

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
DE PLANTAS**

**Efecto de la distribución heterogénea de
nitrato sobre el sistema radical de
Capsicum chinense Jacq.**

Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias presenta:

Teresita de Jesús Celis Arámburo

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN, A.C.**

Mérida, Yucatán, México

2011



Mérida, Yucatán, México; a 27 de Septiembre de 2011.

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, 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: Teresita de Jesús Celis Arámburo

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS
Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “**Efecto de la distribución heterogénea de nitrato sobre el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq.**” fue realizado en los laboratorios de la **Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Ileana Echevarría Machado** y el **Dr. Manuel Martínez Estévez**, dentro de la Opción de **Doctorado directo**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., haciendo uso de sus equipos e instalaciones, bajo la asesoría y dirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado y el Dr. Manuel Martínez Estévez.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No.203654, otorgada para los estudios de Doctorado.

Este trabajo fue financiado con fondos de CONACYT con el Apoyo para la formación de doctores No.55641 y parcialmente por el proyecto No.84275.

DEDICATORIA

A mis padres,

A mis hermanos,

A toda mi familia,

Y a tí, por quien ríe, a quien Amo, con quien sueño.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a Dios, por ser mi mejor amigo, por haberme dado fuerzas y valor para alcanzar esta meta, por darme su bendición y la oportunidad de vencer todos los obstáculos para alcanzar este triunfo.

A la Dra. Ileana Echevarría y al Dr. Manuel Martínez, mis asesores de tesis, gracias por su dedicación, paciencia y entrega, así como por sus enseñanzas, consejos y apoyo incondicional.

Agradezco de manera particular a los miembros de mi comité tutorial y de evaluación de tesis: Dr. Víctor Suárez Solís, Dra. Ana Luisa Ramos Díaz, Dr. Felipe Sánchez Teyer, Dra. Virginia Herrera y Dr. Felipe Vázquez Flota, por su tiempo, dedicación y recomendaciones al presente trabajo.

Al Dr. Tomás González, Dra. Nancy Santana, Dr. Ignacio Islas, Dra. Rosa María Escobedo y Dr. José Juan Zúñiga, por proveer las semillas de chile habanero.

Al Laboratorio del Dr. Felipe Sánchez Teyer, donde se realizaron los experimentos de cDNA-AFLP y a las técnicas M.C. Adriana Quiroz (establecimiento de metodología de cDNA-AFLP) y M.C. Alejandra Barraza (geles de poliacrilamida y tinción con plata).

Al Laboratorio de la Dra. Lourdes Miranda Ham, donde se determinó la actividad de la NR y a la técnica M.C. Lizbeth Castro Concha.

Agradezco a la M.C. Mildred Carrillo Pech y al M.C. Ramón Souza por su invaluable asistencia en los trabajos experimentales de hibridación de membranas. Así como al Dr. José Juan Zúñiga, al Dr. Manuel Martínez Estévez y a la Dra. Ileana Echevarría Machado por proporcionar los plásmidos utilizados para los análisis.

A todo el personal de CICY, así como a los profesores del Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, agradezco todas sus enseñanzas.

A mis compañeros de posgrado y de la UBBMP que me apoyaron con el manejo de equipos o técnicas, y que a su vez, hicieron más grata mi estancia en esta importante etapa de mi vida.

A los compañeros que coincidieron conmigo en el tiempo de permanencia en el laboratorio No.7 de la UBBMP, el grupo de los "radicales": Wendy,

Selene, Kenny, Neto I, Anny, Ángel, Gladys, Ricardo, Orlando, Isaac, Marta, Angélica y Neto II.

A los compañeros de otros laboratorios o inclusive de otros institutos, que formaron parte de los seminarios de grupos conjuntos, gracias por sus observaciones, comentarios y sugerencias a: Fátima, Nancy, Ramón, Naivy, Maty, Lucy, Enid, Emanuel, Luis, Camilo, Rocío, Orlando e Isaac.

A los amigos fuera de CICY: Hebel, Pablo, Paola, Misael, Carolina y Paty, gracias por hacer más agradable mi estancia en Yucatán.

A Marijose Herrera, por todo el apoyo, los cuidados, la confianza, los consejos y los grandiosos momentos compartidos.

A la memoria de mis abuelitos: Mamita, papá Pancho y abuelito Federico.

A la memoria de doña Cristina, gracias por sus agradables charlas y por proporcionarme alojamiento durante mis primeros meses en Mérida.

Al M.C. Sixto Velarde Félix por su ejemplo de tenacidad, consejos, palabras de aliento y significativa amistad.

A la memoria de Titanic, gracias por ser un magnífico perro, ¡¡¡Te Quiero Mucho!!!

A mis greñudos, Armani y Lacoste, por brindarme alegría y compañía al regresar cada noche a casa. Y gracias a Gerardo por obsequiármelos.

A la blanca Mérida y a todo Yucatán. Gracias por los eventos culturales, las zonas arqueológicas, la lengua maya, las tradiciones y su gente.

Muchísimas gracias a quienes esperaron pacientemente cada periodo vacacional que pude regresar a mi tierra, Culiacán. A quienes me brindaron comprensión y apoyo al venir a estudiar a Mérida. A toda mi Familia. A mi abuelita Panchita. A mis padres: Rosalinda y Federico. A mis hermanos: Claudia, Mario Alberto y Rosalinda. A mis sobrinos: Guillermo Edreí, Claudia Ayelén, Iktys Alberto, Clara Marián, Javier Nicolás, Flavio, Karlo, Kelly, Kevin, Arjuna, Kuntty, Siddharta, Steven, Xitlali, Lluvia y Frida. A mis cuñados: Guillermo, Martha Alicia y Javier. A mis tíos: Flavio, Salo, Eva, Baldo y Cecy. A mis primos: Flavio, Perla, Ely, Karely, Frank, Kary, Iris, Tony, Izcoatl, Quetzal, Huitzi, Xochilt, Ixchel y Martín. Y a todos los nuevos miembros que la integran.

♪ Es mi orgullo ser de Culiacán... ¡¡Y arriba el Norte, Sí señor!!

ÍNDICE GENERAL

	LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
	RESUMEN	xv
	ABSTRACT	xvii
	INTRODUCCIÓN	1
	CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	3
I.1.	ANTECEDENTES	3
I.1.1.	Sistemas radicales	3
I.1.1.1.	La raíz como parte integral de la planta	3
I.1.1.2.	Clasificación de los sistemas radicales	4
I.1.1.3.	Procesos de crecimiento radical	6
I.1.2.	Nutrientes	8
I.1.2.1.	Distribución y disponibilidad de nutrientes en el suelo	9
I.1.2.2.	Nitrógeno en el suelo	10
I.1.2.2.1.	Nitrógeno inorgánico	11
I.1.2.2.2.	Movilidad del N en el suelo	12
I.1.3.	Sistemas de transporte de N inorgánico	15
I.1.3.1.	Nitrato	15
I.1.3.2.	Amonio	17
I.1.4.	Metabolismo del nitrógeno	20
I.1.5.	Respuesta del sistema radical a la presencia de nutrientes en el suelo	21
I.1.5.1.	Respuesta del sistema radical al nitrato	23
I.1.5.2.	Respuesta del sistema radical al amonio	27
I.1.6.	Genes implicados en la respuesta del sistema radical al N inorgánico	27
I.1.7.	El nitrato como molécula señal	32
I.1.8.	Género <i>Capsicum</i>	33
I.1.8.1.	Origen del género	33
I.1.8.2.	Clasificación taxonómica	34
I.1.8.3.	Descripción morfológica	34
I.1.8.4.	Distribución geográfica del género <i>Capsicum</i>	34
I.1.8.5.	Importancia económica del chile habanero	36
I.1.8.6.	Características de crecimiento del chile habanero en el estado de Yucatán	37
I.2.	HIPÓTESIS	39
I.3.	OBJETIVOS	39
I.3.1.	Objetivo general	39
I.3.2.	Objetivos particulares	39
I.4.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
I.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

	CAPÍTULO II. EXOGENOUS NITRATE INDUCES ROOT BRANCHING AND INHIBITS PRIMARY ROOT GROWTH IN <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	
II.1.	ABSTRACT	55
II.2.	Abreviations	55
II.3.	Introduction	57
II.4.	MATERIALS AND METHODS	59
II.4.1.	Plant material	59
II.4.2.	Growth conditions	59
II.4.3.	Heterogeneous or homogeneous NO ₃ ⁻ treatments	60
II.4.4.	Effect of tungstate on the root response to NO ₃ ⁻	61
II.4.5.	Evaluation and analysis of results	61
II.5.	RESULTS	61
II.5.1.	Effect of heterogeneous NO ₃ ⁻ conditions on PR growth	61
II.5.2.	Effect of heterogeneous NO ₃ ⁻ conditions on LR formation and growth	64
II.5.3.	Differential sensitivity to NO ₃ ⁻ exposure in <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	67
II.5.4.	Effect of tungstate of on the response to NO ₃ ⁻ in habanero pepper root system	70
II.6.	DISCUSSION	72
II.6.1.	Effect of NO ₃ ⁻ on PR growth	72
II.6.2.	NO ₃ ⁻ effect on LR proliferation	74
II.7.	Acknowledgements	77
II.8.	References	78
	CAPÍTULO III. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL SISTEMA RADICAL DE <i>Capsicum chinense</i> Jacq. INDUCIDOS POR NITRATO	
III.1.	INTRODUCCIÓN	85
III.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	87
III.2.1.	Obtención del material vegetal	87
III.2.2.	Aplicación del tratamiento de nitrato	87
III.2.3.	Extracción del ARN	88
III.2.4.	Obtención de la sonda	88
III.2.5.	Obtención de la población de los cDNA para la hibridación	88
III.2.6.	Hibridación y detección de la expresión diferencial de genes	88
III.2.7.	Análisis de la expresión diferencial de los genes por PCR en tiempo real	94
III.3.	RESULTADOS	94
III.3.1.	Análisis de la expresión diferencial de los genes	97

III.4.	DISCUSIÓN	101
III.4.1.	VPS26	101
III.4.2.	V-ATPasa	102
III.4.3.	Nitrato reductasa (NR)	104
III.4.4.	NRT2	104
III.4.5.	Otros transportadores	106
III.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
	CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL	115
IV.1.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	125
	DATOS COMPLEMENTARIOS	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Morfología de los sistemas radicales	5
Figura 1.2.	Dos tipos de sistemas radicales	6
Figura 1.3.	Tipos de desarrollo del sistema radical	7
Figura 1.4.	Representación de la rizósfera y sus componentes mayoritarios	9
Figura 1.5.	Esquema de la reducción de nitrato y nitrito (ácido nitroso)	20
Figura 1.6.	Esquema resumen de la reducción asimilativa del nitrógeno	21
Figura 1.7.	Efecto de diversos nutrientes sobre las raíces de <i>Hordeum vulgare</i>	22
Figura 1.8.	Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> expuestas a tratamiento localizado KCl (testigo) o de KNO ₃ (tratamiento)	24
Figura 1.9.	Modelo de la regulación del crecimiento y desarrollo de raíces laterales por efecto del NO ₃ ⁻ en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Figura 1.10.	Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de nitrato sobre el sistema radical de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	41
Figure 2.1.	Response to NO ₃ ⁻ of PR growth in habanero pepper seedlings	62
Figure 2.2.	Response to NO ₃ ⁻ or NH ₄ ⁺ supply of PR growth in habanero pepper seedlings	64
Figure 2.3.	Effect of NO ₃ ⁻ localized supplies on LR number and elongation in habanero pepper seedlings	65
Figure 2.4.	Effect of NH ₄ ⁺ and NO ₃ ⁻ (uniform or localized supply) on LR proliferation	67
Figure 2.5.	PR response to external NO ₃ ⁻ of six habanero pepper accessions	68
Figure 2.6.	LR response to external NO ₃ ⁻ of six habanero pepper accessions	69
Figure 2.7.	Effect of tungstate on root growth response to localized NO ₃ ⁻ supplies	71
Figura 3.1.	Visualización de extractos de ARN y sonda marcada (+DIG)	96
Figura 3.2.	Amplificación de los cDNAs de los genes	97
Figura 3.3.	Modificaciones diferenciales respecto al testigo en los niveles de transcritos del ápice de raíces de <i>C. chinense</i> expuestas a NO ₃ ⁻ durante diferentes tiempos	98

Figura 3.4.	Genes con mayores modificaciones diferenciales en los niveles de transcritos y/o participación en la captación y metabolismo del N, en los análisis realizados a muestras de ápices de raíces de <i>C. chinense</i> expuestos a NO_3^- durante diferentes tiempos	100
Figura 4.1.	Modelo del efecto de la presencia de NO_3^- sobre el sistema radical de <i>C. chinense</i> . Cambios fisiológicos y moleculares	120
Figura S2.1.	Dose-response curve to tungstate (Na_2WO_4)	127
Figura S2.2.	Effect of tungstate (Na_2WO_4) on nitrate reductase (NR) activity	128
Figura S3.1.	Expresión diferencial de genes provenientes de ápices de raíz de chile habanero sometidos a la presencia de nitrato durante 0 horas (I), 1 hora (II), 2 horas (III) y 4 horas (IV)	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Índices de difusión y comportamiento de absorción de N inorgánico (NH_4^+ , NO_3^-) y N orgánico disuelto (lisina, glicina, glutamato) en el suelo. Los cálculos están basados en la adición de 15.5 μM de N soluble en el suelo	14
Tabla 1.2.	Propiedades regulatorias y bioquímicas de los transportadores de amonio tipo AMT caracterizados para <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Lycopersicon esculentum</i> (Le), <i>Oryza sativa</i> (Os), <i>Brassica napus</i> (Bn) y <i>Lotus japonicus</i> (Lj)	19
Tabla 1.3.	Genes regulados por nitrato en diferentes especies	30
Tabla 1.4.	Principales países productores de chile	35
Tabla 2.1.	Effect of NO_3^- on LR formation in <i>C. chinense</i>	66
Tabla 3.1.	cDNAs provenientes de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. analizados por hibridación diferencial	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- 6PGDH**, 6-fosfogluconato dehidrogenasa
- ABA**, Ácido abscísico
- AMT**, Transportador de amonio
- ASR**, Arquitectura del sistema radical
- C:N**, Balance carbono-nitrógeno
- C. chinense**, *Capsicum chinense*
- CAS**, Cajas de agar segmentadas
- FNR**, Fd NADP⁺ oxidoreductasa
- FT**, Factores de transcripción
- GDH**, Glutamato deshidrogenasa
- GOGAT**, Oxoglutarato amino transferasa
- GS**, Glutamina sintetasa
- HAK**, Transportador de potasio
- HATS**, High affinity transporter system
- LATS**, Low affinity transporter system
- Mo₄⁻²**, Molibdato
- N**, Nitrógeno
- NH₃**, Amoniacó volátil
- NH₄⁺**, Amonio
- NIA**, Gen estructural de la nitrato reductasa
- NiR**, Nitrito reductasa
- NO₃⁻**, Nitrato
- NO_x**, Óxidos de nitrógeno
- NR**, Nitrato reductasa
- NRT1**, Familia de transportadores de nitrato de baja afinidad
- NRT2**, Familia de transportadores de nitrato de alta afinidad
- PCR**, Polymerase chain reaction
- PR10**, Proteína relacionada a patogénesis

PTR, Peptide transporters
p/v, Peso/volumen
RL, Raíces laterales
RP, Raíz primaria
SERK, Cinasa relacionada a embriogénesis somática
Ton, Toneladas
V-ATPasa, ATPasa vacuolar
V-PPasa, H⁺-pirofosfatasa
v/v, Volumen/volumen
VPS26, Proteína de sorteo vacuolar
WO₄⁻², Tungstato

RESUMEN

La distribución espacial y temporal del nitrógeno en el suelo es muy variable. Los suelos donde se desarrolla el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) no son la excepción.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de condiciones heterogéneas de nitrato (NO_3^-) sobre el sistema radical de chile habanero, así como la expresión génica diferencial inducida por la presencia de NO_3^- . Se observó que el NO_3^- indujo una serie de respuestas en el sistema radical de chile habanero: estimuló localmente la formación y la elongación de las raíces laterales (RL), inhibió el desarrollo de la raíz primaria (RP) en función del tiempo e inhibió sistémicamente la formación de RL en los segmentos sin NO_3^- . Al exponer las raíces a 1 mM de NO_3^- durante tiempo cortos (0 hasta 4 h) se observaron modificaciones en la expresión de algunos genes presentes en el ápice radical, destacándose la estimulación de los genes que codifican a las proteínas VPS6, V-ATPasa, una proteína 14-3-3 y la NR. Este trabajo representa el primer reporte sobre los cambios en la expresión génica en el sistema radical de chile habanero inducidos por NO_3^- . Los patrones de expresión indican que existen conjuntos de genes que responden de manera específica a la presencia de NO_3^- .

Como lo constatan nuestros resultados, aunados a diversos reportes previos, las plantas poseen múltiples respuestas al NO_3^- , lo cual les proporciona un mecanismo de regulación capaz de adaptar la expresión de los distintos genes en función de las condiciones a las que se exponen.

ABSTRACT

The nitrogen distribution is spatially and temporally highly variable in the soil. The soils where habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) develops are not an exception.

The aim of this work was to study the effect of the heterogeneous NO_3^- conditions on habanero pepper root system, and as well as the differential gene expression induced by the NO_3^- . It was observed that NO_3^- induced a series of responses in habanero pepper root system: locally it stimulated lateral root (RL) formation and elongation, inhibited primary root (PR) development in a time-dependent manner, and inhibited systemically the RL formation in segments without NO_3^- . By exposing roots to 1 mM NO_3^- for times (0 up to 4 h), changes in the expression of some genes from root tips were observed, highlighting the stimulation of genes encoding proteins VPS6, V-ATPase, a 14-3-3 protein and NR. This is the first report on changes in NO_3^- inducing gene expression in habanero pepper root system. The expression patterns indicated that there are sets of genes that respond specifically to NO_3^- presence.

Our results are in agreement with previous studies, regarding the multiple responses that the plants have to NO_3^- , which provides a regulatory mechanism able to adapt the expression of different genes depending on the conditions that plant is exposed.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento del sistema radical se lleva a cabo a través de tres procesos: la división celular del meristemo de la raíz primaria, que provoca el crecimiento en longitud; la formación de raíces laterales, que aumenta la capacidad de exploración del sistema; y la formación de pelos radiculares, que incrementa el área total tanto de la raíz primaria como de las raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2003).

De los macronutrientes requeridos por las plantas, el nitrógeno (N) es el que se consume en mayor abundancia y el que limita de manera más significativa el crecimiento (Crawford, 1998). Muchas especies vegetales son capaces de absorber y asimilar nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+), urea y aminoácidos como fuentes de N, pero la respuesta a cada forma en particular varía entre una especie y otra (Haynes, 1978; Miller *et al.*, 2007).

El desarrollo del sistema radical está altamente relacionado con la distribución y disponibilidad de los nutrientes en el suelo (Zhang & Forde, 2000). Dicha disponibilidad es espacial y temporalmente heterogénea, pudiendo variar su concentración en un orden de hasta 1000 veces, en una distancia de centímetros o en un curso de horas, tal y como sucede con el N inorgánico (Bloom *et al.*, 2006).

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye en más de un 90 % al volumen de producción estatal (Tun, 2001). El suelo, es el principal factor limitante para la producción de chile habanero en Yucatán. Los luvisoles (de fertilidad mediana, buen drenaje y fácil manejo) son de buen potencial para el cultivo de esta planta; las rendzinas (rico en humus, poco profundo, desarrollado sobre roca caliza) y cambisoles (fertilidad media a baja, bien drenados, de profundidad mediana, accesibles en su manejo, al carecer de cubierta vegetal son muy susceptibles a la erosión) tienen un potencial mediano, pero pueden obtenerse altos rendimientos a pesar de su pedregosidad y poca profundidad mediante ciertas prácticas de manejo (Tun, 2001). En Yucatán, *C. chinense* crece en condiciones de suelo desfavorables para los cultivos, dado que el 90 % de los suelos de la península presentan una concentración alta de materia orgánica, un pH entre 7.5 y 8.5, son pobres en N y fósforo (P) y presentan altas concentraciones de potasio (K), aunque la disponibilidad del mismo es baja (Ramírez *et al.*, 2005). El sistema radical

de esta especie tiende a ser poco desarrollado y con bajo vigor de crecimiento.

A pesar de que México es el país con la mayor diversidad génica de *Capsicum* y de que el chile es prácticamente sinónimo de la nacionalidad mexicana y de su cocina, nuestro país no es el productor más importante: las bases de la FAO lo posicionaron en segundo lugar en el 2006, superándolo China. Además, aunque en México el chile es un producto culturalmente importante, existe poca investigación sobre esta especie (López, 2003).

Dada la importancia que presenta la captación y asimilación de los nutrimentos, particularmente de nitrógeno, para el desarrollo de las plantas y las condiciones precarias, nutrimentalmente hablando, a las que se enfrentan algunos cultivos, y situándose en el entorno en que se desarrolla el chile habanero en Yucatán, resulta un modelo interesante para evaluar el efecto de la distribución heterogénea de nitrógeno inorgánico sobre las raíces de *C. chinense*.

Además de su papel como nutrimento, NO_3^- se considera una molécula señal, dicho papel ha sido demostrado en diferentes eventos, tales como: la estimulación de su propio sistema de transporte (Rao & Rain, 1976), el incremento de la actividad meristemática en las raíces laterales y la regulación de la ramificación de la raíz (Drew *et al.*, 1975; Zhang & Forde, 1998) así como la inducción de la expansión celular en la hoja (Forde, 2002). Sin embargo, no todas las especies vegetales responden de manera similar a la heterogeneidad de NO_3^- en el suelo, por lo que se plantea la siguiente pregunta: ¿existen mecanismos conservados y/o particulares entre diferentes especies para la respuesta a NO_3^- ? El desarrollo de este proyecto contribuirá a poder responder esta pregunta, brindando conocimiento de esta respuesta en la especie *Capsicum chinense*.

CAPÍTULO I

Antecedentes, objetivos y estrategia experimental

I.1. ANTECEDENTES

I.1.1. SISTEMAS RADICALES

I.1.1.1. LA RAÍZ COMO PARTE INTEGRAL DE LA PLANTA

Las plantas superiores están constituidas principalmente por tres tipos de órganos: la raíz, el tallo y las hojas. Estos órganos están presentes en proporciones diferentes y con varias modificaciones. El tallo y las hojas conforman la parte aérea, mientras que la raíz representa la parte subterránea.

La raíz y la parte aérea difieren no sólo en estructura, sino también en las funciones que efectúan. Las plantas utilizan las raíces como sostén y para la absorción de agua y nutrientes y a la parte aérea para captar energía de los fotones de la radiación solar durante el proceso de la fotosíntesis, así como para la transpiración. Estas funciones, a su vez, determinan la relación raíz-parte aérea, que suele ser muy compleja. Ambas partes intercambian sustancias de crecimiento y otros metabolitos (Kolek & Kozinka, 1992).

La raíz es el órgano generalmente subterráneo del cuerpo de las traqueófitas. Se caracteriza por su crecimiento definido, geotropismo positivo, ausencia de yemas, hojas, nudos y entrenudos y por su especialización como órgano de anclaje, absorción de agua y sales minerales disueltas, acumulación de diversas sustancias orgánicas y en ocasiones excepcionales, como unidad de propagación. La raíz se origina a partir de la radícula del embrión o polo radical del eje embrionario y se conoce como raíz principal o primaria (PR). La radícula crece, dando origen a la RP y se fija al suelo desde los primeros estadios, de esta forma se garantiza el posterior crecimiento y desarrollo de la planta; a partir de la RP se forman raíces laterales (RL). En las plantas se puede distinguir otro tipo de raíces: las adventicias, las cuales se originan de otras partes, diferentes al embrión (tallos y hojas). Este último tipo es frecuente en las monocotiledóneas, en particular en las gramíneas y en dicotiledóneas propagadas vegetativamente (Kolek & Kozinka, 1992).

Las raíces se desarrollan en el suelo, en condiciones de oscuridad, por lo tanto, son totalmente dependientes de la energía asimilada y producida por la fotosíntesis. En contraste, la parte aérea, que crece expuesta al aire y a la

luz, es completamente dependiente del agua y los nutrientes minerales absorbidos del suelo por la raíz. En conjunto, estas actividades son decisivas para garantizar el aumento de masa y volumen, tanto de la raíz como de la parte aérea. Un punto clave en la regulación y coordinación de dichas actividades se atribuye a los fitoreguladores y su intercambio entre raíz y parte aérea, en particular las auxinas y citocininas (Kolek & Kozinka, 1992). Entre la raíz y la parte aérea existe un balance funcional, que bajo ciertos límites se mantiene constante durante largos periodos de la vida de la planta. Por supuesto, el balance es dinámico y se renueva después de cualquier modificación del entorno (Kolek & Kozinka, 1992).

En la raíz se sintetizan hormonas como las citocininas, ácido abscísico (ABA) y giberelinas, posteriormente se translocan a la parte aérea. Las auxinas se sintetizan en la parte aérea (hojas jóvenes y cotiledonares) (Ljung *et al.*, 2001) y se translocan a la raíz, en esa zona las auxinas regulan la longitud de la RP, el número de RL y la respuesta gravitrópica (Peret *et al.*, 2009).

I.1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS RADICALES

Se observa una amplia variación en la arquitectura del sistema radical en las diversas especies, lo cual sugiere que está determinada por factores genéticos, entre otros. Se reconocen dos tipos de sistema radical, de acuerdo a la forma de originarse la RP (Fitter, 1987):

- a) Sistema alorrízico: se origina en plantas que presentan un embrión típicamente bipolar, a partir del eje hipocótilo-radícula del embrión, en el extremo opuesto al ápice del vástago. Este sistema se presenta en las espermatofitas y en forma general, el sistema radical adulto consiste de una RP con ramificaciones (Fig. 1.1 a).
- b) Sistema homorrízico: la RP se encuentra ubicada lateralmente respecto al vástago, como ocurre en los pteridofitos y en ellos el sistema radical adulto es adventicio (Fig. 1.1 b). Una situación particular ocurre en las monocotiledóneas, debido a que, aún presentando una organización bipolar de su embrión, la RP es de corta duración y es sustituida por raíces adventicias, que representan el sistema radical definitivo. Por esta razón, se habla de un sistema radical homorrízico secundario.

El sistema alorrízico se encuentra típicamente en dicotiledóneas, incluyendo especies modelo tales como *Arabidopsis*, tomate y chícharo (Fig. 1.1 a). Generalmente, incluye al menos dos tipos de raíces: RP y RL. Los sistemas

radiculares alorrízicos están dirigidos por la RP, la cual produce RL que pueden formar raíces de órdenes superiores. La presencia de raíces adventicias en sistemas alorrízicos es poco común, pero ocasionalmente emergen del hipocótilo o del tallo, particularmente sobre heridas (Osmont *et al.*, 2007).

En contraste, el sistema homorrízico se asocia a las plantas monocotiledóneas (Fig. 1.1 b) y se caracteriza por el desarrollo de muchas raíces adventicias paralelas a la RP (Raven *et al.*, 1992). En realidad, la mayoría de los sistemas radiculares en maíz y arroz están constituidos por raíces que crecen post-embriónariamente. Dependiendo del tejido del que emerjan se les asigna un nombre específico, como raíces coronarias o raíces de soporte (Hochholdinger, 2004). Además, algunas monocotiledóneas, como el maíz, forman raíces embriogénicas adicionales, las cuáles emergen de los nodos escutelares y se denominan raíces seminales. La RP de las monocotiledóneas generalmente es llamada raíz seminal. Todos los tipos de raíces pueden ramificar y formar RL (Feldman, 1994).

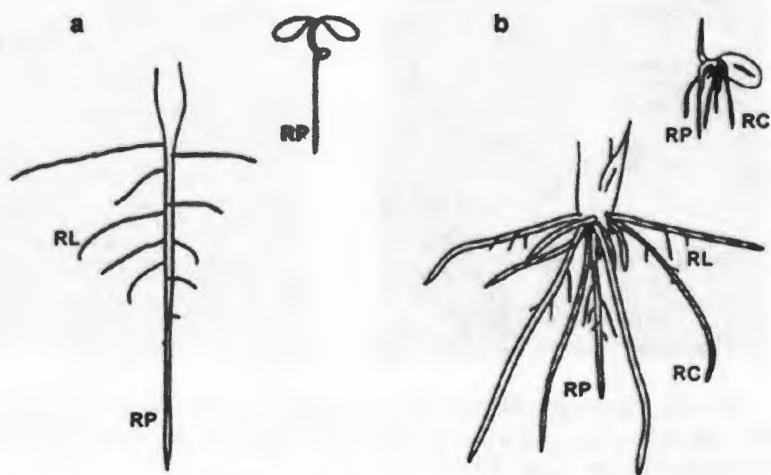


Figura 1.1. Morfología de los sistemas radicales (a) Representación esquemática de un sistema radical alorrízico típico como se observa en dicotiledóneas, ejemplificado en *Arabidopsis* a los 5 y 12 días después de la germinación. (b) Representación esquemática de un sistema radical homorrízico típico como se aprecia en monocotiledóneas, ejemplificado en arroz a los 7 y 14 días después de la germinación. Los pelos radiculares no están representados. RP, raíz primaria; RL, raíz lateral; RC, raíz coronaria (Tomado de Osmont *et al.*, 2007).

La RP es importante en todo el ciclo de vida de los sistemas alorrízicos; sin embargo, en los homorrízicos solo es importante durante las primeras etapas de desarrollo de las plántulas (Feldman, 1994).

Existe otra clasificación con base al tipo de ramificación, distinguiéndose dos tipos de sistema radical, el axonomorfo y el fasciculado (Raven *et al.*, 1992). El axonomorfo se presenta en gimnospermas y dicotiledóneas, consiste en una RP que se desarrolla más que las laterales y predomina durante toda la vida del sistema radical, distinguiéndose un eje bien definido. En el caso del fasciculado, se desarrollan un conjunto de raíces, todas equivalentes en cuanto a longitud y grosor, no habiendo predominio de la RP, como ocurre en el sistema radical adulto de las monocotiledóneas. Un ejemplo de ambos sistemas se representa en la Fig. 1.2.

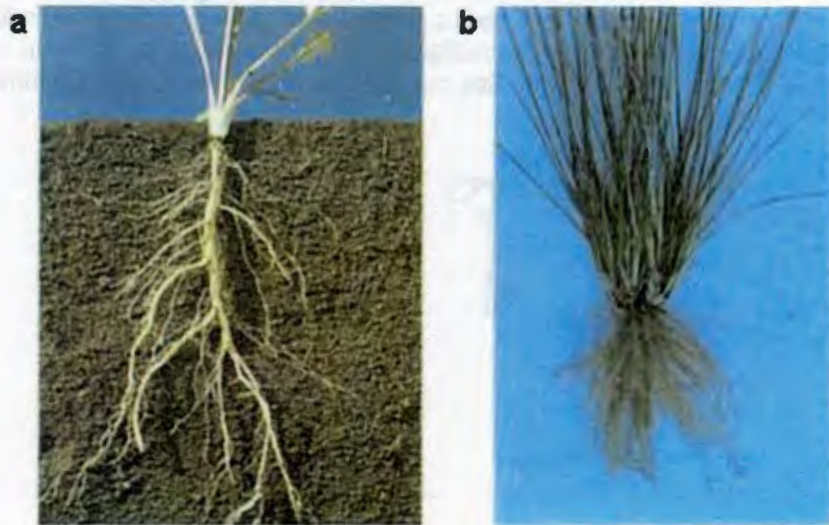


Figura 1.2. Dos tipos de sistemas radicales (a) Sistema de raíz axonomorfa del diente de león (*Taraxacum officinale*). (b) Sistema de raíz fasciculada de una gramínea (Raven *et al.*, 1992).

I.1.1.3. PROCESOS DE CRECIMIENTO RADICAL

Los procesos que afectan mayoritariamente la arquitectura y, por ende, el crecimiento del sistema radical son tres: 1) la división celular del meristemo de la RP, 2) la formación de RL que aumenta la capacidad de exploración del sistema radical, y 3) la formación de pelos radiculares que incrementa el área total de la RP y de las RL (López-Bucio *et al.*, 2003) (Fig. 1.3).

El desarrollo de las raíces en el suelo está regulado por señales endógenas que mantienen los patrones y la actividad del meristemo apical de la raíz, a su vez, contribuyen en la generación de nuevas RL. Entre ellos, las auxinas juegan un papel muy importante, aunque otras hormonas (citocininas, brasinoesteroides, etileno y giberelinas) también contribuyen a la arquitectura general de la raíz (Jovanovic *et al.*, 2008).

Con el objetivo de estudiar las bases moleculares de los procesos que conllevan al crecimiento radical, se ha llevado a cabo el aislamiento y la caracterización de genes que se expresan en éste órgano. Desde finales de los 80's se han reportado genes que se expresaban preferencialmente en la raíz de *Pisum sativum* L. en comparación a sus otros órganos (Evans *et al.*, 1988). Se conocen las funciones de algunos de estos genes en la raíz: la glutamino sintasa citosólica en *Glycine max* var. Prize (Miao, 1991) y un gen que codifica para un transportador de NO_3^- en *Arabidopsis* (Tsay *et al.*, 1993). También se han realizado estudios en raíces de *Zea mays* (John *et al.*, 1992) a partir de los cuales se reportó el gen *zrp3*, relacionado con el desarrollo de la misma. En estudios en *Oriza sativum* se analizaron las clonas RCc2 y RCc3 (relacionadas con ZRP3 de maíz), ubicándolas como miembros de una familia conservada de genes específicos de raíz (Xu *et al.*, 1995).

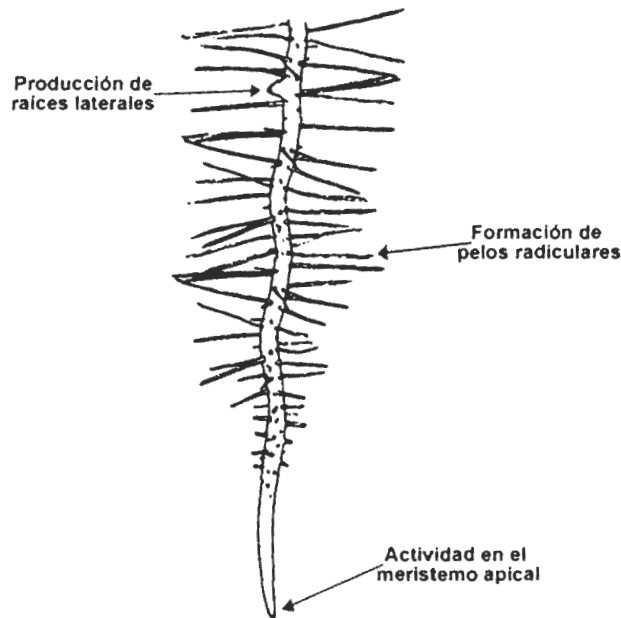


Figura 1.3. Tipos de desarrollo del sistema radical (Adaptado de Schiefelbein & Benfey, 1991).

A su vez, se ha descubierto que varios de estos genes codifican a factores de transcripción (FT), los cuales interaccionan con secuencias de ADN que actúan en *cis*, o bien, con otros reguladores transcripcionales que activan o reprimen algunos genes blanco, lo cual puede conducir a la expresión de genes que provoquen importantes cambios morfológicos, fisiológicos y/o metabólicos (Montiel *et al.*, 2004). Entre las funciones de los FT ya descritos se mencionan: la estabilidad del meristemo radical (MP, BDL) el patrón radial de la raíz (SHR, SCR), los patrones de las células epidérmicas (GL2, CPC, TRY, ETC1, WER, GL3/EGL3), la iniciación de las RL (NAC1, IAA28, SLR1/IAA14, KNAT6) y la iniciación de las RL inducida por NO_3^- (ANR1) (Montiel *et al.*, 2004). Esto nos indica la factibilidad de analizar molecularmente los sucesos trascendentales en el desarrollo de la raíz.

I.1.2. NUTRIMENTOS

Las sustancias inorgánicas más importantes para las funciones vitales de las plantas son: el agua, los nutrientes minerales y los gases CO_2 y O_2 . Estas sustancias, algunas de las cuales son absorbidas predominantemente por la raíz y otras por la parte aérea, son translocadas entre la raíz y la parte aérea, ya sea en su forma original o después de sufrir ciertas transformaciones (Kolek & Kozinka, 1992).

El suelo es un elemento de enlace entre los factores bióticos y abióticos y se le considera un hábitat para el desarrollo de las plantas (rizósfera). Presenta diversos estados físicos, ya que contiene gases, líquidos y componentes sólidos, minerales, materia orgánica y organismos de varios *phyla* (Fig. 1.4).

Las plantas absorben nutrientes del suelo mayoritariamente por la raíz. Los nutrientes entran en la raíz como componentes de soluciones acuosas. Las vías de su movimiento pueden ser, aunque no necesariamente, las mismas que las del agua. Esto es porque la absorción de agua y la absorción de nutrientes son dos procesos diferentes y se controlan por mecanismos distintos (Kolek & Kozinka, 1992).



Figura 1.4. Representación de la rizósfera y sus componentes mayoritarios (Adaptado de Epstein & Bloom, 2005).

Los nutrientes se pueden dividir en macronutrientes y micronutrientes, de acuerdo a las concentraciones en que son requeridos por las plantas. La concentración de macronutrientes en tejidos vegetales, N, por ejemplo, puede ser hasta mil veces mayor que la concentración del micronutriente Zn. Utilizando esta clasificación, los siguientes elementos se pueden definir como macronutrientes: C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Na y Si. Los micronutrientes son: Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Cl y Ni. Esta división de los nutrientes vegetales es un tanto arbitraria, y en muchos casos, las diferencias entre la concentración de macronutrientes y micronutrientes son poco precisas. Por ejemplo, la concentración de Fe o Mn en los tejidos vegetales llega a ser casi tan alta como la concentración de S o Mg (Mengel & Kirkby, 2001).

I.1.2.1. DISTRIBUCIÓN Y DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTOS EN EL SUELO

El desarrollo del sistema radical está altamente relacionado con la disponibilidad y distribución de los nutrientes minerales (Zhang & Forde, 2000). En el suelo, la disponibilidad de recursos es desigual y la mayoría lo son en un alto grado de heterogeneidad (Lechowicz & Bell, 1991; Jackson &

Caldwell, 1993; Gross *et al.*, 1995). La disponibilidad espacial y temporal de nutrimentos en el suelo no es uniforme, pudiendo variar su concentración en un orden de hasta 1000 veces, en una distancia de centímetros o en un curso de horas, tal y como sucede con el nitrógeno inorgánico (Bloom *et al.*, 2006).

La disponibilidad teórica de los diferentes nutrimentos en los suelos orgánicos varía en función del pH, ya que un pH alto disminuye la solubilización y absorción de Cu, Zn, Fe y Co y especialmente del Mn, incrementando, en cambio, la del Mo y el S (Kolek & Kozinka, 1992). También varía dependiendo de la textura, ya que en suelos muy arenosos es frecuente la carencia de Mn, Cu, Zn, Bo y Mo, debido a que dichos nutrimentos son lixiviados en estos suelos con gran facilidad (Kolek & Kozinka, 1992). De igual manera, la actividad microbiológica, el drenaje de los suelos, las condiciones de óxido-reducción, las condiciones climáticas y las variaciones estacionales intervienen en la disponibilidad de nutrimentos (Kolek & Kozinka, 1992).

Las plantas manifiestan síntomas carenciales cuando no reciben todos los nutrimentos que requieren. Las deficiencias nutricionales pueden provenir realmente por carencia o bien, porque otros nutrimentos impidan la absorción de ese determinado elemento o compuesto. En este segundo caso se trata de nutrimentos antagónicos (Strasburger, 1997). Además, los síntomas carenciales también pueden deberse a la movilidad del nutrimento en el suelo, ya que estos pueden permanecer móviles, tales como N (en forma de NO_3^-), K, Mo, P, Cl, Na, Zn y Mg o bien, inmóviles como Ca, S, Fe, B y Cu (Strasburger, 1997).

El uso preferencial de los parches ricos en nutrimentos, fenómeno muy común en los pastos (Hutchings & de Kroon, 1994), es una respuesta común ante la heterogeneidad, aunque no universal. Robinson analizó su frecuencia y los tipos de respuesta exhibidas cuando la fuente de nutrimentos del suelo es heterogénea (Robinson, 1994). Por otra parte, en *Lolium perenne* se compararon las respuestas de parches de N con diferentes características físicas y químicas utilizando ^{15}N marcado, comprobándose la importancia de que la relación C:N sea baja durante la toma de N, para que ésta se vea favorecida; así como la efectividad de las raíces para competir con los microorganismos por nutrimentos Hodge *et al.* (2000a, 2000b y 2000c).

1.1.2.2. NITRÓGENO EN EL SUELO

El N se encuentra en el suelo como una mezcla compleja de formas orgánicas e inorgánicas. Además de presentar cambios estacionales y

diurnos, también se caracteriza por encontrarse distribuido de manera heterogénea. En la mayoría de los suelos, más del 90 % del contenido de N es orgánico. Este nitrógeno orgánico es producto, principalmente, de la biodegradación de las plantas y los animales muertos. Es reducido eventualmente a NH_4^+ , el cual puede oxidarse a NO_3^- por la acción de bacterias en el suelo. El N enlazado al humus del suelo es especialmente importante para mantener la fertilidad del suelo. Los organismos que fijan N ordinariamente no pueden proporcionar el N suficiente para satisfacer la demanda de las plantas. El N inorgánico de los fertilizantes se pierde a menudo por lixiviación en el agua de lluvia. El humus del suelo, sin embargo, sirve como depósito del N requerido por las plantas, con la ventaja adicional de que su velocidad de descomposición, y por tanto, de liberación para las plantas, es aproximadamente paralela al crecimiento de éstas: rápida durante la estación calurosa del crecimiento y lenta durante los meses de invierno (Manahan, 2007).

El N está generalmente más disponible para las plantas como ión nitrato, NO_3^- . Algunas plantas, como el arroz, pueden utilizar el N en forma de NH_4^+ ; sin embargo, otras plantas se intoxican por esta forma. Cuando se aplica el N a los suelos en forma de amonio las bacterias nitrificantes realizan una función esencial, convirtiéndolo en ión NO_3^- disponible (Manahan, 2007).

1.1.2.2.1. NITRÓGENO INORGÁNICO

El N es un elemento esencial requerido por todas las plantas, constituye del 1.5 al 2 % del peso seco de éstas y aproximadamente el 16 % de las proteínas vegetales (Frink *et al.*, 1999). Este elemento es el principal componente de los nutrientes absorbidos por la raíz. La mayoría de éste se incorpora a la materia orgánica de la planta y es utilizado para la síntesis de aminoácidos y proteínas. La síntesis de ciertos aminoácidos y amidas, principalmente del grupo del glutamato y el aspartato, se efectúan predominantemente en las raíces. En contraste, aminoácidos del grupo de la serina son sintetizados principalmente en las hojas (Kolek & Kozinka, 1992).

La disponibilidad de N es el principal factor limitante para el crecimiento de las plantas y la producción de los cultivos. Las plantas pueden utilizar una amplia gama de especies de N, incluyendo el amoníaco volátil (NH_3), óxidos de N (NO_x), N mineral (NO_3^- y NH_4^+) y N orgánico (urea, aminoácidos, péptidos, etc.), pero la respuesta a cada forma en particular de N varía entre una especie y otra (Haynes, 1978; von Wirén *et al.*, 1997). Generalmente, las plantas adaptadas a bajos pH y suelos reducidos, como las que habitan en los bosques maduros o en la tundra ártica, tienden a tomar NH_4^+ o aminoácidos, mientras que las plantas adaptadas a pH altos y suelos

aeróbicos prefieren tomar NO_3^- (Maathuis, 2009). Las dos fuentes primarias de N inorgánico para las plantas son el NH_4^+ y el NO_3^- ; sin embargo, en la mayoría de los suelos utilizados para la agricultura, el NO_3^- es la principal fuente de N (Crawford & Glass, 1998; Hirsch & Sussman, 1999). Debido a los altos requerimientos de N en los cultivos vegetales, la fertilización con N es una de las principales inversiones del mundo agrícola, con 80 millones de toneladas métricas de fertilizantes con N aplicado anualmente (Frink *et al.*, 1999). También hay consecuencias negativas del uso excesivo de fertilizantes con N en la producción agrícola, porque solo se aprovechan dos tercios del N aplicados y el no absorbido puede lixiviarse y contaminar los mantos acuíferos (Frink *et al.*, 1999).

La relación en que se encuentren presentes NO_3^- y NH_4^+ es de suma importancia para el desarrollo de las plantas. Por ejemplo, el crecimiento óptimo de las raíces de *Solanum lycopersicum* en suelos cuya relación de NO_3^- y NH_4^+ es 3:1 y es inhibido cuando la concentración de amonio es muy alta (Bloom *et al.*, 1993). Por el contrario, el abeto (*Picea glauca*), tiene una gran preferencia por el NH_4^+ (Kronzucker *et al.*, 1997), mientras que algunos pastos del ártico prefieren aminoácidos (Chapin *et al.*, 1993). En general, la mayoría de los cultivos se desarrollan favorablemente con una mezcla de NO_3^- y NH_4^+ (Crawford, 1998).

I.1.2.2.2. MOVILIDAD DEL N EN EL SUELO

La difusión del N en el suelo depende del gradiente de concentración y del coeficiente de difusión para la forma particular de N. A pesar de que los coeficientes de difusión para el NO_3^- y el NH_4^+ en agua son similares (Tabla 1.1), los valores en el suelo se determinan por factores adicionales como la carga y el tamaño del ión, la viscosidad del agua, la temperatura, la humedad del suelo, la tortuosidad y la capacidad amortiguadora del suelo. Para el NO_3^- , el coeficiente de difusión efectiva en el suelo es de $3.26 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, mientras que para el NH_4^+ es de 10 a 100 veces menor (Owen & Jones, 2001). Como consecuencia, el NH_4^+ es menos lixiviado que el NO_3^- en los suelos.

En muchos suelos agrícolas la concentración de NO_3^- se encuentra en un rango entre 1 a 5 mM (Owen & Jones, 2001). Sin embargo, como consecuencia de su utilización por las plantas y los microorganismos y su lixiviación, las concentraciones de este ión en la solución del suelo son muy variables (Miller & Cramer, 2004).

El NH_4^+ , al poseer carga positiva, interacciona con las partículas del suelo, lo que genera una mayor disponibilidad del mismo. Las concentraciones de NH_4^+ en el suelo se encuentran en un rango entre 20 y 200 μM (Owen &

Jones, 2001); sin embargo, el pH bajo, las bajas temperaturas, la acumulación de compuestos fenólicos y los suelos anaeróbicos inhiben la nitrificación, generando la acumulación de NH_4^+ (Britto & Kronzucker, 2002). Por otra parte, las actividades agrícolas e industriales (contaminación) han dado lugar a la acumulación de NH_4^+ en muchos suelos agrícolas. Así que en algunos sistemas, la forma predominante de N en el suelo es el NH_4^+ con concentraciones promedio de 2 mM en suelos forestales y por encima de 20 mM en algunos suelos agrícolas (Britto & Kronzucker, 2002). Estas altas concentraciones de NH_4^+ son potencialmente tóxicas para algunas especies, posiblemente debido a problemas con el equilibrio en el pH (Raven & Smith, 1976), desequilibrio entre aniones y cationes (Chaillou & Lamaze, 2001) y/o la pérdida de energía resultante del flujo de salida de los iones (Britto & Kronzucker, 2002).

Tabla 1.1 Índices de difusión y comportamiento de absorción de N inorgánico (NH_4^+ , NO_3^-) y N orgánico disuelto (lisina, glicina, glutamato) en el suelo. Los cálculos están basados en la adición de $15.5 \mu\text{M}$ de N soluble en el suelo (modificado de Owen & Jones, 2001).

	Unidad	NO_3^-	NH_4^+	Lisina	Glicina	Glutamato
Coefficiente de difusión en agua	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	1.90×10^{-9}	1.96×10^{-9}	9.03×10^{-10}	1.05×10^{-9}	6.94×10^{-10}
Coefficiente de difusión efectiva en el suelo	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	3.26×10^{-10}	2.70×10^{-12}	1.12×10^{-12}	9.03×10^{-12}	1.20×10^{-11}
Coefficiente de difusión del suelo relativo a NO_3^- en el suelo		1	8.23×10^{-3}	3.42×10^{-3}	2.76×10^{-2}	3.68×10^{-2}
Distancia de difusión en un día	m	7.51×10^{-3}	6.80×10^{-4}	4.40×10^{-4}	1.25×10^{-3}	1.44×10^{-3}
Concentración en la solución del suelo	μM	77.3	0.62	0.55	3.87	7.73
Cantidad absorbida por el suelo	$\mu\text{mol L}^{-1}$ de suelo	0.00	15.3	15.4	14.7	13.9
Total en el suelo	$\mu\text{mol L}^{-1}$ de suelo	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5
Porcentaje de N absorbido del total en el suelo	%	0	99.2	99.3	95.0	90.0

I.1.3. SISTEMAS DE TRANSPORTE CELULAR DE N INORGÁNICO

I.1.3.1. NITRATO

El transporte de NO_3^- desde la rizósfera hasta el citoplasma de las células corticales de la raíz es termodinámicamente desfavorable en términos de los gradientes de potencial eléctrico y químico. La concentración de NO_3^- , en el citoplasma de células radicales de cebada expuestas al mismo, se ha estimado entre 5 y 30 mM (Zhen *et al.*, 1991; King *et al.*, 1992). Asimismo, se ha demostrado que, excepto bajo determinadas condiciones (King *et al.*, 1992), la absorción de NO_3^- requiere energía, probablemente como fuerza protón-motriz.

Utilizando métodos electrofisiológicos se ha encontrado una hiperpolarización de las membranas después del tratamiento con NO_3^- (McClure *et al.*, 1990). Este comportamiento estuvo estrechamente relacionado con la actividad de la H^+ -ATPasa presente en la membrana plasmática en raíces de maíz. Se propone que el transporte de NO_3^- se efectúa mediante un mecanismo tipo simporte H^+/NO_3^- cuando la estequiometría H^+/NO_3^- es mayor que 1, lo cual sería la causa de la estimulación de la H^+ -ATPasa. Glass *et al.*, (1992) observaron este mecanismo simporte en células radicales de cebada, con una estequiometría de 2 H^+/NO_3^- . Sin embargo, la presencia de un transportador del tipo simporte H^+/NO_3^- en vesículas aisladas de raíces de maíz, podría ser modulado por el estatus de NO_3^- de las células radicales como demostraron Ruiz-Cristin & Briskin (1991) y Lu & Briskin (1993). Estas observaciones sugieren una estrecha relación entre el transporte de NO_3^- y la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana, especialmente en condiciones inducidas de absorción de NO_3^- . Matzke & Mengel (1993) propusieron que la H^+ -ATPasa de membrana estaba implicada en la reabsorción de aniones, cuya actividad se incrementaba al aumentar la absorción de NO_3^- . Santi *et al.* (1995) observaron que al inducir la absorción de NO_3^- en raíces de maíz, la actividad de H^+ -ATPasa en el plasmalema también se incrementaba.

La absorción de NO_3^- en plantas superiores ha sido bien caracterizada a nivel cinético. La presencia de NO_3^- en el medio induce su propio sistema de absorción (Tompkins *et al.*, 1978; Deane-Drummond, 1984; MacKown & McClure, 1988). También, estudios en plantas de cebada, muestran que el flujo de NO_3^- se reduce en concentraciones bajas, mientras que a concentraciones altas este proceso no se afecta (Glass *et al.*, 1990). Esto se podría explicar mediante la existencia de dos sistemas de transporte, uno de baja afinidad y otro de alta afinidad. Se plantea que el de baja afinidad es constitutivo y de primer orden, respecto a la concentración externa de NO_3^- , mientras que el de alta afinidad es inducible y saturable por la concentración externa de NO_3^- (Siddiqi *et al.*, 1989).

También, se ha reportado que existe un sistema saturable constitutivo con una baja K_m , tanto para el NO_3^- como para el NO_2^- , y otro con una cinética lineal en plantas de cebada que no han sido inducidas con NO_3^- . El de baja K_m sigue una cinética típica de Michaelis-Menten y se satura con concentraciones entre 40 y 100 μM . El sistema lineal se encuentra en un intervalo de concentraciones de 100 a 500 μM de NO_3^- (Aslam *et al.*, 1992). En cebada, el NO_3^- es modulador de su propia absorción. La inducción del sistema de absorción del NO_3^- parece depender de una concentración citoplasmática crítica, pero cuando esa concentración es muy alta, se transporta rápidamente a otros lugares, por lo que su concentración en la raíz disminuye, provocando una inhibición del sistema de absorción. Sin embargo, no está claro si la concentración de NO_3^- de la raíz *per se* o de algún producto de la asimilación del NO_3^- son los responsables de esa retroalimentación negativa (Siddiqi *et al.*, 1989).

La mayoría de estos experimentos se hicieron en especies de cereales y se basaron en medidas químicas de la desaparición de NO_3^- de la solución nutritiva, lo que pudo causar errores al intentar determinar los flujos netos de NO_3^- . Siddiqi *et al.*, (1990) utilizaron $^{13}\text{NO}_3^-$, en plantas de cebada, para comprobar el influjo de NO_3^- en las raíces y confirmaron el patrón bifásico de absorción de NO_3^- : el sistema de transporte de alta afinidad (HATS, por sus siglas en inglés), con una cinética típica de Michaelis-Menten que opera a concentraciones de NO_3^- inferiores de 1 mM, y el sistema de transporte de baja afinidad (LATS, por sus siglas en inglés), que opera a concentraciones superiores a 1 mM de NO_3^- y que generalmente sigue una cinética lineal (Doddema & Telkamp, 1979; Goyal & Huffaker, 1986; Pace & McClure, 1986; Siddiqi *et al.*, 1990; Kronzucker *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que el HATS es sensible a inhibidores metabólicos (tungstato, metionina sulfoximina y azaserina) y parece ser un sistema de transporte activo (Siddiqi *et al.*, 1990). El mecanismo de acoplamiento de energía para el transporte activo de NO_3^- por el HATS ha sido investigado por medio de estudios electrofisiológicos en un limitado número de especies (Glass *et al.*, 1992). Estas observaciones serían consistentes con que el mecanismo simporte $2\text{H}^+:1\text{NO}_3^-$ es promovido por la energía derivada del gradiente de protones generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Santi *et al.*, 1995). La absorción de NO_3^- está asociada con la depolarización de la membrana (creada por una diferencia de potencial eléctrico $\Delta\Psi$), la cual es inducible por NO_3^- y saturable respecto a la concentración externa de NO_3^- (Glass *et al.*, 1992).

En 1998, Ivashikina & Feyziev, propusieron la existencia de un mecanismo por el cual el balance de carga durante la absorción de NO_3^- está regulado en células de la raíz de maíz. Asimismo, estos autores muestran un posible

mecanismo que regula la absorción de NO_3^- en respuesta a diferentes cationes y que podría estar relacionado con cambios en los flujos pasivos de NO_3^- a través del plasmalema (Ivashikina & Feyziev, 1998).

El primer gen eucariótico de un transportador de NO_3^- se aisló hace 20 años y fue de *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al.*, 1991). Algunos años después, se aisló un gen homólogo en *Arabidopsis*, que, a pesar de también incluir los 12 dominios transmembranales putativos, no estuvo relacionado filogenéticamente con el gen de *Aspergillus* (Tsay *et al.*, 1993). Se han clonado varios transportadores de NO_3^- para diferentes especies, identificándose dos familias distintas en plantas: la NRT1, que agrupa a los componentes del grupo LATS y la NRT2, que incluye al grupo de los HATS (Crawford & Glass, 1998; Daniel-Vedele *et al.*, 1998; Forde & Clarkson, 1999; Forde, 2000; Williams & Miller, 2001).

En plantas superiores existe un gran número de genes de la familia NRT1. En contraste con el bajo número en otros organismos (seis en seres humanos, cuatro en *C. elegans*, tres en *Drosophila* y uno en levaduras), *Arabidopsis* posee 53 genes NRT1 y arroz 80, lo que sugiere que esta familia desempeña algunas funciones únicas en las plantas superiores. Mientras que para la familia NRT2 los números son más modestos, *Arabidopsis* cuenta con solo siete genes NRT2 (Tsay *et al.*, 2007).

1.1.3.2. AMONIO

El amonio (suma de NH_4^+ y NH_3) es central para la síntesis de los ácidos nucleicos, aminoácidos y otras moléculas orgánicas, así como un precursor producto de su catabolismo. En condiciones de pH cercanos a 7 solo existe ~1 % en forma de NH_3 . Estudios clásicos revelan que las membranas lipídicas sintéticas son impermeables al NH_4^+ , pero son relativamente permeables al NH_3 . En membranas biológicas el transporte de ambas especies puede ser significativo (Ludewig *et al.*, 2007). En plantas superiores la toma de NH_4^+ ocurre a través de dos sistemas de transporte: uno de alta afinidad (HATS) y otro de baja afinidad (LATS) (Miller *et al.*, 2001). Los HATS para NH_4^+ son saturables en rangos micromolares y son electrogénicos (Higinbotham *et al.*, 1964; Walker *et al.*, 1979a y 1979b; Felle, 1980; Wang *et al.*, 1994). Sin embargo, los LATS no son saturables aun en rangos milimolares (Ullrich *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1993).

Existen varias evidencias de que los transportadores de amonio tipo AMT, que pertenecen a los transportadores de alta afinidad, representan las principales vías para la toma de NH_4^+ . Sin embargo, la absorción excesiva de NH_4^+ , así como su liberación catabólica por los procesos dentro de la célula, pueden causar toxicidad. Por lo tanto, la captación de NH_4^+ debe ser

estrictamente regulada. Para regularse la homeostasis de NH_4^+ se sintetizan varios transportadores que difieren en sus propiedades bioquímicas, localización y en su regulación a nivel transcripcional. Al mismo tiempo, los transportadores tipo AMT están sujetos al control del status de N, tanto localizadamente como en toda la planta (Loqué & von Wirén, 2004). Hasta la fecha se han caracterizado diferentes transportadores de NH_4^+ (Tabla 1.2) en *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Brassica napus* y *Lotus japonicus*, los cuales se han localizado en diferentes tejidos vegetales.

Arabidopsis contiene seis secuencias codificantes para AMTs en su genoma, de las cuales se conoce su localización celular y subcelular, así como su expresión en los tejidos (Ludewig *et al.*, 2007).

Tabla 1.2 *Propiedades regulatorias y bioquímicas de los transportadores de amonio tipo AMT caracterizados para Arabidopsis thaliana (At), Lycopersicon esculentum (Le), Oryza sativa (Os), Brassica napus (Bn) y Lotus japonicus (Lj) (tomada de Loqué & von Wirén, 2004). — Indica datos no determinados.*

Transportador	Localización del ARNm	Regulación del ARNm por N	Regulación del ARNm por luz o C	Km para NH ₄ ⁺
AtAMT1;1	Raíz, hoja, tallo	Represión	Inducción	<0.5 µM ~20 µM
AtAMT1;2	Raíz, hoja	Represión	Inducción	25-40 µM 3.mM
AtAMT1;3	Raíz	Represión	Inducción	25-40 µM
AtAMT2;1	Raíz, hoja, tallo	Represión	—	~ 20 µM
LeAMT1;1	Raíz, hoja	Represión	—	10 µM
LeAMT1;2	Raíz, hoja	Inducción	—	60 µM
LeAMT1;3	Hoja	—	—	—
OsAMT1;1	Raíz, brote	Inducción/represión	Constitutivo	—
OsAMT1;2	Raíz (cofia)	Inducción/represión	Constitutivo	—
OsAMT1;3	Raíz	Represión	Inducción	—
OsAMT2;1	Raíz, brote	Constitutivo	—	—
OsAMT3;1	Raíz, brote	—	—	—
BnAMT1;2	Hoja	Constitutivo-represión	—	—
LjAMT2;1	Raíz, brote, nódulos	—	—	—

I.1.4. METABOLISMO DEL NITRÓGENO

Las primeras dos etapas en la asimilación de NO_3^- son la reducción del mismo a NO_2^- , y la reducción de NO_2^- a NH_4^+ . El mecanismo básico de la asimilación de NO_3^- en tejidos vegetales verdes en presencia de luz se representa en la Figura 1.5. Las dos enzimas que participan en el proceso son la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) (Hewitt, 1975).

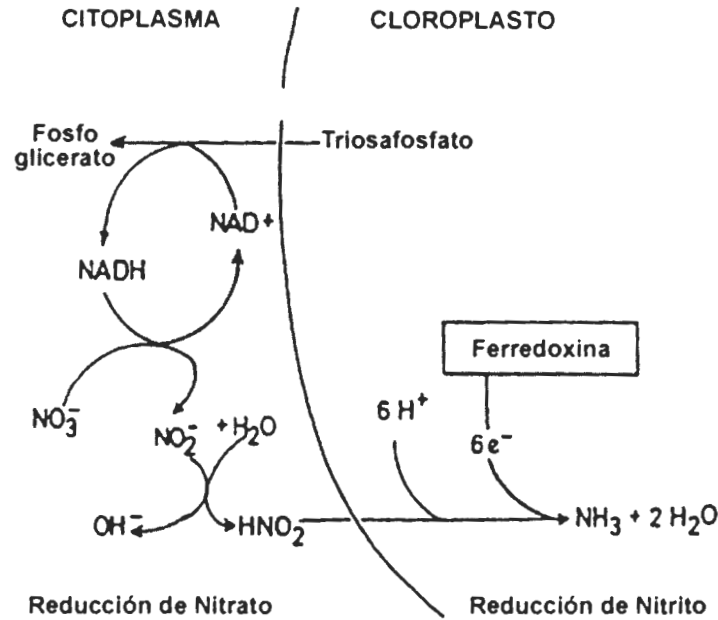


Figura 1.5. Esquema de la reducción de nitrato y nitrito (ácido nitroso) (adaptado de Mengel & Kirkby, 2001).

La forma más común de la NR utiliza NADH como donador de electrones, mientras que otras formas (localizadas predominantemente en tejidos sin clorofila, como las raíces) pueden utilizar tanto NADH como NADPH, mientras que la NiR emplea ferredoxina reducida o NADPH (Warner & Kleinhofs, 1992).

Existen dos posibles rutas de asimilación de NH_4^+ : la ruta GS/GOGAT (glutamina sintetasa / oxoglutarato amino transferasa) (Ullrich *et al.*, 1990) y la GDH (glutamato deshidrogenasa) (Ferrer, 1995) (Fig. 1.6). La GS cataliza la incorporación del amonio al grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato para producir glutamina y la GOGAT cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina al α -cetoglutarato para formar dos moléculas de glutamato. En circunstancias especiales, como puede ser una

concentración de amonio suficientemente alta, la asimilación de amonio puede seguir caminos alternativos como puede ser la incorporación directa del amonio al α -cetoglutarato, una reacción catalizada por la GDH. Esta enzima está presente en todos los organismos y emplea NAD(P)H como donador de electrones (Castillo *et al.*, 2005).

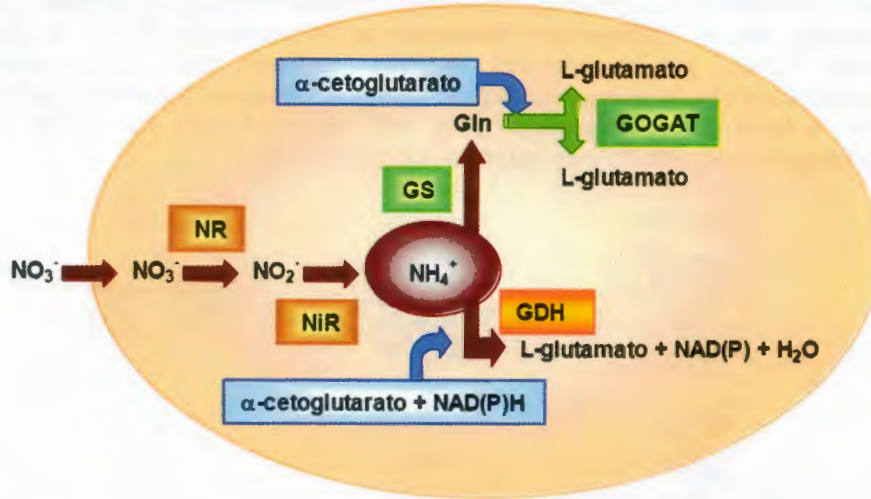


Figura 1.6. Esquema resumen de la reducción asimilativa del nitrógeno. **GDH**, glutamato deshidrogenasa; **GS**, glutamina sintetasa; **GOGAT**, oxoglutarato amino transferasa; **NR**, nitrato reductasa y **NiR**, nitrito reductasa.

I.1.5. RESPUESTA DEL SISTEMA RADICAL A LA PRESENCIA DE NUTRIMENTOS EN EL SUELO

La capacidad de las plantas para responder apropiadamente a la disponibilidad de nutrientes es de fundamental importancia para su adaptación al ambiente (López-Bucio *et al.*, 2003). Las raíces responden modificando su arquitectura, y de esta manera, proporcionan a las plantas la capacidad de adaptarse a las variaciones nutrimentales de la rizósfera. Por lo general, el desarrollo de los sistemas radicales es asimétrico, lo cual refleja la capacidad de las raíces para ajustar su crecimiento y desarrollo ante los diversos factores ambientales (Robinson, 1994; Forde & Lorenzo, 2001).

Entre los estudios pioneros de la respuesta de las raíces a la heterogeneidad espacial de los nutrientes en el suelo están los reportados por Drew *et al.*, (1973), Drew, (1975) y Drew & Saker, (1975, 1978). Estos

autores, realizaron experimentos con raíces de *Hordeum vulgare* expuestas a P, NO_3^- , NH_4^+ o K, creciendo en diferentes situaciones experimentales: en posición vertical, en condiciones homogéneamente altas o bajas de nutrimentos; ante condiciones pobres de nutrimentos con un segmento a concentraciones altas y en posición horizontal con las mismas condiciones altas de nutrimentos homogéneos. En el tratamiento homogéneo, el desarrollo de la RP y de las RL fue similar en todas las concentraciones. Sin embargo, en los tratamientos heterogéneos, el desarrollo de las RL fue pobre donde los nutrimentos estaban escasos, pero proliferaron abundantemente en el segmento donde se encontraba el nutrimento (NO_3^- , NH_4^+ o P) a alta concentración (Fig. 1.7). Por otro lado, las raíces de *Hordeum vulgare* fueron insensibles a la presencia de K.

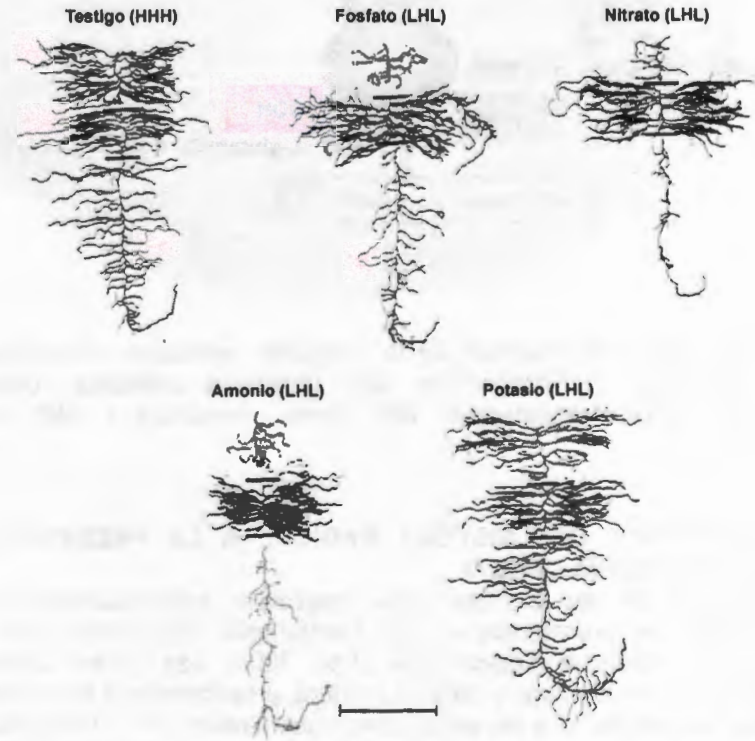


Figura 1.7. Efecto de diversos nutrimentos sobre las raíces de *Hordeum vulgare*. Todas las zonas del sistema radical de la planta control fueron expuestas uniformemente a una solución concentrada de nutrimentos (HHH). En los tratamientos localizados (LHL), solo en el segmento medio la raíz se expuso a la solución completa, los segmentos superior e inferior contenían una solución deficiente en P, NO_3^- , NH_4^+ o K. Barra de escala, 10 cm (tomado de Drew, 1975).

Se ha reportado que, de entre todos los nutrimentos, solo cuatro pueden considerarse como una señal capaz de controlar el desarrollo de la raíz, éstos son: N, P, S y Fe.

En plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a una baja disponibilidad de P, presentaron una mayor densidad, así como una mayor longitud de pelos radiculares que las que se desarrollaron con alta disponibilidad. Dicha elongación es dependiente de la disponibilidad de P, incrementándose hasta cinco veces la densidad de pelos radiculares respecto al testigo (Bates & Lynch, 1996). Este efecto se debe al incremento en el número de células epidérmicas que se diferenciaron en tricoblastos (Ma *et al.*, 2001).

La baja disponibilidad de Fe indujo cambios morfológicos en las células epidérmicas de las raíces de *Arabidopsis*, particularmente se observó un incremento en la formación y elongación de pelos radiculares. Dichos pelos radiculares emergieron de células que en condiciones normales no los forman (Schmidt *et al.*, 2000).

Asimismo, en *Arabidopsis*, un incremento en la disponibilidad de NO_3^- redujo la elongación de la RP y suprimió la elongación de las RL (Linkohr *et al.*, 2002).

El sistema radical de *Arabidopsis* presentó mayores ramificaciones al desarrollarse en condiciones limitantes de SO_4^{2-} . Cuando las plantas crecieron en cajas con agar suplementadas con SO_4^{2-} la RP se elongó y las RL se desarrollaron a cierta distancia del ápice de la RP, en contraste, cuando se eliminó el SO_4^{2-} del medio, las RL se formaron más cercanas al ápice de la RP e incrementaron su densidad (Kutz *et al.*, 2002).

En general, las respuestas del sistema radical a la baja disponibilidad de nutrimentos parecen estar presentes en todas las angiospermas, y puede actuar para incrementar la eficiencia en la captación de nutrimentos cuando éstos se encuentran en concentraciones limitantes. Información reciente sugiere la existencia de vías de transducción de señales específicas que interpretan las concentraciones exteriores de los nutrimentos y conllevan a una modificación del desarrollo de la raíz. Las hormonas vegetales, sobre todo, las auxinas, citocininas y etileno parecen ser factores claves en estas vías mediadas por nutrimentos (López-Bucio *et al.*, 2003).

1.1.5.1. RESPUESTA DEL SISTEMA RADICAL A NITRATO

El NO_3^- produce modificaciones en el sistema radical de las plantas. Se ha descrito su participación en importantes efectos en el desarrollo de las RL.

En estudios realizados con raíces de *Triticum aestivum*, expuestas a un suministro localizado de NO_3^- , se observó una respuesta también localizada al incrementarse la producción de RL en la zona donde estaba presente el nutrimento (Hackett, 1972).

Zhang & Forde, (1998b) realizaron experimentos en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones heterogéneas de NO_3^- , encontrando que el NO_3^- estimuló la elongación de RL, pero no el número de las mismas en el segmento donde se aplicó el tratamiento. Además, la RP fue insensible a este nutrimento (Fig. 1.8). El efecto estimulador sobre la elongación de las RL se debió a un incremento en la producción de células en el ápice de las raíces directamente expuestas al NO_3^- (Zhang *et al.*, 1999).

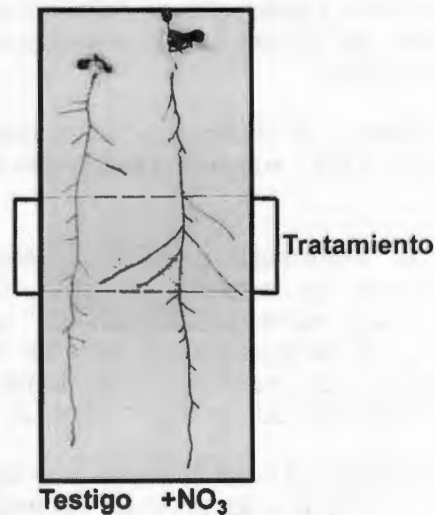


Figura 1.8. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a tratamiento localizado de KCl (testigo) o de KNO₃ (tratamiento) (tomado de Zhang & Forde, 1998b). El rectángulo indica el segmento en el que se colocó el nutrimento.

Con base a los estudios realizados en raíces de *Arabidopsis*, Casimiro *et al.*, (2003) plantean la existencia de tres mecanismos que regulan el desarrollo de las RL por el efecto del NO_3^- : **1)** un efecto estimulador, el cual es más evidente cuando las plantas crecen en bajas concentraciones de NO_3^- (del orden μM) y posteriormente se les suministra de manera localizada (Zhang & Forde, 1999); **2)** un efecto inhibitorio inducido por altas concentraciones, el cual es más notorio cuando las plantas se desarrollan en un medio con un contenido de NO_3^- uniformemente alto (del orden mM)

(Zhang *et al.*, 1999, 2000) y 3) un efecto inhibitorio, cuando existe una alta relación C:N, generando una represión dramática en el desarrollo de las RL (Malamy & Ryan, 2001).

Los tres mecanismos regulatorios relacionados con NO_3^- actúan en diferentes estadios de desarrollo. La inhibición causada por una alta relación C:N se presenta en la etapa de iniciación de las RL, debido a un impedimento en el movimiento de las auxinas desde los brotes hasta los sitios de iniciación de las mismas (Malamy & Ryan, 2001). Por el contrario, la inhibición de las RL inducida por altas concentraciones de NO_3^- ocurre inmediatamente después de la emergencia de las RL, cuando el meristemo se activa (Zhang *et al.*, 1999; Signora *et al.*, 2001). Las plantas desarrollándose en medios con altas concentraciones de NO_3^- producen una cantidad de primordios de RL similar a aquéllos con un suministro bajo de este ión. Sin embargo, no se elongan (Zhang *et al.*, 1999), por el contrario, la aplicación localizada de NO_3^- incrementa la tasa de crecimiento de las RL en la zona enriquecida con el mismo, pero en *Arabidopsis* no tiene efecto en el número de RL (Zhang *et al.*, 2000).

A su vez, Zhang & Forde (1998b) propusieron un modelo de regulación del crecimiento y desarrollo de RL en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a NO_3^- , donde plantean la existencia de dos posibles vías de regulación (Fig. 1.9). Por un lado, que el NO_3^- , al ser internalizado en la célula por transportadores, puede ser metabolizado, o bien, puede ser almacenado, modificando así el balance de C:N, lo cual provoca una inhibición sistémica sobre la activación de meristemas de RL. Por otro lado, plantean la presencia de receptores de NO_3^- en la membrana plasmática, que al unirse con dicho ión activen una cascada de señales, donde podrían participar los genes ANR1 (codifica para un factor de transcripción) y AXR4 (participa en el transporte y respuesta a auxinas), que generarán una respuesta estimuladora localizada sobre la proliferación celular en el meristemo de las RL.

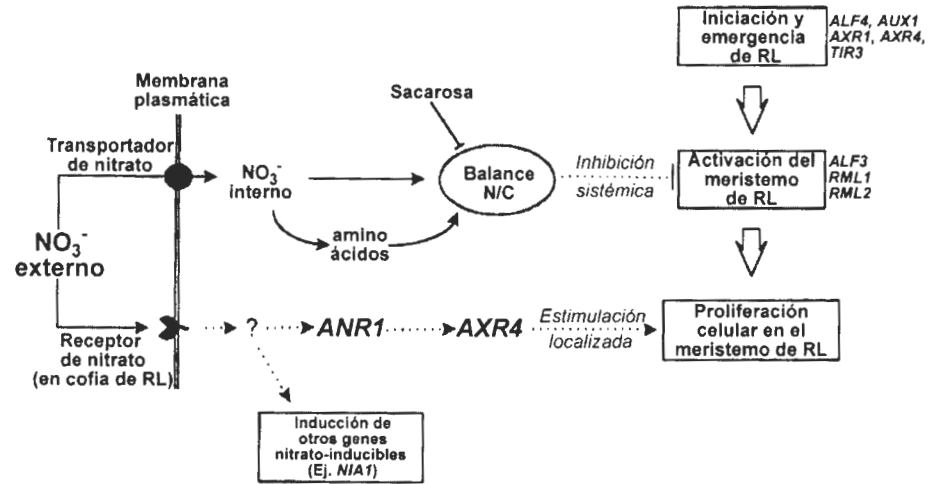


Figura 1.9. Modelo de la regulación del crecimiento y desarrollo de raíces laterales por efecto del NO_3^- en *Arabidopsis thaliana* (modificado de Zhang et al., 1999). ANR1, factor de transcripción de la familia MADS-BOX; y AXR4, mutante resistente a auxinas.

Zhang & Forde (1998b) también analizaron el efecto del NO_3^- aplicándolo de manera localizada sobre una doble mutante de *Arabidopsis* (*nia1nia2*), la cual se caracteriza por portar una mutación en cada uno de los genes estructurales de la NR (*NIA*) y presenta una actividad residual de 0.5 %. Estas plantas mostraron una respuesta similar al tratamiento localizado de NO_3^- que plántulas silvestres de *Arabidopsis* que manifiestan actividad completa de NR. Dicho resultado soporta la hipótesis de que el NO_3^- puede actuar como una molécula señal por sí mismo, sin implicar el metabolismo del N directamente (Zhang & Forde, 1998b).

La respuesta inducida por NO_3^- que ha sido más caracterizada es la primaria (Redinbaugh & Campbell, 1991), en la cual la expresión de genes que codifican para transportadores de NO_3^- y enzimas que participan en la asimilación, como el CHL1 y el NRT2.1, respectivamente, son rápidamente inducidos (entre 0.5 y 1 hr) (Wang et al., 2003). En *Nicotiana tabacum* se observa una respuesta primaria normal al NO_3^- en mutantes de la NR (Deng et al., 1989) y en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (Redinbaugh & Campbell, 1993), indicando que el NO_3^- por sí mismo es responsable de la respuesta y no se requiere la síntesis *de novo* de proteínas. La identidad molecular de los componentes de la señal en la respuesta a NO_3^- comienzan a ser elucidados. Por ejemplo, el factor de transcripción ANR1 está involucrado en la regulación de la arquitectura de

raíz (Zhang & Forde, 1998), y en estudios recientes se ha publicado que el factor de transcripción NLP7 (Castaings *et al.*, 2009) y la proteína cinasa CIPK8 que interactúa con una proteína tipo calcineurina (CBL) son reguladores positivos de la respuesta primaria a NO_3^- (Ho *et al.*, 2009).

En resumen, se ha demostrado que el NO_3^- produce diversas modificaciones en el sistema radical de las plantas. Parte de los mecanismos por los cuales se produce esta respuesta han sido elucidados, sin embargo, aun quedan varias incógnitas por resolver.

I.1.5.2. RESPUESTA DEL SISTEMA RADICAL AL AMONIO

El crecimiento de muchas plantas es fuertemente inhibido cuando la única fuente de N es el NH_4^+ (Marschner, 1986). Parte de este efecto puede deberse a la elevada acidificación del medio externo lo cual inhibe la toma de otros cationes. La acidificación del medio es producida por la toma de este ión (Haynes, 1986). En *Arabidopsis* el suministro de NH_4^+ en un rango entre 3 mM y 12 mM inhibe el crecimiento de la RP (Cao *et al.*, 1993). Este comportamiento también se presenta en plántulas de *Solanum lycopersicum* expuestas a concentraciones altas de NH_4^+ , en las que se inhibe el crecimiento de las raíces. Sin embargo, en bajas concentraciones, el NH_4^+ promueve el desarrollo extenso del sistema radical. Además, el suministro de NH_4^+ como única fuente de N, induce la formación de un sistema radical más compacto (Bloom, 1997).

El efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz por NH_4^+ se presenta por el bloqueo en la expansión y en la división celular (Cao *et al.*, 1993).

I.1.6. GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DEL SISTEMA RADICAL AL N INORGÁNICO

Como señal, el NO_3^- reprograma el metabolismo del N y del C, el desarrollo radical y la expresión de un grupo selecto de genes (Crawford, 1995). Esta respuesta involucra cambios rápidos y muy marcados en la expresión génica. Sin embargo, dichos mecanismos son poco comprendidos (Crawford & Arst, 1993). Esta respuesta al NO_3^- involucra la inducción directa de la expresión génica, mostrando una rápida activación (entre 30 a 60 min) de varios genes implicados en la asimilación del NO_3^- y el NH_4^+ . Esto se presenta como respuesta a concentraciones bajas de NO_3^- (10 a 250 μM), e incluso en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, lo cual indica que el NO_3^- no se requiere la síntesis *de novo* para dicha respuesta. El gen más estudiado es el de la NR (Cheng *et al.*, 1986; Crawford *et al.*, 1986). En estudios realizados en *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*, el transcrito de la NR se acumula en las

plantas minutos después de ser tratadas con concentraciones entre 10 μM y 50 mM de NO_3^- (Melzer *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1991; Gowri *et al.*, 1992). De manera similar, en especies tales como *Solanum lycopersicum*, *Brassica napus* y *Glycine max*, los genes involucrados en la toma de NO_3^- (NRT1 y NRT2), o en su reducción hasta amonio (NR, NiR), son rápidamente inducidos por rangos de concentraciones de NO_3^- muy similares (Koch, 1997; Crawford & Glass, 1998; Forde & Clarkson, 1999). En *Arabidopsis*, también son inducidos los genes de las enzimas involucradas en la asimilación de NH_4^+ , específicamente la GS y la GOGAT (Lam *et al.*, 1996; Koch, 1997; Stitt, 1999).

En 1997 se describieron dos genes potencialmente regulatorios que participan en la respuesta de *Arabidopsis* a NO_3^- . En primer lugar, una mutante resistente a clorato, *cr88*, en la cual la presencia de NO_3^- y luz provocan la inducción de uno de los dos genes que codifican a la NR, el gen *nia2*, pero no del gen *nia1* (Lin & Cheng, 1997). En segundo lugar, se describió un gen de la familia de factores de transcripción MADS-box, el gen *anr1*. Cuando en plantas transgénicas este gen se reprime, se afecta la inhibición sistémica por NO_3^- sobre el desarrollo de las RL (Zhang & Forde, 1998 y 2000). Este gen es inducido en plantas que previamente se encontraban en condiciones de ausencia de NO_3^- por 2 mM de NO_3^- (Zhang & Forde, 1998). En trabajos posteriores, Zhang & Forde reportaron la participación del gen *axr4* en la respuesta a NO_3^- , puesto que al utilizar una mutante, *axr4*, resistente a dosis elevadas de auxinas, en experimentos en condiciones heterogéneas de NO_3^- , éstas fueron insensibles al estímulo, sugiriendo una superposición en las rutas de respuesta a NO_3^- y de respuesta a auxinas (Zhang & Forde, 1999).

Al utilizar una biblioteca sustractiva de cDNA de tomate (*Solanum lycopersicum*), Wang *et al.* (2001) reportaron la inducción de 115 genes por el efecto de la aplicación de NO_3^- (Tabla 1.3). Dentro de ellos, se observaron algunos que habían sido identificados previamente, tales como: transportadores de NO_3^- , NR y NiR, y enzimas del metabolismo, como: transaldolasa, transcetolasa, malato deshidrogenasa, asparagina sintetasa e histitina decarboxilasa. También identificaron 14 genes, cuya expresión no había sido relacionada previamente con la respuesta a NO_3^- , incluyendo: acuaporinas, transportadores de fosfato y K, así como genes potencialmente involucrados en regulación transcripcional, genes de respuesta a estrés y genes de proteínas ribosomales.

Años más tarde, se realizó un análisis por microarreglos de la respuesta a NO_3^- , utilizando una mutante nula de la NR de *Arabidopsis*. El análisis reveló la expresión de 595 genes cuya expresión se modificó diferencialmente en respuesta a NO_3^- (5 mM por 2h) en plantas mutantes,

comparada con plantas silvestres. De este grupo se identificaron algunos involucrados en tareas como: energía, metabolismo del N, glucólisis y gluconeogénesis. Dado que dichos genes respondieron independientemente de la actividad de NR, se considera que el NO_3^- , y no un metabolito posterior de su ruta metabólica, actuó como una señal (Wang *et al.*, 2004).

En estudios más recientes, Liu *et al.* (2008) reportaron la regulación positiva de 206 genes al exponer plantas de maíz (*Zea mays* L.) a 1 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ por una hora, en tratamiento del tipo "split-root", que consiste en dividir el sistema radical colocándolo en dos compartimentos y aplicar diferentes tratamientos. Estos genes están involucrados con el metabolismo de fitohormonas y la transducción de señales, la división y la expansión celular, el transporte transmembranal, el metabolismo del C y del N, la transferencia de electrones, la respuesta al estrés, entre otros procesos fisiológicos. De estos 206 genes, se observó que 26 codifican para fitohormonas o transducción de señales (respuesta a hormonas, transcripción génica, fosforilación y defosforilación de proteínas, etc.) lo cual da pauta a la elucidación de algunos de los participantes de la cascada de señalización en respuesta a NO_3^- .

Tabla 1.3 Genes regulados por nitrato en diferentes especies

Especie	Método	Tratamiento	Clasificación de genes	Cant. de genes	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hidroponia	5 mM de KNO ₃	Funciones desconocidas	66	Wang <i>et al.</i> , 2004
			Energía	88	
			Metabolismo	212	
			Glicólisis y gluconeogénesis	23	
			Metabolismo de aminoácidos	53	
			Utilización de N y S	22	
			Transporte facilitado	95	
			Metabolismo del N y S	28	
			Biosíntesis de aminoácidos	39	
			Simportes	13	
			Transportes aniónicos	12	
			Degradación de aminoácidos del grupo del glutamato	11	
			Sistema de transducción de señales de dos componentes	17	
			Actividades metabólicas diferentes del N y S	7	
Degradación de aminoácidos (catabolismo)	27				

Especie	Método	Tratamiento	Clasificación de genes	Cant. de genes	Referencia
<i>Solanum lycopersicum</i>	Hidroponia	4.8 mM de NO ₃ ⁻ por 12 h	Toma y asimilación de NO ₃ ⁻	5	Wang <i>et al.</i> , 2001
			Acuaporinas	5	
			Transportadores de NH ₄ ⁺ , Pi y K	5	
			Respuesta a estrés	1	
			Proteínas ribosomales	8	
Especie	Método	Tratamiento	Clasificación de genes	Cant. de genes	Referencia
<i>Zea mays</i>	Split-root	Ca(NO ₃) ₂ 1 mM por 1 h	Hormonas y transducción de señales	26	Liu <i>et al.</i> , 2008
			Transportadores transmembranales	13	
			Transferencia de electrones	16	
			División y expansión celular	5	
			Metabolismo del C y N	29	
			Respuesta a estrés	1	
			Otras funciones	36	
			Funciones desconocidas	80	
			Regulados negativamente	24	

I.1.7. EI NITRATO COMO MOLÉCULA SEÑAL

Las plantas han desarrollado varios mecanismos que les permiten adquirir N a bajas concentraciones, así como el utilizar una amplia gama de formas de N tales como: NO_3^- , NH_4^+ , urea y aminoácidos (Crawford, 1995).

La regulación de la asimilación del NO_3^- es una de las características de especial interés. Aunque el NO_3^- sirve como la principal señal que regula su propia asimilación, los niveles de luz, de citocininas, de CO_2 , los ritmos circadianos y los metabolitos del C y del N (como la sacarosa y la glutamina) también desempeñan papeles regulatorios (Crawford, 1995).

Una de las respuestas a la exposición a NO_3^- es la inducción de la expresión de genes, tales como los correspondientes a transportadores de NO_3^- y de las enzimas NR, NiR, GS GOGAT-Fd (Warner & Kleinhofs, 1992; Crawford & Arst, 1993; Redinbaugh & Campbell, 1993; Hoff *et al.*, 1994). La inducción se produce en cuestión de minutos y en respuesta a muy bajas concentraciones de NO_3^- (de hasta 10 μM).

En 1995 aun no se habían identificado genes regulados por NO_3^- en plantas superiores (Crawford, 1995). Sin embargo, existían reportes de regiones regulatorias actuando en *cis* en promotores de los genes de NiR (en espinaca) y NR (en *Arabidopsis*), que conferían la expresión de genes reporteros a partir de la inducción por NO_3^- en plantas transgénicas de tabaco (Rastogi *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que el NO_3^- es una molécula señal por inducir la expansión celular en hojas de *Nicotiana tabacum* L. Se analizó la aplicación de diferentes fuentes de N, encontrándose que la aplicación de NH_4^+ provocó una disminución del 50 % en el número de hojas, así como una reducción del 30 % en el tamaño celular de las mismas. Además, redujo en un 60 % en el contenido de zeatina (citocininas) y este efecto se revertió cuando la fuente nitrogenada fue el NO_3^- (Walch-Liu *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la participación de los reguladores de crecimiento, tales como las citocininas, en la morfogénesis de las hojas responde a cierta inducción por las formas de N. Además de la fuente de N, el NO_3^- se ha involucrado en las vías de transducción de señales que regulan la morfogénesis de la hoja por la suplementación de citocininas a la parte aérea. Sin embargo, es posible que otras hormonas, tales como el ácido abscísico, el cual incrementa en el xilema de raíces y de hojas de *Ricinus communis* tratadas con NH_4^+ (Peuke *et al.*, 1994), interactúen con las citocininas en la regulación de la morfogénesis de la hoja (Walch-Liu *et al.*, 2000).

Zhang & Forde (1998b) también analizaron el efecto del NO_3^- aplicándolo de manera localizada sobre la doble mutante de *Arabidopsis* (*nia1nia2*) y

presenta una actividad residual de NR de 0.5 %. Se obtuvo una respuesta similar al tratamiento localizado de NO_3^- en plántulas silvestres de *Arabidopsis*. Dicho resultado soporta la hipótesis de que el NO_3^- puede actuar como una molécula señal por sí mismo, sin implicar el metabolismo del N directamente.

Resumiendo, las plantas cuentan con mecanismos que les permiten adquirir N a bajas concentraciones, así como el utilizar una amplia gama de formas de N. Para el caso particular del NO_3^- , éste se ha demostrado que es capaz de actuar como señal, ya que regula su propia asimilación. Entre las respuestas reportadas para la exposición a NO_3^- se pueden mencionar la inducción de la expresión de genes, así como modificaciones en los patrones de desarrollo vegetal, tanto en parte aérea como en el sistema radical. Aunado a esto y considerando las condiciones nutrimentales en las que se desarrolla el chile habanero en la península de Yucatán y los antecedentes de respuesta a NO_3^- en otras especies, se seleccionó a este miembro del género *Capsicum* como modelo de estudio, con ello se pretende conocer parte de los mecanismos de respuesta del chile habanero a la presencia de NO_3^- y conocer su función como señal.

I.1.8. GÉNERO *Capsicum*

El género *Capsicum*, miembro de la familia solanácea, fue denominado en el siglo XVI en los herbarios europeos y adoptado por J.P. Tournefort en su trabajo *Institutiones rei herbarie*, publicado en 1700. Cuando Linneo escribió su obra "Genera plantarum", en 1742 se continuó con esta denominación. La importancia económica del género *Capsicum* es evidente por tener diversas aplicaciones y una amplia distribución en las regiones templadas tropicales y subtropicales del mundo. La mayoría de los tipos de chiles son considerados como plantas anuales en los países templados, pero son potencialmente perennes en los trópicos, sobre todo el chile habanero (Tun, 2001).

I.1.8.1. ORIGEN DEL GÉNERO

El género *Capsicum*, al cual pertenecen todos los chiles cultivados, es originario de los trópicos de América. Está comprendido por entre 20 y 30 especies. Por lo menos cinco de ellas (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. frutescens*) representan las taxas cultivadas que han sido domesticadas en diversos puntos geográficos (Eshbaugh, 1976).

I.1.8.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica para el cultivo del chile habanero es la siguiente:

Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotyledonea
Superorden	Sympetala
Orden	Tubiflorales
Familia	Solanácea
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum chinense</i> Jacquin

I.1.8.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

El chile es un fruto carnoso hueco, en forma de cápsula y lleno de aire en cuyo interior se encuentran las semillas. Cada flor produce gametos masculinos y femeninos y tiene de cinco a ocho pétalos, entre cinco y ocho estambres y de dos a cuatro pistilos (López *et al.*, 2003).

La altura de la planta de chile habanero es variable, pero en los cultivares comerciales puede oscilar entre 75 y 120 cm. Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas (2.5 a 3.5 mm); tienen testa de color café claro a café oscuro y su periodo de germinación varía entre ocho y quince días (en el suelo). Tiene raíz pivotante, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, las características del suelo y las prácticas de manejo que se le proporcionen; puede alcanzar longitudes mayores a los 2 m (Tun, 2001). Su tallo es grueso, erecto, glabro y robusto. Generalmente tiene tendencia a formar tres tallos en la primera ramificación, la que ocurre entre la décima y duodécima hoja, para después continuar bifurcándose, con un crecimiento indeterminado. Después de la primera trifurcación muy raramente las tres ramas alcanzan el mismo desarrollo. Las hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonos de verde dependiendo de la variedad. Pueden ser glabras o pubescentes; el grado de pubescencia también depende de la variedad. Con una nutrición adecuada se pueden alcanzar hojas con un tamaño superior a los 15 cm de longitud y ancho. Las flores son de color blanco; su tamaño varía entre 1.5 y 2.5 cm de diámetro de la corola. Estos órganos se emiten en cada ramificación y se pueden presentar racimos de hasta seis flores, dando lugar a un promedio de tres frutos (Tun, 2001).

I.1.8.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GÉNERO *Capsicum*

La migración de las plantas cultivadas está ligada al traslado del hombre, puesto que requieren de su intervención y cuidado para sobrevivir. Cristóbal

Colón las llevó a España, al regreso de su primera travesía, y trajo algunas semillas y esquejes europeos para sembrar en las islas del Caribe, en su segundo viaje (Long-Solís, 1998).

Durante el siglo XVI varias naciones desempeñaron un papel importante en el traslado de plantas de un continente a otro. Principalmente fueron los españoles, portugueses, ingleses, holandeses y turcos quienes se encargaron de la difusión de las plantas americanas. En el siglo XX encontramos casi todas las plantas americanas cultivadas distribuidas en los cinco continentes, algunas de ellas tan adaptadas al ambiente que es difícil determinar cuáles son originarias del lugar (Long-Solís, 1998).

Después del descubrimiento de América todas las especies del género, principalmente *C. annuum*, fueron dispersadas en distintas regiones del mundo y rápidamente se constituyó como la principal "especia" o condimento de comidas típicas de muchos países, éste se encuentra ampliamente extendido alrededor del mundo. Los principales países productores se presentan en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Principales países productores de chile (FAOSTAT, 2007)

POSICIÓN	REGIÓN	PRODUCCIÓN (Ton)	
1	China	14026272	F
2	México	1890428	
3	Turquía	1759224	
4	Indonesia	1128790	
5	España	1059500	
6	Estados Unidos	855870	
7	Nigeria	723000	F
8	Egipto	475000	F
9	Corea, Rep.	414136	
10	Países Bajos	320000	
11	Ghana	279000	F
12	Túnez	278000	
13	Argelia	268055	
14	Italia	252194	
15	Marruecos	213760	
16	Hungría	208200	
17	Israel	185942	
18	Rumania	184939	
19	Serbia	150257	
20	Japón	149600	

[]: Datos oficiales, F: Estimación FAO

I.1.8.5. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CHILE HABANERO

El chile habanero (*C. chinense*) es uno de los principales cultivos de la península de Yucatán y cuya producción lo convierte en un fruto tradicional con el cual identifican al estado en algunas regiones del país. Generalmente se comercializa en fresco para consumo directo o como materia prima para procesamiento industrial. En promedio cada año se siembran alrededor de 411 hectáreas y se logra una producción de 1975 toneladas y una derrama económica de más de 14 millones de pesos en el sector primario y 100 millones en el sector secundario. En 2004 el consumo de chile habanero para la venta en fresco y procesado alcanzó 1372 toneladas según datos proporcionados por las principales compañías comercializadoras y procesadoras de Yucatán (Ramírez *et al.*, 2005).

En el año 2004 los principales mercados nacionales donde se comercializó la producción de chile habanero de Yucatán fueron las centrales de abasto del Distrito Federal, Guadalajara, Monterrey, Tijuana, San Luis Potosí, Morelia, Cancún, Puebla y Oaxaca. Hacia los mercados internacionales de América se exportó a los Estados Unidos (California, Florida, Texas, Nueva York, Oregon, Nuevo México y Massachusetts), Canadá y Cuba. Para los mercados europeos, se exportó chile habanero a España (Madrid, Barcelona, Zaragoza y Valencia) e Inglaterra (Londres). Para los mercados de Asia, se exportó principalmente a Japón, país que ha iniciado una estrategia de mercado sumamente interesante y atractiva para establecer negocios relacionados con la industria del chile habanero (Ramírez *et al.*, 2005).

El incremento en la demanda del chile habanero, y la poca disponibilidad de materia prima ha dado lugar a las iniciativas para aumentar la superficie del cultivo por parte de las autoridades del Gobierno del Estado de Yucatán, autoridades de diferentes municipios, industriales, empresarios particulares y pequeños productores. Durante décadas el chile habanero fue cultivado en la Península de Yucatán (Campeche, Quintana Roo y Yucatán) y en Belice. Sin embargo, por la gran demanda, otros estados lo están produciendo. Entre estos se incluyen Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Tabasco. A nivel internacional, la producción comercial de chile habanero se ha ampliado a otras regiones del continente americano entre los que destacan los países como República Dominicana, Jamaica, Trinidad y Tobago, Costa Rica, Colombia, Estados Unidos y Holanda, entre otros (Ramírez *et al.*, 2005).

Los usos de los frutos de chile habanero, ya sea en fresco o procesados, son múltiples. Aparte del consumo en fresco, cocido o como condimento o "especia" en comidas típicas de diversos países, existe una gran gama de

productos industriales que se usan en la alimentación humana; congelados, deshidratados, encurtidos, enlatados, pastas y salsas.

El chile habanero se caracteriza por contenidos muy altos de capsaicina. La capsaicina se usa como saborizante en la preparación de ciertas carnes frías, como repelente contra mamíferos depredadores, en la agricultura y en la ganadería menor, como sustancia activa de las pinturas y como estimulante en la industria farmacéutica. Es también componente básico del llamado "pepper gas", utilizado en el campo militar y de los atomizadores contra asaltantes (Islas-Flores *et al.*, 2005).

I.1.8.6. CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DEL CHILE HABANERO EN EL ESTADO DE YUCATÁN

El suelo, sin lugar a dudas, es un factor fundamental para la producción del chile habanero, ya que influye de manera determinante en su calidad (el que se produce en suelos pedregosos tiene mayor periodo de vida de anaquel que el que se produce en suelos profundos). Pero, por otro lado, desde el punto de vista de eficiencia, es más económico producirlo en suelos profundos, como los luvisoles y con mejores rendimientos que los obtenidos en suelos pedregosos (Ramírez *et al.*, 2005).

La península de Yucatán se destaca por la ausencia de marcados niveles orográficos. Sus suelos se agrupan en ocho órdenes principales: entre los que se encuentran los correspondientes a la serie de los litosoles y rendzinas líticas (en los cuales su color varía de negro, rojo o café rojizo). Otro grupo de suelos son los vertisoles, su textura es arcillosa, su relieve plano, con drenaje superficial lento e interno muy lento. Por último, los mejores suelos para fines agrícolas, son los luvisoles ródicos y crómicos de la clasificación FAO/UNESCO (Ramírez *et al.*, 2005).

Los suelos predominantes del estado de Yucatán son los delgados y pedregosos, como los litosoles y rendzinas, que en sus formas puras abarcan más del 43 % y al incluir las asociaciones superan el 95 %. En los suelos luvisoles se ubican las áreas con mayor potencial productivo en la entidad y permiten una gran diversificación de la agricultura, ya que en ellos, si se cuenta con riego, se pueden producir granos básicos como maíz, frijol y sorgo durante todo el año; en la época de temperaturas más bajas, de octubre a febrero es factible producir algunas hortalizas como tomate, sandía, el melón, chile, cilantro, remolacha y colinabo, entre otras (Ramírez *et al.*, 2005).

Los suelos más favorables para el cultivo de chile habanero, son aquellos bien drenados y con buena retención de humedad. En consecuencia, deben

evitarse los suelos con texturas extremas. En el estado de Yucatán los suelos más apropiados para el desarrollo del chile habanero, desde el punto de vista de productividad son los luvisoles, que son susceptibles de mecanización, presentan muy buen drenaje, de bajo a mediano el contenido de materia orgánica y baja retención de humedad; las asociaciones de luvisoles con rendzinas y cambisoles también se consideran como óptimos pero solo en un 10 %, ya que el otro 90 % se considera como subóptimos por su pedregosidad; las rendzinas y sus asociaciones por el grado de pedregosidad fueron considerados como subóptimos y como no aptos a los vertisoles, regosoles y gleysoles, así como a sus asociaciones (Ramírez *et al.*, 2005).

Dada la importancia que presenta la captación y asimilación de los nutrimentos, particularmente de nitrógeno, para el desarrollo de las plantas, las condiciones precarias, nutrimentalmente hablando, a las que se enfrentan algunos cultivos, situándose en el entorno en que se desarrolla el chile habanero en Yucatán, y considerando el que no existen reportes sobre los mecanismos génicos y fisiológicos de las modificaciones de su sistema radical ante la presencia de los diferentes nutrimentos, el chile habanero resulta ser un modelo interesante para evaluar el efecto de la distribución heterogénea de nitrógeno inorgánico sobre las raíces de *C. chinense*.

I.2. HIPÓTESIS

Si el NO_3^- , actuando como una señal, induce proliferación del sistema radical en *Arabidopsis* y cereales, es probable que también la raíz de *Capsicum chinense* Jacq. pueda percibir localmente este nutrimento, desencadenando una expresión génica diferencial, que conduzca a una mayor formación y elongación de raíces laterales en la zona expuesta al NO_3^- .

I.3. OBJETIVOS

I.3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de condiciones heterogéneas de NO_3^- sobre el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq.

I.3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluar los cambios en la arquitectura de raíz de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. expuestas a condiciones heterogéneas de NO_3^- .
- II. Estudiar la función del NO_3^- como molécula señal en el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq.
- III. Estudiar la expresión génica diferencial en el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. inducida por la presencia de NO_3^- .

I.4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se esquematiza en la Figura 1.10 y consistió en lo siguiente:

OBJETIVO I.

Para evaluar los cambios en la arquitectura de la raíz de *Capsicum chinense* Jacq. expuestas a condiciones heterogéneas de NO_3^- , se utilizaron plántulas de entre 4 y 5 días después de germinadas. Los experimentos se realizaron en el modelo de cajas de agar segmentadas (descrito por Zhang & Forde, 1998), exponiendo únicamente una región de la raíz primaria a 1 mM de KNO_3 (segmento medio). Como testigos se utilizaron tratamientos en los que el NO_3^- se aplicó de forma homogénea (a toda la caja) o en segmentos diferentes al de los tratamientos (superior e inferior). En todos los tratamientos, se utilizó un testigo, en el cual el NO_3^- fue sustituido por 1 mM de KCl. Para estudiar la sensibilidad de la raíz de chile habanero a la presencia de NO_3^- , se desarrolló un experimento dosis-respuesta en las cajas de agar segmentadas, usando dosis desde 10 μM hasta 10 mM de NO_3^- . También, con el objetivo de conocer el comportamiento dentro de la

especie, se evaluó la respuesta radical dentro de una pequeña colección de accesiones de *C. chinense*. En todos estos experimentos, se evaluó el crecimiento de la raíz primaria y el número y longitud de las raíces laterales, durante diferentes intervalos de tiempo y hasta los 10 días de tratamiento. Los resultados obtenidos en estos experimentos se describen en el Capítulo II de la presente tesis.

OBJETIVO II.

Para abordar el estudio de la función del NO_3^- como molécula señal en el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq., se utilizaron dos estrategias: una fue el uso de un inhibidor de la nitrato reductasa (NR), el tungstato (WO_4^{2-}), y la otra fue usar el NH_4^+ , el cual es producido durante la asimilación del NO_3^- . Estos experimentos también fueron realizados en el modelo de cajas de agar segmentadas. Para el experimento con WO_4^{2-} , éste se adicionó en el segmento medio de las cajas, junto con el KCl (testigo) o el NO_3^- (tratamiento), e inicialmente se realizó una curva dosis respuesta con el mismo, para seleccionar la dosis en la cual se obtuviera una inhibición de la NR, sin afectarse el crecimiento de la raíz primaria. Bajo estas condiciones también se evaluó el crecimiento radical, como se describe anteriormente.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se describen también en el Capítulo II de la presente tesis.

OBJETIVO III.

Para estudiar la expresión génica diferencial en el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. inducida por la presencia de NO_3^- , se extrajo el ARN de los ápices (1 cm) de raíces de chile habanero expuestas por tiempos cortos a NO_3^- (0, 1, 2 y 4 hr). En este experimento se utilizaron plántulas de chile habanero de 30 a 45 días después de germinadas y creciendo en condiciones de hidroponía. Se evaluaron los niveles de expresión de 48 genes que previamente fueron obtenidos a partir de suspensiones celulares, raíces u hojas de chile habanero. Para el estudio se utilizó la técnica de hibridación diferencial.

Los resultados que se obtuvieron en esta parte de la tesis, se describen en el Capítulo III del documento.

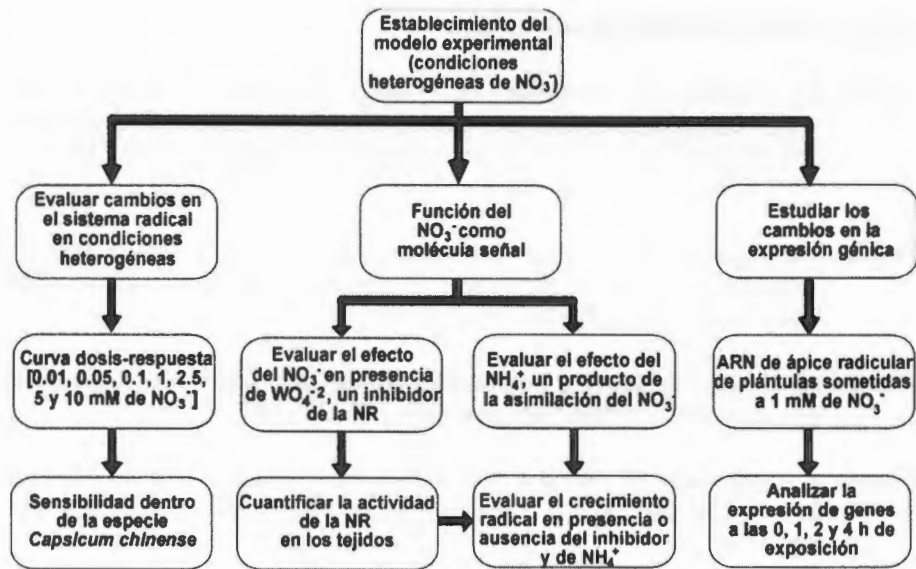


Figura 1.10. Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de nitrato sobre el sistema radical de *C. chinense*.

I.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC** (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol* 99: 1124-1133
- Bates TR, Lynch JP** (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 19: 529-538
- Bloom AJ** (1997) Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root development. *Z Pflanz Bodenkunde* 160: 253-259
- Bloom AJ, Jackson LE, Smart DR** (1993) Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. *Plant Cell Environ* 16: 199-206
- Bloom AJ, Meyerhoff PA, Rost TL** (2002) Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *J Plant Growth Regul* 21: 416-431
- Bloom AJ, Frensch J, Taylor AR** (2006) Influence of inorganic nitrogen and pH on the elongation of maize seminal roots. *Ann Bot-London* 97: 867-873
- Britto DT, Kronzucker HJ** (2002) NH_4^+ toxicity in higher plants: A critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584
- Campbell WH** (1996) Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol* 111: 355-361
- Cao Y, Glass ADM, Crawford NM** (1993) Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux1*, *axr1*, and *axr2*. *Plant Physiol* 102: 983-989
- Casimiro I, Beekman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* 8: 165-171

- Castaigns L, Camargo A, Pocholle D, Gaudon V, Texier Y, Boutet-Mercey S, Taconnat L, Renou JP, Daniel-Vedele F, Fernandez E, Meyer C, Krapp A** (2009) The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J* 57: 426-435
- Castillo RF, Roldán RMD, Blasco PR, Huertas RMJ, Caballero DFJ, Moreno VC, Luque-Romero MM** (2005) *Biotecnología ambiental*. Tebar, Madrid, España. 614 p
- Chaillou S, Lamaze T** (2001) "Ammonical nutrition of plants", in *Nitrogen assimilation by plants*, J-F Morot-Gaudry (ed). Science Publishers Inc., New Hampshire, USA pp. 53-69
- Chapin FS, Moilanen L, Kielland K** (1993) Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* 361: 150-153
- Cheng C, Acedo G, Dewdney J, Goodman H, Cankling M** (1991) Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol* 96: 275-279
- Cheng C, Dewdney J, Kleinhofs A, Goodman H** (1986) Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *P Natl Acad Sci USA* 83: 6825-6828
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7: 859-868
- Crawford NM, Arst HNJ** (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu Rev Genet* 27: 115-146
- Crawford N, Campbell W, Davis R** (1986) Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *P Natl Acad Sci USA* 83: 8073-8076
- Crawford N, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci* 3: 389-395
- Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M** (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr Opin Plant Biol* 1: 235-239

- Day KJ, Hutchings MJ, John EA** (2003) The effects of spatial pattern of nutrient supply on the early stages of growth in plant populations. *J Ecol* 91: 305-315
- Deane-Drummond CE** (1984) The apparent induction of nitrate uptake by *Chara corallina* cells following pretreatment with or without nitrate and chlorate. *J Exp Bot* 35: 1182-1193
- Deng MD, Moureaux T, Caboche M** (1989) Tungstate, a molybdate analogue inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene. *Plant Physiol* 91: 304-309
- Doddema H, Telkamp GP** (1979) Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol Plantarum* 45: 332-338
- Drew MC** (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytol* 75: 479-490
- Drew MC, Saker LR** (1975) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates of nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system. *J Exp Bot* 26: 79-90
- Drew MC, Saker LR** (1978) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. III. Compensatory increases in growth of lateral roots, and in rates of phosphate uptake, in response to a localized supply of phosphate. *J Exp Bot* 29: 435-451
- Drew MC, Saker LR, Ashley TW** (1973) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. I. The effect of nitrate concentration on the growth of axes and laterals. *J Exp Bot* 24: 1189-1202
- Epstein E, Bloom AJ** (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. SINAUER, USA. 400 p
- Evans IM, Swinhoe R, Gatehouse LN, Gatehouse JA, Boulter D** (1988) Distribution of root messenger RNA species in other vegetative organs of pea (*Pisum sativum* L.). *Mol Gen Genet* 214: 153-157
- Esau K** (1965) *Plant Anatomy*. New York: Wiley
- Eshbaugh WH** (1976) Genetic and biochemical systematic studies of Chili Peppers (*Capsicum* - Solanaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102: 394-403

- Facelli E, Facelli JM** (2002) Soil phosphorus heterogeneity and mycorrhizal symbiosis regulate plant intra-specific competition and size distribution. *Oecologia* 133: 54-61
- Feldman LJ** (1994) "The maize root", in *The Maize Handbook*. Freeling, V Walbot (ed). New York/Berlin: Springer-Verlag. pp. 29-37
- Felle H** (1980) Amine transport at the plasmalemma of *Riccia fluitans*. *Biochim Biophys Acta* 602: 181-195
- Ferrer J** (1995) Glutamato deshidrogenasa NADP⁺ dependiente del Archaea *Haloferax mediterranei*. Estudios cinéticos y características moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Alicante, Alicante
- Fitter AH** (1987) An architectural approach to the comparative ecology of plant root systems. *New Phytol* 106: 61-77
- Fitter AH** (2002) "Characteristics and functions of root systems" en: *Plant Roots. The hidden half*. Marcel Dekker, Inc., New York
- Forde BG, Clarkson DT** (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Adv Bot Res* 30: 1-90
- Forde B, Lorenzo H** (2001) The nutritional control of root development. *Plant Soil* 232: 51-68
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: Structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1465: 219-235
- Forde BG** (2002) The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J Exp Bot* 53: 39-43
- Fransen B, de Kroon H, Berendse F** (2001) Soil nutrient heterogeneity alters competition between two perennial grass species. *Ecology* 82: 2534-2546
- Frink CR, Waggoner PE, Ausubel JH** (1999) Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *P Natl Acad Sci USA* 96: 1175-1180
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Glass ADM, Siddiqi MY** (1995) Nitrogen absorption by plants roots. In: Srivastava H.S., Singh, R.P. (eds) *Nitrogen nutrition in higher plants*. Associated Publishing Company, New Delhi
- Glass ADM, Siddiqi MY, Ruth TJ, Ruffy TW** (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley. II. Energetics. *Plant Physiol* 93: 1585-1589
- Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV** (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol* 99: 456-463

- Gowri G, Kenis J, Ingemarsson B, Redinbaugh M, Campbell W** (1992) Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol Biol* 18: 55-64
- Goyal SS, Huffaker RC** (1986) The uptake of NO_3^- , NO_2^- , and NH_4^+ by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol* 82: 1051-1056
- Gross KL, Pregitzer KS, Burton AJ** (1995) Spatial variation in nitrogen availability in 3 successional plant-communities. *Journal of Ecology* 83: 357-367
- 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* 24: 1169-1180
- Haynes RJ, Goh KM** (1978) Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol Rev* 53: 465-510
- Haynes RJ** (1986) Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In Haynes, R.J. *Mineral nitrogen in the plant-soil system*. Edit. Academic Press, San Diego, CA. pp. 303-378
- Hewitt EJ** (1975) Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Annu Rev Plant Physiol* 26: 73-100
- Higinbotham N, Etherton B, Foster RJ** (1964) Effect of External K, NH_4 , Na, Ca, Mg, and H ions on the cell transmembrane electropotential of *Avena* Coleoptile. *Plant Physiol* 39: 196-203
- Hirsch RE, Sussman MR** (1999) Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. *Trends Biotechnol* 17: 356-361
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF** (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138: 1184-1194
- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M, Woll K** (2004) From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci* 9: 42-48
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH** (2000a) Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity. *J Ecol* 88: 150-164
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH** (2000b) Spatial and physical heterogeneity of N supply from soil does not influence N capture by two grass species. *Funct Ecol* 14: 645-653
- Hodge A, Robinson D, Fitter AH** (2000c) An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in soil. *New Phytol* 145: 575-584

- Hoff T, Truon HM, Caboche M** (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ* 17: 489-506
- Hutchings MJ, de Kroon H** (1994) Foraging in plants: The role of morphological plasticity in resource acquisition. *Adv Ecol Res* 25: 159-238
- Hutchings M, John E** (2004) The effects of environmental heterogeneity on root growth and root/shoot partitioning. *Ann Bot-London* 94: 1-8
- Islas-Flores I, González-Estrada T, Villanueva MA** (2005) The capsaicin: just as hot as hell? *Recent Res Develop Biochem* 6: 121-132
- Ivashikina NV, Feyziev YM** (1998) Regulation of nitrate uptake in maize seedlings by accompanying cations. *Plant Sci* 131:25-34
- Jackson RB, Caldwell MM** (1993) Geostatistical patterns of soil heterogeneity round individual perennial plants. *J Ecol* 81: 683-692
- John I, Wang H, Held B, Wurtele E, Colbert J** (1992) An mRNA that specifically accumulates in maize roots delineates a novel subset of developing cortical cells. *Plant Mol Biol* 20: 821-831
- Jovanovic M, Lefebvre V, Laporte P, Gonzalez-Rizzo S, Lelandais-Brière C, Frugier F, Hartmann C, Crespi M** (2008) How the environment regulates root architecture in dicots. *Adv Bot Res* 46: 35-74
- King BJ, Siddiqi MY, Glass ADM** (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity - Implications for nitrate influx. *Plant Physiol* 99: 1582-1589
- King BJ, Siddiqi MY, Ruth TJ, Warner RL, Glass ADM** (1993) Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiol* 102: 1279-1286
- Koch K** (1997) "Molecular crosstalk and the regulation of C- and N-responsive genes", in *A molecular approach to primary metabolism in higher plants*. C.H. Foyer y W. P. Quick, ed. (London: Taylor and Francis), pp. 105-124
- Kolek J, Kozinka V** (1992) *Physiology of the plant root system*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 380 p
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM** (1995) Kinetics of NO₃⁻ influx in spruce. *Plant Physiol* 109: 319-326
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM** (1997) Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385: 59-61

- Kutz A, Muller A, Henning P, Kaiser WM, Piotrowsky M, Weiler EW** (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 30: 95-106
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM** (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Phys* 47: 569-593
- Lam H, Hsieh M, Coruzzi G (1998)** Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 345-353
- Lechowicz MJ, Bell G** (1991) The ecology and genetics of fitness in forest plants. II. Microspatial heterogeneity of the edaphic environment. *J Ecol* 79: 687-696
- Lewis OAM (1986)** Plants and nitrogen. Edward Arnold Publishers Ltd., London
- Lin Y, Hwang CF, Brown JB, Cheng CL** (1994) 5'proximal regions of *Arabidopsis* nitrate reductase genes direct nitrate-induced transcription in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 106: 477-484
- Lin Y, Cheng C** (1997) A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines a new *HY* locus. *Plant Cell* 9: 21-35
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser O** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* 29: 751-760
- Little YD, Rao H, Oliva S, Daniel-Vede F, Krapp A, Malamy JE** (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *P Natl Acad Sci USA* 102: 13693-13698
- Liu J, Han L, Chen F, Bao J, Zhang F, Mi G** (2008) Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Science* 175: 272-282
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* 28: 465-474
- Long-Solís J** (1998) *Capsicum* y cultura: la historia del chilli. 2da Edición. Fondo de Cultura Económica. México

- López-Bucio J, Cruz Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6: 280-287
- López GO** (2003) Chilli. La especia del Nuevo Mundo. *Ciencias* 69: 66-75
- Loqué D, von Wirén N** (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* 55: 1293-1305
- Lu Q, Briskin D** (1993) Modulation of the maize plasma membrane carrier by NO_3^- . *Phytochem* 33: 1-8
- Ludewig U, Neuhäuser B, Dynowski M** (2007) Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* 581: 2301-2308
- Luo J, Tillman RW, Ball PR** (2000) Nitrogen loss through denitrification in a soil under pasture in New Zealand. *Soil Biol Biochem* 32: 497-509
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP** (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 24: 459-467
- Maathuis F** (2009) Physiological functions of mineral nutrients. *Curr Opin Plant Biol* 12: 250-258
- MacKown CT, McClure PR** (1988) Development of accelerated net nitrate uptake. Effects of nitrate concentration and exposure time. *Plant Physiol* 87: 162-166
- Malamy JE, Ryan KS** (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127: 899-909
- Manahan SE** (2007) Introducción a la química ambiental. Ed. Reverté
- Marschner H** (1986) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, CA
- Matzke H, Mengel K** (1993) Importance of plasmalemma ATPase in the retention and exclusion of inorganic ions. *Z Pflanz Bodenkunde* 156: 515-519
- McClure PR, Kochian LV, Spanswick RM, Shaff JE** (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol* 93: 281-289
- Mengel K, Kirkby EA** (2001) Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 849 p
- Meharg A, Blatt M** (1995) NO_3^- transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: Kinetic control by pH and membrane voltage. *J Membrane Biol* 145: 49-66

- Melzer J, Kleinhofs A, Warner R** (1989) Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol Gen Genet* 217: 341-346
- Miao GH, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DPS** (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* 3: 11-22
- Miller AJ, Cookson SJ, Smith SJ, Wells DM** (2001) The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *J Exp Bot* 52: 541-549
- Miller AJ, Cramer MD** (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274: 1-36
- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith S** (2007) Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J Exp Bot* 59: 111-119
- Miller AJ, Smith SJ** (1996) Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J Exp Bot* 47: 843-854
- Montiel G, Gantet P, Jay-Allemand C, Breton C** (2004) Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol* 136: 3478-3485
- Nakazawa YE, Núñez R, Souza R, Santana N, Zúñiga JJ** (2010) Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defence-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense*. *Eur J Plant Pathol* 126: 403-415
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS** (2007) **Hidden branches: Developments in root system architecture.** *Annu Rev Plant Biol* 58: 93-113
- Owen AG, Jones DL** (2001) Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biol Biochem* 33: 651-657
- Pace GM, McClure PR** (1986) Comparison of nitrate uptake kinetic parameters across maize inbred lines. *J Plant Nutr* 9: 1095-1111
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14: 399-408
- Peuke AD, Jeschke WD, Hartung W** (1994) The uptake and flow of C, N, and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. III. Long-

- distance transport of abscisic acid depending on nitrogen nutrition and salt stress. *J Exp Bot* 45: 741-747
- Ramírez G, Góngora S, Pérez L, Chel L, González T, Tun J, Escalante E, Rodríguez L, Ledon J, Castillo J, López H** (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, Mochochá, Yucatán; México
- Rastogi R, Back E, Schnelderbauer A, Bowsher C, Moffatt B, Rothstein SJ** (1993) A 330-bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue specific expression in transgenic tobacco. *Plant J* 4: 317-326
- Raven J, Smith F** (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol* 76: 415-431
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE** (1992) *Biología de las plantas*. Vol. 2. Reverté, S.A. Barcelona. 773 p
- Redinbaugh MG, Campbell WH** (1993) Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol* 101: 1249-1255
- Robinson D** (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* 127: 635-674
- Ruiz-Cristin J, Briskin DP** (1991) Characterization of a H^+/NO_3^- symport associated with plasma membrane vesicles of maize roots using $^{36}ClO_3^-$ as a radiotracer analog. *Arch Biochem Biophys* 285: 74-82
- Santi S, Locci G, Pinton R, Cesco S, Varanini Z** (1995) Plasma membrane H^+ -ATPase in maize roots induced for NO_3^- uptake. *Plant Physiol* 109: 1277-1283
- Schiefelbein JW, Benfey PN** (1991) The development of plant roots: new approaches to underground problems. *Plant Cell* 3: 1147-1154
- Schmidt W, Tittel J, Schikora A** (2000) Role of hormone in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 122: 1109-1118
- Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ, Rufty TW Jr** (1990) Studies of the uptake of the nitrate barley. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx. *Plant Physiol* 93: 1426-1432

- Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ, Fernando M** (1989) Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{13}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol* 90: 806-813
- Signora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H** (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J* 28: 1-9
- Smart DR, Bloom AJ** (1998) Investigations of ion absorption during NH_4^+ exposure. I. Relationship between H^+ efflux and NO_3^- absorption. *J Exp Bot* 49: 95-100
- Strasburger E** (1997) Tratado de botánica. Ediciones Omega. 8va edición
- Strong DT, Fillery IRP** (2002) Denitrification response to nitrate concentrations in sandy soils. *Soil Biol Biochem* 34: 945-954
- Stitt M** (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol* 2: 178-186
- Tang P, Wu H** (1957) Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature* 179: 1355-1356
- Taylor AR, Bloom AJ** (1998) Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant Cell Environ* 21: 1255-1263
- Tompkins GA, Jackson WA, Volk RJ** (1978) Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings: effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 6-methylpurine and puromycin. *Physiol Plant* 43: 166-171
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM** (1993) The herbicide sensitivity gene *chl1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72: 705-713
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH y Hsu PK** (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581: 2290-2300
- Tun DJC** (2001) Chile habanero, características y tecnología de producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Yucatán, México
- Ullrich WR, Larsson M, Larsson CM, Lesh S, Novacky A** (1984) Ammonium uptake in *Lemna gibba* G 1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiol Plantarum* 61: 369-376
- Ullrich W, Aparicio P, Rigano C, Fuggi A** (1990) Inorganic nitrogen in plants and microorganisms: Uptake and metabolism. Springer-Verlag New York, LLC

- Unkles S, Hawker K, Grieve C, Campbell E, Montague P, Kinghorn J** (1991) *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *P Natl Acad Sci USA* 88: 204-208
- von Wirén N, Gazzarrini S, Frommer WB** (1997) Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant Soil* 196: 191-199
- Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C** (2000) Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot* 51: 227-237
- Walker NA, Beilby MJ, Smith FA** (1979a) Amine uniport at the plasmalemma of charophyte cells: I. Current-voltage curves, saturation kinetics, and effects of unstirred layers. *J Membr Biol* 49: 21-55
- Walker NA, Smith FA, Beilby MJ** (1979b) Amine uniport at the plasmalemma of charophyte cells II. Ratio of matter to charge transported and permeability of free base. *J Membr Biol* 49: 238-296
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM** (1993) Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma). *Plant Physiol* 103: 1259-1267
- Wang MY, Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV** (1994) Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. *Plant Physiol* 104: 899-906
- Wang Y, Garvin D, Kochian L** (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol* 127: 345-359
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* root and shoot reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 132: 556-567
- Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM** (2004) Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 2512-2522
- Warner R, Kleinhofs A** (1992) Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol Plantarum* 85: 245-252
- Williams LE, Miller AJ** (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 659-688
- Xu Y, Buchholz W, DRose R, Hall T** (1995) Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. *Plant Mol Biol* 27: 237-248

- Zhang H, Forde BG** (1998a) ...response: Nitrate and root branching. Trends Plant Sci Research News 3: 204-205
- Zhang H, Forde BG** (1998b) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. Science 279: 407-409
- Zhang H, Jennings A, Barlow P, Forde B** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. P Natl Acad Sci USA 96: 6529-6534
- Zhang H, Forde BG** (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. J Exp Bot 51: 51-59
- Zhen RG, Koyro HW, Leigh RA, Tomos AD, Miller AJ** (1991) Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. Planta 185: 356-361
- Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM** (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 17: 563-568

CAPÍTULO II

Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq.*

Teresita de Jesús Celis-Arámburo, Mildred Carrillo-Pech, Lizbeth Castro-Concha, María de Lourdes Miranda-Ham, Manuel Martínez-Estévez, Ileana Echevarría-Machado

II.1. ABSTRACT

The effects of nitrate (NO_3^-) on the root system are complex and depend on several factors, such as the concentration available to the plant, endogenous nitrogen status and the sensitivity of the species. Though these effects have been widely documented on *Arabidopsis* and cereals, no reports are available in species of the *Capsicum* genus. In this paper, we have determined the effect of an exogenous *in vitro* application of this nutriment on root growth in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). Exposure to 1 mM NO_3^- inhibited primary root growth in both, dose- and time-dependent manners; however, not all accessions of habanero pepper were affected similarly. The highest inhibition was attained with 0.1 mM NO_3^- between the fourth and fifth day of treatment. Inhibition of primary root growth was observed by exposing the root to both homogeneous and heterogeneous conditions of the nutriment; in contrast, ammonium was not able to induce similar changes. Heterogeneous NO_3^- application stimulated the formation and elongation of lateral roots in the segment where the nutriment was present, while the opposite for LR formation happened where its concentration was low. This effect was also not observed in all accessions. These results demonstrate that habanero pepper responds to NO_3^- in a similar fashion as other species with certain particular differences. Therefore, studies in this model could help to elucidate the mechanisms by which roots respond to NO_3^- in fluctuating soil environments.

II.2. ABBREVIATIONS

LR, lateral root; NR, nitrate reductase; PR, primary root

*Estos resultados forman parte de un artículo que se aceptó para su publicación en la revista *Plant Physiology and Biochemistry*.

II.3. INTRODUCTION

Plants integrate information from the environment to trigger responses that lead to the formation of new roots and shoots. This dynamic developmental strategy allows the plant to capture available soil resources, on which it is totally dependent.

Unfortunately, spatial and temporal availability of nutrients in the soil, particularly nitrogen (N), are highly heterogeneous (Owen & Jones, 2001; Miller & Cramer, 2004; Bloom *et al.*, 2006). N is the mineral element that most limits crop productivity due to its high requirement, indicating that it may play a significant role in the integration of root responses to nutrient gradients.

When root systems are exposed to heterogeneous conditions of NO_3^- , lateral root proliferation is observed in the segment exposed to the nutrient, whereas inhibition is detected where there is a NO_3^- deficit (Hackett, 1972; Drew *et al.*, 1973; Drew, 1975; Drew & Saker, 1975; Granato & Raper, 1989; Scheible *et al.*, 1997; Zhang & Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Linkohr *et al.*, 2002). In cereals, this proliferation appears to be caused by an increase in both the number and the elongation rate of lateral roots (LR) as observed in wheat (Hackett, 1972), barley (Drew *et al.*, 1973; Drew, 1975; Drew & Saker, 1975) and maize (Granato & Raper, 1989). However, in *Arabidopsis* the results are contradictory: some report a stimulation in the elongation rate, but not the number of LR in the NO_3^- enriched segment (Zhang & Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999), while some others describe stimulation of both processes (Linkohr *et al.*, 2002).

LR growth can also be inhibited by NO_3^- , which can be observed not only in segments exposed to a NO_3^- deficiency under heterogeneous conditions, but also in NO_3^- -rich segments (≥ 10 mM) in both heterogeneous and homogeneous conditions (Zhang & Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Signora *et al.*, 2001).

The primary root (PR) appears to be less sensitive to this ion, as has been determined under heterogeneous conditions in cereals (Drew *et al.*, 1973; Drew, 1975; Drew & Saker, 1975; Granato & Raper, 1989) and in *Arabidopsis* (Zhang & Forde, 1998; Linkohr *et al.*, 2002). In contrast, homogeneous exposure to NO_3^- (1 mM) inhibited PR growth in *Arabidopsis* in an age-dependent manner (Linkohr *et al.*, 2002), as well as in maize, in concentrations ranging up to 0.1 mM (Zhao *et al.*, 2007) or even at doses ≥ 0.5 mM (Tian *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2008). However, Zhang & Forde (1998) failed to observe this effect, even at doses of 50 mM NO_3^- . Different genotypes displayed varying sensitivity to NO_3^- (Tian *et al.*, 2005). NO_3^-

directly stimulated PR growth in *Arabidopsis* when placed on the root tip and this effect depended on the studied accession (Walch-Liu & Forde, 2008).

It has been suggested that the NO_3^- ion acts itself directly as a signaling molecule to regulate localized LR elongation (Zhang & Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Nevertheless, a systemic inhibitory effect seems to be mediated by signals derived from the internal N status (Forde, 2002).

Although NO_3^- sensors and the signaling pathways mediating these effects are not fully characterized, in recent years the roles of some important components involved in root response to NO_3^- , particularly in *Arabidopsis*, have been described. It has been suggested that the NO_3^- transporters NRT1.1 and NRT2.1 could act as NO_3^- sensors. NRT1.1 mutants are unable to promote an increased LR proliferation in patches enriched with NO_3^- ; this effect is mediated by the transcription factor ANR1 (Remans *et al.*, 2006a). In *Medicago truncatula*, an NRT1 transporter seems to be involved in both PR and LR development in response to NO_3^- (Yendrek *et al.*, 2010). Furthermore, NRT2.1 has been implicated in controlling LR initiation in response to low supplements of NO_3^- (Remans *et al.*, 2006b) and LR repression in response to a high C/N high ratio (Little *et al.*, 2005).

Two protein kinases that are induced by NO_3^- , CIPK8 and CIPK23, seem to play key roles in the NO_3^- signaling pathway. While CIPK8 positively regulates NO_3^- -induced gene expression (Hu *et al.*, 2009), CIPK23 is a negative regulator (Ho *et al.*, 2009).

The role of phyto-hormones in NO_3^- response has also been extensively studied. Auxin is considered an excellent candidate for mediation of N signaling due to its importance in LR initiation and development (Forde, 2002; Fukaki & Tasaka, 2009). Auxin levels vary in response to NO_3^- treatment, correlating with changes in root growth (Walch-Liu *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2008).

On the other hand, cytokinins appear to act as local or long distance signaling molecules in response to NO_3^- (Miyawaki *et al.*, 2004; Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008). The N supply leads to an increase in cytokinin levels in various species (Singh *et al.*, 1992; Samuelson & Larsson, 1993; Wagner & Beck, 1993; Takeji *et al.*, 2001; Kiba *et al.*, 2011), which can be associated with a reduced PR and LR growth as well as LR formation (Werner *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2005).

Other phyto-hormones, such as abscisic acid (ABA) (Signora *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Shkolnik-Inbar & Bar-Zui, 2010; Yendrek *et al.*, 2010) and ethylene (Tian *et al.*, 2009), could also be involved in the NO_3^- -mediated

signaling pathways, particularly in inhibitory events in response to high concentrations of NO_3^- .

The effect of NO_3^- on the root system has largely been characterized in *Arabidopsis* and cereals. However, there are very few studies in others families, such as Solanaceae. For instance, tomato root growth shows a hyperbolic response to soil inorganic N levels: very few roots were found in soil blocks depleted of inorganic N, and then roots began proliferating with increasing levels of inorganic N up to a point, to finally decrease in soil containing high levels of inorganic N (Bloom *et al.*, 2003).

Root growth in tobacco transformants with low nitrate reductase (NR) activity showed a two to three fold reduction when exposed to homogeneous 12 mM NO_3^- concentration, compared to those grown at 0.2 mM. However, when the nutriment was applied in a heterogeneous manner, root growth was much higher in the part exposed to 12 mM NO_3^- than in that in contact to 0.2 mM (Scheible *et al.*, 1997).

Since the effects of N on root system architecture are complex and depend on several factors, among them the plant species, it is important to broaden the knowledge of these to other plant families to learn about conservation and/or specificity in response mechanisms. The aim of this work was to study the effect of an exogenous *in vitro* NO_3^- application on the root system of habanero pepper (*C. chinense*), a species belonging to the *Capsicum* genus of the Solanaceae family.

II.4. MATERIALS AND METHODS

II.4.1. PLANT MATERIAL

C. chinense cv. Orange seeds (Seminis Vegetable Seeds, Inc. 2700 Camino del Sol, Oxnard, CA 93030, USA) were used in most of the experiments. Other accessions, namely NP4EC, P1115C (cv. Orange), S5B (cv. Orange), Timul 2-1 (cv. Orange), MR-8 (cv. Red) and R4 (cv. Red), were collected in different parts of Yucatan.

II.4.2. GROWTH CONDITIONS

Seeds were surface sterilized for five minutes in 80 % ethanol (v/v) followed by four rinses with sterile distilled water and placed for 15 minutes in diluted commercial bleach [30 % (v/v), CloralexTM, Allen Distribuidora SA de CV]. Seeds were then rinsed again four times with sterile distilled water and left to imbibe for 48 hours in water at 4°C in the dark.

Seeds were germinated by placing them in 9-cm petri dishes containing a thin cotton layer covered with filter paper moistened with sterile distilled water. The dishes were placed in the dark at 25°C. Once the radicle protruded, seeds were transferred to 9-cm petri dishes, oriented vertically and placed in a growth room under a photoperiod of 16 h light/8 h dark at 25°C, and a light intensity of approximately 50.26 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$. Growth medium (-NI) contained 23 mM MES (pH 5.7), 0.5 % (w/v) sucrose, 1 % (w/v) agar-agar and 1:50 B5 medium salts (Gamborg *et al.*, 1968), from which N was removed in the form of KNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. To compensate for this removal, 1 mM KCl was added, and 0.01 mM NH_4NO_3 acted as the sole nitrogen source.

II.4.3. HETEROGENEOUS OR HOMOGENEOUS NO_3^- TREATMENTS

The effect of a heterogeneous distribution of NO_3^- on the root system architecture was followed under aseptic conditions on segmented agar plates (Zhang & Forde, 1998). Habanero pepper seedlings with a 20 mm-long PR growing in low levels of NO_3^- (0.01 mM NH_4NO_3 , -NI medium) were transferred to 9-cm petri dishes containing -NI medium that had been divided into three segments separated by a distance of approximately 3 mm. The top and middle segments were each 15 mm wide. In order to apply the NO_3^- patch, 50 μl of a 100 mM stock solution of whether 1 mM KCl (control) or 1 mM KNO_3 (treatment) were added to the middle segment and allowed to diffuse throughout overnight at 25 °C. The seedlings were placed on the surface of the agar so that approximately 2 mm from the apex were in contact with the middle segment where NO_3^- treatment was applied (heterogeneous -+). An inverted heterogeneous (heterogeneous +-+) experiment was performed in which the top and bottom segments were adjusted with 1 mM KNO_3 , and seedlings were placed in a position similar to that described above.

For the dose-response experiments, KCl or KNO_3 concentrations in the middle segment were adjusted to 0.01, 0.05, 0.1, 1, 2.5, 5 or 10 mM. In the case where ammonium (NH_4^+) was used, the middle segment was adjusted to 0.01, 0.1, 0.5 or 1 mM NH_4Cl .

For the homogeneous treatment, the petri dishes contained -NI medium with either 1 mM KCl (control) or 1 mM KNO_3 (treatment). These boxes were not segmented, and the seedlings were placed in a position similar to that of the segmented plates, using as reference lines that were drawn on the back of the boxes, that simulated three segments of segmented plates.

II.4.4. EFFECT OF TUNGSTATE ON THE ROOT RESPONSE TO NO₃⁻

The effect of NO₃⁻ patches on the root system was evaluated in the presence of tungstate, a NR inhibitor. Segmented plates were used, and a dose response experiment was performed to determine the threshold concentration that would not affect PR growth, where the middle segment was adjusted to 1 mM KCl (control) + 0, 0.025, 0.050, or 0.1 mM Na₂WO₄. The chosen concentration was 0.050 mM Na₂WO₄, which was applied only in the middle segment. Molybdate (Na₂MoO₄) was present in all segments at a concentration of 0.02 μM (basal concentration).

II.4.5. EVALUATION AND ANALYSIS OF RESULTS

Daily PR growth was recorded at the same hour at which the seedlings were placed in treatment (day 0). Measurements were made with a ruler directly on the petri dish or aided by a stereoscope (Leica MZ FLIII). Root growth was photographed on the first, fifth and tenth day of treatment using images (Epson Perfection 3490 Photo, Seiko Epson) to a resolution of 300 dpi. To report the onset of visible LR formation (larger than 0.5 mm), seedlings in petri dishes were monitored daily with a stereoscope.

At the final day of evaluation (day 10), the number and length of the LR were recorded aided with a stereoscope. To measure total PR length, the roots were spread out on an agar plate with the help of a clamp.

For all experiments, three seedlings were placed in each plate and at least, five plates were used per treatment. Experiments were repeated at least twice.

II.5. RESULTS

II.5.1. EFFECT OF HETEROGENEOUS NO₃⁻ CONDITIONS ON PR GROWTH

In order to examine the adaptive response of habanero pepper's root system to local NO₃⁻ patches, seedlings were pre-grown on agar plates with a low NO₃⁻ concentration (0.01 mM) and transferred to plates that were divided into three segments so that the PR apex was placed just below the first gap, in contact with the middle segment (Zhang & Forde, 1998). Treatment with 1 mM KCl had no effect on PR growth compared to controls with H₂O.

PR growth of seedlings exposed to heterogeneous conditions of NO₃⁻ was lower (49.6 ± 2.6 mm) than those exposed to KCl (57.8 ± 1.5 mm) after 10 days (Fig. 2.1A). When assessing the effect of these conditions over time, no differences in PR growth were observed between the seedlings exposed

to KCl or KNO₃ during the first three days of exposure (Fig. 2.1B). However, after this day, an inhibitory effect was observed in the treated seedlings. This difference became more marked between the fourth and fifth day (Figs. 2.1B and C), when PR growth of KNO₃ exposed seedlings was 70 % lower than that of the control. Cumulative growth on the fifth day of seedlings placed in heterogeneous NO₃⁻ conditions was 16 % lower (36.3 ± 1.4 mm) than its control counterparts (43.4 ± 1.0 mm). A similar effect was observed for seedlings growing under homogeneous NO₃⁻ conditions (Figs. 2.1A, B and C).

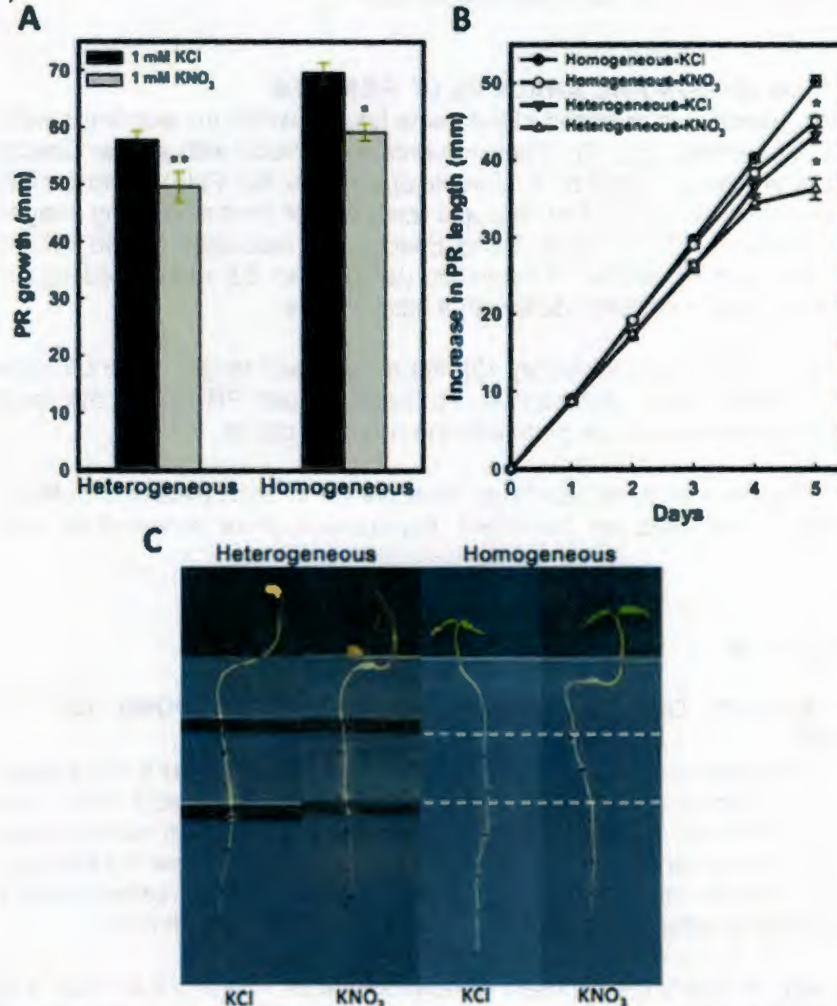


Figure 2.1. Response to NO₃⁻ of PR growth in habanero pepper seedlings. Seedlings were grown either under a NO₃⁻-rich patch (heterogeneous -+-) or homogeneous conditions, using 1 mM KNO₃ (treatment) or KCl (control), as

*indicated in Materials and methods. (A) PR growth after 10 days of exposure. (B) Cumulative PR growth in the first 5 days. (C) Photograph showing seedlings growth either in heterogeneous or homogeneous NO₃⁻ conditions after 5 days. Black dots indicate daily PR growth. Values represent mean ± SE, n = 15-21 seedlings. Asterisk represent significant differences based on Tukey's test, P < 0.01(**) or P < 0.05 (*).*

PR growth inhibition was dose dependent. The highest inhibition was obtained between the fourth and fifth day of treatment. Low NO₃⁻ doses (0.01 and 0.05 mM) did not affect growth; however, the highest inhibitory effect on growth occurred between the fourth and fifth day with 0.1 mM NO₃⁻ (Fig. 2.2A). The use of higher concentrations, ranging from 2.5 to 10 mM NO₃⁻ showed inhibition values that were not significantly different from those obtained with 0.1 mM.

An alternative source of inorganic nitrogen (NH₄⁺) provoked different effects on PR growth, which were both dose- and time-dependent, from the ones observed for NO₃⁻. Exposure to 0.01 mM NH₄⁺ resulted in an increase (approximately 20 %) in growth between the fourth and fifth day compared to control seedlings (Fig. 2.2B). At a dose of 0.1 mM NH₄⁺, there was no significant effect on growth, while at high doses (0.5 and 1 mM NH₄⁺), an inhibitory effect was noted. However, this inhibition was lower (about 40 %) than that caused by NO₃⁻ (approximately 70 %) (Figs. 2A and B). When analyzing cumulative growth during the first five days of treatment, no significant changes were observed at doses between 0.01 and 0.1 mM NH₄⁺, and only a slight decrease at higher doses (Fig. 2.2B).

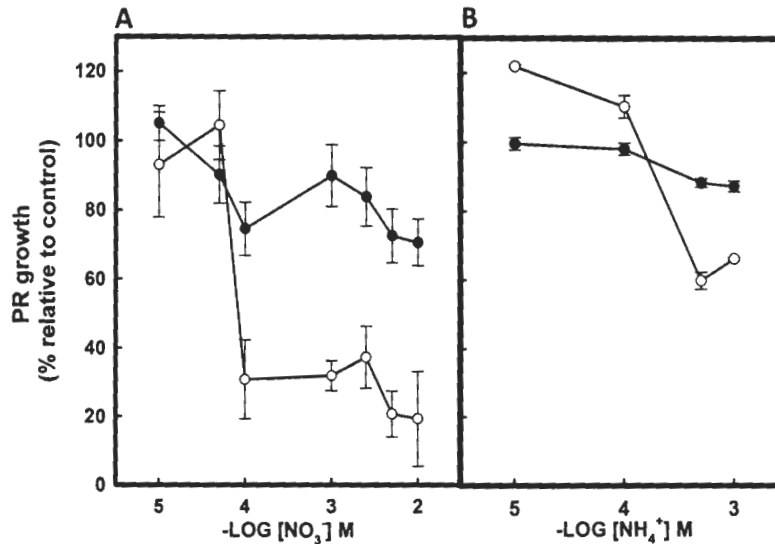


Figure 2.2. Response to NO_3^- or NH_4^+ supply of PR growth in habanero pepper seedlings. Seedlings were cultivated during 5 days under heterogeneous conditions (-+-), NO_3^- concentration range (A; 0.01, 0.05, 0.1, 1, 2.5, 5 and 10 mM) or NH_4^+ (B; 0.01, 0.1, 0.5 and 1 mM) in the middle segment, as specified in Materials and methods. Data are expressed as percentages of PR growth in KCl. PR growth after 5 days (●, 100 % = 42.36 ± 1.09 mm), and PR growth between 4th and 5th day (○, 100 % = 6.67 ± 0.17 mm). Values represent mean \pm SE, $n = 12-15$ seedlings.

II.5.2. EFFECT OF HETEROGENEOUS NO_3^- CONDITIONS ON LR FORMATION AND GROWTH

Under the described conditions, the first visible LR (longer than 0.5 mm) appeared after 5 days of treatment. This behavior was similar in all treatments, and in general, LR formation in habanero pepper was scarce (a maximum of six LR per seedling) by day 10. Exposure to heterogeneous NO_3^- conditions stimulated LR formation in the PR segment exposed to the nutrient (Fig. 2.3A). However, the LR number decreased when PR reached the bottom segment where it was not in direct contact with NO_3^- (Fig. 2.3A). These results indicate that unlike the localized stimulatory effect, the inhibitory effect of NO_3^- on LR formation is systemic.

Total LR length was also higher in the middle segment (four-fold higher) where they were exposed to 1 mM NO_3^- compared to control seedlings, whereas no significant differences between treatment and control were

observed in the bottom segment (Fig. 2.3B). The average LR length for control seedlings in the middle segment was 6.50 ± 0.50 mm ($n = 2$ roots), which was significantly lower than that in the treated seedlings (17.34 ± 1.98 mm, $n = 29$ roots). Data indicate that the increase in total LR length (Fig. 2.3B) was not due solely to an increase in root number, but to a NO_3^- stimulation of LR growth. No significant differences in the average LR length in the bottom segment between the treatment (4.50 ± 1.52 mm, $n = 5$ roots) and control (2.91 ± 0.53 , $n = 17$ roots) were found.

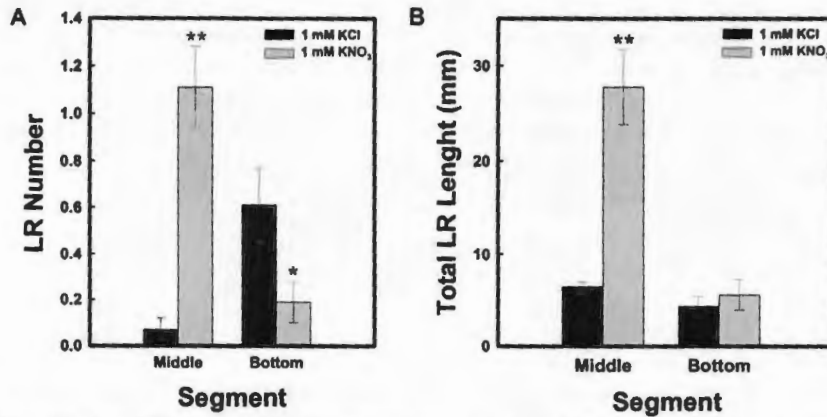


Figure 2.3. Effect of NO_3^- localized supplies on LR number and elongation in habanero pepper seedlings. Seedlings were placed on plates divided into three segments (top, middle and bottom), where 1 mM KCl (control) or 1 mM KNO_3 (treatment) was added to middle segment (heterogeneous application, -+-) and the LR number (A) or total LR length (B) were measured in each segment after 10 days. No LR were formed in the top segment. Data represent mean \pm SE, $n = 15-21$ seedlings. Asterisks represent significant differences based on Tukey's test, $P < 0.001$ (**) or $P < 0.05$ (*).

To exclude the notion that increased LR production in the middle segment resulted from a higher degree of PR development and not from the localized treatment, the effect of an homogeneous application of KNO_3 was tested, along with the application of NO_3^- to the top and bottom segments (heterogeneous inverted distribution, +-+).

Homogeneous application to the entire PR stimulated LR formation and this was observed not only in the area that would have corresponded to the middle segment of the heterogeneous conditions, but also in the bottom segment (Table 1). Under the homogeneous conditions, fewer seedlings (37

%) were not able to form LR in response to NO_3^- , but up to four LR were formed in the bottom segment, when compared to exposure under heterogeneous conditions, in which 85 % of the seedlings did not form roots and no more than two were formed in this segment (Table 1).

By applying NO_3^- to the top and bottom segments (heterogeneous inverted distribution, +-+), localized stimulation was observed, which dependent on the presence of nutriment, particularly at the bottom end; some treated seedlings produced up to five LR in this segment (Table 1).

Table 2.1. Effect of NO_3^- on LR formation in *C. chinense*. Seedlings were grown either under heterogeneous (-+- or +-+) or homogeneous (- or +) conditions, using 1 mM KNO_3 (+, treatment) or KCl (-, control). Values represent LR number per seedling evaluated after 10 days of treatment in each segment. Numbers in parentheses are the percentage of seedlings that had this LR number, where 30 seedlings correspond to 100 %.

#LR/seedling (seedlings percent with this LR number)					
HOMOGENEOUS			HETEROGENEOUS		
SEGMENT	- KNO_3	+ KNO_3	KNO_3 (- - -)	KNO_3 (-+-)	KNO_3 (+-+)
Top	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (93.02%)
					1 (4.65%) 2 (2.33%)
Middle	0 (58.33%)	0 (25.00%)	0 (92.86%)	0 (29.64%)	0 (88.37%)
	1 (29.16%)	1 (41.66%)	1 (7.14%)	1 (33.33%)	1 (11.63%)
	2 (12.50%)	2 (33.33%)		2 (33.33%) 3 (3.70%)	
Bottom	0 (37.50%)	0 (37.50%)	0 (57.15%)	0 (85.19%)	0 (20.93%)
	1 (41.66%)	1 (33.33%)	1 (28.57%)	1 (11.11%)	1 (30.23%)
	2 (20.83%)	2 (20.83%)	2 (10.71%)	2 (3.70%)	2 (25.58%)
		3 (4.16%) 4 (4.16%)	3 (3.57%)		3 (16.28%) 4 (4.65%) 5 (2.35%)

Homogeneous NO_3^- application stimulated LR formation in the middle and bottom segments, compared to control plants homogeneously treated with KCl (Fig. 2.4A). However, when NO_3^- treatment was applied in the middle segment, growth was stimulated approximately 15-fold in comparison to the control, and even reduced LR number in the bottom end (Fig. 2.4A). Uneven application of NH_4^+ was not as successful as NO_3^- in stimulating LR formation, and no roots were detected in the bottom segment (Fig. 2.4A).

Though homogeneous NO_3^- application increased LR growth in the middle and bottom segments, the heterogeneous exposure stimulated growth

approximately four times in the middle segment and did not induced a significant effect in growth in the bottom one (Fig. 2.4B). On the other hand, the effect obtained with NH_4^+ in the middle segment was similar to the one obtained for the homogeneous NO_3^- treatment (Fig. 2.4B).

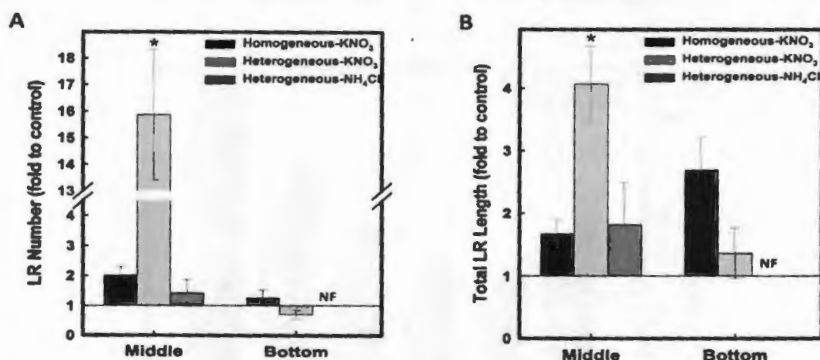


Figure 2.4. Effect of NH_4^+ and NO_3^- (uniform or localized supply) on LR proliferation. Seedlings were placed in plates with a homogeneous KNO_3 concentration (1 mM) or in plates divided into three segments (top, middle and bottom), with 1 mM KNO_3 or 1 mM NH_4Cl applied into the middle segments. In controls, KNO_3 or NH_4Cl were substituted by 1 mM KCl . The LR number (A) and length (B) were evaluated after 10 days of treatment in each segment (mean \pm SE, $n = 12-15$ seedlings). In the homogeneous treatment, segments were spatially simulated by lines drawn on the back of the plates, as shown in Fig. 2.1C. Data are expressed as fold to controls with KCl , where one fold was: in A, 0.54 ± 0.15 LR in homogeneous KCl or 0.07 ± 0.05 LR in heterogeneous KCl , both in middle segment, and 0.83 ± 0.16 LR in homogeneous KCl or 0.61 ± 0.16 LR in heterogeneous KCl , both in bottom segment; in B, 7.75 ± 1.56 mm in homogeneous KCl or 6.50 ± 0.50 mm in heterogeneous KCl , both in middle segment, and 2.67 ± 0.47 mm in homogeneous KCl or 4.13 ± 0.90 mm in heterogeneous KCl , both in bottom segment. NF (non-formed, no LR were formed in NH_4^+ treatment). Asterisks represent significant differences based on Tukey's test, $P < 0.001$.

II.5.3. DIFFERENTIAL SENSITIVITY TO NO_3^- EXPOSURE IN *Capsicum chinense* Jacq.

A small collection of habanero pepper accessions was screened in order to establish the universality of the response to NO_3^- exposure, and the degree of variability among genotypes. Seedlings from six different accessions of *C. chinense* were exposed to the heterogeneous NO_3^- treatment in segmented plates. There were great variations in PR growth among the accessions after five days of exposure. PR from accessions P1115C and S5B grew about 30

mm, whereas others, such as those of R4 and MR-8, grew 65 and 50 mm, respectively (Fig. 2.5A). Nevertheless, and in the same manner as in the Seminis accession, these also showed an important inhibition of PR growth between the fourth and fifth day of treatment, but the percentages differed among them, ranging from a modest 13 % (MR-8) to values as high as 70 % (NP4EC) (Fig. 2.5B).

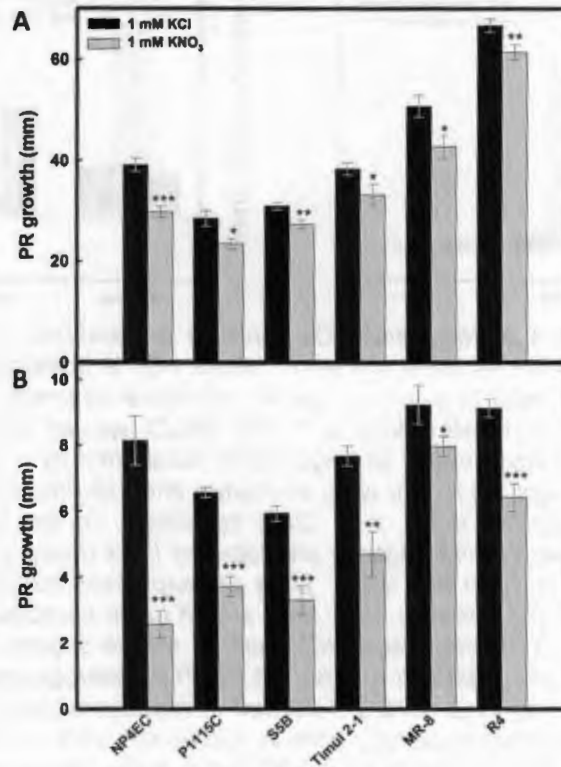


Figure 2.5. PR response to external NO_3^- of six habanero pepper accessions. Experiment was done using the heterogeneous scheme under similar conditions used in Fig. 2.3. (A) PR growth after 5 days of treatment. (B) PR growth between 4th and 5th days of treatment. Values represent mean \pm SE, $n = 15$ seedlings. Asterisks represent significant differences based on Tukey's test, $P < 0.001$ (***), $P < 0.01$ (**), or $P < 0.1$ (*).

In accessions P1115C, Timul 2-1 and NP4EC, LR formation was unaffected by NO_3^- treatment, whereas this parameter increase in all the other accessions (Fig. 2.6A). There were also important differences in LR length after exposure to NO_3^- in all the accessions studied. LR growth was not significantly affected in NP4EC, P1115C, S5B and MR-8, while it was

maximal in Timul 2-1 and R4 (Fig. 2.6B). These results demonstrate that even when the general response to NO_3^- is inhibition of PR growth, there is an intraspecies root response to this nutrient in *Capsicum* (Fig. 2.6C).

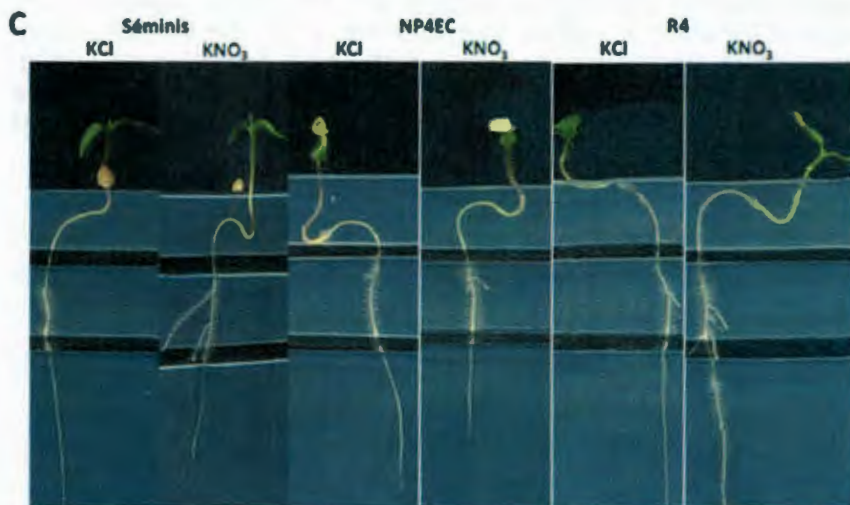
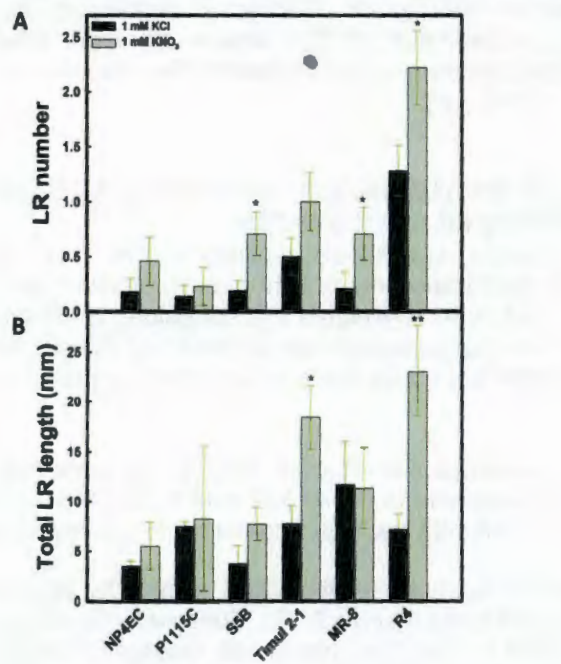


Figure 2.6. LR response to external NO_3^- of six habanero pepper accessions. Experiment was done using the heterogeneous scheme under

similar conditions used in Fig. 2.3. (A) LR number in middle segment, evaluated after 10 days. (B) Total LR length in the middle segment, evaluated at same day. (C) Photograph shows representative seedlings of three accessions growing for 10 days in heterogeneous conditions from control (KCl) or treatment (KNO_3). Values represent mean \pm SE, $n = 15$ seedlings. Asterisks represent significant differences based on Tukey's test, $P < 0.01$ (**), or $P < 0.1$ (*).

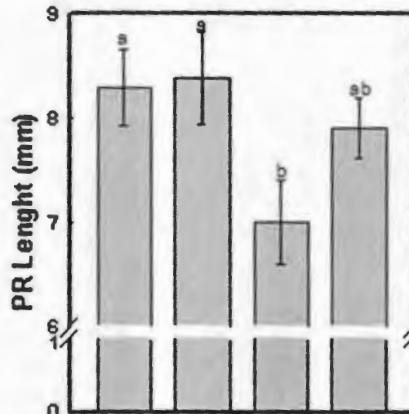
II.5.4. EFFECT OF TUNGSTATE OF ON THE RESPONSE TO NO_3^- IN HABANERO PEPPER ROOT SYSTEM

The fact that roots respond differentially to NH_4^+ and NO_3^- suggest that changes in its root system result from a direct effect of NO_3^- and not from its metabolism. To further investigate this, tungstate, a NR inhibitor, was used. An initial dose-response experiment showed that PR growth was inhibited at 0.1 mM tungstate but not to those lower than or equal to 0.050 mM (Figure S2.1).

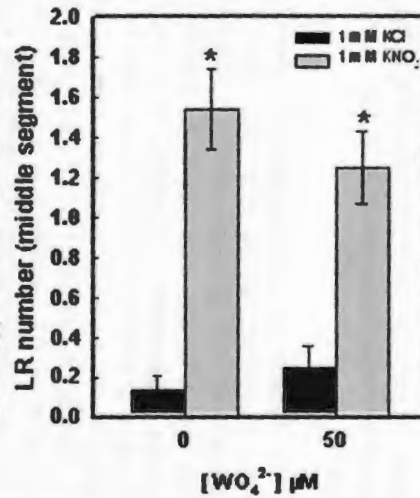
Therefore, to evaluate the effect of NO_3^- in the presence of this inhibitor, seedlings were exposed to 1 mM KCl plus 0.05 mM Na_2WO_4 (control) or 1 mM KNO_3 plus 0.05 mM Na_2WO_4 (treatment) in the middle segment.

The presence of tungstate inhibited NR activity by approximately 45 % in habanero pepper roots (Figure S2.2). Tungstate did not affect accumulated PR growth in the NO_3^- -treated plants with respect to control. PR growth was significantly inhibited after 4 days exposed to 1 mM KNO_3 , consistent with our previous experiments without tungstate (Fig. 2.7A). On the other hand, the presence of the NR inhibitor did not affect LR formation either (Fig. 2.7B). However, the most important effect of the use of tungstate translated in a greatly lowered LR growth in response to NO_3^- in the middle segment (Fig. 2.7C).

A



B



C

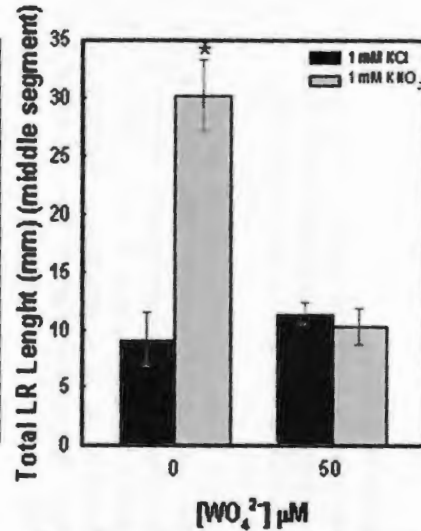


Fig. 2.7. Effect of tungstate on root growth response to localized NO₃⁻ supplies. Experiment was performed in segmented agar plates, as in Fig. 2, but 0.05 mM tungstate, a NR inhibitor, was added into the middle segment along with localized treatment (control-KCl, treatment-KNO₃, both 1 mM). (A) PR growth between 4th and 5th days after transfer to treatment. (B) LR number in middle segment, evaluated after 10 days. (C) Total LR length in middle segment, evaluated at same day. Values represent mean ± SE, n = 15 seedlings. Different letters represent significant difference (P ≤ 0.01), and asterisks represent significant differences based on Tukey's test, P ≤ 0.001.

II.6. DISCUSSION

II.6.1. EFFECT OF NO₃⁻ ON PR GROWTH

There are widespread notions about the effects that NO₃⁻ supplements have on the root system, one is that they modify the radicular architecture, altering LR number and length, and also that PR is less sensitive to this nutriment. However, we have demonstrated that habanero pepper's PR is highly sensitive to the presence of NO₃⁻ (Figs. 2.1 and 2.2). PR growth is inhibited by NO₃⁻ concentrations as low as 0.1 mM (Fig. 2.2). This inhibition occurs in a very narrow window of time, specifically between the fourth and fifth day of treatment and does not depend on the manner in which the nutriment is applied, whether heterogeneously or homogeneously. Though this effect could be observed in all pepper accessions studied, the degree of inhibition differed among them (Fig. 2.5).

So far, no such effect has been reported in other plant species in the same period of time when the experiment took place in agar dishes, particularly under heterogeneous conditions.

In *Arabidopsis*, inhibition of PR growth has been observed when NO₃⁻ is applied homogeneously at high concentrations (50 mM), but not in a range between 0.1 and 10 mM (Signora *et al.*, 2001). Contrastingly, Zhang & Forde (1998) were unable to observe this inhibition, even up to 50 mM NO₃⁻. It is noteworthy to mention that some experimental conditions, such as type of accession, sucrose concentration and exposure period were different, which could explain the discrepancies in results. However, PR growth in *Arabidopsis* is not inhibited at NO₃⁻ concentrations as low as those reported here for habanero pepper (Guo *et al.*, 2001; Castaings *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009). There are even reports that 0.05 mM NO₃⁻ can stimulate PR growth in *Arabidopsis*, but this effect was dependent on the accession used (Walch-Liu & Forde, 2008).

On the other hand, a reduction in PR length in response to NO₃⁻ under homogeneous conditions was observed in *Medicago truncatula* at a dose of 1 mM NO₃⁻ after three weeks of treatment (Yendrek *et al.*, 2010), as well as in *Zea mays* at doses equal or higher to 5 mM NO₃⁻ (Tian *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2008).

Our results suggest that inhibition of habanero pepper PR growth is not a short-term response to NO₃⁻, since it occurred between the fourth and fifth day of exposure, which may indicate that various signals that trigger the process are converging either within this time frame, or immediately before it. Coincidentally, on the fifth day, the first LR became visible in all treatments. Under these conditions, reduced PR growth could be a result of

competition for assimilates, in which a portion of these resources have been diverted towards LR formation and/or shoot growth, and thus sacrificing PR growth.

It is known that the allocation of carbon skeletons plays a definite role in LR development in the presence of NO_3^- , whether by a preferential transport of soluble carbohydrates to the zone which favors LR development (Drew & Saker, 1975) or a reduced translocation that limits root growth (Bloom *et al.*, 2003), or even a strong inhibition of starch synthesis in tobacco leaves (Scheible *et al.*, 1997). In the case of habanero pepper, it seems to be unlikely that a competition for photosynthates is the cause for PR inhibition, as no correlation was found between this inhibition and an increased LR production and elongation in response to NO_3^- in the different accessions studied. For instance, accession NP4EC had a poor response to NO_3^- in terms of LR formation and elongation, but showed the highest PR growth inhibition recorded between the fourth and fifth day, whereas accession R4 produced a large LR number, which were also longer, in response to NO_3^- , although PR growth inhibition was about half that observed in NP4EC (Figs. 2.5 and 2.6).

The effect of NO_3^- on the habanero pepper PR can be a specific event that requires no further change in other components of the root system. This could be observed in accessions NP4EC and P1115C, where their only response to NO_3^- was to inhibit PR growth, no effect on LR production and elongation was registered (Figs. 2.5 and 2.6).

NH_4^+ was not able to produce the same effects on PR as NO_3^- (Fig. 2.2B). These results suggest that NO_3^- , but not a product of its assimilation, is responsible for inhibiting PR growth. However, treatment with tungstate, a NR inhibitor, is able to restore growth to levels similar to the control (Fig. 2.7A). Therefore, it is not possible to put aside the effect of metabolites produced from NO_3^- , which may be contributing to this response.

Since the inhibitory effect of NO_3^- on PR growth could be observed in all seven accessions studied, but to a different level in each one, it is likely that levels of exogenous and/or endogenous NO_3^- may be regulating phyto-hormone translocation and/or signaling in the root tip, and thus, development. The role of phyto-hormones in the effect of NO_3^- on PR has been reported in maize, where indoleacetic acid levels (IAA) decreased in the phloem and apex of the root upon accumulation of endogenous NO_3^- . This reduction was greater after three days of exposure to 10 mM NO_3^- (Tian *et al.*, 2008). In *Medicago truncatula*, reduction in PR length appears to be mediated by a nitrate transporter NRT1, which is regulated by auxins, cytokinins and ABA (Yendrek *et al.*, 2010).

NO_3^- induces expression of the auxin receptor AFB3 at the apex of the root of *Arabidopsis*, allowing it to play a role in phyto-hormone signaling. However, mRNA levels of AFB3 decline rapidly after induction due to its regulation by the microRNA miR393, which is induced by NH_4^+ and glutamate (Vidal *et al.*, 2010). If this type of regulation occurs in the habanero pepper, it could represent a mechanism to adjust radicular growth in a fast and accurate manner depending on the internal and external availability of NO_3^- .

Cytokinin levels can be effectively modified by NO_3^- , both in the leaves and the roots (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005; Garnica *et al.*, 2010; Kiba *et al.*, 2011). They also appear to play an important role in regulating PR growth (Takei *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003), as is the case in one particular maize variety. This effect was the opposite in a different variety, where cytokinin levels did not increase, and the PR was not sensitive to this concentration of NO_3^- . Root growth was inhibited upon exogenous application of cytokinins (Tian *et al.*, 2005). In *Arabidopsis* and tobacco, NO_3^- has been shown to reduce cytokinin levels through overexpression of the genes encoding the enzyme responsible for degradation of cytokinins, resulting in an increase in the PR length (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003).

In addition to phyto-hormones, proteins such as kinases and transcription factors could be involved in the response to NO_3^- of habanero pepper PR. Mutants of protein kinases (Hu *et al.*, 2009) and transcription factors (Castaings *et al.*, 2009) are insensitive to the inhibitory effect of NO_3^- in *Arabidopsis*. Interestingly, the mutant protein kinase, *cipk8*, showed an increase in PR growth when exposed to 0.1 mM NO_3^- (Hu *et al.*, 2009), a sensitivity similar to that found in habanero pepper.

II.6.2. NO_3^- EFFECT ON LR PROLIFERATION

When habanero pepper root was exposed to NO_3^- under heterogeneous conditions, both the number and length of LR increased in the nutrient-enriched patch (Figs. 2.3 and 2.4), as have been described for cereals (Hackett, 1972; Drew *et al.*, 1973; Drew, 1975; Drew & Saker, 1975; Granato & Raper, 1989) and *Arabidopsis* (Linkohr *et al.*, 2002). There is a contradictory report in *Arabidopsis* where stimulation of LR elongation, but not their number, in the segment exposed to NO_3^- was observed (Zhang & Forde, 1998).

This localized LR proliferation was specific for NO_3^- and did not depend on the degree of PR development in the area exposed to NO_3^- . Stimulation of

LR formation seems to be mediated directly by NO_3^- as this effect was observed in the presence of tungstate, an NR inhibitor (Fig. 2.7B). However, stimulation of LR elongation was not observed in the presence of tungstate (Fig. 2.7C), suggesting that at least in part, the response to NO_3^- may require that this ion to be metabolized. In *Arabidopsis*, however, LR elongation in response to NO_3^- is produced by the ion itself that interacts with ANR1, a transcription factor (Zhang & Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999).

In our study, a systemic inhibition of LR number in the lower segment was recorded where the nutriment was absent; however, the total length of these roots was not affected (Fig. 2.3). This result indicates that PR growth inhibition, described previously, is not a generalized effect, it is specific for NO_3^- on the growth of these roots. In contrast, in *Arabidopsis* a 30 % reduction in LR growth was observed in the segment that did not contain this ion (Zhang & Forde, 1998).

The role of phyto-hormones and their interaction may also be important to trigger localized proliferation and systemic inhibition of LR in response to NO_3^- in habanero pepper. Auxins play a central role in LR formation and growth (Nibau *et al.*, 2008; Fukaki & Tasaka, 2009; Overvoorde *et al.*, 2010), and they seem to be important in mediating this process.

NO_3^- -induced expression of the *AFB3* gene in the pericycle suggests that NO_3^- may regulate auxin signaling in this location (Vidal *et al.*, 2010). When *afb3* mutants are exposed to NO_3^- , they show a decrease in LR density compared to wild type plants (Vidal *et al.*, 2010).

NRT1.1 transporter facilitates auxin transport away from the root tip. When NO_3^- levels are low, NRT1.1 prevents the accumulation of auxin in the apex and therefore, inhibits LR growth; with increasing levels of NO_3^- , inhibited auxin transport activity of NRT1.1 leads to an accumulation of this phyto-hormone resulting in LR growth (Krouk *et al.*, 2010). The characteristics of this transporter family in the genus *Capsicum* and their role as auxin transporters are still unknown.

Furthermore, it has been reported that cytokinins and ABA can play an important role in mediating the NO_3^- response, mainly by inhibiting LR formation and growth. Increasing cytokinin levels in response to this ion inhibit LR formation primordia in *Arabidopsis*, possibly through a disturbance in the auxin gradient (Laplaze *et al.*, 2007) and in *Medicago truncatula* (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). However, more evidence is needed to relate cytokinins to the regulation of root architecture in response to NO_3^- availability.

The inhibitory effect of NO_3^- on LR development requires ABA synthesis, since it may play a key role in the integration of multiple regulatory signals (Signora *et al.*, 2001).

Although phyto-hormones may play similar roles among various species in regulating root growth, their levels, localization in response to environmental conditions and cellular sensitivity to them may be completely different, leading to specific responses. Phyto-hormone content and changes in response to various environmental factors have not been studied in the habanero pepper root.

Though *Arabidopsis* and habanero pepper are both eudicots, they have different growth characteristics. Tomato seedlings, which belong to the Solanaceae family as habanero pepper, growing in petri dishes for ten days had a two-fold increase in PR growth when compared to *Arabidopsis*, while LR initiation index was three times lower (Dubrovsky *et al.*, 2009). These differences in growth may reflect different behaviors.

Surprisingly, LR proliferation, both formation and elongation, in patches enriched with NO_3^- was not a generalized event in all accessions of habanero pepper: some were capable of increasing local LR growth and number (cv. Orange Seminis, S5B, Timul 2-1 and R4), one accession was able to increase the number but not the elongation of LR (MR-8), and others were insensitive to the local presence of NO_3^- , without modifying LR production and elongation (NP4EC and P1115C) (Fig. 2.6).

Internal status of NO_3^- may be a fundamental factor for inducing different behaviors regarding root development among species. Endogenous levels of NO_3^- in NP4EC seedlings were higher than those reported for cv. Orange (Seminis), i.e. two to four times higher contents in the root and leaf, respectively, grown under different conditions of NO_3^- .

Overall, responses to NO_3^- in habanero pepper may be particular to this species, such as the general inhibitory effect on PR growth at low nitrate doses, reflecting that PR is highly sensitive to this nutriment, and that though LR proliferation in patches enriched with NO_3^- may occur, it is not a general response in this species. Given the multiple roles of phyto-hormones in NO_3^- signaling in other species, it is necessary to study how these might be interacting in habanero pepper root to trigger the observed responses and whether differences in levels or cellular sensitivity could explain the observed variation among the studied accessions. It would also be important to understand the contribution of the endogenous N status to this response.

II.7. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. Nancy Santana Buzzy and Tomás González Estrada for their kind contribution of NP4EC (NSB), and P1115C, S5B, Timul 2-1, MR-8, R4 seeds. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (Project 60258) and a CONACYT fellowship to T.C.A. (203654)

II.8. REFERENCES

- Bloom AJ, Meyerhoff PA, Taylor AR, Rost TL** (2003) Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *J Plant Growth Regul* 21: 416-431
- Bloom AJ, Frensch J, Taylor AR** (2006) Influence of inorganic nitrogen and pH on the elongation of maize seminal roots. *Ann Bot-London* 97: 867-873
- Castaigns L, Camargo A, Pocholle D, Gaudon V, Texier Y, Boutet-Mercey S, Tacconat L, Renou JP, Daniel-Vedele F, Fernandez E, Meyer C, Krapp A** (2009) The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J* 57: 426-435
- Drew MC, Saker LR, Asley TW** (1973) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. I. The effect of nitrate concentration on the growth of axes and laterals. *J Exp Bot* 24: 1189-1202
- Drew MC** (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytol* 75: 479-490
- Drew MC, Saker LR** (1975) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates of nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system. *J Exp Bot* 26: 79-90
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucialy-Mendivil S, Jeknic Z, Ivanchenko MG** (2009) The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann Bot-London* 103: 807-817
- Forde BG** (2002) The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J Exp Bot* 53: 39-43
- Fukaki H, Tasaka M** (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* 69: 437-449
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158

- Garnica M, Houdusse F, Zamarreño AM, Garcia-Mina JM** (2010) The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *J Plant Physiol* 167: 1264-1272
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18: 2680-2693
- Granato TC, Raper CD** (1989) Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *J Exp Bot* 40: 263-275
- Guo FQ, Wang RC, Chen M, Crawford NM** (2001) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (*CHL1*) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell* 13: 1-18
- Hackett C** (1972) A method of applying nutriment locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots. *Aust J Biol Sci* 24: 1169-1180
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF** (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138: 1184-1194
- Hu HC, Wang YY, Tsay YF** (2009) AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J* 57:264-278
- Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H** (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J Exp Bot* 62: 1399-1409
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P, Gojon A** (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutriment sensing in plants. *Dev Cell* 18: 927-937
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T,**

- Bennett M** (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* 19: 3889-3900
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser O** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* 29: 751-760
- Little YD, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE** (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13693-13698
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T** (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20027-20031
- Miller AJ, Cramer MD** (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274: 1-36
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37: 128-138
- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC** (2008) Branching out in new directions: The control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol* 179: 595-614
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a001537
- Owen AG, Jones DL** (2001) Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biol Biochem* 33: 651-657
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A** (2006a) The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19206-19211
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A** (2006b) 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 Physiol* 140: 909-921

Samuelson ME, Larsson CM (1993) Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Sci* 93: 77-84

Scheible WR, Lauerer M, Schulze ED, Caboche M, Stitt M (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J* 11: 671-691

Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D (2010) *ABI4* Mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 3560-3573

Signora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J* 28: 1-9

Singh S, Letham DS, Zhang R, Palni LMS (1992) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence: IV. Effect of nitrogenous nutriment on cytokinin levels and senescence of tobacco leaves. *Physiol Plantarum* 84: 262-268

Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama, T (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol* 42: 85-93

Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H (2004) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 45: 1053-1062

Tian QY, Chen FJ, Zhang FS, Mi GH (2005) Possible involvement of cytokinin in nitrate-mediated root growth in maize. *Plant Soil* 100: 1-12

Tian Q, Chen F, Liu J, Zhang F, Mi G (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 QY, Sun P, Zhang WH (2009) Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 184: 918-931

- Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutierrez RA** (2010) Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. P Natl Acad Sci USA 107: 4477-4482
- Wagner BM, Beck E** (1993) Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. *Planta* 4: 511-518
- Walch-Liu P, Liu LH, Remans T, Tester M, Forde BG** (2006) Evidence that L-glutamate can act as a exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47: 1045-1057
- Walch-Liu P, Forde BG** (2008) Nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J* 54: 820-828
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. P Natl Acad Sci USA 98: 10487-10492
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550
- Yendrek CR, Lee YC, Morris V, Liang Y, Pislariu CI, Burkart G, Meckfessel MH, Salehin M, Kessler H, Wessler H, Lloyd M, Lutton H, Teillet A, Sherrier DJ, Journet EP, Harris JM, Dickstein R** (2010) A putative transporter is essential for integrating nutriment and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J* 62: 100-112
- Zhang H, Forde BG** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutriment-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409
- Zhang H, Jennings A, Barlow P, Forde B** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. P Natl Acad Sci USA 96: 6529-6534

Zhang H, Rong H, Pilbeam D (2007) Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 58: 2329-2338

Zhao DY, Tian QY, Li LH, Zhang WH (2007) Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. *Ann Bot-London* 100: 497-503

CAPÍTULO III

Cambios en la expresión génica en el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. inducidos por nitrato

III.1 INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una hortaliza de gran importancia económica para el estado de Yucatán. En esta zona del país se cultiva en suelos con una alta concentración de materia orgánica, un pH entre 7.5 y 8.5, concentraciones limitantes de N y P, y que presentan altas concentraciones de K (Ramírez *et al.*, 2005). En los estudios fisiológicos realizados (Capítulo II), se observó que el NO_3^- indujo una serie de respuestas en el sistema radical de *C. chinense*: estimuló localmente la formación y la elongación de las raíces laterales (RL), inhibió el desarrollo de la raíz primaria (RP) en función del tiempo e inhibió sistémicamente la formación de RL en los segmentos sin NO_3^- .

Se ha reportado que el NO_3^- es una molécula señal que induce modificaciones en el desarrollo fisiológico de las plantas y que dichas modificaciones se presentan en un orden determinado (Redinbaugh & Campbell, 1991). Los autores anteriormente mencionados describen la existencia de una respuesta primaria ante la presencia de NO_3^- , la cual incluye la inducción de genes que codifican a: las enzimas nitrato y nitrito reductasa (NR y NiR, respectivamente), a los sistemas de toma y traslocación de NO_3^- y a las proteínas involucradas en procesos regulatorios requeridas para la expresión de sistemas de genes de respuesta secundaria. La respuesta secundaria a la presencia de NO_3^- consiste en un fenómeno más complejo, como la proliferación del sistema radical, el incremento de la tasa de respiración y otros cambios fisiológicos en la planta (Redinbaugh & Campbell, 1991).

Durante la respuesta primaria a NO_3^- se induce la expresión de genes que codifican a enzimas que participan en la asimilación del NO_3^- , así como a transportadores de NO_3^- , tales como CHL1 y NRT2.1, dichos genes son rápidamente inducidos (entre 0.5 y 1 hrs) por 250 μM de NO_3^- (Wang *et al.*, 2003). Se ha observado la misma respuesta primaria a NO_3^- en presencia de inhibidores de proteínas (Redinbaugh & Campbell, 1993), así como en plantas mutantes en la enzima NR (Deng *et al.*, 1989), lo cual indica que la respuesta observada se debe al NO_3^- *per se* y que no se requiere la síntesis de proteínas *de novo*. Se han comenzado a determinar la identidad molecular de los componentes señalizadores que participan en la respuesta a NO_3^- . Por ejemplo, el factor de transcripción ANR1 está involucrado en la

regulación de la arquitectura de raíz en respuesta a NO_3^- (Zhang & Forde, 1998). Además, en estudios recientes se reportan como posibles reguladores de la respuesta primaria a NO_3^- a los factores de transcripción NLP7 (Castaings *et al.*, 2009) y a una proteína tipo calcineurina (CBL-) que interacciona con una cinasa CIPK8 (Hu *et al.*, 2009).

En estudios realizados con una biblioteca de ADNc en *Solanum lycopersicum*, Wang *et al.*, (2001) reportaron cambios en la expresión de 115 genes por la exposición a NO_3^- . Se identificaron genes que se indujeron por la presencia de este ión, tales como: transportadores de NO_3^- , las enzimas NR y NiR, así como las siguientes enzimas: transaldolasa, transcetolasa, malato deshidrogenasa, asparagina sintetasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ferredoxina, ferredoxina NADP oxidoreductasa e histidina decarboxilasa. La regulación por NO_3^- de estos genes había sido previamente reportada para *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2000). A su vez, identificaron 14 genes cuya expresión no había sido relacionada previamente con la respuesta a NO_3^- en *Arabidopsis*, incluyendo: acuaporinas, transportadores de fosfato y de K, genes potencialmente involucrados en la regulación transcripcional, genes de respuesta a estrés, genes de proteínas ribosomales y genes con funciones desconocidas (Wang *et al.*, 2001).

Años más tarde, Wang *et al.* (2004) realizaron otro análisis de expresión de genes en respuesta a NO_3^- y en esta ocasión utilizaron una mutante nula de la NR de *Arabidopsis*. El análisis reveló la expresión de 595 genes en respuesta a NO_3^- (5 mM por 2 hrs), tanto en plantas mutantes como en plantas silvestres. Las características funcionales de mayor relevancia en las que se agruparon estos genes fueron: energía, metabolismo, glicólisis y gluconeogénesis. Dado que dichos genes respondieron independientemente de la actividad de la NR, estos autores consideraron que el NO_3^- , y no un metabolito posterior de su ruta metabólica, actuó como una señal.

En estudios más recientes, Liu *et al.*, (2008) reportaron la regulación positiva de 206 genes al exponer plantas de maíz (*Zea mays* L.) a 1 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ por una hora. Estos genes están involucrados en diferentes procesos celulares como: el metabolismo de fitohormonas y la transducción de señales, la división y la expansión celular, el transporte transmembranal, el metabolismo del C y del N, la transferencia de electrones, la respuesta al estrés, entre otros procesos fisiológicos. Del total de estos genes, se observó que 26 codifican a genes implicados en respuesta a hormonas, transcripción génica, fosforilación y defosforilación de proteínas, etc.

Como ya se ha reportado, el NO_3^- genera diversas modificaciones en los patrones de expresión génica en diferentes especies, en el caso particular de la familia de las solanáceas, solo se ha estudiado el efecto del NO_3^- en *Solanum lycopersicum* (Wang *et al.*, 2001), por lo que resulta de sumo interés el analizar la respuesta de un miembro más de dicha familia, *C. chinense*, principalmente por el efecto observado a nivel fisiológico (capítulo II) y por las respuestas diferenciales con respecto a los resultados reportados para *Arabidopsis thaliana*.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 Obtención del material vegetal

Se utilizaron semillas de *C. chinense* cv. Naranja, de la compañía Seminis Vegetable Seeds, Inc. 2700 Camino Del Sol, Oxnard, CA 93030, USA. Las semillas se esterilizaron superficialmente por 5 minutos en etanol al 80 % (v/v). Después de cuatro lavados con H_2O d estéril, permanecieron 15 minutos en Cloralex (Distribuidora Allen S.A. de C.V.), diluido al 30 % (v/v) y nuevamente se lavaron por cuatro ocasiones con H_2O d estéril. En todos los pasos anteriores se sometieron a agitación suave. Todos los procedimientos se realizaron en campana de flujo laminar. Después de terminado el proceso, se almacenaron por 48 h en H_2O d estéril, en oscuridad a 4 °C.

Para la germinación, las semillas estériles, se colocaron en recipientes con agrolita humedecida con H_2O d (20 semillas/recipiente), en condiciones de oscuridad, a 24 ± 2 °C por nueve días. Después de este tiempo, las plántulas se mantuvieron durante 45 días en hidroponía, en condiciones de fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) a 24 ± 2 °C, con riegos cada tercer día con H_2O d estéril y cada seis días con medio Hoagland (Arnon & Hoagland, 1952) modificado a 1/5 de su fuerza iónica, constituido por: 500 μM CaCl_2 , 12.5 μM H_3BO_3 , 1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 μM ZnSO_4 , 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM Fe-EDTA, 200 μM KH_2PO_4 , 200 μM MgSO_4 y 1 mM KNO_3 (Richard-Molard *et al.*, 2008).

III.2.2 Aplicación del tratamiento de nitrato

Las plántulas de 45 días después de germinadas fueron transferidas al mismo medio descrito; sin embargo, el KNO_3 fue sustituido por 1 mM de KCl. Después de tres días, las plántulas se expusieron a 1 mM de KNO_3 durante 0, 1, 2 y 4 h. Para llevar a cabo el análisis de la expresión diferencial, se colectaron los ápices radicales (1cm desde el ápice) y se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándose a -80 °C hasta su utilización.

III.2.3 Extracción del ARN

Para la extracción del ARN se utilizaron de 70 a 90 mg de los ápices radicales (1 cm) de las plántulas sometidas a los diferentes períodos de tratamiento y se extrajo el ARN total, siguiendo el protocolo descrito en el kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). El ARN extraído se cuantificó espectrofotométricamente, y se evaluó la integridad en una electroforesis en geles de agarosa.

III.2.4 Obtención de la sonda

Para la obtención de las sondas se utilizaron aproximadamente 0.4 µg del ARN extraído a partir de las raíces sometidas al tratamiento. Para el marcaje de la sonda se realizó la transcripción reversa del ARN, utilizando el oligo-dT y la transcriptasa reversa SuperScript™ III (Invitrogen) en presencia de digoxigenina-11-dUTP (marcaje alcalino, Roche). Para el protocolo, se siguieron las recomendaciones del fabricante.

III.2.5 Obtención de la población de los ADNc para la hibridación

Para el estudio se utilizaron las secuencias de 48 genes de *C. chinense*, descritos en la tabla 3.1, de los cuales 45 habían sido previamente obtenidos en el laboratorio del Dr. José Juan Zúñiga, dos en el laboratorio del Dr. Manuel Martínez y uno en el laboratorio de la Dra. Ileana Echevarría.

Se realizó una PCR (Polymerase Chain Reaction) para la amplificación de cada uno de estos genes. Se utilizaron dos juegos de cebadores, uno para los que se encontraban clonados en el plásmido pGEM y el otro para los que se encontraban en pTR1pEx2, los cuales fueron reportados por Nakazawa *et al.*, (2010). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94 °C, 2 min, 1 ciclo; 94 °C, 30 seg, 55 °C, 30 seg, 72 °C, 1 min 45 seg, 45 ciclos, 72 °C, 10 min, 1 ciclo (pGEM) y 94 °C, 2 min, 1 ciclo; 94 °C, 30 seg, 68 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 40 ciclos, 72 °C, 10 min, 1 ciclo (pTR1pEx2).

III.2.6 Hibridación y detección de la expresión diferencial de genes

Las membranas de nylon (Zeta-Probe, BIO-RAD) se cortaron al tamaño necesario (7.8 x 11.5 cms) y se hidrataron con H₂O. Los productos de PCR se desnaturalizaron a 100 °C por 5 min con NaOH 0.4 M y EDTA 10 mM, pH 8 y se aplicaron aproximadamente 200 ng a cada membrana de nylon utilizando un sistema de microfiltración bio-dot® (BIO-RAD). Es necesario destacar que se prepararon cuatro membranas, para hibridizar con las sondas provenientes de los tiempos de tratamiento 0, 1, 2 y 4 horas, respectivamente. Posteriormente, las membranas se humedecieron en solución 2x SSC (1x SSC es 0.15 M de NaCl y 0.015 M de citrato de sodio a

pH 7) el ADN se fijó a la membrana, utilizando luz UV. Para realizar la prehibridación, las membranas se colocaron en recipientes herméticos con la solución de hibridación Church (amortiguador fosfatos 0.5M, pH 7.2, SDS 7 %, 1 mM de EDTA, pH 8 y 1 % de BSA) durante toda la noche (12 ± 2 h), a 65°C con agitación suave.

Las sondas marcadas fueron colocadas a 100°C por 5 min, para la desnaturalización de la doble cadena. Se adicionaron a la solución de prehibridación y se dejaron hibridar a 65°C durante 12 ± 2 h, con agitación suave. Después de este período, se eliminó la solución de hibridación y las membranas se sumergieron en la solución de lavado 2x SSC (2x SSC, SDS 0.1 %) por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados secuenciales de 20 min a 65°C cada uno, en las siguientes soluciones: 2x SSC, 0.5x SSC, 0.22x SSC y 0.1x SSC.

Las membranas se equilibraron durante 1 minuto con la solución de lavado (Tween 20 y ácido maleico, pH 7), adicionando posteriormente 5 % de leche descremada por una hora a temperatura ambiente. Se adicionó el anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (0.75 U/ μl , Roche) a razón de 1:15000 y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Se realizaron tres lavados con la solución de lavado por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la última solución de lavado y se añadió la solución de detección (100 mM de Tris-HCl pH 9.5 y 100 mM de NaCl) durante 2 min a temperatura ambiente. Se retiró la solución de detección y se añadió el sustrato quimioluminiscente CSPD (Disodio 3-(4-metoxispiro {1,2-dioxetano-3,2'(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)fenil fosfato, Roche Diagnostics) y se dejó reaccionar durante 5 min. Las membranas se expusieron a un film durante 25 ± 1 min a 37°C y éste se reveló. Para la interpretación de los resultados obtenidos, se realizaron análisis densitométricos, utilizando el programa Image J. Dado que el experimento se repitió en dos ocasiones, el juego de membranas proveniente de cada repetición fue sometido a este análisis por separado.

Tabla 3.1. *cDNAs* provenientes de *Capsicum chinense* Jacq. analizados por hibridación diferencial.

Posición	Clave EMBL	Nombre	Función	Sitio de clonación	Origen
A1	AJ879936	Proteína asociada a un receptor putativo (RAP-putativo)	Reg	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
A2	AJ879115	Proteína relacionada a patogénesis (PR10)	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
A3	AJ878871	PR10	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
A4	-	PR10	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
A5	-	PR10	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
A6	-	PR10	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
B1	AM900559	Proteína no expresora de los genes relacionados a patogénesis 1 (NPR1)	Int	pGEM	Suspensiones celulares
B2	AJ879117	ACC oxidasa	Met	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
B3	AJ879119	Esterasa	Met	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
B4	AJ879121	Glutación S-transferasa-1 (GST-1)	Met	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
B5	AJ879071	Ω -6-desaturasa	Met	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
B6	AJ879069	Ω -6-ácido graso desaturasa (FAD-6)	Met	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
C1	AJ879066	Peroxidasa aniónica (Px aniónica)	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
C2	AJ879067	GST/peroxidasa (GST-Px)	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares

Posición	Clave EMBL	Nombre	Función	Sitio de clonación	Origen
C3	AJ973135	Glutación peroxidasa (GPx)	Res	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
C4	AM040268	Citosol malato deshidrogenasa (CMDH)	Ene	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
C5	-	Transportador de potasio (HAK 9)	Trp	pGEM	Raíces ³
C6	AM040276	Oxidasa unida a FAD	Uni	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
D1	-	Proteína de sorteo vacuolar (VPS26)	Loc	pGEM	Hojas ¹
D2	-	Asparaginasa	Met	pGEM	Hojas ¹
D3	-	Transportador de nitrato (NRT2)	Trp	pGEM	Raíces ²
D4	AM040266	Proteína 14-3-3	Com	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
D5	-	Nitrato Reductasa (NR)	Met	pGEM	Hojas ¹
D6	-	Omitina descarboxilasa (ODC)	Met	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
E1	AM040271	Glutación S-transferasa-12 (GST-12)	Met	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
E2	AM900560	Factor de transcripción WRKY (WRKY)	Tra	pGEM	Suspensiones celulares ¹
E3	AM040274	Proteína putativa con dedos de zinc (ZFP putativo)	Uni	pTRIpIEx2	Suspensiones celulares ¹
E4	AJ608158	MAP cinasa 1 (MAPK-1)	Com	pGEM	Suspensiones celulares ¹
E5	AJ608159	MAP cinasa 2 (MAPK-1)	Com	pGEM	Suspensiones celulares ¹
E6	AJ608160	MAP cinasa 3 (MAPK-1)	Com	pGEM	Suspensiones celulares ¹

Posición	Clave EMBL	Nombre	Función	Sitio de clonación	Origen
F1	AM040277	Factor de replicación A (RF-A)	Cic	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
F2	AJ879116	Metalotioneína	Res	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
F3	AJ879065	Proteína transportadora tipo ABC (ABC)	Trp	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
F4	AJ879118	Poliubiquitina	Mod	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
F5	AJ879070	Enzima conjugada a ubiquitina	Mod	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
F6	AM040267	Proteína inducida por fosfato	Com	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
G1	-	Cinasa relacionada a embriogénesis somática (SERK)	Com	pGEM	Suspensiones celulares
G2	AJ879120	Proteína inducida por ácido araquidónico	Com	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
G3	AM040273	Proteína de respuesta a etileno	Int	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
G4	AM040278	Proteína inducida por auxinas	Int	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
G5	-	Transportador de potasio (HAK 2)	Trp	pGEM	Raíces ³
G6	AJ879062	Proteína de pared celular-1	Bio	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
H1	AM168448	Actina	Loc	pGEM	Suspensiones celulares
H2	AJ879072	Proteína tipo extensina	Loc	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
H3	AJ879068	Proteína ribosomal L37a	Sin	pTRIpEx2	Suspensiones celulares
H4	AM040269	Alcohol deshidrogenasa (ADH)	Ene	pTRIpEx2	Suspensiones celulares

Posición	Clave EMBL	Nombre	Función	Sitio de clonación	Origen
H5	AJ879064	V-ATPasa	Ene	pTRlplEx2	Suspensiones celulares ¹
H6	-	14-3-3 Proteína (R27)	Com	pTRlplEx2	Suspensiones celulares ¹

¹ Genes obtenidos en el laboratorio del Dr. José Juan Zúñiga

² Gen obtenido en el laboratorio de la Dra. Ileana Echevarría

³ Genes obtenidos en el laboratorio del Dr. Manuel Martínez

Función: **Met**-metabolismo; **Ene**-Energía; **Cic**-Ciclo celular y procesamiento del ADN; **Tra**-transcripción; **Sin**-Síntesis de proteínas; **Mod**-Modificaciones postraduccionales; **Uni**-Proteínas de unión o que requieren un cofactor; **Reg**-Regulación del metabolismo y funcionamiento de las proteínas; **Trp**-transporte celular, facilitadores de transporte y rutas de transporte; **Com**-comunicación celular/mecanismos de transducción de señales; **Res**-rescate de las células, defensa y virulencia; **Int**-interacción sistémica con el ambiente; **Bio**-biogénesis de los componentes celulares; **Loc**-localización subcelular. Las funciones de los genes obtenidos en el laboratorio del Dr. José Juan Zúñiga (*) habían sido previamente reportadas (Nakazawa *et al.*, 2010).

III.2.7 Análisis de la expresión diferencial de genes por PCR tiempo final

Para confirmar los resultados obtenidos en el experimento de hibridación se seleccionaron dos de los genes con mayores modificaciones en los niveles de transcritos (*vps26* y *v-atpasa*) y dos de los genes que codifican para proteínas participantes en el metabolismo (*nr*) o el transporte del nitrógeno (*nrt2*) y se validaron a través de PCR tiempo final.

Se diseñaron cebadores específicos para cada uno de estos genes:

vps26: F:5'-GATGGAAGTCGGTATTGAAG-3' y
R:5'-ATCTCAAGTGCCAACATCTC-3';
v-atpasa: F:5'-TTCAACTCCTTTTAGCTGCC-3' y
R:5'-TACGTGCCTTAATATGCCTT-3';
nr: F:5'-CCAACAGGCAAGCCCAAGAC-3' y
R:5'-GTTCTGTCCATGGATCTTCT-3';
nrt2: F:5'-GCTGCCGCCCTTTAGTCCC-3' y
R:5'-ACGCAATTCTCCAAGCAGTG-3'.

Los oligonucleótidos se utilizaron para realizar PCRs (Polymerase Chain Reaction) con diferentes cantidades de ciclos para seleccionar el número de ciclos adecuado para el análisis de la expresión de cada uno de los genes. Las condiciones finales de PCR fueron las siguientes:

vps26: 96 °C, 1 min, 1 ciclo; 94 °C, 30 seg, 51.8 °C, 30 seg, 72 °C, 30 seg, 25 ciclos, 72 °C, 10 min, 1 ciclo,

v-atpasa: 96 °C, 2 min, 1 ciclo; 94 °C, 30 seg, 52.2 °C, 30 seg, 72 °C, 25 seg, 25 ciclos, 72 °C, 10 min, 1 ciclo,

nr: 96 °C, 1 min, 1 ciclo; 94 °C, 30 seg, 52.4 °C, 30 seg, 72 °C, 20 seg, 30 ciclos, 72 °C, 10 min, 1 ciclo,

nrt2: 96 °C, 1 min, 1 ciclo; 94 °C, 30 seg, 55.6 °C, 30 seg, 72 °C, 30 seg, 30 ciclos, 72 °C, 10 min, 1 ciclo.

III.3 RESULTADOS

El trabajo se desarrolló con el objetivo de conocer si la presencia exógena de NO_3^- puede inducir cambios en la expresión de genes en las raíces de *C. chinense*. Para ello, inicialmente las plántulas de chile habanero fueron expuestas a un déficit de NO_3^- durante tres días y posteriormente se les aplicó 1 mM de KNO_3 . Para la evaluación de la expresión génica se

seleccionaron periodos de tiempo cortos de exposición al nutrimento, de tal manera que fuera factible evaluar respuestas tempranas inducidas por NO_3^- .

A su vez, para el estudio se seleccionó sólo el ápice radical de las plántulas de *C. chinense*, debido a la importancia que reviste esta estructura en la percepción de diferentes condiciones ambientales (gravedad, obstáculos, nutrimentos, etc.).

Los genes analizados se seleccionaron a partir de una colección de genes anteriormente reportados para *C. chinense*. Además, se tuvo en consideración el abarcar diversos procesos: metabolismo, energía, ciclo celular y procesamiento del ADN, transcripción, síntesis de proteínas, modificaciones postraduccionales, proteínas de unión o que requieren un cofactor, regulación del metabolismo y funcionamiento de las proteínas, transporte celular, facilitadores de transporte y rutas de transporte, comunicación celular/mecanismos de transducción de señales, rescate de las células, defensa y virulencia, interacción sistémica con el ambiente, biogénesis de los componentes celulares y localización subcelular.

Para la obtención de la sonda se extrajo el ARN proveniente del ápice radical de las plántulas sometidas a los tratamientos de NO_3^- durante los diferentes intervalos de tiempo y éste se sometió a un tratamiento con ADNasa. En la Figura 3.1A se observa que se lograron obtener extractos de ARN con una buena integridad. A partir de 0.4 μg de ARN se sintetizaron las sondas, las cuales fueron marcadas con digoxigenina, como se describió en los materiales y métodos (Figura 3.1B).

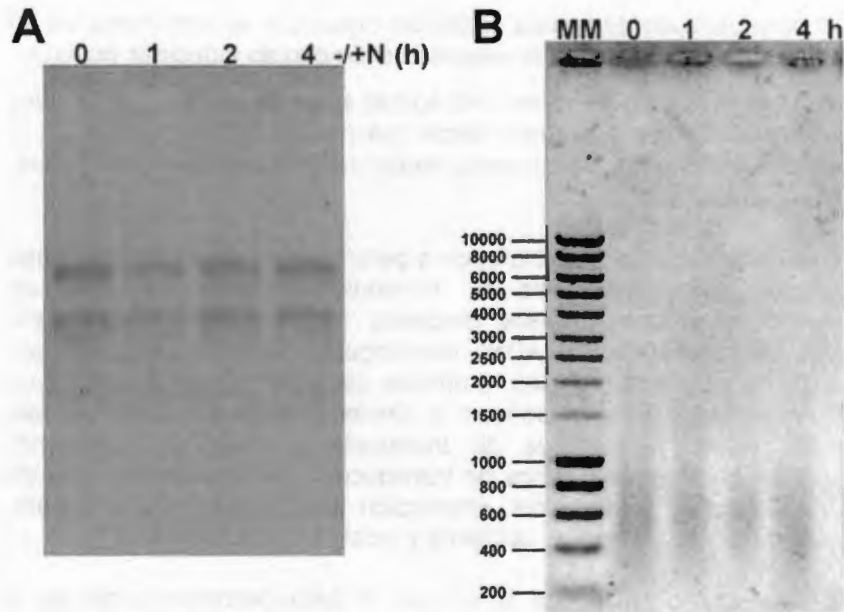


Figura 3.1. Visualización de extractos de ARN y sonda marcada (+DIG). (A) ARN de ápices de raíz de *C. chinense* sometidos durante diferentes tiempos a NO_3^- (0, 1, 2 y 4 hrs). Las concentraciones aplicadas fueron 0.33 μg , 0.26 μg , 0.31 μg y 0.39 μg respectivamente. Gel de agarosa al 1 %. (B) Sonda marcada con digoxigenina-11-dUTP. ~0.38 μg de ARN por carril. Gel de agarosa al 1 %.

Por otro lado, los genes a evaluar fueron amplificados a partir del vector en el cual se encontraban subclonados y se observaron en geles de agarosa (Figura 3.2). Los productos de PCR de cada uno de estos genes (~200 ng) se fijaron en las membranas.

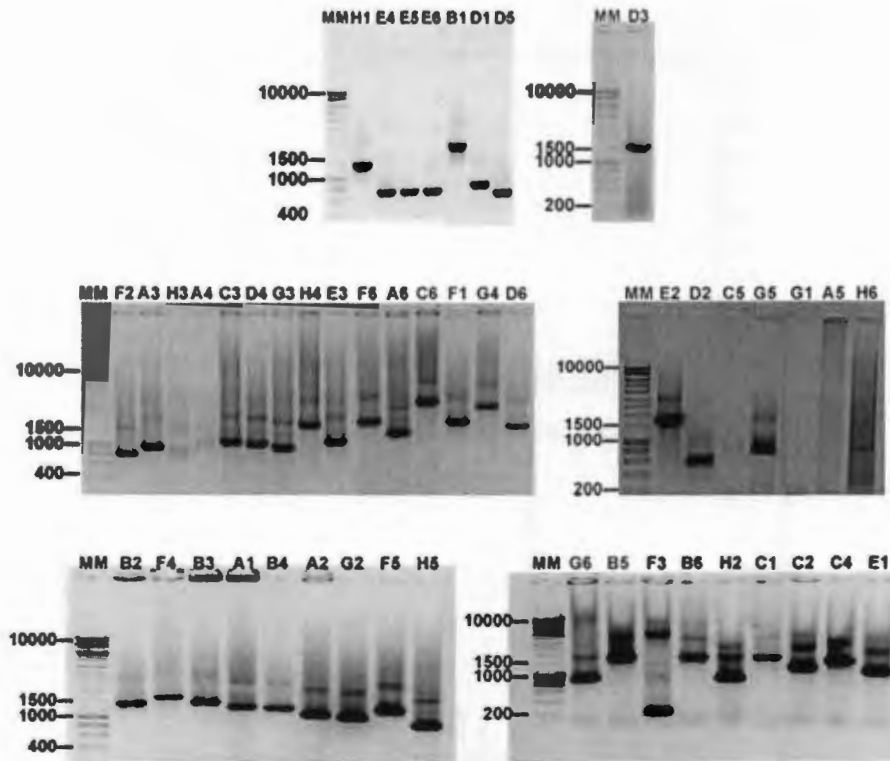


Figura 3.2. Amplificación de los ADNc de los genes. La clave de cada uno de los genes se describe en la tabla 3.1. Las imágenes corresponden a geles de agarosa al 1 % en donde se aplicaron los productos de la amplificación.

III.3.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes

Se observó que una gran cantidad de estos genes modificaron su expresión en respuesta a NO_3^- . En la Figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos en el análisis densitométrico de las imágenes de las membranas en el programa Image J. Para este análisis, se le asignó el valor 1 a la densitometría de cada punto en el tiempo 0.

Abundancia relativa de transcritos

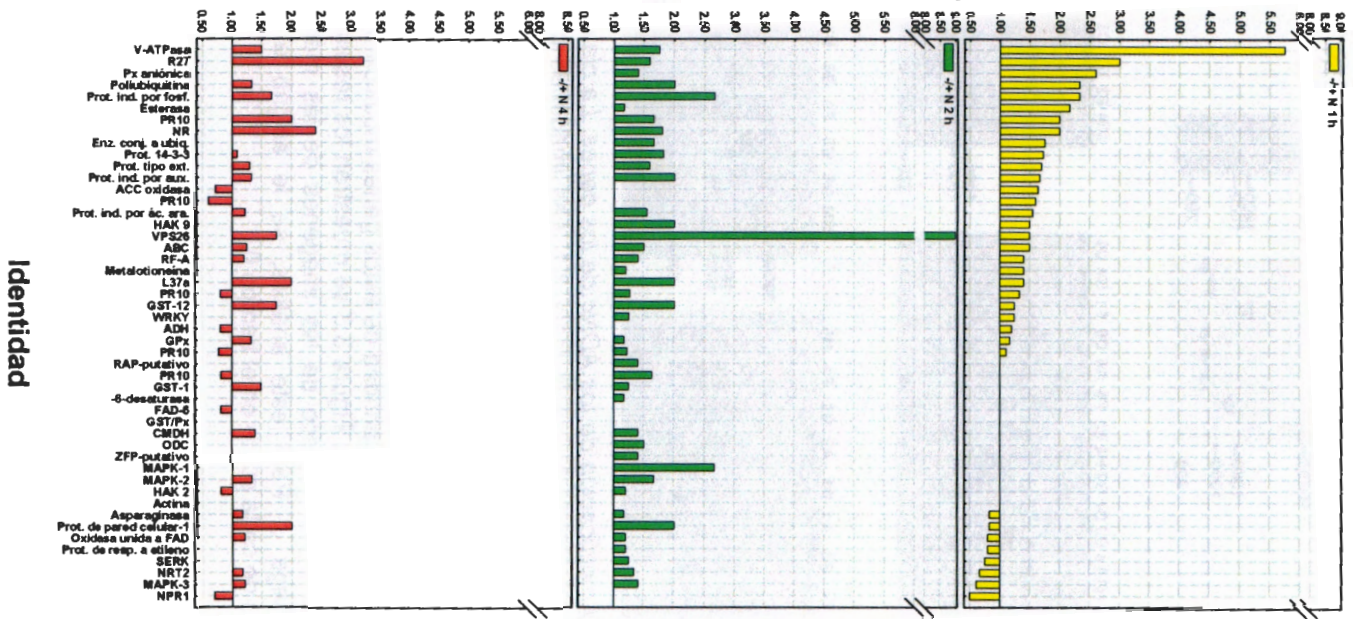


Figura 3.3. *Modificaciones diferenciales respecto al testigo (tiempo 0) en los niveles de transcritos del ápice de raíces de C. chinense expuestas a NO₃⁻ durante diferentes tiempos. Gráficas decrecientes en función de los transcritos más estimulados con 1 h de exposición a NO₃⁻. Estos resultados se obtuvieron al analizar densitométricamente con el programa Image J la hibridación de las cuatro membranas obtenidas en la primera repetición del experimento.*

En las muestras con una hora de exposición a NO₃⁻ se observó un incremento en la abundancia de 27 transcritos, destacándose ocho de ellos: V-ATPasa, proteína 14-3-3, peroxidasa aniónica, poliubiquitina, proteína inducida por fosfato, esterasa, proteína relacionada a la patogénesis y NR (Figura 3.3, Figura S3.1). A su vez, se redujo el número de transcritos de ocho genes: asparaginasa, proteína de pared celular, oxidasa unida a FAD, proteína de respuesta a etileno, SERK, NRT2, MAK cinasa 3 y NPR1. Los niveles de transcritos que no sufrieron modificaciones durante dicha condición fueron: proteína relacionada a patogénesis, glutatión S-transferasa, Ω -6-desaturasa, Ω -6-ácido graso desaturasa, GST/peroxidasa, citosol malato deshidrogenasa, ornitina decarboxilasa, MAP cinasa 1 y 2, HAK No.2 y actina.

La mayor estimulación en el número de transcritos se observó para el cDNA de VPS26 a las dos horas de exposición a NO₃⁻, ya que se estimuló nueve veces respecto al testigo. Bajo esa misma condición, se aprecia una estimulación importante para la proteína inducida por fosfato y la MAP cinasa 1 (Figura 3.3).

Finalmente, con cuatro horas de exposición a NO₃⁻, se destaca la estimulación en el número de transcritos de la proteína 14-3-3 y la NR.

Cabe enfatizar la significativa estimulación presentada por los genes *vps26* y *v-atpasa*, como se muestra en la Figura 3.3. En el caso de la NR, se aprecia una estimulación a la primera hora de exposición a NO₃⁻, mismo nivel que se mantiene constante durante las dos y cuatro horas. Para el transportador NRT2, observamos una caída en el número de transcritos a la hora de exposición a NO₃⁻ y una ligera estimulación a las dos y cuatro horas.

Para una mejor observación de estos resultados, en la Figura 3.4A se muestra los resultados obtenidos en las membranas, específicamente para los genes *vps26*, *v-atpasa*, *nr*, *nrt2* y *actina* (como control de carga).

Los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación diferencial fueron confirmados en una repetición del experimento con muestras

biológicas diferentes. Además, los resultados obtenidos en la técnica de hibridación se validaron a través de PCR tiempo final, específicamente para los cuatro genes que habían presentado las mayores modificaciones en los niveles de transcritos, así como para el control de actina (Fig. 3.4B).

La presencia de NO_3^- indujo la acumulación de los transcritos correspondientes a la *vps26* y *nr* en función del tiempo (Fig. 3.4B). Al igual que lo previamente observado (Fig. 3.4A), no se detectó la acumulación de los transcritos correspondientes al *nrt2* pero sí una disminución de transcritos a la hora de exposición a NO_3^- (Fig. 3.4A). Por otra parte, la acumulación de los transcritos de la *v-atpasa* presentó fluctuaciones al aumentar con 1 h de exposición a NO_3^- pero descendiendo a las 2 y 4 h (Fig. 3.4A y B). Los patrones de expresión obtenidos por PCR tiempo final corresponden con los resultados de la hibridación diferencial, comprobando así la veracidad de los datos.

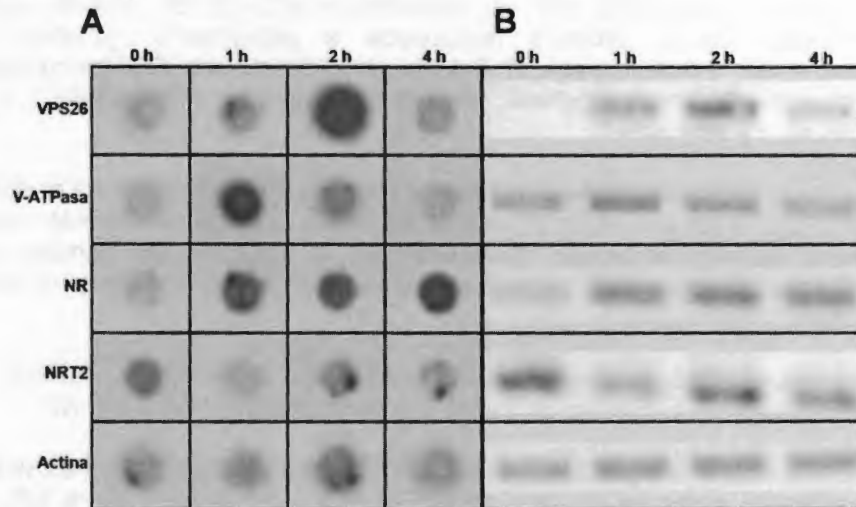


Figura 3.4. A. Genes con mayores modificaciones diferenciales en los niveles de transcritos y/o participación en la captación y metabolismo del N, en los análisis realizados a muestras de ápices de raíces de *C. chinense* expuestas a NO_3^- durante diferentes tiempos. Las imágenes se seleccionaron a partir del Figura S3.1. **B.** Confirmación de los niveles de expresión de los transcritos por PCR tiempo final. La expresión se evaluó durante las primeras 4 h en un curso temporal. La actina se utilizó como control de carga y de amplificación.

III.4 DISCUSIÓN

III.4.1 VPS26

De los 48 genes analizados para raíces de *C. chinense*, el nivel de transcritos para la proteína de sorteo vacuolar VPS26 fue el que presentó la mayor acumulación, alcanzando una estimulación de nueve veces con respecto al testigo (Fig. 3.4A); este resultado se obtuvo a las 2 h de exposición a NO_3^- , posteriormente sus niveles disminuyeron.

VPS26 es una subunidad del retrómero, el cual es un complejo proteico cuya función es el reciclamiento de los receptores (Seaman, 2005). En mamíferos y en levaduras esta proteína es responsable del transporte retrógrado de los receptores de carga vacuolar de MVB/PVC (cuerpos multivesiculares / compartimentos prevacuolares) hacia la red trans del aparato de Golgi (TNG por sus siglas en inglés) (Seaman, 2004 y 2005). En levaduras, el retrómero está constituido por dos subunidades, una subunidad grande, formada por tres proteínas: VPS35P, VPS29P y VPS26P, así como de una subunidad pequeña, que la conforman dos proteínas: VPS17P y VPS5P. En *Arabidopsis* se clonaron los homólogos de la subunidad grande y se demostró que dicho complejo proteico se asocia con MVB/PVC (Oliviusson *et al.*, 2006). Además, se co-localizó a Vps35 con los marcadores de MVB/PVC Pep12 y VSRA1-1. Estos datos sugieren la existencia en plantas de una proteína de transporte retrógrado del MVB/PVC al TGN.

Por muchos años se ha establecido que uno de los principales papeles de las vacuolas líticas en plantas es la degradación de las proteínas; sin embargo, aun se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas son etiquetadas para su posterior degradación (Müller *et al.*, 2007). Estudios recientes en células vegetales revelan una nueva forma de integrar directamente a MVB/PVC con la vía de degradación, con la participación de proteínas de la vacuola, sugiriendo un traslape en las vías endocíticas y secretoras (Spitzer *et al.*, 2006).

Se ha reportado que la proteína VPS26P juega un papel importante, ya que puede interactuar con otros componentes del complejo retrómero, tales como VPS35P y facilitar el transporte de los receptores del endosoma al aparato de Golgi. Vps35p se asocia periféricamente a las membranas que contienen VPS10P (Reddy *et al.*, 2001).

Nuestros resultados sugieren que el NO_3^- podría inducir cambios en el reciclamiento de receptores en el ápice radical de chile habanero a través de una inducción en la expresión de la subunidad VPS26. La expresión del gen *vps26* de ninguna otra especie vegetal había sido anteriormente

relacionada con la respuesta radical a NO_3^- , por lo que estos resultados representan un dato novedoso.

III.4.2 V-ATPasa

Al analizar los niveles de transcritos para la subunidad G de la *v-atpasa* en raíces de *C. chinense* expuestas a 1 mM de KNO_3 durante 1 h, se obtuvo un incremento de 5.5 veces con respecto al testigo, dichos niveles descendieron hasta alcanzar un nivel basal a las 4 h de tratamiento.

El transporte a través de la membrana de la vacuola se efectúa con la energía generada por dos bombas de protones: la H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) y la H^+ -pirofosfatasa (V-PPasa) (Hedrich *et al.*, 1989). La actividad combinada de estas dos bombas de protones generan el gradiente y el potencial de membrana que se utiliza para el transporte de los compuestos en contra de sus gradientes electroquímico y de concentración (Gaxiola *et al.*, 2007).

La V-ATPasa es la bomba dominante en las endomembranas celulares de la mayoría de las plantas, tanto en términos de cantidad de proteínas, como de actividad enzimática (Dietz *et al.*, 2001). La V-ATPasa es indispensable para el crecimiento de las plantas en condiciones normales, debido a su papel de aporte de energía en el transporte secundario, el mantenimiento de la homeostasis de solutos y, posiblemente, para facilitar la fusión vesicular. Bajo condiciones de estrés tales como: la salinidad, la sequía, el frío, la acidez, la anoxia y el exceso de metales pesados en los suelos, la supervivencia de las células vegetales depende en gran medida del mantenimiento o el ajuste de la actividad de la V-ATPasa. La regulación de la expresión génica y la actividad de la V-ATPasa están involucradas en la adaptación de las células a corto y largo plazo (Dietz *et al.*, 2001).

Estudios bioquímicos e inmunoquímicos han puesto de manifiesto que la V-ATPasa no se localiza exclusivamente en el tonoplasto de las vacuolas maduras, sino que también está asociada a diversas membranas subcelulares, incluyendo el aparato de Golgi (Ali & Akazawa, 1986; Matsuoka *et al.*, 1997), el retículo endoplásmico (Herman *et al.*, 1994), las vesículas intracelulares y la membrana plasmática (Sze *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 1999; Dietz *et al.*, 2001). Sin embargo, las funciones subcelulares específicas de las V-ATPasas en distintos tipos celulares y su participación en el desarrollo de plantas multicelulares se desconoce (Padmanaban *et al.*, 2004).

En las plantas, la expansión celular requiere de la coordinación de los cambios de las propiedades de la pared celular, la síntesis y el transporte de

membrana y de nuevos materiales de la pared, así como de un mantenimiento del potencial osmótico (Schumarcher *et al.*, 1999). La afluencia de agua es la fuerza motriz para la expansión celular, la reducción del potencial osmótico, que a su vez se restablece por la captación de solutos en el citoplasma y a menudo en grandes vacuolas. Debido a que la V-ATPasa, junto con las unidades de H⁺-pirofosfatasa conducen a la absorción de solutos en la vacuola, desde hace tiempo se sugiere que la función de la V-ATPasa es importante para la expansión celular (Taiz & Zeiger, 1991). En estudios realizados en *Gossypium hirsutum* L. los niveles más altos de la proteína V-ATPasa se presentaron durante el desarrollo de las fibras, recordando que las fibras de algodón representan células individuales, se asume que la elongación celular está relacionada con los niveles de la proteína V-ATPasa (Smart *et al.*, 1998). Sin embargo, la única evidencia directa de una función para la V-ATPasa en la expansión celular proviene del análisis de líneas transgénicas de zanahoria, en las cuales la expansión celular se redujo utilizando un mecanismo de inhibición en antisentido de la subunidad A de la V-ATPasa (Gogarten *et al.*, 1992).

Debido a que en nuestro estudio los análisis de expresión fueron realizados en los ápices radicales, es probable que existan pocas vacuolas al encontrarse las células en un menor grado de diferenciación; o bien, pueden existir vacuolas en desarrollo (provacuolas), por lo que no se puede descartar que la V-ATPasa se encuentre localizada en otros compartimentos, tales como: el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, las vesículas intracelulares y la membrana plasmática, tal como se mencionó anteriormente, regulando las concentraciones endógenas de NO₃⁻ en los organelos ya presentes en ese estadio de desarrollo de los ápices radicales.

En *Arabidopsis*, la actividad de la V-ATPasa en el tonoplasto es requerida para un almacenamiento eficiente de NO₃⁻ (Krebs *et al.*, 2009) y además, se conoce que la concentración de NO₃⁻ puede considerarse como una señal que regula cambios tanto en el desarrollo, como la formación y crecimiento de las raíces (Hackett 1972; Drew *et al.*, 1973; Drew 1975; Drew & Saker 1975; Granato & Raper 1989; Scheible *et al.*, 1997; Zhang & Forde 1998; Zhang *et al.*, 1999; Linkohr *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2007), es por ello que la inducción de la expresión de este gen a la hora de exposición de las raíces de chile habanero a NO₃⁻ constituye un evento que pudiera ser importante en la respuesta radical observada en esta especie y la cual se describió en el capítulo II.

III.4.3 Nitrato reductasa (NR)

El NO_3^- exógeno participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno. En nuestro trabajo se observó que el gen de la NR se indujo desde la primera hora de exposición al nutrimento, este incremento fue de dos veces con respecto al testigo y se mantuvo así durante las cuatro horas de la evaluación. Dicha estimulación coincide con lo ya reportado por diversos autores, ya que en estudios realizados en *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis* y *Zea mays* los ARNm del gen de la NR se acumulan en las plantas minutos después de ser tratadas con NO_3^- a concentraciones entre 10 μM y 50 mM (Meizer *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1991; Gowri *et al.*, 1992; Zhang & Forde, 2000; Wang *et al.*, 2004; Ruzicka *et al.*, 2010). Nuestros resultados confirman que en chile habanero la inducción de la expresión de la NR también es un evento de la respuesta primaria a NO_3^- .

III.4.4 NRT2

En raíces de *C. chinense*, el nivel de transcritos para el gen del transportador NRT2 presentó una disminución al transcurrir 1 h de exposición a 1 mM de KNO_3 , posteriormente se presentó una recuperación, sin embargo, los niveles de transcritos siempre fueron más bajos que el testigo. Este resultado se corroboró al realizar en dos ocasiones la hibridación de las membranas, así como el análisis de PCR en tiempo final.

Existen diversos reportes que indican que el NO_3^- es capaz de modificar la expresión de genes que codifican para ciertos transportadores transmembranales. Wang *et al.*, (2000) estudiaron plántulas de *Arabidopsis thaliana*, encontrando que al exponerlas a 250 μM de KNO_3 por 20 min se estimulaba la expresión de genes de transportadores de NO_3^- (NRT1.1) y de calcio (CAX1); a su vez, reportaron que cuando las plántulas se sometieron a concentraciones mayores de KNO_3 (5 y 10 mM) por 2 h, se inhibió un transportador de amonio (AMT1.1) en plántula completa.

Wang *et al.*, (2001) presentaron evidencias de la inducción que ejerció el NO_3^- en raíces de plántulas de *Solanum lycopersicum* de cinco semanas de edad. Las plántulas se expusieron a 2 mM de NO_3^- [1.2 mM KNO_3 , 0.8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] durante 1, 6, 12, 24, 48 y 96 h, y en el transcurso de 1 a 24 h se estimuló la expresión de los genes de transportadores de amonio (LeAMT2), transportadores de nitrato (LeNRT1.2, LeNRT2.1), canales y transportadores de potasio (HAK5, homólogo de Kdc1, KUP3) y transportadores de fosfato (LePT2).

Años más tarde, Wang *et al.*, (2004) profundizaron en el efecto del NO_3^- sobre plántulas de *Arabidopsis*. Para ello utilizaron plántulas silvestres y plántulas mutantes con actividad nula de la NR, dichas plántulas se

desarrollaron durante 10 días con 2.5 mM de succinato de amonio como única fuente de nitrógeno, posteriormente se les aplicó 5 mM KNO_3 por 2 h. Dentro de los 595 genes que respondieron a NO_3^- se encontraban diversos genes que codifican para transportadores: ACH1 (NRT2.1), ACH2(NRT2.2), NRT2, NLT1 (NRT1.2), NPK1 putativo, transportador de amonio, transportador putativo de aminoácidos catiónicos, proteína transportadora de Fe(II), transportadores de azufre, transportador putativo de potasio (AKT1) y transportador de fosfato (AtPT2), así como la estimulación de algunos genes que codifican para otros tipos de transportadores. Específicamente para la familia de transportadores de NO_3^- , obtuvieron que NRT1.1, NRT2.1 y NRT2.2 se indujeron fuertemente en la raíz, NRT2.4 se indujo moderadamente en las raíces, mientras que NRT2.5 se reprimió moderadamente y NRT1.1 se indujo moderadamente en la parte aérea.

En reportes más recientes, Liu *et al.*, (2008) analizaron el efecto del NO_3^- sobre plántulas de *Zea mays* L. mediante el sistema split-root de dos compartimentos. Estos autores expusieron las plántulas a 0.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ durante 0, 1, 4 y 8 h, colectaron 15 cm del ápice de la raíz y extrajeron el ARN para realizar los estudios por microarreglos. Encontraron que el tratamiento localizado con NO_3^- indujo la expresión de 14 genes que participan en el transporte transmembranal, entre ellos un transportador de alta afinidad de NO_3^- (ZmNRT2.1), un transportador putativo de azúcar, un precursor del translocador G6P/fosfato, cuatro acuaporinas, tres bombas de protones y una pirofosfatasa inorgánica vacuolar translocadora de H^+ , un transportador de aniones orgánicos y una β -importina.

Cabe mencionar que nuestros resultados contrastan con lo ya reportado anteriormente por otros autores. Sin embargo, en los análisis realizados en nuestro laboratorio por Ramos *et al.* (comunicación personal), en raíces completas de chile habanero se observó una inducción en la expresión del gen CcNRT2 a las 4 – 6 h de exposición a 500 μM NO_3^- , lo cual concuerda con los datos obtenidos para otras especies al estudiar la raíz completa o una parte mayor a del ápice. A partir de ello, podemos sugerir que la inducción del transportador en respuesta a NO_3^- ocurre de manera dependiente a la zona de la raíz evaluada y que al menos para chile habanero este fenómeno no se observa en el ápice de la raíz. También es necesario señalar que en *Arabidopsis* este tipo de transportador, contrario al AtNRT1.1, no se expresa mayoritariamente en el ápice radical, sino en las células de la epidermis, de la endodermis y del córtex de la zona de maduración de las raíces (Nazio *et al.*, 2003), por lo que cabe la posibilidad de que en los ápices de las raíces de *C. chinense* tampoco se exprese el transportador NRT2 que se regula por NO_3^- .

III.4.5 Otros transportadores

Como se aprecia en los análisis transcripcionales realizados en nuestro estudio, la expresión de un transportador de potasio, el HAK9, se regula positivamente en presencia de NO_3^- , esto coincide con reportes previos de estudios realizados en raíces de tomate (Wang *et al.*, 2001) y en raíces de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2004).

En nuestros estudios, un gen de un transportador tipo ABC, solo presentó niveles de expresión basales sin modificaciones relevantes, a diferencia de los estudios realizados en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2004) donde se estimuló su expresión de un tipo de estos transportador al aplicar 5 mM de KNO_3 por 2 h. Sin embargo, es necesario destacar que existen muchos transportadores de este tipo en las plantas y en nuestro estudio se incluyó exclusivamente a un tipo, por lo que no se puede descartar la posibilidad de la inducción de algún tipo de estos transportadores en las raíces de chile habanero en respuesta a NO_3^- .

En estudios recientes se hace referencia a la existencia de una intercomunicación entre las vías de toma de N y K; a su vez, se plantea que las respuestas de las raíces a los macronutrientes N, P, K y S están interconectadas y la mayor disponibilidad de un nutriente puede causar un desbalance en otro (Ruzicka *et al.*, 2010).

Este trabajo consiste en el primer reporte sobre los cambios en la expresión génica en el sistema radical de *C. chinense* Jacq. inducidos por NO_3^- . Los patrones de expresión reportados indican que existen conjuntos de genes que responden a la presencia de NO_3^- .

Nuestros resultados concuerdan con reportes previos, en el sentido de que las plantas poseen múltiples respuestas al NO_3^- , lo cual les proporciona un mecanismo de regulación capaz de adaptar la expresión de los distintos genes en función de las condiciones a las que se expone la planta.

III.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali MS, Akazawa T** (1986) Association of H⁺-translocating ATPase in golgi membrane system from suspension culture cells of sycamore. *Plant Physiol* 81: 222-227
- Arnon DJ, Hoagland DR** (1952) Nutrient solution. En: Hewitt, E.J. (ed) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication No.22 Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent, U.K. p. 85
- Bloom AJ** (1997) Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root development. *Z Pflanz Bodenkunde* 160: 253-259
- Campbell WH** (1988) Higher plant nitrate reductase and its role in regulation of nitrate assimilation. *Physiol Plantarum* 74: 214-219
- Cheng C, Acedo G, Dewdney J, Goodman H, Cankling M** (1991) Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol* 96: 275-279
- Cheng C, Dewdney J, Kleinhofs A, Goodman H** (1986) Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *P Natl Acad Sci USA* 83: 6825-6828
- Colcombet J, Hirt H** (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413: 217-226
- Crawford N, Campbell W, Davis R** (1986) Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *P Natl Acad Sci USA* 83: 8073-8076
- Crawford N, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci* 3: 389-395
- Drew MC, Saker LR, Asley TW** (1973) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. I. The effect of nitrate concentration on the growth of axes and laterals. *J Exp Bot* 24: 1189-1202

- Drew MC** (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytol* 75: 479-490
- Drew MC, Saker LR** (1975) Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates of nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system. *J Exp Bot* 26: 79-90
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Gollidack D** (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot* 52: 1969-1980
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5:199-206
- Forde BG, Clarkson DT** (1999) "Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives", in *Adv Bot Res* 30: 1-90
- Gansel X, Muños S, Tillard P, Gojon A** (2001) Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* 26: 143-155
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K** (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett* 581: 2204-2214
- Gogarten JP, Fichmann J, Braun Y, Morgan L, Styles P, Taiz SL, DeLapp K, Taiz L** (1992) The use of antisense mRNA to inhibit the tonoplast H^+ ATPase in carrot. *Plant Cell* 4: 851-864
- Gowri G, Kenis J, Ingemarsson B, Redinbaugh M, Campbell W** (1992) Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol Biol* 18: 55-64
- Granato TC, Raper CD** (1989) Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *J Exp Bot* 40: 263-275
- 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* 24: 1169-1180

- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC** (2001) The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127: 803-16
- Hedrich R, Kurkdjian A, Guern J, Flugge UI** (1989) Comparative studies on the electrical properties of the H⁺ translocating ATPase and pyrophosphatase of the vacuolar-lysosomal compartment. *EMBO J* 8: 2835-2841
- Herman EM, Li X, Su RT, Larsen P, Hsu H, Sze H** (1994) Vacuolar-type H⁺-ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells. *Plant Physiol* 106: 1313-1324
- Huber SC, MacKintosh C, Kaiser WM** (2002) Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant Mol Biol* 50: 1053-1063
- Klychnikov OI, Li KW, Lill H, de Boer AH** (2007) The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins. *J Exp Bot* 58: 1013-1023
- Koch K** (1997) "Molecular crosstalk and the regulation of C- and N-responsive genes", in *A molecular approach to primary metabolism in higher plants*. C.H. Foyer y W. P. Quick, ed. (London: Taylor and Francis), pp. 105-124
- Krebs M, Beyhl D, Görlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K** (2010) *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *P Natl Acad Sci USA* 107: 3251-3556
- Lam H, Hsieh M, Coruzzi G** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 345-353
- Lin Y, Cheng C** (1997) A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines a new *HY* locus. *Plant Cell* 9: 21-35
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser O** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* 29: 751-760
- Liu J, Han L, Chen F, Bao J, Zhang F, Mi G** (2008) Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci* 175: 272-282

- Matsuoka K, Higuchi T, Maeshima M, Nakamura K** (1997) A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell* 9: 533-546
- Melzer J, Kleinhofs A, Warner R** (1989) Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol Gen Genet* 217: 341-346
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A** (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J* 18: 1-12
- Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C** (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol* 6: 1104-1113
- Müller J, Mettbach U, Menzel D, Šamaj J** (2007) Molecular dissection of endosomal compartments in plants. *Plant Physiol* 145: 293-304
- Nakazawa YE, Núñez R, Souza R, Santana N, Zúñiga JJ** (2010) Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defence-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense*. *European Journal of Plant Pathol* 126: 403-415
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass DM, Touraine B** (2003) Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol Bio* 52: 689-703
- Oliviusson P, Heinzerling O, Hillmer S, Hinz G, Tse YC, Jiang L, Robinson DG** (2006) Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in *Arabidopsis*, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* 18: 1239-1252
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* 129: 886-896
- Padmanaban S, Lin X, Perera I, Kawamura Y, Sze H** (2004) Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol* 134: 1514-1526
- Ramírez G, Góngora S, Pérez L, Chel L, González T, Tun J, Escalante E, Rodríguez L, Ledon J, Castillo J, López H** (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, México

Redinbaugh MG, Campbell WH (1991) Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol Plantarum* 82: 640-650

Reddy JV, Seaman MN (2001) Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Mol Biol Cell* 12: 3242-3256

Richard-Molard C, Krapp A, Brun F, Ney B, Daniel-Vedele F, Chaillou S (2008) Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *J Exp Bot* 59: 779-791

Ruzicka DR, Barrios FH, Hausmann NT, Jackson LE, Schachtman DP (2010) Tomato root transcriptome response to a nitrogen-enriched soil patch. *BMC Plant Biol* 10:75 doi:10.1186/1471-2229-10-75

Santos MO, Aragão FJ (2009) Role of SERK genes in plant environmental response. *Plant Signal Behav* 4: 1111-1113

Scheible WR, Lauerer M, Schulze ED, Caboche M, Stitt M (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J* 11: 671-691

Schoonheim PJ, Sinnige MP, Casaretto JA, Veiga H, Bunney TD, Quatrano RS, De Boer AH (2007) 14-3-3 adapter proteins are intermediates in ABA signal transduction during barley seed germination. *Plant J* 49: 289-301

Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T, Chory J (1999) The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development. *Gene Dev* 13: 3259-3270

Seaman MN (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* 165: 111-122

Seaman MN (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* 15: 68-75

- Sinnige MP, Roobeek I, Bunney TD, Visser AJ, Mol JN, Boer AH** (2005) Single amino acid variation in barley 14-3-3 proteins leads to functional isoform specificity in the regulation of nitrate reductase. *Plant J* 44: 1001-1009
- Smart LB, Vojdani F, Maeshima M, Wilkins TA** (1998) Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol* 116: 1539-1549
- Spitzer C, Schellmann S, Sabovljevic A, Shahriari M, Keshavaiah C, Bechtold N, Herzog M, Muller S, Hanisch FG, Hulskamp M** (2006) The *Arabidopsis* elc mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development* 133: 4679-4689
- Stitt M** (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* 2: 178-186
- Sze H, Li X, Palmgren M** (1999) Energization of the plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: biosynthesis and regulation. *Plant Cell* 11: 677-689
- Taiz L, Zeiger E** (1991) *Plant physiology*. Benjamin/Cummings, Redwood City, CA
- Tang P, Wu H** (1957) Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature* 179: 1355-1356
- Van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP** (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23: 936-946
- van Heusden GPH** (2005) 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life* 57: 623-629
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell* 12: 1491-1510
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over

1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 132: 556-567

Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM (2004) Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 2512-2522

Wang Y, Garvin D, Kochian L (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol* 127: 345-359

Wilkinson JQ, Crawford NM (1991) Identification of the *Arabidopsis* CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene *Nia2*. *Plant Cell* 3: 461-471

Wilczynski G, Basner A, Szopa J (1998) The expression of 14-3-3 isoforms in potato is developmentally regulated. *J. Plant Physiol* 153: 118-126

Yanagisawa S (1998) Transcription factors in plants: physiological functions and regulation of expression. *J Plant Res* 363-371

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

Zhang H, Jennings A, Barlow P, Forde B (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *P Natl Acad Sci USA* 96: 6529-6534

Zhang H, Forde BG (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot* 51: 51-59

Zhao DY, Tian QY, Li LH, Zhang WH (2007) Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. *Ann Bot-London* 100: 497-503

Zuk M, Weber R, Szopa J (2005) 14-3-3 protein down-regulates key enzyme activities of nitrate and carbohydrate metabolism in potato plants. *J agricultural and food chemistry* 53: 3454-3460

The first of these is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The second is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The third is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The fourth is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The fifth is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The sixth is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The seventh is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The eighth is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The ninth is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

The tenth is the fact that the new system is based on a
 different set of assumptions than the old one. It is based on the
 idea that the system should be able to handle a wide range of
 situations, rather than being limited to a few specific cases.

CAPÍTULO IV

Discusión general

En los capítulos anteriores se presentó una discusión detallada de cada uno de los experimentos realizados. En este capítulo se discutirá de manera integral el compendio de todos resultados, enfatizando en el posible papel del NO_3^- como molécula señal para la inducción de modificaciones en el sistema radical de *C. chinense*.

En el capítulo II, se mostró que el NO_3^- , en condiciones heterogéneas, indujo cambios en el desarrollo del sistema radical de *C. chinense*, dado que el crecimiento de la raíz primaria (RP) sufrió una inhibición, principalmente entre el 4^{to} y el 5^{to} día de exposición al NO_3^- (Fig. 2.5B). Este resultado se obtuvo tanto para condiciones homogéneas como heterogéneas. La RP presentó una inhibición de hasta aproximadamente un 70 %, respecto al testigo, entre el 4^{to} y el 5^{to} día de tratamiento, incluso en dosis tan bajas como 100 μM de KNO_3 y fue dependiente de la fuente nitrogenada, ya que el NH_4Cl solo provocó un 40 % de inhibición, a una dosis de 500 μM (Fig. 2.2A y B).

En contraste con nuestros resultados, Zhang & Forde (1998) no observaron cambios en el crecimiento de la RP de *Arabidopsis*, al suministrarle NO_3^- en un rango de concentraciones desde 0.01 mM hasta 50 mM, durante 14 días. Por otra parte, Drew, (1975) tampoco reportó diferencias en la elongación de la raíz seminal de *Hordeum vulgare* al exponerla a variaciones de concentraciones de NO_3^- por un periodo de 21 días. Sin embargo, recientemente Walch-Liu & Forde, (2008) reportaron que en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a 5 mM de KNO_3 se estimuló modestamente (17-22 %) el crecimiento de la RP. En estos trabajos no se menciona el efecto del NO_3^- sobre el crecimiento diario de la RP. Bajo nuestras condiciones, las diferencias en la longitud de la RP iniciaron al 4^{to} día de exposición a los parches de NO_3^- y se mantuvieron hasta el periodo final del experimento (10^{mo} día) (Fig. 2.1A). Nuestros resultados sugieren que la inhibición del crecimiento de la RP de *C. chinense* no es una respuesta a corto plazo ante la presencia de NO_3^- , ya que se produjo entre el 4^{to} y el 5^{to} día de exposición (Fig. 2.5B), lo que puede indicar que hay varias señales que desencadenarían el proceso ya sea durante ese periodo de tiempo, o bien, inmediatamente antes. Al analizar el efecto del NO_3^- en seis diferentes accesiones de *C. chinense* se observó que el crecimiento de la RP durante los primeros cinco días fue diferencial. Mientras que la RP de accesiones como P1115C y S5B crecieron alrededor de 30 mm, otras como la R4 y MR-

8 crecieron 65 y 50 mm, respectivamente (Fig. 2.5A). Sin embargo, en todas las accesiones se observó una inhibición en el crecimiento de la RP durante los primeros cinco días. Nuevamente, esta inhibición fue mayor entre el 4^{to} y el 5^{to} día de tratamiento y el porcentaje de inhibición fue diferencial entre accesiones, obteniéndose desde una modesta inhibición del 13 % (MR-8) hasta valores tan altos como de un 70 % (NP4EC). Con esto, se concluye que este efecto es generalizado en *C. chinense*.

También se observó un incremento en la capacidad de respuesta de las plántulas al NO_3^- , más del 70 % de las plántulas formaron RL en la zona expuesta a NO_3^- . Para descartar que dicha estimulación se debiera al grado de desarrollo de la zona de la RP expuesta a NO_3^- y no a la presencia localizada de éste, se evaluó la respuesta en condiciones homogéneas de NO_3^- , así como la aplicación de este nutrimento en otros segmentos de la RP (Fig. 2.4A y B). A partir de estos resultados (Capítulo II) se demostró que la respuesta de *C. chinense* no se debió al grado de desarrollo de la RP en el segmento expuesto al NO_3^- , sino que fue producto del tratamiento localizado y fue específica para este ión.

Existen, desde hace mucho tiempo, numerosos reportes sobre el efecto del NO_3^- en diversas especies en los cuales se plantea que una característica generalizada de las raíces es la de crecer preferentemente en las regiones de suelo que contengan concentraciones favorables de nutrimentos (Weaver & Clements, 1938; Cooke, 1954; Russell, 1961; Passioura & Wetselaar, 1972; Drew, 1975; Zhang & Forde, 1998).

Se ha reportado que el NO_3^- estimula la formación de raíces laterales (RL) en *Pisum sativum* (Wiersum, 1958). Además, se han descrito varias gramíneas en las que concentraciones milimolares de NO_3^- estimulan la formación y el crecimiento de RL, entre las que se encuentran: *Triticum aestivum* L. (Hackett, 1972), *Hordeum vulgare* (Drew, 1975) y *Zea mays* (Granato & Raper, 1989). En *C. chinense* Jacq. el número de RL se afectó por la disponibilidad de NO_3^- , los parches ricos en NO_3^- estimularon la formación de RL y los parches pobres en este ión suprimieron este proceso. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con lo encontrado por Zhang & Forde, (1998) para *Arabidopsis*, ya que dichos autores no observaron cambios en el número de RL en los experimentos con parches de NO_3^- .

Se reportan tres mecanismos por medio de los cuáles el nitrógeno (N) regula el desarrollo de las raíces laterales: **1)** un efecto estimulador localizado inducido por NO_3^- , que es más evidente cuando las plantas crecen en bajas concentraciones de NO_3^- y posteriormente se les suministra éste en forma localizada (Zhang & Forde, 1998). **2)** un efecto inhibitorio inducido por altas concentraciones de NO_3^- , el cual es más aparente cuando

las plantas crecen en condiciones homogéneamente altas (Zhang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000) y 3) la inhibición por una alta relación en el balance carbono:nitrógeno (C:N), provocando una represión dramática en el desarrollo de las RL (Malamy & Ryan, 2001).

En nuestros experimentos, el NO_3^- a concentraciones de 1 mM estimuló la formación y elongación de las RL en *C. chinense* (capítulo II), produciendo un efecto similar al reportado para especies cultivables, tales como trigo, cebada y maíz (Hackett, 1972; Drew, 1975; Granato & Raper, 1989). A su vez, se presentó la respuesta inhibitoria sistémica al disminuir la cantidad de RL en los segmentos sin NO_3^- con respecto a las plántulas testigo.

El uso preferencial de los parches ricos en nutrimentos, fenómeno presentado generalmente en los pastos (Hutchings & de Kroon, 1994), es una respuesta común de las plantas ante la heterogeneidad de nutrimentos, aunque no se considera una respuesta universal. Robinson, (1994) analizó su frecuencia y los tipos de respuesta exhibidas cuando la fuente de nutrimentos del suelo es heterogénea y Hodge *et al.*, (2000a, b y c) compararon las respuestas de parches con diferentes características físicas y químicas utilizando ^{15}N marcado como fuente de N en *Lolium perenne*, reportando la importancia de que la relación C:N sea alta durante la toma de N para que ésta se vea favorecida, así como la efectividad de las raíces para competir con los microorganismos por nutrimentos.

Para conocer si el NO_3^- era capaz de inducir cambios en el desarrollo del sistema radical de chile habanero, al actuar como molécula señal, y no como producto de un efecto metabólico, se utilizó al tungstato (WO_4^{2-}), el cual es un inhibidor constitutivo de la nitrato reductasa (NR), que reemplaza al molibdeno en la apoenzima e inhibe su actividad catalítica (Heimer *et al.*, 1969). Cuando las plántulas de *C. chinense* fueron expuestas a 1 mM de KNO_3 con 50 μM de Na_2WO_4 , la presencia de WO_4^{2-} no afectó el crecimiento acumulado de la RP con respecto al testigo durante los primeros tres días de tratamiento. Sin embargo, la RP expuesta únicamente a KNO_3 1 mM se inhibió a partir del 4^{to} día, al igual que en experimentos previos. En este experimento, se observó también que la cantidad de RL formadas en el segmento medio se estimuló respecto al testigo aun en presencia de WO_4^{2-} . La longitud total alcanzada por las RL se estimuló en presencia de NO_3^- ; sin embargo, cuando se suministró WO_4^{2-} no se observó el efecto estimulatorio.

La presencia de WO_4^{2-} inhibió la actividad de la NR aproximadamente en un 45 % en las raíces de *C. chinense*. El WO_4^{2-} no afectó el crecimiento acumulado de la RP con respecto al testigo en plantas expuestas a NO_3^- . El crecimiento de la RP fue significativamente inhibido después de cuatro días

de expuestas a 1 mM de KNO_3 . Por otro lado, la presencia del inhibidor de la NR no afectó la formación de RL. Sin embargo, el efecto más importante de la utilización de WO_4^{2-} , fue una baja tasa de crecimiento de las RL en respuesta a NO_3^- en el segmento medio.

Debido a que el efecto no fue observado en presencia de WO_4^{2-} , la elongación localizada de las RL en respuesta al NO_3^- podría atribuírsele a un efecto metabólico, aunque no se puede descartar que el WO_4^{2-} pueda tener un efecto sobre otros eventos celulares que indirectamente podrían regular el crecimiento de las RL. A este respecto se podría recalcar que la estimulación en el crecimiento de RL no fue observada cuando se aplicó amonio, un producto de la asimilación del NO_3^- .

Cuando plántulas de *Nicotiana tabacum* crecieron en una solución nutritiva en la que el MoO_4^{2-} se substituyó por tungstato (50 μM de Na_2WO_4), la actividad de la NR en hojas disminuyó a un nivel muy bajo en tan solo 24 h (Heimer *et al.*, 1969), el mismo efecto se observó con una dosis mayor de tungstato (150 μM de Na_2WO_4) (Deng *et al.*, 1989). De igual forma, en células en suspensión de *Nicotiana tabacum* 50 y 100 μM de Na_2WO_4 inhibieron el desarrollo de la raíz y de la parte aérea así como la toma de NO_3^- (Heimer *et al.*, 1969). En otras especies también se observa el efecto inhibitorio del tungstato sobre la actividad de la NR: en raíces de plántulas de *Z. mays* (Espin *et al.*, 2004), en plántulas de *A. thaliana*, *Cucurbita pepo* y *Nicotiana plumbaginifolia* (Lillo *et al.*, 2004).

Por otro lado, la estimulación localizada en la formación de RL en respuesta al NO_3^- podría ser un evento regulado directamente por este nutrimento y no por una respuesta metabólica, ya que este efecto se observó incluso en presencia de WO_4^{2-} , un inhibidor de la NR.

Es necesario considerar el papel que juegan las hormonas en todos estos procesos de señalización, particularmente las auxinas, quienes desempeñan un papel fundamental en la formación y el crecimiento de las RL (Overvoorde *et al.*, 2010).

Para que se presenten modificaciones en el sistema radical se hipotetiza que se indujeron cambios en la expresión génica por efecto de NO_3^- exógeno. En este trabajo se realizó una aproximación a las modificaciones en la expresión génica que ocurren en presencia de NO_3^- exógeno, utilizando la técnica de hibridación diferencial y se confirmó el resultado de algunos de los genes con mayores modificaciones mediante PCR tiempo final.

Al exponer las raíces de *C. chinense* a 1 mM de NO_3^- durante tiempo cortos (0, 1, 2 y 4 h) se observaron modificaciones en la expresión de algunos genes presentes en el ápice radical (capítulo III). De los resultados obtenidos, se destaca la estimulación de los genes que codifican a las proteínas VPS6, V-ATPasa, una proteína 14-3-3 y la NR. En el caso de la NR, se observa una estimulación a la primera hora de exposición a NO_3^- , mismo nivel que se mantiene constante durante las dos y cuatro horas.

Haciendo un recuento general, de los 48 genes analizados para chile habanero, podemos observar que con una hora de exposición a NO_3^- uno de los primeros genes en estimularse significativamente fue el de la V-ATPasa, incrementándose 5.5 veces el nivel de sus transcritos, esto nos sugiere una rápida regulación del gradiente de protones necesario para la toma de nutrimentos. Posteriormente, también se destaca la estimulación de dos veces respecto al testigo de los transcritos de la enzima NR, activándose así el metabolismo del nitrógeno; a las dos horas en presencia de NO_3^- , se obtuvo el resultado más novedoso de estos experimentos, la estimulación de nueve veces respecto al testigo del gen de la VPS26, que podría sugerirse tenga una participación en la vía de señalización con el receptor de NO_3^- u otros receptores. A su vez, el nivel de la NR continúa; finalmente, a las cuatro horas de exposición a NO_3^- , observamos que los niveles de todos los transcritos se muestran muy cercanos al nivel basal (0 h); sin embargo, la NR continúa activa, esto nos sugiere una rápida regulación inicial de la percepción y toma de NO_3^- , posteriormente, la raíz parece enfocarse en metabolizar dicho nutrimento.

Los niveles de transcritos para el transportador NRT2 presentaron una ligera reducción al exponer las raíces durante una hora a NO_3^- ; sin embargo, éstos se recuperaron respecto al testigo en los tratamientos de mayor exposición a NO_3^- . Este resultado se corroboró al realizar en dos ocasiones la hibridación de las membranas. Este resultado contrasta con lo ya reportado por otros autores para algunos transportadores de la familia NRT2, ya que en estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2000 y 2004), *Zea mays* L. (Liu *et al.*, 2008) y *Solanum lycopersicum* (Wang *et al.*, 2001). Dichos estudios se realizaron utilizando toda la plántula o la raíz completa; en comparación con nuestros experimentos, en los que el análisis se realizó específicamente en los ápices de las raíces de *C. chinense* (1 cm de los ápices). Nuestros resultados indican que en particular el gen de este transportador está presente en el ápice de la raíz; sin embargo, no se estimula por el NO_3^- . Hasta el momento no conocemos cuantos miembros existen de esta familia de transportadores en *C. chinense*, tampoco se conoce para otra especie del género *Capsicum*. En *Arabidopsis* se ha identificado la existencia de tres familias transportadoras

de NO_3^- ; AtNRT1 con 53 miembros, AtNRT2 con 7 miembros y AtCLC con 7 miembros (De Angeli *et al.*, 2009; Forde, 2000; Tsay *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el NO_3^- tiene efectos fisiológicos sobre las raíces de *C. chinense*, ya que al aplicarlo localizadamente se afectan los patrones de crecimiento de la RP y de las RL. Algunos de dichos efectos son específicos de la fuente nitrogenada y no se deben al metabolismo del nitrógeno. También se presentan modificaciones en la expresión génica, observándose estimulación en diversos genes en respuesta a la exposición a NO_3^- .

Dado lo anterior, en la Figura 4.1 se resumen los principales cambios inducidos por la presencia de NO_3^- sobre las raíces de *C. chinense*. Se demostró que dicho ión induce cambios a nivel fisiológico, tales como la inhibición de la RP, así como la estimulación en la formación y elongación de las RL. En el aspecto molecular, se indujo el incremento en los niveles de transcritos de diversos genes de interés.

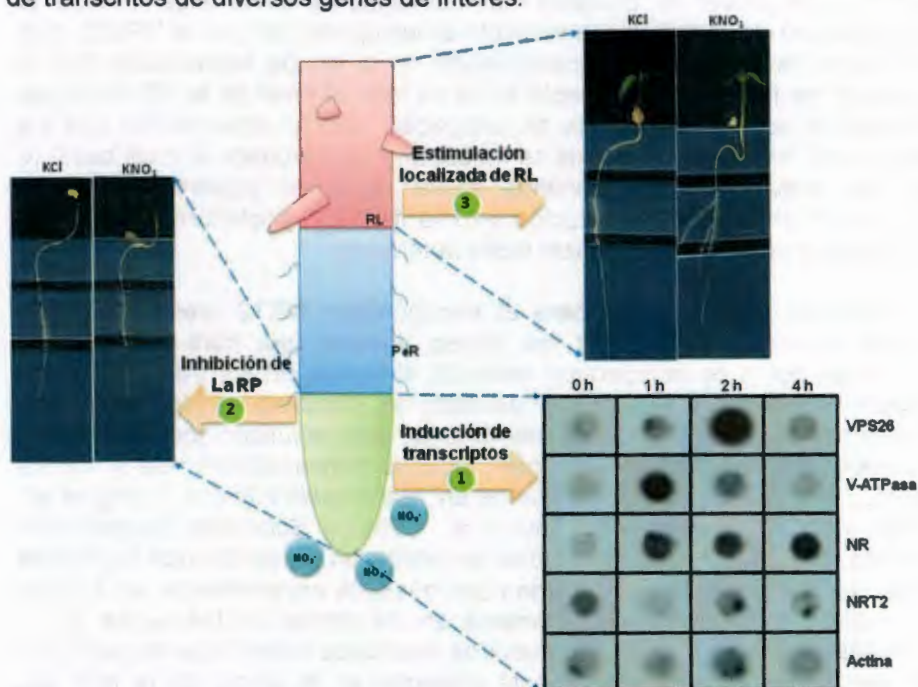


Figura 4.1. Modelo del efecto de la presencia de NO_3^- sobre el sistema radical de *C. chinense*. Cambios fisiológicos y moleculares. PeR: pelos radiculares, RL: raíces laterales. 1. Inducción de transcritos durante las primeras horas de exposición a nitrato, 2. Inhibición del crecimiento de la RP

durante el 4^{to} y 5^{to} día de tratamiento, 3. Estimulación localizada de RL (imagen al 10^{mo} día de evaluación).

Nuestros resultados concuerdan con reportes previos, en el sentido de que las plantas poseen múltiples respuestas al NO_3^- , lo cual les proporciona un mecanismo de regulación capaz de adaptar la expresión de los distintos genes en función de las condiciones a las que se expone la planta.

Resumiendo, los nuevos aportes de esta tesis consisten en la presentación de los efectos fisiológicos y génicos en raíces de *C. chinense* inducidos por NO_3^- . Es la primera ocasión que se reporta para Chile habanero la forma específica en que sus raíces se comportan ante este estímulo, así como resulta novedosa la participación de los genes que inducen proteínas tales como VPS26, V-ATPasa.

IV.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cooke GW** (1954) Recent advances in fertilizer placement. II. Fertilizer placement in England. *J Sci Food Agric* 9: 429
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2009) Review. CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philos T R Soc B* 364: 195-201
- Deng M, Moureaux T, Caboche M** (1989) Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene. *Plant Physiol* 91: 304-309
- Drew MC** (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytol* 75: 479-490
- Espen L, Nocito FF, Cocucci M** (2004) Effect of NO_3^- transport and reduction on intracellular pH: an *in vivo* NMR study in maize roots. *J Exp Bot* 55: 2053-2061
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465: 219-235
- Granato TC, Raper CD** (1989) Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *J Exp Bot* 40: 263-275
- 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
- Heimer YM, Wray JL, Filner P** (1969) The effect of tungstate on nitrate assimilation in higher plant tissues. *Plant Physiol* 44: 1197-1199
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH** (2000a) Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity. *J Ecol* 88: 150-164
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH.** (2000b) Spatial and physical heterogeneity of N supply from soil does not influence N capture by two grass species. *Funct Ecol* 14: 645-653
- Hodge A, Robinson D, Fitter AH** (2000c) An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in soil. *New Phytol* 145: 575-584
- Hutchings MJ, de Kroon H** (1994) Foraging in plants: the role of morphological plasticity in resource acquisition. *Adv Ecol Res* 25: 159-238

- Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F, Oltedal S** (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J Exp Bot* 55: 1257-1282
- Liu J, Han L, Chen F, Bao J, Zhang F, Mi G** (2008) Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci* 175: 272-282
- Malamy J, Ryan K** (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127: 899-909
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a001537
- Passioura JB, Wetselaar R** (1972) Consequences of banding nitrogen fertilizers in soil. II. Effects on the growth of wheat roots. *Plant Soil* 36: 461
- Robinson D** (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* 127: 635-674
- Russell EW** (1961) Soil conditions and plant growth. 9th edition. Longmans, London
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM** (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72: 705-713
- Walch-Liu P, Forde BG** (2008) Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J* 54: 820-828
- Wang Y, Garvin D, Kochian L** (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol* 127: 345-359
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell* 12: 1491-1510
- Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM** (2004) Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 2512-2522

- Weaver JE, Clements FE** (1938) *Plant Ecology*. 2nd edn. McGraw-Hill, New York
- Wiersum LK** (1958) Density of root branching as affected by substrate and separate ions. *Acta Bot Neerl* 7: 174
- Zhang H, Forde BG** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409
- Zhang H, Forde BG** (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot* 51: 51-59
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *P Natl Acad Sci USA* 96: 6529-6534

CAPÍTULO V

Conclusiones generales y Perspectivas

CONCLUSIONES GENERALES

1. El NO_3^- inhibió el crecimiento de la RP de chile habanero y este efecto fue dependiente del tiempo de exposición y de la dosis.
2. El NO_3^- estimuló localmente la formación y la elongación de las RL. Este efecto dependió de la accesión.
3. La estimulación en la formación de RL puede ser una respuesta al NO_3^- actuando como señal, ya que ésta se mantuvo en presencia de un inhibidor de la NR y el NH_4^+ no fue capaz de inducir esta respuesta.
4. Los efectos inhibitorios sobre la RP y estimulatorios sobre la elongación de las RL parecen requerir, en parte, que el NO_3^- sea metabolizado.
5. El NO_3^- aumentó de manera más significativa los niveles de los transcritos de una NR, una ATPasa vacuolar y una proteína de sorteo vacuolar a tiempos cortos de exposición, lo cual sugiere que el NO_3^- puede inducir cambios en su propio metabolismo, así como en eventos de transporte a nivel de vacuola y reciclamiento de receptores de membrana. Estos procesos pudieran estar involucrados en el desencadenamiento de la respuesta a nivel de desarrollo radical inducida por dicho nutrimento.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos constituyen los primeros reportes del efecto de la distribución heterogénea del NO_3^- sobre el sistema radical de *C. chinense* y abren nuevas perspectivas para continuar profundizando en el tema.

En primera instancia, para continuar los estudios sobre el efecto del NO_3^- como molécula señal en el sistema radical de *C. chinense* se requiere descartar que el efecto observado se deba al metabolismo del N, por lo tanto, se plantea analizar el efecto de otros metabolitos de la ruta del nitrógeno (NO_2^- , aminoácidos). También, se propone utilizar inhibidores de otras enzimas del metabolismo primario del N.

Es indispensable analizar los cambios morfológicos y anatómicos para determinar los motivos de la inhibición del desarrollo de la raíz primaria (RP) durante el 4^{to} al 5^{to} día de exposición a NO_3^- .

También se sugiere estudiar el papel de las fitohormonas en el desarrollo del sistema radical de *C. chinense*, fundamentalmente las auxinas, el ácido abscísico y las citocininas, hormonas que ya se han reportado como implicadas en los fenómenos de desarrollo de las raíces para otras especies vegetales.

A partir de ADNc y la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (cDNA-AFLP, por sus siglas en inglés) es posible efectuar un análisis más amplio y detallado sobre la expresión génica diferencial en el sistema radical de *C. chinense* inducida por condiciones heterogéneas de NO_3^- . Para realizar este estudio se propone utilizar ARN extraído de raíces expuestas a condiciones heterogéneas de NO_3^- , durante diferentes intervalos de tiempo, así como analizar la expresión de genes en las raíces de las plántulas sometidas a una inhibición de la nitrato reductasa.

Los transcritos, cuya expresión se modifique por el tratamiento, podrán ser eluidos del gel de poliacrilamida, ligados a un vector, clonados y enviados a secuenciar. Para validar los datos de cDNA-AFLP se podrán seleccionar algunas de las secuencias analizadas para verificar los cambios en los patrones de expresión a través de la metodología de Northern blot.

Finalmente, se propone estudiar y caracterizar el papel de algunos de los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a NO_3^- para elucidar si el mecanismo por el cual el NO_3^- modifica la arquitectura de raíz en *C. chinense* comparte algunos de los genes reguladores reportados para otras especies, o bien, determinar si participan genes nunca antes reportados para la vía de señalización del NO_3^- , los niveles de regulación de dichos genes y su localización en la raíz, así como identificar un posible receptor de NO_3^- .

DATOS COMPLEMENTARIOS

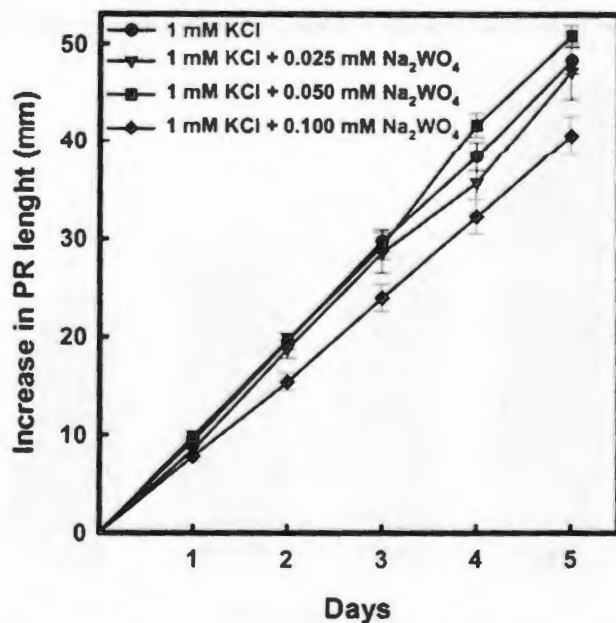


Figure S2.1. Dose-response curve to tungstate (Na_2WO_4). Experiment was performed under heterogeneous conditions, applying 1 mM KCl + increasing Na_2WO_4 concentrations (0, 0.025, 0.050, 0.100 mM) to the middle segment. RP growth was evaluated daily up to day 5. Values represent mean \pm SE, $n = 15$ seedlings.

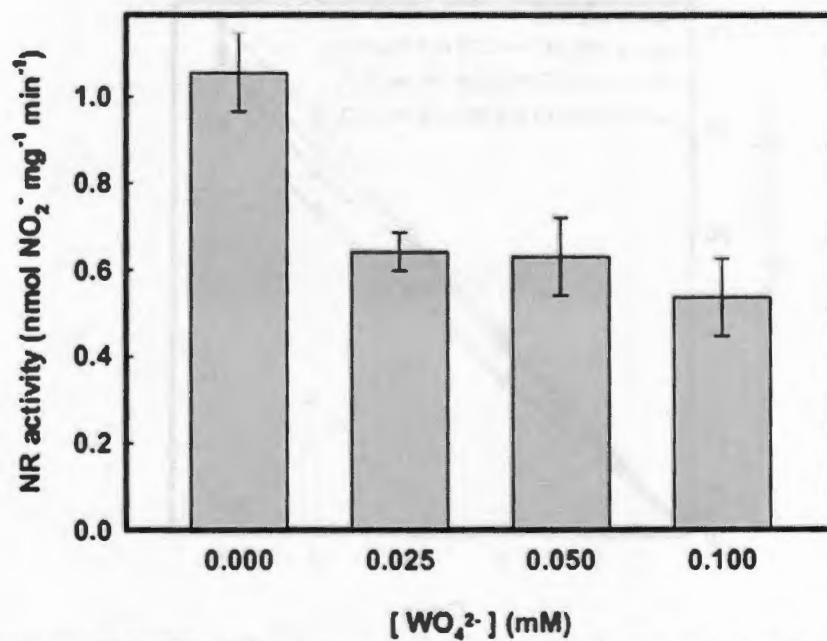


Figure S2.2. Effect of tungstate (Na_2WO_4) on nitrate reductase (NR) activity. Seedlings grown in 1 mM KNO_3 + increasing Na_2WO_4 (0, 0.025, 0.050, 0.100 mM) under homogeneous conditions. Root NR activity was evaluated after 5 days of treatment (Ramos et al., 1982). Values represent mean of three repetitions \pm SE.

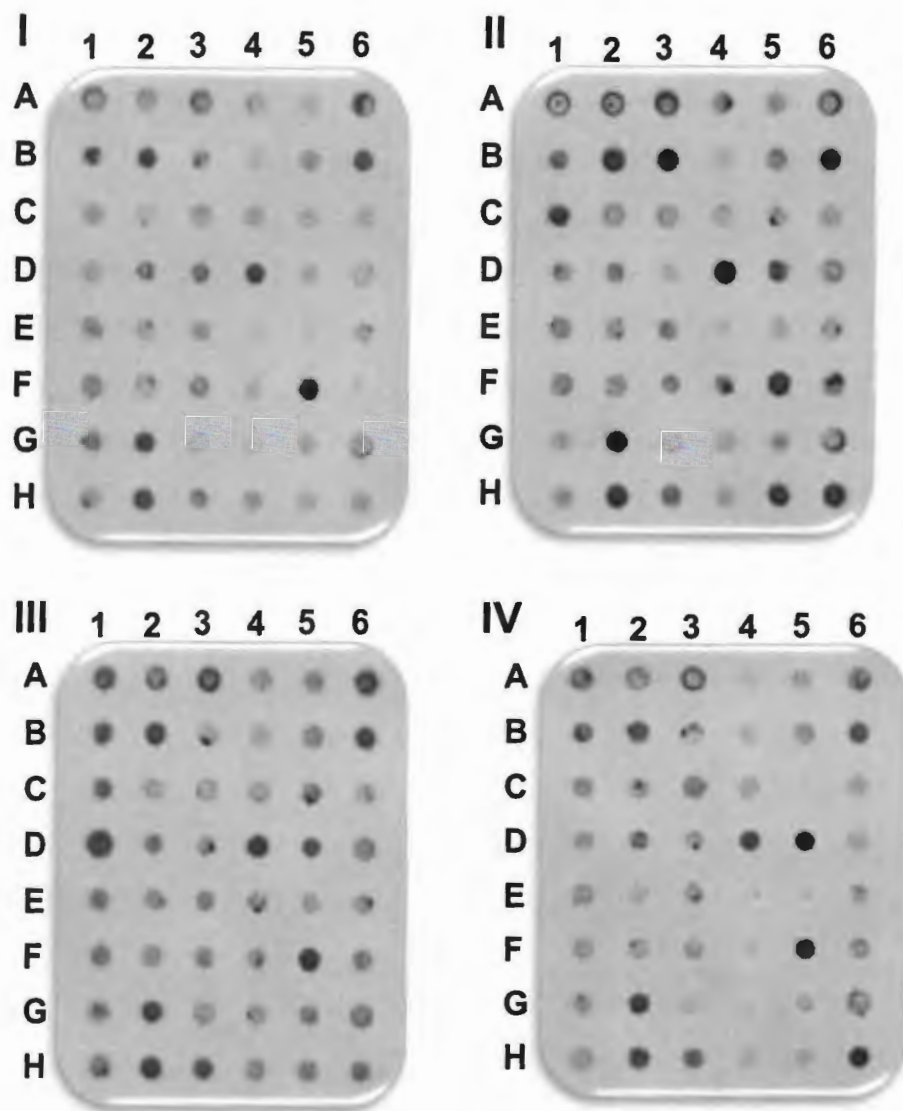


Figura S3.1. *Expresión diferencial de genes provenientes de ápices de raíz de chile habanero sometidos a la presencia de nitrato durante 0 horas (I), 1 hora (II), 2 horas (III) y 4 horas (IV). Las figuras representan la imagen escaneada del film obtenido después de la exposición de cada membrana.*

