuerdo a la zona de la raíz de *C. annuum*. Todo esto es indicativo de la gran diversidad de estos genes en plantas, y se sugiere que los genes que se expresaron en la misma zona son los que más tarde podrían formar parte del receptor activo.

Como se ha mencionado con anterioridad, no hay suficiente información acerca de los GLRs, se sabe muy poco sobre su función en las plantas, así como su presencia en las mismas. Hasta la fecha, no se ha realizado el estudio de expresión por zonas de la raíz, como el que se presenta en este trabajo.

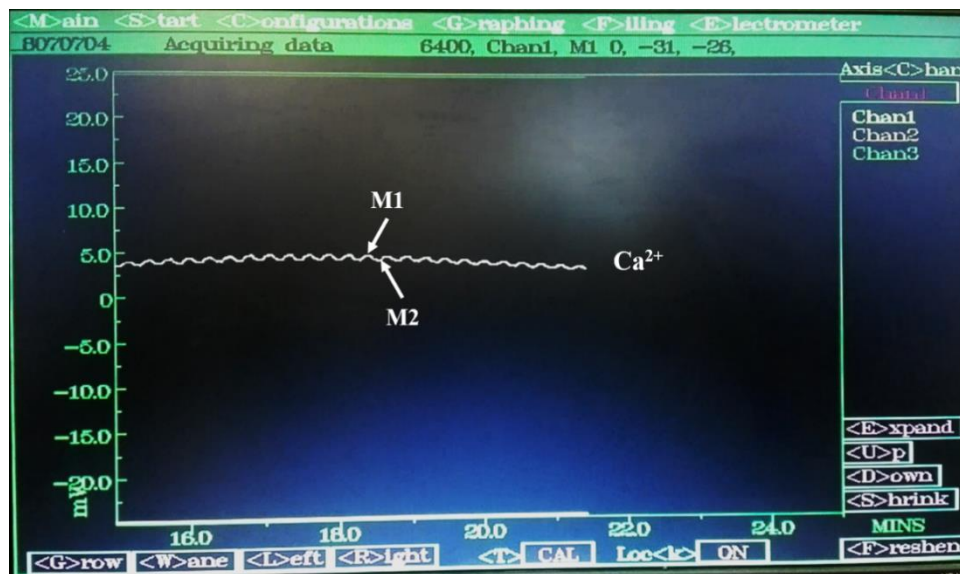
Por medio de estudios de microchip y PCR en tiempo real, se demostró la expresión de seis de los 24 genes en *O. sativa*, siendo el *OsGLR3.1*, *OsGLR4.9* y *OsGLR3.6* los que se expresan mayoritariamente en este órgano (Singh *et al.*, 2014).

En *S. lycopersicum*, fueron evaluados 13 genes de *GLR* en diferentes tejidos de la planta (hojas, tallos, raíces, flores, y frutos de diferentes estados de desarrollo), y los resultados revelaron importantes niveles de expresión para cuatro de ellos (*SIGLR1.1*, *1.2*, *2.2* y *3.1*). Los cuatro se expresaron en raíces, aunque *SIGLR1.1* fue más específico para raíces en comparación con los otros órganos, así como respecto a los otros *SIGLRs* evaluados (Aouini *et al.*, 2012). Estos resultados son opuestos a los obtenidos en el laboratorio para *CaGLR1.1* y *CaGLR1.2*, dado que no se expresan en raíz; lo cual revela que *SIGLR1.1* y *SIGLR1.2* podrían participar en el desarrollo de raíces en *S. lycopersicum*, mientras que *CaGLR1.1* y *CaGLR1.2* podrían participar en otros eventos de desarrollo en chile serrano. Por otro lado, *CaGLR2.2* y *CaGLR3.1*, mostraron expresión en raíz al igual que sus homólogos *SIGLR2.2* y *SIGLR3.1*, sugiriendo que podría tratarse de proteínas con funciones similares entre ambas especies.

#### 4.2.2. MEDICIONES DE FLUJO de $\text{Ca}^{2+}$ EN RAÍCES DE *C. annuum*

Como parte de la identificación de los receptores, se realizaron mediciones de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en raíces de *C. annuum* para investigar si los GLRs de plantas responden igual a sus homólogos en presencia de agonistas y antagonistas que ya han sido elucidados en los iGluRs de mamíferos.

En la Figura 4.4 se muestra la imagen de pantalla de un registro original de MIFE en la raíz de *C. annuum*. El electrodo cambia entre dos posiciones M1 y M2, de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de la superficie de la raíz, reportando el potencial eléctrico en cada punto equivalente a la actividad del ion. Un mayor nivel de voltaje representa una mayor actividad del ion. Un mayor nivel de M1 comparado con M2 implica la salida del catión y cuando el nivel de M2 es mayor a M1 implica la entrada del catión.



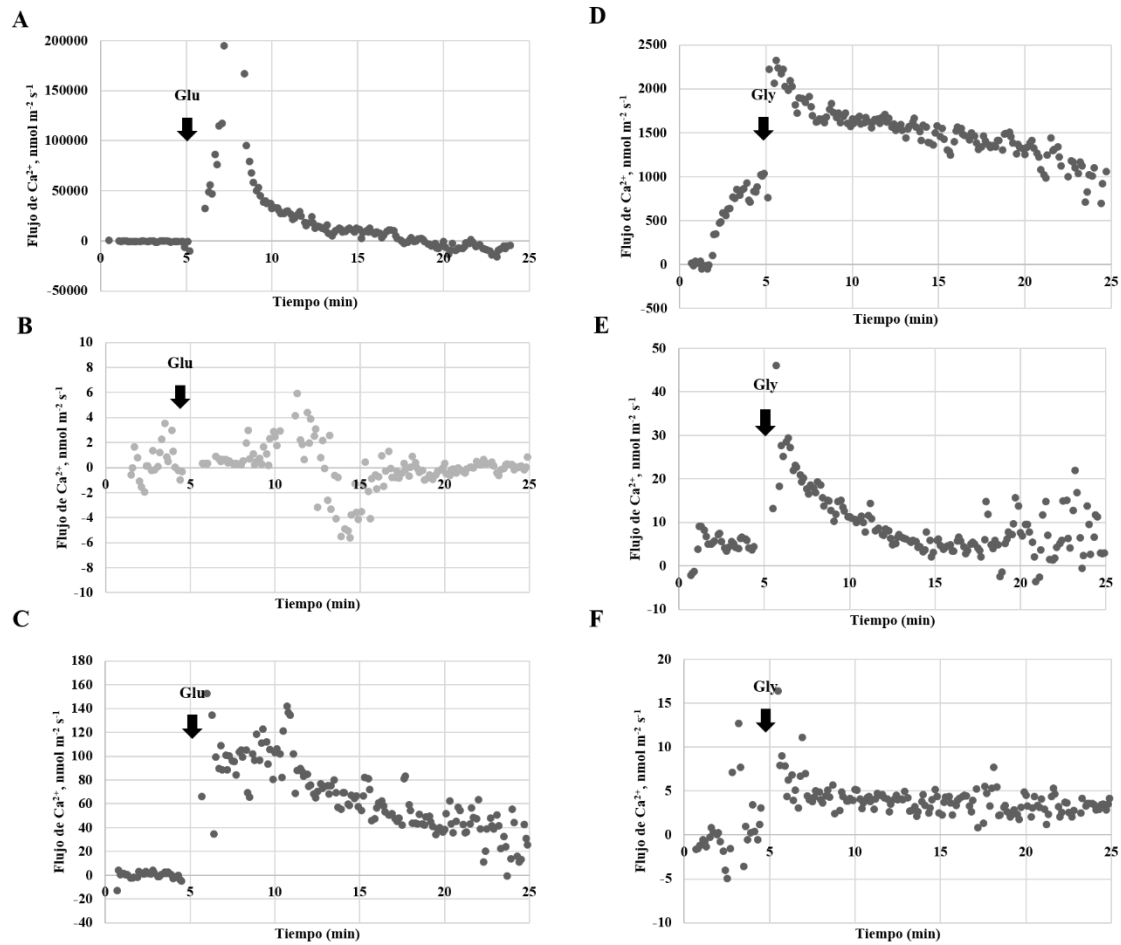
**Figura 4.4.** Imagen de pantalla de un registro original de MIFE en la raíz de *C. annuum*. En la pantalla se muestran los registros de la actividad del ion determinados por el electrodo.

Inicialmente, los flujos iónicos se midieron durante 5 min, pasado este tiempo se aplicó el fármaco de interés a la concentración deseada (ver Cuadro 4.1).

La aplicación de L-Glu a las concentraciones de 0.1 y 10 mM resultó en un flujo de entrada del ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4.5a, c). Además, a la concentración de 0.1 mM el flujo de entrada fue 1000 veces mayor que con 10 mM, sugiriendo que los receptores presentes en la raíz al momento de la medición podrían estar ocupados con agonistas endógenos o que la concentración elevada indujo que los receptores llegaran a un estado de saturación. Por otra parte, cuando se procedió a evaluar el flujo iónico con Glu a la concentración de 1 mM la medición se vio afectada y no se logró apreciar apropiadamente el comportamiento del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto podría deberse a que el electrodo presentó 'ruido' en el tiempo en que fue realizada la medición (Figura 4.5b).

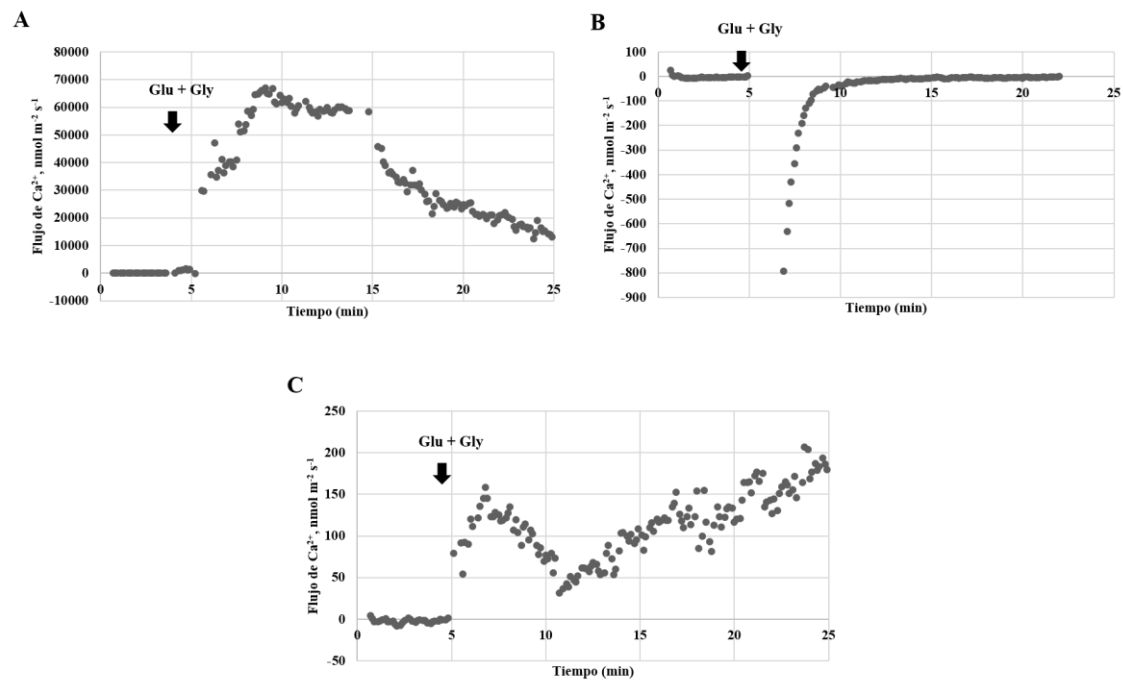
La aplicación de Gly indujo entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las tres concentraciones evaluadas. En este caso, la aplicación de Gly a la mínima dosis utilizada (0.1 mM) provoca un mayor flujo de entrada que cuando es aplicada a su máxima dosis utilizada (10 mM) (Figura 4.5d-f). Otro dato interesante es que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por Gly, a la mínima concentración utilizada, permanece aproximadamente el doble de tiempo que el provocado por L-Glu a la misma concentración. Para ambos casos, L-Glu y Gly, las otras

dos concentraciones utilizadas afectaron al electrodo provocando que la medición no sea clara.



**Figura 4.5.** Efecto de los fármacos sobre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona madura de la raíz de *C. annuum*. Los flujos fueron generados por la aplicación de A) 0.1 mM de Glu, B) 1 mM de Glu, C) 10 mM de Glu, D) 0.1 mM de Gly, E) 1 mM de Gly, F) 10 mM de Gly y se indica con flechas. Los valores representan la media,  $n = 3-5$  plántulas.

Como se ha ido mencionando a lo largo del escrito, L-Glu y Gly son agonistas y co-agonistas, respectivamente de los iGluRs tipo NMDA en mamíferos, y ambos son necesarios para la apertura del canal iónico; por lo que al igual que en experimentos anteriores era importante evaluar los flujos del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ambos. Dado lo anterior, se procedió a aplicar L-Glu y Gly en conjunto. Los resultados arrojaron que únicamente a las concentraciones de 0.1 mM y 10 mM resultaron en una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, a la concentración de 1 mM provocó salida de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4.6).



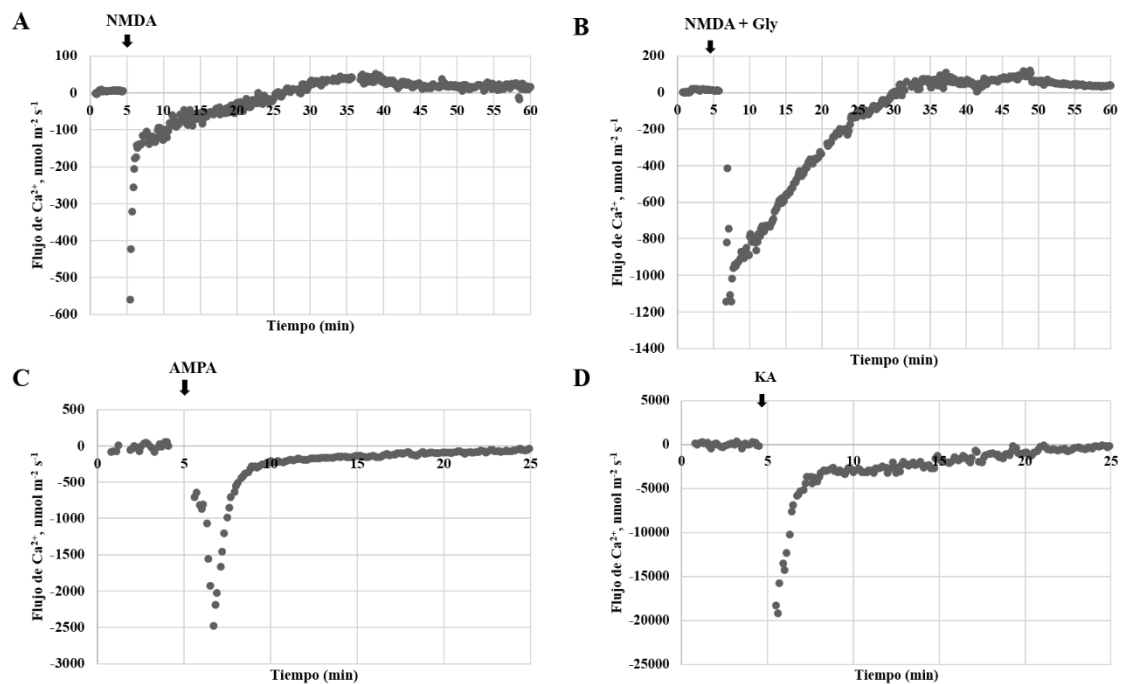
**Figura 4.6.** Efecto de los fármacos sobre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona madura de la raíz de *C. annuum*. Los flujos fueron generados por la aplicación de A) 0.1 mM de Glu + 0.1 mM de Gly, B) 1 mM de Glu + 1 mM de Gly, C) 10 mM de Glu + 10 mM de Gly, se indica con flechas. Los valores representan la media de  $n = 3-5$  plántulas.

Dado el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante de la aplicación de Glu + Gly a las concentraciones de 0.1 y 10 mM en las raíces de chile serrano, se sugiere que posibles GLRs podrían estar participando en esta actividad. Para reforzar esta teoría, se prosiguió a la realización de ensayos con herramientas más dirigidas a estos receptores, los agonistas sintéticos de los GLRs de tipo NMDA, AMPA y KA.

Como se puede observar en la Figura 4.7, la adición de 1 mM de NMDA provoca un flujo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se invierte en flujo de entrada a partir del min 25 aproximadamente, esto podría sugerir una respuesta tardía en la actividad del receptor (Figura 4.7a). Un efecto parecido fue observado cuando se aplicó en conjunto 1 mM de NMDA + 1 mM de Gly, a partir del min 5 provocó salida del ion  $\text{Ca}^{2+}$ , y entre el min 25 y el min 30 este flujo fue invertido a entrada (Figura 4.7b).

Los iGluRs del tipo NMDA son más permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  que a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , mientras que los del tipo AMPA y KA son más permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que a  $\text{Ca}^{2+}$  (Kritis *et al.*,

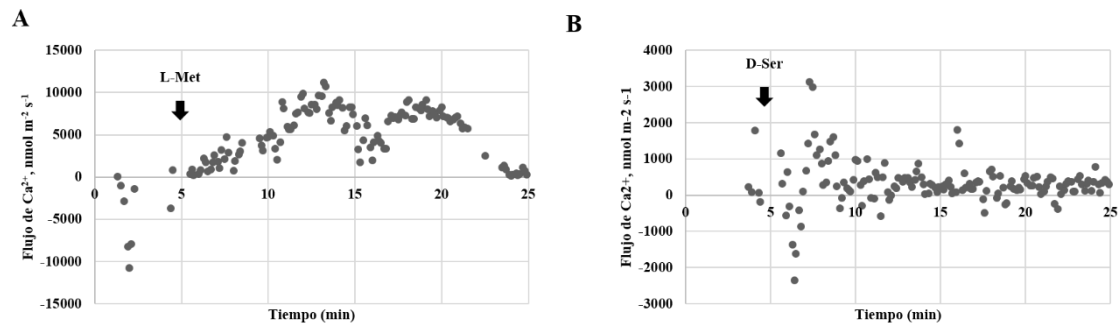
2015). Sin embargo, para fines experimentales se realizaron mediciones de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  con los fármacos AMPA y KA, cada uno a la concentración de 1 mM. La aplicación directa de ambos compuestos provocó flujo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al min 5 aproximadamente, hasta estabilizarse nuevamente (Figura 4.7c y d, respectivamente). Ambos se midieron durante más de 60 min y no hubo cambios en la tendencia (datos no mostrados).



**Figura 4.6.** Efecto de los fármacos sobre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona madura de la raíz de *C. annuum*. Los flujos fueron generados por la aplicación de A) 1 mM de NMDA, B) 1 mM de NMDA + 1 mM de Gly, C) 1 mM de AMPA, D) 1 mM de KA a los 5 min y se indica con flechas. Los valores representan la media de  $n = 3-5$  plántulas.

Además de L-Glu y Gly, otros aminoácidos fungen como agonistas de los iGluRs en mamíferos. Por tal razón, se realizaron ensayos con L-Met y D-Ser a la concentración de 1 mM. La adición de L-Met a los 5 min provocó flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la raíz de *C. annuum* (Figura 4.8a). La aplicación de D-Ser al igual que L-Met estimuló la entrada del ion  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo, no logra ser apreciado adecuadamente en la gráfica debido a que el electrodo presentó 'ruido' en el momento de la medición (Figura 4.8b). Con estos resultados se sugiere la existencia

de CaGLRs en la raíz de chile serrano funcionando de forma similar a sus homólogos en mamíferos.



**Figura 4.7.** Efecto de los fármacos sobre los flujos de Ca<sup>2+</sup> en la zona madura de la raíz de *C. annuum*. Los flujos fueron generados por la aplicación de A) 1 mM de L-Met, B) 1 mM de D-Ser a los 5 min y se indica con flechas. Los valores representan la media de n = 3-5 plántulas.

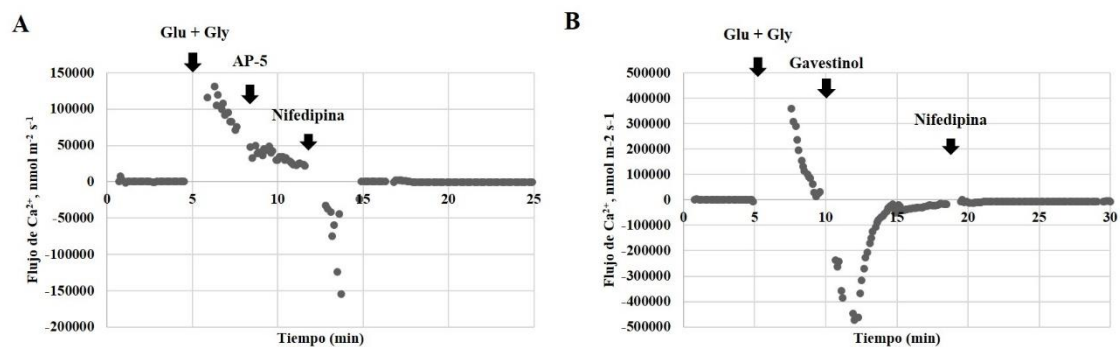
Los resultados anteriormente descritos sugieren que principalmente L-Glu, Gly, y la combinación de estos podrían fungir como agonistas de los GLRs en *C. annuum*; sin embargo, es necesario realizar estudios farmacológicos con bloqueadores e inhibidores de transportadores de Ca<sup>2+</sup>. Por esa razón, se prosiguió a evaluar el efecto sobre el flujo iónico ante la presencia de antagonistas iGluRs del tipo NMDA.

Previo a la aplicación de los bloqueadores y antagonistas, fue necesario escoger un tratamiento de los anteriormente evaluados que provocara flujo de entrada de Ca<sup>2+</sup>. El tratamiento utilizado fue el de 0.1 mM Glu + 0.1 mM Gly debido a que el flujo de entrada de Ca<sup>2+</sup> provocado por éste, presentaba una tendencia clara y además, el flujo de entrada era estable por más tiempo en comparación de los otros dos tratamientos a la concentración de 1 y 10 mM; esto quiere decir que, el pico más alto de entrada de Ca<sup>2+</sup> se demoraba aproximadamente 7 min en decaer, por tanto, caía aproximadamente en el min 15 de la medición (Figura 4.6a). Dado lo anterior, se decidió aplicar los antagonistas entre el min ocho y diez de la medición, antes de que decayera el flujo de entrada.

A continuación, se prosiguió a la evaluación de los antagonistas y bloqueadores sobre el flujo de Ca<sup>2+</sup>. Para esto se aplicó inicialmente, 0.1 mM Glu + 0.1 mM Gly en el min 5 de la medición para la evaluación de todos los antagonistas, lo cual provocó flujo de entrada de Ca<sup>2+</sup>.

Uno de los antagonistas a evaluar fue el AP-5, un antagonista iGluR del tipo NMDA que se une al sitio de Glu. Después del flujo de entrada provocado por la combinación de Glu y Gly en el min 5, se procedió a la aplicación de AP-5 a 0.1 mM en el min 8, lo que resultó en una disminución en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que ocupó el sitio de Glu en los posibles receptores presentes en la raíz. Posteriormente, se adicionó Nifedipina, bloqueador de canales de calcio, en el min 12, lo que resultó en un bloqueo total del flujo (Figura 4.9a).

Por otro lado, también se evaluó un antagonista tipo NMDA que se une al sitio de Gly, el Gavestinol. La aplicación de este a una concentración de 1 mM en el min 10 provocó flujo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$ . Seguidamente, se adicionó Nifedipina en el min 19, lo que resultó en un bloqueo total del flujo (Figura 4.9c).

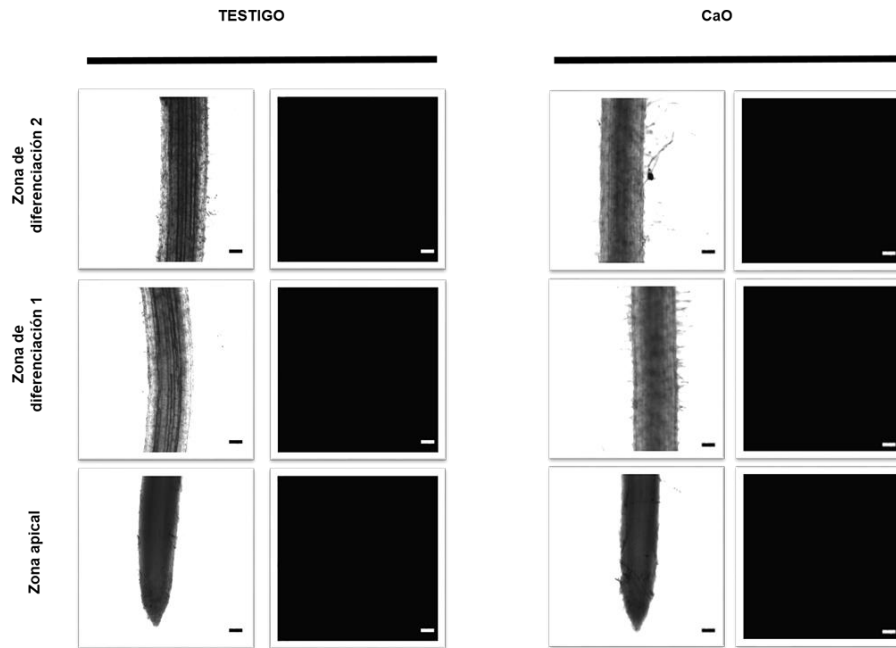


**Figura 4.8.** Efecto de los fármacos sobre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona madura de la raíz de *C. annuum*. Los flujos fueron generados por la aplicación directa de A) 0.1 mM de AP-5, y B) 1 mM de Gavestinol. Los valores representan la media de  $n = 3-5$  plántulas.

#### 4.2.3. SEÑALIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN RAÍCES DE *C. annuum* CON CaO

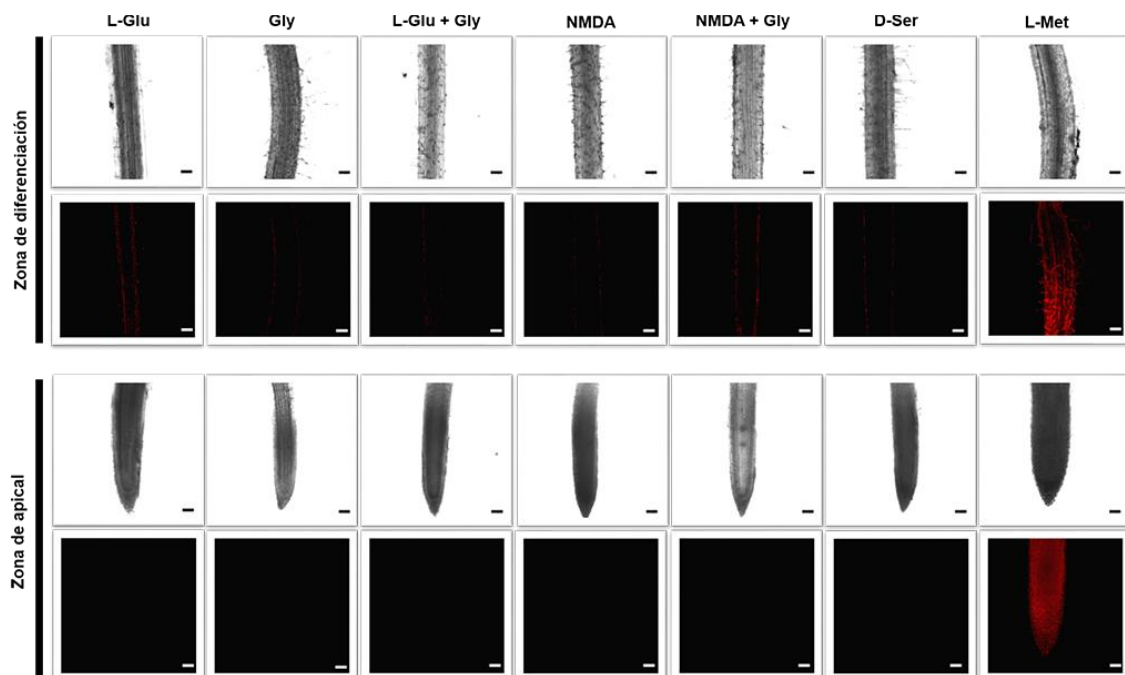
Los estudios con microscopía confocal permiten la localización y evaluación semicuantitativa de concentraciones de calcio citosólico mediante el uso de indicadores de calcio selectivos. En este proyecto, se utilizó CaO para evaluar dichas concentraciones en raíces de *C. annuum* en respuesta a la aplicación de ciertos fármacos. En la Figura 4.10 se muestran las raíces testigo (con y sin CaO); ambos experimentos demuestran ausencia de fluorescencia, indicativo de que no se detectó  $\text{Ca}^{2+}$  en estas raíces.





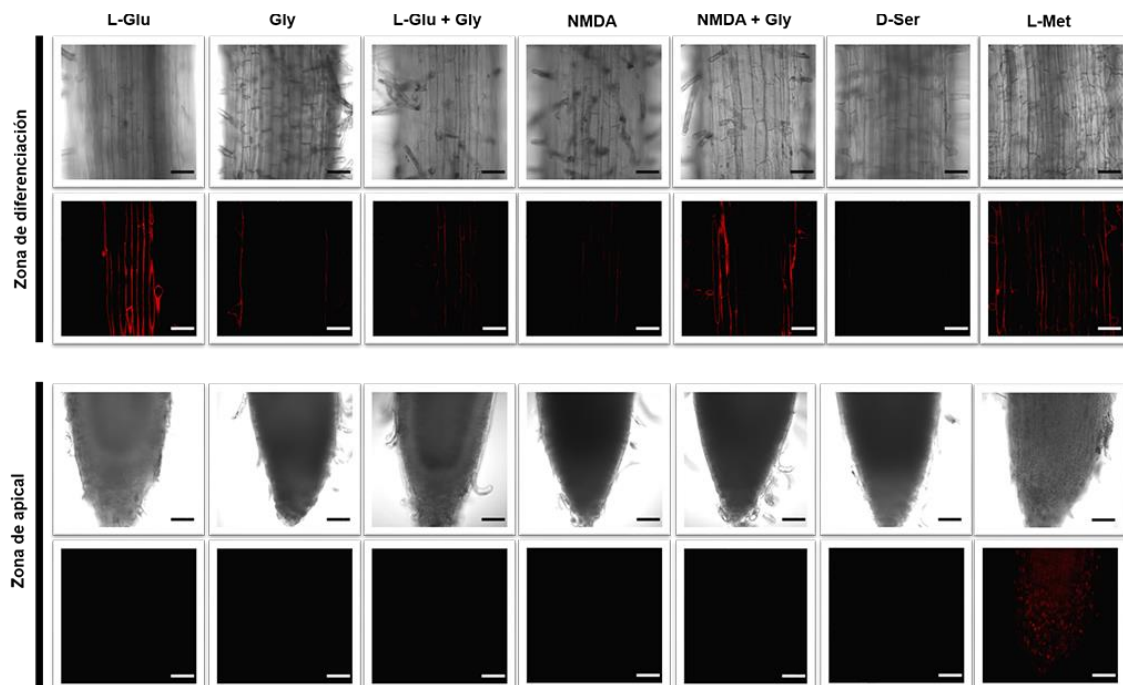
**Figura 4.9.** Raíces de *C. annuum* testigo (sin CaO: a la izquierda y con CaO: a la derecha). La barra representa una escala de 100  $\mu$ M.

Para llevar a cabo este experimento, las raíces fueron tratadas simultáneamente con los fármacos y en presencia del fluoróforo sensible a calcio. El tratamiento con todos los aminoácidos que se ensayaron y agonistas de los iGluRs provocaron fluorescencia en la raíz después de los 60 min de incubación. Esta fluorescencia se observó preferentemente en la zona de diferenciación y muy poca en el ápice, excepto para los tratamientos con L-Met, que también fue observada en el ápice de la raíz (Figura 4.11).



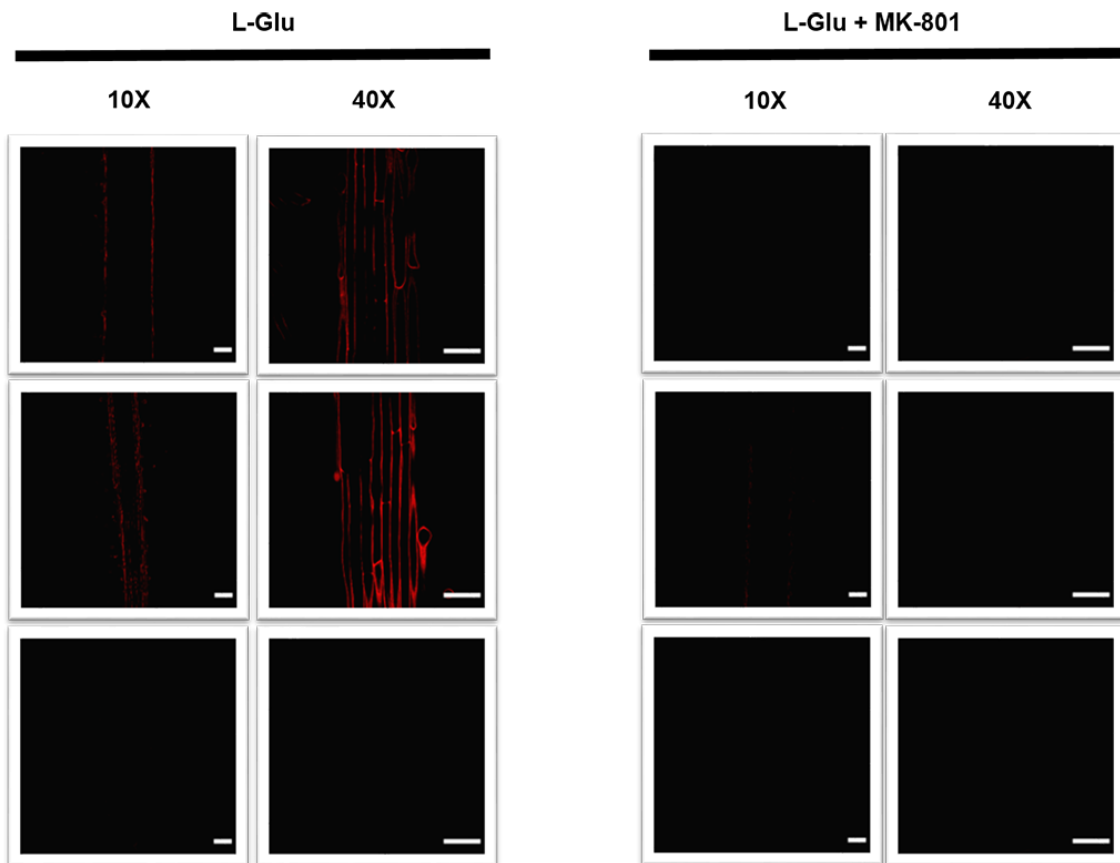
**Figura 4.10.** Variaciones de calcio intracelular en raíces de *C. annuum* bajo diferentes tratamientos de aminoácidos y el agonista NMDA. Las imágenes fueron tomadas en dos zonas; zona apical y zona de diferenciación, después de una 1 h de tratamiento. Los fármacos a evaluar fueron: L-Glu 0.1 mM, Gly 0.1 mM, Glu 0.1 mM + Gly 0.1 mM, NMDA 0.1 mM, NMDA 0.1 mM + Gly 1 mM, D-Ser 1 mM y L-Met 1 mM. La barra representa una escala de 100  $\mu$ M.

En la Figura 4.12 se muestran magnificaciones a 40X de las imágenes presentadas en la figura anterior. Se puede apreciar que L-Glu indujo una señal mayoritaria en la zona de diferenciación, mientras que los tratamientos en conjunto de NMDA y Gly incrementaron la señal, en comparación a la previamente observada. Igualmente, la señal más fuerte en el meristemo de la raíz fue observada con el tratamiento con L-Met.



**Figura 4.11.** Variaciones de calcio intracelular en raíces de *C. annuum* bajo diferentes tratamientos a 40X. Las imágenes fueron tomadas en dos zonas; zona apical y zona de diferenciación. Los fármacos a evaluar fueron: L-Glu 0.1 mM, Gly 0.1 mM, Glu 0.1 mM + Gly 0.1 mM, NMDA 0.1 mM, NMDA 0.1 mM + Gly 1 mM, D-Ser 1 mM y L-Met 1 mM. La barra representa una escala de 100  $\mu$ M.

MK-801 es un antagonista de los iGluRs del tipo NMDA que se une al sitio del poro. La aplicación de éste debería bloquear el flujo de calcio al citosol y, por tanto, la fluorescencia emitida. En la Figura 4.14 se muestra este efecto.



**Figura 4.12.** Variaciones de calcio intracelular en raíces de *C. annuum* incubadas con 0.1 mM de Glu + 0.2 mM de MK-801. Las imágenes fueron tomadas en tres zonas; la inferior representa la zona apical, la intermedia representa la zona de diferenciación y la superior representa una segunda zona de diferenciación más cercana a la base de la raíz. La barra representa una escala de 100  $\mu$ M.

En los últimos dos apartados (1.2.2 y 1.2.3), se evaluó la actividad de los posibles GLR presentes en las raíces de *C. annuum* a través de dos técnicas, MIFE y microscopía confocal, ambas para estudiar la actividad de los posibles GLRs presentes en las raíces de *C. annuum*.

En conjunto, los resultados sugieren que L-Glu (preferencialmente a la dosis de 0.1 mM) es capaz de activar GLRs presentes en la RP de chile serrano. En *Arabidopsis*, este mismo aminoácido, a las concentraciones de 0.05 y 1.0 mM, activó corrientes de  $Ca^{2+}$  en protoplastos de raíces; estos resultados se llevaron a cabo con la técnica de patch-clamp (Dennison & Spalding *et al.*, 2000, Demidchik *et al.*, 2004). Además, por medio de una técnica basada en luminiscencia por medio de aecuatorina, L-Glu (5 mM) indujo la elevación en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en células de tabaco, y dicho flujo fue suprimido por la adición de antagonistas de los iGluRs (350  $\mu$ M MK-801 y 1 mM DNQX) (Vatsa *et al.*, 2011).

Ni *et al.* (2016), usaron un sistema de luminiscencia basado en acuaporina para probar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en raíces de arroz con siete diferentes aminoácidos como posibles agonistas. El experimento arrojó que Glu era el único que desencadenaba flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las raíces y este efecto incrementaba a mayores dosis de dicho aminoácido, además, CNQX y DNQX reducen dicho flujo de calcio.

Los resultados expuestos en estos apartados también demostraron que el uso de Glu y Gly en conjunto, provocó elevación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . En *Arabidopsis*, se obtuvieron resultados similares por medio de la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  por aecurina; Glu 0.01 mM + Gly 0.01 mM, aumentan los niveles de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y DNQX los inhibe (Dubos *et al.*, 2003). Por otra parte, por medio de la electrofisiología y el uso de mutantes, Qi *et al.*, (2006) demostraron que la aplicación de ambos aminoácidos en raíces de *Arabidopsis* desencadena corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en *glr3.3*, despolarizando el potencial de membrana.

Además, por medio de la expresión heteróloga y caracterización electrofisiológica en ovocitos de *Xenopus laevis*, se demostró que *AtGLR3.7* condujo los cationes  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  a través de la membrana plasmática (Roy *et al.*, 2008); y *AtGLR1.1*, así como *AtGLR1.4* fueron permeables a  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (Tapken y Hollmann, 2008).

Los reportes hasta la fecha, refuerzan lo observado en este trabajo, sugiriendo la existencia de GLRs en las raíces de chile serrano, y que, participan en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula.

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue identificar la presencia y actividad de posibles GLRs en las raíces de *C. annuum* a través de estudios farmacológicos y moleculares.

NMDA y AMPA (agonistas) son compuestos sintéticos, y KA (agonista) se extrae de ciertas algas; ninguna de estas sustancias se encuentra en el cerebro (Lerma *et al.*, 1997). Estos tres compuestos son usados como herramientas farmacológicas para el estudio de iGluRs.

En animales, estos fármacos agonistas son compuestos químicos afines y específicos que se unen al sitio de unión del agonista en un receptor y provocan una respuesta en forma de cascada de señalización (Kew y Kemp, 2005). Por el contrario, los antagonistas son compuestos químicos similares en estructura al agonista y son capaces de unirse al sitio de unión del agonista, pero no desencadenan una respuesta biológica (Clementi y Fumagali, 2015).

Para responder a la pregunta general realizada en este proyecto: ¿Cuál población (tipo) de GLRs están presentes en la raíz de *C. annuum*?, se realizó, de primera instancia, la caracterización del efecto de agonistas y antagonistas específicos de los iGluRs sobre parámetros del crecimiento radical en plantas de chile serrano bajo condiciones *in vitro*. En caso de que la adición de estos fármacos modulara la arquitectura radicular entonces estos cambios podrían deberse a la participación de GLRs.

Por tanto, se evaluó primero el efecto de NMDA sobre la raíz de *C. annuum*. El agonista NMDA inhibió el crecimiento de la RP en esta especie; sorprendentemente AP-5 no provoca el efecto contrario, sino que tiene el mismo efecto. En *Arabidopsis*, se ha reportado que el NMDA estimula el crecimiento de la RP (Singh y Chang, 2018), mientras que AP-5 no tiene efecto sobre este parámetro (Walch-Liu *et al.*, 2006). Este resultado contrasta con lo observado en el laboratorio.

Dado lo anterior se sugiere que el sitio de unión del agonista no está conservado para el propio antagonista, o incluso podría tratarse de receptores diferentes al de mamíferos. El antagonista podría estarse uniendo a un sitio diferente al que el agonista se une.

Al utilizar el agonista AMPA y el antagonista de este tipo de receptores DNQX, estos compuestos tuvieron un efecto antagónico sobre el crecimiento de la RP de chile

serrano: AMPA estimuló transitoriamente este parámetro mientras que DNQX lo inhibió. Receptores AMPA podrían estar implicados en la arquitectura radical de los chiles, actuando sobre la RP. En particular, el crecimiento de la RP es importante para la exploración profunda de los suelos, lo cual puede repercutir en una mejor captación del agua y de los nutrientes que tienen una mayor difusión en el mismo, como es el caso del nitrato.

En cuanto a RLs, el agonista NMDA inhibió la formación y crecimiento de RL en *C. annuum*; por el contrario, AP-5 estimula dichos eventos. En *Arabidopsis*, NMDA tiene un efecto opuesto a lo antes mencionado, estimula el desarrollo de RLs (Singh y Chang, 2018). Además, en este trabajo, el agonista AMPA inhibió la formación de RLs, y las que lograron formarse no se elongaron. El mismo efecto fue observado con DNQX. En *Arabidopsis*, la adición de AMPA a las raíces da como resultado un fenotipo opuesto al observado en este trabajo, de forma que estimula el desarrollo de éstas (Singh y Chang, 2018). Estos datos sugieren diferencias importantes entre especies para esta familia de proteínas.

La aparición de RLs ocurre en la zona diferenciada de la RP; se originan específica y exclusivamente a partir de las células del periciclo a partir de la formación de PRL; en este proceso, participa la señalización de auxina y la acción de ciertos factores de transcripción como LBD16 y LBD18 (Rybel *et al.*, 2009), estos sucesos son importante para la aparición o no de RLs. Este evento es evaluado indirectamente en este proyecto a través del NRL. La relación entre los GLR y la señalización por auxina, aún no ha sido estudiada.

Después de las divisiones de los PRLs que dan lugar a las RLs y la subsecuente emergencia de éstas de la epidermis de la RP, empieza su elongación controlada por su propio meristemo apical. Este evento es evaluado en este proyecto en dos parámetros, LPRL y LTRL.

En resumen, en cuanto a RP no hubo un efecto antagónico entre NMDA y AP-5, mientras que en la evaluación de RLs, sí hubo un efecto opuesto. Estos resultados sugieren que los GLRs del tipo NMDA que podrían estar participando en la regulación del crecimiento de la RP parecen ser diferentes a los que regulan la proliferación de RLs. Sin embargo, en ambos casos estos receptores parecen regular de manera negativa el crecimiento. En cambio, AMPA estimuló transitoriamente el crecimiento de la RP e inhibió el desarrollo de RLs, mientras que DNQX inhibió tanto la RP como la aparición y crecimiento de RL.

Estos resultados son muy interesantes y sugieren que para la regulación del crecimiento de la RP podrían funcionar complejos de receptores de diferentes tipos (NMDA y AMPA) con efectos antagónicos, estimulatorios e inhibitorios. Este comportamiento sugiere que el crecimiento de este órgano podría ser regulado de diferentes maneras de acuerdo a la presencia de agonistas particulares de estos GLR, que se encuentren en el suelo. En cambio, los diferentes tipos podrían actuar de manera coordinada para regular de manera negativa la proliferación de RLs.

La siguiente pregunta abordada en este trabajo fue: ¿Cuáles GLRs podrían estar presentes en la raíz de *C. annuum*? Para ello, se decidió evaluar los niveles de transcritos de los 12 GLR en raíces de esta especie. En la caracterización *in silico* realizada inicialmente se observaron grandes diferencias evolutivas entre los AtGLR y los CaGLR. Estas especies no comparten el clado I, mientras que no se encontraron miembros del clado II de *C. annuum*, que sean compartidos con los del mismo clado de *A. thaliana* y el de tomate SIGLR2.6. Los miembros del clado III sí estuvieron compartidos entre éstas especies.

La presencia de transcritos de GLRs en la raíz de chile serrano refuerza los resultados anteriores, y los hace más interesantes dadas las anteriores conclusiones. En este proyecto, la raíz fue seccionada en tres zonas de 2 cm aproximadamente cada una. Cuatro (*CaGLR1.1*, *CaGLR1.2*, *CaGLR2.4* y *CaGLR3.5*) de los 12 genes estudiados no muestran expresión en ninguna zona de la raíz. En cambio, los genes *CaGLR2.2* y *CaGLR2.3* parecen expresarse preferencialmente en la zona más cercana a la base de la raíz, y los de la Familia III (*CaGLR3.1*-*CaGLR3.4*) se expresan mayoritariamente en la zona más cercana al meristemo apical.

De forma integradora, los receptores activos involucrados en la inhibición o estimulación del crecimiento de la RP activados por NMDA y AMPA, respectivamente, podrían estar formados preferentemente por GLRs de la Familia III, ya que estos se expresaron más en la zona apical. De forma similar, los receptores activos involucrados en la aparición y crecimiento de RLs aparentemente relacionado con la aplicación de AP-5 podrían estar formados por GLRs como el 2.2 y el 2.3.

En *Arabidopsis* los 20 genes se expresaron en raíces, siendo los de la Familia III los que se expresaban mayoritariamente (Chiu *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2008; Weiland *et al.*, 2016).

Por medio de estudios de microchip y PCR en tiempo real, se demostró la expresión de

seis de los 24 genes en *O. sativa*, siendo el *OsGLR3.1*, *OsGLR4.9* y *OsGLR3.6* los que se expresan mayoritariamente (Singh *et al.*, 2014).

En *S. lycopersicum* fueron evaluados 13 genes de *GLR* en diferentes tejidos de la planta y cuatro de ellos (*SIGLR1.1*, 1,2, 2.2 y 3.1) fueron publicados, dando como resultado que se expresaron en raíces. *SIGLR1.1* fue más específico para raíces en comparación con los otros órganos, así como respecto a los otros *SIGLRs* evaluados (Aouini *et al.*, 2012). Resulta interesante que, en Chile, una especie que pertenece a las solanáceas como tomate, los genes *CaGLR1.1* y *CaGLR1.2* no hayan seguido estos patrones.

En este trabajo también se realizó la identificación de posibles GLRs a través de su actividad mediante la medición de flujo neto de  $\text{Ca}^{2+}$  por la técnica MIFE, así como  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  por medio de un fluoróforo CaO.

Los resultados aquí descritos llevan a proponer y a reforzar la existencia de GLRs en las raíces de *C. annuum* a través del estudio de su actividad. Aminoácidos que fungen como agonistas de los receptores en mamíferos provocaron flujos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las raíces de Chile serrano (L-Glu, Gly, L-Met y D-Ser). Por el contrario, NMDA evoca flujo de salida del catión a través de la técnica MIFE, siendo similar para AMPA. La adición de antagonistas de los iGluRs del tipo NMDA provocó disminución en el flujo de entrada o salida según sea el caso, sugiriendo que se unen al mismo sitio del agonista, suprimiendo la respuesta original.

Algunos de estos resultados fueron reforzados con los realizados con CaO. L-Glu, Gly, NMDA y D-Ser mostraron fluorescencia en la zona diferenciada de la raíz debido a la unión del fluoróforo con calcio. De manera sorprendente, L-Met fue el único aminoácido que provocó fluorescencia en toda la raíz. La aplicación simultánea de un antagonista (MK-801) con L-Glu provocó disminución en la fluorescencia; es decir, en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , inducida por el aminoácido.

Hay muy pocos reportes en la literatura que estudian con electrofisiología estos canales en plantas. Agonistas como NMDA, Glu y Gly evocan PAs en una hepática (Krol *et al.*, 2007), una planta no vascular muy antigua, demostrando la presencia de GLRs incluso en plantas ancestrales.

L-Glu induce despolarización de la membrana plasmática (Dubos *et al.*, 2003; Sivaguru *et al.*, 2003; Demidchik *et al.*, 2018) y la elevación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células de tabaco (Vatsa *et al.*, 2011b), en arroz (Ni *et al.*, 2016) y en



hojas de cebada (Felle y Zimmermann, 2007b).

El aminoácido D-Ser participa en el crecimiento del tubo polínico como un agonista activo en estudios realizados en tabaco y en *Arabidopsis* (Michard *et al.*, 2011). Siete de los veinte aminoácidos estándares, L-Met, L-Trp, L-Phe, L-Leu, L-Tyr, L-Asp y L-Thr (Tapken *et al.*, 2013) actuaron como agonistas despolarizando la membrana en hojas de *Arabidopsis* a través de un AtGLR1.4. En este trabajo, la L-Met no sólo fue el agonista más efectivo sino el más potente, similar a lo observado por Tapken *et al.*, (2013). Meyerhoff *et al.*, (2005), concluyeron que DNQX, CNQX, así como MNQX reducen corrientes de Ca<sup>2+</sup> dependientes de Glu en células del mesófilo en *A. thaliana*.

Este trabajo es el primero que demuestra la presencia y la participación de estas proteínas en la arquitectura radical en el género de *Capsicum*.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA

#### CONCLUSIONES

En el genoma de *C. annuum* existen 12 genes con similitud en secuencia a los iGluRs de mamíferos.

Se observó que los fármacos aplicados afectan el crecimiento de las plántulas *in vitro*, dependiendo del tipo de fármaco y su concentración. NMDA, AP-5 y DNQX inhibieron el crecimiento de la raíz; y AMPA lo estimuló transitoriamente. Por otro lado, NMDA, AMPA Y DNQX inhibieron la formación y crecimiento de raíces laterales, mientras que AP-5 las estimuló.

Se detectó la presencia de transcritos de *GLR* en la raíz, cuatro de los 12 evaluados no se expresaron, los dos del clado I (*CaGLR1.1* y *CaGLR1.2*) así como *CaGLR2.4* y *CaGLR3.5*. Además, dos genes (*CaGLR2.2* y *CaGLR2.3*) parecen expresarse preferencialmente en la zona más cercana a la base de la raíz, y los genes del clado III (*CaGLR3.1-CaGLR3.4*) se expresan a favor de la zona más cercana al meristemo apical.

CaGLRs participan en el flujo de entrada de calcio en raíces de chile serrano mediante su activación por L-Glu, Gly, L-Met y D-Ser.

#### PERSPECTIVAS

En este trabajo se caracterizó la respuesta de las plántulas de chile serrano a la aplicación de los diferentes fármacos y su intervención en el desarrollo fisiológico de las plantas de chile habanero.

Una perspectiva importante es estudiar las interacciones entre posibles CaGLRs, más específicamente entre los que demostraron expresión en la zona apical de la raíz, así como la zona diferenciada con el fin de sugerir las subunidades que podrían formar al receptor activo.

Además, se podrían realizar protoplastos de células epidérmicas y corticales para estudiar la actividad de estos canales de forma más específica, tanto para electrofisiología como para microscopía confocal.

Todos los resultados aquí obtenidos son información relevante que ayuda a sugerir la presencia de receptores, así como su papel; sin embargo, para un mejor análisis sería interesante utilizar vectores de silenciamiento para generar plantas mutantes para el análisis funcional del receptor y su localización subcelular utilizando microscopía confocal y expresión heteróloga.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aouini, A., Matsukura, C., Ezura, H., y Asamizu, E. (2012). Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*, 493(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.037>
- Bouché, N., Lacombe, B., y Fromm, H. (2003). GABA signaling: A conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in Cell Biology*, 13(12), 607–610. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.10.001>
- Brenner, E. D., Feinberg, P., Runko, S., y Coruzzi, G. M. (2009). A mutation in the Proteosomal Regulatory Particle AAA-ATPase-3 in Arabidopsis impairs the light-specific hypocotyl elongation response elicited by a glutamate receptor agonist, BMAA. *Plant Molecular Biology*, 70(5), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9489-7>
- Brenner, E. D., Martínez-Barboza, N., Clark, A. P., Liang, Q. S., Stevenson, D. W., y Coruzzi, G. M. (2000). Arabidopsis mutants resistant to S(+)- $\beta$ -methyl- $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiology*, 124(4), 1615–1624. Retrieved from c:%5CDocuments and Settings%5Cfordeb%5CMy Documents%5CPDF files%5CBrenner *et al.* 2000.pdf
- Cabañas, M., de la Luz, M., Lamothe, A. L., Suárez, D., Domínguez, Y. *Prácticas de Botánica Morfológica y Sistemática*, 2005
- Celis-arámbaro, T. D. J., Carrillo-pech, M., Castro-concha, L. A., Miranda-ham, M. D. L., Martínez-estévez, M., y Echevarría-machado, I. (2011). Plant Physiology and Biochemistry Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology et Biochemistry*, 49(12), 1456–1464. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.09.003>
- Chang, I. F., Curran, A., Woolsey, R., Quilici, D., Cushman, J. C., Mittler, R., ... Harper, J. F. (2009). Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 9(11), 2967–2985. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800445>
- Chen, B. S., y Roche, K. W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation.

*Neuropharmacology*, 53(3), 362–368.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.018>

Chen, G., Cui, C., Mayer, M. L., y Gouaux, E. (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor, *402*(December).

Chiu, J. C., Brenner, E. D., DeSalle, R., Nitabach, M. N., Holmes, T. C., y Coruzzi, G. M. (2002). Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(7), 1066–1082.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004165>

Chiu, J., DeSalle, R., Lam, H. M., Meisel, L., y Coruzzi, G. (1999). Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Molecular Biology and Evolution*, 16(6), 826–838.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026167>

Cho, D., Kim, S. A., Murata, Y., Lee, S., Jae, S., Nam, H. G., ... Genetics, M. (2009). De-regulated expression of the plant glutamate receptor stomatal closure, 437–449.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03789.x>

Clementi, F. y F. G. (2015). *General and Molecular Pharmacology-Principles of Drug Action*. (G. Clementi, Francesco y Fumagalli, Ed.) (4th ed.). Italian: John Wiley y Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Davenport, R. (2002). Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*, 90(5), 549–557.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf228>

De Loof, A. (2016). The cell's self-generated “electrome”: The biophysical essence of the immaterial dimension of Life?. *Communicative & integrative biology*, 9(5), e1197446.

de Toledo, G. R., Parise, A. G., Simmi, F. Z., Costa, A. V., Senko, L. G., Debono, M. W., & Souza, G. M. (2019). Plant electrome: the electrical dimension of plant life. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 31(1), 21-46.

Demidchik, V., Essah, P. A., y Tester, M. (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta*, 219(1), 167–175.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1207-8>

Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., y Pottosin, I. (2018). *Tansley*

- review Calcium transport across plant membranes : mechanisms and functions, 49–69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>
- Dennison, K. L., y Spalding, E. P. (2000). Glutamate-Gated Calcium Fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1511–1514. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1511>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., y Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7–61. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Dominguez-May, A. V., Carrillo-Pech, M., Barredo-Pool, F. A., Martinez-Estevez, M., Us-Camas, R. Y., Moreno-Valenzuela, O. A., y Echevarria-Machado, I. (2013). A Novel Effect for Glycine on Root System Growth of Habanero Pepper. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 138(6), 433–442. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/138/6/433.full>
- Dubos, C., Huggins, D., Grant, G. H., Knight, M. R., y Campbell, M. M. (2003). A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *Plant Journal*, 35(6), 800–810. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01849.x>
- Dubos, C., Willment, J., Muggins, D., Grant, G. H., y Campbell, M. M. (2005). Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation. *Plant Journal*, 43(3), 348–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02458.x>
- Felle, H. H., y Zimmermann, M. R. (2007a). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta*, 226, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0458-y>
- Felle, H. H., y Zimmermann, M. R. (2007b). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta*, 226, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0458-y>
- Forde, B. G., Cutler, S. R., Zaman, N., y Krysan, P. J. (2013). Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in Arabidopsis root architecture. *Plant Journal*, 75(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/tpj.12201>
- Forde, B. G., y Roberts, M. R. (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000prime Reports*, 6(June 2014), 37. <https://doi.org/10.12703/P6-37>
- Fu, H., Subramanian, R. R., y Masters, S. C. (2000). 14-3-3 P ROTEINS : Structure ,

Function , and Regulation.

Garmborg. (1968). NUTRIENT REQUIREMENTS OF SOYBEAN OF SUSPENSION, *158*(9901), 151–158.

Kang, J., Mehta, S., y Turano, F. J. (2004). Regulates Abscisic Acid Biosynthesis and Signaling to Control Development and Water Loss, *45*(10), 1380–1389.

Kang, J., y 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 of the United States of America*, *100*(11), 6872–6877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030961100>

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<sup>2+</sup> influx and delays fungal infection. *Molecules and Cells*, *21*(3), 418–427. <https://doi.org/10.1159/000094288>

Kew, J. N. C., y Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology, 4–29. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>

Kim, S. A., Kwak, J. M., Jae, S.-K., Wang, M.-H., y 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 Cell Physiol*, *42*(1), 74–84. Retrieved from [https://watermark.silverchair.com/pce008.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAdMwggHPBqkqhkiG9w0BBwagggHAMII BvAIBADCCAbUGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMs\\_Kxmc2AwT6EoFDWAgEQgIBhrj5s63j4urKj3zjwO\\_x08\\_0jCnBrq8PxHHmVKYrUhsHNu0oHZkZXq53kxun-VpYJev09Poo4bruuV\\_Gyiu6AohApSEVVtW3KSeLpJf-bKFWR1ppWT1oCLsoV0QjMZ0PBc3p4i85BCNfgcAdG3afJca\\_gOrn26WCEFvOe89WfBDz06OH7CzZ\\_S2jAOA5bBDcMPV4VY\\_hY4kVeQX7T\\_UY0jf39KTNSwTodjWQqwwY4xjxUtEOKKj6xos57Dk0erWEtaLBYVYquyt-vQ2JFtUsH89LcWv3r7dVkBGLXnHF3\\_upf1Uka6IbUB6AFABspTnWOTHquhf2yJrmA1QQyxqs5XRycMzh4aWq9v9GEhTofutC0TEr8d-z1N5ANw3av4GwX41diY9wATp2JC3AOwYpDB8R\\_kmUbLaSq3Z-K-VODtIYvdy3LQvYiwQJvOqtHE09iXQy1\\_K5oykgnibD4A-PyaxOqPchiUi6Bon5az5APb7YwMgrDKusC9ac67nCdWlou2-tgbeaQ](https://watermark.silverchair.com/pce008.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAdMwggHPBqkqhkiG9w0BBwagggHAMII BvAIBADCCAbUGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMs_Kxmc2AwT6EoFDWAgEQgIBhrj5s63j4urKj3zjwO_x08_0jCnBrq8PxHHmVKYrUhsHNu0oHZkZXq53kxun-VpYJev09Poo4bruuV_Gyiu6AohApSEVVtW3KSeLpJf-bKFWR1ppWT1oCLsoV0QjMZ0PBc3p4i85BCNfgcAdG3afJca_gOrn26WCEFvOe89WfBDz06OH7CzZ_S2jAOA5bBDcMPV4VY_hY4kVeQX7T_UY0jf39KTNSwTodjWQqwwY4xjxUtEOKKj6xos57Dk0erWEtaLBYVYquyt-vQ2JFtUsH89LcWv3r7dVkBGLXnHF3_upf1Uka6IbUB6AFABspTnWOTHquhf2yJrmA1QQyxqs5XRycMzh4aWq9v9GEhTofutC0TEr8d-z1N5ANw3av4GwX41diY9wATp2JC3AOwYpDB8R_kmUbLaSq3Z-K-VODtIYvdy3LQvYiwQJvOqtHE09iXQy1_K5oykgnibD4A-PyaxOqPchiUi6Bon5az5APb7YwMgrDKusC9ac67nCdWlou2-tgbeaQ)

- Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., y Vavilis, T. D. (2015). Researching glutamate “ induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(March), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>
- Krol, E., Dziubinska, H., Trebacz, K., Koselski, M., y Stolarz, M. (2007). The influence of glutamic and aminoacetic acids on the excitability of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.04.015>
- Kwaaitaal, M., Huisman, R., Maintz, J., Reinstadler, a, Panstruga, R., Reinstädler, A., y Panstruga, R. (2011). Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 440(3), 355–365. <https://doi.org/10.1042/BJ20111112>
- Lam, H.-M., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Meisel, L., Oliveira, I. C., Shin, M., y Coruzzi, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396(November), 125–126. <https://doi.org/10.1038/24066>
- Lerma, J., Morales, M., Vicente, M. A., y Herreras, O. (1997). Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*, 20(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)20055-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)20055-4)
- Li, G., Wu, S., Cai, L., Wang, Q., Zhao, X., y Wu, C. (2013). Identification and mRNA expression profile of glutamate receptor-like gene in quinclorac-resistant and susceptible *Echinochloa crus-galli*. *Gene*, 531(2), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.013>
- 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037713>
- Maricq, A. V., Peckol, E., Driscoll, M., y Bargmann, C. I. (1995). Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor. *Nature*, 378(6552), 78–81. <https://doi.org/10.1038/378078a0>
- Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, M. R. G., Latz, A., Lacombe, B., Hedrich, R., ... Becker, D. (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*, 222(3), 418–427. <https://doi.org/10.1007/s00425-005->



1551-3

- Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., ... Feijó, J. a. (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6028), 434–437. <https://doi.org/10.1126/science.1201101>
- Miller, N. D., Brooks, T. L. D., Assadi, A. H., y 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. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.118711>
- Nagata, T., Iizumi, S., Satoh, K., Ooka, H., Kawai, J., Carninci, P., ... Kikuchi, S. (2004). Comparative analysis of plant and animal calcium signal transduction element using plant full-length cDNA data. *Molecular Biology and Evolution*, 21(10), 1855–1870. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh197>
- Newman, I. A. (2001). Ion transport in roots: Measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant, Cell and Environment*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00661.x>
- Newman, I., Chen, S. L., Porterfield, D. M., & Sun, J. (2012). Non-invasive flux measurements using microsensors: theory, limitations, and systems. In *Plant Salt Tolerance* (pp. 101-117). Humana Press, Totowa, NJ.
- Ni, J., Yu, Z., Du, G., Zhang, Y., Taylor, J. L., Shen, C., ... Wu, Y. (2016). Heterologous Expression and Functional Analysis of Rice GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE Family Indicates its Role in Glutamate Triggered Calcium Flux in Rice Roots. *Rice*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0081-x>
- Pottosin, I., Zepeda-Jazo, I., Bose, J., & Shabala, S. (2018). An anion conductance, the essential component of the hydroxyl-radical-induced ion current in plant roots. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 897.
- Price, M. B., Jelesko, J., y Okumoto, S. (2012). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Frontiers in Plant Science*, 3(October), 235. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00235>
- Qi, Z., Stephens, N. R., y 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. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088989>

- Roy, B. C., y Mukherjee, A. (2016). Computational analysis of the glutamate receptor gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1102(September), 1–21. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1222968>
- Roy, S. J., Gilliam, M., Berger, B., Essah, P. A., Cheffings, C., Miller, A. J., y Davenport, R. J. (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*, 861–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01801.x>
- ROY, S. J., GILLIAM, M., BERGER, B., ESSAH, P. A., CHEFFINGS, C., MILLER, A. J., ... TESTER, M. (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell y Environment*, 31(6), 861–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01801.x>
- Rybel, B. De, Casimiro, I., Benkova, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., y Bennett, M. J. (2009). *Arabidopsis* lateral root development : an emerging story, (June), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Sarwat, M., Ahmad, A., Abdin, M. Z., y Ibrahim, M. M. (2017a). *Stress signaling in plants : genomics and proteomics perspective. Volume 2*. Springer.
- Sarwat, M., Ahmad, A., Abdin, M. Z., y Ibrahim, M. M. (2017b). *Stress signaling in plants : genomics and proteomics perspective. Volume 2*. Springer.
- Shabala, L., Ross, T., McMeekin, T., y Shabala, S. (2006). Non-invasive microelectrode ion flux measurements to study adaptive responses of microorganisms to the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 472–486. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00019.x>
- Shabala, S., Newman, I., Whittington, J., y Juswono, U. (1998). Protoplast ion fluxes: Their measurement and variation with time, position and osmoticum. *Planta*, 204(2), 146–152. <https://doi.org/10.1007/s004250050241>
- Singh, A., Kanwar, P., Yadav, A. K., Mishra, M., Jha, S. K., Baranwal, V., ... Pandey, G. K. (2014). Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *FEBS Journal*, 281(3), 894–915. <https://doi.org/10.1111/febs.12656>

- Singh, S. K., y Chang, I.-F. (2018). Pharmacological Studies with Specific Agonist and Antagonist of Animal iGluR on Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *GABA And Glutamate - New Developments In Neurotransmission Research*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72121>
- Singh, S. K., Chien, C. Te, y Chang, I. F. (2016). The Arabidopsis glutamate receptor-like gene GLR3.6 controls root development by repressing the Kip-related protein gene KRP4. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1853–1869. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv576>
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W., y Baskin, T. I. (2003). Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant and Cell Physiology*, 44(7), 667–675. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg094>
- Souza, G. M., Ferreira, A. S., Saraiva, G. F., & Toledo, G. R. (2017). Plant “electrome” can be pushed toward a self-organized critical state by external cues: Evidences from a study with soybean seedlings subject to different environmental conditions. *Plant signaling & behavior*, 12(3), e1290040.
- Stephens, N. R., Qi, Z., y 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. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108134>
- Tapken, D., Anschutz, U., Liu, L.-H., Huelsken, T., Seebohm, G., Becker, D., y Hollmann, M. (2013a). A Plant Homolog of Animal Glutamate Receptors Is an Ion Channel Gated by Multiple Hydrophobic Amino Acids. *Science Signaling*, 6(279), ra47-ra47. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003762>
- Tapken, D., Anschutz, U., Liu, L.-H., Huelsken, T., Seebohm, G., Becker, D., y Hollmann, M. (2013b). A Plant Homolog of Animal Glutamate Receptors Is an Ion Channel Gated by Multiple Hydrophobic Amino Acids. *Science Signaling*, 6(279), ra47-ra47. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003762>
- Tapken, D., y Hollmann\*, M. (2008). Arabidopsis thaliana Glutamate Receptor Ion Channel Function Demonstrated by Ion Pore Transplantation. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.076>
- Teardo, E., Carraretto, L., Bortoli, S. De, Costa, A., Behera, S., Wagner, R., ... Szabo, I. (2015). Alternative Splicing-Mediated Targeting of the Arabidopsis GLUTAMATE

- RECEPTOR3.5 to Mitochondria Affects Organelle Morphology. *Plant Physiology*, 167(1), 216–227. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242602>
- Teardo, E., 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 - Bioenergetics*, 1807(3), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.008>
- Teardo, E., Segalla, A., Formentin, E., Zanetti, M., Marin, O., Giacometti, G. M., ... Szabò, I. (2010). Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistr y Characterization of a Plant Glutamate Receptor Activity.
- 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. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451.405>
- Turano, F. J., Muhitch, M. J., Felker, F. C., y McMahon, M. B. (2002). The putative glutamate receptor 3.2 from Arabidopsis thaliana (AtGLR3.2) is an integral membrane peptide that accumulates in rapidly growing tissues and persists in vascular-associated tissues. *Plant Science*, 163, 43–51. Retrieved from [http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo\\_thumb/The-putative-glutamate-receptor-3-2-from-Arabidopsis-thaliana--AtGLR3-2--is-an-integral-membrane-peptide-that-accumulates-in-rapidly-growing-tissues-and-persists-in-vascular-associated-tissues.pdf](http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/The-putative-glutamate-receptor-3-2-from-Arabidopsis-thaliana--AtGLR3-2--is-an-integral-membrane-peptide-that-accumulates-in-rapidly-growing-tissues-and-persists-in-vascular-associated-tissues.pdf)
- Ultsch, A., Schuster, C. M., Laube, B., Betz, H., y 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 Lett.*, 324(2), 171–177.
- Vatsa, P., Chiltz, A., Bourque, S., Wendehenne, D., Garcia-Brugger, A., y Pugin, A. (2011a). Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production. *Biochimie*, 93(12), 2095–2101. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.006>
- Vatsa, P., Chiltz, A., Bourque, S., Wendehenne, D., Garcia-Brugger, A., y Pugin, A. (2011b). Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production. *Biochimie*, 93(12), 2095–2101.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.006>

Vincill, E. D., Bieck, A. M., y Spalding, E. P. (2012). Ca<sup>2+</sup> conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiology*, 159(1), 40–46. <https://doi.org/10.1104/pp.112.197509>

Vincill, E. D., Clarin, A. E., Molenda, J. N., y Spalding, E. P. (2013). Interacting glutamate receptor-like proteins in Phloem regulate lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(4), 1304–1313. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110668>

Walch-liu, P., y Forde, B. G. (2007). L-Glutamate as a Novel Modifier of Root Growth and Branching, 2(4), 284–286. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj075>

Walch-Liu, P., Liu, L. H., Remans, T., Tester, M., y Forde, B. G. (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(8), 1045–1057. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj075>

Wang, D., y Bosland, P. (2006). The genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41 (5): 1169-1187.

Wang, H., Shabala, L., Zhou, M., y Shabala, S. (2019). Developing a high-throughput phenotyping method for oxidative stress tolerance in barley roots, 15:12

Watkins, J. C., y Jane, D. E. (2006). The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl, S100–S108. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706444>

Weiland, M., Mancuso, S., y Baluska, F. (2016). Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 43(1), 1–25. <https://doi.org/10.1071/FP15109>

Zhu, X., Feng, Y., Liang, G., Liu, N., y Zhu, J. K. (2013). Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca<sup>2+</sup> dynamics in arabidopsis plants. *Molecular Plant*, 6(2), 444–455. <https://doi.org/10.1093/mp/sst013>

## ANEXOS

**ANEXO I.** Características de las secuencias de aminoácidos utilizadas para el diseño del árbol filogenético. Nomenclatura y números de accesoión de los 20 AtGLRs de *A. thaliana*, 13 SIGLRs de *S. lycopersicum*, 24 OsGLRs de *O. sativa*, 1 RsGLRs de *R. sativus*, 12 CaGLRs de *C. annuum* y un receptor de glutamato de la cianobacteria *Synechocystis sp.* (SynGluR0) y una proteína de unión a aminoácidos periplásmicos bacterianos GlnH (EcoliglnH); estos últimos dos son grupos externos.

Especie	Gen	Cromosoma	Longitud (pb)	Número de accesoión	de Base de datos	de aa	Número de accesoión	
<b><i>Solanum lycopersicum</i></b>	<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	
	<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<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	-
<hr/>						
<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	-
<b><i>Oriza sativa</i></b>						
<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	-
<b><i>Raphanus sativus</i></b>	<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	-
<b><i>Capsicum annum</i></b>	<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	-
<b><i>Externos</i></b>	<i>EcoligInH</i>	-	747	X14180	NCBI	249	CAA32382
	<i>SynGluR0</i>	-	1194		NCBI	398	BAA17851