



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio de los mecanismos de modulación del
crecimiento radical mediado por los D-
aminoácidos en chile habanero (*Capsicum
chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

Angélica Anahi Serralta Interian

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2020

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 Angélica Anahi Serralta Interian titulado Estudio de los mecanismos de modulación del crecimiento radical mediado por los D-aminoácidos en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas 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. Cecilia Hernández Zepeda
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 09 de Enero de 2020

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: Angélica Anahi Serralta Interian

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

AGRADECIMIENTOS

Primero doy gracias a Dios por haberme permitido cumplir un objetivo más en la vida, por ser el apoyo y la fortaleza en los momentos de dificultad y de debilidad, gracias por las alegrías producto de su apoyo y por las caídas y dificultades que me ha puesto, porque de ellas aprendo. Gracias por ponerme en el lugar correcto con las personas adecuadas.

A lo largo de este tiempo son muchos los que han contribuido en el proceso y conclusión de este trabajo a los que estoy infinitamente agradecida.

Principalmente le doy gracias mi asesora la Dra. Ileana Echevarría Machado, por todos esos años de enseñanzas académicas y de vida, por compartir logros y fracasos, por sus palabras de aliento, por todo su gran apoyo, por ser un ejemplo para nosotros. Me llevó una enorme satisfacción y alegría el haber formado parte de su grupo de trabajo, gracias por aceptarme, sin usted, esto no hubiera sido posible.

Agradezco al Dr. Manuel Martínez, gracias por haber sido parte fundamental de mi formación académica, por todos los consejos y las recomendaciones que han hecho posible la conclusión de la tesis; gracias por el apoyo ante las dificultades y tropiezos. Gracias por su tiempo brindado para las dudas y los consejos.

Agradezco a la Dra. Miranda Ham, por sus consejos, recomendaciones y cuestionamientos que me insitaron a seguir mejorando, por compartir su experiencia, por su disposición para apoyarme en las diferentes dudas que pudiera tener, por haber sido una parte importante de mi desarrollo académico.

Al Dr. Josep Dubrovsky por sus recomendaciones y cuestionamientos para la mejora de la tesis, al igual agradecerle por la estancia de investigación en su laboratorio en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

También agradezco a mi comité revisor, a la Dra. Virginia Herrera, al Dr. Rene Garruña, a la Dra. Casandra Reyes y la Dra. Ana Luisa Ramos, por el tiempo destinado a la lectura de la tesis y por las recomendaciones para poder mejorar el escrito. Igualmente agradezco al

Dr. Issac Zepeda Jazo por aceptarme en su laboratorio en la Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo para la realización de los estudios electrofisiológicos, gracias por sus consejos, apoyo y por su hospitalidad.

A la M.C. Fátima Medina por su disponibilidad para apoyarme en los diferentes requerimientos técnicos para la realización del proyecto y por sus consejos.

En el periodo de realización de la tesis hubieron momentos de alegrías y dificultades, y cada uno de estos momentos pude disfrutarlos gracias a mis compañeros de laboratorio: Fabi, Marta, Fede, Camilo, Manuel, Helbert y Jafet, gracias por sus consejos, aportaciones, por su disponibilidad a apoyarme, por las risas, las experiencias, por hacer de este periodo una estancia inigualable.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por permitirme ser parte de esta institución por todo el periodo de mi formación en esta área de conocimiento, al personal de posgrado por sus atenciones antes los tramites y dudas.

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por todas las facilidades proporcionadas, por las instalaciones y los equipos brindados.

Al CONACYT por la beca otorgada N° 474112.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mis padres, mis hermanos e Ivan, gracias por su apoyo incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 FORMAS DE NITRÓGENO EN EL SUELO, SU ABSORCIÓN Y ASIMILACIÓN POR LAS PLANTAS	3
1.2 PRESENCIA DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN LA NATURALEZA	5
1.3 PRESENCIA DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN EL SUELO.....	6
1.4 PRESENCIA DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN LAS PLANTAS	7
1.5 METABOLISMO DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN LAS PLANTAS.....	8
1.6 FUNCIÓN DE LOS D-AMINOÁCIDOS EN LAS PLANTAS	12
1.6.1 EFECTOS TÓXICOS DE LOS D-AMINOÁCIDOS.....	12
1.6.2 EFECTOS ESTIMULATORIOS DE LOS D-AMINOÁCIDOS	13
1.7 LOS D-AMINOÁCIDOS ACTÚAN COMO UN LENGUAJE QUÍMICO PARA MEDIAR LA COMUNICACIÓN ENTRE ESPECIES.....	16
1.8 GENERALIDADES DEL SISTEMA RADICAL Y SU REGULACIÓN	18
1.9 INFLUENCIA DE LOS NUTRIENTES EN EL DESARROLLO DE LA ARQUITECTURA RADICAL	22
1.10 RECEPTORES DE GLUTAMATO Y SU FUNCIÓN EN PLANTAS.....	26
1.11 MODELO DE ESTUDIO: CHILE HABANERO	29
1.11.1 ANTECEDENTES DEL EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE CHILE HABANERO	31

HIPOTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
JUSTIFICACIÓN	34
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
CAPÍTULO II	37
CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL EN CHILE HABANERO EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>.....	37
2.1 INTRODUCCIÓN	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	39
2.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL EN EL MODELO <i>IN VITRO</i>	39
2.2.4 CURVA DOSIS-RESPUESTA	41
2.2.5 CURSO TEMPORAL.....	42
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
2.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL EN EL MODELO <i>IN VITRO</i>	42
2.3.2 EFECTOS DE LA MEZCLA DE LOS D-AA SOBRE LA FORMACIÓN DE EVENTOS DE INICIACIÓN DE RAÍZ LATERAL	44
2.3.3 EXPERIMENTO DE CURVA DOSIS- RESPUESTA.....	49
2.3.4 CURSO TEMPORAL.....	51

CAPÍTULO III	54
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS AUXINAS EN LA RESPUESTA RADICAL INDUCIDA POR LOS D-AAs	54
3.1 INTRODUCCIÓN	54
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	55
3.2.2 TRATAMIENTOS CON ANTI-AUXINA.....	56
3.2.3 DISEÑO DE CEBADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE <i>LBD16</i> Y <i>LBD18</i> EN CHILE HABANERO	56
3.2.4 NIVEL DE TRANSCRITOS DE LOS GENES <i>LBD</i>	57
3.2.5 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE LOS GENES <i>LBD16</i> Y <i>LBD18</i> DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i>	58
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
3.3.1 PARTICIPACIÓN DE LAS AUXINAS EN EL CRECIMIENTO DE LA RP MEDIADO POR LA MEZCLA DE D-AAs	58
3.3.2 PARTICIPACIÓN DE LAS AUXINAS EN LA INDUCCIÓN DE RLS MEDIADO POR LA MEZCLA DE D-AAs.	61
3.3.3 IDENTIFICACIÓN DE GENES PUTATIVOS <i>LBD16</i> Y <i>LBD18</i> EN EL GENOMA DE <i>CAPSICUM</i>	64
3.3.4 EVALUACIÓN DEL NIVEL DE TRANSCRITOS DE LOS GENES <i>LBD</i> EN RESPUESTA A AUXINA EN RAÍCES TRATADAS CON LA MEZCLA DE D-AAs.....	70
CAPÍTULO IV.....	74
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN LAS RAÍCES EXPUESTAS A LA MEZCLA DE LOS D-AAs VAL, LEU Y CYS	74
4.1 INTRODUCCIÓN	74
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	76

4.2.1 MATERIAL VEGETAL	76
4.2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y TRATAMIENTOS CON AMINOÁCIDOS.....	76
4.2.3 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE TRANSCRITOS DE LOS <i>GLRs</i> EN PLÁNTULAS EXPUESTAS A LOS D-AAs.....	77
4.2.4 DETERMINACIÓN DEL FLUJO NETO DE Ca^{2+} POR LA TÉCNICA MIFE	79
4.2.5 DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. 80	
4.2.6. ANÁLISIS DE NITRATO, AMINOÁCIDOS TOTALES Y PROTEÍNAS TOTALES EN LOS TEJIDOS DE LAS PLANTAS	81
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
4.3.1 VARIACIÓN EN EL CRECIMIENTO RADICAL DE LAS DIFERENTES VARIEDADES DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A LA MEZCLA DE LOS D-AAs	82
4.3.2 MEDICIÓN DEL FLUJO DE Ca^{2+} EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO POR LA TÉCNICA MIFE.....	86
4.3.3 EVALUACIÓN DEL FLUJO DE Ca^{2+} EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO POR MEDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL	88
4.3.4 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON LOS AMINOÁCIDOS SOBRE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN LAS VARIEDADES DE CHILE HABANERO	89
4.3.5 EFECTO DE LOS D-AAs SOBRE LOS NIVELES DE NITRATO, AMINOÁCIDOS TOTALES Y PROTEÍNAS TOTALES	95
CAPÍTULO V	99
DISCUSIÓN GENERAL	99
CAPÍTULO VI.....	108
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	108
CONCLUSIONES GENERALES	108
PERSPECTIVAS.....	109

BIBLIOGRAFÍA.....	111
--------------------------	------------

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Los D-AAs como moduladores del crecimiento y salud de las plantas.	15
Figura 1.2. Eventos de formación de la RL	20
Figura 1.3. Modelo de iniciación de raíces laterales mediada por auxinas	21
Figura 1.4. Cambios en los parámetros de crecimiento radical en repuesta a la disponibilidad (homogénea o heterogénea) de los nutrientes	25
Figura 1.6. Dosis inhibitoria de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz.....	32
Figura 1.7. Estrategia experimental general.....	36
Figura 2.1 Distancias evaluadas en la RP a las 96 h de tratamiento	41
Figura 2.2. Cambios morfológicos en el crecimiento de la RP y apertura de cotiledón a las 96 h de tratamiento.....	43
Figura 2.3. Primordios de raíz lateral en diferentes estadios y RLs de chile habanero. ...	45
Figura 2.4 Formación de eventos de iniciación y longitud de las raíces laterales a las 96 h.	46
Figura 2.5. Formación de órganos laterales en las raíces expuestas a los diferentes tratamientos de N	48
Figura 2.7 Curva dosis-respuesta de los D-AAs sobre la formación y el crecimiento de raíces laterales	50
Figura 2.8. Efecto de las mezclas de AAs y NO_3^- sobre la formación de EI durante un curso temporal.....	52
Figura 2.9. Formación de eventos de iniciación en las raíces expuestas a los diferentes tratamientos con L- y D-AAs.	53
Figura 3.2 Incremento en el crecimiento acumulado en longitud de la raíz primaria (RP) de	

<i>Capsicum annuum</i> variedad CM334 expuesta a dosis crecientes de PCB.	60
Figura 3.5 Alineamiento de <i>LBD16</i> de diferentes solanáceas y su comparación con la secuencia de <i>Arabidopsis</i>	65
Figura 3.6 Alineamiento de <i>LBD18</i> de diferentes solanáceas y <i>Arabidopsis</i>	66
Figura 3.7 Amplificación por PCR de los cebadores de los genes <i>LBD16</i> y <i>LBD18</i>	67
Figura 3.8 Nivel de transcritos de los genes <i>LBD16</i> y <i>LBD18</i> en respuesta a AIA	67
Figura 3.9 Alineamiento de las secuencias de <i>LBD16</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtLBD16</i>), <i>C. annuum</i> (<i>CaLBD16</i>) y el fragmento clonado de <i>C. chinense</i> (<i>CcLBD16</i>).....	68
Figura 3.10 Alineamiento de las secuencias de <i>LBD18</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtLBD18</i>), <i>C. annuum</i> (<i>CaLBD18</i>) y el fragmento clonado de <i>C. chinense</i> (<i>CcLBD18</i>).....	69
Figura 3.11 Nivel de transcritos de los genes <i>LBD16</i> y <i>LBD18</i> en raíces tratadas con L-AA y D-AA	71
Cuadro 4.1 Características de los cebadores de los <i>GLR</i>	78
Figura 4.1 Medición del flujo de Ca^{2+} mediante la técnica MIFE.....	79
Figura 4.2 Efecto de la mezcla de D-AA sobre el crecimiento de la raíz primaria (RP) de chile habanero en condiciones <i>in vitro</i>	83
Figura 4.3 Efecto de la mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys sobre la formación y la longitud de las raíces laterales en plántulas de chile habanero <i>in vitro</i>	84
Figura 4.4 Efecto de la mezcla de D-AA sobre el crecimiento de las raíces de tres variedades de chile habanero	85
Figura 4.5 Flujo de entrada de iones de Ca^{2+} en las raíces tratadas con D- y L-AAs	86
Figura 4.6 Flujo neto de entrada de iones de Ca^{2+} en las raíces tratadas con L y/o D- Val, Leu y Cys.....	87

Figura 4.7 Efecto de los aminoácidos sobre los contenidos de calcio en las raíces de dos variedades de chile habanero 89

Figura 4.8 Niveles de transcritos de los *CcGLR* en tres variedades de chile habanero expuestas a los L-AAs y D-AAs 91

Figura 4.9 Variación del calcio intracelular en las raíces de Mayan Kisin con la adición de L-Glu..... 94

Figura 4.10 Efecto de la mezcla de L-AAs y D-AAs sobre los niveles de metabolitos nitrogenados en raíz y hoja de las diferentes variedades de chile habanero..... 96

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Enzimas caracterizadas en plantas que participan en el metabolismo de los D-AA..... 10

Cuadro 2.1 Efecto de la aplicación por 96 h de la mezcla de los D-AAs sobre la distancia de formación de los eventos de iniciación..... 47

Cuadro 3.1 Cebadores seleccionados para la amplificación de los genes *LBD16* y *LBD18*..... 57

Cuadro 3.2 Secuencias utilizadas para la selección del gen putativo de *LBD16* para *Capsicum*..... 64

RESUMEN

Los D-aminoácidos (D-AAs) están presentes en la naturaleza, en organismos como bacterias, mamíferos y plantas. A pesar de que las plantas están expuestas a estos compuestos, se han llevado a cabo muy pocos estudios sobre su efecto en el desarrollo vegetal. La mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys fue seleccionada para llevar a cabo el presente estudio, ya que en un trabajo previo se demostró que fueron capaces de estimular el crecimiento radical en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). El objetivo de este trabajo fue caracterizar los cambios morfológicos en las raíces expuestas a ellos y estudiar la participación de auxinas y receptores de glutamato (GLR) en esta respuesta. La mezcla de estos tres D-AAs aumentó el número de primordios de raíces laterales (PRLs) y de raíces laterales (RLs). El efecto estimulador sobre la formación de RLs también fue comprobado en *Capsicum annuum* y en otras tres variedades yucatecas pertenecientes a *Capsicum chinense* (Mayan Chac, Mayan Kisin y Mayan Baalché). Al aplicar la anti-auxina PCIB, en conjunto con la mezcla de estos D-AAs, se inhibió drásticamente su efecto estimulador. Igualmente, los niveles de transcritos de los genes *Lateral Organ Boundary Domain 16* y *18* (*LBD16* y *LBD18*), los cuales son inducidos en respuesta a auxina en *Arabidopsis*, aumentaron en las raíces expuestas a estos tres D-AAs, en comparación con aquellas que crecieron en el tratamiento testigo con los L-AAs. Todos estos resultados sugieren la participación de las auxinas en la respuesta a los D-AAs. Además, los resultados obtenidos al medir los flujos de Ca^{2+} por la técnica de estimación de flujo de iones por microelectrodo no invasivo (MIFE™), parecen indicar que la activación de un GLR por la mezcla de estos D-AAs en la raíz de chile no sería el evento primario que desencadenaría el efecto de estos compuestos. Esta sugerencia también parece ser confirmada por los datos de microscopía confocal usando a un fluoróforo sensible a Ca^{2+} . Sin embargo, los análisis moleculares indicaron que el tratamiento con los D-AAs incrementaron los niveles de transcritos de dos *GLRs*, *CcGLR1.1* y *CcGLR3.4*, mientras que disminuyeron los de *CcGLR3.1* en las raíces de la variedad Mayan Kisin. Para el resto de las variedades de chile habanero analizadas, no se observaron cambios significativos en los niveles de estos transcritos. Estos datos indican que Mayan Kisin pudiera presentar receptores funcionales específicos en las raíces tratadas con los D-AAs, los cuales pueden diferir de aquellos presentes cuando la raíz es tratada con la mezcla testigo de los L-AAs. Al aplicar el L-Glu, un posible agonista de los

GLR, las raíces expuestas a los D-AAs fueron capaces de presentar mayor flujo de Ca^{2+} , comparada con las tratadas con los L-AAs. Además, se demostró que el tratamiento con la mezcla de D-AAs incrementó significativamente los niveles endógenos de nitrato, aminoácidos totales y proteínas, en las variedades Mayan Chac y Mayan Kisin, no así para Mayan Baalché. Estos resultados proporcionan información valiosa para comprender el posible papel de los D-AAs en la regulación del crecimiento vegetal.

ABSTRACT

D-amino acids (D-AAs) are present in nature, in bacteria, mammals and plants. Although plants are exposed to these compounds, very few studies of their effect on plant development have been carried out. A mixture of the D-AAs Val, Leu and Cys was selected to carry out the present study, since in a previous study had shown that these were able to stimulate root growth in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). The objective of this work was to characterize the morphological changes in the roots exposed to the mixture of the D-AAs and to study the participation of auxins and glutamate receptors (GLR) in this response. The mixture of these three D-AAs increased the number of lateral root primordia (LRPs) and lateral roots (LRs). The stimulatory effect on the formation of LRs was also demonstrated in *Capsicum annuum* and in three other Yucatecan varieties belonging to *Capsicum chinense* (Mayan Chac, Mayan Kisin y Mayan Baalché). By applying the anti-auxin PCIB together with the mixture of these D-AAs, this stimulatory effect was drastically inhibited. Likewise, the transcript levels of the Lateral Organ Boundary Domain 16 and 18 genes (*LBD16* y *LBD18*), which are induced in response to auxin in *Arabidopsis*, increased in the roots exposed to these three D-AAs compared to the control with the treatment with the L-AAs. All these results suggest the participation of auxins in the response to D-AAs. In addition, the results obtained from Ca^{2+} fluxes measured by noninvasive microelectrode ion flux estimation technique (MIFE™) seem to indicate that the activation of a GLR by the mixture of these D-AAs may not be the primary event triggered by these compounds. This suggestion also seems to be confirmed by confocal microscopy data using a Ca^{2+} sensitive fluorophore. However, molecular analysis indicated that treatment with D-AAs, compared to the treatment with L-AAs, increased transcripts levels of two *GLR*, *CcGLR1.1* and *CcGLR3.4*, while those of *CcGLR3.1* decreased in the roots of the variety Mayan Kisin. For Mayan Chac and Mayan Baalché varieties no significant changes were observed in these transcripts. These data indicate that Mayan Kisin could have specific functional receptors in the roots treated with the D-AAs, which may differ from those present when the root is treated with the control mixture of the L-AAs. It was found that the roots stimulated with the D-AAs had greater Ca^{2+} flow, compared to those treated with the L-AAs, when a possible *GLR* agonist, L-Glu, was applied. In addition, it was shown that the mixture of D-AAs significantly increased the endogenous levels of nitrate, total amino acids and proteins in

Mayan Chac and Mayan Kisin varieties but not for Mayan Baalché, compared to the mixture of L-AAAs. These results provide valuable information to understand the possible role of D-AAAs in plant growth regulation.

INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos existen en la naturaleza en al menos dos formas estereoquímicas, L y D, siendo por muchos años la forma L la más estudiada y la que se ha considerado biológicamente activa. Sin embargo, estudios recientes indican que los D-aminoácidos (D-AAs) también pueden presentar actividad biológica en organismos tales como bacterias, plantas y mamíferos (Brückner y Westhause, 2003).

La presencia de los D-AAs en los tejidos de las plantas se debe a su absorción a partir del suelo o a su síntesis endógena, donde intervienen enzimas como las racemasas y las D-AA aminotransferasas (Vranova *et al.*, 2012). A pesar de su existencia en los tejidos vegetales y de que las plantas durante su ciclo de vida pueden estar expuestas a la presencia de esta fuente nitrogenada, es muy poco lo que se conoce acerca de los efectos que ocasionan sobre el crecimiento vegetal.

En un trabajo previo se demostró que al añadir una mezcla de los D-AAs: Val, Leu y Cys a 100 μ M de cada uno, a una solución nutritiva que contenía como fuente principal de nitrógeno (N) al nitrato de potasio (1 mM), se estimuló el crecimiento de las plántulas de chile habanero, en comparación con las que crecían únicamente con la fuente inorgánica de N (Serralta-Interian *et al.*, 2014). Específicamente, se obtuvieron aumentos significativos en el número de raíces laterales (RLs), la longitud radical total y el área radical. Además, este tratamiento con la mezcla de los D-AAs aumentó los niveles endógenos de metabolitos nitrogenados, como aminoácidos totales y proteínas, lo cual sugiere que las plantas que recibieron este tratamiento aumentaron la eficiencia en el uso de N (Serralta-Interian *et al.*, 2014).

El sistema radical es una estructura muy importante para la vida de las plantas, no sólo porque es el órgano responsable de la absorción y transporte de nutrientes y agua, sino también porque regula muchos procesos que se llevan a cabo en la parte aérea. Las plantas integran señales exógenas y endógenas para regular de manera precisa y coordinada la formación y crecimiento de este órgano. Está demostrado, particularmente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, que fitohormonas como las auxinas y el etileno son importantes para que se lleven a cabo estos procesos y que sus niveles pueden ser

regulados en respuesta a señales exógenas, como la presencia de nutrientes en el suelo (Giehl *et al.*, 2014; Fukaki y Tasaka, 2009; Hogde *et al.*, 2009; Ivanchenko *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que los receptores de glutamato (GLR) de plantas, parecidos a los receptores ionotrópicos de glutamato de mamíferos, pueden regular el crecimiento radical (Li *et al.*, 2006; Walch-Liu *et al.*, 2006) y que los D-AAAs pueden ser agonistas de estas proteínas (Michard *et al.*, 2011).

En este proyecto se estudiaron los mecanismos por los cuales los D-AAAs provocaron una estimulación sobre el crecimiento radical de chile habanero, abordando específicamente la posible participación de la hormona auxina, así como la de un GLR en dicha respuesta.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Formas de nitrógeno en el suelo, su absorción y asimilación por las plantas

El N es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, siendo un constituyente de macromoléculas importantes en las células, tales como el ADN, el ARN, las proteínas, la clorofila y fitoreguladores como auxinas y citocininas (Hawkesford *et al.*, 2012). Las plantas pueden adquirir el N del suelo en formas inorgánicas [nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+)] y orgánicas [urea, aminoácidos (AAs) y péptidos] (Kiba y Krapp, 2016; Tabata *et al.*, 2014).

El NO_3^- es la principal forma de N inorgánico (NI) que es tomada y asimilada por la mayoría de los cultivos que crecen en suelos aeróbicos, en donde se puede encontrar a concentraciones entre 1 y 20 mol. m^{-3} . En cambio, el NH_4^+ puede ser la fuente de NI más importante para aquellos cultivos que crecen en suelos menos aireados (Andrews *et al.*, 2013).

La toma del NI a partir de la solución del suelo se lleva a cabo por familias de transportadores que se localizan en la membrana plasmática de las raíces de las plantas (Wang *et al.*, 2011). Existen dos familias de proteínas transportadoras para el NO_3^- : los NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER (NRT1/NPF) y la familia de los NRT2 (Nacry *et al.*, 2013), que pertenecen a los sistemas de toma de baja (low-affinity transport system, LATS, concentración de $\text{NO}_3^- > 250 \mu\text{M}$) y alta afinidad (high affinity transport system, HATS, concentración de $\text{NO}_3^- < 250 \mu\text{M}$), respectivamente (Plett *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2014). Para el NH_4^+ , el transporte es mediado por la superfamilia de transportadores de amonio (ammonium transporter, AMT) (Kiba y Krapp, 2016; Ludewig *et al.*, 2007).

Una vez que el NO_3^- es tomado por la planta, éste es reducido a nitrito y luego a NH_4^+ por acción de las enzimas nitrato (NR) y nitrito reductasas (NiR), respectivamente. El NH_4^+ derivado del NO_3^- , o tomado directamente del suelo, es asimilado en glutamina y glutamato,

a través del ciclo de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (ciclo GS/GOGAT) o por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) (Xu *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, el NI es considerado como la fuente dominante de N para las plantas; sin embargo, en la actualidad la importancia del N orgánico es ampliamente reconocida (Franklin *et al.*, 2017). Las plantas también pueden tomar y metabolizar un amplio rango de formas de N orgánico, incluyendo AAs, péptidos y proteínas (Brackin *et al.*, 2015). Estas formas están presentes en concentraciones elevadas, principalmente en los suelos con un alto contenido de materia orgánica (Gioseffi *et al.*, 2012; Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2010).

En los suelos agrícolas, los AAs predominantes son: glicina (Gly), serina (Ser), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), ácido glutámico (Glu) y glutamina (Gln) (Jämtgård *et al.*, 2010), mientras que en praderas la Gly, la lisina (Lys) y la treonina (Thr) son los más abundantes (Farrell *et al.*, 2011). Por otro lado, en los bosques, la Ser, el Glu, el Asp y la leucina (Leu) son los mejor distribuidos (Yu *et al.*, 2013). La vida media de los AAs en los suelos es de 1.7 a 28.7 h (Lipson *et al.*, 2001; Hadas *et al.*, 1992).

Actualmente se reconoce que la poza de AAs en el suelo no sólo está formada por los estereoisómeros L, sino una parte de ella está compuesta por D-AAAs. Ellos se originan en el suelo a partir de diferentes vías (Vranova *et al.*, 2012). Se sabe que las raíces de las plantas pueden absorber estos compuestos (Gördes *et al.*, 2013; 2011; Forsum *et al.*, 2008) y se han identificado varias proteínas que participan en este proceso (Kolukisaoglu y Suarez, 2017; Lehmann *et al.*, 2011; Svennerstam *et al.*, 2007). Además, varias enzimas que participan en su metabolismo han sido aisladas y caracterizadas, a partir de diferentes especies vegetales (Gogami *et al.*, 2009; Funakoshi *et al.*, 2008; Fujitani *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2006).

Si bien por muchos años, los estereoisómeros L de los AAs fueron considerados los únicos biológicamente activos, nuevos resultados apuntan a que la presencia de los D-AAAs en los organismos no es producto de eventos azarosos, sin un control y significado fisiológico. El efecto que estos compuestos tienen sobre diferentes organismos está siendo materia de estudio por un grupo de investigadores, particularmente en organismos tales como bacterias y mamíferos (Aliashkevich *et al.*, 2018; Cava *et al.*, 2011; Michard *et al.*, 2011).

1.2 Presencia de los D-aminoácidos en la naturaleza

La presencia de los D-AAs en la naturaleza data de los años 20 cuando se describió por primera vez la octopina, un derivado de L-Arg y D-Ala producido por los pulpos (Morizawa, 1927) y también encontrado en viera (Moore y Wilson, 1937). En 1930 se reportó la presencia en la envoltura celular de *Bacillus anthracis* de un peptidil poli-D-ácido glutámico, formado principalmente por D-ácido glutámico (Ivanovics *et al.*, 1937). A partir de los años 50, estos compuestos fueron detectados en los fluidos corporales de insectos y moluscos (Izumiya *et al.*, 1957; Auclair y Patton, 1950) y más tarde, se detectaron en tejidos de mamíferos (Hashimoto *et al.*, 1993; 1992).

Estos compuestos están presentes en organismos, desde procariotes hasta eucariotes (plantas, insectos, moluscos, anfibios, anélidos como la lombriz de tierra, mamíferos, etc.), en varias formas incluyendo libres, conjugados, dentro de proteínas y péptidos, etc. (Gao *et al.*, 2015; Cavas *et al.*, 2011; Bruckner y Fujii, 2010; Bruckner y Westhauser, 2003; Fujii, 2002; Hamase *et al.*, 2002). Ellos son abundantes en los suelos (Vranova *et al.*, 2012), aguas costeras (Kawasaki y Benner, 2006), alimentos fermentados y bebidas (Kato *et al.*, 2011; Vranova *et al.*, 2012; Friedman, 2010; Bruckner y Hausch, 1989), en extractos de intestino de mamíferos, rumen y heces fecales (Bruckner y Schieber, 2001; Schieber *et al.*, 1999) y en fluidos fisiológicos de vertebrados superiores (Patzold *et al.*, 2005). Además, a la temperatura de la superficie de la tierra, los AAs racemizan espontáneamente convirtiéndose de una forma a otra (Bada, 1982), por lo que la aparición de los D-AAs es inevitable, particularmente en suelos y sedimentos donde éstos son secuestrados (Steen *et al.*, 2013; Carstens *et al.*, 2012; Kimber *et al.*, 1994; Bada, 1982).

La biomasa bacteriana es de una fuente que contribuyen en mayor medida a la presencia de los D-AAs en la naturaleza. Estos metabolitos son fundamentales para la fisiología de las bacterias, debido a que forman parte de los peptidoglicanos de su pared celular (Hancock, 1960), siendo ésta la mayor fuente de los mismos para estos organismos. Los peptidoglicanos tienen una alta proporción de D-Glu y D-Ala (van Heijenoort 2001; Nagata *et al.*, 1999), pero también pueden incorporar a la D-Ser (Reynolds y Courvalin 2005; Arias

et al., 1999), la D-Lys (Boniface *et al.*, 2006) y el D-Asp (Bellais *et al.*, 2005; Veiga *et al.*, 2005), entre otros. Los antibióticos peptídicos sintetizados por las bacterias son otra fuente importante de D-AAs, siendo la D-Ala, la D-Ser, la D-Leu y el D-Glu los más abundantes en estas moléculas (Radkov y Moe, 2014), aunque D-Phe, D-Val y otros, también están presentes (Cava *et al.*, 2011).

Además, una gran cantidad de bacterias de diferentes phyla son capaces de acumular y liberar al medio cantidades milimolares de D-AAs libres durante la entrada a la fase estacionaria (Horcajo *et al.*, 2012; Cava *et al.*, 2011); entre los D-AAs liberados, los más conocidos son los D-AAs de cadena ramificada, tales como D-Leu, D-allo-Ile y D-Val, así como D-Met, D-Arg y D-Tyr (Alvarez *et al.*, 2018; Mutaguchi *et al.*, 2013; Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Lam *et al.*, 2009). Sin embargo, estos resultados recién comienzan a obtenerse y sugieren que este mecanismo de acumulación y liberación podría ser una fuente importante de otros D-AAs, diferentes a aquellos incorporados en la estructura de los peptidoglicanos y los antibióticos.

1.3 Presencia de los D-aminoácidos en el suelo

Estos compuestos pueden estar presentes en los suelos a partir de diferentes orígenes, tales como la pared celular de las bacterias, excrementos, antibióticos, insecticidas sintéticos, biomasa eucariótica (plantas, hongos y animales), racemización biótica y abiótica, donde en algunos casos pueden aportar hasta $\sim 10 \text{ kg ha}^{-1}$ (Vranova *et al.*, 2012). La racemización abiótica puede ser lenta e influenciada por factores, como el calor, el pH, la presencia de aldehídos, las sales, la radiación y los radicales (Khatib y Aqra, 2009), mientras que la racemización biótica es la catalizada por aminoácido (AA) racemasas (Friedman, 1999).

En el suelo, los D-AAs pueden estar en forma libre o unidos a coloides o materia orgánica, incluyendo proteínas y péptidos (Schulten y Schnitzer, 1997). Bremner (1950) encontró que entre el 1.4 y 1.7% del total de AAs en el suelo consistía de D-enantiómeros. Pollock *et al.* (1977) informaron que estos enantiómeros podían alcanzar niveles entre 5 y 16% de la concentración de los AAs totales del suelo, siendo la D-Ala, el D-Asp y el D-Glu los más significativos y, en menor cantidad, la D-Val, la D-Ile, la D-Leu, la D-Pro y la D-Phe.

La tasa de mineralización de los D-AAs también está dada de acuerdo al tipo de suelo (Hill *et al.*, 2011), reportándose la mayor concentración de estos compuestos en pastizales (hasta 1520 mg kg⁻¹) (Amelung *et al.*, 2006; Brodowski *et al.*, 2004; Wichern *et al.*, 2004; Amelung y Zhang, 2001). Sin embargo, la tasa de mineralización de los D-AAs con respecto a la de los L-AAs es menor, por lo que se sugiere que solo una fracción de las bacterias presentes en el suelo llevan a cabo esta función (Landi *et al.*, 2000).

Las propiedades del suelo, particularmente el pH, también pueden afectar la existencia de los D-AAs. Un pH alto puede promover la racemización abiótica y favorecer el dominio de las bacterias sobre los hongos (Rousk y Jones, 2010), mientras que el pH bajo permite un cambio de la comunidad microbiana que favorece la presencia de hongos, los cuales son una fuente pobre de D-AAs comparada con las bacterias (Walsh, 1999). Además, la racemización biótica, catalizada por racemasas, es óptima a pH alcalino (Ju *et al.*, 2009; Johnston y Diven, 1969). De igual manera, un alto pH en los suelos está asociado con la salinidad o sodicidad, condiciones que incrementan la racemización (de Miranda *et al.*, 2002).

Como se ha descrito, los D-AAs en el suelo pueden originarse a partir de una amplia gama de fuentes. Las plantas pueden estar expuestas a esta fuente de N, donde su concentración y el tipo dependen del suelo, las condiciones ambientales, así como de la microbiota del suelo, entre otros factores.

1.4 Presencia de los D-aminoácidos en las plantas

Desde los años 60's se reconoció que la N-acilación de los D-AAs, particularmente la N-malonilación del D-Trp, era un proceso común en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Zenk y Scherf, 1964; 1963) y a partir de ello, se han encontrado en plantas de metabolismo C3, C4 y CAM, así como en gimnospermas y angiospermas. Los D-AAs detectados mayormente en las plantas son Ala, Ser, Gln, Asn, Glu, Asp, Pro, Val, Leu, Lys y conjugados con el ácido D- α -amino-n-butírico (Bruckner y Westhauser 2003; Soda, 1977; Ogawa *et al.*, 1976; Ogawa y Sasaoka, 1976). La proporción de D-AAs en la poza total de los AAs puede ser de hasta ~ 1.5% en las diferentes partes de la planta (Vranova *et al.*, 2012).

La presencia de D-Ala, D-Asp y D-Glu, tanto en forma libre como conjugada, ha sido reportada en plántulas de chícharo (Ogawa *et al.*, 1977), granos de cebada y flores de lúpulo (Erbe y Brückner, 2000) y hojas de tabaco (Kullman *et al.*, 1999). Dipéptidos de D-Ala y derivados N-acilados de otros D-AAs también han sido encontrados en numerosas plantas (Rozan *et al.*, 2001; Kullman *et al.*, 1999; Manabe, 1992; 1984; Pokorny *et al.*, 1970).

Brückner y Westhauser (2003) reportaron que los D-AAs libres se encontraron en el rango de 0.2% hasta 8% relativo al L-AA correspondiente, siendo detectados los D-AAs Asp, Asn, Glu, Gln, Ser y Ala en la mayoría de las plantas analizadas (maple, abeto, cactus, pastos, maíz y melón); en cambio Pro, Val, Leu y Lys sólo se detectaron en algunas especies (soya y alfalfa). De esto se desprende que los D-AAs, en un porcentaje bajo son constituyentes de las plantas.

En sus inicios, la presencia de los D-AAs en los tejidos vegetales fue explicada por su toma a partir de la solución del suelo por las raíces de las plantas. Este hecho ha sido demostrado para plantas como trigo, maíz y arabidosis, tanto en ausencia como en presencia de otras fuentes de N (Gördes *et al.*, 2013; 2011; Hill *et al.*, 2011; Forsum *et al.*, 2008; Aldag y Young, 1970). Sin embargo, estos compuestos también pueden ser adquiridos por las plantas a partir de una llamada “adquisición de nutrientes heterotrófica”, recientemente reportada; aquellas bacterias en contacto con la superficie de la raíz modifican activamente su pared celular y pueden ser “tragadas” (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2010). Igualmente, la síntesis de novo y un metabolismo activo de estos compuestos en las plantas ha sido demostrado (Gördes *et al.*, 2013; Funakoshi *et al.*, 2008), lo cual permitió explicar la presencia de los D-AAs en tejidos vegetales provenientes de plantas cultivadas en condiciones asépticas.

1.5 Metabolismo de los D-aminoácidos en las plantas

Existe marcado desconocimiento en cuanto al metabolismo y función de los D-AAs en plantas, comparado con otros organismos. En la década de los 60's se reportó que al aplicar estereoisómeros D y L de Phe, Val, Leu, Ile, Tyr, Trp, Ala y Glu a *Hordeum vulgare* se formaban derivados de malonil ó únicamente con los D (Rosa y Neish, 1968). Robinson (1976) reportó que algunos D-AAs como Trp, Phe, Met, Leu, Val y Ala sufren malonilación, no así otros como Glu, Asp y Lys. Esta reacción es catalizada por una N-malonil transferasa,

la cual transfiere el grupo malonil ó desde el malonil-acetil CoA al grupo amino de los D-AAs (Kionka y Amrhein, 1984). Se ha reportado que la malonilación precede el movimiento de los D-AAs a la vacuola (Forsum 2016; Pokorny *et al.*, 1970).

Aldag y Young (1970) demostraron la ocurrencia de descarboxilación al aplicar varios D-AAs (Val, Leu, Ala, Met y Lys). Al suministrar D-Ala detectaron Val en la raíz e Ile en los brotes de las plantas. Manabe y Ohiro (1981) suministraron D y L-Ala a la hoja bandera de arroz y encontraron que el estereoisómero L disminuyó rápidamente, mientras que el D lo hizo de forma gradual. La D-Ala fue conjugada para formar D-alanil-glicina y posiblemente D-Ala-D-Ala, sugiriendo además que podría ser parcialmente metabolizada a otros compuestos. Sin embargo, las enzimas responsables de este proceso no han sido identificadas.

Se encontraron tres clases de cambios en el perfil de AAs endógenos en respuesta a la aplicación exógena de D-AAs en *Arabidopsis*: (1) los D-AAs aplicados condujeron a cambios en el contenido de L-AAs no isoméricos. (2) el incremento de un L-AA después de la aplicación de su enantiómero D. (3) la acumulación de D-Ala y D-Glu (Gördes *et al.*, 2013). El último comportamiento había sido previamente reportado (Gördes *et al.*, 2011).

Dos rutas hacen posible la utilización biológica de los D-AAs: la racemización y la transaminación. La primera convierte directamente el D- al L-AA, mientras que, en la segunda, ocurre la desaminación de α -amino a α -cetoácido (Brückner y Fujii, 2010). Las enzimas que participan en el metabolismo de los D-AAs caracterizadas en plantas se presentan en el Cuadro 1.1.

Sin embargo, en el estudio de Gördes *et al.* (2013), aún no se han reportado racemasas específicos para D-Phe, D-Trp, D-Met, D-His, D-Leu, D-Ile, y D-Thr en plantas (Cuadro 1.1). Se sugiere la participación primaria de una D-AA aminotransferasa y posteriormente, la racemización putativa, resultado de L-AAs aminotransferasa. La caracterización de una D-AA D-Asp aminotransferasa de *Arabidopsis* (Funakoshi *et al.*, 2008), así como su presencia en *Pisum sativum* (Ogawa y Fukuda, 1973) y *Oryza sativa* (Manabe 1984) ha sido descrita (Cuadro 1.1). El descubrimiento de este gen en *Arabidopsis* brindó una posible explicación para la conversión del D-Asp, suplementado exógenamente, a D-Ala y D-Glu. Esta enzima

tiene una homología de 23.8%, 26.2% y 19.6% con las de *Bacillus* sp. YM-1, *Bacillus subtilis* y *Bacillus sphaericus*, respectivamente (Funakoshi *et al.*, 2008).

CUADRO 1.1. Enzimas caracterizadas en plantas que participan en el metabolismo de los D-AA

Tipo de actividad	Organismo	Características	Cita
Racemasas			
Ala racemasa	Alfalfa	Tiene especificidad por ambos isómeros de Ala. Se inhibe por hidroxilamina y fenilhidracina. Requiere de PLP como coenzima	Ono <i>et al.</i> , 2006
Ser racemasa	Arabidopsis	Clonación del ADNc y caracterización del producto génico. La proteína es una enzima bifuncional dependiente de PLP, cataliza la racemización de Ser y su deshidratación a piruvato	Fujitani <i>et al.</i> , 2006
Ser racemasa	Cebada	Cataliza la racemización y deshidratación de Ser a piruvato. Es dependiente de PLP pero no de ATP	Fujitani <i>et al.</i> , 2007
Ser racemasa	Arroz	Altamente específica para Ser. El ATP incrementa su actividad de deshidratasa	Gogami <i>et al.</i> , 2009
D-Ile racemasa	Arabidopsis	Es requerida para la biosíntesis de N-malonil-D-allo-Ile y es independiente de PLP	Strauch <i>et al.</i> , 1986
D-Trp racemasa	Tabaco	Cataliza la racemización de D-Trp a L-Trp en cultivo celulares de tabaco	Miura y Mills, 1971
D-Trp racemasa	Trigo	Catalización la racemización de L-Trp a D-Trp en coleóptilos etiolados	Rekoslovsvaya <i>et al.</i> , 1999
Aminotransferasas			
D-Asp aminotrasferasa	Arabidopsis	Cataliza la transaminación entre D-AAs. Es dependiente de PLP y su acción es inhibida por hidroxilamina y ácido amino-oxilacético	Funakoshi <i>et al.</i> , 2008
D-Ala aminotrasferasa	Chicharo	Actividad aminotransferasa específica para D-AAs. Incrementa su actividad con D-Asp+ α -cetoglutarato y D-Glu + piruvato	Ogawa y Fukuda, 1973
D-aminotrasferasa	Arroz	Cataliza la transaminación de D-Ala a D-Asp y D-Glu	Manabe 1984
D-AA oxidasa			
DAAO	Maíz	Cataliza la oxidación de D-Ala y D-Asp	Gholizadeh y Kohnehrouz, 2008
DAAO	Arroz	Identificación de secuencias putativas en el genoma	Gholizadeh y Kohnehrouz, 2008
DAAO	Arabidopsis	Identificación de secuencias putativas en el genoma	Gholizadeh y Kohnehrouz, 2008

PLP: Fosfato de piridoxal

En cuanto a las racemasas, la Ser racemasa aislada y caracterizada en *A. thaliana* mostró una identidad de un 46%, 45%, 39% y 30% con las serín racemasas aisladas de humano, ratón, *S. cerevisiae* y *E. coli*, respectivamente. En cambio, las aisladas de raíz de cebada y arroz presentaron una identidad de un 68%, 46%, 45% y 28% con las serín racemasas de *Arabidopsis*, humano, ratón y *E. coli*, respectivamente (Gogami *et al.*, 2009; Fujitani *et al.*, 2007).

En la degradación de los D-AAs participa la enzima DAAO, una flavoenzima que cataliza

esteroespecíficamente la desaminación oxidativa del D-AA a su correspondiente cetoácido, amonio y peróxido de hidrógeno (Tishkov y Khoronenkova, 2005). Una DAAO fue encontrada en maíz y otras putativas, basadas por similitud de secuencia, se han detectado en arroz y *Arabidopsis* (Gholizadeh y Kohnehrouz, 2008). Al administrar D-Val en maíz se detectó su conversión a CO₂ y al correspondiente cetoácido, lo cual es indicativo de la actividad de una DAAO (Aldag y Young, 1970).

Por otro lado, se ha propuesto a la rizodeposición como una posibilidad para reducir el contenido endógeno de D-Ala y D-Glu (Kolukisaoglu y Suarez, 2017). Al aplicar 1 mM de D-Ala y D-Glu a plantas de *Arabidopsis*, sus contenidos endógenos disminuyeron a las 24 h, mientras que los de sus respectivos L enantiómeros aumentaron, mediante la actividad de racemasas. Ambos D-AAs también fueron secretados al medio, al parecer de una forma pasiva, así como los D-AAs Asp, Leu, Lys, Phe y Pro fueron exudados. Aunque la exudación de los D-AAs ocurre, parece no contribuir crucialmente a la reducción de los mismos en las plantas (Herner *et al.*, 2018).

Se sugiere que la aparición de los D-AAs en los tejidos vegetales es un proceso controlado y que puede tener un significado fisiológico. Funakoshi *et al.* (2008) reportaron un incremento transiente de D-Asp durante la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis*, obteniéndose una relación D-Asp/L-Asp de 0.43%. La acumulación de N-malonil-D-Trp durante los primeros días de la germinación también ha sido observada en tomates y plantas de trigo (Gamburg y Rekoslavskaya, 1991), mientras que la acumulación de D-Ala y sus derivados durante el inicio de la germinación ha sido reportado en plántulas de chícharo (Fukuda *et al.*, 1973). Se detectaron altas cantidades de D-Ser, alcanzando hasta el 10% en relación al estereoisómero L durante la germinación de arroz (Gogami *et al.*, 2009). El D-Trp y la D-Ala también se han acumulado en ciertas fases de la ontogenia, localizados en órganos específicos (Rekoslavskaya *et al.* 1988; Ogawa y Fukuda, 1973). Recientemente, Strauch *et al.* (2015) reportaron la acumulación de N-malonyl-D-allo-Ile en hoja, la cual fue diferencial entre 440 accesiones naturales de *Arabidopsis*.

A pesar de estos cambios precisos en la concentración de determinados D-AAs en los tejidos vegetales que hacen sugerir una participación importante en estos procesos, la función de los mismos se desconoce en la gran mayoría de las especies vegetales. Los

principales avances obtenidos en este campo, se describen a continuación.

1.6 Función de los D-aminoácidos en las plantas

Las plantas presentan múltiples comportamientos en respuesta a los D-AAs y se sugiere que éstos dependen de la especie vegetal, la microbiota que está asociada a ella y la diversidad de D-AAs producidos por las actividades racemasas y/o otras enzimas involucradas en su metabolismo. Recientemente, se ha hipotetizado que aquellos D-AAs producidos por racemasas de bacterias patogénicas disminuyen el crecimiento de ciertas especies de plantas, mientras que las racemasas expresadas por la flora simbiótica vegetal favorecen el desarrollo de las plantas (Hernández y Cava, 2016). Aunque esta hipótesis no se ha comprobado, concuerda con los efectos reportados para los D-AAs sobre el crecimiento vegetal.

1.6.1 Efectos tóxicos de los D-aminoácidos

Una fuerte inhibición del crecimiento con D-AAs ha sido reportada desde hace varias décadas para diferentes especies (Manabe y Ohira, 1981; Aldag y Young, 1970; Valle y Virtanen, 1965), lo cual llevó a sugerir que estos compuestos no pueden ser utilizados por las plantas y que pueden interferir en el metabolismo vegetal.

La D-Ser y la D-Ala han sido considerada como los D-AAs más tóxicos. La toxicidad de la D-Ser ha sido probada para especies como lenteja (Bollard, 1966), girasol (Aldag y Young, 1970), algodón (Valdovinus y Muir, 1965), *Arabidopsis* (Forsum *et al.*, 2008), tomate y tabaco (Erikson *et al.*, 2005), entre otras. Sin embargo, la respuesta a la D-Ser varía entre especies; mientras en cultivos tales como tomate, álamo, tabaco y *Arabidopsis* se requieren 3 mM de D-Ser para inhibir completamente el crecimiento de la planta, mientras que en maíz y cebada esto no ocurrió hasta los 30 mM (Erikson *et al.*, 2005).

Los mecanismos de toxicidad para la D-Ser y otros D-AAs son desconocidos. Dentro de las posibles causas, se propone a la D-aminoacilación del ARNt y posiblemente, la inhibición en la síntesis de L-Ser (Erikson *et al.* 2005; 2004). Además, se ha demostrado que este D-AA inhibió las enzimas serina: glioxalato aminotransferase (85%) y la alanina: glioxalato aminotransferase (35%) en hojas de espinaca (Rehfeld y Tolbert, 1972).

Sin embargo, también se han señalado defectos en la toma y/o metabolismo de estos compuestos como posibles causas de tal inhibición. Forsum *et al.* (2008) reportaron que de todos los D-AAs, la D-Ala y la D-Ser fueron absorbidos a tasas más altas por las raíces de *Arabidopsis* y éstos fueron los más eficientes para inhibir el crecimiento; mientras que la D-Val y D-Ile se absorbieron a menor tasa, siendo los menos tóxicos para esta especie. Sin embargo, Gördes *et al.* (2011) reportaron que la concentración endógena fue similar para todos los D-AAs, después de ser aplicados exógenamente en *Arabidopsis*. Por lo tanto, esto sugiere que un defecto en el metabolismo, más que en la toma, podría ser la causa de la toxicidad, lo cual se demostró cuando líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan una D-Ser amonio liasa de *E. coli* y una DAAO de *Rhodotorula gracilis*, (ambas enzimas catalizando la desaminación del D-AA en amonio y cetoácido) fueron capaces de crecer satisfactoriamente en presencia de D-Ser (Forsum, 2016). De hecho, cuando estas líneas transgénicas crecieron en presencia de nitrato, además de la D-Ser, el crecimiento de las plantas fue mayor al obtenido con nitrato y amonio (Forsum, 2016).

Únicamente D-Ala, D-Arg, D-His, D-Ser, D-Trp y D-Tyr inhibieron el crecimiento de *Arabidopsis* a concentraciones submilimolares, con la D-Tyr mostrando la mayor inhibición a una dosis de aproximadamente 70-80 μ M. La D-Ile no inhibió, incluso hasta cuando se aplicó a 10 mM (Gordes *et al.*, 2011).

1.6.2 Efectos estimulatorios de los D-aminoácidos

No todos los D-AAs inhiben el crecimiento de las plantas, aunque existen muy pocos trabajos que demuestran su efecto positivo sobre estos organismos. Ciertos D-AAs como D-Ile a 5 mM y D-Val a 1 mM, aumentaron el crecimiento en *Arabidopsis* (Erikson *et al.*, 2004), mientras que 2 mM D-Lys, pero no L-Lys, fue eficiente al promover el crecimiento de la planta completa de *Arabidopsis* y tabaco (Chen *et al.*, 2010).

El D-Trp presente en el suelo puede ser convertido a ácido indol-3-acético (IAA) por los microorganismos y de esta manera, influir significativamente en el crecimiento y desarrollo vegetal (Martens y Frankenberg, 1993, McQueen-Mason *et al.* 1989; Law, 1987). Kuraishi y Sakurai (1988) observaron que, para algunas especies vegetales, el D-Trp puede ser un precursor más efectivo que el estereoisómero L para la síntesis de IAA.

Los D-AAs conjugados con el 2,4- ácido diclorofenoxiacético estimularon la elongación de los coleóptilos en *Avena sativa* L. var. Mariner y el crecimiento de tejidos de soya, como ocurre con los conjugados con L-AAs (Davidonis *et al.*, 1982). En las semillas de *Xanthium pennsylvanicum*, los D-AAs Leu, Thr, Met, Val y Phe incrementaron la producción de etileno, rompiendo la dormancia y potenciando su germinación. Los L-AAs no fueron capaces de provocar este efecto. En particular, D-Met y D-Phe también lo hicieron en otras especies, como calabaza, girasol y frijol mungo (Sato y Esashi, 1980). Dado que la L-Met no provocó este efecto y que otros D-AAs con estructura diferente pueden producirlo, se sugiere que éste es un efecto indirecto, quizás a través de receptores estereoespecíficos para AAs en la membrana.

El mayor acercamiento a las funciones fisiológicas de estos compuestos en las plantas se ha reportado, por un lado, con el descubrimiento de que plantas de trigo fueron capaces de tomar D-Ala aproximadamente cinco veces más rápido que el nitrato, cuando el N fue suministrado en forma mezclada (Hill *et al.*, 2011). Por otro lado, el que la D-Ser podría regular el crecimiento del tubo polínico en tabaco y *Arabidopsis* al actuar como agonista de los receptores de glutamato (GLR), siendo éste el ligando más activo de los receptores GLR1.2 y GLR3.7, ha demostrado la necesidad de un D-AA en el ciclo de vida de las plantas (Michard *et al.*, 2011).

Otra probable función de los D-AAs en estos organismos es actuar como una molécula señal de condiciones de estrés. Las plántulas de lenteja de agua acumularon D-Ala cuando se expusieron a luz UV (Monselise *et al.*, 2015), así como la D-Cys parece participar en la señalización y adaptación al estrés hídrico. Aunque no se conoce su mecanismo, se sugiere que el incremento de la actividad de la D-Cys desulfidrasa y el incremento del H₂S pudieran estar participando en este proceso (Jin *et al.*, 2011).

Además, los D-AAs probablemente participen en la prevención de enfermedades. La aplicación foliar de D-Leu en los cítricos previno el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, la cual ocasiona la enfermedad conocida como el chancro en este cultivo (Figura 1.1, Li y Wang 2013).

Una gran cantidad de funciones de los D-AA aún son desconocidas y otras necesitan ser

caracterizadas a detalle. Tal es el caso del papel de la D-Ala en los cloroplastos de las plantas superiores, donde se ha localizado este compuesto, pero se desconoce su función (Kolukisaoglu y Suarez, 2017). Al igual que con la mutante de *Arabidopsis* hipersensible a etanol *AtGEK1* (etanol-hipersensitive mutant), consecuencia de una mutación en la D-aminoacil-ARNt deacilasa, donde no se sabe aún cómo la pérdida de *AtGEK1* y la incapacidad para reparar la carga accidental del ARNt con D-AA causa hipersensibilidad al etanol en las plantas (Fujishige *et al.*, 2004).

Un resumen de los D-AAs que modulan el desarrollo vegetal reportados hasta la fecha, se presentan en la Figura 1.1. A pesar de su toxicidad demostrada y ejemplificada anteriormente, los resultados actuales comienzan a mostrar la importancia de los D-AAs en la naturaleza. Estos datos demuestran la necesidad de considerar el estudio de la función de estas moléculas como un punto clave en la regulación del desarrollo vegetal.

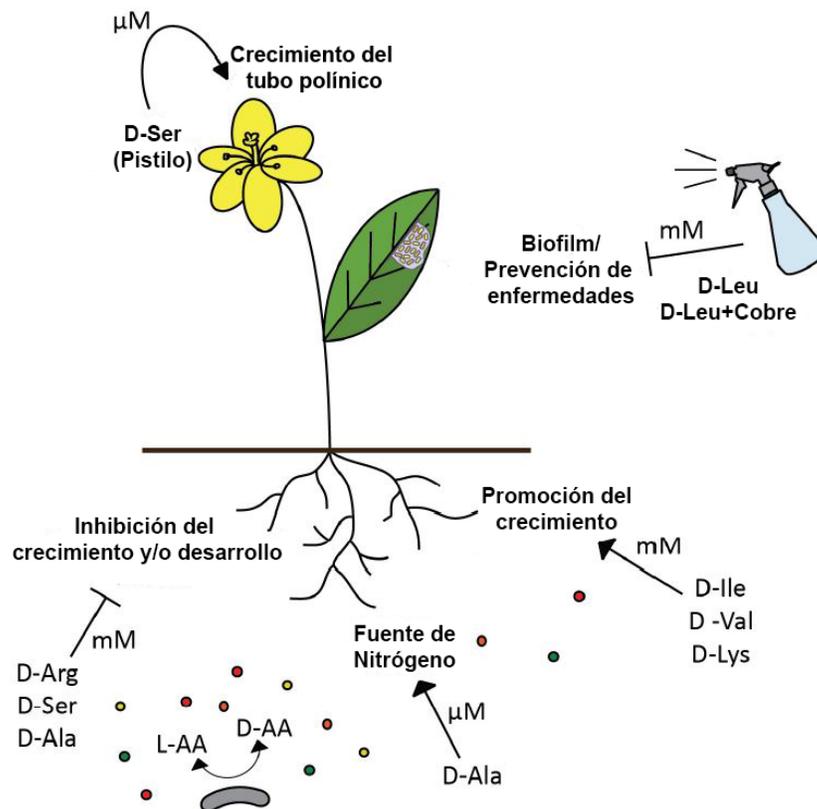


Figura 1.1 Los D-AAs como moduladores del crecimiento y salud de las plantas (modificado de

Aliashkevich *et al.*, 2018).

1.7 Los D-aminoácidos actúan como un lenguaje químico para mediar la comunicación entre especies

Existen varios ejemplos de una regulación mediada por los D-AAAs entre especies de bacterias y de la microbiota endófitas de mamíferos. La producción de D-AAAs en determinadas fases de crecimiento de las bacterias, proporciona una señal para que remodelen el peptidoglicano de la pared, tanto de la propia bacteria como de otras especies que no lo produce (Cava *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2009). Esto es muy importante, especialmente en las comunidades microbianas que habitan en la biopelícula (comunidad microbiana sésil que se adhiere a una superficie sólida y está rodeada por una matriz extracelular producida por bacterias), en donde las bacterias se protegen eficazmente de amenazas ambientales dañinas y pueden desarrollarse células persistentes tras el ataque con antibióticos. Cuando hay una escasez de nutrientes, la liberación extracelular de los D-AAAs puede señalar a la población bacteriana completa para que regulen la cantidad y la composición del peptidoglicano (Cava *et al.*, 2011).

La alta cantidad de D-Arg producida y secretada al medio por *Vibrio cholerae* en la fase estacionaria inhibió un amplio rango de bacterias filogenéticamente diversas, mientras que otros D-AAAs, como la D-Ala, la D-Met, la D-Ser, la D-His, la D-Gln y la D-Phe no lo pudieron hacer (Alvarez *et al.*, 2018). El efecto tóxico de la D-Arg en organismos sensibles a ella, como *Agrobacterium tumefaciens*, fue suprimido en mutantes del sistema de chaperona DnaJ y en la maquinaria de toma de fosfato (Alvarez *et al.*, 2018), siendo desconocidas las causas de este comportamiento. En este estudio, se propone a la D-Arg como un “bien público” compartido en comunidades de *Vibrio*, donde unos se especialicen en la producción de D-AAAs y los otros, los no productores, son los “tramposos” que se benefician de la producción de los D-AAAs para controlar las comunidades bacteriales sensibles (Alvarez *et al.*, 2018).

La microbiota del intestino en los mamíferos está compuesta por una numerosa diversidad de especies bacterianas que liberan D-AAAs en el huésped (Sasabe *et al.*, 2016). Por otro lado, las células epiteliales del intestino producen una D-AAO que puede regular los niveles endógenos de los D-AAAs, convirtiéndolos a α -cetoácidos y H_2O_2 . A su vez, el H_2O_2 tiene un

efecto tóxico sobre algunas poblaciones bacterianas (Nathan y Cunningham-Bussel, 2013), por lo que la interacción entre los D-AAs microbiológicos y la DAAO intestinal puede regular la composición de la microbiota del intestino. La D-Ala, el D-Asp, el D-Glu y la D-Pro han sido implicados en este efecto, el cual no se produce en ratones libres de gérmenes (Nathan y Cunningham-Bussel, 2013).

Por otro lado, esta microbiota del intestino puede ser un regulador importante del metabolismo de los D-AAs, modulando su concentración en la sangre y el cerebro del hospedero (Kawase *et al.*, 2017). De esta manera, la microbiota del intestino podría regular el funcionamiento del cerebro en mamíferos, al regular los niveles de D-Ser que llegan a este órgano (Kawase *et al.*, 2017; Hatanaka *et al.*, 2002). Esto sugiere la existencia de una ruta bidireccional de comunicación entre los microorganismos del intestino y el cerebro.

También, se ha demostrado la interacción entre la producción de D-Trp por las bacterias probióticas y las enfermedades alérgicas por vía aérea (Kepert *et al.*, 2017). Igualmente, los D-AAs Ile, Phe y Leu producidos por especies de *Staphylococcus* activaron los receptores de sabor dulce en el tracto respiratorio superior y digestivo, inhibiendo los mecanismos de señalización de los receptores de sabor amargo y la secreción de defensina en las células sinonasales. Esta respuesta provoca la supresión de la respuesta inmune innata, disminuyendo la muerte de la bacteria invasora (Lee *et al.*, 2017). Igualmente, la flora respiratoria normal también secreta D-AAs, que son usados para prevenir el crecimiento de bacterias compitiendo en el aire con ella, como *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.* 2017; Rasmuseen *et al.*, 2000).

A pesar de la riqueza de especies que habitan en la rizósfera, el papel de los D-AAs sobre ella es desconocido. Se ha sugerido que los exudados de D-AAs de la raíz pudieran participar en la atracción de determinados microorganismos, influenciar en la producción de antibacterianos o antimicóticos volátiles, o bien, pudieran servir como una fuente de C/N para las bacterias (Hener *et al.*, 2018). Así, las raíces de las plantas se podrían defender de microorganismos patógenos o atraera los benéficos (Hener *et al.*, 2018). En cuanto a la interacción planta-planta, un posible papel podría ser en el reconocimiento de sus vecinas. Por ejemplo, anteriormente se ha reportado que AAs no proteícos, como la meta-tirosina producida por las plantas, puede actuar como herbicida e inhibir el crecimiento y el

asentamiento de otras especies (Bertin *et al.*, 2007).

En general, el efecto de fuentes orgánicas de N sobre el desarrollo radical es poco estudiado; en particular, el efecto de los D-AAs sobre el desarrollo de este órgano es prácticamente desconocido.

1.8 Generalidades del sistema radical y su regulación

Las plantas, al ser organismos sésiles, adaptan su morfología y el crecimiento de sus órganos a las condiciones ambientales. En particular, la raíz puede variar su crecimiento de acuerdo al tipo de suelo y los nutrientes que éste contenga (Jink *et al.*, 2017; Dathe *et al.*, 2016).

Dos componentes importantes del sistema radical de la planta son la raíz primaria (RP) y las raíces laterales (RLs). La RP de *Arabidopsis* se inicia durante la embriogénesis a través de la especificación de una sola célula suspensora extraembrionaria, que genera el centro quiescente (CQ). El CQ está conformado por un pequeño grupo de células que raramente se dividen, pero son cruciales para el mantenimiento de la identidad de las células meristemáticas. Después de varias rondas de divisiones y expansiones celulares asimétricas, se origina el meristemo apical de la RP (Tian *et al.*, 2014; De Smet *et al.*, 2010). El meristemo apical de la RP está formado por un conjunto de células que se dividen y dan origen a todos los tejidos de la raíz. El crecimiento continuo de la RP es el resultado de la división celular, la elongación y la diferenciación en el meristemo de la RP (Jiang y Feldman 2005).

Por otro lado, la formación de RLs tiene una función crucial en el desarrollo y la construcción de los sistemas radicales ramificados, constituye la mayor masa de la raíz y lleva a cabo funciones claves en la exploración de los suelos, la toma y transporte de nutrientes y agua. Estas estructuras se forman a partir de las células del periciclo y, dependiendo de la especie, ocurren adyacente al polo del floema (maíz) o al polo del protoxilema (*Arabidopsis*) (Chen *et al.*, 2018; Hochholdinger y Zimmermann, 2008). Las células del periciclo especificadas se denominan células fundadoras y a partir de ellas se originan los primordios de raíces laterales (PRL), que después de una serie de divisiones anticlinales y periclinales originan a las RLs. Las RLs cuentan con un nuevo meristemo y son capaces de alargarse

(Peret *et al.*, 2009; De Smet *et al.*, 2006; Malamy y Benfey 1997; Dolan *et al.*, 1993).

La formación de las RLs se divide en cinco etapas: 1) la especificación de las células fundadoras de las RLs, 2) la iniciación de las RLs, donde se lleva a cabo una migración nuclear de dos células fundadoras a una pared celular común y sufren una serie de divisiones anticlinales, 3) morfogénesis de las RLs, en la cual las células fundadoras se dividen periclinalmente para formar el PRL, 4) la emergencia de la RL y 5) la activación del meristemo de las RLs (Figura 1.2) (Banda *et al.*, 2019; Jung y McCouch, 2013).

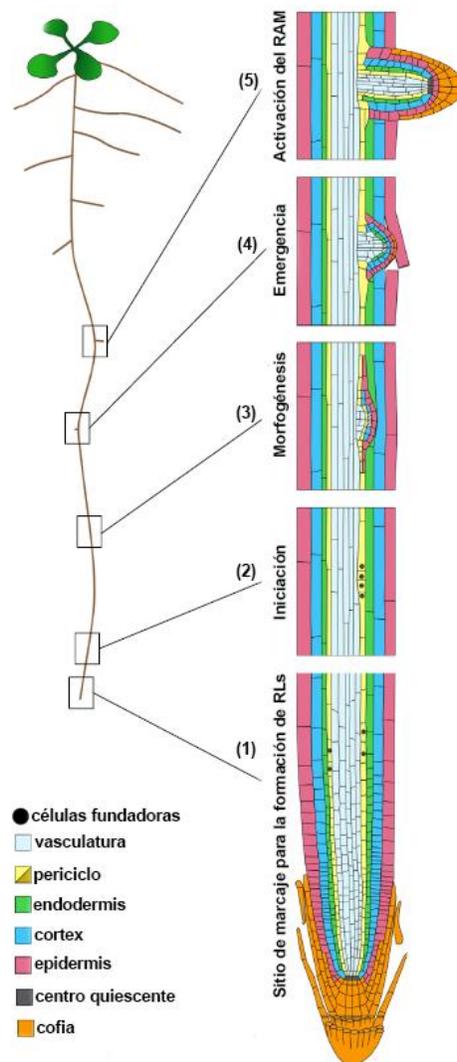


Figura 1.2. Eventos de formación de la RL. 1) Las células del periciclo son “marcadas” para la iniciación de la RL, 2) la iniciación de la RL (divisiones anticlinales que producen células más largas y cortas), 3) El desarrollo del PRL mediante divisiones periclinales, 4) la emergencia de la PRL y 5) activación del RAM de la RL (modificado de Banda *et al.*, 2019).

La configuración espacial del sistema radical (número y longitud de órganos laterales), también llamada arquitectura de raíz y varía ampliamente dependiendo de la especie de planta, la composición del suelo y particularmente, de la disponibilidad de agua y nutrimentos minerales (Bao *et a.*, 2014; Smith y De Smet, 2012).

Las auxinas son un estimulador clave en muchas especies para la formación de las RLs (Du y Scheres, 2018). Estudios recientes en *Arabidopsis thaliana* y otras especies también han demostrado que las proteínas transportadoras de auxinas son necesarias en este proceso (Xuan *et al.*, 2016; Fukaki *et al.*, 2007). El papel de las auxinas en el marcado de las células fundadoras ya está establecido, pero el mecanismo de regulación dependiente de auxina y de la periodicidad de la iniciación del PRL todavía no está elucidado (Du y Scheres, 2018; van Norman *et al.*, 2013; Dubrovsky *et al.*, 2011).

Un punto de control en el proceso de formación de RLs consiste en el marcado de las células fundadoras de las RLs y su subsecuente división, formando un estadio temprano del primordio. En *Arabidopsis* esto ocurre en la zona de diferenciación (Marhavý *et al.*; 2016); estas especificaciones han sido asociadas con un incremento de la respuesta a auxina en un pequeño grupo de células del periciclo adyacente al protoxilema (Goh *et al.*, 2012; Benková *et al.*, 2003). Otro punto de control regula la morfogénesis de la RLs. Las auxinas actúan como un disparador morfogénico de la iniciación y organogénesis de la RLs (Du y Scheres, 2018; Dubrovsky *et al.*, 2008).

Muchos estudios fisiológicos y genéticos han demostrado el papel de las auxinas en la iniciación de RLs, particularmente en la iniciación y desarrollo del primordio (Du y Scheres, 2018; Fukaki *et al.*, 2007). Estudios mediante inhibidores del transporte de auxina han demostrado que el transporte polar de auxina es una señal importante durante la iniciación de la RL (Du y Scheres, 2018; Casimiro *et al.*; 2010).

El modelo de la vía de señalización de auxinas para la iniciación de RLs y desarrollo del

PRL se ha construido en *Arabidopsis*, donde se ha demostrado que, una vez que la auxina se acumula en la célula del periciclo, desencadena una vía de transducción de señales que promueve la degradación de las proteínas Aux/IAAs (IAA14/SLR) a través del complejo SCF^{TIR1/AFBs} y el proteosoma 26S, resultando así en la liberación y activación de los factores de transcripción ARF7/ARF19, entre otros. Estos factores de transcripción activan la transcripción de genes blanco requeridos para la iniciación de las RLs (LBD16/ASL18, LBD29/ASL16). LBD16/ASL18 y LBD29/ASL16 son proteínas nucleares que están involucradas en la regulación transcripcional de la iniciación de las RLs. Esta vía resulta en la división anticlinal de las células en el periciclo del protoxilema para la iniciación de las RLs (Figura 1.3) (Fukaki y Tasaka, 2009).

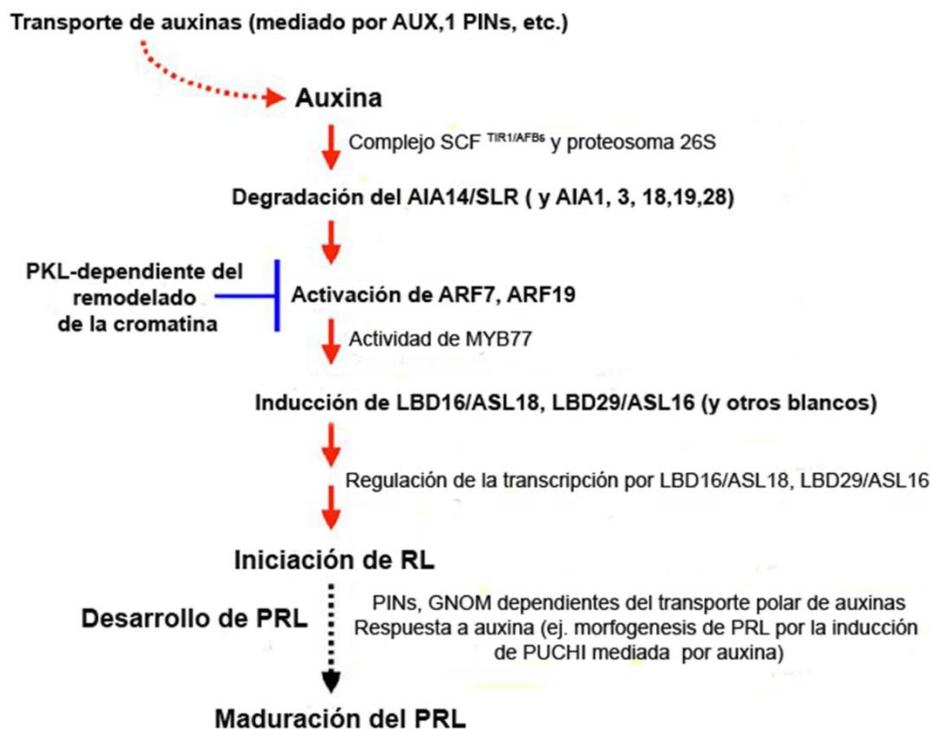


Figura 1.3. Modelo de iniciación de raíces laterales mediada por auxinas (modificado de Fukaki y Tasaka, 2009).

LBD16/ASL18 y *LBD29/ASL16* son miembros de la familia *LBD* (*Lateral Organ Boundaries-Domain/ Asymmetric Leaves2-LIKE*) (Goh *et al.*, 2012; Shuai *et al.*, 2002) y son inducidos

por auxinas en las raíces, sólo si ARF7 y ARF19 están presentes (De Rybel *et al.*; 2010). Se ha demostrado que la sobreexpresión de *LBD16-SRDX* (LBD16 con un dominio de represor transcripcional) induce una fuerte supresión de la formación de RLs, y se sugiere que el LBD16 endógeno regula positivamente la iniciación de las RLs. Los mutantes con pérdida de la función de LBD16 presentan una disminución en el número de RLs, sugiriendo un papel redundante para los miembros homólogos de la familia *LBD/ASL* a LBD16 (Goh *et al.*, 2012).

Durante la formación de las RLs, ocurre una interacción entre hormonas. La iniciación de las RL es regulada positivamente por auxinas, pero negativamente por citocininas y altas concentraciones de etileno. Las citocininas inhiben la acumulación de auxina por una alteración de la expresión de los PINs, proteínas que participan en el transporte de auxinas. De este modo, se inhibe el gradiente de auxinas para la iniciación de las RLs (Jing y trader, 2019). Altas concentraciones de etileno aumentan el transporte acropetal y basipetal de auxinas, inhibiendo la iniciación de las RLs (Liu *et al.*, 2017; Negi *et al.*, 2008). Cuando las concentraciones de etileno son bajas se promueve la iniciación de las RLs a través de un incremento de la síntesis de auxina dependiente de Trp. En este proceso participan las proteínas WEAK ETHYLENE INSENSITIVES (WEI2 y WEI7) (Fukaki y Tasaka *et al.*, 2009). El etileno estimula la biosíntesis de auxina y el transporte basípetal de auxina hacia la zona de elongación, donde activa una respuesta local que conduce a la inhibición de la elongación celular (Korobova *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2017).

Además de los factores hormonales, las plantas al ser organismos sésiles dependen completamente de los nutrientes que están disponibles en sus alrededores. La disponibilidad y distribución de nutrientes está en un flujo constante, y para que las plantas pueden alcanzar un óptimo crecimiento deben ser capaces de percibir estos cambios en los recursos y responder apropiadamente a los mismos.

1.9 Influencia de los nutrientes en el desarrollo de la arquitectura radical

La arquitectura del sistema radical está regulada genéticamente y es muy plástica, es decir, puede variar en respuesta a diversos factores ambientales. Esta plasticidad ha sido considerada como una capacidad esencial de las plantas que facilita su adaptación a los

factores físicos, químicos y biológicos de su medio ambiente. El desarrollo del sistema radical es un importante rasgo agronómico. La correcta arquitectura radical en los suelos le permite a la planta sobrevivir a periodos de falta de agua y nutrientes y competir eficientemente por los recursos (Bhabhor et al., 2018; Malamy, 2005).

Los nutrientes en el suelo, tales como el NO_3^- , el fosfato (PO_4^-) y el hierro, actúan como señales que pueden ser percibidas por las plantas, las cuales activan mecanismos moleculares que modifican los procesos de división y diferenciación celular dentro de la raíz, y tienen un gran impacto en la arquitectura del sistema radical. Importantes procesos de desarrollo, tales como la formación de PRs, el crecimiento de la RP y la formación de las RLs son particularmente sensibles a cambios en la concentración interna y externa de nutrientes (Gruber et al., 2013).

Dentro de estos cambios, uno de los más estudiados es la modulación de la velocidad de crecimiento de la raíz en respuesta a NO_3^- y PO_4^- (Gruber et al., 2013; López-Bucio et al., 2003). Drew (1975) reportó un incremento del número de RLs en respuesta a PO_4^- y NO_3^- en cebada, mientras que Linkohr et al. (2002) demostraron que un parche rico en nutrientes inducía un incremento localizado en la iniciación y la elongación de las RLs en la misma planta. Esta respuesta fue estudiada después en *Arabidopsis*, donde se demostró que había un incremento en la elongación de las RLs en las regiones de la RP expuesta a alta concentración de NO_3^- (Zhang y Forde, 1998). Estas modificaciones en la arquitectura radical no sólo están relacionadas con la estimulación de la elongación de las RLs dentro de compartimento que contienen NO_3^- , sino también con la represión del crecimiento de estas raíces fuera de los parches de NO_3^- (Giehl et al., 2014). En el caso del NO_3^- también se han realizado estudios en chícharo (Wiersum, 1958), trigo (Hackett, 1972), maíz (Granato y Raper, 1989) y chile habanero (Celis-Arámburo et al., 2011), donde se aplicó de manera localizada, resultando en la estimulación de la longitud y el número de las RLs.

Por otro lado, el NH_4^+ , aplicado en concentraciones milimolares, resulta tóxico para las plantas. Este nutriente causa inhibición en el crecimiento de las raíces y brotes, clorosis en las hojas, desequilibrio iónico, desbalance en el pH de la membrana plasmática o estrés oxidativo (Esteban et al., 2016). En plántulas de de cebada (Drew, 1975) y *Cedrus atlantica* (Boukcim et al., 2006), el NH_4^+ inhibe el crecimiento de la RP a través de una represión de

la proliferación celular en el meristemo apical y, además, reduce el tamaño de las células (Liu *et al.*, 2013). Sin embargo, la aplicación localizada de este compuesto estimula la formación de las RLs en *Arabidopsis* (Liu y Wiren, 2017; Araya *et al.*, 2016), a través de un incremento de la iniciación de los PRLs. No obstante, la elongación y la emergencia de las RLs es inhibida (Lima *et al.*, 2010).

El fósforo (Pi) es otro macronutriente que limita el crecimiento de los cultivos debido a su alta afinidad para unirse a metales en suelos ácidos y alcalinos (Raghothama, 1999). En *Arabidopsis*, altas concentraciones del mismo promueven el crecimiento de la RP e inhiben el de las RLs (Satbhai *et al.*, 2015), mientras que bajas concentraciones alteran la tasa de crecimiento de la RP e incrementa la formación y emergencia de las RLs, incrementando igualmente la densidad y la longitud de los PRs (Lopez Bucio *et al.*, 2002).

El azufre es un macronutriente esencial para la síntesis de los AAs metionina y cisteína y otros compuestos involucrados en el metabolismo celular. Las plantas adquieren este compuesto del suelo en forma de sulfato; cuando hay una baja disponibilidad de éste, se activa el gen que codifica para la enzima nitrilasa 3 (NIT3). Esta enzima convierte al ácido indol-3-acetonitrilo (IAN) a auxina, provocando así un aumento en el número de RLs (Kutuz *et al.*, 2002) y en la longitud de la RP (Gruber *et al.*, 2013).

Por otro lado, la baja disponibilidad de K⁺ provoca una reducción en la longitud de la RP y la elongación de RLs (Kellermeier *et al.*, 2013), mientras que, con la limitación de hierro, incrementa la formación y elongación de los PRs, pero altera la formación de las RLs (Giehl *et al.*, 2012).

En general, la disponibilidad de los nutrientes modula el crecimiento radical y su arquitectura en las plantas, lo cual es dependiente del tipo de planta y nutriente en cuestión (Figura 1.4). Los mecanismos por los cuales los nutrientes provocan estos cambios aún están siendo investigados (Giehl *et al.*, 2014).

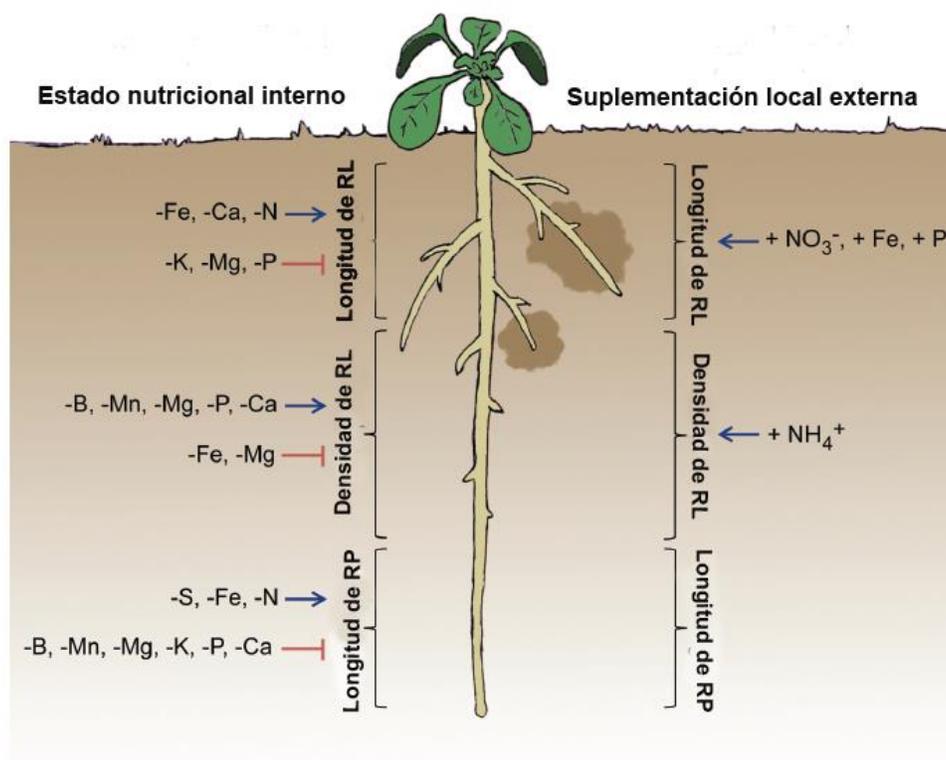


Figura 1.4. Cambios en los parámetros de crecimiento radical en respuesta a la disponibilidad (homogénea o heterogénea) de los nutrientes. La disponibilidad local de algunos nutrientes puede afectar la elongación o ramificación de las raíces en parches enriquecidos. Los parches oscuros observados al lado derecho de la figura indican el incremento de un nutriente en particular (modificado de Giehl *et al.*, 2014).

La descripción del papel del NH_4^+ o los AAs como moléculas señal todavía es muy pobre, a diferencia de lo que se sabe para NO_3^- . La primera evidencia que el NH_4^+ o derivados metabólicos podrían servir como una señal para las plantas fue la de la regulación de los transportadores de NH_4^+ (Walch-Liu *et al.*, 2006). También, se ha observado que los productos de asimilación del N (Gln y Glu) podrían actuar como moléculas señal cuando sus niveles son percibidos como un indicador de un estatus alto de N interno. El L-Glu también puede ser una molécula señal que regula el crecimiento radical en *Arabidopsis* (Walch-Liu y Forde, 2008).

La Gly y el L-Glu provocaron efectos tanto positivos como negativos en el crecimiento de la

RP de *Senecio vulgaris* (Skinner y Street, 1953). En *Avena sativa*, L-Val, L-Ser, L-Tyr, L-Ile, L-Leu y L-Thr reducen el crecimiento longitudinal de las raíces (Leblanc *et al.*, 2008).

El L-Glu es una molécula señal en los mamíferos, y en 1998 se descubrió que *Arabidopsis* poseía una familia de genes tipo *GLR* (receptores de glutamato) que estaban relacionados con los *GLR* del tipo ionotrópico (*iGluRs*) de mamíferos (Lam *et al.*, 1998). También, se ha reportado que la aplicación externa del L-Glu en las plantas provoca cambios en la arquitectura radical que han sido atribuidos a un efecto de señal (Walch-Liu y Forde, 2008), donde el ápice radical puede percibir al L-Glu por medio de receptores (Walch-Liu *et al.*, 2006). El L-Glu, a pesar de inhibir el crecimiento de la RP de *Arabidopsis*, causa un aumento en la formación de RLs (Walch-Liu *et al.*, 2006).

1.10 Receptores de glutamato y su función en plantas

La membrana contiene una variedad de receptores involucrados en la percepción de nutrientes, iones y metabolitos (Davenport, 2002). Los GLR fueron descubiertos en animales y en estos organismos se dividen en dos grupos: los metabotrópicos (mGLuR) y los ionotrópicos (iGLuR). Los mGLuR comprenden proteínas integrales de membrana que están acoplados a proteínas G. Este grupo de GLR no forman canales iónicos y ellos proporcionan un mecanismo por el cual el L-Glu puede modular la excitabilidad celular y la transmisión sináptica en el sistema nervioso central a través de segundos mensajeros (Niswendwe y Conn 2015). Los miembros de los iGLuR son proteínas integrales de membrana consideradas canales catiónicos no selectivos que median la sinapsis excitatoria rápida en el sistema nervioso central de los vertebrados y son permeables a Ca^{2+} , Na^+ y otros cationes (Kumar y Mayer, 2013).

Con base en su respuesta farmacológica a agonistas y antagonistas, los iGLR se dividen en cuatro familias en mamíferos: los de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), el de tipo kainato, el de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y el de tipo delta (Meyer, 2006).

Posteriormente, se encontraron genes *GLRs* en otras especies como *Caenorhabditis elegans* (Maricq *et al.*, 1995) y *Drosophila melanogaster* (Ultsch *et al.*, 1993), y en plantas (Chiu *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2002). En plantas se identificaron 20 genes del tipo receptor

de glutamato ionotrópico (iGLR) en el genoma de *Arabidopsis* (Chiu *et al.*, 1999; 2002). Estas secuencias se agruparon en tres clados (I, II y III). Tiempo después, se descubrieron proteínas tipo GLR en *Raphanus sativus* L. (Kang *et al.*, 2006) y *Oryza sativa*. En esta última especie, se encontraron 24 secuencias *OsGLR* en su genoma que fueron muy similares a los *AtGLR* (Li *et al.*, 2006), aunque en esta especie se agruparon en cuatro clados. Otros 13 genes se encontraron en tomate y se nombraron *SIGLR*, siendo similares con los *AtGLR* del clado I y III (Aouini *et al.*, 2012).

Estos receptores son complejos macromoleculares, conformados por subunidades proteicas que poseen de 800 a 960 AAs y con una masa molecular de aproximadamente 100 kDa. De igual manera, contienen seis dominios conservados que son similares a los de animales en un 16 a 63%. Éstos se dividen en: dos sitios de unión a ligandos extracelulares (S1-S2) y cuatro dominios transmembranales (M1-M4) que pueden ser o no idénticos (Figura 1.5). Los dominios transmembranales forman el poro que tiene un tamaño de 3.34 Å y permite el paso de iones (Weiland *et al.*, 2015; Hedrich *et al.*, 2012; Bigge, 1999).

La unión de una molécula a los sitios S1 y S2 permite las modificaciones conformacionales que afectan al receptor y alteran la posición de la estructura secundaria cerca de la región del poro. Estos cambios son esenciales para el paso de iones (Sobolevsky *et al.*, 2009). La región del N terminal tiene más sitios de unión al ligando, permitiendo la unión de los *AtGLRs* a otros agentes que podrían actuar como sus antagonistas/agonistas o como moduladores.

Los GLR se conforman por cuatro subunidades (Dubos *et al.*, 2005). Los *AtGLR* están más relacionado estructuralmente a los receptores del tipo NMDA de mamíferos. Para estos organismos, los receptores NMDA son funcionales solo si tres diferentes clases de subunidades (NR-1, NR-2 y NR-3) son ensambladas en una combinación homo o heterotetramérica (Ulbrich e Isacoff, 2008). El ensamble del receptor se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, donde el dominio N terminal de los diferentes iGLR interactúan y reconocen los patrones adecuados (Penn *et al.*, 2008; Ayalon *et al.*, 2005; Ayalon y Stren-Bach, 2001). Los GLRs también son afectados por fosforilación, palmitoilación, glucosilación y S-nitrosilación, modificando así su respuesta (Traynelis *et al.*, 2010).

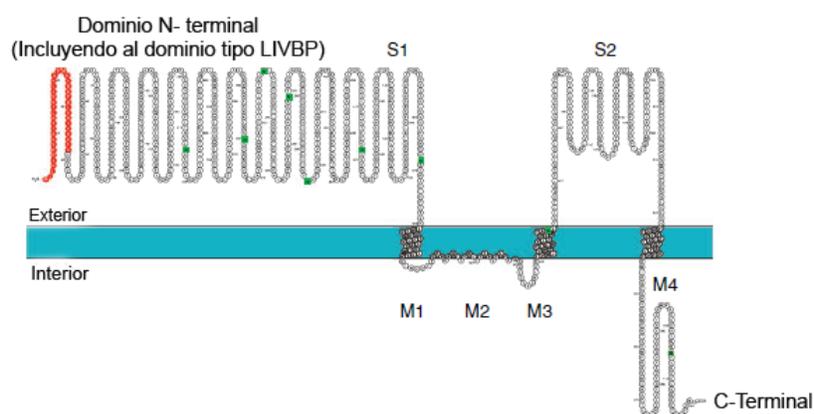


Figura 1.5 Estructura teórica del receptor AtGLR3.7 en la bicapa lipídica. En rojo se señala la secuencia señal y en verde los posibles sitios de glucosilación. En la figura se observan los seis dominios que conforman al GLR: los dominios transmembranales M1-M4 y los S1-S2 de unión al ligando, además de un segundo dominio de unión situado cerca del extremo N-terminal con una similitud a la proteína de unión tipo LIVBP (leucina/ isoleucina/ valina) (modificado de Omasits *et al.*, 2014).

Los agonistas verdaderos de los GLR no están totalmente definidos para las plantas. Se considera que el L-Glu y la Gly son los agonistas principales del receptor. Sin embargo, estudios de expresión heteróloga han demostrado la existencia de una amplia especificidad de AAs que pueden actuar como agonistas de los GLR. Un ejemplo es la despolarización de la membrana causada por L-Ala, L-Asn, L-Cys, L-Glu, L-Gly y L-Ser en raíces de la mutante knockout de *AtGLR3.3* de *Arabidopsis* (Qi *et al.*, 2006). Sin embargo, los D-AA también pueden ser agonistas de los GLR. La D-Ser es un agonista muy activo para el receptor *GLR1.2* en el tubo polínico de *Arabidopsis* y tabaco, modulando el crecimiento de este órgano (Michard *et al.*, 2011). Además, se ha encontrado que diferentes AAs pueden unirse a un receptor y esta unión depende de la estructura y carga del aminoácido (Tapken *et al.*, 2013).

Hasta la fecha, se sabe que los GLRs participan en las siguientes funciones fisiológicas en las plantas: la regulación del metabolismo de C y N y el balance de agua (Kang *et al.*, 2004), la respuesta a la luz (Kang y Turano, 2003), el control de la señalización por Ca^{2+} (Lam *et al.*, 1998), la regulación de la biosíntesis de ABA (Kim *et al.*, 2001), el balance hídrico (Kang y Turano, 2003), la coordinación de la actividad mitótica durante el desarrollo de la raíz (Li

et al., 2006; Walch-Liu *et al.*, 2006), el crecimiento del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011), la respuesta a la toxicidad por el aluminio (Sivaguru *et al.*, 2003), la regulación de la despolarización de la membrana inducida por L-Met en las hojas de *Arabidopsis* (Tapken *et al.*, 2013), las señales de defensa y el control del gravitropismo en raíces (Manzoor *et al.*, 2013) y el desarrollo de RLs (Vincill *et al.*, 2013).

Recientes trabajos señalan el posible papel del receptor AtGLR3.4 en la regulación de la germinación bajo estrés salino (Cheng *et al.*, 2018), así como su papel en la quimiotaxis de esperma que es esencial para la fertilización en animales y plantas (Ortiz Ramírez *et al.*, 2017). Sin embargo, la función de otros GLR de *Arabidopsis* y de otras plantas es materia de estudio en diversas investigaciones.

1.11 Modelo de estudio: chile habanero

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

Ramírez y Vásquez (2007) señalan que el chile habanero es una de las especies hortícolas de mayor importancia económica para los productores del estado de Yucatán. En el Estado se cosechan alrededor de 3,000 toneladas anuales (Sagarpa, 2011), ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate (Tun, 2001).

El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica; se ha demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, vitaminas como la C, E y A y minerales (Guzmán *et al.*, 2004). Esta especie se encuentra clasificada taxonómicamente de acuerdo a Tun (2001), de la siguiente manera:

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



El chile habanero se desarrolla mejor a una temperatura promedio superior a 24 °C y no mayor a los 35 °C, así como a una humedad del suelo entre 80 y 90% (Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Pacheco-Méndez, 2005). Las bajas temperaturas (menos de 16 °C) provocan un menor y más lento crecimiento, disminuyendo de esta manera el rendimiento y calidad del fruto.

El suelo es un factor limitante para el cultivo de esta especie, debido a los terrenos carbonatados y la presencia de afloramientos rocosos en la Península (Borges-Gómez *et al.*, 2008). Además, el 90% de los suelos de la Península presentan una concentración alta de materia orgánica (Ramírez, 2005). Este cultivo crece en suelos profundos y bien drenados, con textura entre franco limoso y franco arcilloso, con un pH desde 6.5 a 7.0, de un buen nivel de fertilidad y con una leve pendiente, no menos de 8%, para evitar áreas que se encharquen de una fuerte lluvia (Pacheco-Méndez, 2005).

En términos generales, el cultivo de chile habanero requiere altas cantidades de K, N, Ca, Mg y P, siendo los requerimientos nutritivos durante todo el ciclo de producción de 300, 250, 200, 100 y 100 Kg, respectivamente (Prado, 2006). Aunque estas cantidades pueden variar de acuerdo al tipo de suelo, entre otros factores.

1.11.1 Antecedentes del efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de chile habanero

En chile habanero, se observó que el L-Glu no tuvo un efecto significativo en el crecimiento de la RP, como se había reportado en *Arabidopsis* (Walch-Liu y Forde, 2008). Sin embargo, en presencia de Gly, se presentaron cambios significativos en el crecimiento de la RP, particularmente se observó una inhibición del crecimiento de la RP y una estimulación en la elongación de PRs (Domínguez-May *et al.*, 2013). Al profundizar en esta respuesta se encontró que las raíces creciendo en presencia de Gly presentaron el mismo número de células que su respectivo testigo creciendo en KCl, pero de menor tamaño. Por lo que el efecto sobre el crecimiento fue debido a una inhibición en la elongación y no en la división celular. Además, la Gly indujo una acumulación de gránulos de almidón en el ápice radical (Domínguez-May *et al.*, 2013).

Por otro lado, se realizó una caracterización del efecto de los D-AAs sobre el crecimiento radical de chile habanero. Inicialmente, estos experimentos fueron llevados a cabo en condiciones controladas en cajas de Petri y durante tiempos cortos (entre 4 y 10 días). Bajo estas condiciones, se observó que los D-AAs suministrados individualmente, modificaron el crecimiento de las raíces de chile habanero y que este efecto fue dependiente del tipo y la concentración. Los D-AAs Phe, Tyr, Asn, Lys y Met inhibieron el crecimiento de la RP a 0.5 mM; sin embargo, la RP fue más sensible a la presencia de D-Asp y D-Ala, donde ocurrió una inhibición desde dosis de 0.05 y 0.1 mM, respectivamente (Figura 1.6A, Serralta-Interian, 2014). En cambio, para *Arabidopsis*, los D-AAs Val, Gln, Phe, Asn, Lys y Met provocaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento sólo hasta dosis por arriba de 1 mM. La diferencia más notoria entre chile habanero y *Arabidopsis* se pudo observar para el efecto con el D-Asp, el cual inhibió el crecimiento en esta última especie a dosis de 5 mM, 100 veces más alta a la usada para chile habanero (Figura 1.6 B, Gördes *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que las raíces de chile habanero son más sensibles a la presencia de los D-AAs, en comparación a las de *Arabidopsis* (Gördes *et al.*, 2011).

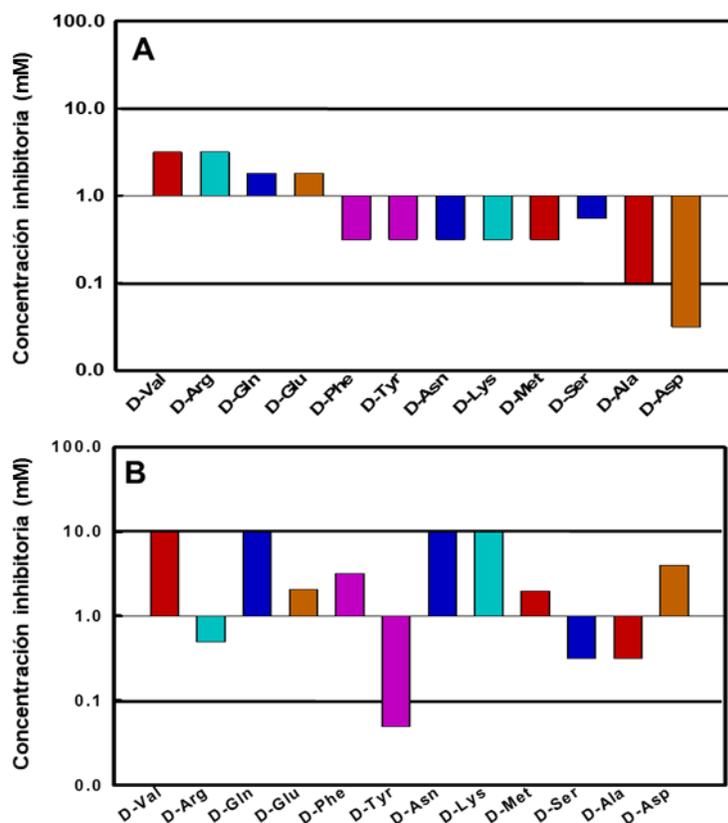


Figura 1.6. Dosis inhibitoria de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz. Los datos representan la concentración de los D-AA a la cual se observó una inhibición (30-50%) sobre el crecimiento de la RP en chile habanero (A) y *Arabidopsis* (B) (modificado de Gördes *et al.*, 2011). Se observa que la dosis de inhibición para cada aminoácido fue dependiente de la especie. Las barras de colores diferentes representan la clasificación de los aminoácidos de acuerdo al grupo R. Rojo: grupo R alifático, Azul: grupo R polar sin carga, Naranja: grupo R cargado negativamente, Morado: grupo R aromática, verde claro: grupo R cargado positivamente.

Sin embargo, la D-Leu y D-Cys aumentaron el número de RLs y PR, respectivamente. Bajo estas mismas condiciones, se observó que la D-Val inhibió el crecimiento de la RP a las 24 horas de exposición; sin embargo, a las 96 horas las raíces logran recuperar el crecimiento alcanzando valores similares a los del testigo con KCl (Serralta-Interian *et al.*, 2014).

Entonces, se decidió evaluar esta respuesta durante tiempos más prolongados de exposición a los D-AA. En esta ocasión, el experimento fue desarrollado en hidroponía,

con plántulas de 45 días de edad que estuvieron expuestas durante 30 días a los tratamientos con estos compuestos. Para la selección de los D-AAs se escogieron los tres que provocaron un efecto positivo en el crecimiento de chile habanero y se aplicaron en forma de mezcla (tal como pueden encontrarse en el suelo) y por separado. Entonces, las plantas crecieron con 1 mM de KNO_3 como principal fuente de nitrógeno y se le adicionó la mezcla de los aminoácidos (0.01 mM D-Val, D-Leu y D-Cys, 1:1:1). Los resultados mostraron que la mezcla aumentó la longitud radical total, así como el área radical (Serralta-Interian *et al.*, 2014).

A partir de estos resultados, surgieron las siguientes preguntas, las cuales fueron atendidas en el presente trabajo:

¿Cuáles son los cambios morfológicos que ocurren en el ápice radical de chile habanero expuesto a los D-AAs?

¿Están participando los GLR en la respuesta radical a D-AAs?

¿Están involucradas las auxinas en la respuesta radical a los D-AAs?

HIPOTESIS

La exposición de la raíz de chile habanero a los D-AAs (D-Leu, D-Val y D-Cys), a diferencia de sus estereoisómeros L, inducirá la activación de un GLR y/o cambios en la señalización de auxina en el ápice radical, que conducirán a modificaciones morfológicas en la raíz.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los cambios a nivel morfológico que producen los D-AAs (D-Leu, D-Val y D-Cys) en la raíz de chile habanero en condiciones *in vitro* y determinar la posible participación de los GLR y de auxinas en esta respuesta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los cambios morfológicos que se inducen en la RP de chile habanero cuando crecen en presencia de los D-AAs, en condiciones *in vitro*.
- Determinar la actividad de un GLR en las raíces de chile habanero expuestas a los D-AAs y evaluar su papel en la respuesta radical.
- Estudiar la participación de las auxinas en la respuesta radical inducida por D-AAs.

JUSTIFICACIÓN

Los D-AAs están presentes en las plantas debido a que pueden ser tomados del suelo en su forma libre o conjugada, o por medio de un metabolismo endógeno. Sin embargo, el conocimiento del papel de estos compuestos en la fisiología de la planta es limitado. Se sabe que pueden promover el crecimiento o resultar dañinos para las plantas dependiendo de la especie, la dosis y el tipo de D-AA. Se ha reportado que en *Arabidopsis* pueden tener un papel como fuente de N o como molécula señal, aunque no se ha estudiado a fondo su función en esta especie, ni en otras de interés comercial.

El chile habanero, es una especie de interés comercial en la Península de Yucatán, la cual puede estar expuesta a los D-AAs, debido al tipo de fertilización de la planta o a las condiciones climáticas donde se cultiva, pudiendo así tener un efecto sobre su crecimiento

y desarrollo. Previamente, se había reportado que determinados D-AAs, como Val, Leu y Cys pueden incrementar el crecimiento de las raíces y aumentar los niveles de metabolitos nitrogenados en plantas de chile habanero en hidroponia; aunque se desconoce cómo estos compuestos pueden provocar el efecto. Por lo tanto, conocer el posible mecanismo de cómo actúan en la planta podría ayudar a comprender su papel en el desarrollo de ésta y a su utilización como parte de esquemas de fertilización basados en fuentes de N orgánicas, lo que puede ayudar a contrarrestar la baja producción actual de chile habanero de forma amigable con el medio ambiente.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 1.7 se presenta en forma resumida la estrategia experimental para abordar las preguntas realizadas en la tesis.

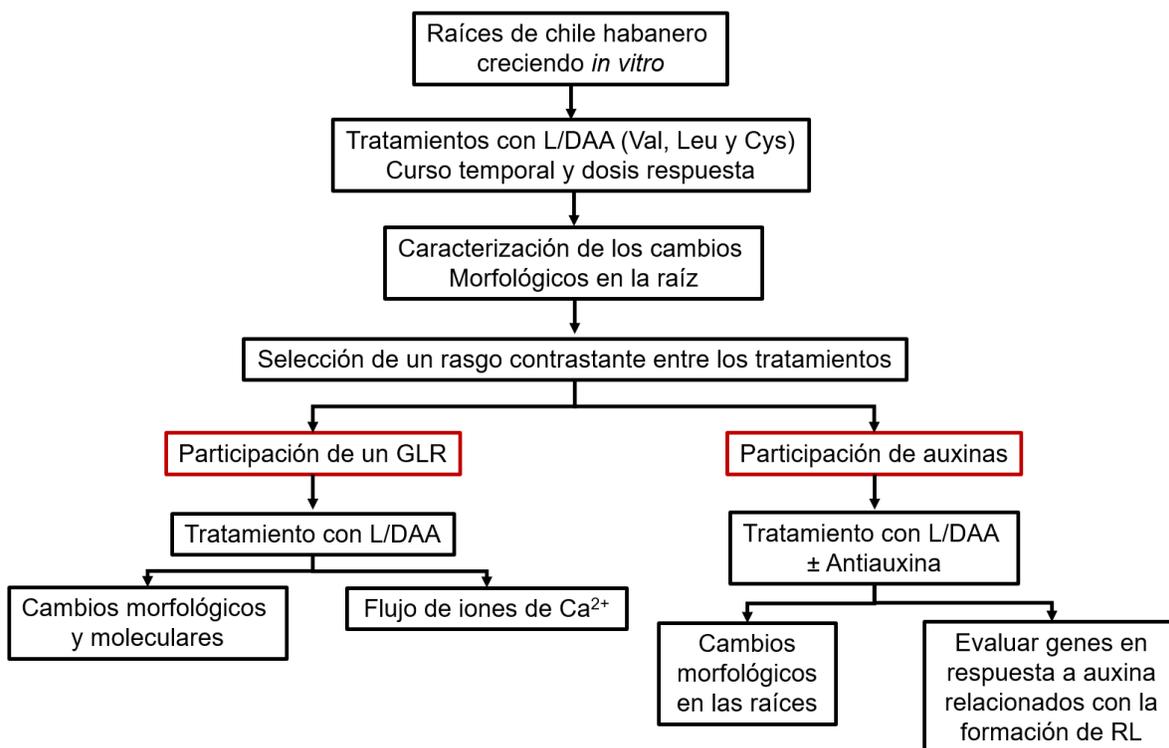


Figura 1.7. Estrategia experimental general

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS D-AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL EN CHILE HABANERO EN CONDICIONES *IN VITRO*

2.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas tienen una gran capacidad para adaptar su crecimiento y desarrollo a los continuos cambios ambientales. La plasticidad en el crecimiento de éstas se atribuye a la arquitectura del sistema radical donde la raíz es el principal órgano responsable de la absorción de los nutrientes y el agua, así como el anclaje de la planta al suelo. La RP y las RLs son dos componentes importantes del sistema radical en plantas dicotiledóneas (Tian *et al.*, 2014).

Las RLs en *Arabidopsis* se inician con la especificación de las células fundadoras en el periciclo opuestas a cada polo del xilema para la formación del PRL (Parizot *et al.*, 2008). Seguidamente, estas células sufren una serie de divisiones anticlinales y periclinales en la zona de diferenciación, definiendo así la estructura del PRL, que posteriormente emerge a través de las capas del tejido de la RP y adquiere un meristemo activo (Banda *et al.*, 2019).

Los procesos que regulan el desarrollo de las RLs dependen de la especie y de los diversos estímulos ambientales y, aunque los mecanismos que controlan la etapa de iniciación de este proceso aún son poco conocidos, se propone que debieran tener características comunes fundamentales entre los diferentes taxas (Dubrovsky *et al.*, 2006; Malamy, 2005).

Los estímulos ambientales, como la disponibilidad de nutrientes en el suelo, son moduladores de la estructura radical. En el caso de las formas inorgánicas de N como el NO_3^- éste puede desempeñar un papel en la respuesta radical, influyendo en la formación de RLs o en el crecimiento de la RP que varía dependiendo de la concentración y la especie (Célis-Arámburo *et al.*, 2011; Walch-Liu y Forde, 2008).

Por otro lado, se sabe que las formas solubles de N orgánico, incluyendo aminoácidos (L y D) y pequeños péptidos, pueden representar una fuente significativa de N para las plantas, en particular, en suelos templados donde las tasas de mineralización son bajas (Tegeeder y

Rentsch, 2010). Sin embargo, pocos estudios han examinado el efecto de los AAs y péptidos sobre el crecimiento y proliferación de la raíz (Forde, 2014). La exposición de la RP de *Arabidopsis* a bajas concentraciones de L-Glu (<50 μM) tuvo un efecto distintivo en su estructura, donde se observa la inhibición del crecimiento de la RP y la estimulación de las RLs (Walch-Liu y Forde, 2008).

Las plantas pueden estar expuestas a los D-AAs a partir de la solución del suelo. También, se ha demostrado que éstas contienen estos compuestos en sus tejidos, en forma libre o conjugada (Robinson, 1976), los cuales son considerados como un constituyente principal, aunque en un bajo porcentaje (Brückner y Westhauser, 2003). A pesar de que se ha detectado la presencia de los D-AAs en algunos organismos, no se conoce completamente su función.

Existe mayor conocimiento acerca del papel de estos compuestos en animales, donde ellos participan en la síntesis y regulación hormonal, en procesos fisiológicos como la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria neuronal, como indicadores de edad, entre otros procesos (Mori *et al.*, 2010; Hamase *et al.*, 2009; Morikawa *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000; D'Aniello *et al.*, 1993; Dunlop *et al.*, 1986).

Los estudios sobre el efecto de los D-AAs en el desarrollo de las plantas son muy escasos. Se ha reportado que en *Arabidopsis*, estos compuestos tienen un efecto sobre el crecimiento de la raíz, ya sea positivo o negativo, dependiendo del tipo de D-AA (Gördes *et al.*, 2011). Además, la D-Ser participa en el crecimiento del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011). Por otro lado, se observó que al exponer a la RP de chile habanero a la presencia de los D-AAs, durante tiempos cortos de exposición (96 horas), ocurrió una inhibición en el crecimiento de este órgano, la cual fue dependiente de la dosis y el tipo de D-AA.

En cambio, algunos de ellos ocasionaron cambios positivos en el desarrollo radical, como un aumento en el número de RLs (D-Leu), mayor desarrollo de PRs (D-Cys) y una recuperación en el crecimiento de la RP (D-Val). Cuando se aplicó una mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys, a tiempos más prolongados (30 días), se observó un incremento en el número de RLs y en la longitud radical total.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue llevar a cabo una caracterización de los

principales cambios morfológicos que ocurrieron en la RP expuesta a la mezcla de los D-AAs. Esta caracterización es requerida para poder estudiar de una manera más dirigida el mecanismo de acción de estos compuestos sobre el desarrollo radical.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la variedad naranja, la cual comercializa la empresa Séminis. Las semillas se desinfectaron y se colocaron en cajas de Petri para su germinación, siguiendo el protocolo descrito por Celis-Arámbaro *et al.* (2011). Cuando ocurrió la protrusión de la radícula (de 4 a 5 días), las plántulas fueron transferidas al modelo *in vitro*.

El modelo *in vitro* (cajas de Petri) permite llevar a cabo experimentos a tiempos cortos, en condiciones controladas y estériles. En este caso, las semillas germinadas se colocaron en cajas de Petri con el siguiente medio de crecimiento: medio basal para N orgánico: 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, a las cuales se le eliminó la fuente de N y se le adicionó 1 mM de KNO₃ como única fuente de N. Las cajas fueron colocadas verticalmente, en condiciones de oscuridad, hasta que la RP alcanzó una longitud de aproximadamente 2.2 ± 0.5 cm (~ cinco días). Cuando esto ocurrió, las plántulas fueron transferidas a los respectivos tratamientos.

2.2.2 Caracterización del efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento radical en el modelo *in vitro*

Inicialmente, se llevó a cabo una caracterización del efecto de la mezcla de D-AAs sobre el crecimiento radical en condiciones *in vitro*, con el objetivo de definir un fenotipo que permitiera evaluar el efecto de los tratamientos que se aplicarán. Las plántulas fueron transferidas a cajas de Petri que contenían el medio de crecimiento para N orgánico, descrito anteriormente y se sometieron a los siguientes tratamientos de N: **NI**: 1 mM de KNO₃ + 0.3 mM NH₄Cl; **NO₃⁻ + L-AA**: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM de la mezcla de L-AAs (0.1 mM L-Val, 0.1 mM L-Leu y 0.1 mM L-Cys) y **NO₃⁻ + D-AA**: 1 mM de KNO₃ + 0.3 mM de la mezcla

de D-AA (0.1 mM D-Val, 0.1 mM D-Leu y 0.1 mM D-Cys). El experimento se realizó en un cuarto de cultivo en condiciones controladas, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad. La intención con este primer experimento fue utilizar la misma mezcla de D-AAs que en los experimentos en hidroponía había dado los mejores resultados, para después caracterizar el efecto de los aminoácidos individualmente.

2.2.3 Clareado de raíces de chile habanero y evaluación de las distancias de formación de los órganos laterales

Para observar los cambios en la formación de órganos laterales se realizó el clareado de la raíz de acuerdo a la metodología propuesta por Malamy y Benfey (1997) con modificaciones de Dubrovsky *et al.* (2006). Las raíces fueron incubadas a 62°C en una solución de 20% (v/v) metanol y 0.24 N HCl durante 40 min; posteriormente se incubó en una solución 7% NaOH (p/v) y 60% etanol (v/v) a temperatura ambiente durante 20 min. Las raíces fueron rehidratadas con incubaciones de etanol al 40%, 20% y 10%, además con 10% (v/v) de etanol en glicerol al 50% (v/v), 2 h por paso. Posteriormente, las muestras se colocaron en un portaobjetos con glicerol al 50% (v/v) y se observó en un microscopio de fluorescencia (Axioplan).

Para corroborar los datos, algunas raíces fueron observadas en el microscopio confocal FV-1000 (Olympus, Tokio, Japón) simulando una óptica de Nomarski u óptica de contraste interferencial (DIC), con el objetivo de observar a los PRL en estadios más tempranos.

Se evaluó el incremento en el crecimiento de la RP cada 24 h con el uso de una regla. A partir de las raíces clareadas, se registró el número de PRL, así como el número y la longitud de las RLs. Para el número de eventos de iniciación (EI), se sumó el número de PRL y el de RLs. Además, se evaluaron las siguientes distancias: distancia entre EI, distancia entre el ápice (menos la cofia) y el PRL más distal y proximal, distancia desde el último PRL a la primera RL emergida en una misma fila de células y distancia de la última RL a la base de la raíz (Figura 2.1).

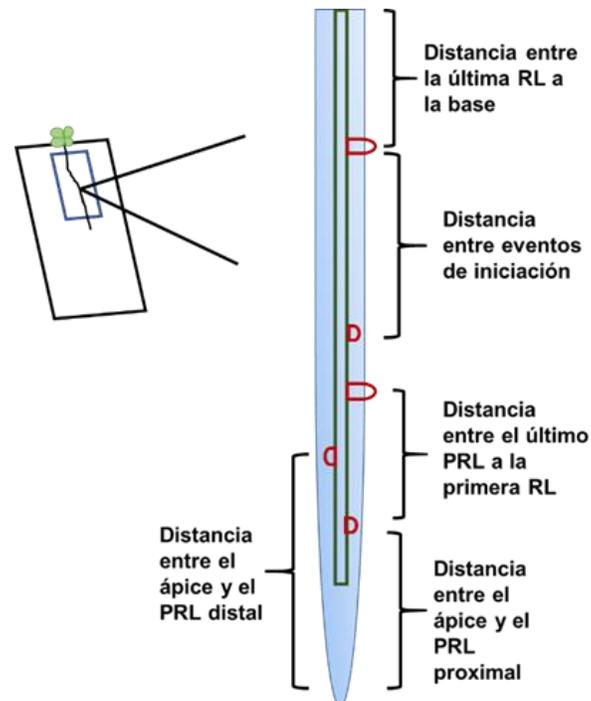


Figura 2.1 Distancias evaluadas en la RP a las 96 h de tratamiento (modificado de Dubrovsky *et al.*, 2006).

Para realizar el cálculo de las distancias, se tomaron fotos en el microscopio óptico (AXIOPLAN) del ápice a la base de la RP; posteriormente, fueron ensambladas en el programa Photoshop CS6 y cada una de las mediciones descritas anteriormente, se realizó con el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.2.4 Curva dosis-respuesta

Una vez que ocurrió la protrusión de la radícula, las semillas fueron transferidas al medio NO, descrito en el apartado (2.2.1) para el crecimiento de la plántula. Cuando la RP alcanzó un tamaño de 2.2 ± 0.5 cm, se transfirieron a cajas de Petri que contenían medio NO más 1 mM de KNO_3 , con la mezcla de los L- o D-AAAs, a las concentraciones de 0.025, 0.05 y 0.100 mM. En este experimento, se determinó el incremento diario en longitud de la RP hasta los cuatro días de tratamiento, así como el número y la longitud de las RLs.

2.2.5 Curso temporal

Este experimento se realizó de manera similar al descrito en la sección 2.2.4, excepto que la concentración utilizada de los L- y D-AAs fue de 0.1 mM y las raíces estuvieron expuestas al tratamiento por 24, 48 y 72 h. Transcurrido el tiempo, se determinó la formación de eventos de iniciación realizando tinciones con el método de Feulgen. Para este caso, se utilizaron 12 raíces por tratamiento, las cuales fueron incubadas durante toda la noche en alcohol etílico: ácido acético (3:1, v/v). Posteriormente, las raíces fueron sometidas a una hidrólisis ácida con 1N HCl a 62°C durante 8 y medio minutos. A continuación, el HCl fue retirado y las raíces se incubaron con el reactivo de Schiff durante 40 min. Las raíces fueron observadas en un microscopio óptico (Zeiss Primo Strar), acoplado a una cámara (Canon), para poder realizar la toma de las imágenes.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Caracterización del efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento radical en el modelo *in vitro*

En la Figura 2.2A, se observa la morfología de las plántulas de chile habanero de la variedad comercial seminis a las 96 h de exposición a los tratamientos de N. De manera significativa, se observó que un mayor porcentaje de plántulas presentó apertura de los cotiledones cuando fueron expuestas a los D-AAs (24%), seguida de aquellas sometidas a los L-AAs y al testigo con NI, ambos con un 14% de apertura de cotiledón (Figura 2.2 B).

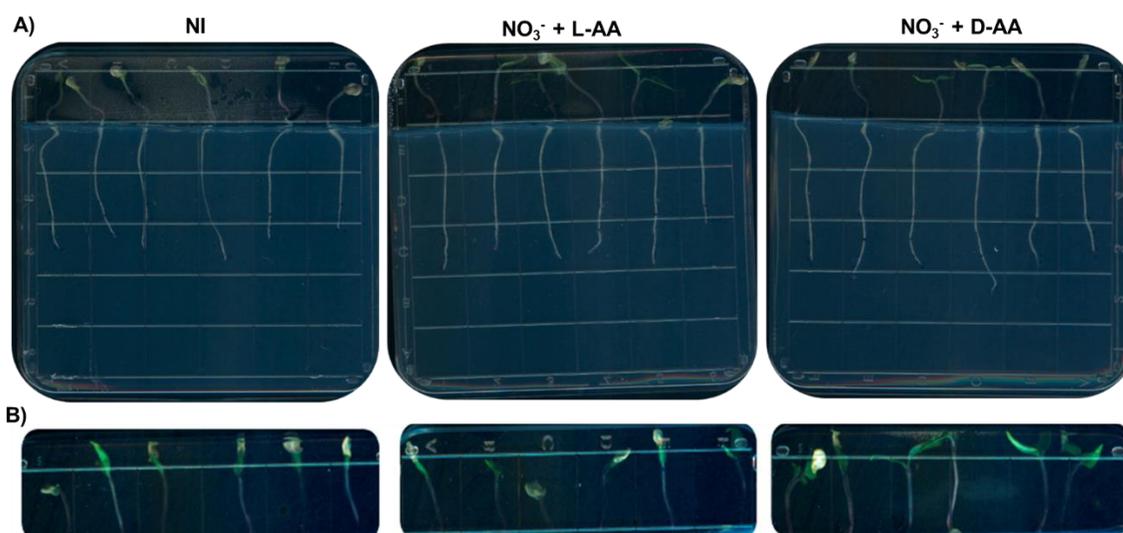


Figura 2.2. Cambios morfológicos en el crecimiento de la RP y apertura de cotiledón a las 96 h de tratamiento. A) En la figura se presenta una imagen representativa que muestra el tamaño de la RP de las plántulas de chile habanero expuestas a diferentes tratamientos de N: **NI**, 1 mM KNO₃ + 0.3 mM NH₄Cl (Testigo con N inorgánico); **NO₃⁻ + L-AA**, 1 mM KNO₃ + 0.3 mM de la mezcla de los L-AAs (Val, Leu, Cys, cada uno a 0.1 mM) y **NO₃⁻ + D-AA**, 1 mM KNO₃ + 0.3 mM D-AAs (Val, Leu, Cys, cada uno a 0.1 mM), B) Cotiledones abiertos a las 96 h bajo los diferentes tratamientos de N descritos anteriormente. Las fotografías muestran una imagen representativa de cinco cajas de Petri.

Los cambios en el crecimiento de la raíz de chile habanero en condiciones *in vitro* en presencia de la mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys no se habían caracterizado anteriormente, por lo que los resultados obtenidos son el primer acercamiento para poder indagar en el mecanismo por el cual ocurren. Para ello, es necesaria la obtención de un fenotipo característico de esta respuesta; sin embargo, en cuanto al crecimiento de la RP, no se observó una diferencia entre los tratamientos.

Diversos autores han reportado que los D-AAs provocan una inhibición en el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis*, tales como D-Ser, D-Ala y D-Arg (Forsum *et al.*, 2008; Svennerstam *et al.*, 2007) y otros han propuesto que incrementan el crecimiento, como se observó para D-Val, D-Lys y D-Ile (Chen *et al.*, 2010). Estas respuestas múltiples de las plantas a los D-AAs parecen depender del tipo de D-AA y la especie. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha reportado un análisis detallado del efecto de estos compuestos sobre el

desarrollo del sistema radical.

Por otro lado, normalmente se ha evaluado el papel de los AAs por separado y no en conjunto, tal como pueden estar presentes en los suelos. La utilización de las mezclas de los D-AAs se ha trabajado normalmente en bacterias, donde tienen un papel importante a nivel ecológico. Por ejemplo, la D-Leu, la D-Met, la D-Tyr y el D-Trp regulan la formación y el desensamblaje de la biopelícula en *Bacillus subtilis* (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010).

2.3.2 Efectos de la mezcla de los D-AA sobre la formación de eventos de iniciación de raíz lateral

Para evaluar el efecto de los D-AAs sobre la formación de EI, las raíces de chile habanero en los diferentes tratamientos fueron clareadas de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.2.3, logrando observar PRL a partir del estadio dos (Figura 2.3 A). Además, algunas de las imágenes se corroboraron a través de la observación al microscopio confocal utilizando una óptica simulada de Normaski (Figura 2.3 B), donde se observan las diferentes etapas de desarrollo del PRL detectadas en la raíz de chile habanero.

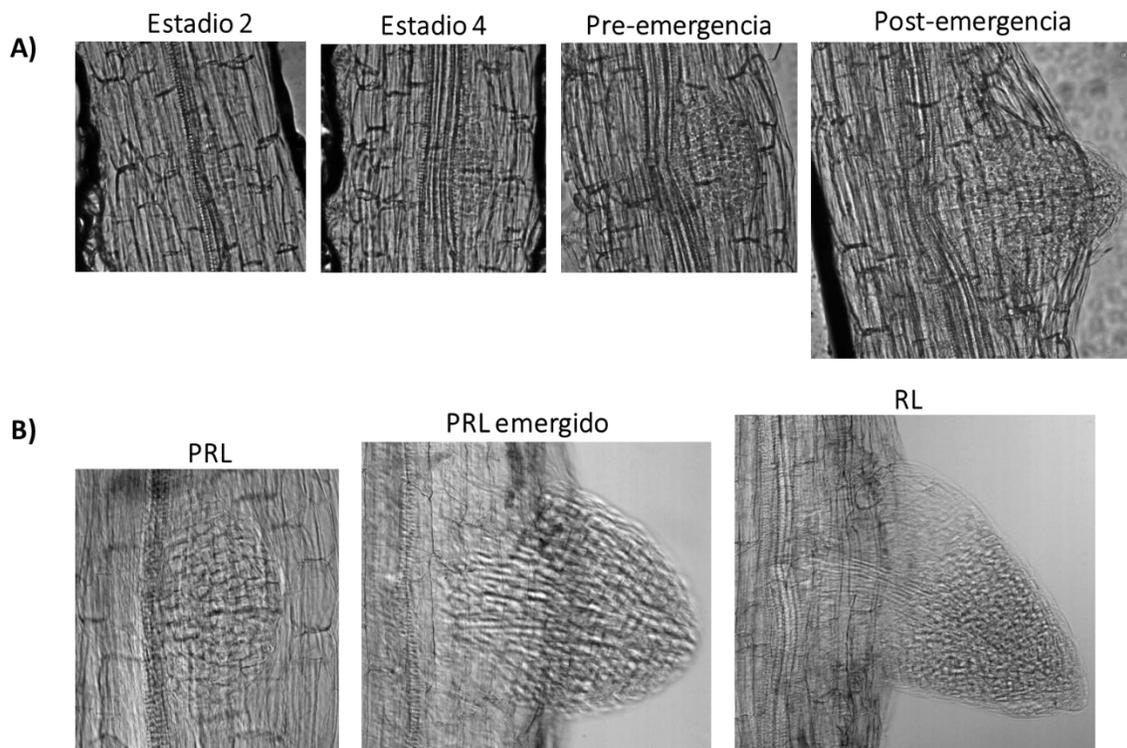


Figura 2.3. Primordios de raíz lateral en diferentes estadios y RLs de chile habanero observadas bajo el microscopio óptico (A) y microscopio confocal (B) con una óptica tipo Nomarski o DIC, donde se observan el PRL pre-emergente, el PRL emergente y la RL.

Cuando se evaluó el número de PRL por RP, se observó que este valor fue significativamente mayor en aquellas plántulas expuestas a los D-AAs, comparadas con las que crecieron en presencia de los tratamientos NI (64%) y NO_3^- + L-AA (44%), mientras que las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los tratamientos de NI y NO_3^- + L-AA (Figura 2.4 A).

A su vez, el tratamiento que contenía a los D-AAs demostró un aumento en el número de RLs aproximadamente 3 y 4.7 veces en comparación con los tratamientos NO_3^- + L-AA y NI, respectivamente (Figura 2.4B). Al evaluar el número de EI (número de PRL + número de RLs) se observó un aumento aproximado de 2 y 2.8 veces mayor en las plántulas tratadas con los D-AAs que con los estereoisómeros L o con NI, respectivamente (Figura 2.4 C).

De igual manera, la longitud de las RLs fue significativamente mayor (2 y 10 veces) cuando las plántulas se sometieron a tratamientos con los D-AAs con respecto a los otros tratamientos (L-AA y NI, respectivamente) (Figura 2.4 D). En conclusión, la presencia de los D-AAs en el medio de crecimiento estimuló la formación de RLs y de EI, así como la elongación de las RLs, comparada con sus testigos, las plántulas creciendo en presencia de los L-AAs y aquellas creciendo sólo con la fuente de N inorgánica.

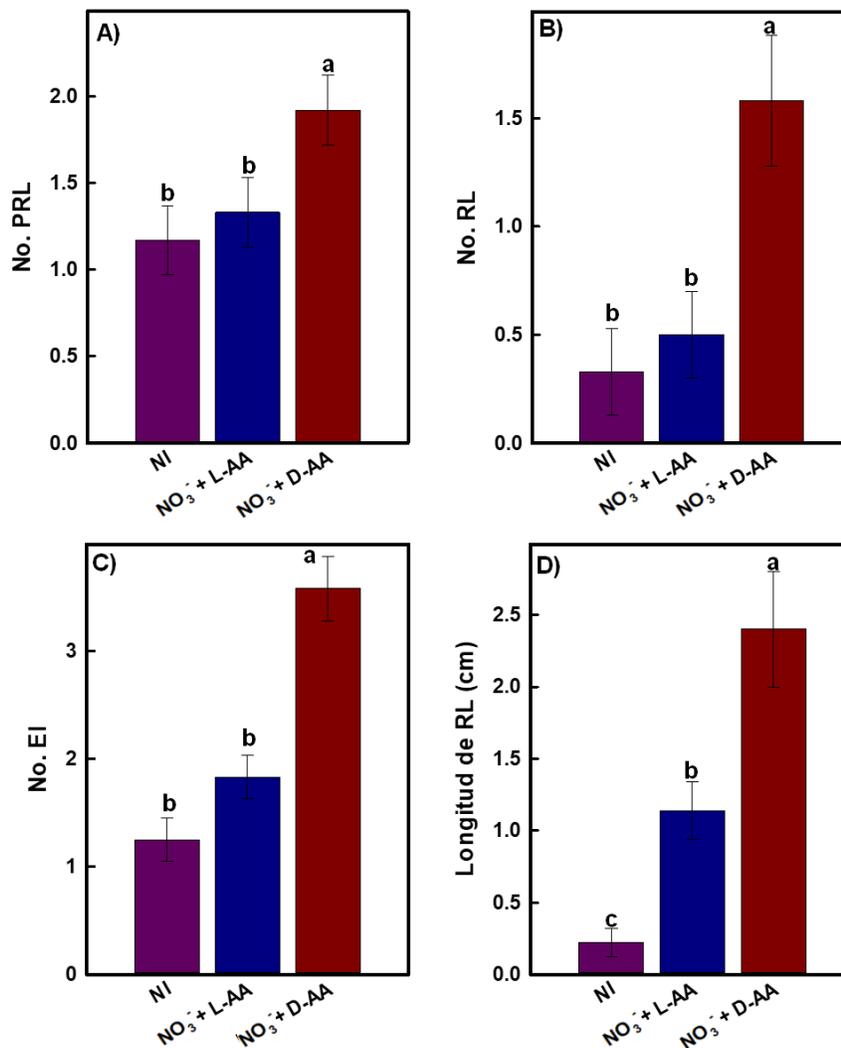


Figura 2.4 Formación de eventos de iniciación y longitud de las raíces laterales a las 96 h. En las figuras se observa la formación de EI en presencia de diferentes condiciones de N, las cuales se describieron en la leyenda de la figura 2.1. A) Número de PRL, B) Número de RLs, C) Número de EI y D) Longitud total de RLs. Los datos presentados son la combinación de tres experimentos independientes (24 plántulas en cada uno). Las letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey $P \leq 0.05$).

Otro de los parámetros evaluados fueron las diferentes distancias de formación de los EI (Cuadro 2.1). Con relación a su testigo (L-AAs), el tratamiento con los D-AAs, aumentó significativamente las distancias entre EI (75 %) y entre el ápice y el PRL más distal (27%), pero estos valores fueron similares a los presentados por el tratamiento NI. La distancia

desde el ápice radical al PRL proximal fue similar entre los tratamientos, mientras que el tratamiento con los D-AAs redujo las distancias entre el último PRL y la primera RL (22 %) y de la última RL a la base de la raíz (53 %) (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Efecto de la aplicación por 96 h de la mezcla de los D-AAs sobre la distancia de formación de los eventos de iniciación. Los parámetros fueron determinados como se describe en materiales y métodos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (los datos presentados son la combinación de tres experimentos independientes, $n= 14$ plántulas; Tukey, $P \leq 0.05$). Los tratamientos NI, $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$ y $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$ son descritos en la leyenda de la Figura 2.1.

Tratamiento	Distancia entre EI (mm)	Distancia entre ápice y PRL distal (mm)	Distancia del ápice al PRL proximal (mm)	Distancia de la última RL a la base (mm)	Distancia del PRL a la primera RL (mm)
NI	14.04 ± 3.24 (a)	11.23 ± 1.9 (a)	6.99 ± 1.4 (a)	10.29 ± 2 (b)	16.93 ± 0 (a)
$\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$	6.92 ± 2 (c)	9.68 ± 1.74 (b)	7.6 ± 1.3 (a)	14.69 ± 3 (a)	10.92 ± 0.4 (b)
$\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$	12.16 ± 1.7 (a)	12.32 ± 0.8 (a)	7.45 ± 0.27 (a)	6.87 ± 1.2 (c)	8.53 ± 0.8 (c)

Los valores de las distancias de formación se ejemplifican en la Figura 2.5, donde se observa que los diferentes parámetros evaluados varían entre cada tratamiento. En particular, en esta figura se muestra que la formación de EI (PRL + RL) por RP es mayor cuando las raíces se exponen a los D-AAs, comparada con la que ocurre en los tratamientos testigo y se puede distinguir la reducción entre la distancia de la última RL a la base de la raíz y de la distancia del PRL a la primera RL en las raíces tratadas con los D-AAs.

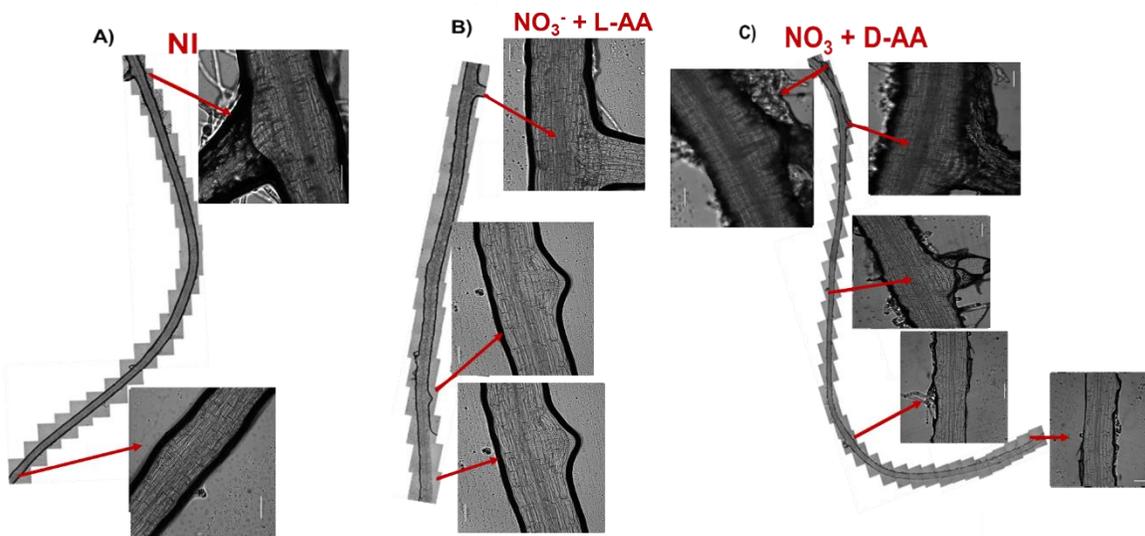


Figura 2.5. Formación de órganos laterales en las raíces expuestas a los diferentes tratamientos de N. En las figuras se muestra una RP representativa ($n=14$) para los tratamientos con NI (A), $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$ (B) y $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$ (C). Estas raíces son las que se utilizaron para realizar los cálculos en la figura 3. En los recuadros se muestran los EI formados para cada RP. Las raíces fueron reconstruidas (en el programa Photoshop) a partir de imágenes individuales tomadas al microscopio óptico. La barra blanca indica una escala de $100 \mu\text{m}$.

De acuerdo a los datos obtenidos en esta sección, se observó un mayor número de PRLs con los tratamientos que contenían a los D-AAs en comparación con los L-AAs, aunque no todos logran desarrollarse hasta RLs. Sin embargo, para chile habanero, el número de PRLs y RLs es menor (Celis-Aramburo *et al.*, 2011), comparado con otras especies, como por ejemplo *Arabidopsis* (Dubrovsky *et al.*, 2006) y tabaco (Stitt y Feil, 1999).

En cuanto al tratamiento NI, el número de RLs fue similar a lo reportado por Celis-Aramburo *et al.* (2011) al aplicar 1 mM de KNO_3 de manera heterogénea. Muchos de los datos obtenidos en el desarrollo del proceso de formación de los EI en chile habanero contrastan con los reportados para *Arabidopsis* (Ivanchenko *et al.*, 2008; Dubrovsky *et al.*, 2006).

La formación de estos órganos es un proceso importante y el patrón de desarrollo depende de la taxa (Dubrovsky *et al.*, 2006), así como de estímulos ambientales, la distribución de nutrientes, el tipo de suelo y los factores hormonales y genéticos. Hasta la fecha, el efecto

de la aplicación de D-AAs sobre los procesos de formación de los primordios de RLs y de las RLs no ha sido abordado en otra especie vegetal.

2.3.3 Experimento de curva dosis- respuesta

Los resultados de esta sección muestran el crecimiento de la RP ante concentraciones crecientes (0.025, 0.050 y 0.1 mM) de los respectivos L- y D-AAs. Estas concentraciones correspondieron a un total de 0.075, 0.150 y 0.3 mM de D-AAs en la mezcla, respectivamente.

En la Figura 2.6 se presenta el incremento en la longitud de la RP a las 96 h de tratamiento, observando una disminución (~ 5%) de este parámetro cuando la concentración de los aminoácidos fue de 0.1 mM, comparado con las dosis más bajas. El efecto inhibitorio en el crecimiento de la RP no fue estereoespecífico (Figura 2.6).

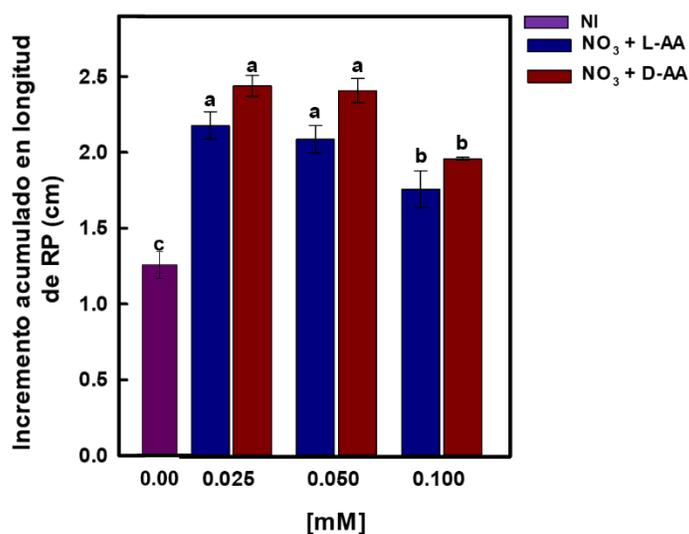


Figura 2.6. Incremento en la longitud de la raíz primaria a las 96 h de exposición a los tratamientos NI, NO₃⁻ + L-AA y NO₃⁻ + D-AA en donde la dosis de los AAs individuales en la mezcla fue de 0.025 mM, 0.050 mM y 0.1 mM (n=30). Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre dosis y tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

Al evaluar el efecto de la dosis de los AAs sobre la formación de RLs, se observó que no

hubo diferencia significativa en el número de RLs en el tratamiento de NO_3^- + D-AA entre todas las dosis utilizadas, mientras que este parámetro disminuyó hasta tres veces comparado con el tratamiento de NO_3^- + L-AA cuando la dosis incrementó a 0.1 mM (Figura 2.7 A). Cuando se comparó entre los tratamientos con L y D-AAs, una diferencia significativa en el número de RLs sólo fue observada a la dosis de 0.1 mM, donde en el tratamiento los D-AAs fueron un 75% mayor comparada con la de los L-AAs (Figura 2.7 A).

Al analizar los valores de longitud promedio de las RLs se observó que no hubo una diferencia significativa entre las dosis por tratamiento, lo cual ocurrió tanto para el tratamiento con L- como con el D-AA (Figura 2.7 B). Sin embargo, al comparar entre los tratamientos se obtuvo que las plantas sometidas a los D-AAs presentaron valores significativamente mayores (16 y un 55% a dosis de 0.05 y 0.1 mM, respectivamente) comparado con aquellas creciendo en presencia de los L-AAs y NI (Figura 2.7 B).

En cuanto a la longitud total de las RLs, de igual manera no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes dosis del tratamiento de D-AAs. Con respecto al testigo con L-AAs, se presentó una disminución de un 16% a 0.1 mM, no así a las concentraciones menores (Figura 2.7 C). Cuando se comparó entre ambos tratamientos, se pudo observar diferencias significativas entre éstos a las dosis de 0.025 y 0.1 mM, donde nuevamente los datos sugieren que los D-AAs aumentan este valor en un 57 y 67%, respectivamente, comparado con los L-AAs y NI. Sin embargo, a una dosis intermedia (0.05 mM), no hubo diferencia significativa en la longitud total de las RLs entre los tratamientos (Figura 2.7 C).

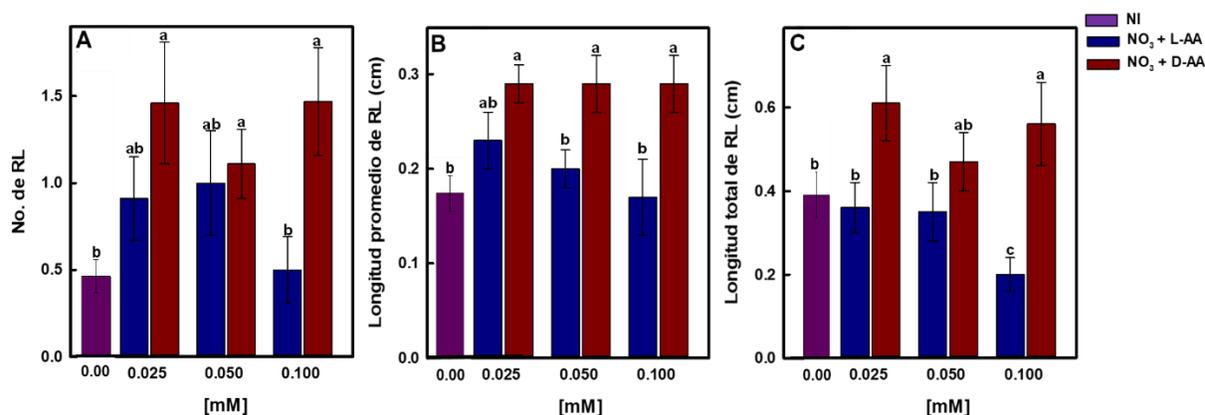


Figura 2.7 Curva dosis-respuesta de los D-AAs sobre la formación y el crecimiento de raíces

laterales. En este experimento se utilizó un testigo con NI (1mM KNO₃ + 0.3 mM NH₄Cl), la mezcla de los D/L-AAs a dosis individuales de 0.025, 0.05 y 0.1 mM con 1 mM de KNO₃ como fuente principal de N. Se evaluó el número de RLs (A), la longitud promedio de RLs por planta (B) y la longitud total de RLs por planta (C) a las 96 h de tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos bajo las diferentes dosis (Tukey, $P \leq 0.05$).

Estos resultados sugieren que la formación de las RLs es más sensible a los L-AAs que los D-AAs. Las concentraciones reportadas para los L-AAs en los suelos están en un rango de 0.01-10 μ M y en suelos ricos en materia orgánica en concentraciones milimolares (Jones *et al.*, 2005; Öhlund y Näsholm, 2002), en los cuales de 1.4-1.7% corresponde a la concentración de D-AAs (Vranova *et al.*, 2012).

También se ha visto en plantas de *Arabidopsis* y tabaco que el efecto de los D-AAs aplicados individualmente puede promover el crecimiento de las RLs, dependiendo de la dosis aplicada (Chen *et al.*, 2010; Näsholm *et al.*, 2009).

2.3.4 Curso temporal

A partir de los resultados anteriores, se seleccionó la dosis de 0.1 mM de cada D-AA para llevar a cabo los experimentos de curso temporal. En este experimento, se evaluó la formación de los eventos de iniciación a las 24, 48 y 72 h en los tratamientos con NO₃⁻ + L-AA (1 mM KNO₃ + L-Val, L-Leu y L-Cys, 0.1 mM cada uno) y NO₃⁻ + D-AA (1 mM KNO₃ + D-Val, D-Leu y D-Cys, 0.1 mM cada uno).

En la figura 2.8 A, se presenta los datos de la formación de los PRL en los diferentes tiempos, el cual fue mayor con el tratamiento que contenía la mezcla de los D-AAs en comparación con su estereoisómero L. De acuerdo a los datos, se sugiere que durante las primeras 24 h, las raíces tratadas con los D-AAs comenzaron a formar los PRL, mientras que éstos no fueron observados en aquellas raíces tratadas con los L-AAs. El número de PRL incrementó aproximadamente 10 veces a las 48 h y 72 h de tratamiento con los D-AAs siendo éstos un 80 % menor al presentado en las raíces creciendo en presencia de los L-AAs.

Las RLs fueron observadas a partir de las 48 h de exposición a los tratamientos y en este momento, el número fue similar para las raíces de ambos tratamientos (Figura 2.8 B). En

cambio, las raíces tratadas con los D-AAs incrementaron ~3 veces el número de RLs a las 72 h, mientras que las que crecieron en presencia de los L-AAs mantuvieron valores similares a los presentados a las 48 h (Figura 2.8 B). Esto podría indicar que los PRL formados en su mayoría logran desarrollarse para dar lugar a las RLs cuando están expuestos a los tratamientos con la mezcla de D-AAs.

Puesto que el número de PRL y RLs fue mayor con los D-AAs, el número de EI igualmente fue mayor con este tratamiento. El número de EI a las 24 horas fue de ~0.1, incrementando a las 48 y 72 horas ~30 veces. Por otra parte, el tratamiento testigo con los L-AAs presentó menos EI en comparación con el de los D-AAs (Figura 2.8 C). Por lo tanto, se puede sugerir que los D-AAs estimulan la formación de los EI en la raíz, siendo la formación de los PRL los que contribuyen más en este aumento.

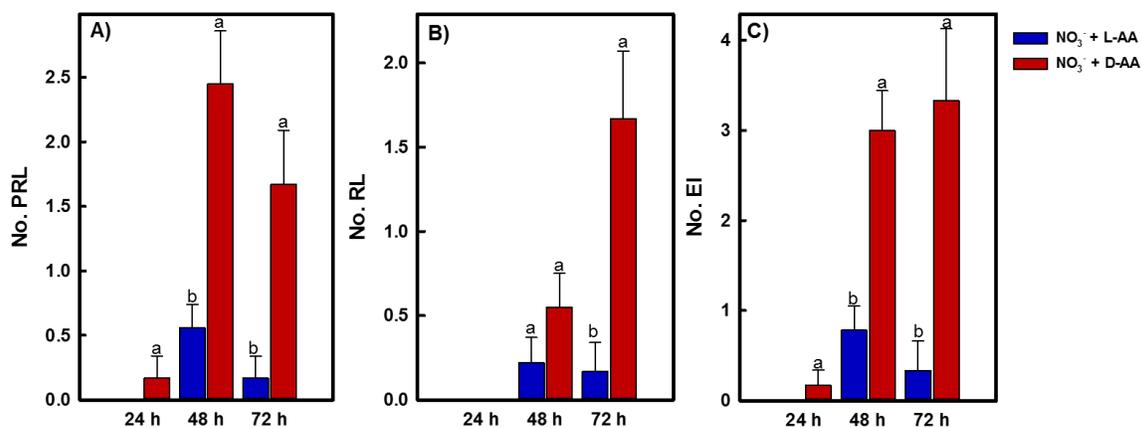


Figura 2.8. Efecto de las mezclas de AAs y NO₃⁻ sobre la formación de EI durante un curso temporal. En este experimento se utilizó el medio con 1 mM KNO₃ más la mezcla de los D/L-AA 0.1 mM. Se evaluó el número de PRL (A), el número de RL (B) y el número de EI (C) a las 24, 48 y 72 h de tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos en los diferentes tiempos (n=12, Tukey, p≤ 0.05).

En la Figura 2.9 se muestra la formación de EI (PRL + RL) por RP, durante un curso temporal. Los resultados confirman las observaciones anteriores, encontrando un efecto estimulador de los D-AAs, comparado con el tratamiento con los L-AAs, sobre la formación de PRL y RLs por RP.

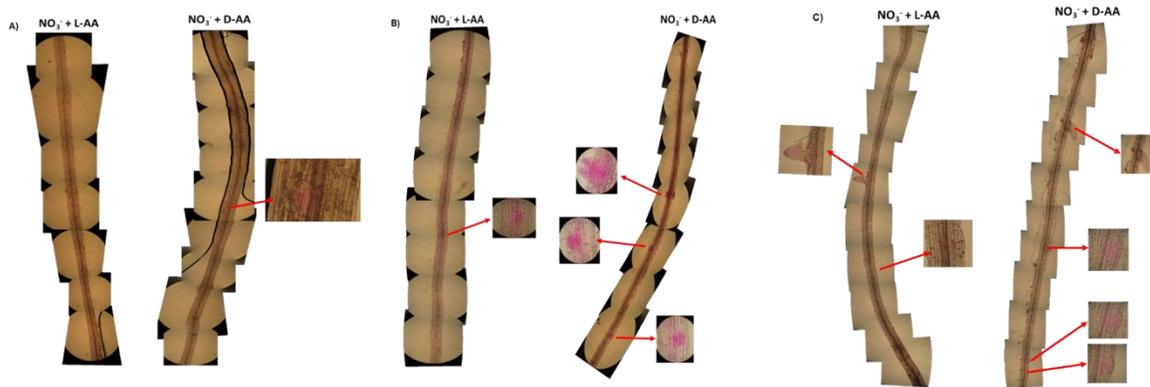


Figura 2.9. Formación de eventos de iniciación en las raíces expuestas a los diferentes tratamientos con L- y D-AAAs. En las figuras se muestra una RP representativa ($n=12$) para los tratamientos NO_3^- + L-AA y NO_3^- + D-AA, a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). Estas raíces son las que se utilizaron para realizar los cálculos en la Figura 2.8. En los recuadros se muestran los EI formados para cada RP. Las raíces fueron reconstruidas (en el programa Photoshop) a partir de imágenes individuales tomadas al microscopio óptico.

En cuanto a estos valores, anteriormente se había evaluado la formación de los EI hasta las 96 h, por lo que se decidió realizar un curso temporal tomando en cuenta 24, 48 y 72 h de exposición a los tratamientos con la mezcla de D-AAAs y al testigo con la mezcla de L-AAAs, utilizando el método de tinción de Feulgen, el cual permitió observar todos los EI formados.

Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento NO_3^- + D-AA podría incrementar la formación de EI, afectando algún parámetro como la iniciación de los PRL o la emergencia de la LR. A pesar del claro efecto de los D-AAAs sobre estos procesos, el número de EI por RP es bajo en chile habanero, lo cual ha sido también observado previamente (Celis-Arámburo *et al.*, 2011). Esta característica dificulta establecer un fenotipo en cuanto al efecto de estos compuestos sobre la producción de RLs, dado el número absoluto muy bajo.

Los resultados anteriores sugieren que las raíces de chile habanero expuestas a los D-AAAs (Val, Leu y Cys) aumentaron el número de RLs, el cual pudiera ser un fenotipo en respuesta a la exposición de la raíz a estos compuestos, que fue dependiente del tiempo de exposición a la mezcla y de la variedad utilizada.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS AUXINAS EN LA RESPUESTA RADICAL INDUCIDA POR LOS D-AAs

3.1 INTRODUCCIÓN

La RP establecida durante la embriogénesis, da lugar a nuevas RLs, que en su conjunto conforman la arquitectura radical de la planta. La arquitectura del sistema radical está regulada por diversos factores ambientales o componentes endógenos, como las auxinas. Las auxinas son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. En las raíces, éstas son consideradas como las moléculas formadoras (Went 1929), debido a los cambios originados por ellas en el fenotipo, como el incremento en la longitud de los PRs, el incremento en la longitud de la RP, el aumento del número de PRLs y su efecto en el gravitropismo (Overvoorde *et al.*, 2010; Peret *et al.*, 2009).

Las auxinas participan directamente en el marcaje de las células del periciclo para la iniciación de las RLs. La aplicación exógena de auxinas puede activar prácticamente todas las células del periciclo adyacentes al protoxilema, disminuyendo el espaciamiento de los PRL y conducir a un incremento de eventos de iniciación de RLs (Benkova *et al.*, 2003; Himanen, 2002). En este evento, intervienen procesos como la biosíntesis, el transporte, la distribución y la señalización de la hormona (Jones y Ljung, 2012). Por lo tanto, las auxinas tienen un papel dominante en el desarrollo y la formación de estas estructuras, al intervenir en las etapas de marcaje, iniciación, desarrollo del PRL y emergencia de las mismas (Lavenus *et al.*, 2013; Dubrovsky *et al.*, 2011; Overvoorde *et al.*, 2010).

Durante el proceso intervienen varios genes regulados por auxina, en especial los Lateral Organ Boundary Domain (LBD), cuyos productos proteícos modulan el desarrollo de las RLs (Lee y Kim, 2013; Okushima *et al.*, 2007). En particular, el LBD16 juega un papel durante la migración nuclear que ocurre en las células fundadoras del PRL (Goh *et al.*, 2012) y LBD18 está involucrado en las divisiones asimétricas anticlinales y periclinales durante la iniciación del PRL y en la progresión del desarrollo de éste a través de la regulación de genes del ciclo celular (Lee *et al.*, 2015; Berckmans *et al.*, 2011).

Los estudios sobre la participación de estas proteínas en el proceso han sido desarrollados fundamentalmente en la planta modelo *Arabidopsis*, pero en otras especies muy poco se sabe del mismo. Sin embargo, las auxinas también regulan la arquitectura de los sistemas radicales de numerosas plantas, como, por ejemplo, en tomate las auxinas estimulan el crecimiento de las RLs e inhiben el crecimiento de la RP (Munday y Haworth, 1994). En chile habanero, se ha observado una estimulación del número y longitud de las RLs cuando las plántulas se exponen al ácido indol acético (AIA) (Célis-Aramburo *et al.*, 2011), al igual que en plantas de arroz donde bajas concentraciones de auxinas promueven la elongación de las RLs (Zhang *et al.*, 2007).

Una forma de estudiar la participación de las auxinas en los procesos de desarrollo es por medio de la utilización de inhibidores como los anti-auxinas, los cuales inhiben la acción de la auxina compitiendo con ésta por el sitio de unión a su receptor. Diversos compuestos con actividad anti-auxínica se han utilizado como una herramienta para elucidar el mecanismo de percepción de auxina y su función en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Uno de los más utilizados, el cual fue seleccionado para este trabajo, es el ácido p-clorofenoxyisobutírico ó ácido clofibríco (PCIB), ya que inhibe los efectos fisiológicos inducidos por auxina (MacRae y Bonner, 1953; Burström, 1950).

La importancia de las auxinas ha sido estudiada durante muchos años y sobre todo se ha establecido muy bien como una hormona por excelencia en la formación del sistema radical. Por esta razón, considerando el fenotipo radical obtenido en las plántulas de chile habanero cuando se les aplica la mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys, no se puede descartar que su mecanismo de acción pudiera deberse a que modifiquen los niveles de auxina y que ésta sea la que provoque el efecto. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue estudiar la participación de las auxinas en los cambios inducidos por la mezcla de D-AAs en la formación de RLs.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) de la variedad naranja, comercializada por la empresa Séminis y de *Capsicum annuum* variedad criollo Morelos

334 (CM 334). Las semillas se desinfectaron, germinaron y las plántulas crecieron como se describe en la sección 2.2.1 del capítulo II.

3.2.2 Tratamientos con anti-auxina

Se utilizaron plántulas con 2 ± 0.5 cm de longitud de la RP, las cuales se colocaron en el medio que contenía la anti-auxina, el ácido p-clorofenoxy-isobutirico o ácido clofibrico (PCIB), a concentraciones de 0, 10, 20 y 50 μM junto con los tratamientos con los aminoácidos: **NO₃ + L-AA**: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM de la mezcla de L-AAs (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu y 0.1 mM Cys) y **NO₃ + D-AA**: 1 mM de KNO₃ + 0.3 mM de la mezcla de D-AAs (0.1 mM D-Val, 0.1 mM Leu y 0.1 mM D-Cys).

Para la anti-auxina, se preparó un stock de 100 mM de PCIB en etanol al 100% y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones necesarias. Al tratamiento testigo, se le agregó la cantidad de etanol respectiva. Las plántulas estuvieron en fotoperiodo a 16 h luz/ 8 h oscuridad a 25°C. Se evaluó el crecimiento de la RP, marcando diariamente a la misma hora y midiendo posteriormente con ayuda de una regla durante 4 y 10 días. Igualmente se evaluó el número de RLs al día 10 de tratamiento.

3.2.3 Diseño de cebadores para la amplificación de *LBD16* y *LBD18* en chile habanero

En *Arabidopsis*, la familia de factores de transcripción LBD, especialmente LBD16 y LBD18, tienen una función importante en las etapas iniciales de formación del PRL y son regulados por auxina (Peret *et al.*, 2009; Overvoorde *et al.*, 2010). En este trabajo se decidió amplificar estos genes a partir de las raíces de chile habanero y CM 334 y estudiar su posible aplicación como marcadores de iniciación de la formación de RLs en respuesta a auxina en estas especies. Para el diseño de cebadores, se utilizaron las secuencias de los genes reportados para *Arabidopsis* y con base en éstas, se realizó una búsqueda de secuencias similares en la base de datos de Solanáceas Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>). Las secuencias de estos genes, a partir de Solanáceas, se utilizaron para el diseño de los cebadores, usando el programa Oligo (<https://www.oligo.net/>). Las secuencias de estos cebadores se muestran en el cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Cebadores seleccionados para la amplificación de los genes *LBD16* y *LBD18*

Cebador	Secuencia	% G + C
<i>LBD16</i>		
F_LBD16_25	TGTGGTGCATGCAAATTYCT	45
F-LBD16_114	TGCAGCCATTCATAAGGTGT	45
R_LBD16_237	CAACACAGCCATAGACAGGA	50
R_LBD16_239	TGCAACACAGCCATAGACAG	50
R_LBD16_648	TTTTCATCATCCTAAGAGCC	40
<i>LBD18</i>		
F_LBD18_41	GTGGTGCATGCAAGTTTCTY	50
R_LBD18_278	CTGTTGCTGAAGGGWAAAGA	45
R_LBD18_256	TGACCAACACAGCCATAGAC	50

3.2.4 Nivel de transcritos de los genes LBD

Para determinar el nivel de transcritos de los genes *LBD*, se utilizaron las raíces de las plántulas tratadas con los tratamientos descritos en la sección 3.2.2. Se realizó una extracción de ARN total, utilizando el RNeasy® PLant Mini Kit, de acuerdo al protocolo establecido y en algunos casos, el ARN total fue aislado usando el método de Trizol a partir de raíces de plántulas de chile habanero o CM 334. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 1 µg del ARN total, utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScrip™ con oligo-dT, como se describe en el protocolo de manufactura (Invitrogen).

Para la PCR, se utilizaron los cebadores diseñados en el apartado 3.2.3 (Cuadro 3.1). Las condiciones de la PCR fueron: *LBD16*: 95°C durante 1 min, 32 ciclos de 94°C durante 30 seg, 52°C durante 30 seg, 75°C durante 40 min, y 72°C durante 10 min y para *LBD18*: 95°C durante 1 min, 32 ciclos de 94°C durante 30 seg, 53°C durante 30 seg, y 72°C durante 10 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (p/v), teñido con Gel Red o bromuro de etidio.

3.2.5 Clonación de los fragmentos amplificados de los genes *LBD16* y *LBD18* de *Capsicum chinense*

Se utilizó ARN total proveniente de raíces de plántulas de chile habanero creciendo durante cuatro días en el medio que contenía la mezcla de D-AAs y se amplificaron fragmentos por RT-PCR, tanto para *LBD16* como para *LBD18*, bajo las condiciones descritas en la sección 3.2.4, los cuales se purificaron con el kit QIAEX II Agarosa Gel Extration Protocol (*QIAGEN*).

Después de la purificación de ambos fragmentos, se ligaron al vector *pJET1.2/blunt*, utilizando el protocolo sugerido para los productos generados con la Taq DNA polimerasa (extremos cohesivos 3'-dA). Posteriormente, las células competentes de *E. coli* DH5 α se transformaron con el producto de ligación por choque térmico. El cultivo bacteriano resultante fue plaqueado en medio LB sólido con ampicilina e incubado a 37 °C durante 16 h. Las colonias positivas en una reacción de PCR para cada gen se subcultivaron en el medio LB líquido con ampicilina, a 37°C durante 8 h en agitación (175 rpm), de las cuales se purificó el plásmido. Las clonas que resultaron positivas por análisis de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea del Sur).

Los resultados fueron analizados corroborando la secuencia obtenida para *C. chinense* en el NCBI mediante un BLAST. Las secuencias en sentido y en antisentido fueron alineadas en el programa multAlin, verificando que ambas coincidieran y en caso de algún cambio puntal en la secuencia, éste se verificó en los cromatogramas para seleccionar la base que correspondiera.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Participación de las auxinas en el crecimiento de la RP mediado por la mezcla de D-AAs

El sistema radical es fundamental para la supervivencia de las plantas y éste es regulado por las señales ambientales que modifican el estatus hormonal de la planta y a su vez, las respuestas posteriores de las células y los tejidos (Dong *et al.*, 2018). Una de las hormonas vegetales que tiene un papel esencial en el desarrollo de las raíces es la auxina; y su participación ha sido estudiada durante un largo tiempo, mediante el desarrollo de mutantes

o de fármacos que inhiben su transporte y percepción.

Anteriormente, se había observado que el tratamiento que contenía la mezcla de los D-AAs, Val, Leu y Cys estimulaba el crecimiento de las raíces, sobre todo la formación de las RLs.

Al exponer las raíces de chile habanero a los tratamientos con L- y D-AAs y en presencia de dosis crecientes (0, 10, 20 y 50 μM) de PCIB, no se observaron cambios significativos en el crecimiento de la RP al cuarto día, dentro de cada tratamiento y en respuesta a la anti-auxina, observándose siempre valores mayores en presencia de los D-AAs, en comparación con el testigo (L-AA) (Figura 3.1A).

A tiempos largos (10 días de tratamiento), el PCIB disminuyó significativamente el crecimiento de la RP a las dosis más altas y cuando las plántulas crecieron en presencia de los L-AAs, no así con el tratamiento con los D-AAs. Debido a ello, se detectaron diferencias significativas en el incremento de la RP entre las plántulas expuestas a los tratamientos con L- y D-AAs, a las dosis de 20 y 50 μM del PCIB (Figura 3.1 B).

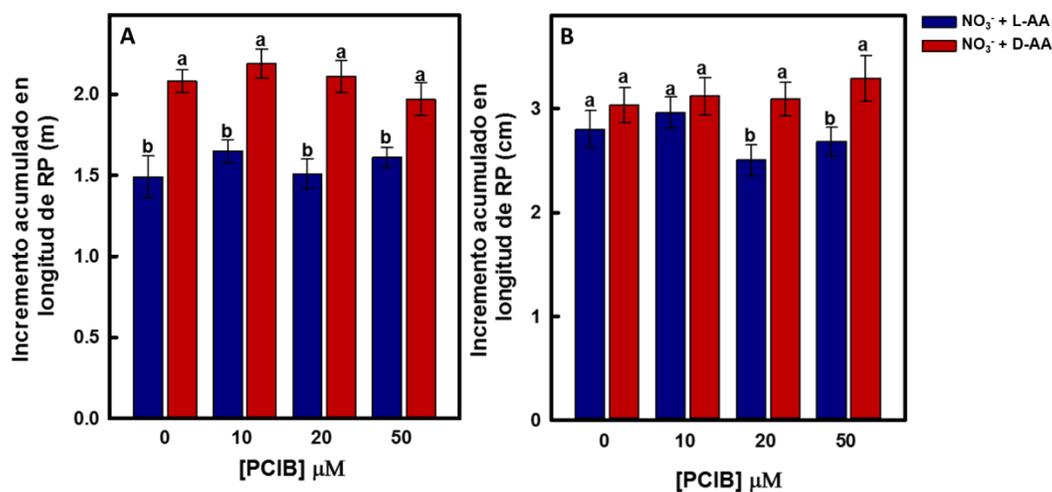


Figura 3.1. Incremento en el crecimiento acumulado en la longitud de la RP de chile habanero, variedad Seminis, con diferentes dosis de PCIB. En la gráfica se observa el incremento en el crecimiento de la RP a los cuatro (A) y 10 días (B) de exposición a los tratamientos NO₃⁻ + L-AA y NO₃⁻ + D-AA a dosis crecientes de PCIB (0, 10, 20 y 50 μM). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($n=30$) (Tukey, $P \leq 0.05$).

Capsicum annuum CM334, una variedad modelo para diversos estudios, especialmente de interacción planta-patógeno, fue usada en estos experimentos. Como se puede observar en la Figura 3.2 A, al cuarto día de tratamiento el crecimiento de la RP se redujo en presencia de las dosis de 20 y 50 μM de PCIB cuando las plántulas se expusieron a los L-AAs, no así cuando se expusieron a los D-AAs. Esta inhibición desapareció a un tiempo más prolongado de exposición de 10 días (Figura 3.2 B). Sin embargo, las plántulas creciendo en presencia de los D-AAs fueron más sensibles al PCIB, inhibiéndose el crecimiento de la RP desde dosis de 10 μM de este compuesto al cuarto día de tratamiento (Figura 3.2 A). Al día 10 de tratamiento, la inhibición en el crecimiento se mantuvo, pero a partir de la dosis de 20 μM (Figura 3.2 B). Al cuarto día, las raíces tratadas con los D-AAs alcanzaron prácticamente el doble de crecimiento al presentado por aquellas expuestas a los L-AAs y el efecto estimulador se mantuvo al día 10 de tratamiento (Figura 3.2).

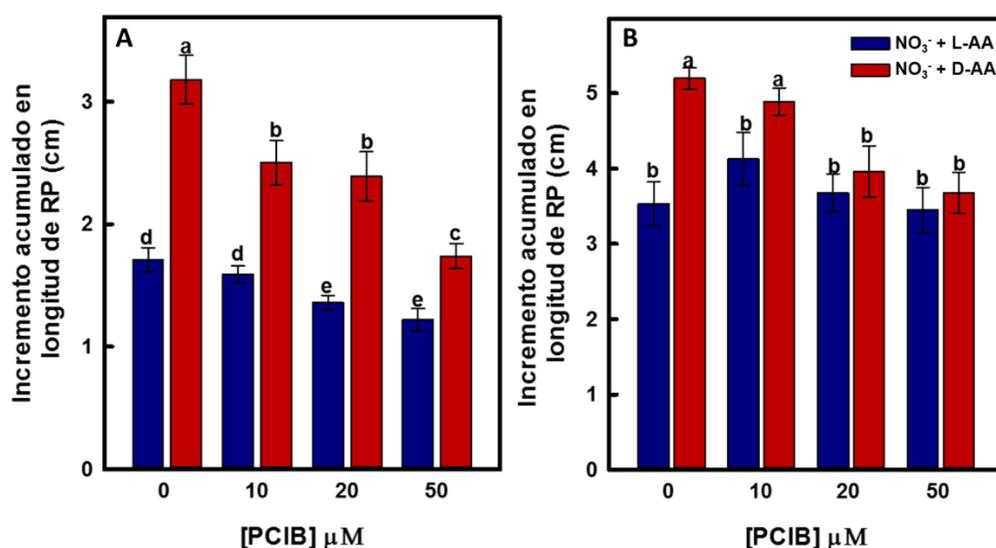


Figura 3.2 Incremento en el crecimiento acumulado en longitud de la raíz primaria (RP) de *Capsicum annuum* variedad CM334 expuesta a dosis crecientes de PCIB. En la gráfica se observa el incremento en el crecimiento de la RP a los 4 días (A) y a los 10 días (B) de exposición a los tratamientos $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$ y $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$ a diferentes dosis de PCIB (0, 10, 20 y 50 μM) ($n=30$). Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre la concentración aplicada por tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

Una acumulación de auxina en el ápice de la RP permite el transporte basipetalo y la

regulación de varios eventos de desarrollo a lo largo de la raíz (Satbhail *et al.*, 2014). En plantas de trigo (Hejnowicz, 1961) y de *Phleum pratense* (Goodwin, 1972) tratadas con bajas concentraciones de ácido indolacético (AIA), la elongación de la raíz fue inhibida de manera transitoria, recuperándose estos valores hasta longitudes iguales o mayores al testigo. Se ha reportado que el anti-auxina 4,4,4-trifluoro-3-indole-3-butyric acid (TFIBA) promueve el crecimiento en longitud de la raíz y a su vez, causa una reducción del grosor e inhibición del crecimiento de PRs y RLs (Zhang and Hasenstein, 2000). Sin embargo, PCIB inhibe el crecimiento de la raíz en *Arabidopsis* y la síntesis de etileno, pero sus efectos son menos severos que con otros anti-auxinas (Ono *et al.*, 2003).

3.3.2 Participación de las auxinas en la inducción de RLs mediado por la mezcla de D-AAs

El número de RLs en presencia de los tratamientos de $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$ y $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$, con o sin el anti-auxina PCIB, se presentan en la Figura 3.3 A. El máximo de RLs desarrolladas fue de aproximadamente cuatro para Seminis. Para este lote de semillas no se presentaron diferencias entre los tratamientos con L y D-AAs. Cuando se agregó el PCIB, esta producción disminuyó 1.3 veces para las concentraciones de 10 y 20 μM , y tres veces para el tratamiento con 50 μM . Sin embargo, este efecto fue observado para los dos tratamientos con los AAs.

La variedad de *C. annuum* CM334 produjo un mayor número de RLs y fue más responsiva a los tratamientos con D-AAs (Figura 3.3 B). Estos compuestos aumentaron el número de RLs aproximadamente un 50 % más en comparación con el testigo con los L-AAs. Al adicionar la anti-auxina PCIB, el número de RLs disminuyó conforme aumentó la concentración de este compuesto y esta disminución fue más drástica cuando las raíces estuvieron en presencia de los D-AAs (Figura 3.4B). A la dosis de 50 μM de PCIB, se observó la mayor inhibición, siendo ésta de un 90 y 70% con los D- y L-AAs, respectivamente (Figura 3.3 B).

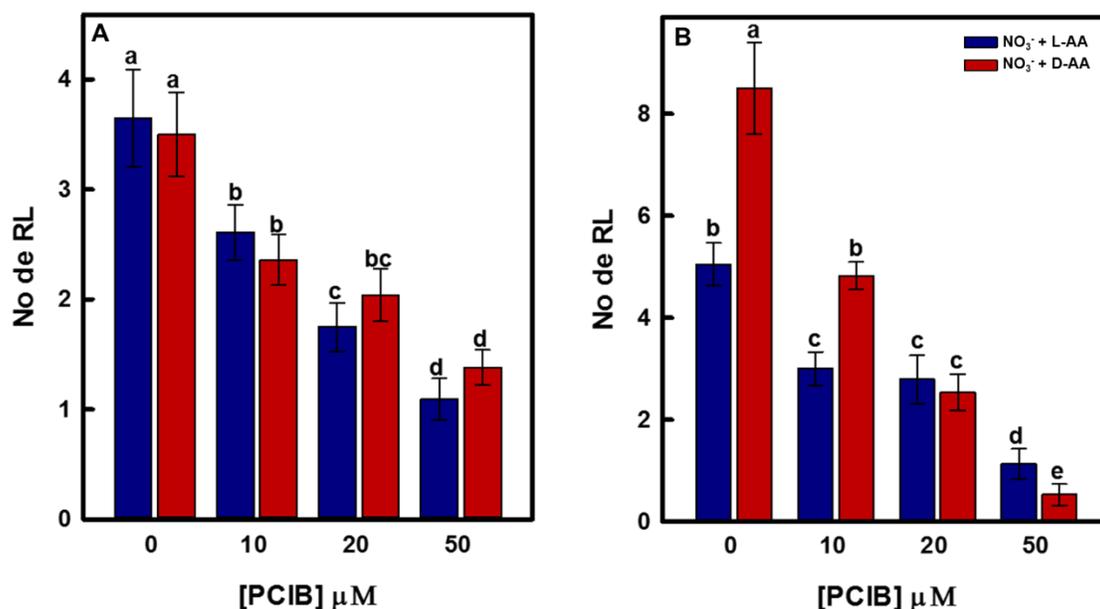


Figura 3.3 Efecto del PCIB sobre la formación de RLs. En este experimento se utilizó la mezcla de los D/L-AAs, anteriormente descrita, más PCIB a dosis individuales de 0, 10, 20 y 50 μM. Se evaluó el número de RLs a los 10 días posteriores al tratamiento para chile habanero var. Seminis (A) y para *Capsicum annuum* var. CM334 (B). Letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos bajo las diferentes dosis (Tukey, $p \leq 0.05$).

Estos efectos también se pueden corroborar en la Figura 3.4, en la cual se observa la diferencia en el desarrollo de las RLs para ambas especies, cuando son expuestas a los tratamientos con NO₃⁻ + L-AA y NO₃⁻ + D-AA, siendo más favorable para CM334 con los D-AAs. De manera interesante, se pudo observar que la presencia de PCIB no sólo inhibió la formación de RLs, sino que favoreció la formación de PRs, particularmente en CM334 y este efecto fue independiente de los tratamientos con AAs (Figura 3.4). Igualmente, como se observa para esta especie, la apertura de los cotiledones y el desarrollo de la parte aérea de la planta estimulado por los D-AAs fue completamente inhibido en presencia de las dosis más altas de PCIB.

Existen reportes del efecto del PCIB en plántulas de *Arabidopsis*, en las cuales igualmente se observa una inhibición del número de RLs. Esta inhibición es contraria al efecto de las auxinas que promueven y participan en las diferentes etapas del desarrollo de las RLs; se ha visto que 10 μM AIA restablecen el fenotipo causado por PCIB (Zhao y Hasenstein,

2009).

El PCIB también se ha utilizado para contrarrestar el efecto de la auxina endógena en los tejidos embriogénicos, promoviendo la maduración de embriones en coníferas como *Pinus sylvestris* y *Abies nordmanniana* (Abrahamsson *et al.*, 2012), donde se señala que los efectos de PCIB dependen tanto de la concentración como del momento de aplicación del compuesto (Carneros *et al.*, 2017; Vondráková *et al.*, 2011).

Además, se sabe que el PCIB inhibe fuertemente el crecimiento en presencia de nutrientes, por lo que se sugiera que su acción es dependiente del tipo de especie y estado fisiológico (Oono *et al.*, 2003). Entonces, el fenotipo observado con la presencia de los D-AAs, en cuanto al incremento del número de RLs, pudiera estar mediado por auxina, aunque no sean solamente éstas moléculas las que regulen la respuesta.

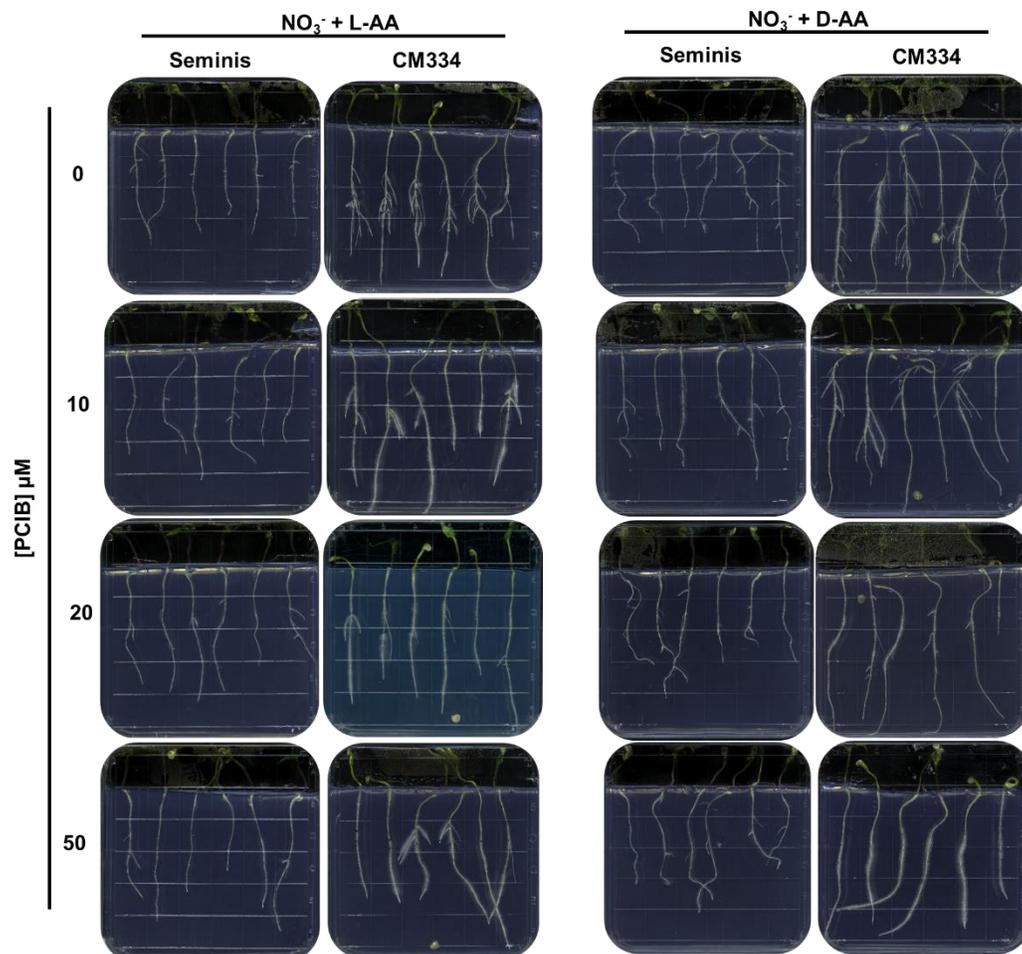


Figura 3.4 Imágenes representativas del efecto del PCB sobre la formación de RLs. Las imágenes demuestran las diferencias en el número de RLs para Seminis y CM334 cuando se exponen a los tratamientos con $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$ o $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$ y su comportamiento en presencia o ausencia de la anti-auxina PCB.

3.3.3 Identificación de genes putativos *LBD16* y *LBD18* en el genoma de *Capsicum*

Para la identificación de los genes *LBD16* y *LBD18* se procedió a la búsqueda de la secuencia codificante para estos genes en el genoma de *Capsicum annuum*, usando a las secuencias respectivas de *Arabidopsis*. Se realizó un BLASTn en la base de datos Sol Genomics Network y corroborando en el NCBI, obteniendo únicamente dos secuencias putativas para *LBD16*, de las cuales se seleccionó la CA03g10850 por presentar el mayor porcentaje de similitud con la de *Arabidopsis* (Cuadro 3.2). Esta búsqueda se realizó en el genoma de *Capsicum annuum* debido a que era el genoma disponible en ese momento, puesto que no había sido reportado el de chile habanero.

Cuadro 3.2 Secuencias utilizadas para la selección del gen putativo de *LBD16* para *Capsicum*

Secuencia	No de Accesoión	% Similitud	Tamaño (pb)	Tamaño (aa)
<i>LBD16</i>				
<i>Arabidopsis</i>	AT2G42430		738	246
<i>Capsicum annuum</i>	CA03g10850	84.35	672	224
	CA06g27850	83.72	618	206

Además, de acuerdo con la base de datos Sol Genomics se encontraron secuencias codificantes para este gen con similitud para algunas Solanaceas. Utilizando todas estas secuencias y la obtenida para *Capsicum*, se realizó un alineamiento con el programa MultAlin (Corpet *et al.*, 1988) para poder seleccionar las regiones en donde se diseñarían los cebadores. En la Figura 3.5 se presenta la imagen obtenida del alineamiento de estas secuencias y las regiones donde se seleccionaron los cebadores. Los porcentajes de similitud de la secuencia de *Arabidopsis* con las de Solanáceas fueron de 66.45%, 69.37%, 70.28% y 64.04% con la de *Capsicum annuum*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis* y *Solanum lycopersicum*, respectivamente.

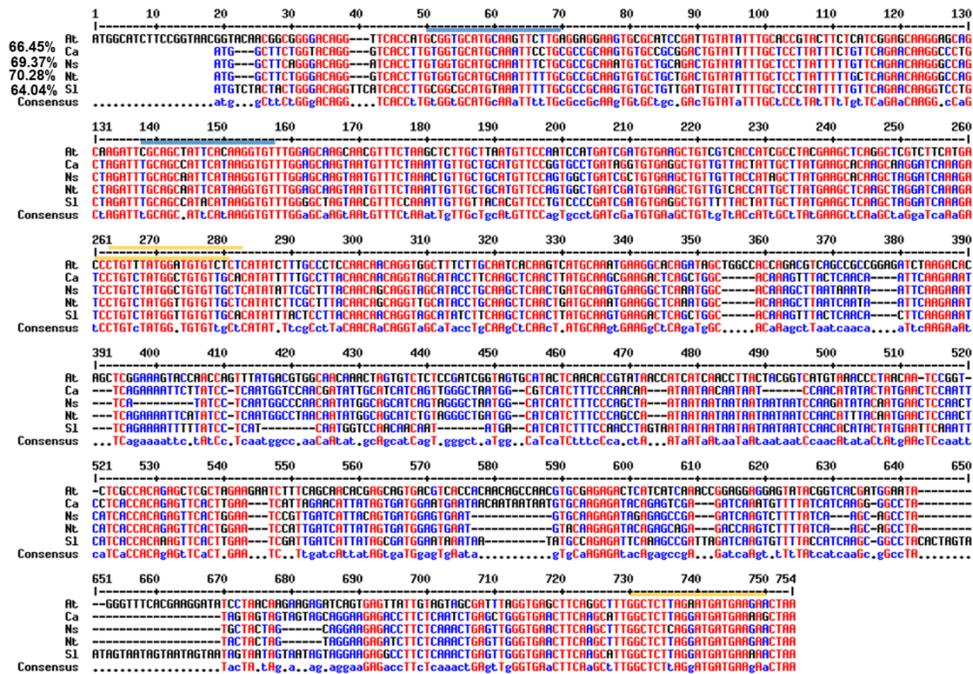


Figura 3.5 Alineamiento de *LBD16* de diferentes solanáceas y su comparación con la secuencia de *Arabidopsis*. Ca: *Capsicum annuum*, Ns: *Nicotiana sylvestris*; Nt: *Nicotiana tomentosiformis*; S1: *Solanum lycopersicum*. Las líneas señalan en azul corresponden a la posición de los cebadores en sentido y las líneas en amarillo a los antisentido. En la parte superior izquierda se indica el porcentaje de similitud obtenido con la secuencia de *Arabidopsis*.

Para el *LBD18*, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Con base en la secuencia reportada para *Arabidopsis*, se realizó una búsqueda de las posibles secuencias en Sol Genomics Network. Para este gen, únicamente se encontró una coincidencia con *Capsicum annuum* y las demás fueron entre otras especies de *Solanum*.

El porcentaje de similitud que presentaron con relación a la de *Arabidopsis*, fue de 63.83, 62.45, 62.96 y 62.83% con las de *Capsicum annuum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum pennelli* y *Solanum lycopersicum*, respectivamente (Figura 3.6). Cuando se realizó el alineamiento con diferentes secuencias de la base de datos de Solanáceas, solamente se observó un pequeño sitio con zonas conservadas donde se procedió a proponer los oligos para el *LBD18*, obteniendo tres cebadores, uno en sentido y dos en antisentido, todos con

una longitud de 20 pares de bases, descritos en Materiales y Métodos. Se destaca que las secuencias encontradas en las Solanáceas siempre fueron menores a la reportada para *Arabidopsis* (Figura 3.6).

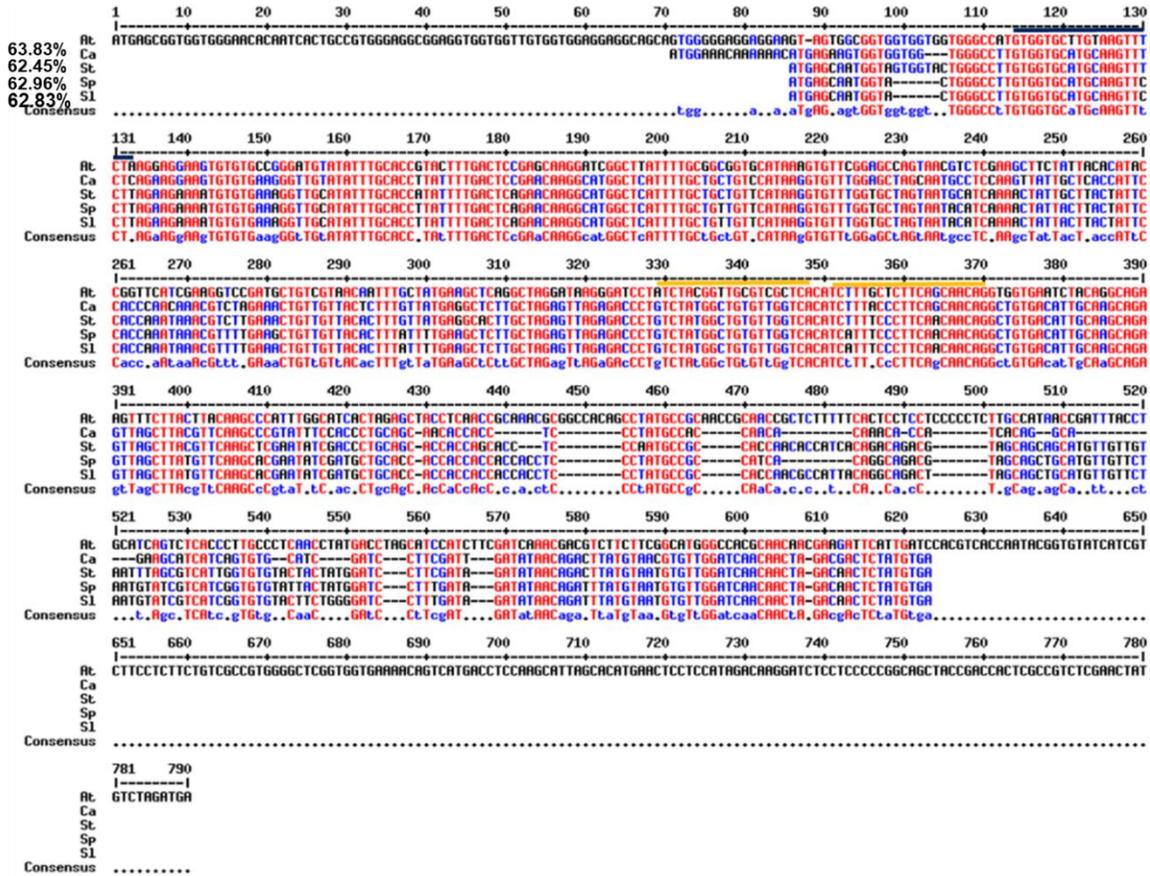


Figura 3.6 Alineamiento de *LBD18* de diferentes solanáceas y *Arabidopsis*. Ca: *Capsicum annuum*, St: *Solanum tuberosum*; Sp: *solanum pennellii*; Sl: *Solanum lycopersicum*. Los cebadores se señalan en las líneas azules (en sentido) y en las amarillas (en antisentido). Los porcentajes de similitud con *Arabidopsis* se señalan a la parte superior izquierda.

Para amplificar los fragmentos de estos genes a partir de tejido de chile habanero, se usó como material de partida el cDNA sintetizado a partir del ARN total de raíces de plantulas de ocho días de edad tratadas con 20 µM AIA durante ocho horas. En la Figura 3.7 se muestran los resultados de la amplificación por PCR, usando las dos combinaciones de cebadores para ambos genes. Los tamaños de cada fragmento coincidieron con los esperados para *LBD16* (643 pb y 554 pb usando las combinaciones de los cebadores F25-R648 y F114-R648, respectivamente) y para *LBD18* (235 pb y 257 pb para la combinación

de cebadores F41-R256 y F41-R278, respectivamente)

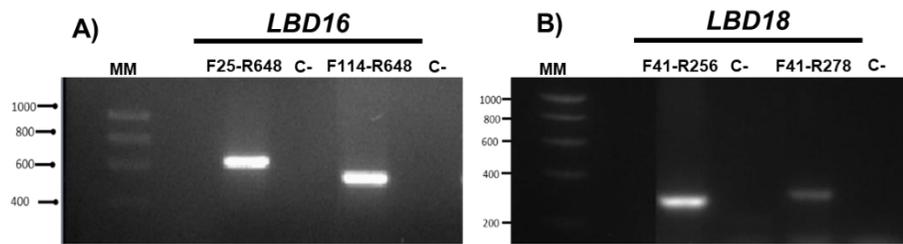


Figura 3.7 Amplificación por PCR de los cebadores de los genes *LBD16* y *LBD18*. En A se observa el juego de cebadores para *LBD16* con los cebadores F25-R648 y con los cebadores F114-R648, acompañados cada uno en el carril contiguo del testigo negativo sin ADNc. En B se presenta la amplificación de los cebadores para *LBD18* de los cebadores F41-R256 y cebadores F41-R278, cada uno con un testigo negativo, en el carril continuo. MM: marcador molecular de 1 Kb. ADNc de raíces de *Capsicum annuum*.

Para demostrar que estos transcritos eran inducidos por auxina exógena, como sucede en *Arabidopsis*, las plántulas de chile habanero fueron expuestas o no, a esta fitohormona durante ocho horas y se llevó a cabo la amplificación por RT-PCR a partir de ARN de las raíces. Como se observa en la figura 3.9, los niveles de transcritos de ambos genes se incrementaron en las raíces tratadas con la auxina y *LBD16* presentó mayores niveles de transcritos que *LBD18*.

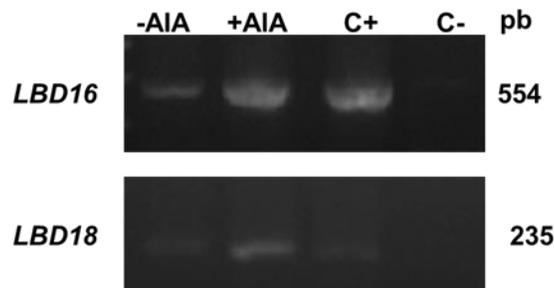


Figura 3.8 Nivel de transcritos de los genes *LBD16* y *LBD18* en respuesta a AIA. Se amplificaron los genes por PCR a partir de ADNc de raíces de chile habanero tratadas o no con AIA. Se utilizó el juego de cebadores para *LBD16* (F114-R648) y para *LBD18* (F235-R256). Testigo positivo (C+): ADNc +AIA, testigo negativo (C-): sin ADNc.

Estos resultados demuestran que ambos genes pueden ser regulados por auxinas en la

raíz de chile habanero, tal como ocurre en *Arabidopsis*. Estos genes también fueron clonados a partir de raíz de chile habanero para verificar si su secuencia correspondiera a la esperada. Para *LBD16*, la secuencia obtenida presentó un 99% de identidad con la de *C. annuum* con un tamaño de 549 pb (Figura 3.9).

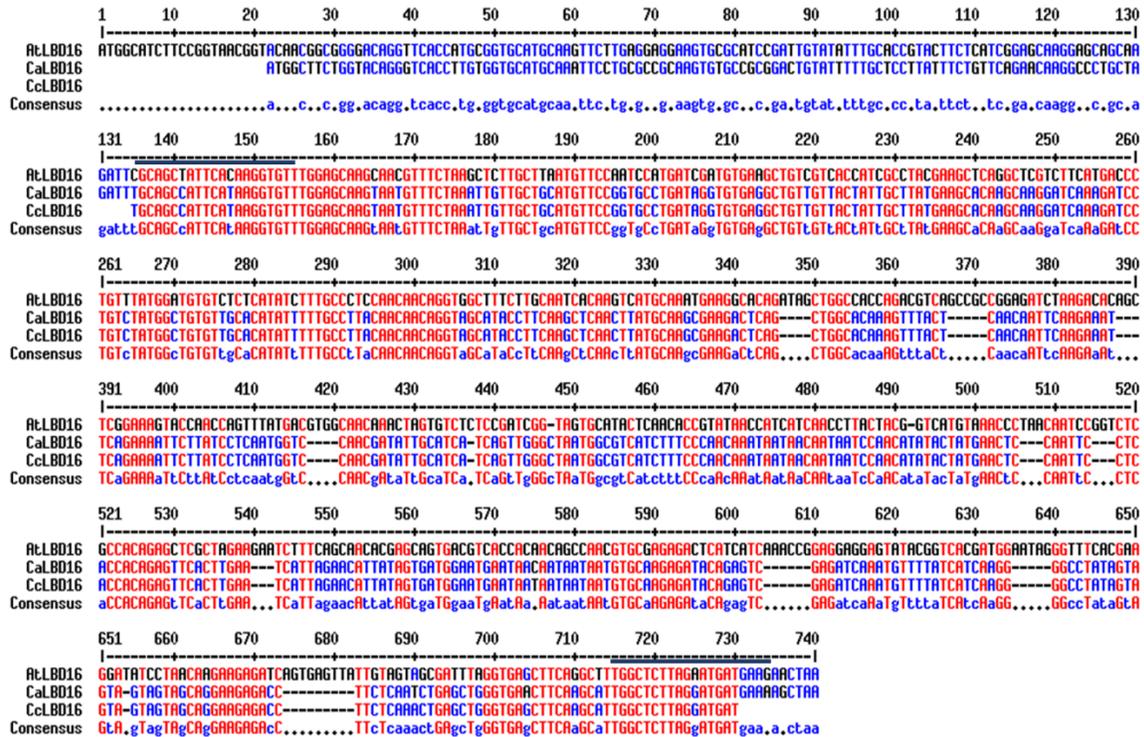


Figura 3.9 Alineamiento de las secuencias de *LBD16* de *Arabidopsis thaliana* (*AtLBD16*), *C. annuum* (*CaLBD16*) y el fragmento clonado de *C. chinense* (*CcLBD16*). Los datos de las secuencias fueron corroborados en el NCBI mediante un Blastn.

Para la secuencia correspondiente a *LBD18* a partir de las muestras de *C. chinense*, se obtuvo un fragmento de 235 pb con un 99% de identidad con la reportada para *C. annuum*. Esta secuencia correspondía al tamaño esperado, al igual que los cebadores anteriormente diseñados para *C. annuum* fueron identificados en la secuencia (Figura 3.10).

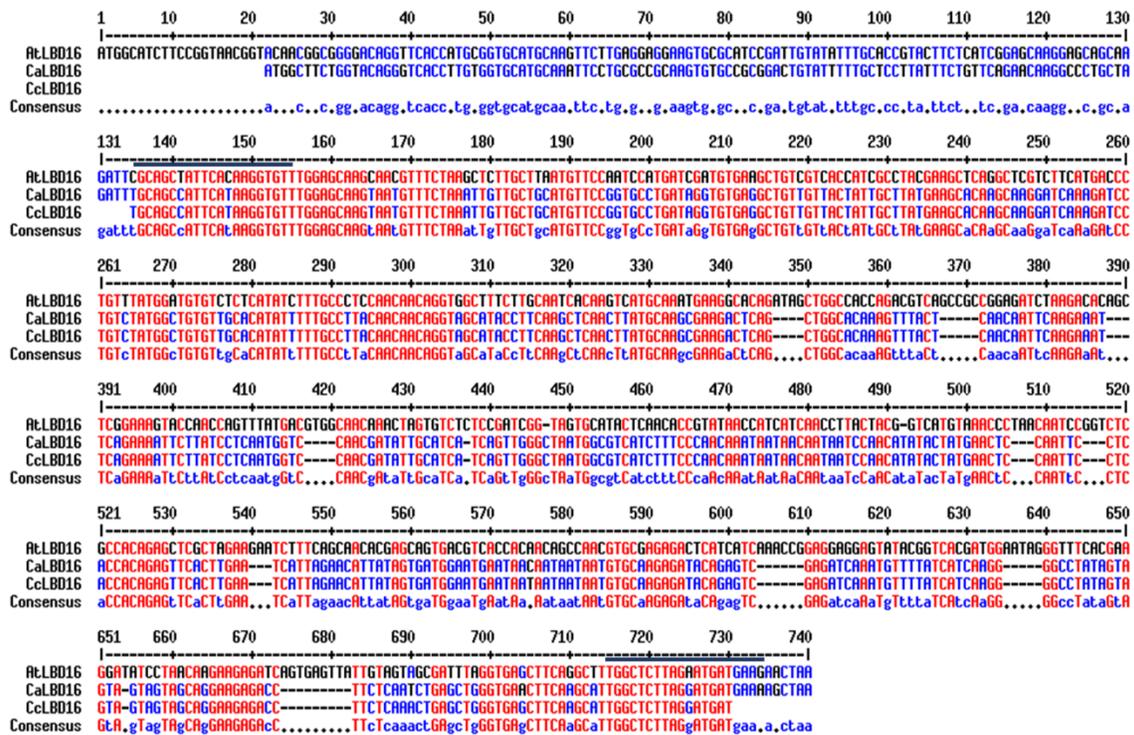


Figura 3.10 Alineamiento de las secuencias de *LBD18* de *Arabidopsis thaliana* (*AtLBD18*), *C. annuum* (*CaLBD18*) y el fragmento clonado de *C. chinense* (*CcLBD18*). Los datos de las secuencias fueron corroborados en el NCBI mediante un Blastn.

Diferentes factores genéticos participan en la regulación de los eventos de iniciación de las RLs y algunos de ellos son regulados por auxinas; principalmente la señalización de auxinas mediada por AUXIN RESPONSE FACTOR, ARF7 y ARF19, y el represor auxin/indol-3- acetic acid (Aux/IAA), incluyendo SOLITARY ROOT (SLR)/IAA14. Las auxinas aceleran la degradación de las proteínas Aux/IAA, tales como SLR/IAA14, reprimiendo la función de ARF7 y ARF19 como activadores transccripcionales. A su vez, ARF7 y ARF19 activan la transcripción de *LBD16* y *LBD18*, que también podrían activar una red transcripcional río abajo para la iniciación de RLs (Okushima *et al.*, 2007).

Estas proteínas son las que regulan los eventos de iniciación de las RLs mediados por auxinas, pero únicamente han sido caracterizados en *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran que la expresión de estos genes en las raíces de chile habanero también es regulada por auxina.

Este resultado, además de su similitud en secuencia, sugiere que las secuencias localizadas en *Capsicum* son candidatos para *LBD16* y *LBD18*, como su contraparte de *Arabidopsis*.

3.3.4 Evaluación del nivel de transcritos de los genes *LBD* en respuesta a auxina en raíces tratadas con la mezcla de D-AAs

La proteína *LBD16* participa en la iniciación de la migración nuclear y las divisiones asimétricas en la etapa de iniciación del primordio de RLs, mientras que la *LBD18* está involucrada tanto en las primeras etapas de desarrollo de las RLs, así como durante la emergencia de éstas (Goh *et al.*, 2012; Berckmans *et al.*, 2011).

Como ambos genes son inducidos por auxina en las raíces de chile habanero y su participación está relacionada en el desarrollo de las RLs, demostrado en *Arabidopsis*, en este trabajo se usaron para profundizar en el papel de las auxinas en la respuesta de chile habanero a la mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys. Para determinar si el efecto de la mezcla de los D-AAs era influenciada por auxinas, se expusieron las raíces de chile habanero a los tratamientos con estos compuestos durante un curso temporal de 24, 48, 72 y 96 h, y el ARN fue extraído a partir de las raíces. Como testigo, se utilizó a la mezcla con L-AA.

En las plantulas de chile habanero *Seminis*, no se observaron cambios en los niveles de transcritos de *LBD16* y *LBD18* con relación a los tratamientos con AAs a los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos. Únicamente a las 96 h se logró observar un ligero aumento en los niveles de transcritos de *LBD18*, mientras que lo contrario fue observado para *LBD16* (Figura 3.11). Esta respuesta pudiera deberse a la variabilidad biológica dentro de esta variedad.

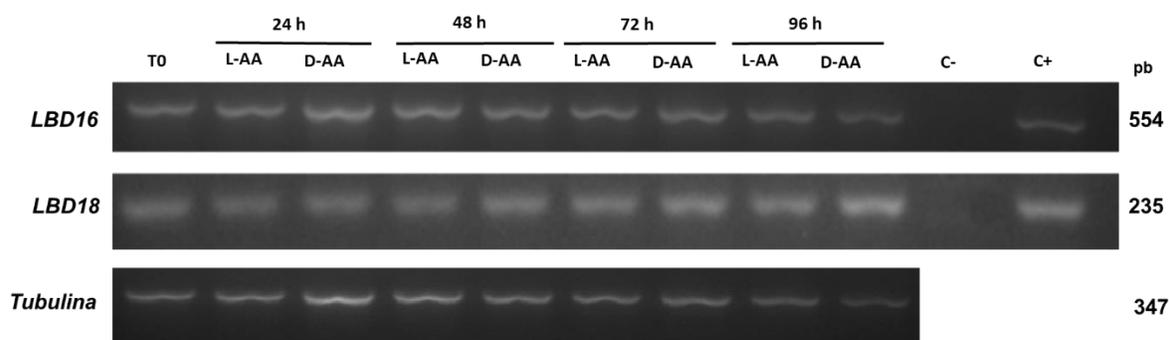


Figura 3.11 Nivel de transcritos de los genes *LBD16* y *LBD18* en raíces tratadas con L-AA y D-AA. Se amplificaron los genes por PCR a partir de ADNc de raíces de chile habanero tratadas con L-AA y con D-AA. Se utilizó el juego de cebadores para *LBD16* (F114-R648) y para *LBD18* (F41-R256). En el gel de agarosa se observa en el carril 1: T₀, raíces sin tratamiento de aminoácidos; en el carril 2 y 3: raíces tratadas con L-AA y D-AA, respectivamente a las 24h, en el carril 4 y 5: raíces tratadas con L-AA y D-AA a las 48h, en el carril 6 y 7: raíces tratadas con L-AA y D-AA a las 72h, en el carril 8 y 9: raíces tratadas con L-AA y D-AA a las 96h. Testigo negativo (C-): sin -ADNc, testigo positivo (C+): ADNc+AIA. Como control interno de las reacciones de PCR se utilizó el gen constitutivo de tubulina.

Conociendo que la variedad CM334 de *C. annuum*, la cual respondió a los tratamientos con D-AAs, se decidió evaluar los niveles de transcritos para ambos genes en las raíces de plántulas expuestas por 10 días a la mezcla de los D-AAs. Los niveles de transcritos para ambos genes aumentaron en las raíces expuestas a los D-AAs, comparadas con las tratadas con los L-AAs en esta especie (Figura 3.12). El tratamiento con la anti-auxina PCIB abolió el aumento del número de RLs observado anteriormente con los D-AAs, comparada a las raíces tratadas con los L-AAs (Figura 3.3 B y 3.4). Para conocer el efecto de este tratamiento sobre los niveles de transcritos de estos genes, se evaluaron los mismos en las raíces expuestas a los tratamientos con los aminoácidos en presencia de 50 μ M PCIB. No se observaron cambios significativos en los niveles de transcritos de *LBD16* cuando las raíces fueron tratadas con la anti-auxina, manteniéndose el efecto estimulador provocado por los D-AAs sobre los niveles de transcritos de este gen. En cambio, los niveles de transcritos de *LBD18* disminuyeron significativamente en las raíces expuestas a PCIB, desapareciendo totalmente el aumento provocado por los D-AAs, comparado con el tratamiento de los L-AAs (Figura 3.12).

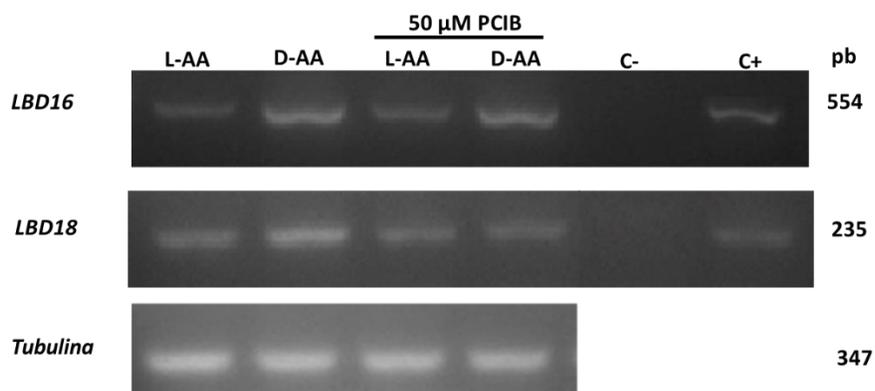


Figura 3. 12 Niveles de transcritos de los genes *LBD16* y *LBD18* en raíces de CM334 en presencia o ausencia de PCIB. Se amplificaron los genes por PCR a partir de ADNc de raíces de la variedad CM334 tratada durante 10 días con las mezclas de L- y D-AAs en presencia o ausencia de 50 μ M de PCIB. Se utilizó el juego de cebadores F114-R648 y F41-R256 para amplificar a *LBD16* y *LBD18*, respectivamente. C-: testigo negativo (-ADNc), C+: testigo positivo (ADNc +AIA). Como control interno de las reacciones de PCR se utilizó el gen constitutivo de tubulina.

Como se ha descrito en los apartados anteriores, los procesos de desarrollo de las RLs están enteramente regulados por auxinas. A nivel transcripcional, la expresión de los genes *LBD16* y *LBD18* es clave para la iniciación, cada uno con un papel diferente. La proteína *LBD16* está relacionada con eventos de iniciación de RLs (Okushima *et al.*, 2007) y *LBD18* está más relacionada con la emergencia de las RLs (Lee *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en la variedad CM334 sugieren que en el efecto de los D-AAs sobre el desarrollo de RLs podrían participar las auxinas. La proteína *LBD18* parece tener un papel importante en esta respuesta, ya que los niveles de transcritos del gen que la codifica disminuyeron en presencia de PCIB, el cual abolió el efecto estimulador de estos compuestos sobre la producción de RLs. Sin embargo, este comportamiento no ocurrió con *LBD16*, probablemente por la falta de *LBD18* u otra proteína río abajo de *LBD16*. Lee *et al.* (2017) mencionan que *LBD16* y *LBD18* forman un heterodímero para desencadenar el desarrollo de las RLs.

Por otra parte, se ha visto que la acción del PCIB puede variar según el tipo de célula y la zona de la raíz, así como de la especie y estado fisiológico de la planta como se observó en linaza en donde se promueve el crecimiento de la raíz, contrario a *Arabidopsis* en donde

se inhibió (Zhao *et al.*, 2010). Un aspecto a tener en cuenta es que la expresión de estos genes puede ser llevada a cabo en tipos celulares y zonas de la raíz específicas (Porco *et al.*, 2016), y en nuestro estudio, se usó el órgano completo, lo cual puede enmascarar el resultado de expresión de los mismos.

Otros genes *LBD* que fueron reportados en *Arabidopsis* también son regulados a nivel transcripcional por auxinas y sus productos proteicos participan en dicha respuesta. Por ejemplo, LBD29 es un factor de transcripción involucrado en la emergencia de las RLs, actuando en etapas posteriores a LBD18 (Porco *et al.*, 2016). LBD33 juega un papel similar al LBD18, regulando el ciclo celular y al factor de transcripción E2F α (Goh *et al.*, 2012); mientras que LBD13 está involucrado en la emergencia y elongación de las RLs (Cho *et al.*, 2019). También, el LBD14 controla la formación de las RLs mediado por ABA (Jeon y Kim, 2018). Sin embargo, a pesar de las variaciones en los resultados esperados, ésto representa un acercamiento en la vía de acción de la mezcla de los D-AAs sobre el crecimiento de la raíz. Este estudio sienta algunas bases para futuras investigaciones en relación entre las auxinas y los D-AAs para regular el desarrollo de las RLs en esta especie.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN LAS RAÍCES EXPUESTAS A LA MEZCLA DE LOS D-AAs VAL, LEU Y CYS

4.1 INTRODUCCIÓN

Los GLR son proteínas que tienen una alta homología en secuencia y estructura a los receptores de glutamato del tipo ionotrópico de mamíferos (iGLuR). Los receptores funcionales forman un tetrámero, donde cada subunidad contiene dos dominios de unión a ligando (S1 y S2), cuatro dominios transmembranales (M1 a M4), siendo M2 la región del poro, la cual atraviesa parcialmente la membrana (Davenport 2002). Cuando un agonista se une a su sitio de unión, provoca un cambio conformacional en el receptor y se abre el poro, desencadenando la entrada de Ca^{2+} .

Desde el descubrimiento de los GLR en el genoma de *Arabidopsis* hace 21 años (Lam *et al.*, 1998), se han encontrado en *Chlamydomonas*, clorofitas, musgos, helechos, gimnospermas y plantas con flores (De Bartoli *et al.*, 2016). Hasta la fecha, en *Arabidopsis* se sabe que esta familia se compone de 20 genes agrupados en tres clados diferentes (Chiu *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 1999), al igual que en *Solanum lycopersicum* donde se descubrieron 13 genes (Aouini *et al.*, 2012). Por otro lado, en *Oryza sativa* se conocen 24 genes que se agrupan en cuatro clados (Singh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2006), además de otras especies como *Raphanus sativus* donde se conoce sólo un gen (Kang *et al.*, 2004) y uno en una gramínea silvestre (Li *et al.*, 2013).

En las plantas, estas proteínas participan en diferentes funciones como el balance carbono: nitrógeno (Kang *et al.*, 2004), la biosíntesis y señalización de ABA (Kong *et al.*, 2015), el gravitropismo en las raíces (Miller *et al.*, 2010), la iniciación de las RLs (Vincill *et al.*, 2013), el desarrollo radical (Singh *et al.*, 2016), el crecimiento del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011), la germinación de semillas (Kong *et al.*, 2015), entre otros. Inicialmente, se creía que estas proteínas se localizaban exclusivamente en la membrana plasmática; sin embargo, ya se han detectado también en las membranas de cloroplastos y mitocondrias (Teardo *et al.*, 2015), las endomembranas de las células espermáticas y la membrana vacuolar

(Wudick *et al.*, 2018). Estos resultados sugieren que estas proteínas presentan una amplia diversificación en funciones en las plantas.

Aunque los agonistas de estos receptores están bien establecidos en los mamíferos, en las plantas, aún son desconocidos. Se sabe que el L-Glu causa despolarización de la membrana plasmática y un flujo de Ca^{2+} en las raíces de *Arabidopsis* y se ha sugerido que actúa sinérgicamente con la Gly (Brenner *et al.*, 2006). Otros AAs que inducen cambios en el potencial de membrana y en la concentración de Ca^{2+} intracelular son la L-Ala, L-Ser, L-Asn, L-Cys y glutatona (γ -glutamyl-cisteinil-Gly), los cuales también se sugieren como posibles agonistas de estas proteínas (Qi *et al.*, 2006).

Además de los estereoisómeros L, los D-AAs también parecen tener la capacidad de ser agonistas de los GLR, igual a lo que ocurre para mamíferos (Hamase *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la D-Ser es un agonista de los GLRs AtGLR1.2 y AtGLR3.7 y la activación de estas proteínas por el D-AA favorece el crecimiento del tubo polínico de *Arabidopsis* (Michard *et al.*, 2011).

Por lo tanto, uno de los objetivos del trabajo fue estudiar la posible participación de los GLR en la respuesta de los D-AAs sobre el crecimiento radical de chile habanero. Una forma de estudiar los GLRs es por medio del flujo de entrada de Ca^{2+} , que puede ser cuantificado por la técnica de medición de flujo de iones por microelectrodos no invasivos (MIFE TM), que permite la cuantificación de los flujos netos de varios iones con alta resolución espacial (varios μm) y temporal (aproximadamente 5 s). La técnica MIFE se ha convertido en una herramienta para estudiar las respuestas adaptativas de las células y tejidos vegetales a una gran cantidad de condiciones como el estrés abiótico y biótico o para mapear los perfiles de flujo de iones de la raíz, así como estudiar la cinética del flujo de iones transitorios (Su *et al.*, 2019; Shabala *et al.*, 2012).

En las plantas los GLR actúan como canales catiónicos no selectivos, es decir que permiten la entrada de diferentes iones, mayoritariamente de Ca^{2+} . Este flujo es activado cuando el ó los AAs agonistas se unen al sitio de unión al agonista. Como se ha visto para las plántulas de *Arabidopsis* cuando se les adiciona 1 mM de L-Glu, se estimula un incremento en el Ca^{2+} citosólico, lo que causa una despolarización de la membrana de las células del ápice de la

raíz y la posibilidad de una activación secundaria del influjo de Ca^{2+} por la captación de Glu (Davenport 2002).

Por otra parte, como se describió en el capítulo anterior, el lote de semillas de chile habanero Seminis comenzó a presentar problemas de germinación, así como de variabilidad biológica, perdiendo la clara respuesta a los D-AAs que había presentado al inicio de este trabajo. Además, la empresa SEMINIS dejó de surtir estas semillas, las cuales eran consideradas no certificadas. Por ello, se decidió usar tres variedades de chile habanero yucatecas, previamente certificadas para estudiar la participación de los GLR.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) de tres variedades originarias de Yucatán, proporcionadas por la Unidad Productora de Semillas (UPS): dos de fruto rojo (Mayan Chac y Mayan Kisin) y una de fruto naranja (Mayan Baalché).

4.2.2 Condiciones de crecimiento y tratamientos con aminoácidos

Las semillas de chile habanero se desinfectaron como se describe en materiales y métodos del Capítulo II. Después de cinco días de imbibición, las semillas se colocaron para su germinación en cajas de Petri de cristal, que contenían una capa de algodón y papel filtro humedecido con 10 ml de agua destilada estéril, a 25°C en condiciones de oscuridad.

Para evaluar el crecimiento de las variedades de chile habanero expuestas a los tratamientos con AAs, las semillas germinadas se colocaron en cajas de Petri cuadradas con medio basal N orgánico: 23 mM de ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 5.8, sacarosa al 0.5 % (p/v), agar-agar al 1 % (p/v) y sales del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) 1:50. Las cajas se colocaron en posición vertical en oscuridad a 25°C, hasta que la RP alcanzara 2.2 ± 0.5 cm de longitud, entonces las plántulas fueron transferidas al medio de tratamiento correspondiente.

Las fuentes de N orgánicas utilizadas para los tratamientos fueron una mezcla de los tres aminoácidos previamente estudiados, Leu, Val y Cys en forma L y D. Se incluyó como

fueron la fuente principal de N 1 mM KNO₃. Los tratamientos con las fuentes de N orgánicas quedaron estructurados de la siguiente manera: NI, 1 mM KNO₃ + 0.3 mM NH₄Cl, 1 mM KNO₃ + 0.3 mM L-AA [mezcla de L-Leu, L-Val y L-Cys (99%; Sigma–Aldrich), a una concentración de 0.1 mM cada uno, T1] y 1 mM KNO₃ + 0.3 mM D-AA [mezcla de D-Leu, D-Val y D-Cys (99%; Sigma–Aldrich) a una concentración de 0.1 mM cada uno, T2]. El experimento fue conducido en un cuarto de cultivo en condiciones controladas (fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad a 25 °C). En todos los tratamientos la parte superior del medio fue removida de forma tal que solo la raíz quedó expuesta al medio.

En este experimento se evaluó el crecimiento de la RP diariamente hasta el día diez de tratamiento, punteando siempre a la misma hora. Se determinó la longitud total de la RP al día cinco y diez, así como el número y longitud de RLs al décimo día de tratamiento. Las longitudes de la RP y de las RLs fueron determinadas con una regla. Las cajas de Petri fueron escaneadas diariamente en un escáner (HP scanjet 3670). Se utilizaron diez cajas de Petri por tratamiento, cada una conteniendo seis plántulas (n=60 plántulas).

4.2.3 Determinación del nivel de transcritos de los *GLRs* en plántulas expuestas a los D-AAs

Se determinó el nivel de transcritos de los *GLR* en hoja y raíz de las variedades Mayan Chac, Mayan Kisin y Mayan Baalché tratadas con la mezcla de AAs Val, Leu y Cys. El ARN total fue aislado a partir de los tejidos de las plántulas sometidas durante 10 días a los tratamientos, con el RNeasy®Plant Mini Kit (QIAGEN, Cat 74903). La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando la transcriptasa reversa SuperScrip™ y oligo-dt (Invitrogen). A partir del cDNA obtenido se amplificaron los diferentes genes por RT-PCR.

Previamente, en nuestro laboratorio fueron identificadas 12 secuencias en el genoma de *C. annuum* que presentaron alta identidad con los *GLR* de *Arabidopsis* y tomate y que, de manera similar a éstas, fueron agrupadas en tres clados en el análisis filogenético (datos no mostrados). A partir de ellas, se diseñaron cebadores que amplificaban la región del dominio de unión al ligando S2 de estos receptores, localizada entre los dominios transmembranales M3 y M4. Para este trabajo, se decidió estudiar únicamente a los representantes del clado I y III, dado que fueron los que se expresaron en mayor proporción

en estudios preliminares (datos no mostrados). En el cuadro 4.1 se presentan las características de los cebadores usados.

Cuadro 4.1 Características de los cebadores de los *GLR*. En el cuadro se describe la nomenclatura de los cebadores utilizados y su secuencia, así como su temperatura de alineamiento y el tamaño del amplicón resultante.

Cebadores	Secuencia del cebador	T _m (°C)	Tamaño del fragmento (pb)
<i>GLR1.1fwd</i>	TCAAGCCAGAGAACATCAAG	51.3	306
<i>GLR1.1rev</i>	CAACTGATGAAGAAGAGCAA		
<i>GLR1.2fwd</i>	GGACGATTATCCAAAGGAAC	52.6	295
<i>GLR1.2rev</i>	GAGGCTATCTGTTTCATCGG		
<i>GLR3.1fwd</i>	GACATTCTCAACATAGCTCCA	50.5	113
<i>GLR3.1rev</i>	TCATCAACAACTGCCATCAC		
<i>GLR3.2fwd</i>	AGAAAGGTCCGCAAGGTGGT	56.4	209
<i>GLR3.2rev</i>	TTGGAGGTCGCCGTTTTCTG		
<i>GLR3.3fwd</i>	TGCAGAACGGTATTTGGAG	54.1	337
<i>GLR3.3rev</i>	GTCTAAACTGCACGCACTTC		
<i>GLR3.4fwd</i>	TCATTGGGGAGCTACGTGTT	52.6	266
<i>GLR3.4rev</i>	TGACAGTTGAAGGATAGCAG		
<i>GLR3.5fwd</i>	TCAGTTGGGTTCAATTTGCTC	52.6	270
<i>GLR3.5rev</i>	TGTC AATAGCGAGAGGAGAG		

Las condiciones para la amplificación de los fragmentos por PCR fueron las siguientes: *GLR1.1*: 95 °C durante 1 min, 94 °C durante 30 s, 53°C durante 30 s, 75 °C durante 25 s por 35 ciclos y 72 °C durante 10 min; *GLR1.2*: 95 °C durante 1 min, 94 °C durante 30 s, 56°C durante 30 s, 75 °C durante 25 s por 35 ciclos y 72 °C durante 10 min; *GLR3.1*: 95 °C durante 1 min, 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s, 75 °C durante 15 s por 35 ciclos y 72 °C durante 10 min; *GLR3.2-3.5*: 95 °C durante 1 min, 94 °C durante 30 s, 53°C durante 30 s, 75 °C durante 25 s por 35 ciclos y 72 °C durante 10 min.

Todos los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Como testigo de carga, se utilizó a la tubulina (F-5 'GACCTTGAATCGGCTTATGG 3' y R-5 'TATCCTGGGTGAACGCTTTG 3').

4.2.4 Determinación del flujo neto de Ca^{2+} por la técnica MIFE

Estas determinaciones fueron realizadas en la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo en el laboratorio del Dr. Isaac Zepeda Jazo. El flujo neto de Ca^{2+} fue medido por la técnica no invasiva MIFE (Microelectrode Ion Flux Estimation) en plántulas de la variedad Mayan Chac. Para ello, las plántulas crecieron en condiciones *in vitro* en el medio NO: 23 mM de ácido 2-(N morfolino)-etanosulfónido (MES), pH 5.8, sacarosa al 0.5 % (p/v), agar-agar al 1 % (p/v) y sales del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) 1:50, en condiciones de oscuridad a 25°C, hasta que la RP alcanzó 6 ± 0.5 cm de longitud. Cuando obtenían el tamaño adecuado, se colocaron en una cámara de medición donde fueron inmovilizadas (Figura 4.1).

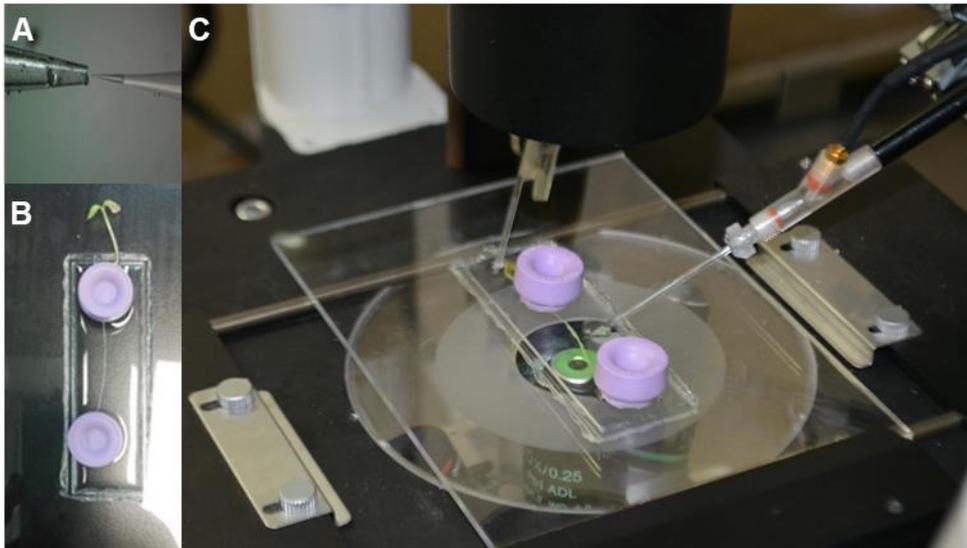


Figura 4.1 Medición del flujo de Ca^{2+} mediante la técnica MIFE. En la figura se observa el electrodo para la medición del flujo de Ca^{2+} al cual se le realizó el back-filling (A), posteriormente las plantas se inmovilizaron en la cámara de medición (B), la cual se colocó en el microscopio invertido donde se registraron los flujos de Ca^{2+} (C).

La cámara para las mediciones se adaptó para un volumen de 3 ml de solución de medición (0.5 mM KCl, 0.1 mM CaCl_2 , 2 mM Tris, 5 mM MES a pH6). Las raíces se dejaron 1 h en incubación para su estabilización (Figura 4.1B). Para las mediciones, se utilizó un electrodo selectivo a Ca^{2+} que previamente se preparó mediante estiramiento, corte y secado del

cristal y posterior recubrimiento con tributil clorosilano. Al electrodo se le realizó el back-filling con 500 mM de CaCl_2 , y éste fue colocado en contacto con la resina ión 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 (Figura 4.1B). Después, los electrodos fueron calibrados utilizando soluciones estándares con concentraciones de Ca^{2+} 100, 250 y 500 μM , hasta obtener una correlación superior a 0.999 para iniciar con la medición de los flujos de Ca^{2+} .

Cada una de las mediciones se realizó a una distancia de 2 cm por arriba del ápice de la raíz, colocando el electrodo selectivo a una distancia de separación de 50 μm de la raíz. Los valores se registraron de acuerdo al movimiento del electrodo de la posición 1 (50 μm) a la posición 2 (100 μm) (Figura 4.1C). A los 5 min de medición, se le adicionó a la solución de baño 0.1 mM del aminoácido correspondiente o una mezcla de éstos, registrando el flujo neto hasta los 20 min. Las diferencias de potencial electroquímico fueron convertidas en el software CHART y el flujo neto de iones fue calculado con el software MIFEFLUX. Se utilizaron cinco raíces por tratamiento.

4.2.5 Determinación de la variación de Ca^{2+} intracelular mediante microscopía confocal

Para la determinación de la variación de Ca^{2+} en las raíces de las variedades Mayan Chac y Mayan Kisin, se utilizó el indicador de Ca^{2+} Calcium Orange™, AM (C3015, Molecular probes by Life Technologies), el cual fue preparado en el amortiguador (5 mM de MES-Na pH 6 y 0.5 mM de CaSO_4) a una concentración final de 5 μM (Zebelo *et al.*, 2012).

Para este análisis, se usaron las raíces de plántulas tratadas de manera similar a aquellas que se usaron para la técnica MIFE. Dichas raíces fueron incubadas durante 1 h con 0.1 mM del aminoácido correspondiente o una mezcla de éstos, y en presencia de 1 mL de la solución de trabajo del fluoróforo.

En otro experimento realizado con la variedad Mayan Kisin, se usaron plántulas que crecieron durante 10 días en presencia de los tratamientos con 1 mM KNO_3 + 0.3 mM L-AAs (L-Val, L-Leu y L-Cys, cada uno a 0.1mM) y 1 mM KNO_3 + 0.3 mM D-AAs (D-Val, D-Leu y D-Cys, cada uno a 0.1mM). La variación de Ca^{2+} en las raíces fue medida añadiendo

1 ml de la solución de trabajo anteriormente descrita más 0.1 mM de L-Glu e incubadas por 1 h.

Todas las raíces fueron colocadas en un portaobjetos para su observación en el microscopio confocal FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan) a una longitud de onda de excitación y emisión de 555-610 nm. Las imágenes fueron procesadas en el software FV10-ASW 3.01b. En estos análisis se usaron tres raíces por tratamiento.

4.2.6. Análisis de nitrato, aminoácidos totales y proteínas totales en los tejidos de las plantas

Los tejidos de raíz y hoja de las tres variedades yucatecas: Mayan Chac, Mayan Kisin y Mayan Baalché, tratadas durante 10 días con los AAs fueron usados para estas extracciones. Se pulverizaron 0.1 g de raíz y hoja por separado con nitrógeno líquido, y luego se adicionaron 1% de polivinil pirrolidona (p/v) y el amortiguador de extracción (250 μ L; 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sacarosa, glicerol al 10%, 10 mM pirofostato de sodio, 0.2 mM ortovanadato de sodio, 1 mM 1 mM β -mercaptoetanol, 10 g/mL aprotinina, 10 g/mL leupeptina).

Posteriormente, se homogeneizó con un politron y se centrifugó a 14000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y utilizó para la determinación de proteínas totales (mg g⁻¹ peso fresco) por el método de Bradford (1976), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (BioRad, No. Cat. 5000006). Para la cuantificación, se realizó una curva patrón utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

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

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Variación en el crecimiento radical de las diferentes variedades de chile habanero expuestas a la mezcla de los D-AAs

La variabilidad génica de chile habanero es extensa, por lo que sus respuestas a los estímulos ambientales o nutrientes del suelo pueden variar según el color de fruto, el tamaño de la planta y el picor, entre otros factores. Como se señaló en los capítulos anteriores, la diferencia en el crecimiento de la RP y las RLs fue dependiente de la especie dentro del género *Capsicum*. Sin embargo, al evaluarlos en una variedad comercial no certificada de chile habanero Seminis, que presenta mayor variabilidad, las respuestas en el crecimiento fueron dependientes de la edad de la semilla. Por ello, se decidió trabajar con tres variedades de chile habanero certificadas, entre ellas dos de fruto rojo (Mayan Chac y Mayan Kisin) y una de fruto naranja (Mayan Baalché).

Primeramente, se evaluó el efecto de la mezcla de los D-AAs (NO_3 + D-AA, Val, Leu y Cys) sobre el crecimiento de la RP de estas variedades. Con independencia del tratamiento, el crecimiento de este órgano fue superior en las variedades de fruto color rojo (Mayan Chac y Mayan Kisin), comparada con la de color naranja Mayan Baalché (Figura 4.2). Sin embargo, la longitud de la RP fue menor en los tratamientos con L- y D-AA con respecto al tratamiento sin AAs (testigo con NI). Entre los tratamientos con AAs, se observó que los D-AAs aumentaron la longitud de la RP al quinto día de tratamiento en las variedades de frutos color rojo con respecto a los L-AAs, no así en la naranja (Figura 4.2A). Esta respuesta también se mantuvo a los 10 días de tratamiento (Figura 4.2B).

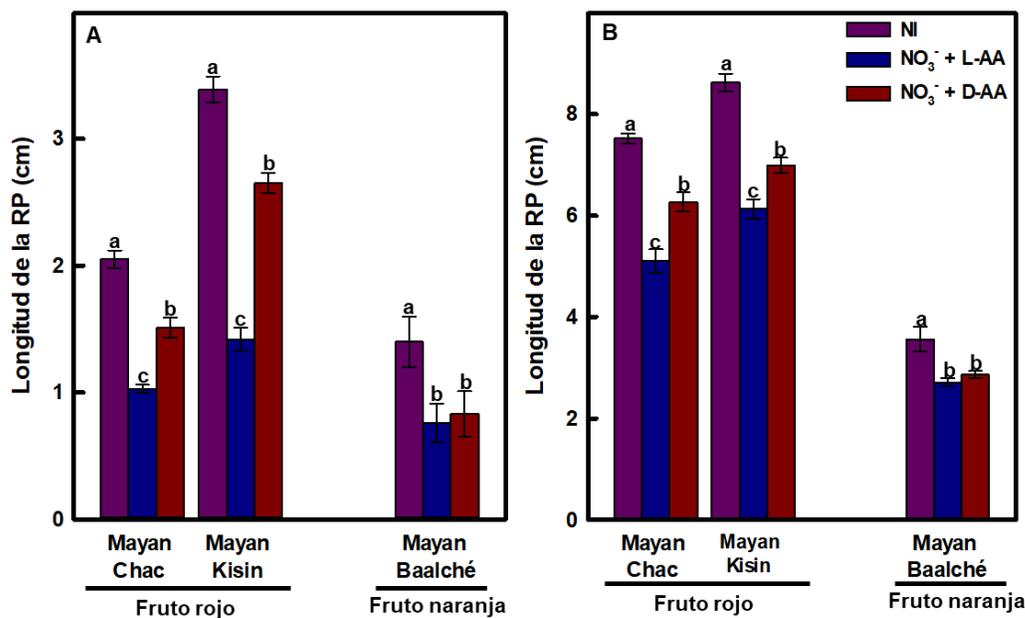


Figura 4.2 Efecto de la mezcla de D-AA sobre el crecimiento de la raíz primaria (RP) de chile habanero en condiciones *in vitro*. En la figura se observa la longitud de la RP a los cinco (A) y 10 (B) días de exposición a los tratamientos con los AAs. Se evaluó el crecimiento de la RP de las diferentes variedades de chile habanero sometidas a los tratamientos NI: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM NH₄Cl, NO₃⁻ + L-AA: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM L-AA, Val, Leu y Cys y NO₃⁻ + D-AA: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM D-AA, Val, Leu y Cys. Los datos representan la media ± ES, n=60 plántulas. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de una misma variedad (Tukey, $P \leq 0.05$).

Como se observa en la Figura 4.3A, las variedades rojas fueron también más productivas en cuanto a número de RLs que las naranjas, y dentro de las rojas destacó la Mayan Chac como la más productora de RLs. Los tratamientos con D-AAs causaron el aumento de 30% en el número de RLs en la variedad Mayan Chac comparado al tratamiento con los L-AA y NI. Para Mayan Kisin, se obtuvo aproximadamente un 20% de incremento en el número de RLs con los tratamientos con los D-AAs y el tratamiento NI (sin aminoácidos), en comparación con los L-AAs. En cambio, no se observó un efecto significativo sobre este parámetro para la variedad Mayan Baalché (Figura 4.3A).

La longitud promedio y total de las RLs también varió entre variedades y tratamientos con los AAs L y D (Figura 4.3 B y C), donde nuevamente las variedades de fruto rojo presentaron

una mayor longitud comparada con las de fruto naranja. Particularmente, la longitud promedio de las RLs fue menor con el tratamiento $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$ para las variedades de fruto rojo Mayan Chac y Mayan Kisin; para Mayan Chac la longitud fue 60% menor con relación a los valores del testigo con L-AA y NI; para Mayan Kisin de aproximadamente un 30% menor con relación a los L-AAs, no así para el testigo con NI. En cuanto Mayan Baalché, la longitud promedio fue 70% menos comparado a las variedades de fruto rojo, e igualmente no se presentó una variación en cuanto a la aplicación de los L/D-AAs (Figura 4.3 B).

Otro parámetro evaluado fue la longitud total de las RLs, donde Mayan Chac presentó una mayor longitud total, pero no hubo una diferencia significativa entre los L-AA, D-AA y NI. La longitud total de las RLs para Mayan Kisin fue 1.7 veces menor comparada con Mayan Chac, aunque la respuesta a los D-AAs fue igual. Sin embargo, para Mayan Baalché, a pesar de que la longitud total en comparación a las variedades rojas fue 2.5 veces menor; en esta variedad la longitud de la RP fue inhibida con los tratamientos con AAs; donde el tratamiento con los D-AA inhibe un 40% comparada a los L-AAs y 70% con relación al testigo con NI (Figura 4.3 C).

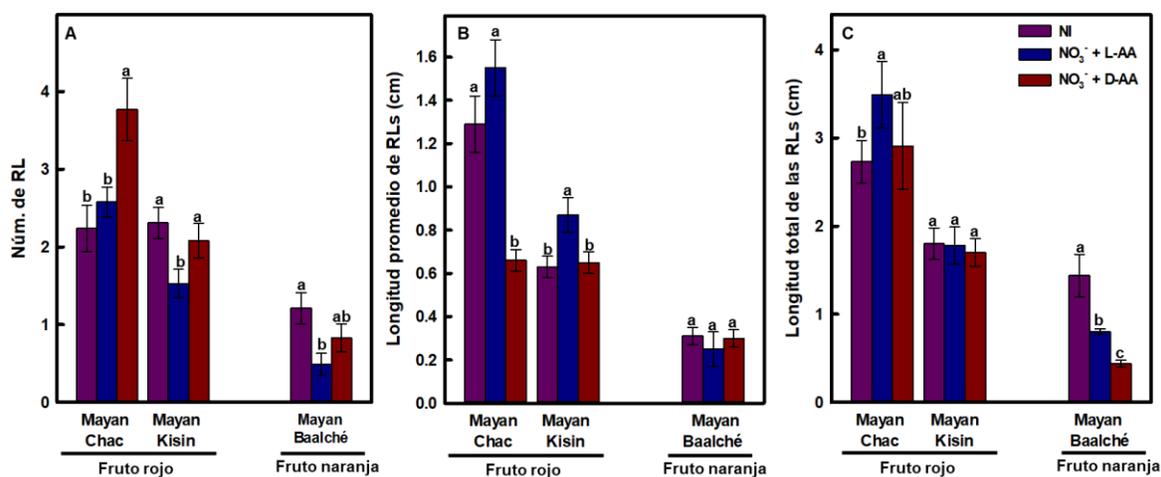


Figura 4.3 Efecto de la mezcla de los D-AAs Val, Leu y Cys sobre la formación y la longitud de las raíces laterales en plántulas de chile habanero *in vitro*. El número y la longitud de las RLs fueron evaluadas al día 10 de tratamiento, en A) número de RL, B) Longitud promedio de RLs y C) Longitud total de RLs. Los datos representan la media \pm ES, n= 60 plántulas. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de una misma variedad

En la Figura 4.4 se puede observar el mayor vigor que muestran las variedades rojas, comparadas con la naranja, tanto en el crecimiento de la RP, la proliferación de RLs y en el desarrollo de la parte aérea. También, se muestran los cambios morfológicos inducidos por los D-AAs en el sistema radical. Las variedades Mayan Chac y Mayan Kisin muestran una RP de mayor longitud, así como un mayor número de RLs, pero más cortas. Aunque un mayor número de plantas respondieron a los D-AAs formando RLs para la variedad Mayan Baalché (50%, comparada con 30% en presencia de la mezcla de los L-AAs) (Figura 4.4), el cambio no fue estadísticamente significativo (Figura 4.3).

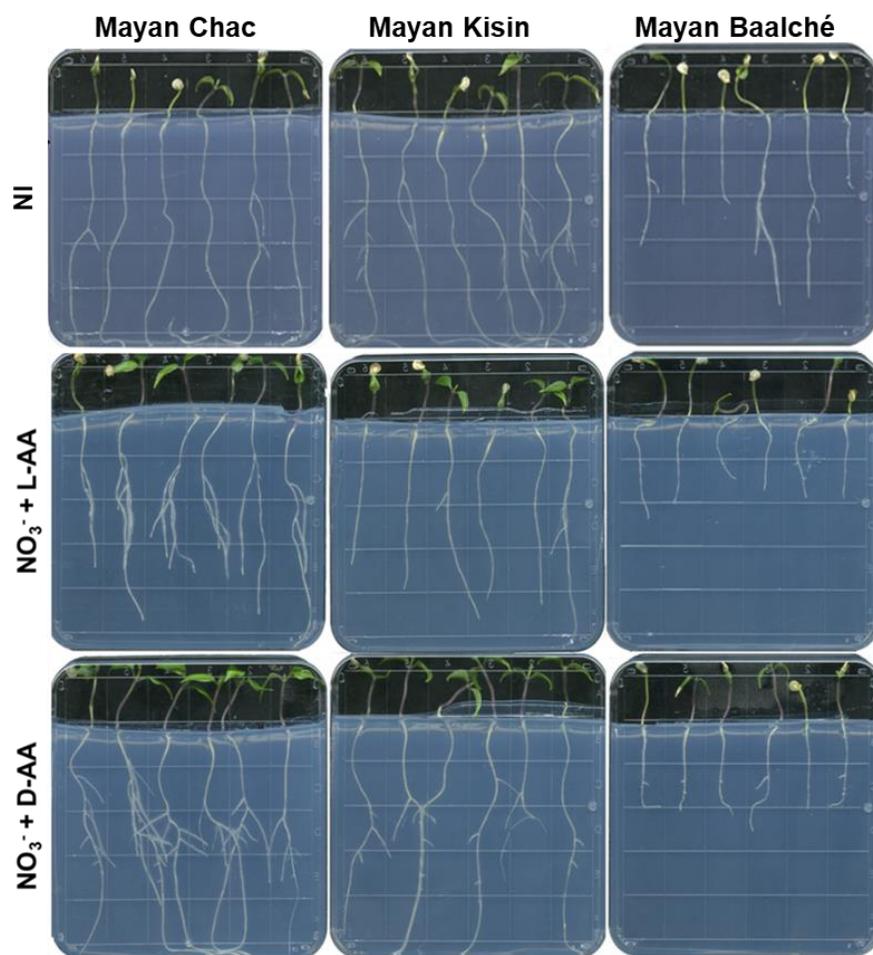


Figura 4.4 Efecto de la mezcla de D-AA sobre el crecimiento de las raíces de tres variedades de chile habanero. En la figura se observan las imágenes representativas del efecto de los tratamientos NI, NO₃⁻ + L-AA y NO₃⁻ + D-AA sobre las variedades Mayan Chac, Mayan Kisin y Mayan Baalché los

10 días de tratamiento.

4.3.2 Medición del flujo de Ca^{2+} en las raíces de chile habanero por la técnica MIFE

Las raíces de Mayan Chac expuestas a la mezcla de los L-AAs, presentaron un flujo de entrada de Ca^{2+} el cual alcanzó los máximos niveles ($2000 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 8 min (3 min después de la aplicación de los mismos). Posteriormente, los valores disminuyeron a aproximadamente $1000 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, manteniéndose a estos niveles hasta el final de la medición (Figura 4.5A). Al aplicar los D-AAs, el comportamiento fue muy similar; hubo un flujo de entrada de Ca^{2+} que fue máximo a los 8 min, y a partir de aproximadamente los 12 minutos, los niveles comenzaron a disminuir. Sin embargo, la magnitud del flujo fue mucho menor ($1.5 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 4.5B).

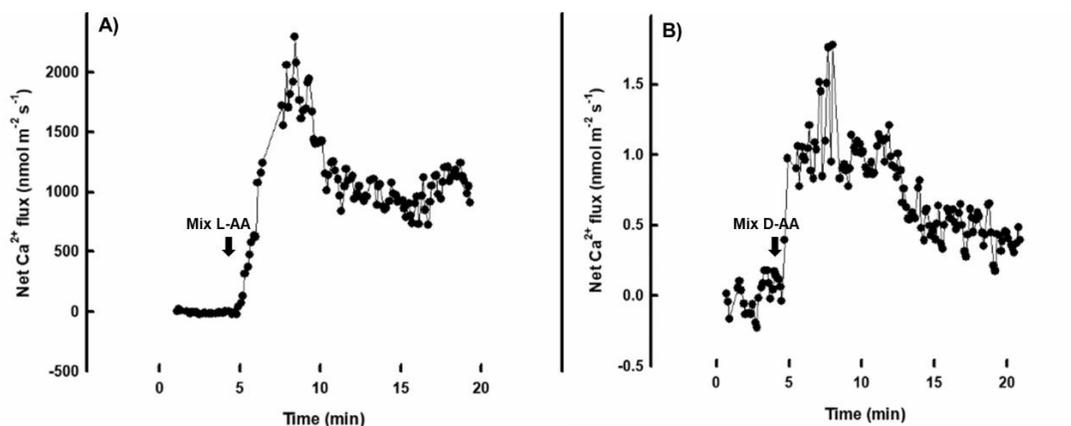


Figura 4.5 Flujo de entrada de iones de Ca^{2+} en las raíces tratadas con D- y L-AAs. En las imágenes se observa el flujo de entrada de los iones de Ca^{2+} medidos por la técnica MIFE, en las raíces de Mayan Chac a las cuales se les adicionó los tratamientos A) L-AA: 0.3 mM L-AA (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys) testigo, B) D-AA: 0.3 mM D-AA (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys). La flecha señala el tiempo en que se agregaron los compuestos. Se muestran los datos del promedio de cinco mediciones por tratamiento. Las escalas en el eje y varían de 0 a $2000 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (A) y de 0 a $1.5 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (B).

Para conocer el efecto individual de los AAs sobre los flujos de Ca^{2+} , cada uno fue adicionado por separado a la cámara de medición. Los AAs L-Val y L-Leu modificaron muy poco el flujo de entrada de este ión, pero cuando se adicionó L-Cys se produjo un flujo de entrada que fue 100 veces mayor en magnitud y este flujo se mantiene alrededor de 8 min

(Figura 4.6 A). Igualmente, el mayor flujo de entrada con los D-AAs fue inducido por la D-Cys, siendo menor en magnitud al observado con la L-Cys y en este caso fue de muy corta duración, ~2 seg. La D-Val también produjo un flujo de entrada de Ca^{2+} , el cual fue mayor al provocado por la L-Val; en cambio la D-Leu no afecta la entrada de Ca^{2+} (Figura 4.6 B). Hasta la fecha, el flujo de Ca^{2+} inducido por AAs no había sido estudiado en las raíces del género *Capsicum*. Estos resultados sugieren que estos compuestos podrían activar canales de Ca^{2+} y/o ser agonistas de GLR presentes en este órgano.

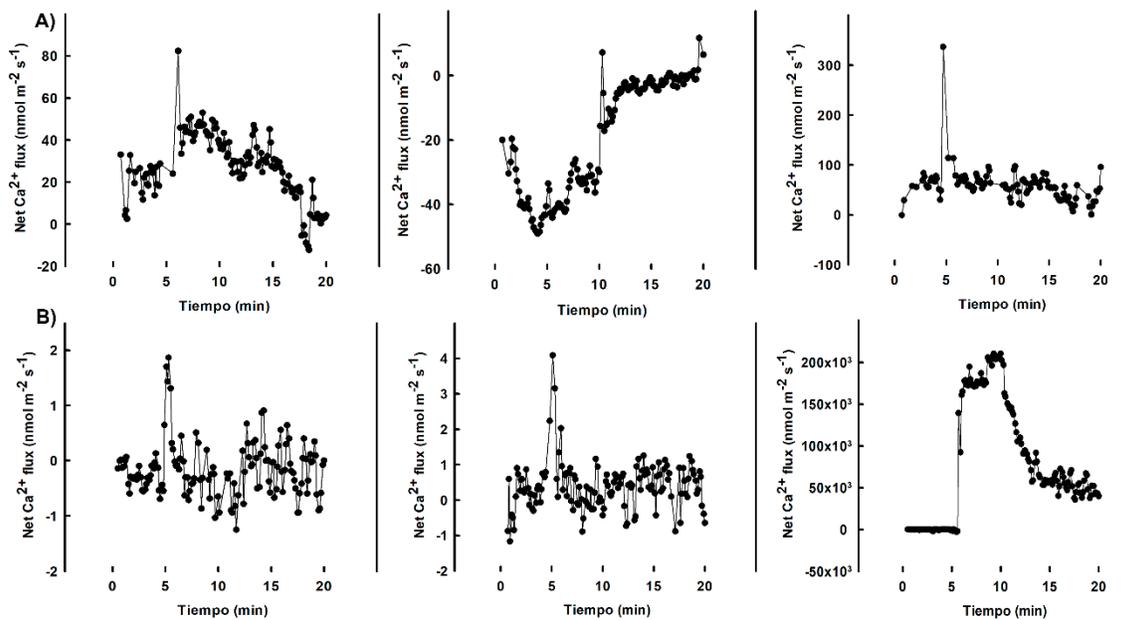


Figura 4.6 Flujo neto de entrada de iones de Ca^{2+} en las raíces tratadas con L y/o D- Val, Leu y Cys. En las imágenes se observa el flujo de entrada de los iones de Ca^{2+} medidos por la técnica MIFE en las raíces de Mayan Chac, a las cuales se agregó 0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys en forma L (A) o en forma D (B). La flecha señala el momento en que se agregaron los compuestos. El tiempo de medición fue hasta 20 min. Los ejes y de las graficas tiene unidades diferentes debido a la variación de los flujos entre aminoácidos.

Una característica de la activación de los GLR en plantas es el flujo de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Esta activación ocurre cuando se le une un agonista, que puede ser un aminoácido y, como consecuencia, se desencadenan cascadas de señalización que afectan diferentes procesos fisiológicos en las plantas. Con base en los resultados con L-Cys, se sugiere que pudiera actuar como un agonista de los GLR.

Anteriormente, a este aminoácido se le ha propuesto como un posible agonista de los receptores *AtGLR3.3* y *AtGLR3.4* de *Arabidopsis*, activándolos y desencadenando la entrada de Ca^{2+} a la célula (Li *et al.*, 2013; Stephen *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2006). Se ha sugerido que para el *AtGLR3.3*, el grupo tiol de este aminoácido es el que es reconocido por el receptor (Qi *et al.*, 2006).

4.3.3 Evaluación del flujo de Ca^{2+} en las raíces de chile habanero por medio de microscopía confocal

El contenido de Ca^{2+} intracelular fue observado mediante la fluorescencia del Calcium orange (flouoroloro sensible a calcio) en las variedades Mayan Chac y Mayan Kisin. En la Figura 4.7A se observa que las raíces testigos de la variedad Mayan Chac presentaron una alta fluorescencia del Calcium Orange, indicativo de la presencia de Ca^{2+} en las mismas. Sin embargo, al adicionar la mezcla de los L-AAs no se lograron observar cambios significativos en los niveles de fluorescencia que indicaran una mayor entrada de Ca^{2+} a la célula. Para el caso de los D-AAs, aun cuando al parecer hubo una ligera disminución en la señal, tampoco fue muy significativa (Figura 4.7A). Estos datos no concuerdan con los resultados obtenidos por MIFE. Estas discrepancias pueden ser debido al tiempo de incubación con el fluoróforo, entre otros factores. Con la técnica MIFE, se demostró que la incubación con la mezcla de L-AAs induce una entrada de Ca^{2+} en esta variedad, la cual ocurre inmediatamente después de estar en contacto con ellos; sin embargo, durante tiempos más prolongados, las células pueden reajustar sus niveles endógenos de este catión, de tal manera que no fue posible observar cambios significativos a través de microscopía confocal a la hora de exposición con estos compuestos.

La variedad Mayan Kisin presentó diferencias significativas con respecto a la Mayan Chac, dado que de forma general la fluorescencia fue muy baja en la primera (Figura 4.7B). Nuevamente, no se observaron cambios significativos por la presencia de los L-AAs, aunque los D-AAs provocaron una disminución en la señal de fluorescencia, indicando una concentración menor de Ca^{2+} en los tejidos (Figura 4.7B, especialmente en las imágenes sobrelapadas de campo claro y fluorescencia).

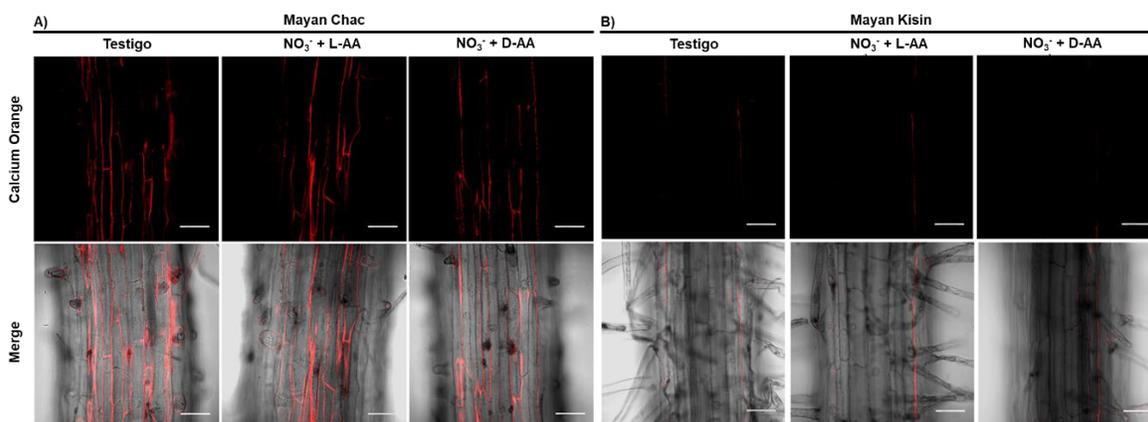


Figura 4.7 Efecto de los aminoácidos sobre los contenidos de calcio en las raíces de dos variedades de chile habanero. En las imágenes se observa la fluorescencia del fluoróforo Calcium Orange indicativa de la presencia de calcio en las raíces tratadas con más la mezcla $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$ y/o $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$, en las raíces de Mayan Chac (A) y Mayan Kisin (B). El testigo fueron raíces incubadas con la solución de tinción ($5 \mu\text{M}$ de amortiguador MES-Na (pH 6.0), 1 mM Calcium Orange) sin los AAs. En la parte superior se presentan las imágenes con el fluoróforo y en la parte inferior las imágenes sobrelapadas. Cada uno es una muestra representativa de $n=3$, la sección de la raíz observada es de aproximadamente 2 cm por encima del ápice, a $40 \times$. La barra blanca representa una escala de $100 \mu\text{m}$.

4.3.4 Efecto de los tratamientos con los aminoácidos sobre los niveles de transcritos de los receptores de glutamato en las variedades de chile habanero

Los GLRs están involucrados en varios procesos dentro del crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo uno de estos la formación y emergencia de RLs. En trabajos desarrollados previamente en el laboratorio se lograron identificar 12 secuencias en el genoma de chile habanero con una alta identidad con los GLR de *Arabidopsis* y tomate (García-Laines, 2019).

En este trabajo se observaron diferencias significativas en la presencia de transcritos de los GLR entre variedades y entre tratamientos (Figura 4.8). Para la variedad Mayan Chac, en raíz, se identificaron cuatro *CcGLR* en respuesta al tratamiento sin AAs (NI) y únicamente el *CcGLR3.1* con los tratamientos con L- y D-AAs, el cual no varía su expresión entre estos tratamientos (Figura 4.8A). En hojas, se identificaron cinco *CcGLR* con el testigo NI y dos

con los tratamientos con AAs. Para ambos tratamientos con AAs, hay una disminución en la expresión del *CcGLR3.1* y *CcGLR3.4* comparado con el testigo NI (Figura 4.8B).

De manera significativa, en la raíz de la variedad Mayan Kisin se identificaron los transcritos de *CcGLR1.1*, *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2* y *CcGLR3.4* y éstos variaron de acuerdo al tratamiento de AA. Para *CcGLR1.1*, únicamente se observaron niveles de transcritos en las raíces expuestas a los D-AAs y la expresión de este gen fue exclusiva en las raíces de esta variedad. Los niveles de transcritos de *CcGLR3.1* y *CcGLR3.2* fueron menores cuando las raíces estuvieron expuestas a los D-AAs, mientras lo contrario sucedió con *CcGLR3.4* (Figura 4.8A). En las hojas de esta variedad, tres fueron los genes expresados: *CcGLR3.1*, *CcGLR3.2* y *CcGLR3.4*. Para el *CcGLR3.1* y el *CcGLR3.2* no varió significativamente sus niveles de transcritos entre los tratamientos de acuerdo a los resultados con el control de carga, tubulina (Figura 4.8B). Sin embargo, el *CcGL3.4* tiene una mayor expresión en el tratamiento con los D-AAs en relación a los L-AA y NI (Figura 4.8B).

La variedad naranja Mayan Baalché presentó niveles de transcritos para dos genes que fueron exclusivos para esta variedad: *CcGLR3.3* y *CcGLR3.5*. Estos genes fueron expresados tanto en la raíz como en las hojas de esta especie (Figura 4.8). En la raíz de la misma también fueron identificados cinco genes *CcGLR*; donde la expresión de los genes *CcGLR3.1* y *CcGLR3.4* disminuye con los tratamientos con AAs; por otro lado, se observó mayor nivel de expresión para el *CcGLR3.2* en el tratamiento con L-AAs en comparación con el tratamiento con los D-AAs y el testigo NI (Figura 4.8A). También, el nivel de transcritos del *CcGLR3.5* fue exclusivo del tratamiento con L-AAs. En la parte aérea, se identificaron seis *CcGLR* en respuesta a los tratamientos; el *CcGLR3.2* no modificó su expresión en los tratamientos, por otro lado, los *CcGLR3.1* y *CcGLR3.4* disminuyeron su expresión bajo los tratamientos con L y D-AAs en comparación al tratamiento con NI. Por último, los *CcGLR3.3* y *CcGLR3.5* únicamente se identificaron en los tratamientos con L-AAs y NI (Figura 4.8B).

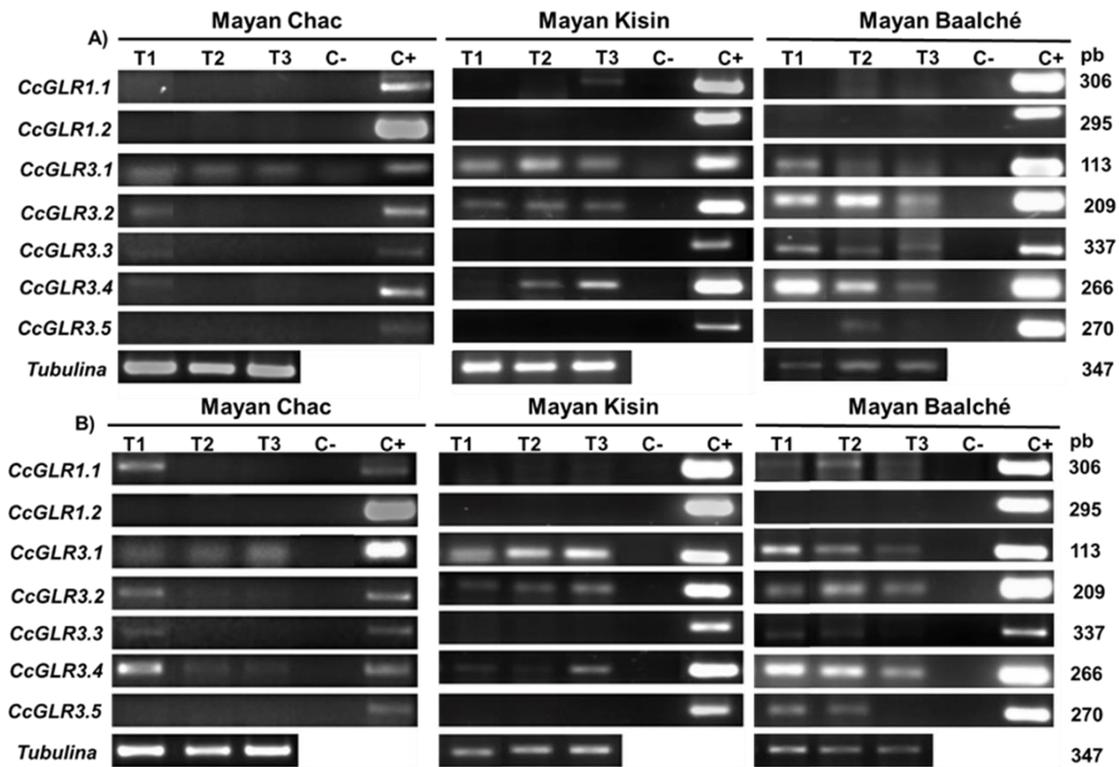


Figura 4.8 Niveles de transcritos de los *CcGLR* en tres variedades de chile habanero expuestas a los L-AAAs y D-AAAs. Se amplificaron los genes de la familia I y III de los *CcGLR* en tejidos de raíz (A) y hoja (B) de las variedades Mayan Chac, Mayan Kisin y Mayan Baalché expuestas por 10 días a las diferentes fuentes de N. T1: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM NH₄Cl, T2: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM L-AAAs (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys), T3: 1 mM KNO₃ + 0.3 mM D-AAAs (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys). Como control positivo se utilizaron las clonas plasmídicas de cada *CcGLR*, control negativo: -ADNc. Cada una de las PCR se realizó a 35 ciclos. Como control interno de las reacciones de PCR se utilizó el gen constitutivo de tubulina

Estos resultados son muy interesantes ya que demuestran que las raíces de las tres variedades de chile habanero podrían estar “equipadas” con una batería diferente de GLRs funcionales. Teniendo en cuenta que cada receptor funcional podría ser activado por agonistas distintos, los cuales serían determinados por el tipo de subunidad que se asocia para formar el receptor funcional, se podría mencionar que la versatilidad funcional de los mismos puede variar entre especies.

Se sugiere que la estructura del complejo receptor funcional esté formada por cuatro

subunidades independientes (Price *et al.*, 2013; Vincill *et al.*, 2013), pudiendo ser homo o heterotetrámero. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido aislar este 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.*, 2013) y métodos derivados del doble híbrido (Price *et al.*, 2013).

Además, se han estudiado 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.*, 2013). La interacción física entre AtGLR3.2 y 3.4 también ha sido demostrada (Vincill *et al.*, 2013). Se reportó la expresión de cinco a seis AtGLRs en una única célula de la hoja de *Arabidopsis*, siendo AtGLR3.7 expresado en todos los tipos celulares muestreados (Roy *et al.*, 2008); sin embargo, no se logró identificar un patrón de co-expresión o expresión específico del tipo de célula. La formación de homomultímero también fue demostrado para OsGLR3.1 de arroz (Li *et al.*, 2006).

En la raíz de la variedad Mayan Kisin resaltó el comportamiento de *CcGLR1.1* y *CcGLR3.4* frente a la mezcla de los D-AAAs, dado el aumento en los niveles de transcritos en respuesta a los mismos. Este comportamiento fue exclusivo para estos genes y para la raíz de esta variedad. Aunque estos genes han sido poco estudiados, existen resultados en *Arabidopsis* que demuestran que sus productos proteicos participan en eventos biológicos importantes.

En plantas transformadas de *Arabidopsis* que contenían una secuencia antisentido del *AtGLR1.1*, se observó un aumento en los niveles de Ca^{2+} , además de una baja germinación de semillas en presencia de sacarosa (fuente de carbono), cuyo fenotipo se recuperó cuando se incubaba con nitrato (fuente de N). Estas plantas presentaron elevados niveles de ABA, por lo que se sugiere que el *AtGLR1.1* está involucrado en la relación C/N y en la señalización por ABA (Kang y Turano, 2003). En cuanto al *GLR3.4* se sabe que está relacionado con las respuestas a estrés osmótico y por frío, que inducen la expresión del gen en células del mesófilo en *Arabidopsis*, la cual fue dependiente de Ca^{2+} (Meyerhoff *et al.*, 2005).

Sin embargo, los datos de microscopía confocal (Figura 4.7) usando la mezcla de los AAs contrastan con los resultados moleculares; esto es, la fluorescencia indicativa de un mayor flujo de Ca^{2+} fue mínima en la raíz de Mayan Kisin, comparada con la presentada por Mayan Chac, a pesar de que en la primera se observaron mayores niveles de transcritos en la raíz para varios GLRs. Una posible explicación es que la raíz de la variedad Mayan Kisin tratada con los D-AAs pueda responder mejor al L-Glu que aquella tratada con los L-AAs, ya que fue capaz de aumentar los niveles de transcritos de genes específicos, bajo esta condición. El L-Glu ha sido el agonista mejor estudiado hasta la fecha de los GLR.

Para verificar esta hipótesis, las raíces tratadas con la mezcla de los L- o D-AAs durante 10 días fueron incubadas durante 1 h con L-Glu, en presencia del fluoróforo sensible a Ca^{2+} Calcium Orange y observadas al microscopio confocal. Como se muestra en la Figura 4.9, las raíces expuestas al tratamiento con la mezcla de los D-AAs respondieron mejor a la presencia del L-Glu, observado a través de una mayor fluorescencia, que aquellas expuestas a los L-AAs. Estos resultados sugieren que el tratamiento con los D-AAs puede modificar el metabolismo nitrogenado en la raíz de esta variedad, de forma tal que induzca un aumento en los agonistas endógenos de los GLRs, induciendo éstos a nivel transcripcional y estimulando la actividad de los mismos. Estos eventos pueden estar relacionados con los cambios morfológicos observados en respuesta a esta mezcla de AAs en el sistema radical de esta variedad de chile habanero.

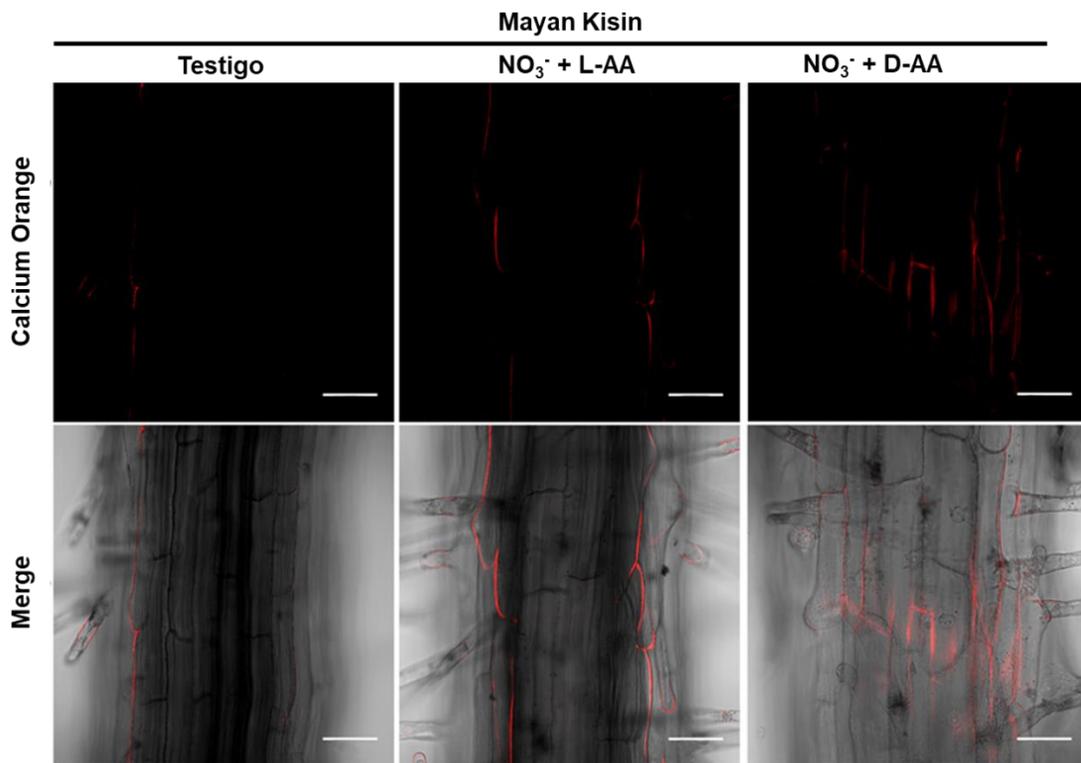


Figura 4.9 Variación del calcio intracelular en las raíces de Mayan Kisin con la adición de L-Glu. En las imágenes se observa la fluorescencia del Calcium Orange en las raíces tratadas con NO_3^- + L-AA y/o NO_3^- + D-AA durante 10 días, en la variedad Mayan Kisin. Las raíces de Mayan Kisin se incubaron por 1 h con 0.1 mM de L-Glu + Calcium Orange. En la parte superior se representa las imágenes con el flououroforo y en la parte inferior las imágenes sobrelapadas. Cada uno es una muestra representativa de $n=3$, la sección de la raíz observada es de aproximadamente 2 cm sobre el ápice a 40 x. La barra representa una escala de 100 μm .

En cuanto a los ligandos de los GLR existen múltiples posibilidades, teniendo en cuenta que en *Arabidopsis* hay 20 GLR y cada uno tiene dos sitios de unión. Los verdaderos agonistas aún no han sido elucidados, aunque se ha propuesto a L-Glu y Gly (Dubos *et al.*, 2003), L-Gln, L- Met, L-Thr, L-Phe, L-Leu, L-Tyr (Tapken *et al.*, 2013), glutationa (Li *et al.*, 2013) y D-Ser (Millard *et al.*, 2011), entre otros. De acuerdo a la conducción iónica, los GLR son considerados canales catiónicos no selectivos. Por ejemplo, la expresión de AtGLR3.7 indujo conductancia de la membrana plasmática permeable a Ba^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ en oocitos (Roy *et al.*, 2008), mientras que las de AtGLR1.1 y AtGLR1.4 fueron permeable a K^+ , Ca^{2+} y Na^+ (Tapken y Hollmann, 2008). La permeabilidad a Ca^{2+} también ha sido demostrada

para AtGLR3.3 y 3.4 (Vincill *et al.*, 2012; Stephens *et al.*, 2008). Todas estas características reflejan la complejidad de estas proteínas.

Por otro lado, existen evidencias de que el L-Glu puede modificar el crecimiento radical de *Arabidopsis*, actuando como una molécula señal. Este aminoácido inhibe el crecimiento de la RP, a través de una detención en la actividad mitótica en el meristemo, e induce una proliferación de las RLs (Walch-Liu *et al.*, 2006). Otro posible agonista de estos receptores, la Gly inhibió el crecimiento de la RP de chile habanero y estimuló la formación de PRs (Domínguez-May *et al.*, 2013). Se sabe que los AAs se pueden encontrar abundantemente en los alrededores de la materia orgánica en descomposición en el suelo y pueden ser percibidos por el ápice radical, actuando como moléculas señal que indican la presencia de parches ricos en nutrientes (Walch-Liu *et al.*, 2006).

4.3.5 Efecto de los D-AAs sobre los niveles de nitrato, aminoácidos totales y proteínas totales

Para explorar la posibilidad mencionada anteriormente, el contenido de algunos metabolitos nitrogenados fue evaluados en la raíz y las hojas de las plántulas de las tres variedades de chile habanero tratadas durante 10 días con la mezcla de los AAs. Los cambios más importantes de estos metabolitos en respuesta a los tratamientos con AAs, en las raíces se obtuvieron en las variedades de chile habanero de color rojo: Mayan Chac y Mayan Kisin, mientras que estos compuestos no se modificaron en la variedad Mayan Baalché (Figura 4.10 A-C). Para la variedad Mayan Chac, se obtuvo alto contenido de NO_3^- , aminoácidos totales y proteínas totales en las raíces de las plántulas expuestas a la mezcla de los D-AAs, comparadas con aquellas tratadas con los L-AAs y NI. Para la variedad Mayan Kisin, se obtuvo contenidos de aminoácidos y proteínas totales mayores con el tratamiento de los D-AAs en comparación al testigo con L-AAs y NI (Figura 4.10 B, C).

En las hojas, el efecto de los D-AAs sobre estos metabolitos fue dependiente de la variedad y del tipo de metabolito. En Mayan Chac, las plantas expuestas al tratamiento con los D-AAs presentaron altos contenidos de NO_3^- y proteínas totales en comparación a los tratamientos testigo con los L-AAs. En Mayan Kisin, el contenido de NO_3^- y proteínas totales fue menor con los D-AAs comparado con el testigo NI y los L-AAs; mientras que el contenido

de aminoácidos totales fue similar al testigo con NI. En Mayan Baalché el comportamiento fue similar al encontrado para Mayan Kisin, pero en este caso no afectó el contenido de proteínas totales en este órgano. Estos resultados demuestran que los D-AAs modifican el metabolismo nitrogenado de una manera dependiente de la variedad y del órgano y sugieren que estos cambios pudieran modificar, entre otras cosas, la presencia de GLRs funcionales específicos en estos tejidos.

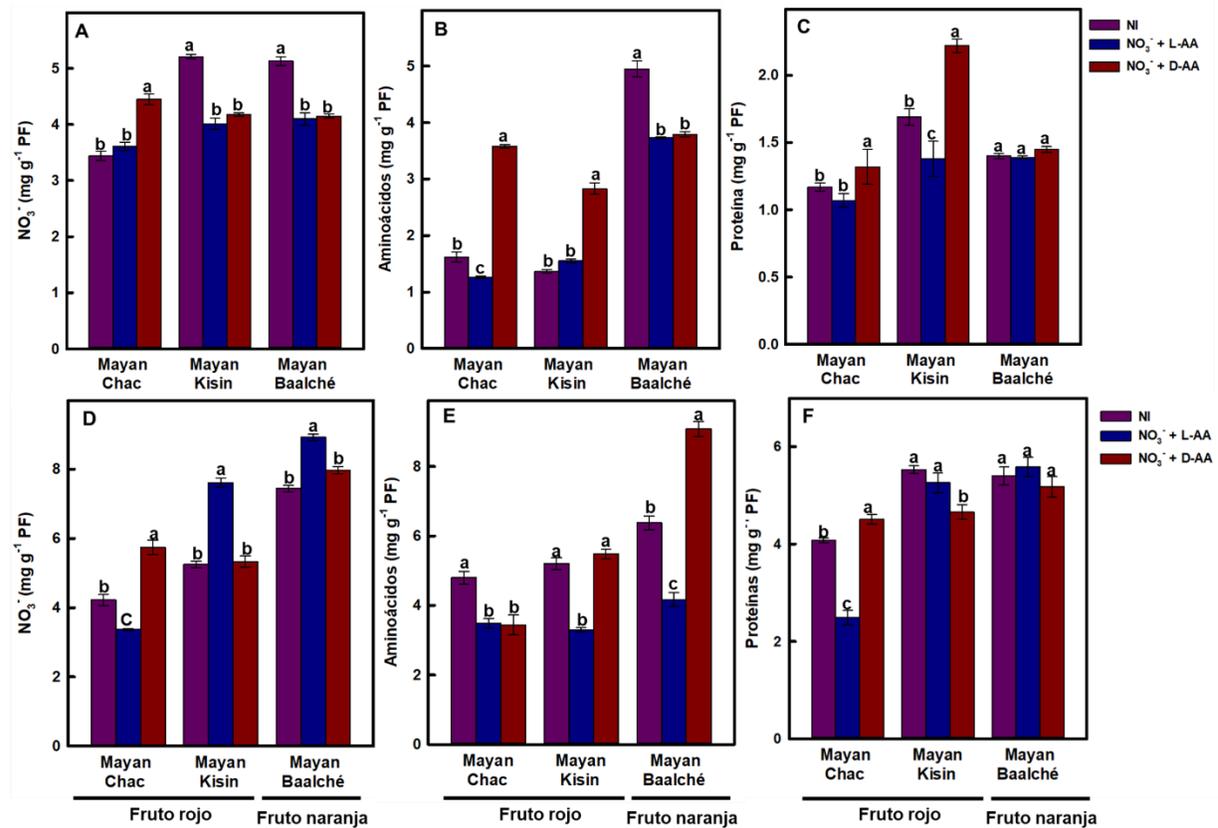


Figura 4.10 Efecto de la mezcla de L-AAs y D-AAs sobre los niveles de metabolitos nitrogenados en raíz y hoja de las diferentes variedades de chile habanero. En la parte superior de la figura se presentan los valores de NO_3^- (A), aminoácidos (B) y proteínas (C) correspondientes al tejido de raíz; en la parte inferior de la imagen se presentan los valores de los metabolitos nitrogenados en hoja de estas variedades (D-F). NI: 1 mM KNO_3 + 0.3 mM NH_4Cl , $\text{NO}_3^- + \text{L-AA}$: 1 mM KNO_3 + 0.3 mM L-AA (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys), $\text{NO}_3^- + \text{D-AA}$: 1 mM KNO_3 + 0.3 mM D-AA (0.1 mM Val, 0.1 mM Leu, 0.1 mM Cys). Los datos representan el valor promedio \pm ES (n=5). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de una misma variedad.

Varios aminoácidos se han clasificado como potenciales agonistas de los GLR, con o sin efecto (Weiland *et al.*, 2016). Algunos de ellos activan a receptores que están relacionados con el desarrollo de raíces como el OsGLR3.1 en *Oryza sativa*, que participa en el desarrollo radical como un regulador de la proliferación celular y muerte celular en el ápice de la raíz. Otros están relacionados en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* (Vincill *et al.*, 2013) y el gravitropismo como el AtGLR3.3 (Miller *et al.*, 2010). Por ejemplo, el AtGLR3.6 induce el acortamiento del meristemo radical disminuyendo la actividad mitótica (Singh *et al.*, 2016). Hasta el momento, el único reporte caracterizado de la participación de los D-AAs como agonista de los GLRs involucra a la D-Ser que, al unirse al receptor AtGLR1.2, desencadena flujos de Ca^{2+} que conducen al desarrollo del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011).

En cuanto a la presencia de ellos en raíces, Vincill *et al.* (2013) confirmaron la localización de las proteínas AtGLR3.2 y AtGLR3.4 en las raíces de *Arabidopsis*. La doble mutante *glr3.2* y *glr3.4* presentó una hiperproducción de primordios de RLs, el cual fue un fenotipo similar a cualquiera de las mutantes simples. El hecho que el fenotipo de la doble mutante no haya sido aditivo al de las mutantes simples, en conjunto con la fuerte similitud en los patrones de localización de estas proteínas en la raíz, sustentó la hipótesis que estas proteínas podrían funcionar en la raíz como un complejo heterotetramérico.

La participación de los GLRs en estos eventos se ha estudiado a través del uso de agonistas y antagonistas de los GLRs de mamíferos, cuyos efectos también han sido demostrados para los GLRs de plantas (Chen *et al.*, 2016; Sivaguru *et al.*, 2013; Manzoor *et al.*, 2013). Igualmente, se han hecho estudios relacionados con los cambios en los niveles de transcritos de los genes *GLRs* durante estos eventos (Singh *et al.* 2014; Manzoor *et al.*, 2013) y con el uso de mutantes de los mismos (Salvador-Recatalà, 2016; Teardo *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se ha aislado el complejo del receptor funcional a partir de alguna membrana vegetal, por lo que los verdaderos agonistas continúan siendo una incógnita.

Entre todos los resultados, cabe destacar el nivel de transcritos del *CcGLR1.1* inducido por los D-AA específicamente en raíz (Figura 4.8) y dados los resultados observados en la Figura 4.9, se podría sugerir que probablemente el receptor *CcGLR1.1* pudiera estar

participando en la regulación del crecimiento radical en chile habanero cuando se agregan los D-AAs, aunque estos no fueran sus agonistas. Además, para poder corroborar estos resultados, sería interesante evaluar el efecto de antagonistas de los receptores, con el objetivo de demostrar que los cambios en la concentración de Ca^{2+} se deben específicamente al flujo a través de estas proteínas, en lugar de otros canales catiónicos no selectivos.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

Efecto estimuladorio de los D-AAs Val, Leu y Cys sobre el crecimiento radical en chile habanero

A pesar de que las plantas pueden estar expuestas por diversas vías a los D-AAs, existen escasos trabajos describiendo su efecto sobre el crecimiento de éstas.

En el Capítulo II se demostró que el número de PRLs y de RLs es mayor en los tratamientos con la mezcla los D-AAs (Val, Leu y Cys) en comparación con el testigo con L-AAs, en una variedad de color naranja de chile habanero, la cual comercializa la empresa SEMINIS y se cultiva en diferentes regiones de México, así como internacionalmente. Los datos sugieren que ellos pudieran participar en el proceso de desarrollo de los PRLs y en la emergencia de las RLs. Estos efectos fueron visibles en las raíces desde las 48-72 h de exposición a estos compuestos (Capítulo II). El efecto de la mezcla de D-AAs sobre la formación de RLs también se comprobó en otra especie del género *Capsicum*, *Capsicum annuum* (Capítulo III) y en otras tres variedades de chile habanero, dos de frutos de color rojo y una naranja (Capítulo IV). Estas últimas variedades fueron inicialmente colectadas de diferentes lugares de la península de Yucatán. Sin embargo, el efecto que estos compuestos ejercieron sobre el crecimiento de las RLs fue dependiente de la variedad: para la naranja Seminis, el número y la longitud de las RLs es mayor con los tratamientos con D-AAs comparado con los L-AAs (Capítulo II); mientras que, para las dos variedades rojas de Yucatán, solamente es mayor el número de RLs, no así la longitud de estas (Capítulo IV). Estos resultados apuntan a que la función de los D-AAs sobre la regulación de eventos de desarrollo radical puede ser compleja y dependiente de las especies vegetales.

Estos efectos no habían sido previamente reportados para estos D-AAs en plantas. La D-Val y D-Leu están presente en los suelos (Vranova *et al.*, 2012; Pollock *et al.*, 1977), donde la D-Leu ha alcanzado hasta el 10% en forma D, con relación a su estereoisómero L (Amelung *et al.*, 2006). Ambos se han detectado también en tejidos vegetales, tanto en forma libre como conjugada (Brückner y Westhauser 2003; Robinson 1976), aunque a

diferencia de D-AAs como Asp, Glu, Gln, Asn, Ser y Ala que son detectados en la mayoría de las plantas, su presencia se encuentra más restringida a ciertas plantas (Brückner y Westhauser 2003). Interesantemente, la D-Val y la D-Leu pueden ser producidos y secretados en cantidades milimolares durante la fase estacionaria de bacterias que viven en el suelo, como *Bacillus subtilis* (Kolodking-Gal *et al.*, 2010) y otras (Mutaguchi *et al.*, 2013; Lam *et al.*, 2009). Sin embargo, la D-Cys es un D-AA muy poco abundante en el suelo (Vranova *et al.*, 2012), aunque se puede encontrar formando parte de los peptidoglucanos de la pared celular de varias especies de bacteria (Ceparros *et al.*, 1992).

La toma de todos los D-AAs a través de las raíces ha sido demostrada en diferentes especies (Gördes *et al.*, 2013; Forsum *et al.*, 2008; Aldag y Young 1970), pero la tasa en la que son absorbidos puede variar. Por ejemplo, la D-Ala y la D-Ser fueron los aminoácidos absorbidos a las tasas más altas por las raíces de *Arabidopsis*, mientras que la D-Val y la D-Ile lo fueron a tasas menores (Forsum *et al.*, 2008). Sin embargo, Gördes *et al.* (2013) reportaron la detección en los tejidos de esta especie de cantidades similares de los 18 D-AAs que habían sido aplicados exógenamente a diferentes ecotipos de *Arabidopsis*, descartando un defecto en la toma para su actividad biológica. El estudio de este proceso y de la familia de proteínas transportadoras (Kolukisaoglu *et al.*, 2017; Gördes *et al.*, 2011, Lehmann *et al.*, 2011; Forsum *et al.*, 2008; Svennerstam *et al.*, 2007; Hirner *et al.*, 2006) implicadas en el mismo, no ha sido abordado hasta el momento en chile habanero.

Asumiendo que todos los D-AAs son absorbidos por las raíces de chile habanero, como ha sido confirmado en diferentes especies vegetales, y dado que los experimentos fueron conducidos a muy baja concentración de los D-AAs y en presencia de concentraciones milimolares de nitrato, se sugiere que los efectos no pueden ser atribuidos al uso de estos D-AAs como fuentes de N y C por las plantas de chile. Esto también se confirma por los resultados obtenidos con la mezcla con los L isómeros. En cambio, se apuesta a que estos D-AAs *per se*, o productos de su metabolismo, pueden provocar directamente esta respuesta, actuando sobre eventos de señalización y/o cambios en el metabolismo endógeno que podrían ser los que desencadenen la respuesta estimuladora de esta mezcla sobre el desarrollo radical en chile habanero.

Existe un marcado desconocimiento del metabolismo de estos compuestos en plantas,

comparado con otros organismos. Se sabe que la D-Val y la D-Leu pueden sufrir malonilación (Robinson 1976) y que esta modificación precede a su compartimentalización en la vacuola, lo cual pudiera constituir un mecanismo de detoxificación (Gamburg y Recoslavavskaya 1991) en aquellos organismos donde estos AAs sean nocivos, lo cual no es el caso en chile habanero.

Hasta la fecha, no se han caracterizado racemasas para convertir a los mismos a sus respectivos isómeros L, aunque la racemización de la D-Leu parece ocurrir en diferentes ecotipos de *Arabidopsis* después de aplicarse exógenamente (Gördes *et al.*, 2013). Las racemasas únicamente se han reportado para los D-AAs Ala (Ono *et al.*, 2006), Ser (Gogami *et al.*, 2009; Fujitani *et al.*, 2007), Ile (Strauch *et al.*, 2015) y Trp (Rekoslovskaya *et al.*, 1999; Miura y Mills 1971). Para el caso de la Ile racemasa se reportó que también despliega una actividad relativa del 1 al 5% (con respecto a la que posee con Ile) hacia Leu y Val, respectivamente (Strauch *et al.*, 2015). Sin embargo, los productos de la racemización de estos AAs no parecen ser los causantes de los efectos biológicos observados, como lo demuestran los resultados con los L isómeros en este trabajo.

También, se ha reportado la acumulación de D-Ala y D-Glu después de la aplicación exógena de estos D-AAs (Gordes *et al.*, 2011), donde se sugiere la participación primaria de una D-AA aminotransferasa y una posterior racemización putativa, resultado de una L-AA aminotransferasa (Gordes *et al.*, 2013). Sin embargo, nuevamente, los productos de esta vía no parecen ser responsables del efecto, ya que la D-Ala inhibió drásticamente el crecimiento radical en chile habanero (Serralta-Interian *et al.*, sometido). Igualmente, la D-Val fue convertida a CO₂ y al correspondiente cetoácido al ser administrada en maíz y girasol (Aldag *et al.*, 1970; Aldag y Young 1970), lo cual fue indicativo de la actividad de una D-AA oxidasa. El metabolismo de estos D-AAs en las raíces de chile habanero debe ser abordado en estudios posteriores.

Se han reportado muy pocos trabajos en donde se haya demostrado un papel estimulador en plantas para estos D-AAs, siendo nulo el conocimiento para el caso de la D-Cys. D-Val (1 mM), D-Lys y D-Ile (5 mM) parecen promover el crecimiento de *Arabidopsis* (Gördes *et al.*, 2011; Erickson *et al.*, 2004). Conjugados de D-Glu, D-Val, D-Leu y D-Met con el 2,4-D estimularon la elongación del coleoptilo de avena y los de D-Glu, D-Val, D-Leu y D-Asp

estimularon el crecimiento de callos de raíces de soya, a 10 μM (Davidonis *et al.*, 1982).

Participación de las auxinas en la respuesta radical a la mezcla de D-Val, D-Leu y D-Cys en chile habanero

En este trabajo, se demostró que al aplicar el anti-auxina PCIB, en conjunto con los D-AAs, se inhibió el número de RLs obtenidos anteriormente con la mezcla de los D-AAs (Figura 3.3). Sin embargo, el crecimiento de la RP en presencia de los tratamientos con los D-AAs, no fue afectada con las diferentes dosis de PCIB (Figura 3.1).

Una relación entre los D-AAs y las auxinas no ha sido reportada hasta el momento. En general, un efecto directo de los D-AAs sobre los niveles de fitohormonas que regulan el crecimiento radical, no ha sido reportado. Únicamente se sabe que la D-Leu y D-Val incrementaron la producción de etileno en semillas de *Xanthium*, para romper la dormancia y potenciar la germinación en esta especie (Satoh y Esashi 1980).

En *Nicotiana tabacum* cv Xanthai, L-AAs como Ala, Asp, Asn, Glu, Gly, Lys y Val, a una concentración de 0.05 μM , resultaron tóxicos para la planta; sin embargo, el efecto fue mitigado cuando se les adicionó ácido naftalenacético; sugiriendo que existe una conjugación de estos aminoácidos con la auxina y, por lo tanto, una mejora en el crecimiento (Marion-Poll y Caboche, 1984). Sin embargo, la conjugación de las auxinas con los D-AAs aún no ha sido reportada.

Igualmente, los D-AAs provocaron un aumento significativo, en comparación con el tratamiento con los L-AAs, en los niveles de transcritos de los genes *LBD16* y *LBD18*, ambos inducidos en respuesta a auxina y claves en los eventos de iniciación de la formación de RLs en *Arabidopsis* (Figura 3.12). Este efecto estimulador sobre los genes también fue inhibido, específicamente para el *LBD18*, en presencia de la anti-auxina (Figura 3.12). Sugiriendo la participación de las auxinas en la respuesta a los D-AAs.

La proteína LBD16 regula etapas tempranas del desarrollo de las RLs y está involucrada en la iniciación de la migración nuclear y las divisiones asimétricas de las células fundadoras de las RLs, mientras que LBD18 está involucrada tanto en la iniciación como en la emergencia de las RLs, así como en la regulación de genes río abajo que ayudan a la

emergencia de las mismas (Lee *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2009).

Además, está establecido que el desarrollo de las RLs ocurre en determinadas zonas de la RP (De Smet, 2012; Dubrovsky *et al.*, 2011), donde el marcaje de los PRLs tiene lugar en el meristemo apical de la raíz, mientras que su emergencia se lleva a cabo en la zona de diferenciación (Péret *et al.*, 2009). Por otro lado, el efecto de las auxinas puede variar dependiendo del tipo de célula por lo que el PCIB puede afectar el crecimiento dependiendo del tipo celular; resultando en un crecimiento celular anormal que al final provoca una inhibición en el crecimiento de la raíz (Oono *et al.*, 2013). Por lo que, los D-AA pudieran ser señales que interactúan con las auxinas para promover la formación de las RLs; al igual que se ha reportado su papel como señalizadores del crecimiento en el tubo polínico o bajo condiciones de estrés (Weiland *et al.*, 2016).

Participación de los GLRs en la respuesta radical a la mezcla de D-Val, D-Leu y D-Cys. Relación con los metabolitos nitrogenados en chile habanero

En este trabajo, se observó que la mezcla de los L-AAs fue capaz de inducir un flujo de Ca^{2+} en las raíces de la variedad Mayan Chac, siendo la L-Cys el aminoácido más activo en esta respuesta. Sin embargo, el flujo que se observó en presencia de la mezcla de los D-AAs fue menor comparado con el de los L enantiómeros. Cuando se midió el flujo de Ca^{2+} con la aplicación de los AAs de forma individual, se obtuvo que la D-Val provoca un flujo mayor al de L-Val. Estos resultados parecen indicar que la activación de un GLR por la mezcla de estos D-AAs en la raíz de chile no sería el evento primario que desencadenaría el efecto de estos compuestos. Esta sugerencia también parece ser confirmada por los datos de microscopía confocal usando a un fluoróforo sensible a Ca^{2+} .

Sin embargo, los análisis moleculares en raíces de la variedad Mayan Kisin indicaron que con el tratamiento de los D-AAs se observó mayores niveles de expresión de dos GLR, el *CcGLR1.1* y el *CcGLR3.4*, mientras que para el *CcGLR3.1* fue menor en comparación con el testigo con los L-AAs (Capítulo IV). Estos datos indican que esta variedad pudiera presentar receptores funcionales específicos en las raíces tratadas con los D-AAs, los cuales pueden diferir de aquellos presentes cuando la raíz es tratada con la mezcla testigo de los L-AAs. Además, estas raíces tratadas con los D-AAs fueron capaces de presentar

un mayor flujo de Ca^{2+} , comparada con las tratadas con los L-AAAs, cuando se les aplicó un posible agonista de los GLR, el L-Glu. Los homólogos a estos genes en *Arabidopsis*, el *AtGLR1.1* y el *AtGLR3.4* están involucrados en la relación C/N y en la señalización por ABA (Kang y Turano, 2003) y en las respuestas al estrés abiótico (Meyerhoff *et al.*, 2005), respectivamente.

En este trabajo, se demostró que la mezcla de D-Val, D-Leu y D-Cys incrementó significativamente los niveles endógenos de los aminoácidos totales y proteínas en la raíz de esta variedad, mientras que aumentó además los de NO_3^- en la Mayan Chac. Este resultado sugiere que, a través de una regulación en el metabolismo celular, particularmente el nitrogenado, los D-AAAs Val, Leu y Cys parecen estimular el crecimiento de chile habanero. Esta afirmación se sustenta por la función como molécula señal que se ha reportado para estos metabolitos nitrogenados, además de su papel en la nutrición y el metabolismo del N y C. El nitrato regula la formación y elongación de RLs en plantas (Zhan *et al.*, 1999; Zhan y Forde 1998,), incluyendo a chile habanero (Celis-Arámburo *et al.*, 2011), y la expansión foliar (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008). Su mecanismo de acción involucra la interacción con su receptor (Ho *et al.*, 2009; Remans *et al.*, 2006) y/o la regulación de los niveles de hormonas importantes en estos eventos, como la auxina (Tian *et al.*, 2008, Walch-Liu *et al.*, 2006) y citocininas (Kiba *et al.*, 2011; Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Samuelson y Larsson 1993; Wagner y Beck 1993). También, se ha sugerido que algunos L-AAAs pueden actuar como moléculas señales para regular el crecimiento radical (Domínguez-May *et al.*, 2013; Walch-Liu *et al.*, 2006.).

Varios AAAs han sido considerados agonistas de los GLR (Weiland *et al.*, 2016), por ejemplo, la L-Met activa a los receptores GLR3.1/3.5 regulando la apertura de estomas, así como a la NADPH oxidasa (Kong *et al.*, 2016). La L-Cys pudiera ser otro potencial agonista de *AtGLR3.3* y *AtGLR3.4* que media el flujo de Ca^{2+} en las raíces (Qi *et al.*, 2006), mientras que la Leu puede ser un agonista del *AtGLR1.4* (Tapken *et al.*, 2013). Justo en la raíz, se encuentran varios GLRs que regulan eventos de crecimiento importantes en este órgano, y cuyos agonistas aún se desconocen. Por ejemplo, GLR3.3 y GLR3.4 están asociados con la iniciación de los PRLs (Vincill *et al.*, 2013), GLR3.4 es sensible al contacto (Mayerhoff *et al.*, 2005), mientras que GLR3.3 está involucrado en la respuesta gravitropica (Miller *et al.*, 2010) y ambos en la señalización de defensa del patógeno y respuesta de resistencia

(Manzoor *et al.*, 2013).

Además, la presencia de racemasas expresadas específicamente en células desarrollándose en los ápices de la RP y RLs (Sugimoto *et al.*, 2009) sugiere una regulación controlada de los niveles endógenos de estos D-AAs en la raíz. Esto podría ser un mecanismo similar a lo que ocurre para la D-Ser en el pistilo y el ovario, donde este D-AA se une al receptor para desencadenar el crecimiento del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011).

El mecanismo por el cual los D-AAs Val, Leu y Cys inducen estos cambios a nivel metabólico y en consecuencia afectan el crecimiento, deben ser abordados en estudios posteriores. Los GLR, a su vez, pueden regular el metabolismo del C/N en las plantas, regulando la expresión de enzimas claves de este proceso. Plantas de *Arabidopsis* expresando un antisentido para *AtGLR1.1*, presentaron una disminución en los niveles de la isoforma citosólica de glutamina sintetasa (GS1) y del aspartato aminotransferasa (AAT2) de un 90 y 93% menor, comparada con las plantas testigo (Kang y Turano 2003). Igualmente, los autores sugieren que *AtGLR1.1* podría estar asociado o mediar la regulación con el receptor de nitrato y que el propio nitrato podría tener un efecto estimulador sobre este receptor (Kang y Turano 2003).

Por otro lado, la interacción directa de los D-AAs con enzimas, es un evento que no puede ser descartado. Se ha reportado que estos compuestos pueden regular directamente la actividad de enzimas importantes en la raíz, incluso aquellas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno. Los D-AAs Ala, Asp y Phe estimularon los niveles de transcritos (Gholizadeh 2015a) y la actividad (Gholizadeh 2015b) de una cisteína proteasa en raíces de *Arabidopsis*. Los autores predijeron que el efecto estimulador en la actividad era producido por la interacción directa de los mismos con la proteasa (Gholizadeh 2015).

Impacto ecológico

Las condiciones de crecimiento del chile habanero en la península de Yucatán favorecen la presencia de los D-AAs en los suelos, donde se ha reportado que los pH alcalinos favorecen la racemización de los L-AAs (Ju *et al.*, 2009; Wolosker *et al.*, 1999) y la dominancia de bacterias sobre hongos (Rousk *et al.*, 2010). Igualmente, la racemización puede aumentar en suelos salinos o sódicos (de Miranda *et al.*, 2002), siendo la salinidad

un problema real en los suelos de la península (Delgado *et al.*, 2010).

Los D-AAs comienzan a ser considerados como un “lenguaje químico” para mediar la comunicación entre especies (Aliashkevich *et al.*, 2018; Cava *et al.*, 2011). Esta función adquiere una relevancia extraordinaria en un ambiente rico y heterogéneo en organismos, como la rizosfera. En las plantas pueden ocurrir múltiples comportamientos en respuesta a los D-AAs, dependiendo de la especie vegetal, la microbiota que está asociada a ella y la diversidad de D-AAs producidos por las actividades racemasas y/o otras enzimas involucradas en el metabolismo de los mismos, ya sea de esta microbiota o de la especie de planta.

La D-Val y la D-Leu se consideran D-AAs no canónicos, ya que generalmente no forman parte de los peptidoglicanos de la pared celular de todas las bacterias, pero que recientemente se ha descubierto que son acumulados y liberados en grandes cantidades y en forma libre al medio, durante la fase estacionaria de bacterias pertenecientes a diferentes phyla (Mutaguchi *et al.*, 2013; Horcajo *et al.*, 2012; Cava *et al.*, 2011; Kolodking-Gal *et al.*, 2010; Lam *et al.*, 2009). Por lo tanto, estos D-AAs podrían ser abundantes en determinados tipos de suelo, donde estas bacterias se encuentren enriquecidas.

Resulta interesante señalar que el chile habanero var. Jaguar crece mejor en los suelos de color rojos que en los negros, ambos de la Península de Yucatán, particularmente cuando son irrigados con agua con alta conductividad eléctrica (Medina-Lara *et al.*, 2019). Los suelos rojos presentan una diversidad bacteriana dos veces mayor que la de los suelos negros, y están dominadas fuertemente por Acidobacteria (83%) (Estrada-Medina *et al.*, 2016). Se ha sugerido que este grupo de bacterias tiene un rol ecológico importante y una significativa versatilidad metabólica (Ward *et al.*, 2009). Una contribución importante de la presencia de D-Val, D-Leu y D-Cys es el hecho de que parecen inducir en chile habanero un uso eficiente de nitrógeno, al presentar mayor cantidad de metabolitos nitrogenados y mayor crecimiento, cuando son expuestas a una misma dosis de N.

Los resultados obtenidos en este trabajo para la mezcla de estos D-AAs sobre la raíz de chile habanero son reportados por primera vez en planta y brindan un acercamiento del mecanismo de regulación de éstos sobre el crecimiento vegetal, el cual debe ser

considerado como un punto clave para profundizar en investigaciones futuras.

Estos resultados indicaron que el impacto de los D-AAs sobre el desarrollo radical en chile habanero es un proceso complejo, que depende de la variedad y del proceso fisiológico (Ej. crecimiento de RP, formación de RLs, elongación de RLs), entre otros factores. Es probable que en los múltiples comportamientos de estas plantas en respuesta a los D-AAs también participen aquellas enzimas racemasas y/u otras enzimas involucradas en el metabolismo de estos compuestos, ya sea de las provenientes de las diferentes variedades o de la microbiota asociada a ellas.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES GENERALES

- Se logró determinar un fenotipo para chile habanero característico de la mezcla de D-AAs Val, Leu y Cys, los cuales provocaron mayor número de RLs en las variedades de chile habanero, Mayan Chac, Mayan Kisin, Mayan Baalché y en *Capsicum annuum* CM334.
- Los cambios morfológicos en las raíces provocados por los D-AA pudieran ser mediados por auxinas, puesto que, al bloquear la percepción de la misma con el PCIB, también se bloquea su efecto sobre las RLs.
- Se identificaron secuencias putativas de los genes *LBD16* y *LBD18* en chile habanero, que también se inducen en respuesta a auxina.
- Se observó un patrón diferencial en el nivel de transcritos de los GLR de la familia I y III para los tejidos de hoja y raíz tratadas con L-AA y D-AAs (mezcla de Val, Leu y Cys).
- Los productos proteicos de *CcGLR1.1* y *CcGLR3.4* podrían participar en la respuesta a la mezcla de los D-AA en la variedad Mayan Kisin.
- Se establecieron dos metodologías para la medición de iones de Ca^{2+} en las raíces de chile habanero: MIFE y por microscopía confocal utilizando el fluoróforo Calcium Orange.
- La mezcla de los D-AA modificaron el metabolismo nitrogenado de las plántulas de chile habanero, siendo este dependiente de la variedad. Estos cambios en los metabolitos nitrogenados pueden ser importantes para desencadenar el efecto de los D-AAs.

PERSPECTIVAS

En cuanto a la participación de auxinas en la respuesta a los D-AAs se sugiere estudiar la participación de otros genes *LBD* reportados recientemente que están involucrados en diferentes etapas de desarrollo y emergencia de las RLs, como *LBD29* y *LBD33*, así como realizar un análisis por zonas de la raíz para poder identificar en qué zona puede haber un mayor nivel de transcritos. De igual manera, estudiar la respuesta de otras hormonas como ABA o citocininas, que también están implicadas en la formación de las RLs y la utilización de inhibidores del transporte de auxinas para poder determinar si la mezcla de los D-AAs modifica el transporte y otras anti-auxinas, como TFIBA, que inhiben aún más que el PCIB, aportarían información relevante.

Se debe profundizar en el estudio, tanto molecular como bioquímico, del efecto de los D-AAs en el metabolismo del nitrógeno; por ejemplo, sobre la nitrato reductasa o transportadores de nitrato, con la finalidad de conocer si la mezcla de los D-AAs está involucrada en estos procesos.

En cuanto a los GLR, se propone la utilización de antagonistas y agonistas de estos receptores para poder definir qué tipo de receptor podría participar en la respuesta a los aminoácidos, así como para verificar si alguno de ellos puede ser un agonista putativo. Otro aspecto importante sería estudiar la activación de los GLR por medio de la variación de Ca^{2+} con otros fluoróforos o la utilización de otras técnicas electrofisiológicas (patch clamp) para la medición del flujo de iones de Ca^{2+} , junto con la aplicación de agonista y antagonistas de los receptores, así como de bloqueadores de canales de Ca^{2+} durante este estudio.

En cuanto al nivel de transcritos de los GLR, se sugiere realizar el análisis de los cambios en los miembros de la familia II.

Por otro lado, valdría la pena analizar si las enzimas del metabolismo de los D-AA están presentes en chile habanero a nivel genético y medir la actividad de éstas con la mezcla.

Por último, es importante llevar a cabo experimentos de tipo curso-temporal, para poder establecer los eventos primarios y/o secundarios dentro de la respuesta radical a los D-

AAs.

BIBLIOGRAFÍA

- Aldag, R.W. y J.L. Young (1970). D-amino acids in soils. I. Uptake and metabolism by seedling maize and ryegrass. *Agron J*, 62, 184–189.
- Aliashkevich, A., L. Alvarez y F. Cava (2018). New Insights into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. *Front Microbiol*, 9, 683.
- Alvarez, L., A. Aliashkevich, M.A. de Pedro y F. Cava (2018). Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity. *ISME J*, 12, 438–450.
- Amelung, W. y X. Zhang (2001). Determination of amino acid enantiomers in soils. *Soil Biol Biochem*, 33, 553-562.
- Andrews, M., J.A. Raven y P.J. Lea (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Ann Appl Biol*, 163, 174–199.
- Amelung, W., X. Zhang y K.W. Flach (2006). Amino acids in grassland soils: climatic effect on concentrations and chirality. *Geoderma*, 130, 207–217.
- Anclair, J.L. y R. Patton (1950). On the occurrence of D-Alanine in the haemolymph of the milkweed bug, *oncopeltus fasciatus*. *Rev Can Biol*, 9, 3–8.
- Aouini, A., C. Matsukura, H. Ezura y E. Asamizu (2012). Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*, 493, 36–43.
- Araya, T., T. Kubo, N. von Wirén y H. Takahashi (2016). Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol*, 58, 254-265.
- Arias, C.A., M. Martín-Martínez, T.L. Blundell, M. Arthur, P. Courvalin, P.E. Reynolds (1999). Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol*, 31, 1653-1664.
- Ayalon, G. y Y. Stern-Bach (2001). Functional assembly of AMPA and kainite receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron*, 31, 103–113.

-
- Ayalon, G., E. Segev, S. Elgavish y Y. Stern-Bach (2005). Two regions in the *N*-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J Biol Chem*, 280, 15053–15060.
- Bada, J.L. (1982). Racemization of amino acids in nature. *Interdiscipl Sci Rev*, 7, 30-46.
- Banda, J., K. Bellande, D. von Wangenheim, T. Goh, S. Guyomarc'h, L. Laplaze y M.J. Bennett (2019). Lateral root formation in Arabidopsis: A well-ordered LRexit. *Trends Plant Sci*, 9, 826-839.
- Bellais, S., M. Arthur, L. Dubost, J.E. Hugonnet, L. Gutmann, J. van Heijenoort, R. Legrand, J.P. Brouard, L. Rice y J.L. Mainardi (2006). Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*, 281, 11586–11594.
- Benková, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591-602.
- Berckmans, B., V. Vassileva, S. Schmid, S. Maes, B. Parizot, S. Naramoto, Z. Magyar, C. Kamei, C. Koncz, L. Bögre, G. Persiau, G. Jaeger, J. Friml, R. Simon, T. Beeckman y L. Veylder (2011). Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell*, 23, 3671-3683.
- Bertin, CC, LA Weston, T. Huang, G. Jander, T. Owens, J. Meinwald y FC. Schroeder (2007). Grass roots chemistry: *meta*-tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *PNAS*, 104, 16964-16969.
- Bhabhor, J., K. Bardhan, D. Patel, A. Narwade y HN Chatrola (2018). The Selective Vulnerability of Rice Root System Architecture to Organic and Inorganic Nitrogen. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 7, 1247-1265.
- Bigge, C.F. (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol*, 3, 441–447.

- Bollard, E.G. (1966). A comparative study of the ability of organic nitrogenous compounds to serve as sole sources of nitrogen for growth of plants. *Plant Soil*, 25,153–166.
- Boniface, A. A. Bouhss, D. Mengin-Lecreux y D. Blanot (2006). The MurE synthetase from *Thermotoga maritima* is endowed with an unusual D-lysine adding activity. *J Biol Chem*, 281,15680–15686.
- Borges-Gómez, L., C.L. Cervantes, N.J. Ruiz, F.S. Soria, R.O. Viecente y C.E. Villanueva (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Lationoamericana*, 28, 35–41.
- Boukcim, H., L. Pages y D. Mousain (2006). Local NO_3^- or NH_4^+ supply modifies the root system architecture of *Cedrus atlantica* seedlings grown in a split-root device. *J PlantPhysiol*, 163, 1293-1304.
- Brackin ,R., T. Näsholm, N. Robinson, S. Guillou, K. Vinall, P. Lakshmanan, S. Schmidt y E. Inselsbacher (2015). Nitrogen fluxes at the root-soil interface show amismatch of nitrogen fertilizer supply and sugarcane root uptake capacity. *Sci Rep*, 5, 15727.
- Bremner, J.M. (1950). The amino acid composition of the protein material in soil. *Biochem J*, 47, 538–542.
- Brenner, ED, R. Stahlberg, S. Mancuso, J. Vivanco, F. Baluska y E. Volkenburgh (2006). Plant neurology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Sci*, 11, 413-419.
- Brodowski, S., W. Amelung, I. Lobe y C.C. Du Preez (2004). Losses and biochemical cycling of soil organic nitrogen with prolonged arable cropping in the South African Highveld-evidence from D- and L-amino acids. *Biogeochemistry*, 71, 17-42.
- Brückner, H. y M. Hausch (1989). Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods. *Chromatographia*, 28, 487-492.

-
- Brückner, H. y A. Schieber (2000). Determination of free D-amino acids in mammalia by chiral gas chromatography – mass spectrometry. *J High Resol Chromatogr*, 23, 576-582.
- Brückner, H. y T. Westhauser (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43-55
- Brückner, H. y N. Fujii (2010). Free and peptide-bound D-amino acids in chemistry and life sciences. *Chem Biodivers*, 7, 1333–1336.
- Brückner, H. y T. (Westhauser 2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, 24, 43–55.
- Burström, H. (1950). Studies on growth and metabolism of roots. IV. Positive and negative auxin effects on cell elongation. *Physiol Plant*, 3, 277-92.
- Carstens, D., K.E. Köllner, H. Bürgmann, B. Wehrli y C.J. Schubert (2012). Contribution of bacterial cells to lacustrine organic matter based on amino sugars and D-amino acids. *Geochim Cosmochim Acta*, 89,159–172.
- Cava, F., H. Lam, M.A. de Pedro y M.K. Waldor (2011). Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 68, 817–83.
- Cawse, P.A. (1967). The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, 92, 311-315.
- Celis-Arámburo, T.J., M. Carrillo-Pech, L.A. Castro-Concha, M.L. Miranda-Ham, M. Martínez-Estévez e I. Echevarría-Machado (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiol Biochem*, 49, 1456–1464.
- Caparros, M., AG. Pisabarro y MA. de Pedro (1992). Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174, 5549-5559.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16, 10881–10890.

-
- Chen, S., CE White, C. George, Y. Zhang, PJ Stogios y A. Savchenko (2016). L hydroxyproline and D-proline catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 198, 1171-1181.
- Chen, I.C., V. Thiruvengadam, W.D. Lin, H.H. Chang y W.H. Hsu (2010). Lysine racemase: a novel non-antibiotic selectable marker for plant transformation. *Plant Mol Biol*, 72, 153–169.
- Cheng, Y., X. Zhang, T. Sun, Q. Tian y WH Zhang (2018). Glutamate Receptor Homolog3.4 is Involved in Regulation of Seed Germination Under Salt Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 59, 978-988.
- Chiu, J., E.D. Brenner, R. DeSalle, M.N. Nitabach, T.C. Holmes y G.M. Coruzzi (2002). Phylogenetic and expression analysis of the Glutamate-Receptor-Like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*, 19, 1066–1082.
- Chiu, J., R. De Salle, H.M. Lam, M. Lee y G. Coruzzi (1999). Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Mol Biol Evol*, 16, 826–838.
- Cho, YY y I-En Hsueh (2019). Insights into Physiological Mechanisms of Salt Stress Tolerance in *Djulis (Chenopodium formosanum Koidz.)* Sprouts. *J Plant Biol*, 62, 263-273.
- D’Aniello, A., G. D’ Onofrio, M. Pischetola, G. D’Aniello, A. Vetere, L. Petrucelli y G. Fisher (1993). Biological role of D-amino acid oxidase and D-Aspartate oxidase. *J Biol Chem*, 265, 26941–26949.
- Davenport, R. (2002). Glutamate receptor in plants. *Ann Bot*, 90, 549-557.
- Davidonis, G.H., R.H. Hamilton, R.P. Vallejo, R. Buly, R.O. Mumma (1982). Biological properties of D-amino acid conjugates of 2, 4-D. *Plant Physiol*, 70, 357-360.
- de Miranda, J., R. Panizzutti, V.N. Foly y H. Wolosker (2002). Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-Serine. *PNAS*, 99, 14542–14547.

-
- Dathe, A., JA Postma, MB Postma-Blaauw y JP Lynch (2016). Impact of axial root growth angles on nitrogen acquisition in maize depends on environmental conditions. *Ann Bot*, 118, 401-414.
- De Smet, I (2011). Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytol*, 193, 821-822.
- Delgado, C., J. Pacheco, A. Cabrera, E. Batllori, R. Orellana y F. Bautista (2010). Quality of groundwater for irrigation in tropical karst environment: the case of Yucatán, Mexico. *Agri Water Manag*, 97, 1423-1433.
- Domínguez-May, A., M. Carrillo-Pech, F. Barredo-Pool, M. Martínez-Estévez, R. Us-Camas, O. Moreno-Valenzuela e I. Echevarría-Machado (2013). A Novel Effect for Glycine on Root System Growth of Habanero Pepper. *J Amer Soc Hort Sci*, 138, 433–442.
- Dong, J., RH Jones y P. Mou (2018). Relationships between Nutrient Heterogeneity, Root Growth, and Hormones: Evidence for Interspecific Variation. *Plants*, 7, 2-16.
- Drew, M.C. (1975). Comparison of effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on growth of seminal root system, and shoot, in barley. *New Phytol*, 75, 479–490.
- 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 J.*, 35, 800-810.
- Dubos, C., J. Willment, D. Huggins, G.H. Grant y M.M. Campbell (2005). Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation: unexpected role of kanamycin in plants. *Plant J*, 43, 348–355.
- Dubrovsky, JG, S. Napsucialy-Mendivil, J. Duclercq, Y. Cheng, S. Shishkova, MG Ivanchenko, J. Friml, AS Murphy y E Benkova (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytol*, 191,970-983.
- Dubrovsky, J.G., G.A. Gambetta, A. Hernandez-Barrera, S. Shishkova y I. Gonzalez (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot*, 97, 903–915.

-
- Dunlop, D.S, A. Neidle y A. Lajtha (1986). The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem Biophys Res Commun*, 141, 27–32.
- Du, Y. y B. Scheres (2018). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *J Exp Bot*, 69, 155–167.
- Erbe T. y H. Bruckner (2000). Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *J Chromatogr A*, 881, 81–91.
- Erikson, O., M. Hertzberg y T. Näsholm (2005). The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. *Plant Mol Biol*, 57, 425-433.
- Erikson O., M. Hertzberg y T. Näsholm (2004). A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol*, 22, 455–458.
- Esteban, R., I. Ariz, C. Cruz y JF Moran (2016). Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci*, 248, 92-101.
- Estrada-Medina, H., BB. Canto-Canché, C. De los Santos-Briones y A. O'Connor-Sánchez (2016). Yucatán in black and red: linking edaphic analysis and pyrosequencing-based assessment of bacterial and fungal community structures in the two main kinds of soil of Yucatán State. *Microbiol Res*, 188, 23-33.
- Farrell, M., P.W. Hill, J. Farrar, R.D. Bardgett y D.L. Jones (2011). Seasonal variation in soluble soil carbon and nitrogen across a grassland productivity gradient. *Soil Biol Biochem*, 43, 835–844.
- Forde, B.G. (2014). Nitrogen signaling pathways shaping root system architecture: an update. *Curr Opin Plant Biol*, 21, 30–36.
- Forsum, O. (2016). On Plant Responses to D-Amino Acids. Ph.D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå.
- Forsum, O., H. Svennerstam, U. Ganeteg y T. Näsholm (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 179, 1058–1069.

-
- Franklin, O., CA Cambui, L. Gruffman, S. Palmroth, R. Orden y T. Näsholm (2017). The carbon bonus of organic nitrogen enhances nitrogen use efficiency of plants. *Plant Cell Environ*, 40, 25-35.
- Friedman, M. (1999). Reviews: Chemistry, nutrition and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem*, 47, 3457–3479.
- Fujii, N. (2002). D-amino acids in living higher organisms. *Origins Life Evol Biosph*, 32, 103–127.
- Fujishige, N., N. Nishimura, S. Iuchi, T. Kunii, K. Shinozaki y T. Hirayama (2004). A novel *Arabidopsis* gene required for ethanol tolerance is conserved among plants and archaea. *Plant Cell Physiol*, 45, 659-666.
- Fujitani, Y., T. Horiuchi, K. Ito y M. Sugimoto (2007). Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: Gene cloning and recombinant protein characterization. *Phytochemistry*, 68, 1530-1536.
- Fujitani, Y., N. Nakajima, K. Ishihara, T. Oikawa, K. Ito y M. Sugimoto (2006). Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67, 668–674.
- Fukaki, H. y M. Tasaka (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol*, 69, 437–449.
- Fukuda, K., A. Tokumura y T. Ogaw (1973). D-alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings. *Phytochem*, 12, 2593–2595.
- Funakoshi, M., M. Sekine, M. Katane, T. Furuchi, M. Yohda, T. Yoshikawa y H. Homma (2008). Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behavior during germination. *FEBS J*, 275, 1188–1200.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50, 151–158.

-
- Gamburg, K.Z. y N.I. Rekoslavskaya (1991). Formation and function of D-amino acids in plants. *Soviet Plant Physiol*, 38, 904–912.
- Gao, X., Q. Ma y H. Zhu (2015). Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 3341–3349.
- Gholizadeh, A. (2015a). The Possible Involvement of D-Amino Acids or Their Metabolites in *Arabidopsis* Cysteine Proteinase/Cystatin-Dependent Proteolytic Pathway. *Cytol Genet*, 49, 73-79.
- Gholizadeh, A. (2015b). Differential Effects of D-amino Acids on the Fusion Forms of a Cysteine Proteinase/Cystatin Pair. *Appl Biochem Microbiol*, 51, 299-305.
- Gholizadeh, A. y B.B. Kohnehrouz (2009). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an active fused D-amino acid oxidase from *Zea mays* L. *Biochemistry*, 74, 137-144.
- Giehl, R., B. Gruber y N. Von Wirén (2014). It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J Exp Bot*, 65, 769–778.
- Giehl, R.F.H., J.E. Lima y N. von Wirén (2012). Regulatory components involved in altering lateral root development in response to localized iron: evidence for natural genetic variation. *Plant Signal Behav*, 7, 711–713.
- Gioseffi, E., A. de Neergaard y J.K. Schjoerring (2012). Interactions between uptake of amino acids and inorganic nitrogen in wheat plants. *Biogeosciences*, 9, 1509–1518.
- Gogami, Y., K. Ito, Y. Kamitani, Y. Matsushima y T. Oikawa (2009). Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry*, 70, 380–387.
- Goh, T., S. Joi, T. Mimura, H. Fukaki (2012). The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139, 883-893.
- Goodwin, R.H. (1972). Studies on roots: V. Effects of indoleacetic acid on the standard root growth pattern of *Phleum pratense*. *Bot Gaz*, 133, 224-229.

-
- Gördes, D., G. Koch, K. Thurow y Ü. Kolukisaoglu (2013). Analyses of Arabidopsis ecotypes reveal metabolic diversity to convert D-amino acids. SpringerPlus, 2, 559.
- Gördes, D., Ü. Kolukisaoglu y K. Thurow (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in Arabidopsis thaliana. Amino Acids, 40, 553–563.
- Granato, T.C. y C.D. Jr. Raper (1989). Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. J Exp Bot, 40, 263–275.
- Gruber, BD, RF Giehl, S. Friedel y N. von Wiren (2013). Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. Plant Physiol, 163, 161-179.
- Guzmán, M.S., I. Torres, M. González, M.A. Mora, M.G. Herrera y D. Hernández (2004). Análisis preliminar de compuestos fenólicos y capsaicinoides en variedades de chile con diferente capacidad pungente. Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya. Primera Convención Mundial del Chile 2004. pp. 115–122
- Hackett, C. (1972). A method of applying nutrients locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots. Aust J Biol Sci, 25, 1169–1180.
- Hadas, A., M. Sofer, J.A.E. Molina, P. Barak y C.E. Clapp (1992). Assimilation of nitrogen by soil microbial population: NH₄ versus organic N. Soil Biol Biochem, 24, 137–143.
- Hamase, K., A. Morikawa y K. Zaitzu (2002). D-Amino acids in mammals and their diagnostic value: review. J Chromatogr B, 781, 73–91.
- Hamase, K., A. Morikawa, S. Etoh, Y. Tojo, Y. Miyoshi y K. Zaitzu (2009). Reviews: Analysis of small amounts of D-amino acids and the study of their physiological functions in mammals. Anal Sci, 25, 961–968.
- Hancock, R. (1960). The amino acid composition of the protein and cell wall of *Staphylococcus aureus*. Biochim Biophys Acta, 37, 42-46.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, R. Konno, A. Niwa, Y. Yasumura, T. Oka, y K. Takahashi (1993). Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and

-
- serum in mutant mice lacking D-aminoacid oxidase. *Neurosci Lett*, 152, 33–36.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, T. Hayashi, N. Fujii, K. Harada, T. Oka y K. Takahashi (1992). The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS*, 296, 33–36
- Hatanaka, T., W. Huang, T. Nakanishi, CC Bridges, SB Smith y PD Prasa (2002). Transport of D-serine via the amino acid transporter ATB (0,+)⁺ expressed in the colon. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 291-295.
- Hawkesford, M., W. Horst, T. Kichey, H. Lambers, J. Schjoerring, I. Skrumsager Møller, P. White (2012). Functions of macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edn, pp. 135-189. Ed. P. Marschner. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiol rev*, 92, 1777–1811.
- Hejnowicz, Z. (1961). The response of the different parts of the cell elongation zone in root to external b-indolylacetic acid. *Acta Soc Bot Polon*, 30, 25-42.
- Hener, C., S. Hummel, J. Suarez, M. Stahl y Ü. Kolukisaoglu (2018). D-Amino Acids Are Exuded by *Arabidopsis thaliana* Roots to the Rhizosphere. *Int J Mol Sci*, 19, 1109.
- Hernandez, S.B. y F. Cava (2016). Environmental roles of microbial amino acid racemases. *Environ Microbiol*, 18, 1673–1685.
- Hill, P.W., R.S. Quilliam, T.H. DeLuca, J. Farrar, M. Farrell, P. Roberts, K.K. Newsham, D.W. Hopkins, R.D. Bardgett y D.L. Jones (2011). Acquisition and assimilation of nitrogen as peptide-bound and D-enantiomers of amino acids by wheat. *PLoS ONE*, 4, e19220.
- Himanen, K., E. Boucheron, S. Vanneste, J. de Almeida Engler, D. Inze y T. Beeckman (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, 14, 2339-2351.

-
- Hirner, A., F. Ladwig, H. Stransky, S. Okumoto, M. Keinath, A. Harms, WB. Frommer y W. Koch (2006). Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell*, 18, 1931-1946.
- Ho, CH., SH. Lin, HC. Hu y YF. Tsay (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138, 1184-1194.
- Hogde, A., G. Berta, C. Doussan, F. Merchan y M. Crespi (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil*, 321, 153–187.
- Horcajo, P., M.A. de Pedro y F. Cava (2012). Peptidoglycan plasticity in bacteria: stress-induced peptidoglycan editing by noncanonical D-amino acids. *Microb Drug Resist*, 18, 306–313.
- Huang AS, A. Beigneux, ZM Weil, PM Kim, ME Molliver, S. Blackshaw, RJ Nelson, SG Young y SH Snyder (2006). d-Aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in d-aspartate oxidase-deficient mice. *J Neurosci* 26, 2814–2819.
- Ivanchenko, M.G., G.K. Munday y J.G. Dubrovsky (2008). Ethylene-auxin interactions regulates lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 55, 335–347.
- Ivanovics, G., V. Bruckner (1937). Ober die chemische natur der immunspezifischen kapselsubstanz der milzbrandbazillen. *Die Naturwissenschaften*, 25, 250.
- Jämtgård, S., T. Näsholm y K. Huss-Danell (2010). Nitrogen compounds in soil solutions of agricultural land. *Soil Biol Biochem*, 42, 2325–2330.
- Jeon BW y J. Kim (2018). Role of *LBD14* during ABA-mediated control of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 13, e1507405.
- Jin, Z., J. Shen, Z. Qiao, G. Yang, R. Wang y Y. Pei (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 414, 481-486.

-
- Jin, K., PJ White, WR Whalley, J. Shen, L. Shi (2017). Shaping an Optimal Soil by Root-Soil Interaction. *Trends Plant Sci*, 10, 823–829.
- Johston, M.M y W.F. Diven (1969). Studies on amino acid racemases. *J Biol Biochem*, 244, 5414-5420.
- Jones, D.L., D. Shannon, T. Junvee-Fortune y J.F. Farrarc (2005). Plant capture of freeamino acids is maximized under high soil amino acid concentrations. *Soil Biol Biochem*, 37, 179-181.
- Jones, B. y K. Ljung (2012). Subter-ranean space exploration: the development of root system architecture. *Curr Opin Plant Biol*, 15, 97-102.
- Ju, J., S. Xu, J. Wen, G. Li, K. Ohnishi, Y. Xue y Y. Ma (2009). Characterization of endogenous pyridoxal 5'-phosphate-dependent alanine racemase from *Bacillus pseudofirmus* OF4. *J Biosci Bioeng*, 107, 225–229.
- Kang, J. y TJ Turano (2003). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 6872–6877.
- Kang, J., S. Mehta y S.L. Turano (2004). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiology*, 45, 1380-1389.
- Kang, S., B.H. Kim, H. Lee, J.Y. Choi, S. Heu, C.J. Oh, S.I. kwon y C.S. An (2006). Overexpression in *Arabidopsis* of a plasma membrane-targeting glutamate receptor form small radish increases glutamate-mediated Ca^{2+} influx and delays fungal infection. *Molecules and Cells*, 21, 418-427
- Kato, S., Y. Kito, H. Hemmi y T. Yoshimura (2011). Simultaneous determination of D-amino acids by the coupling method of D-amino acid oxidase with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Biomed Life Sci*, 29, 3190-5.
- Kawasaki N. y R. Benner (2006). Bacterial release of dissolved organic matter during cell growth and decline: molecular origin and composition. *Limnol Oceanogr*, 51, 2170-

2180.

- Kawase T, Nagasawa M, Ikeda H, Yasuo S, Koga Y, Furuse M (2017) Gut microbiota of mice putatively modifies amino acid metabolism in the host brain. *Br J Nutr* 117:775–783
- Kellermeier, F., P. Armengaud, TJ Seditas, J. Danku, DE Salt y A. Amtmann (2014). Analysis of the root system architecture of *Arabidopsis* provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *Plant Cell*, 26, 1480-1496.
- Keper I, Fonseca J, Müller C, Milger K, Hochwind K, Kostric M (2017) D-tryptophan from probiotic bacteria influences the gut microbiome and allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 139:1525–1535
- Khatib, A. y F. Aqra (2009). Nickel complexes of alanine having a preference for one chiral form over another upon crystallization. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30, 2017-202
- Kiba, T., T. Kudo, M. Kojima y H. Sakakibara (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J Exp Bot*, 62:, 1399-1409.
- Kiba, T. y A. Krapp (2016). Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant Cell Physiol*, 57, 707-714.
- Kim, S.A., J.M. Kwak, S.K. Jae, M.H. Wang y H.G. Nam (2001). Overexpression of the *AtGluR2* gene coding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant and cell physiology*, 42, 74-84
- Kimber RWL, NM Kennedy y AR Milnes (1994). Amino acid racemization dating of a 140,000-year-old tephra-loess-palaeosol sequence on the Mamaku Plateau near Rotorua, New Zealand. *Aust J Earth Sci*, 41,19-26.

-
- Kionka, C. y N. Amrhein (1984). The enzymatic malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of mung-bean hypocotyls. *Planta* 162, 590-226-235.
- Kolodkin-Gal I., D. Romero, S. Cao, J. Clardy, R. Kolte y R. Losick (2010). D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 328, 627-629.
- Kolukisaoglu Ü y J. Suarez (2017). D-Amino Acids in Plants: New Insights and Aspects, but also More Open Questions. In *Amino Acid-New Insights and Roles in Plant and Animal*, InTech, London, UK.
- Kong D., C. Ju, A. Parihar, S. Kim, D. Cho y J. Kwak (2015). Arabidopsis Glutamate Receptor Homolog3.5 Modulates Cytosolic Ca²⁺ Level to Counteract Effect of Abscisic Acid in Seed Germination. *Plant Physiol*, 167, 1630-1642.
- Kong, D., HC Hu, E. Okuma, Y Lee, HS Lee, S. Munemasa, D. Cho, C. Ju, L. Pedoeim y B. Rodriguez (2016). L-Met Activates Arabidopsis GLR Ca²⁺ Channels Upstream of ROS Production and Regulates Stomatal Movement. *Cell Rep*, 17, 2553–2561.
- Kullman JP, Chen X, Armstrong DW (1999) Evaluation of the enantiomeric composition of amino acids in tobacco. *Chirality* 11:669-673
- Kumar, J. y M.L. Mayer (2013). Functional insights from glutamate receptor ion channel structures. *Annual Review of Physiology*, 75, 313-337.
- Kutz, A., A. Müller, P. Hennig, WM Keiser, M. Piotrowski y EW Weiler (2002). A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 30, 95–106.
- Lam H, Oh DC, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA, Waldor MK (2009) D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* 325:1552–1555
- Lam, H.M., J. Chiu, M.H. Hsieh, L. Meisel, I.C. Oliveira, M. Shin y G. Coruzzi (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396, 125-126.

-
- Landi, L., G. Renella, JL Moreno, L. Falchini y P. Nannipieri (2000). Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol Fertil Soils*, 32, 8–16.
- Lavenus, J., T. Goh, I. Roberts, S. Guyomarc'h, M. Lucas, I. De Smet, H. Fukaki, T. Beeckman, M. Bennett y L. Laplaze (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci*, 18, 450-458.
- Law, DM (1987). Gibberellin-enhanced indole-3-acetic acid biosynthesis: d-tryptophan as the precursor of indole-3-acetic acid. *Physiol Plant*, 70, 626-632.
- Leblanc, A., H. Renault, J. Lecourt, P. Etienne, C. Deleu y E. Le Deunff (2008). Elongation changes of exploratory and root hairs systems induced by aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine affect nitrate uptake and *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* transporter gene expression in oilseed rape. *The Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 1928-1940.
- Lee, HW, NY Kim, DJ Lee y J. Kim (2009). LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 151, 1377-1389.
- Lee, HW, C. Cho y J. Kim (2015). Lateral Organ Boundaries Domain16 and 18 Act Downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 Auxin Influx Carriers to Control Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 168, 1792-1806.
- Lee RJ, Hariri BM, McMahon DB, Chen B, Doghramji L, Adappa ND (2017) Bacterial d-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells. *Sci Signal* 10:eaam7703
- Lee HW y J. Kim (2013). EXPANSIN17 Up-Regulated by LBD18/ASL20 promotes lateral root formation during the auxin response. *Plant Cell Physiol*, 54, 1600-1611.
- Lehmann S, Gumy C, Blatter E, Boeffel S, Fricke W, Rentsch D (2011) In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *J Exp Bot* 62:787-796

-
- 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, 489-495.
- Li, J., S. Zhu, X. Song, Y. Shen, H. Chen, J. Yu, K. Yi, Y. Liu, V.J. Karplus, P. Wu, X.W. Deng (2006). A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *The Plant Cell*, 18, 340- 349
- Lima, J.E., S. Kojima, H. Takahashi y N. Von Wirén (2010). Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1; 3-dependent manner. *The Plant Cell*, 22, 3621-3633. Linkohr *et al* (2002)
- Lipson, D. A. y T. Näsholm (2001). The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, 128, 305-316
- Liu, J., L. Sheng, Y. Xu, J. Li, Z. Yang, H. Huang y L. Xu (2014). *WOX11* and *12* Are Involved in the First-Step Cell Fate Transition during de Novo Root Organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* Mar, 26, 1081-1093.
- Liu, Y. y N. von Wiren (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot*, 68, 2581-2592.
- Lopez-Bucio, J., A. Cruz-Ramirez y L. Herrera-Estrella (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280-287.
- MacRae, DH y J. Bonner (1953). Chemical structure and antiauxin activity. *Physiol Plant*, 6, 485-510.
- Malamy, J.E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28, 67-77
- Manabe (1984) Analysis by HPLC of d-alanylglutamine and its related compounds in rice plants. *Soil Sci Plant Nutr* 30:589–593

-
- Manabe H (1992) Formation of dipeptides containing D-alanine in wild-rice plants. *Phytochemistry* 31:527–529
- Manabe H, Ohira K (1981) Effects of D- and L-alanine on the growth of suspension-cultured rice, soybean and tobacco cells. *Soil Sci Plant Nutr* 27:383–386
- Manzoor H, Kelloniemi J, Chiltz A, Wendehenne D, Pugin A, Poinssot B, Garcia-Brugger A (2013) Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant J* 76: 466-480
- Martens, D.A. y W.T. Jr. Frankenberger (1993). Metabolism of tryptophan in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 1679-1687. McQueen-Mason *et al.* 1989.
- Matsumoto-Kitano, M., T. Kusumoto, P. Tarkowski, K. Kinoshita-Tsujimura, K. Václavíková, K. Miyawaki y T. Kakimoto (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *P Natl Acad Sci U.S.A.*, 105, 20027-20031.
- Medina-Lara, F., R. Souza-Perera, M. Martínez-Estévez, MO. Ramírez-Sucre, IM. Rodríguez-Buenfil e I. Echevarría-Machado (2019). Red and Brown Soils Increase the Development and Content of Nutrients in Habanero Pepper Subjected to Irrigation Water High Electrical Conductivity. *Hortscience*, in press
- Meyer, A., S. Eskandari, S. Grallath y D. Rentsch (2006). AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7197-7204
- Meyerhoff, O., K. Müller, MRG Roelfsema, A. Latz, B. Lacombe, R. Hedrich, P. Dietrich y D. Becker (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*, 222, 418-427.
- Michard E, Lima P, Borges F, Silva A, Portes M, Carvalho J, Gilliam M, Liu L, Obermeyer G, Feijo J (2011) Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* 332:434–437
- Miller, ND, TL Durham Brooks, AH Assadi y EP Spalding (2010). Detection of a gravitropism

-
- phenotype in glutamate receptor-like3.3 mutants of *Arabidopsis thaliana* using machine vision and computation. *Genetics*, 186, 585-593.
- Miura, GA y SE Mills (1971). The conversion of D-tryptophan to L-tryptophan in cell cultures of tobacco. *Plant Physiol*, 47, 483-487.
- Monselise, El., A. Levkovitz y D. Kost (2015). Ultraviolet radiation induces stress in etiolated *L. andoltia punctata*, as evidenced by the presence of alanine, a universal stress signal: a 15 N NMR study. *Plant Biology* 17, 613 101-107.
- Mori, H. y R. Inoue (2010). Serine racemase knockout mice: review. *Chemistry and Biodiversity*, 7, 1573-1578
- Morikawa, A., K. Hamase, T. Ohgusu, S. Etoh, H. Tanaka, I. Koshiishi, Y. Shoyama y K. Zaitu (2007). Immunohistochemical localization of D-alanine to b-cells in rat pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355, 872-876.
- Morizawa, K. (1927). The extractive substances in *Octopus octopodia*. *Acta Sch. Med. Univ. Imp. Kyoto*, 9, 285-298.
- Mutaguchi, Y., T. Ohmori, H. Akano, K. Doi y T. Ohshima (2013). Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids. *Springerplus*, 2, 691
- Nacry, P., E. Bouguyon, A. Gojon (2013). Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil*, 370, 1-29.
- Nagata, Y., H. Homma, M. Matsumoto y K. Imai (1999). Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by d-aspartate in rat Leydig cells. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 454, 317-320.
- Näsholm, T., K. Kielland y U. Ganeteg (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.*, 182, 31-48.

-
- Nathan C, Cunningham-Bussel A (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13:349–361
- Negi, S., M.G. Ivanchenko y G.K. Muday (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal*, 55, 175-187.
- Ogawa T, Bando N, Sasaoka K (1976) Occurrence of α -amino-n-butyric acid in legume seedlings. *Agric Biol Chem* 40:1661–1662
- Ogawa T, Fukuda M (1973) Occurrence of D-amino acid aminotransferase in pea seedling. *Biochem Biophys Res Commun* 52:998–1002
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1977) Identification of D-Aspartic Acid and D-Glutamic Acid in Pea Seedlings. *Agric Biol Chem* 41:1811–1812
- Öhlund, J. y T. Näsholm (2002). Low nitrogen losses with a new source of nitrogen for cultivation of conifer seedlings. *Environmental Science and Technology*, 36, 4854-4859.
- Okushima, Y., H. Fukaki, M. Onoda, A. Theologis y M. Tasaka (2007). ARF7 y ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant cell*, 19, 118-130.
- Ono K, Yanagida K, Oikawa T, Ogawa T, Soda K (2006) Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. *Phytochemistry* 67:856–860
- Oono, Y., C. Ooura, A. Rahman, E.T. Aspuria, K. Hayashi, A. Tanaka y H. Uchimiya (2003). p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiol*, 133, 1135-1147
- Overvoorde, P, H. Fukaki y T. Beeckman (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, e001537.

- Pacheco-Méndez, J. A. (2005). Proceso de producción de chile habanero en salsa, a desarrollarse en el departamento del Petén. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Mecánica Industrial
- Parizot, B., L. Laplace, L. Ricaud, E. Boucheron-Dubuisson, V. Bayle, M. Bonke, I. De Smet, S. Poething, Y. Helariutta, J. Haseloff, D. Chriqui, T. Beeckman y L. Nussaume(2008) Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiology*, 146, 140-148.
- Pätzold, R., A. Schieber y H. Brückner (2005). Gas chromatographic quantification of free D-amino acids in higher vertebrates. *Biomed Chromatogr*, 19, 466-473.
- Paungfoo-Lonhienne C, Rentsch D, Robatzek S, Webb RI, Sagulenko E, Näsholm T, Schmidt S, Lonhienne TGA (2010) Turning the Table: Plants consume microbes as a source of nutrients. *Plos One* 5:e11915
- Penn, A.C., S.R. Williams y I.H. Greger (2008). Gating motions underlie AMPA receptor secretion from the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 27, 3056–3068.
- Péret, B., B. De Rybel, I. Casimiro, E. Benková, R. Swarup, L. Laplace, T. Beeckman y M.J. Bennett (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.*, 14, 399-408.
- Plett, DC, LR Holtham, M. Okamoto y TP Garner (2018). Nitrate uptake and its regulation in relation to improving nitrogen use efficiency in cereals. *Semin Cell Dev Biol*, 74, 97-104.
- Pokorny, M., E. Marcenko y D. Keglevic (1970). Comparative studies of L-methionine and D-methionine metabolism in lower and higher plants. *Phytochemistry*, 9, 2175-2188.
- Miller, ND, TL Durham Brooks, AH Assadi y EP Spalding (2010). Detection of a gravitropism phenotype in *glutamate receptor-like 3.3* mutants of *Arabidopsis thaliana* using machine vision and computation. *Genetics*, 186, 585–593.

- Marion-Poll, A. y M. Caboche (1984). Relationship between auxin and amino acids metabolism of Tobacco protoplast- derived cells. *Plant Physiol*, 75, 1048-1053.
- Niswender, CM y PJ Conn (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 295–322.
- Pollock, GE, Cheng CN y Cronin SE (1977) Determination of the D and L isomers of some protein amino acids present in soils. *Anal Chem*, 49,2–7
- Porco, S., A. Larrieu, Y. Du, A. Gaudinier, T. Goh, K. Swarup, R. Swarup, B. Kuempers... y MJ Bennett (2016). Lateral root emergence in *Arabidopsis* is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development*, 143, 3340-3349.
- Prado, U.G. (2006). Tecnología de producción comercial del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, 43 p
- Price, MB y S. Okumoto (2013). Inter-subunit interactions between glutamate-like receptors in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 8, e27034.
- Qi, Z., N.R. Stephens y E.P. Spalding (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*, 142, 963-971.
- Radkov AD, Moe LA (2014) Bacterial synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5363–5374
- Ramírez, G., S. Góngora, L. Pérez, L. Chel, T. González, J. Tun, E. Escalante, L. Rodríguez, J. Ledon, J. Castillo y H. López (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP- SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mocochoá, Yucatán; México

-
- Ramírez, M. M. y G.E. Vázquez (2007). Potencial de producción del chile habanero (*Capsicum chinense* Jack), en el sur de Tamaulipas. INIFAP Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Apartado Postal No. 31, Altamira, Tamaulipas., CP 89601, México.
- Rasmussen TT, Kirkeby LP, Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M (2000) Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *APMIS* 108:663–675.
- Rehfeld DW, Tolbert NE (1972) Aminotransferases in peroxisomes from spinach leaves. *J Biol Chem*, 247, 4803-4811.
- Rekoslavskaya NI, Markova TA, Gamburg KZ (1988) Appearance of N-malonyl-D-tryptophan in Excised Leaves during Wilting. 1. The Content of Tryptophan and N-malonyl-D- tryptophan as Affected by Water Deficit. *J Plant Physiol* 132: 86-89
- Rekoslovskaya, NI, OV Yurjeva, RK Salyaev, S. Mapelli y TV Kopytina (1999). D-tryptophan as IAA source during wheat germination. *Bulg J Plant Physiol*, 25, 39-49.
- Remans, T., P. Nacry, M. Pervent, T. Girin, P. Tillard, M. Lepetit y A. Gojon (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140, 909-921.
- Reynolds PE y P. Courvalin (2005). Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in d-alanyl-d-serine. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 21-25.
- Robinson (1976) D-amino acids in higher plants. *Life Sci* 19:1097–1102
- Rousk J, Jones DL (2010) Loss of low molecular weight dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON) in H₂O and 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. *Soil Biol Biochem* 42:2331–2335
- 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*. *Plant cell environ*, 31, 861-871.

-
- Rozan P, Kuo YH, Lambein F (2001) Nonprotein amino acids in edible lentil and garden pea seedlings. *Amino acids* 20:319–324
- Ruiz-Lau, N., F. Medina-Lara y M. Martínez-Estévez (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*, 70-77
- Sagarpa (2011). Agenda de innovación tecnológica para el estado de Yucatán. 76 p.
- Salvador-Recatalà, V. (2016). New roles for the GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE 3.3, 3.5, and 3.6 genes as on/off switches of wound-induced systemic electrical signals. *Plant Signal Behav*, 11, e1161879.
- Samuelson, ME y CM Larsson (1993). Nitrate regulation of zeation riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Sci*, 93, 77-84
- Sasabe, J., Y. Miyoshi, S. Rakoff-Nahoum, T. Zhang, M. Mita y BM Davis (2016). Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nat Microbiol*, 1, 1–7.
- Satbhail, SB, D. Ristova y W. Bush (2014). Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exp Bot*, 66, 1099-1112.
- Satoh S, Esashi Y (1980) D-amino acid stimulated thylene production in seed tissues. *Planta* 149: 64-68
- Schulten, H.R. y M. Schnitzer M. (1997). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol Fert Soils*, 26, 1-15
- Serralta-Interian, A. (2014). Estudio del efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de maestría. Centro de Investigación científica de Yucatán. México. pp. 64
- Shabala, S., L. Bækgaard, L. Shabala, AT Fuglsang, TA Cuin, LG Nemchinov y MG Palmgren (2011). Endomembrane Ca²⁺-ATPases play a significant role in virus-induced adaptation to oxidative stress. *Plant Signal Behav*, 6, 1053-1056.

-
- 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 J*, 281, 894-915.
- 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. *J Exp Bot*, 67, 1853-1869.
- Sivaguru, M., S. Pike, W. Gassmann y T.I. Baskin (2003). Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant and Cell Physiology*, 44, 67-75.
- Skinner, J. y H. Street (1953). Studies on the growth of excised roots II. Observations on the growth of excised groundsel roots. *New Phytologist*, 53, 44-67.
- Sobolevsky, A.I., M.P. Rosconi y E. Gouaux (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745-756.
- Soda, K. (1977). Biochemistry of D-amino acid (I). *Kagaku* 32, 517-526.
- Steen AD, BB Jorgensen y BA Lomstein (2013). Abiotic racemization kinetics of amino acids in marine sediments. *PLoS ONE*, 8, e71648.
- Stephens, NR, Z. Qi y EP Spalding (2008). Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the GLR3.3 and GLR3.4 genes. *Plant Physiol*, 146, 529-538.
- Strauch, R., E. Svedin, B. Dilkes, C. Chapple y X. Li (2015). Discovery of a novel amino acid racemase through exploration of natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 37, 11726-11731.
- Sugimoto, M., W. Sakamoto y Y. Fujitani (2009). Localization and expression of serine racemase in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 36, 587-590.

-
- Svennerstam, H., U. Ganeteg, C. Bellini y T. Näsholm (2007). Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the Lysine, Histidine Transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiol*, 143, 1853-1860.
- Su, N., Q. Wu, J. Chen, L. Shabala, A. Mithöfer, H. Wang, M. Qu, M. Yu, J. Cui, S. Shabala (2019) GABA operates upstream of H⁺-ATPase and improves salinity tolerance in *Arabidopsis* by enabling cytosolic K⁺ retention and Na⁺ exclusion. *J Exp Bot*, 70, 6349–6361.
- Tabata, R., K. Sumida, T. Yoshii, K. Ohyama, H. Shinohara y Y. Matsubayashi (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*, 346, 343-345.
- Tapken D. y M. Hollmann (2008). *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *J Mol Biol*, 383, 36-48.
- Tapken, D., U. Anshütz, LH Liu, T. Huelsken, G. Seebohm, D. Becker y M. Hollmann (2013). A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Science Signaling*, 6, ra47.
- Teardo, E., L. Carraretto, S. Bortoli, A. De Costa, S. Behera, R. Wagner y I. Szabo (2015). Alternative Splicing-Mediated Targeting of the *Arabidopsis* GLUTAMATE RECEPTOR3.5 to Mitochondria Affects Organelle Morphology. *Plant Physiol*, 167(, 216-227.
- Tegeder, M y D. Rentsch (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular Plant*, 3, 997-1011.
- Tian, Q., F. Chen, J. Liu, F. Zhang y G. Mi (2008). Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *J Plant Physiol*, 165, 942-951.
- Tian, H., Y. Jia, T. Niu, Q. Yu y Z. Ding (2014). The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 33, 745–753.

- Tishkov, V.L. y S.V. Khoronenkova (2005). D-amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism and practical application. *Biochemistry*, 70, 51-56.
- Traynelis, SF, LP Wollmuth, CJ McBain, FS Menniti, KM Vance, KK Ogden y R. Dingledine (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev*, 62, 405-496.
- Tun, JC. (2001). Chile habanero, características y tecnología de producción. INIFAP, Yucatán, México.
- Turano, FJ, MJ Muhitch, FC Felker y MB McMahon (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 Sci*, 163, 43-51.
- Ulbrich, M.H. y E.Y. Isacoff (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 14163-14168.
- Valdovinos JG, Muir RM (1965) Effects of D and L amino acids on foliar abscission. *Plant Physiol* 40:335–340
- Valle E, Virtanen AI (1965) On the injurious and growth promoting effects in peas and barley of various amino acids given together with nitrate. *Acta Agral Fenn* 107:308–319
- van Heijenoort, J. (2001). Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep*, 18, 503-519.
- Veiga, P., S. Piquet, A. Maisons, S. Furlan, P. Courtin y MP Chapot-Chartier (2006). Identification of an essential gene responsible for D-Asp incorporation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan crossbridge. *Mol Microbiol*, 62, 1713-1724.
- Vincill ED, Clarin AE, Molenda JN, Spalding EP (2013) Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1304–1313

-
- Vranova V, Zahradnickova H, Janous D, Skene RK, Matharu-Avtar S, Rejsek K, Formanek P (2012) The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps. *Plant Soil* 354:21–39
- Wagner BM y E. Beck (1993). Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. *Planta*, 4, 511-518.
- Walch-Liu P, Ivanov II, Filleur S, Gan Y, Remans T, Forde BG (2006) Nitrogen regulation of root branching. *Ann Bot* 97:875–881
- Walch-Liu, P y B.G. Forde (2008). Nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant Journal*, 54, 820-828.
- Walsh, C.T. (1999). Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 2393-2396.
- Wang, H., H. Wolosker, J. Pevsner, SH Snyder y DJ Selkoe (2000). Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. *J Endocrinol*, 167, 247-252.
- Wang, W.H., B. Köhler, F.Q. Cao, G.W. Liu, Y.Y. Gong, S. Sheng, Q.C. Song, X.Y. Cheng, T. Garnett, M. Okamoto, R. Qin, B. Mueller-Roeber, M. Tester y L.H. Liu (2011). Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in *Arabidopsis*. *New phytologist*, 193, 432-444.
- Ward, NL, JF Challacombe, PH Janssen, B. Henrissat y PM Coutinho (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2046-2056.
- Weiland, M., S. Mancuso y F. Baluska (2015). Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 43, 1-25.

-
- Went, FW (1929). On a substance causing root formation. Proc Kon Akad Wetensch, Amsterdam, 32, 35-39.
- Wichern, F., I. Lobe, W. Amelung, T. Müller, RG Joergensen y A. Buerkert (2004). Changes in amino acid enantiomers and microbial performance in soils from a subtropical mountain oasis in Oman abandoned for different periods. Biol Fert Soils, 39,398.-406
- Wiersum, L.K. (1958). Density of root branching as affected by substrate and separate ions. Acta Botanica Neerlandica, 7, 174-190.
- Wolosker, H., S. Blackshaw y SH Snyder (1999). Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-Serine to regulate glutamate N-methyl-D-aspartate neurotransmission. PNAS, 96, 13409-13414.
- Wudick, MM., E. Michard, C. Oliveira-Nunes y JA Feijó (2018). Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates?. J Exp Bot, 19, 1-13.
- Yemm, EW y EC Cocking (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. Analyst, 80, 209-214.
- Yu, J. y C.K. Wen (2013). Arabidopsis aux1 rcr1 mutation alters Auxin Resistant 1 targeting and prevents expression of the auxin reporter DR5: GUS in the root apex. Journal Experimental Botany, 64, 921-933.
- Zebelo, SA., K. Matsui, R. Ozawa y ME Maffei (2012). Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (Solanum lycopersicon) plant-to-plant communication. Plant Sci, 196, 93-100.
- Zenk, M.H. y H. Sherf (1963). D-Tryptophan in höheren Pflanzen. Biochimica et Biophysica Acta, 71, 737-738.
- Zhang, H., A. Jennings, PW Barlow y BG Forde (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 6529-6534.

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

Zhang HM y BG Forde (1998). An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279, 407-409.

Zhao, Y. y K.H. Hasenstein (2009). Primary root growth regulation: The role of auxin and ethylene antagonist. *J Plant Growth Regul*, 28, 309-320.