



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO  
QUIMIOTRÓPICO DEL GLUTAMATO EN RAÍCES DE  
CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

**ERNESTO PALACIOS MEDEL**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DE YUCATÁN



Instituto de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO  
QUIMIOTRÓPICO DEL GLUTAMATO EN RAÍCES DE  
CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tesis que presenta

ERNESTO PALACIOS MEDEL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO QUIMIOTRÓPICO DEL GLUTAMATO EN RAÍCES DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 25 de noviembre 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: I.B.Q. ERNESTO PALACIOS MEDEL



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, haciendo uso de sus equipos e instalaciones, bajo la asesoría y dirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca N° 236219, otorgada para los estudios de maestría.



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme fuerza para seguir adelante y al diablo por no dejar de recordarme lo débil que soy.

A mi familia, en especial a mi madre que siempre me ha dado más de lo que puede dar y a mi padre que literalmente dio su vida por mi futuro.

A la Dra. Ileana mi asesora de tesis, que soporto mis múltiples manías, errores y defectos y a pesar de todo eso me dirigió en el camino correcto para la realización de ese trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial y de evaluación de tesis: Dr. Enrique Castaño de la Sema, Dr. Roger Orellana Lanza, Dra. Gladys Cassab López y Dra. Nina Valadez González. Por su tiempo dedicación y recomendaciones para el presente trabajo.

Al personal del laboratorio de la M.C. María del Carmen Quinto en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, donde se realizaron los experimentos en el microscopio invertido de fluorescencia. En especial al Dr. Luis Cardenas Torres y al Dr. Alberto Isaac Zepeda Jazo por todo su apoyo y asesoría.

A la M.C. Mildred Camillo Pech, por toda su ayuda en los trabajos experimentales con agonistas y su participación y apoyo en múltiples experimentos de este trabajo. También por su enorme soporte y asesoría a lo largo de toda mi estancia en esta institución.

A todo el personal del CICY, así como a los profesores del posgrado en ciencias biológicas por todas sus enseñanzas.

A mis compañeros del laboratorio 7 de la UBBMP: Gladys, Ricardo, Marta, Ángel, Angélica, Neto II, Tochis, Enid y Camilo.



**“Nuestra naturaleza está en movimiento. El reposo absoluto es la muerte.”**

**Blaise Pascal**



---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
BIBLIOGRAFÍA.....	3
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
1.1. El chile habanero ( <i>Capsicum chinense</i> Jacq.).....	5
1.1.1. <i>Capsicum chinense</i> . Origen y distribución .....	5
1.1.2. Descripción botánica.....	6
1.1.3. Condiciones de crecimiento del chile habanero en Yucatán.....	7
1.2. El nitrógeno en el suelo.....	10
1.2.1. Formas de nitrógeno en el suelo .....	10
1.2.2. Presencia de aminoácidos en los suelos y su importancia en la nutrición.....	10
1.3. El glutamato en las plantas.....	12
1.3.1 Metabolismo del glutamato en las plantas .....	12
1.3.2 Concentración de glutamato en tejidos vegetales .....	12
1.4. El glutamato como molécula señal .....	13
1.4.1. El glutamato como molécula señal en animales.....	13
1.4.2. Receptores de glutamato y su función en las plantas.....	14
1.4.3. Posible papel de la señalización por glutamato en las plantas .....	17
1.5. Tropismos.....	18
1.5.1 Tipos de tropismos.....	18

---

---

1.5.2. Quimiotropismo .....	19
1.5.3. Efecto quimiotrópico del glutamato .....	20
1.5.4. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en las respuestas trópicas.....	20
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>31</b>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
2.1. INTRODUCCIÓN.....	31
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.2.1 Material vegetal.....	32
2.2.2 Desinfestación de las semillas.....	32
2.2.3 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas .....	32
2.2.4 Tratamiento quimiotrópico .....	33
2.2.5 Caracterización de la respuesta quimiotrópica.....	33
2.2.5.1 Curva dosis-respuesta.....	33
2.2.5.2 Curso temporal.....	35
2.2.5.3 Efecto de la distancia entre la raíz y el estímulo.....	35

---

2.2.6 Especificidad de la respuesta quimiotrópica .....	35
2.2.7 Papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica .....	36
2.2.8 Evaluación de la morfología del ápice radical sometido al tratamiento quimiotrópico.....	36
2.2.9 Papel de un receptor tipo iGLR y del $Ca^{2+}$ en la respuesta quimiotrópica .....	36
2.2.9.1 Ensayo con agonistas y antagonistas de los iGLR de mamíferos .....	36
2.2.9.2 Papel del $Ca^{2+}$ .....	37
2.2.10 Evaluación de los cambios de pH en el exterior de la raíz en respuesta a la presencia de glutamato.....	37
2.3. RESULTADOS.....	38
2.3.1 Caracterización de la respuesta quimiotrópica de la raíz de chile habanero a glutamato ..	38
2.3.1.1 Curva dosis-respuesta.....	38
2.3.1.2 Curso temporal.....	39
2.3.1.3 Efecto de la distancia entre la raíz y el estímulo.....	41
2.3.2 Especificidad de la respuesta quimiotrópica hacia glutamato .....	42
2.3.3 Papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica hacia Glu.....	44
2.3.4. Efecto del glutamato sobre la morfología del ápice radical. ....	45
2.3.5. Papel de un receptor del tipo iGLR y del $Ca^{2+}$ en la respuesta quimiotrópica. ....	47
2.3.5. La exposición de la raíz al glutamato induce cambios en el pH extracelular .....	48
2.4. DISCUSIÓN.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	54
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>59</b>
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	59

---

---

3.1. CONCLUSIONES .....	59
3.2. PERSPECTIVAS.....	59

---

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Principales tipos de suelo en la península de Yucatán.....	8
<b>Figura 1.2</b> Metabolismo del Glu en las plantas.....	12
<b>Figura 1.3.</b> Representación esquemática de las estructuras de los receptores de Glu de diferentes organismos.....	15
<b>Figura 1.4</b> Arquitectura de las raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a distintos tratamientos con L-Glu.....	17
<b>Figura 1.5</b> Resumen de la estrategia experimental que se usó en el trabajo .....	22
<b>Figura 2.1</b> Modelo para estudiar el efecto quimiotrópico del Glu sobre la raíz de chile habanero.....	33
<b>Figura 2.2</b> Medición de ángulos en el programa ImageJ. ....	34
<b>Figura 2.3</b> Modelo para el análisis al microscopio de fluorescencia, usando un fluoróforo sensible a cambio de pH. ....	38
<b>Figura 2.4.</b> Efecto de la concentración de Glu sobre la respuesta quimiotrópica de las raíces de chile habanero. ....	39
<b>Figura 2.5</b> Evaluación de la respuesta trópica de la raíz primaria de chile habanero durante un curso temporal.....	40
<b>Figura 2.6</b> Crecimiento de la raíz primaria de chile habanero durante el tratamiento quimiotrópico. ....	41
<b>Figura 2.7</b> Efecto de la distancia entre la raíz y el estímulo en la respuesta quimiotrópica hacia Glu.....	42
<b>Figura 2.8.</b> Especificidad de la respuesta quimiotrópica al Glu. ....	43
<b>Figura 2.9</b> Papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica. ....	45

---

---

<b>Figura 2.10.</b> Morfología de las raíces sometidas durante ocho horas al tratamiento quimiotrópico .....	47
<b>Figura 2.11</b> Efecto del Glu sobre el pH alrededor del ápice.. .....	49
<b>Figura 2.11</b> Modelo de la respuesta quimiotrópica a glutamato. ....	53

---

LISTADO DE CUADROS

**Cuadro 1.1.** Algunas características de los principales tipos de suelo en los que se cultiva chile habanero en Yucatán, México. .... 9

**Cuadro 2.1** Respuesta quimiotrópica a distintos compuestos relacionados químicamente al glutamato. .... 44

**Cuadro 2.2.** Tamaño de las distintas zonas del ápice radical expuestas al tratamiento quimiotrópico. .... 46

**Cuadro 2.3** Efecto quimiotrópico del glutamato sobre la raíz primaria de chile habanero tratadas con distintos compuestos. .... 48



---

## ABREVIATURAS

6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona	DNQX
Acido $\gamma$ aminobutírico	GABA
Calcio	Ca <sup>2+</sup>
<i>D</i> -Serina	<i>D</i> -Ser
Glicina	Gly
Glutamato	Glu
<i>L</i> -Glutamato de potasio	<i>L</i> -GluK
Nitrógeno	N
Receptor de glutamato	GLR
Receptor ionotrópico de glutamato	iGluR
Receptores metabotrópicos de glutamato	mGLR
$\beta$ -Metilamino- <i>L</i> -alanina	BMAA
United States Department of Agriculture	USDA

---



---

## RESUMEN

Las plantas, como organismos sésiles dependen totalmente del crecimiento para la exploración de su entorno y búsqueda de recursos. Los tropismos le permiten a las plantas tener un crecimiento eficiente, mejorando la captación de recursos y evitando obstáculos al momento de explorar su entorno. Específicamente, las raíces necesitan de estos mecanismos para cumplir con sus funciones, debido a que éstas están encargadas de captar recursos hídricos y nutrimentales. A través de una respuesta quimiotrópica, las plantas crecen en pro o en contra de compuestos presentes en el entorno que podrían ser benéficos o dañinos para su desarrollo. Además de ser pieza clave en los procesos de fecundación dirigiendo el tubo polínico hacia el óvulo.

El glutamato es uno de los aminoácidos más abundantes, llegando a formar el 40% del peso de las proteínas en algunos organismos. También, es una molécula señal importante en diversos organismos, desde microorganismos como protozoarios y hongos donde es indicador de la presencia de nutrimentos, hasta organismos superiores como los mamíferos, donde es esencial para la formación del sistema nervioso y es un neurotransmisor necesario para el aprendizaje. En todos ellos, este aminoácido es quimiotrópicamente activo. Sin embargo, no existen reportes que sustenten el efecto quimioatrayente de este aminoácido para las plantas. El objetivo de este proyecto fue evaluar y caracterizar la respuesta quimiotrópica de la raíz de chile habanero al glutamato. Para ello, se diseñó un modelo *in vitro* en cajas segmentadas, en el cual el ápice de la raíz primaria fue colocado a 3 mm de un bloque conteniendo glutamato y se evaluó el cambio en la dirección de crecimiento de esta raíz. Los resultados demuestran que la raíz de chile habanero fue capaz de detectar la presencia del parche de glutamato, presentando un quimiotropismo positivo ante dicho estímulo. Este efecto se produce desde una dosis de 100  $\mu\text{M}$  de glutamato y es dependiente de calcio y de la presencia de la cofía. La glicina es también capaz de provocar un efecto similar al glutamato, pero esto no ocurre con GABA, el cual es un producto metabólico del glutamato. La respuesta radical a glutamato fue dependiente del tiempo, y en ella parece participar un receptor de glutamato.

---



---

## ABSTRACT

Plants, as sessile organisms, are totally dependent on their growth for environment and resource exploration. Tropisms allow the plants to have an efficient growth, improve resource uptake, and avoid obstacles while exploring their surroundings. The roots need these mechanisms to perform their functions, because these are responsible for water and nutrient capture. Through a chemotropic response, plants grow in favor or against compounds in the environment that may be beneficial or harmful to their development. As well as being a key in the fertilization processes, directing the pollen tube toward the ovule.

Glutamate is one of the most abundant amino acids, leading to up to 40% by weight of proteins in some organisms. It is also an important signal molecule in many organisms, from microorganisms, such as protozoa, and fungi, where it indicates the presence of nutrients up to higher organisms, such as mammals, where it is essential for the nervous system formation, as a neurotransmitter necessary for learning. In all cases, this amino acid is an active chemotropic substance. Until now, there are not reports that support the chemo attractant effect of this amino acid to plants. The objective of this project was to evaluate and characterize the chemotropic response of habanero pepper root to glutamate. To do this, we designed an *in vitro* model in segmented dishes, in which the primary root apex was placed 3 mm from a block containing glutamate, and evaluated the change in the direction of root growth. The results show that habanero pepper root was able to detect the presence of glutamate patch, showing a positive chemotropism to the stimulus. This effect occurs with a dose of 100  $\mu$ M glutamate and it is dependent of the presence of cap and calcium. Glycine is also capable of causing an effect similar to that of glutamate, this did not occur with GABA which is a metabolic product of glutamate. The root response to glutamate was time dependent, and it seems to involve a glutamate receptor.

---



---

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los nutrimentos en el suelo están distribuidos heterogéneamente o están sujetos a un agotamiento localizado. Dado que las plantas son organismos sésiles, ellas carecen de movilidad para migrar a áreas más ricas en nutrimentos; el despliegue espacial del sistema radical determina en gran medida la capacidad de una planta para explotar esos recursos. Los tropismos (hidrotropismo, gravitropismo, quimiotropismo, etc.) tienen un papel importante en la manera en la que las raíces exploran el entorno en busca de soporte y de recursos nutrimentales e hídricos, determinando la capacidad de la planta para encontrar y explotar esos recursos.

El desarrollo del sistema radical en las plantas se relaciona directamente con la concentración y distribución de los nutrimentos en el suelo (Zhang y Forde, 2000). De los macronutrimentos requeridos por las plantas, el nitrógeno es uno de los mayores factores limitantes para el crecimiento (Crawford y Glass, 1998). Este elemento se puede encontrar en el suelo de forma orgánica, como material proteico, aminoácidos libres y urea, o de forma inorgánica, como nitrato y amonio. La forma de responder de las plantas a cada una de estas fuentes varía ampliamente de una especie a otra (Miller *et al.*, 2007).

En diferentes organismos de distintos dominios, el glutamato ha sido señalado como una molécula responsable de generar una respuesta quimiotrópica, desde algunos más simples como *Paramecium tetraurelia* (Van Houten *et al.*, 2000) o *Achlya bisexualis* (Scherus *et al.*, 1989), hasta otros más complejos, en los que el glutamato juega un papel importante dentro del sistema nervioso central, actuando como quimioatrayente para las neuronas. En nuestro grupo tenemos antecedentes de que el glutamato puede tener un efecto quimiotrópico sobre las raíces de chile habanero, por mecanismos aún desconocidos.

El chile habanero (*Capsicum chinense* jacq.) ampliamente cultivado en Yucatán cuenta hoy en día con una amplia fama a nivel mundial, gracias a sus características organolépticas y su alto grado de pungencia. Todas estas características son atribuidas a las condiciones particulares de cultivo y clima de esta región, la cual presenta condiciones adversas para el desarrollo de los cultivos, como son: suelos con alta pedregosidad, poca profundidad y una baja concentración de nitrógeno, formado en su mayoría por suelos de

tipo litosol y rendzina (Ramírez *et al.*, 2005). No obstante, el chile habanero se desarrolla de manera favorable aunque con una producción baja, por lo que es imperante estudiar los mecanismos de captación de recursos para ofrecer alternativas de mejora que permitan el desarrollo de cultivares más productivos en pro de la economía de la región.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los mecanismos por los cuales las raíces de chile habanero responden a la presencia de secciones aisladas de glutamato. Esta respuesta no ha sido abordada con anterioridad en ninguna especie vegetal, por lo que la caracterización de ésta es una investigación de vanguardia que ayuda a comprender la manera en la que los organismos vegetales perciben el ambiente circundante.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Crawford N. y Glass A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 389-395.
- Miller A.J., Fan X., Shen Q., Smith S. (2007). Aminoacids and nitrate as signals of the regulation of nitrogen acquisition. *J. Exp. Bot.* 59: 111-119.
- Ramírez G., Góngora S., Pérez L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J., López H. (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial del chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP-SAGARPA, campo agrícola Exp, Mocochoá, Yucatán, México.
- Schreurs W.J.A., Harold R.L., Harold F.M. (1989). Chemotropism and branching as alternative responses of *Achlya bisexualis* to amino acids. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2519-2528.
- Van Houten J.L., Wan Qing Y. Bergeron A. (2000). Chemosensory signal transduction in *Paramecium*. *J. Nutr.* 130: 946-949.
- Zhang H. y Forde B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51: 51-59.



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

##### 1.1.1. *Capsicum chinense*. Origen y distribución

El género *Capsicum* se conoce desde principios de la civilización en el hemisferio occidental. Ha sido parte de la dieta humana desde 7500 A.C. Los antepasados nativos de América ya cultivaban chile desde 5200 a 3400 A.C. El género *Capsicum* fue domesticado en diferentes partes del sur y centro de América y las cinco especies domesticadas son: *C. annum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* Ruiz y Pavón (Bosland, 1996).

Se considera que *C. chinense* es una de las especies con más variedades domesticadas en América. Esta especie se encuentra estrechamente emparentada con *C. frutescens*, la cual presenta una distribución en América del Sur similar a la de *C. chinense*. El área donde se observa una mayor diversidad en esta especie de chile es la cuenca Amazónica (Cheng, 1989).

Dewitt y Bosland (1994) señalan que *C. chinense* tiene su centro de origen en el Amazonas. Éste se dispersó en tiempos precolombinos a diferentes islas de la Cuenca del Caribe y de éstas, a su vez a la Península de Yucatán, nombrándolo chile habanero en esta región.

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una especie cuyas propiedades de pungencia dependen de factores ambientales, tales como el tipo de suelo y las propiedades osmóticas y nutricionales del mismo. Se ha reportado que las condiciones adversas promueven la síntesis de los capsaicinoides, metabolitos responsables de la pungencia de los chiles (Tun, 2001).

## CAPÍTULO I

---

La clasificación taxonómica del chile habanero es la siguiente (USDA, 2010):

<b>Reino</b>	Plantae-Plantas
<b>Subreino</b>	Tracheobionta- plantas vasculares
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta-plantas con semillas
<b>División</b>	Magnoliophyta-plantas con flores
<b>Clase</b>	Magnolopsida-dicotiledóneas
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Superorden</b>	Sympetala
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	<i>Capsicum</i> L.
<b>Especie</b>	<i>C. chinense</i> Jacq.

### 1.1.2. Descripción botánica

El chile habanero es una planta de altura variable, aunque en los cultivares comerciales puede oscilar entre 75 y 120 cm (Tun, 2001).

Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas (2.5 a 3.5 mm), tienen testa de color café claro o café oscuro y su período de germinación varía entre ocho y quince días. El sabor picante se debe a la presencia de capsaicina, sustancia muy irritante en estado puro y cuya mayor concentración se encuentra en la placenta del fruto (Tun, 2001).

Su tallo es grueso, erecto, glabro y robusto y 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 semi-indeterminado. Después de la primera trifurcación muy raramente las tres ramas alcanzan el mismo desarrollo (Tun,

---

2001) quedando un tallo líder.

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. Con una nutrición adecuada se pueden alcanzar hojas con más de 15 cm de longitud (Tun, 2001).

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 por racimo (Tun, 2001).

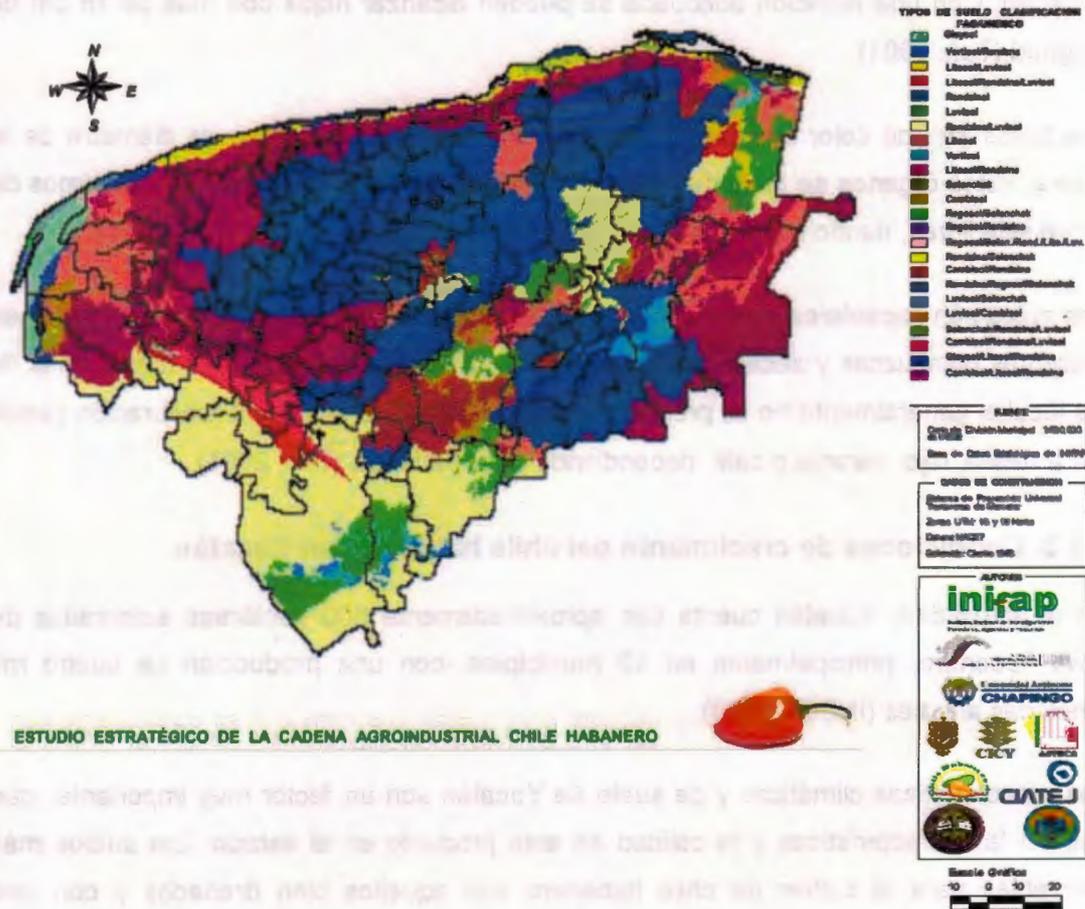
Los frutos son capsulares, huecos y tienen tres y cuatro lóbulos. Las semillas se alojan en placentas blancuzcas y secas, que no están envueltas por mucosa y las membranas de los lóculos generalmente no se prolongan hasta el centro. El color a la maduración puede ser amarillo, rojo, naranja o café, dependiendo de la variedad (Tun, 2001).

### **1.1.3. Condiciones de crecimiento del chile habanero en Yucatán**

En la actualidad, Yucatán cuenta con aproximadamente 500 hectáreas sembradas de chile habanero, principalmente en 13 municipios, con una producción de cuatro mil toneladas anuales (INEGI, 2008).

Las características climáticas y de suelo de Yucatán son un factor muy importante, que definen las características y la calidad de este producto en el estado. Los suelos más favorables para el cultivo de chile habanero son aquellos bien drenados y con una adecuada retención de humedad. En Yucatán, los suelos más apropiados para el desarrollo del picante, desde el punto de vista de productividad, son los luvisoles, conocidos regionalmente como K'an cab. Estos suelos son susceptibles de mecanización, presentan muy buen drenaje, de bajo a mediano contenido de materia orgánica y baja retención de humedad, entre otras características. Las asociaciones de luvisoles con rendzinas y cambisoles también se consideran como óptimos debido a su pedregosidad, ya que influye de manera determinante en la calidad del chile. El chile que se produce en suelos pedregosos tiene mayor período de vida de anaquel, así como una pungencia más elevada que aquel que se produce en suelos profundos (Ramírez *et al.*, 2005).

En la Figura 1.1 se ejemplifican los principales tipos de suelos que se encuentran en Yucatán. Las características generales de los suelos en los cuales se lleva a cabo el cultivo del chile habanero se describen en la Cuadro 1.1.



ESTUDIO ESTRATÉGICO DE LA CADENA AGROINDUSTRIAL CHILE HABANERO



**Figura 1.1.** Principales tipos de suelo en la península de Yucatán (modificada de Ramírez *et al.*, 2005).

**Cuadro 1.1.** Algunas características de los principales tipos de suelo en los que se cultiva chile habanero en Yucatán, México (modificado de Borges-Gómez *et al.*, 2008).

Clasificación FAO	pH	Nitrógeno inorgánico (mg kg <sup>-1</sup> )	Materia orgánica (%)
Cambisol crómico	7.32	36.4	5.1
Cambisol calcárico	7.01 a 7.19	31.8 a 59.1	4.2 a 10.5
Leptosol	7.24 a 7.25	36.4 a 51.5	10.1 a 16.1
Luvisol vértico	6.23 a 6.59	39.4 a 112.	2.3 a 13.8
Rendzina	6.74 a 7.53	28.8 a 97.0	5.6 a 12.8
Vertisol pélico	5.23	50	3.4

La temperatura y la precipitación son dos de los factores climáticos más determinantes en la producción de cualquier especie vegetal. La temperatura media anual adecuada para el cultivo de chile habanero es de 24 a 28 °C, ya que temperaturas menores de 15 °C y mayores de 35 °C limitan el desarrollo de la planta, así como su floración. El chile habanero puede cultivarse en regiones con una precipitación media de junio a octubre de 750 a 1000 mm y lluvias uniformemente distribuidas en todos los meses; precipitaciones menores de 30 mm mensuales afectan desfavorablemente los rendimientos, debido a que reducen la emisión foliar, el número de flores y el peso de los frutos. Las condiciones óptimas de precipitación (750 a 1000 mm) en el estado se presentan hacia el oriente de la entidad, mientras que las subóptimas (650 a 750 mm) en el sur y poniente del estado y las no aptas en el centro, norte y norponiente (menores de 650 mm). Por otra parte, del 80 a 85 % de la precipitación en el estado ocurre de junio a octubre, por lo que el cultivo de temporal se ve ampliamente favorecido (Ramírez *et al.*, 2005).

A pesar de que las condiciones de suelo de Yucatán, son ampliamente reconocidas como la causa de la calidad del chile de esta región y, uno de los principales argumentos para la reciente denominación de origen, en la actualidad son pocos los estudios sobre los requerimientos nutricionales. Aunque se han publicado paquetes tecnológicos donde se recomienda diversas combinaciones de fertilizantes inorgánicos, acompañados de

cerdazas (Soria *et al.*, 2002) o gallinazas (Tun, 2001), éstos son muy superficiales y no incluyen estudios profundos sobre el sistema radical del chile habanero en estas condiciones.

### **1.2. El nitrógeno en el suelo**

#### **1.2.1. Formas de nitrógeno en el suelo**

En el suelo, el nitrógeno (N) se encuentra en una combinación compleja de formas orgánicas e inorgánicas, la cual se encuentra en constante cambio por medio del ciclo del N. La mayor parte del N se encuentra en moléculas orgánicas complejas, el 40% de la materia orgánica en el suelo se encuentra en material proteico, 35% en compuestos heterocíclicos (ácidos nucleicos), 19% en forma de amonio y el resto en sales de amino azúcares y otros compuestos menos complejos (Schultten y Schnitzer, 1998). Los hongos y las bacterias convierten las moléculas orgánicas conteniendo N a sales de amonio, a través de la mineralización. Posteriormente, las sales de amonio son oxidadas a nitritos y estos a nitratos por oxidación; a esto se le conoce como proceso de nitrificación. La concentración de amonio y nitrato es variable según el tipo de suelo, ya que el proceso de nitrificación es regulado negativamente por diversos factores tales como: bajo pH, anaerobiosis o temperaturas extremas (Lewis, 1886).

#### **1.2.2. Presencia de aminoácidos en los suelos y su importancia en la nutrición**

El nitrógeno orgánico disuelto es, en la mayor parte de los casos, el componente más abundante del N en la mayoría de los suelos, del cual los aminoácidos constituyen del 10 al 20% (Jones y Kielland, 2002). La presencia de distintos aminoácidos, así como su concentración en el suelo, varía grandemente de un ecosistema a otro. De manera general, la poza de este nitrógeno orgánico es pequeña y muy dinámica, pues son tomados por los microorganismos y las plantas, por lo que generalmente se encuentran a concentraciones micromolares (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) (Raab *et al.*, 1996; 1999; Öhlund, 2004; Jones *et al.*, 2005). A pesar de ello, en algunos artículos se reporta que estas concentraciones pueden llegar al rango de los milimolares (Öhlund, 2004). Dentro de los aminoácidos libres más abundantes en el suelo se encuentran: el L-acido glutámico, la L-serina, la glicina, la L-alanina y el L-acido aspártico, los cuales provienen fundamentalmente de la

---

descomposición de los compuestos proteicos presentes en el suelo. Se reporta que las proteínas animales pueden contener del 11 al 20% por peso de ácido glutámico; así también, en las proteínas vegetales este contenido se puede elevar hasta el 40%. Se plantea que la vida media de los aminoácidos en forma libre en el suelo puede ser de 1.7 a 28.7 horas (Hadas *et al.*, 1992; Martens y Frankenberger, 1993; Kielland, 1995; Jones, 1999; Lipson *et al.*, 2001).

La importancia ecológica de la absorción de aminoácidos ha sido ampliamente discutida, muchas veces comparada en relación con la absorción de fuentes minerales de N. Se ha encontrado que, a comparación del amonio y del nitrato, la toma de aminoácidos es realmente baja; aun así, su importancia como nutrimento podría ser significativa (Svennerstam, 2008).

Todas las especies vegetales estudiadas hasta ahora, incluyendo las plantas micorrizadas y no micorrizadas, poseen la capacidad de absorber aminoácidos (Lipson y Näsholm, 2001). Trabajos anteriores (Hutchinson y Miller, 1911; Brigham, 1917; Virtanen y Linkola, 1946; Ghosh y Burnis, 1950; Wright, 1962) han propuesto que las plantas pueden absorber aminoácidos como fuente alterna de N. Se han realizado diversos estudios para dar base a esta propuesta, tanto en plantas acuáticas (Joy, 1969; Holst y Yopp, 1979; Borstlap *et al.*, 1986), como en plantas terrestres (Soldal y Nissen, 1978; Bright, 1983; Shobert y Komor, 1987; Jones y Darrah, 1994; Heremans *et al.*, 1997; Schmidt y Stewart, 1999; Persson y Näsholm, 2001; Persson *et al.*, 2003; 2006; Thornton, 2001; 2005; Jämtgård *et al.*, 2008). Todos estos estudios bajo distintos procesos y técnicas experimentales han demostrado que las plantas poseen un sistema eficiente para la absorción de aminoácidos a partir de las soluciones de prueba.

Las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos no permiten que exista un transporte pasivo eficiente. En 1993, Frommer *et al.*, clonaron e identificaron un transportador de aminoácidos en *A. thaliana*. Hoy en día se conocen múltiples transportadores de aminoácidos, los cuales pertenecen a por lo menos cinco familias distintas (Rentsch *et al.*, 2007).

### 1.3. El glutamato en las plantas.

#### 1.3.1 Metabolismo del glutamato en las plantas

El glutamato (Glu) ocupa una posición central en el metabolismo de los aminoácidos en las plantas. Este compuesto es sintetizado por la acción de la glutamato sintasa, usando glutamina y 2-oxoglutarato como sustratos (Figura 1.2). Por otra parte, el Glu es también sustrato para la síntesis de glutamina a partir de amonio, catalizada por la acción de la glutamina sintasa. El grupo  $\alpha$ -amino del Glu puede ser transferido a otros aminoácidos por la acción de un amplio rango de aminotransferasas multiespecíficas. Además, tanto el esqueleto carbonado como el grupo  $\alpha$ -amino del Glu forman las bases para la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, la arginina y la prolina. Finalmente, el Glu puede ser sintetizado o degradado en una reacción reversible catalizada por la Glu deshidrogenasa, proceso que se lleva a cabo en el cloroplasto y en la mitocondria (Forde y Lea, 2007).

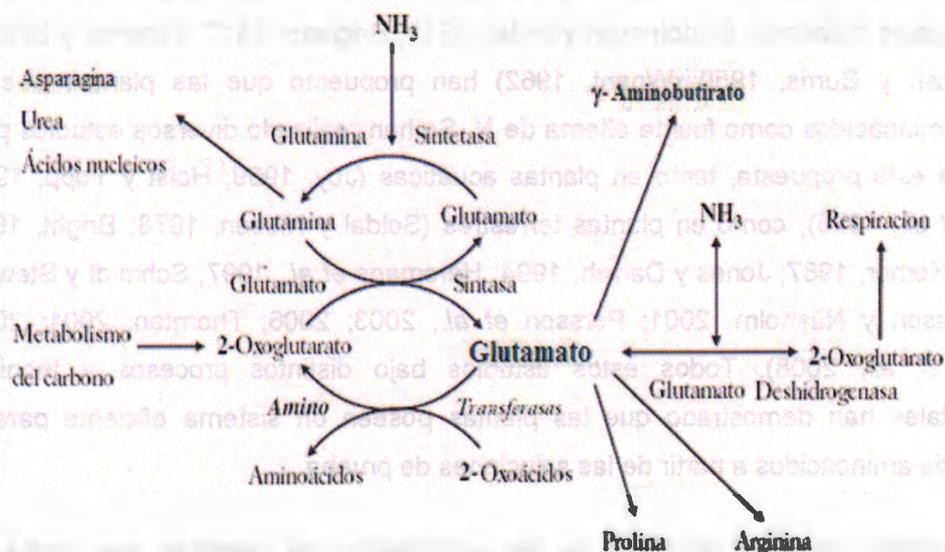


Figura 1.2 Metabolismo del Glu en las plantas (modificado de Forde y Lea, 2007).

#### 1.3.2 Concentración de glutamato en tejidos vegetales

La posibilidad de que la concentración celular de Glu dentro de la planta sea regulada homeostáticamente por la acción combinada de las vías descritas anteriormente, ha sido objeto de estudio (Forde y Lea, 2007). En hojas de tabaco se ha demostrado que la

concentración celular de Glu presenta muy pocos cambios a lo largo del día, fluctuando entre  $3 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF y  $4 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF, independientemente de las condiciones de cultivo (Geiger *et al.*, 1999). Durante la germinación, período que se caracteriza por una alta hidrólisis de las proteínas generando aminoácidos libres, la concentración de Glu aumenta aproximadamente 44 veces en comparación con otros aminoácidos, tales como asparagina, glutamina y arginina, donde el aumento es de 4487, 1587 y 542 veces, respectivamente (King y Gifford, 1997). En la mayoría de los casos la concentración de Glu en los tejidos parece permanecer constante, o con pocos cambios. El mayor aumento reportado en la concentración de este aminoácido fue durante la maduración del tomate, donde la concentración en los frutos verdes fue de  $40.07 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF, aumentando hasta  $282.1 \text{Imol g}^{-1}$  PF en frutos maduros (Roessner-Tunali, *et al.*, 2003). Los autores sugieren que este incremento se debe a que el Glu es un precursor de la clorofila y el cese de la producción de ésta por el proceso de maduración genera una acumulación de este aminoácido.

#### **1.4. El glutamato como molécula señal**

##### **1.4.1. El glutamato como molécula señal en animales**

En animales existen evidencias de las propiedades del Glu como molécula señal, particularmente en el sistema nervioso central de los mamíferos. Este evento se comenzó a considerar desde 1930, al encontrarse altas concentraciones de este aminoácido en el cerebro. Sin embargo, no fue hasta los 70's, con el descubrimiento de la actividad agonista del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), que se definió al Glu como un neurotransmisor del sistema nervioso central (Watkins y Jane, 2006).

Actualmente, se reconocen al menos cuatro tipos de receptores de Glu (GLR) en el sistema nervioso central de mamíferos, los cuales se dividen en dos grupos: los receptores ionotrópicos (iGLR, por sus siglas en ingles), al cual pertenecen los receptores sensibles a:  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), N-metil D-aspartato (NMDA) o kainato y los metabotrópicos (mGLR, por sus siglas en inglés) (Lerma, 1997). A continuación se describen ambos grupos:

**iGLR:** Estos receptores presentan en su estructura canales iónicos permeables a cationes, principalmente al sodio ( $\text{Na}^+$ ) y al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Los tres tipos de iGLR fueron

primero descritos por sus características farmacológicas y posteriormente por sus características moleculares (Meldrum, 2000). Estos receptores son complejos macromoleculares, formados por cuatro o cinco subunidades que pueden o no ser idénticas. Cada una contiene tres dominios transmembranales denominados M1, M3 y M4 y una porción reentrante en la membrana, el dominio M2, que confiere las distintas selectividades iónicas del canal (Figura 1.3) (Bigge, 1999).

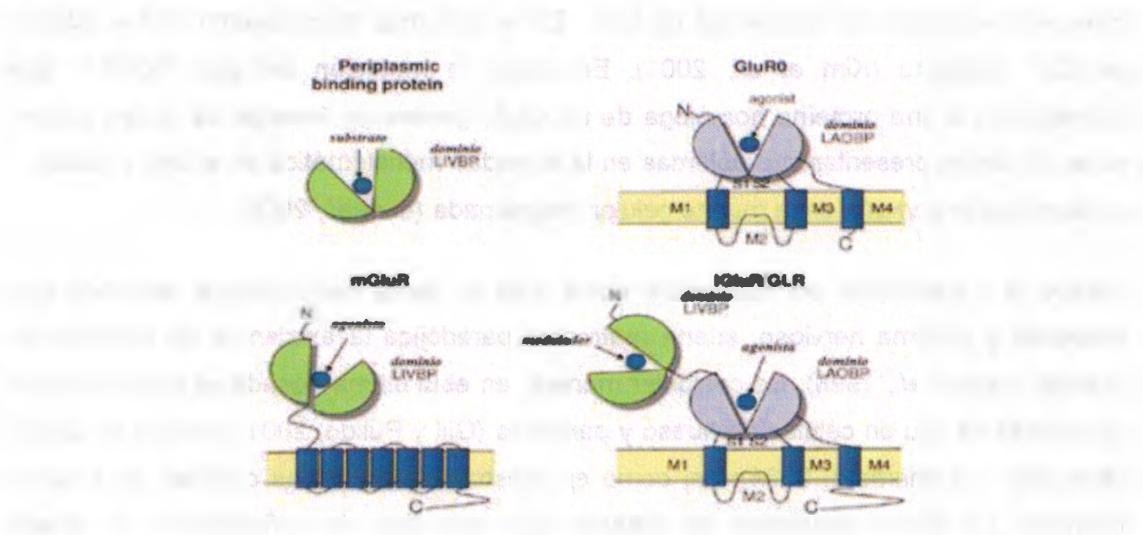
**mGLR:** En adición a la activación de los iGluR, el Glu también actúa sobre receptores acoplados a proteína G, modulando la producción de segundos mensajeros intracelulares. Se plantea que este tipo de receptores median los efectos “lentos” del Glu (Frerking y Nicoll, 2000). Los estudios han revelado que existen al menos ocho subtipos de mGLR y éstos a su vez han sido clasificados en tres grupos distintos, basados en su homología de secuencia, farmacología y acoplamiento a mecanismos de señalización intracelular. De esta manera, podemos decir que el primer grupo está integrado por los subtipos mGluR1 y mGluR5, los cuales activan a una fosfolipasa C. En cambio, los miembros del segundo (mGluR2 y mGluR3) y el tercer grupo (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa y en particular, el receptor mGluR6 está acoplado a la activación de GMPc fosfodiesterasa (Caramelo *et al.*, 1999).

Estos receptores encontrados en la membrana post-sináptica de mamíferos participan en la generación de cascadas de señalización. La activación de dichas cascadas de señalización generan algunos de los eventos de sinapsis, los cuales tienen un papel importante en la homeostasis y los procesos de aprendizaje (Albarracín y Lareo, 2007).

### **1.4.2. Receptores de glutamato y su función en las plantas**

Existe un interés creciente sobre el estudio de este tema en plantas. La existencia de canales iónicos activados por Glu y su posible relación con la familia de genes de los iGluRs en animales, ha sido reportada para plantas (Chiu *et al.*, 1999; 2002; Davenport, 2002; Lam *et al.*, 1998). La señalización por Glu es examinada desde una perspectiva evolutiva y la función que podrían tener en las plantas, tanto en la señalización endógena, como determinando la capacidad de la raíz para responder a fuentes de N orgánico en el suelo, también está siendo objeto de estudio (Öhlund, 2004; Chiu *et al.*, 2002; Walch-Liu *et al.*, 2006 a y b).

El descubrimiento de una familia de genes de receptores de Glu (*AtGLR*), homólogos a los iGluRs de mamíferos en *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1998) ha servido como base de múltiples investigaciones, resultando en descubrimientos interesantes. En estos estudios se destacan la homología entre los GLRs de plantas y los de animales. Esta homología se mantiene en todos los dominios importantes, tanto en las cuatro regiones transmembranales (M1-M4), como en las regiones S1 y S2 de asociación del agonista (Chiu *et al.*, 1999; 2002; Lam, 1998) (Figura 1.3). A pesar de todas estas similitudes, los *AtGLRs* son suficientemente diferentes en sus secuencias en comparación con los iGluRs. Por esa razón, se hace extremadamente difícil deducir tanto su actividad como canal, como sus propiedades de acoplamiento al agonista (Lacombe *et al.*, 2000).



**Figura 1.3.** Representación esquemática de las estructuras de los receptores de Glu de diferentes organismos. Dos tipos de dominio parecidos a trampas de Venus (VFT) se producen en los miembros de la familia iGluRs/GLR, el dominio de unión al agonista LAOBP (formado por las regiones S1 y S2) y el dominio LIVBP (proteína de anclaje para leucina/isoleucina/ valina) en la ampliación de la región N-terminal, que puede actuar como un dominio modulador alostérico. El receptor de Glu bacteriano (*GluR0*) carece de la región C-terminal. M1-M4 se refieren a los dominios transmembranales de la familia *GluR0*/iGluR/GLR. *mGluR* son los receptores del tipo metabotrópico de mamíferos que no poseen el canal iónico (modificado de Forde y Lea, 2007).

En otros estudios se ha probado la funcionalidad de estos receptores. Se ha demostrado que la aplicación de Glu a plantas de *Arabidopsis thaliana* dispara la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al citoplasma en la células de la raíz (Dennison y Spalding, 2000). Plantas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *AtGLR1.1* en antisentido presentan un fenotipo hipersensible al ABA exógeno, así como un aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis y señalización de ABA (Kang *et al.*, 2004). La aplicación de beta-metilamino-l-alanina (BMAA), un agonista de los receptores de Glu, genera una elongación del hipocotilo de *Arabidopsis*, así como una reducción del ángulo de apertura de estos (Brenner *et al.*, 2000). La sobreexpresión del gen *AtGluR2* causó una reducción en la eficiencia de la utilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas plantas transgénicas, las cuales mostraron síntomas de deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos síntomas disminuyeron con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno (Kim *et al.*, 2001). En arroz, la mutación del gen *GLR3.1*, que corresponde a una proteína homóloga de un GLR, genera un fenotipo de raíces cortas; estas mutantes presentaron problemas en la actividad meristemática en el ápice radical y un aumento importante en la muerte celular programada (Li *et al.*, 2006).

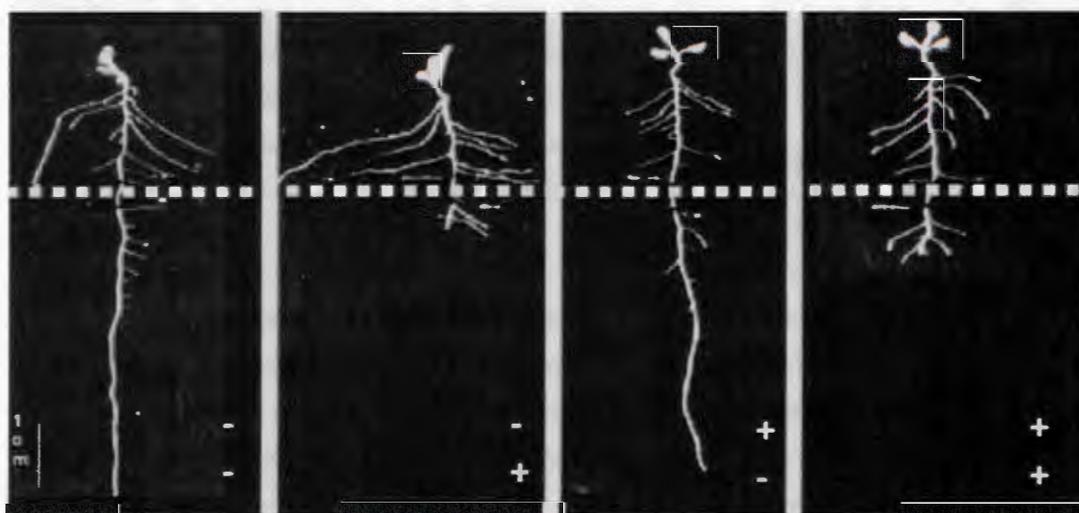
Siendo la señalización por Glu hasta estos días un tema estrictamente asociado con neuronas y sistema nervioso, suena realmente paradójica la existencia de esta vía en plantas (Lam *et al.*, 1998). De cualquier manera, en esta última década se han reportado receptores de Glu en células de hueso y páncreas (Gill y Pulido, 2001; Hinoi *et al.*, 2001; Moriyama y Yamamoto, 2004); así como en mesozoos, los cuales carecen de sistema nervioso. De estos resultados se deduce que este tipo de señalización no queda restringido a los organismos que presentan un sistema nervioso.

Los transportadores de aminoácidos también han sido sugeridos como candidatos para percibir al Glu, debido a su posición en la membrana. *Arabidopsis* cuenta por lo menos con 50 transportadores de aminoácidos de varios tipos, de los cuales algunos no se han caracterizado aún (Liu y Bush, 2006). A pesar de esto, los datos reportados hasta ahora mantienen a los GLR como los candidatos más fuertes para el papel de receptores de Glu.

### 1.4.3. Posible papel de la señalización por glutamato en las plantas

Los estudios sobre los patrones de expresión de los genes de la familia de *AtGluRs* han demostrado que están distribuidos a través de toda la planta y todos son expresados en la raíz (Chiu *et al.*, 2002). Además, cuatro de ellos se expresan exclusivamente en este órgano, en plántulas de *Arabidopsis* de ocho semanas de edad (Chiu *et al.*, 2002).

Un efecto inusual del Glu externo ha sido observado en el crecimiento y ramificación de raíces de *Arabidopsis* (Walch-Liu *et al.*, 2006b). Cuando las raíces de esta planta son expuestas a concentraciones bajas de Glu, hay una marcada inhibición del crecimiento de la raíz primaria y una proliferación de raíces laterales cerca del ápice de la raíz primaria (Figura 1.4). Este efecto fue específico, no siendo provocado por ningún otro aminoácido, incluso ni por el D-Glu.



**Figura 1.4** Arquitectura de las raíces de *Arabidopsis thaliana* sometidas a distintos tratamientos con *L-Glu*. La línea punteada representa la división entre los segmentos superior e inferior, los cuales están sometidos a tratamientos distintos. El signo + indica la presencia de *L-Glu* (50  $\mu\text{M}$ ) y el signo - la ausencia de éste, en el segmento correspondiente (Walch-Liu *et al.*, 2006a).

Las raíces laterales son también sensibles a Glu, pero solo una vez que han alcanzado de 5 a 10 mm de longitud, lo que indica una respuesta retardada, dependiente del grado de desarrollo de las raíces. Respuestas similares a Glu se han reportado en otras especies,

incluyendo *Thlaspi caerulescens*, *Thellungiella halophila* (Walch-Liu *et al.*, 2006 a y b) y tomate (Liu y Bush, 2006). El Glu también podría estar involucrado en la reorientación de la asignación de recursos para el desarrollo vegetativo, así como en la biosíntesis del almidón y la lignina (Dubos *et al.*, 2003).

### 1.5. Tropismos

#### 1.5.1 Tipos de tropismos

Los tropismos son respuestas diferenciales en el crecimiento, que reorientan los órganos de la planta en respuesta a la dirección del estímulo (Esmon *et al.*, 2005).

En 1881, Charles Darwin publicó un trabajo pionero sobre este tema, en el cual demostraba que los extremos de las plantas crecen en dirección a la luz. Este fenómeno se conoce como fototropismo. Darwin también observó que ciertas plantas en condiciones de sombra giraban alejándose de la luz directa, a modo de fototropismo negativo. Este giro se debe a la acción de la hormona vegetal llamada auxina, la cual provoca elongación selectiva, en el lado de la planta orientado hacia la luz. Gracias al fototropismo, determinadas plantas evitan la sombra de otras. El fototropismo, inducido por la luz del sol, se llama heliotropismo (Darwin, 1981).

En el crecimiento de las plantas también se han observado otras respuestas de este tipo. Cuando una semilla germina, la radícula crece hacia abajo, independientemente del sentido en que haya sido plantada. A este crecimiento orientado se le llama geotropismo o gravitropismo, que permite a la planta afianzarse en el suelo. Cuando la parte aérea crece hacia arriba, es decir alejándose de la tierra, el fenómeno se conoce como geotropismo negativo (Hart, 1992). El gravitropismo es el único que está sujeto a una estimulación constante, tanto en intensidad como en tiempo, por lo que su interacción con otros tropismos rige la dirección real del crecimiento. Un ejemplo de ello es la relación gravitropismo-hidrotropismo, donde la dinámica de los amiloplastos en las células de la columela y la relación en los cambios de la concentración de auxina definen la predominancia de una u otra respuesta (Miyazawa y Takahashi, 2007).

Las plantas en el suelo crecen generalmente a favor del quimiotropismo hasta el punto en el que se encuentran con un obstáculo o sección más dura de suelo; en ese caso tienen

---

que atravesar o rodear ese obstáculo. Al encontrar obstáculos que no pueden atravesar, las raíces de las plantas crecen en paralelo únicamente con el ápice en contacto con este obstáculo (Massa y Gilroy, 2003); este comportamiento es conocido como tigmotropismo.

### 1.5.2. Quimiotropismo

El quimiotropismo es un crecimiento direccional el cual es provocado por un estímulo de naturaleza química. Éste puede ser de una manera positiva hacia una molécula benéfica, o negativa cuando el crecimiento es direccionalmente opuesto al estímulo (Hart, 1992).

La respuesta a sustancias en el ambiente externo es más común y por amplio más estudiada, particularmente en organismos unicelulares y gametos. En organismos multicelulares hay generalmente una mayor homeostasis y amortiguamiento del ambiente externo, por lo que la respuesta a químicos externos está restringida solo a algunas situaciones especiales (Hart, 1992).

Se han realizado estudios sobre la importancia del quimiotropismo en múltiples organismos, desde hongos microscópicos hasta animales. Aunque el tema del quimiotropismo ha sido poco estudiado, en los últimos años ha habido un creciente interés debido a su importancia durante las interacciones, tanto dentro de un mismo organismo (autotropismo), como con otros (heterotropismo), así como con el ambiente (Hart, 1992).

En el caso de plantas, aunque la existencia del quimiotropismo es ampliamente aceptada, existen muy pocos reportes de este fenómeno en la literatura científica. En raíces de *Zea mays* existen reportes de quimiotropismo, tanto positivo como negativo, hacia nitrato de cadmio. Este quimiotropismo dependió de la concentración de dicho compuesto: a 100  $\mu\text{M}$  las raíces presentaron quimiotropismo positivo y a 1 mM presentaron quimiotropismo negativo (Filippenko, 2001). En raíces de *Lupinus albus* se reportó un quimiotropismo positivo hacia parches de agar que contenían monofosfato disódico (Newcombe y Rhodes, 1904). También, existen reportes de respuesta quimiotrópica en otros tejidos de la planta, como es el caso del tubo polínico que presenta quimiotropismo positivo hacia exudados del óvulo (Tsong-Hsun, 1949) y en el caso de *Lilium longiflorum* hacia quimocianina, una proteína de 9.9 KDa presente en estos exudados (Kim *et al.*, 2003).

### 1.5.3. Efecto quimiotrópico del glutamato

En varias ocasiones y en una amplia gama de organismos, el Glu ha sido señalado como una molécula responsable de generar una respuesta quimiotrópica. En *Achlya bisexualis*, el Glu, junto con la arginina, han sido reportados como quimioatrayentes débiles, cuyo efecto principal reportado ha sido la ramificación de las hifas (Schreurs *et al.*, 1989). En *Paramecium tetraurelia*, el Glu fue importante en la dirección del movimiento del ciliado a través del medio, siendo para este organismo un atrayente que probablemente indique la presencia de bacterias de las cuales se alimenta (Van Houten *et al.*, 2000). Se han hecho estudios del efecto del Glu en la dirección de crecimiento del tubo polínico de *Hippeastrum*, obteniéndose resultados negativos (Tsong-Hsun, 1949). El Glu, junto con el aspartato y la glicina presentes en los exudados de las raíces de leguminosa, han sido señalados como unos de los principales componentes con capacidad quimioatrayente para distintas especies de *Rhizobium* (Bergman *et al.*, 1988; Gaworzewska y Carlile, 1982) y en *Bradyrhizobium japonicum* se ha reportado la mayor respuesta quimiotrópica del Glu (Barbour *et al.*, 1991).

Sin embargo, los estudios más profundos sobre el Glu como quimioatrayente, se han realizado en células neuronales, donde los conos de crecimiento de las células neuronales de *Xenopus* presentaron respuestas quimiotrópicas a un gradiente de Glu, bajo un rango limitado de concentraciones. Esta respuesta estuvo mediada por un receptor de Glu del tipo NMDA, el cual generó un gradiente diferencial de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula neuronal al percibir el Glu, lo que desencadenó una cascada de señalización, siendo el efecto final el crecimiento asimétrico de las filopodias (Zeng *et al.*, 1986).

### 1.5.4. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en las respuestas trópicas

El  $\text{Ca}^{2+}$  en las plantas es usado para la síntesis de la pared celular, la formación del huso durante la división celular entre otros. Es requerido para el funcionamiento de las membranas de las plantas además de ser un segundo mensajero universal de la respuesta de las plantas y otros organismos a las señales ambientales (Sanders *et al.*, 1999).

Las propiedades del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero lo colocan como una molécula importante en la respuesta quimiotrópica, la adición de EGTA, un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibe

la respuesta gravitrópica (Perdue *et al.*, 1988). También, la relación del  $\text{Ca}^{2+}$  con el transporte de auxina lo coloca como un candidato importante como segundo mensajero para esta respuesta (Ranjeva *et al.*, 1999). El  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario durante el crecimiento del tubo polínico, para el correcto crecimiento en dirección hacia el óvulo; la localización asimétrica de gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones en la punta del tubo polínico dirigen el crecimiento de éste. Aunque se ha señalado al  $\text{Ca}^{2+}$  como una molécula quimioatrayente, las evidencias lo colocan más como una molécula señal en respuesta a los exudados del óvulo (Higashiyama y Hamamura, 2008). En animales el  $\text{Ca}^{2+}$  también juega un papel importante en los tropismos; en células neuronales el  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como mensajero secundario, generando un gradiente asimétrico en la célula que dirige la dirección de crecimiento de las filopodias (Zeng *et al.*, 1986).

## **HIPÓTESIS**

Si en las raíces de las plantas se expresan los receptores ionotrópicos de Glu y éstos juegan un papel importante en la respuesta quimiotrópica en otros organismos, entonces es probable que estos receptores participen en dicha respuesta en las raíces de chile habanero.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar la respuesta quimiotrópica de la raíz de chile habanero al Glu en condiciones *in vitro*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Estudiar la especificidad y la sensibilidad de las raíces de plántulas de chile habanero a la respuesta quimiotrópica a Glu.

Evaluar la morfología de las raíces de plántulas de chile habanero expuestas a parches de Glu.

Estudiar el papel de un receptor de Glu y del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta quimiotrópica en el sistema propuesto.

## JUSTIFICACIÓN.

La presencia de parches en el suelo con alto contenido de Glu podría indicar la presencia de una zona rica en nutrientes, producto de la descomposición de materia orgánica. La capacidad de reconocer estas señales y emitir una respuesta que permita la captación de esos recursos es una ventaja evolutiva, que puede permitirle al chile habanero desarrollarse en suelos con condiciones poco favorables.

Para el estudio de los mecanismos de búsqueda y captación de nutrientes es importante conocer los mecanismos a través de los cuales este tipo de respuestas se llevan a cabo. Siendo el quimiotropismo hacia Glu en plantas un comportamiento nunca antes reportado, representa un descubrimiento de gran interés y el estudio de los mecanismos por los cuales éste se lleva a cabo puede sentar las bases para el desarrollo futuro de nuevos cultivares altamente eficientes para la captación de recursos, impactando positivamente tanto en el uso del suelo como en la utilización racional de fertilizantes.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 1.5 se presenta un resumen de la estrategia experimental que se propuso para llevar a cabo este trabajo.

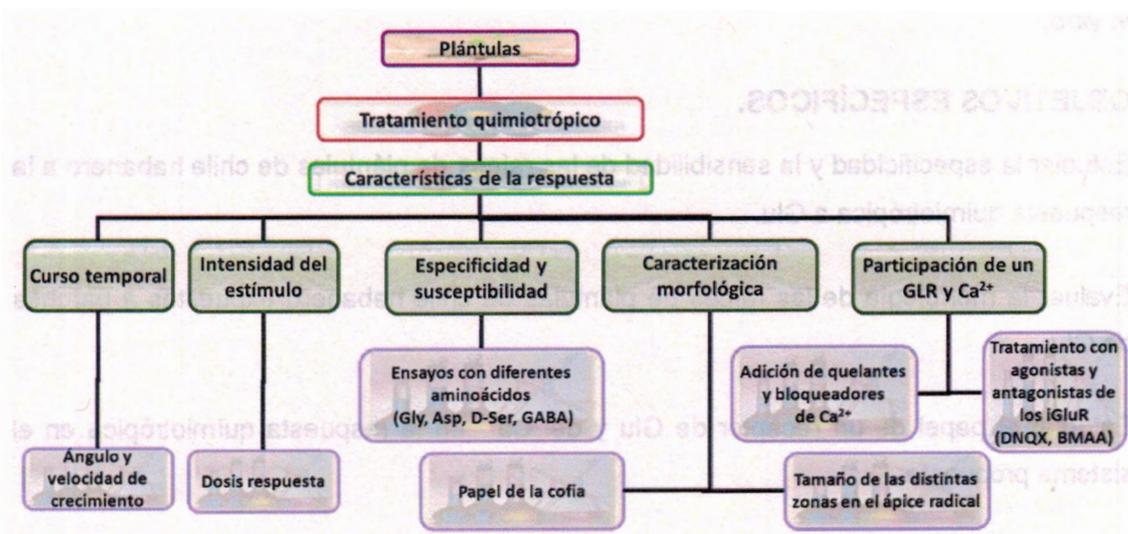


Figura 1.5 Resumen de la estrategia experimental que se usó en el trabajo

**BIBLIOGRAFÍA**

- Albarracin S.L., Lareo L.R. (2007). Modelo integrador para las rutas de señalización diferencial del receptor inotrópico de glutamato activado por N-Metil-D-aspartato. *Ciencia Salud. Bogotá (Colombia)*. 5: 92-105.
- Barbour W.M., Hattermann D.R., Stacey G. (1991). Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microb.* 57: 2635-2639.
- Bergman K.M., Gulash-Hoffee R. E., Hovestadt R.C., Larosiliere R.G., Ronco I.I., Su L. (1988). Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.* 170: 3249-3254.
- Bigge C. (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 441-447.
- Borstlap A.C., Meenks J.L.D., van Eck W.F., Bicker J.T.E. (1986). Kinetics and specificity of amino acid uptake by the duckweed *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. *J. Exp. Bot.* 37: 1020-1035.
- Borges-Gómez L., Soria-Fregoso M., Casanova-Villarreal V., Villanueva-Cohuo E., Pereyda-Pérez G. (2008). Correlación y calibración del análisis de fósforo en suelos de Yucatán, México, para el cultivo de chile habanero. *Agrociencia*. 42:21-27.
- Bosland, P.W. (1996). Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. En: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. Arlington, VA. ASHS Press. 479-487.
- Brenner E.D., Martinez-Barboza N., Clark, A.P., Liang Q., Coruzzi G.M. (2000). *Arabidopsis* mutants resistant to BMAA, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol.* 24: 65-624.
- Brigham R.O. (1917). Assimilation of organic nitrogen by *Zea mays* and the influence of *Bacillus subtilis* on such assimilation. *Soil Sci.* 3: 155-195.
- Bright S.W.J., Kueh J.S.H., Rognes S.E. (1983). Lysine transport in two barley mutants with altered uptake of basic amino acids in the root. *Plant Physiol.* 72: 821-824.
- Caramelo O., Santos P., Carvalho A., Duarte C. (1999). Metabotropic glutamate receptors modulate [<sup>3</sup>H] acetylcholine release from cultured amacrine-like neurons. *J. NeuroSci. Res.* 58: 505-514.

- Cheng S. (1989). The use of *Capsicum chinense* as sweet pepper cultivars and source for gene transfer. En: Tomato and Pepper production in the tropics. Int Synp. AVRDC. Taiwan. 55-62.
- Chiu J., DeSalle R., Lam H.M., Meisel L., Coruzzi G. (1999). Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Mol. Biol. Evo.* 16: 826-838.
- Chiu J.C., Brenner E.D., DeSalle R., Nitabach M.N., Holmes T.C., Coruzzi G.M. (2002). Phylogenetic and expression analysis of the glutamate receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evo.* 19:1066-1082.
- Crawford N., Glass A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *TRENDS PLANT SCI.* 3: 389-395.
- Darwin, C. (1881). *The power of movement in plants*. New York: Appleton.
- Davenport R. (2002). Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany* 90: 549-557.
- Dennison K.L., Spalding E.P. (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1511-1514.
- Dewitt D., Bosland P. (1994). *The pepper garden*. Berkeley, California, USA. Ten Speed Press. 59-71.
- Doi Y. (1951). Studies on the effect of ammonium salts on rice roots. : (2) Chemotropism of roots. *Japanese J. of Crop Sci.* 19: 247-250.
- Dubos C., Huggins D., Grant G.H., Knight M.R., Campbell M.M. (2003). A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *The Plant J.* 35: 800-810.
- Esmon C.A., Pedmale U.V., Liscum E. (2005). Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 665-674.
- Filippenko, V.N. (2001). Evidence for the active and passive chemotropisms in roots. *Russian J. of Plant Physiol.* 48: 431-437.
- Forde B.G., Lea P.J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J. Exp Bot.* 58: 2339-2358.
- Frerking M., Nicoll R., (2000). Synaptic kainate receptor. *Current Opinion in Neurobiol.* 10:

---

342-351.

- Frommer W.B., Hummel S., Riesmeier J.W. (1993). Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. PNAS 90: 5944-5948.
- Gaworzewska E.T., Carlile M.J. (1982). Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J. Gen. Microbiol. 128:1179-1188.
- Geiger M., Haake V., Ludewig F., Sonnewald U., Stitt M. (1999). The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. Plant Cell Env. 22:1177-1199.
- Ghosh B.P., Burris R.H. (1950). Utilization of nitrogenous compounds by plants. Soil Sci. 70: 187-203.
- Gill S.S., Pulido O.M. (2001). Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. Toxicol. Pathol. 29: 208-223.
- Hadas A., Sofer M., Molina J.A., Barak E., Clapp C.E. (1992). Assimilation of nitrogen by soil microbial population: NH<sub>4</sub> versus organic N. Soil. Biol. Biochem. 24:137-143.
- Hart J.W. (1992). Plant tropisms and other growth movements. Published by Chapman & Hall, London, New York, 160-175.
- Heremans B., Borstlap A.C., Jacobs M. (1997). The *rt11* and *raec1* mutants of *Arabidopsis thaliana* lack the activity of a basic-amino-acid transporter. Planta 201: 219-226.
- Higashiyama T., Hamamura Y. (2008). Gametophytic pollen tube guidance. Sex. Plant Reprod. 21: 17-26.
- Hinoi E., Takarada T., Ueshima T., Tsuchihashi Y., Yoneda Y. (2004). Glutamate signaling in peripheral tissues. European J. Biochem. 271: 1-13.
- Holst R.W., Yopp J.H. (1979). Comparative utilization of inorganic and organic compounds as sole nitrogen sources by the submergent duckweed *Lemna trisulca* L. Biol.

Plant. 21: 245-252.

Hutchinson H.B., Miller N.H.J. (1911). The direct assimilation of inorganic and organic forms of nitrogen by higher plants. *Centbl Bakt II* 30: 513-547.

INEGI(1998) <http://www.inegi.org.mx/>

Jämtgård S., Näsholm T., Huss-Danell K. (2008). Uptake of organic nitrogen by barley. *Plant Soil* 302: 221-231.

Jones D.L., Darrah P.R. (1994). Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. *Plant. Soil* 163: 1-12.

Jones D.L. (1999) Amino acid biodegradation and its potential effects on organic N capture by plants. *Soil Biol. Biochem.* 31: 613-622.

Jones D.L., Kielland K. (2002). Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 34: 209-219.

Jones D.L., Shannon D., Junvee-Fortune T., Farrar J.F. (2005). Plant capture of free amino acids is maximized under high soil amino acid concentrations. *Soil Biol. & Biochem.* 37: 179-181.

Joy K.W. (1969). Nitrogen metabolism of *Lemna minor*. I. Growth, nitrogen sources and amino acid inhibition. *Plant Physiol.* 44: 845-848.

Kang J., Mentha S., Turano F.J., (2004) The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol.* 45(10): 1380-1389.

Kielland K. (1995). Landscape patterns of free amino acids in arctic tundra soils. *Biogeochemistry.* 31: 85-98.

Kim S.A., Kwak J.M., Jae S.K., Wang M.H., Nam H.G. (2001) Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant Cell Physiol.* 42: 74-8

Kim S., Mollet J.C., Dong J., Zhang K., Park S.Y., Lord E.M. (2003). Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *PNAS* 100 N° 26:16125-16130.

- King J.E., Gifford D.J. (1997). Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. *Plant Physiol.* 113: 1125-1135.
- Lacombe B., Becker D., Hedrich R., DeSalle R., Hollmann M., Kwak J.M., Schroeder J.I., Novère N.L., Nam G.H., Spalding E.P., Tester M., Turano F.J., Chiu J., Coruzzi G. (2000). The identity of plant glutamate receptors. *SCI.* 292: 1486-1487.
- Lam H.M., Chiu J., Hsieh M.H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., Coruzzi G. (1998). Glutamate receptor genes in plants. *Nature.* 396: 125-126.
- Lerma J. (1997) Receptores postsinápticos de neurotransmisores. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp).* 91: 271-277.
- Lewis, O.A.M. (1986). *Plants and nitrogen.* Edward Arnold Publishers Ltd., London.
- Lin Y. 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.
- Li J., Zhu S., Song X., Shen Y., Chen H., Yu J., Yi K., Liu Y., Karplus V.J., Wu P., Deng X.W. (2006). A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell.* 18:340-349.
- Lipson D.A., Raab T.K., Schmidt S.K., Monson R.K. (2001). An empirical model of amino acid transformations in an alpine soil. *Soil Biol. Biochem.* 33:189-198.
- Lipson D.A., Näsholm T. (2001). The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia.* 128: 305-316.
- Liu X., Bush D.R. (2006). Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino Acids* 30: 113-120.
- Martens D.A., Frankenberger W.T.Jr. (1993). Stability of microbial produced auxins derived from L-tryptophan added to soil. *Soil Sci.* 155:263-271.
- Massa G.D., Gilroy S. (2003). Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 33: 435-445
- Meldrum B. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007-10152.

- Miller A.J., Fan X., Shen Q. and Smith S. (2007) Aminoacids and nitrate as signals of the regulation of nitrogen acquisition. *J. Exp. Bot.* 59: 111-119.
- Miyazawa H., Takahashi H. (2007). How do Arabidopsis Roots Differentiate Hydrotropism from Gravitropism? *Plant Signaling & Behavior* 2:388-389.
- Moriyama Y., Yamamoto A. (2004). Glutamatergic chemical transmission: look! here, there, and anywhere. *J. of Biochem.* 135: 155-163.
- Newcombe F.C., Rhodes. A.L. (1904). Chemotropism of roots. *Bot. Gazette.* 23-35
- Öhlund J. (2004). Organic and inorganic nitrogen sources for conifer seedlings. Doctoral diss. Dept. of Forest Genetics and Plant Physiol., SLU. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Silvestra.* 312.
- Perdue D.O., Lafavre, A.K., Leopold A.C. (1988) Calcium in the regulation of gravitropism by light. *Plant Physiol.* 86:1276-128
- Persson J., Näsholm T. (2001). Amino acid uptake: a wide spread ability among boreal forest plants. *Ecol. Lett.* 4: 434-438.
- Persson J., Högberg P., Ekblad A., Högberg M., Nordgren A., Näsholm T. (2003). Nitrogen acquisition from inorganic and organic sources by boreal forest plants in the field. *Oecologia.* 137: 252-257.
- Persson J., Gardeström P., Näsholm T. (2006). Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. *J. of Exp. Bot.* 57: 2651-2659.
- Raab T.K., Lipson D.A., Monson R.K. (1996). Non-mycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia.* 108: 488-494.
- Raab T.K., Lipson. D.A., and Monson R.K. (1999). soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: *Plant Soil Proces. Ecol.* 80: 2408-2419.
- Ramírez G., Góngora S., Pérez L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J., y López H., (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial del chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP-SAGARPA, campo agrícola

---

Experimental, Mocochoá, Yucatán, México.

- Ranjeva R., Graziana A., Mazars C. (1999). Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view. *The FASEB j.* (113):S135-41.
- Rentsch D., Schmidt S., Tegeder M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* 581: 2281-2289.
- Roessner-Tunali U., Hegemann B., Lytovchenko A., Carrari F., Bruedigam C., Granot D., Fernie A.R. (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* 133: 84-99.
- Sanders D., Brownlee, C., Harper J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706
- Schulten H.R. Schnitzer M. (1998). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol Fert. Soils.* 26: 1-15
- Schmidt S.K., Stewart G.R. 1999. Glycine metabolism by plant roots and its occurrence in Australian plant communities. *Australian J. Plant Physiol.* 26: 253-264.
- Schreurs W.J.A., Harold R.L. Harold F.M. (1989). Chemotropism and branching as alternative responses of *Achlya bisexualis* to amino acids. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2519-2528.
- Shobert C., Komor E. (1987). Amino-acid-uptake by *Ricinus communis* roots characterization and physiological significance. *Plant, Cell & Environ.* 10: 493-500.
- Soldal T., Nissen P. (1978). Multiphasic uptake of amino acids by barley roots. *Physiol. Planta.* 43: 181-188.
- Soria, F.M., Tun S.J., Trejo R.A., Terán S.R. (2002). Paquete tecnologico para la produccion de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) SEP. DGTA. ITA-2 Conkal, Yuc. México. 75.
- Svennerstam H. (2008) Amino Acid Uptake in *Arabidopsis*. Doctoral Thesis No. 2008:50 Faculty of Forest SCI.
- Thornton B. (2001). Uptake of glycine by non-mycorrhizal *Lolium perenne*. *J. of Exp. Bot.* 52: 1315-1322.

- Thornton B., Robinson D. (2005). Uptake and assimilation of nitrogen from solutions containing multiple N sources. *Plant, Cell & Environ.* 28: 813-821.
- Tsung-Hsun T. (1949) A study of chemotropism of pollen tubes *in vitro*. *Plant Physiol.* 24: 494-504.
- Tun J.C. (2001) Chile habanero, Característica y tecnología de producción. Inifap. Yucatán México.
- USDA (1998). National Nutrient Database for Standard Reference <http://www.nal.usda.gov/>
- USDA (2010). United States Department of Agriculture <http://www.nal.usda.gov/>
- Van Houten J. L., Wan Q. Y. Bergeron A. (2000). Chemosensory Signal Transduction in *Paramecium*. *J. Nutr.* 130: 946–949.
- Virtanen A.I., Linkola H. (1946). Organic nitrogen compounds as nitrogen nutrition for higher plants. *Nature.* 158: 515.
- Walch-Liu P., Ivanov I., Filleur S., Gan Y., Remans T., Forde B.G. (2006a). Nitrogen regulation of root branching. *Annals Bot.* 97: 875-881.
- Walch-Liu P., Liu L.H., Remans T., Tester M., Forde B.G. (2006b). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1045-1057.
- Watkins J.C., Jane D.E.. (2006). The glutamate story. *British J. Pharma.* 147: 100-108.
- Wright D.E.. (1962). Amino acid uptake by plant roots. *Archiv. Biochem. Biophysic.* 97: 174-180.
- Zhang H., Forde B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51: 51-59.
- Zeng J.Q., Wan J., Poo M. (1996). Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient *J. Neurosci.*, 76:1140- 1149.

## CAPÍTULO II

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 2.1. INTRODUCCIÓN.

A ciento treinta años de que Darwin hiciera el primer reporte de la forma en que las plantas perciben e interactúan con el mundo por medio de los tropismos, poco es conocido acerca de los mecanismos por los cuales estos se llevan a cabo. Debido al estilo de vida sésil, las plantas dependen del crecimiento para poder explorar su entorno y encontrar los recursos necesarios para su desarrollo. ¿Cómo las plantas perciben los obstáculos, las regiones ricas en nutrimentos, los depósitos de humedad? Todas estas interacciones necesarias para el desarrollo de las plantas son en gran medida, por medio de los tropismos. La luz, la gravedad, el agua, los obstáculos y los compuestos presentes en el medio son fuerzas que ejercen presión sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Los tropismos son una manera de sentir y reaccionar ante el mundo que rodea a estos organismos.

Aunque el quimiotropismo es ampliamente aceptado como un mecanismo presente en las plantas, existen muy pocos estudios acerca de este fenómeno y los mecanismos por los cuales se lleva a cabo son apenas conocidos. Hoy en día solo existen unos cuantos reportes de los compuestos que provocan una respuesta quimiotrópica en las plantas. Estos reportes se describen a continuación: crecimiento del tubo polínico hacia quimocianina (proteína básica secretada por el óvulo) (Kim *et al.*, 2003) y hacia D-serina (Michard *et al.*, 2011); crecimiento de las raíces hacia fosfato de sodio (Newcombe y Rhodes, 1904) y sales de amonio y nitrato (Doi, 1951; Filippenko, 2001). La mayoría de estos estudios son someros y no indagan sobre los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta respuesta.

Por otra parte, el Glu es uno de los aminoácidos más abundantes en la naturaleza; en animales puede llegar a formar el 20% del peso total de las proteínas y en las plantas este porcentaje puede llegar al 40% (USDA). Este compuesto se ha reportado como una molécula quimioatrayente en diversos organismos, desde algunos más simples como el paramecio (Van Houten *et al.*, 2000), hasta otros más complejos como los mamíferos, particularmente para las células neuronales de los mismos (Zeng *et al.*, 1996).

Se propone que el Glu en los suelos, puede ser un indicador de la presencia de materia orgánica en descomposición (Filleur *et al.*, 2005), indicando pozas ricas en nutrimentos. En estudios previos se ha observado que las raíces de chile habanero son quimiotrópicamente atraídas hacia parches aislados que contienen Glu (Palacios-Medel, 2009). El objetivo de este proyecto fue caracterizar dicha respuesta quimiotrópica, la cual no ha sido reportada en plantas.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **2.2.1 Material vegetal**

Las plántulas de chile habanero fueron obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de las semillas de *Capsicum chinense* Jacq. cv. naranja, que comercializa la empresa Séminis (Vegetable Seeds, Inc. Camino del sol Oxnard, CA 933030, USA. Lote No. 935022). Este cultivar es el que utilizan la gran mayoría de los productores de la península de Yucatán.

### **2.2.2 Desinfestación de las semillas**

Para la desinfestación, las semillas se mojaron con 1ml de alcohol al 80% (v/v) y se agitaron durante 5 min. Posteriormente, se les retiró el alcohol y se lavaron con agua estéril cuatro veces. Se sumergieron en hipoclorito de sodio (Cloralex), diluido previamente al 30% y se agitaron durante 15 min. Se retiró la solución y se lavaron con agua estéril tres veces. Por último, las semillas desinfectadas se estratificaron durante 48h en agua estéril, en condiciones de oscuridad, a 4°C.

### **2.2.3 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas**

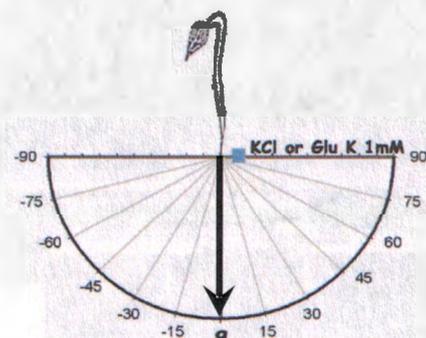
Las semillas estériles se colocaron en cajas petri con papel filtro humedecido, aproximadamente 45 semillas por placa. Una vez que ocurrió la protrusión de la radícula, éstas se transfirieron a cajas de Petri de 9 cm, que contenían el medio basal NO: 23 mM de ácido 2-(N morfolino) etanosulfónico (MES), pH 5.8, sacarosa al 0.5% (p/v), agar-agar al 1% (p/v) y las sales del medio B5 (Gamborg et al. 1968), diluidas 1:50. Las fuentes inorgánicas de nitrógeno del medio B5 (nitrato de potasio y sulfato de amonio) fueron eliminadas y se adicionó como única fuente de nitrógeno 0.5 mM de L-Glutamina (Gln). Para su crecimiento, las plántulas se colocaron en posición vertical, en condiciones de fotoperiodo (16 h luz: 8h oscuridad), a una intensidad luminosa de 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y a

25 °C.

## 2.2.4 Tratamiento quimiotrópico

Para evaluar el efecto quimiotrópico del Glu se utilizó el siguiente modelo: bloques de 5 x 5 mm que contenían el medio NO adicionado con 1 mM de KCl (testigo) o de *L*-Glu de potasio (*L*-GluK) (tratamiento) fueron depositados sobre una tira de acetato de 5 mm de ancho por 9 cm de largo. Esta tira, la cual impedía la difusión de los químicos contenidos en el bloque, fue colocada en la parte media de cajas Petri de 9 cm de diámetro, que contenían el medio NO. Plántulas de chile habanero, cuya raíz primaria medía  $22 \pm 2$  mm fueron colocadas de tal manera que el ápice radicular estuviera separado a una distancia de aproximadamente 2 mm del bloque (Figura 2.1). Se colocaron tres plántulas por caja.

Para el tratamiento con el aminoácido, se preparó una solución acuosa stock de 100 mM, la cual fue esterilizada por filtración, usando un filtro Whatman de 0.02  $\mu$ m.



**Figura 2.1** Modelo para estudiar el efecto quimiotrópico del Glu sobre la raíz de chile habanero. El bloque con el tratamiento se presenta en color gris.

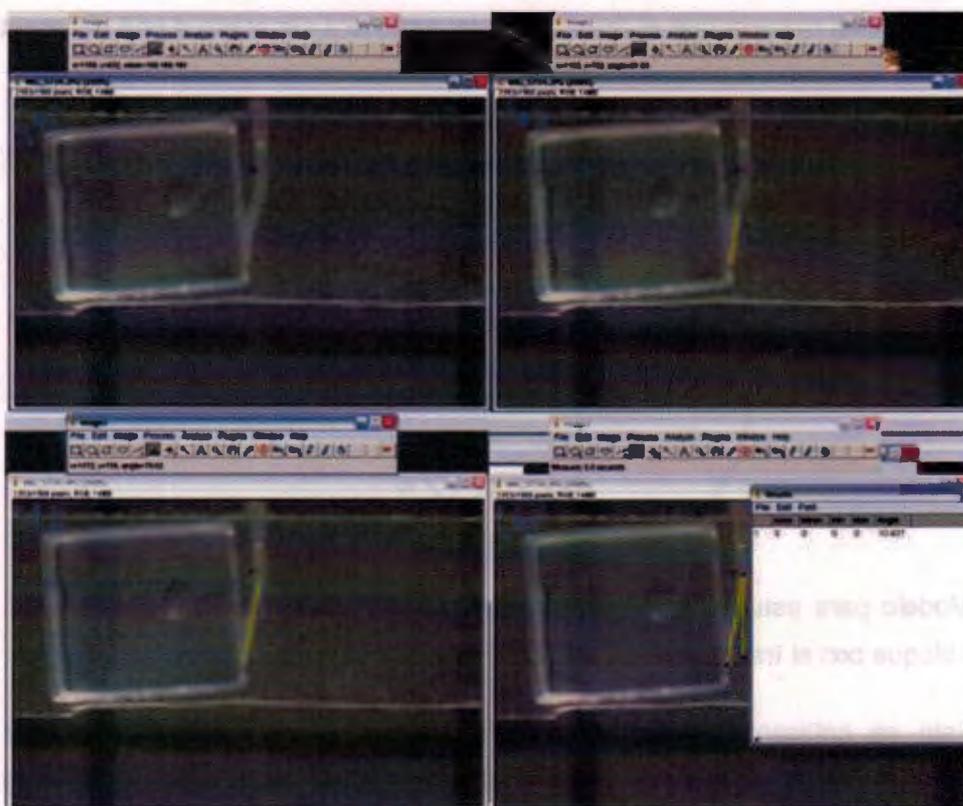
Las cajas Petri se colocaron cuidadosamente en posición vertical, en las mismas condiciones que para el crecimiento de las plántulas, hasta que se evaluó el ángulo de curvatura de la raíz primaria, cuyo tiempo se describe en cada experimento.

## 2.2.5 Caracterización de la respuesta quimiotrópica

### 2.2.5.1 Curva dosis-respuesta

En este experimento se utilizaron diferentes concentraciones de *L*-GluK (0, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ M) en el bloque de agar, ajustando siempre a 1000  $\mu$ M la cantidad de K con KCl. Se tomaron fotografías al tiempo 0 (cuando las plántulas se colocaron en el tratamiento) y

24 h después del tratamiento. Se midió el ángulo de curvatura con respecto a la vertical al analizar las imágenes en el programa imageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Usando la herramienta “ángulo”, se trazó una línea de la punta del ápice hasta la zona de elongación y una segunda línea vertical (Figura 2.2). Un ángulo de curvatura positivo significa un acercamiento hacia el bloque conteniendo el aminoácido, mientras un ángulo negativo implica un alejamiento de la raíz del bloque. Se utilizaron tres plántulas por caja y cinco cajas por cada tratamiento, teniendo un total de 15 plántulas por cada concentración.



**Figura 2.2** Medición de ángulos en el programa ImageJ. en las fotografías se puede observar el trazado de las líneas para medir el ángulo así como el despliegue de la ventana de resultados de las mediciones.

### 2.2.5.2 Curso temporal

Se utilizó el modelo descrito en 2.2.4, utilizando 1mM de KCl (testigo) o 1mM de *L*-GluK (tratamiento). Se tomaron fotografías a intervalos de una hora durante las primeras 16 horas y posteriormente a las 24 horas de exposición a los tratamientos. Las imágenes se analizaron en el programa de análisis de imagen ImageJ, evaluando el crecimiento radical y el ángulo de desviación en el crecimiento. La medición del ángulo de desviación se realizó de la siguiente manera: partiendo del ápice de la raíz primaria se trazó una línea recta pasando por el centro de la raíz y hasta la zona del inicio de formación de pelos radicales (~ 3mm, final de la zona de elongación); a partir de ese punto se trazó una segunda línea totalmente vertical (Figura 2.2). El ángulo formado por esas dos líneas se tomó como el ángulo de desviación para ese tiempo, teniendo valor positivo cuando fue en dirección al estímulo y negativo cuando ocurrió en dirección opuesta.

Las imágenes obtenidas también fueron procesadas en el programa GIF Construcción Set Pro. (<http://www.mindworkshop.com/gifcon.htm>) para obtener un video demostrativo. En este experimento se usaron 27 plántulas por cada tratamiento.

### 2.2.5.3 Efecto de la distancia entre la raíz y el estímulo

En este experimento se usó el modelo descrito anteriormente en 2.2.4, pero el ápice de las raíces fue colocado a distancias de 1, 2, 3 y 4 mm separado del bloque de agar. Se tomaron fotografías al tiempo 0 y a las 8 horas de exposición y se midió el ángulo de desviación del crecimiento a este tiempo.

### 2.2.6 Especificidad de la respuesta quimiotrópica

Para conocer si la respuesta quimiotrópica es específica para el *L*-GluK, se realizó un experimento en el cual se adicionó al bloque de agar 1 mM de los siguientes compuestos, en lugar del Glu: ácido *L*-aspártico (*L*-Asp), glicina (Gly), *D*-serina (*D*-Ser) y ácido  $\gamma$  aminobutírico (GABA). Se evaluó el ángulo de desviación a las 8 horas de tratamiento, como el experimento anterior. Todos estos compuestos, fueron preparados y adicionados al medio de una manera similar al *L*-GluK.

### **2.2.7 Papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica**

Para evaluar el papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica, a plántulas cuya raíz primaria medía  $22 \pm 2$  mm, se les removió la cofia quirúrgicamente con la ayuda de un bisturí y bajo la observación en un estereoscopio. Estas plántulas fueron sometidas al tratamiento quimiotrópico descrito en la sección II.4 (tanto en KCl como en *L*-GluK). En este experimento se tuvo en cuenta que el procedimiento de eliminación de la cofia no afectara el crecimiento radical. Como testigo se utilizaron plántulas a las cuales no se les retiró la cofia. El ángulo de desviación se evaluó a las 8 horas de tratamiento.

### **2.2.8 Evaluación de la morfología del ápice radical sometido al tratamiento quimiotrópico**

Las raíces sometidas al tratamiento quimiotrópico durante 8 horas seis raíces por tratamiento fueron aclaradas usando el método reportado por Dubrovsky *et al.*, (2006). Para ello, las raíces se incubaron a 62 °C por 40 minutos en una solución de 0.24 N de HCl y 20% de metanol (v/v), seguido de una incubación durante 20 minutos, en una solución de NaOH (p/v) y 60% de etanol (v/v). Ambas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las raíces se rehidratan gradualmente, incubándolas en las siguientes soluciones: etanol al 40, al 20 y al 10% (v/v), durante 15 minutos en cada una. Posteriormente, se colocan en portaobjetos, con glicerol al 50% y se observan al microscopio óptico. Se realizaron las siguientes evaluaciones: los tamaños de la cofia, tamaño zona meristemática, zona de elongación y distancia desde el ápice hasta el primer pelo radical formado. Estas evaluaciones fueron realizadas en el programa Image J.

### **2.2.9 Papel de un receptor tipo iGLR y del $Ca^{2+}$ en la respuesta quimiotrópica**

#### **2.2.9.1 Ensayo con agonistas y antagonistas de los iGLR de mamíferos**

Para el estudio del papel de un receptor tipo iGLR, previo al tratamiento quimiotrópico, las raíces se incubaron durante 15 minutos, en una solución de 0.5 mM de DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona). Este compuesto es un antagonista de los iGLR del tipo AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) y kainato. El exceso de la solución se eliminó con papel filtro estéril y las raíces se colocaron en el modelo quimiotrópico, previamente descrito, tanto en presencia de KCl 1mM (testigo) como de *L*-GluK 1mM (tratamiento). Se realizó un testigo, cuyas raíces se incubaron en una solución

acuosa durante 15 minutos y posteriormente se colocaron en el modelo quimiotropico en ambas condiciones. Se midió el ángulo de desviación a las 24 h de tratamiento.

También se desarrolló un experimento, adicionando 1 mM de  $\beta$ -Methylamino-L-alanine (BMAA) en lugar de *L*-GluK, el cual es un agonista de los iGLR del tipo AMPA. Para este ensayo, el agonista se adicionó en el bloque de agar, siguiendo el modelo descrito en el punto 2.2.4.

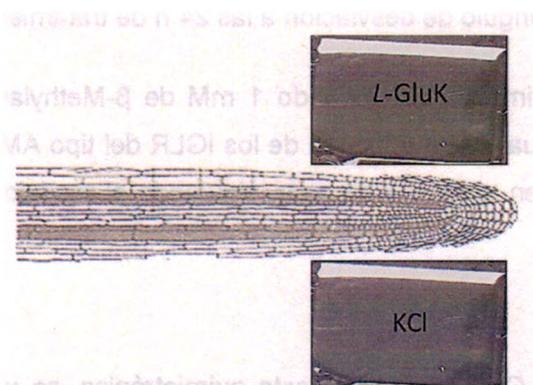
### **2.2.9.2 Papel del $Ca^{2+}$**

Para evaluar la participación del  $Ca^{2+}$  en la respuesta quimiotrópica, se usaron agentes quelantes y bloqueadores de canales. En el primer caso, las raíces fueron tratadas con 1mM de EGTA (ácido etilenglycol tetraacético) a pH 8.0, durante un periodo de 15 min, previo a los tratamientos quimiotrópicos. En el segundo caso, las raíces fueron incubadas durante 15 minutos en una solución conteniendo 5mM de cloruro de lantano ( $LaCl_3$ ), el cual bloquea canales iónicos. Posteriormente, las raíces se sometieron al tratamiento en el modelo quimiotrópico. El ángulo de curvatura se evaluó a las 24 de exposición a los tratamientos.

### **2.2.10 Evaluación de los cambios de pH en el exterior de la raíz en respuesta a la presencia de glutamato**

Para este análisis, se utilizaron plántulas de chile habanero, cuya raíz primaria medía  $22 \pm 2$  mm y se colocaron sobre porta objetos conteniendo una capa delgada de medio NO, sobre la cual se les añadió 40  $\mu$ l del fluoróforo sensible a pH (Verde Oregón). Después de incubar durante una hora, se eliminó el exceso de fluoróforo con 1 ml de medio NO líquido. Para la aplicación del tratamiento, se colocaron bloques de agar a lados opuestos, separados a 1 mm del ápice, uno conteniendo KCl 1mM y el otro *L*-GluK 1mM (Figura 2.3). Las raíces se fotografiaron mediante una cámara CCD (Quantix Cool Snap HQ; Roper Sci.entific), unida a un microscopio invertido Nikon TE300 (Nikon Instruments) con Lente 5x/1.3 de apertura numérica, con un lente de inmersión en agua. Todo el equipo fue operado con un software MetaMorph / MetaFluor (Mol. Devices) a una longitud de onda de 484 nm y leídas a 555 nm cada 15 segundos, durante un tiempo total de 50 minutos. Este experimento fue desarrollado en el Instituto de Biotecnología UNAM, en el laboratorio

de la doctora Carmen Quinto, con el Dr. Luis Cárdenas.



**Figura 2.3** Modelo para el análisis al microscopio de fluorescencia, usando un fluoróforo sensible a cambio de pH.

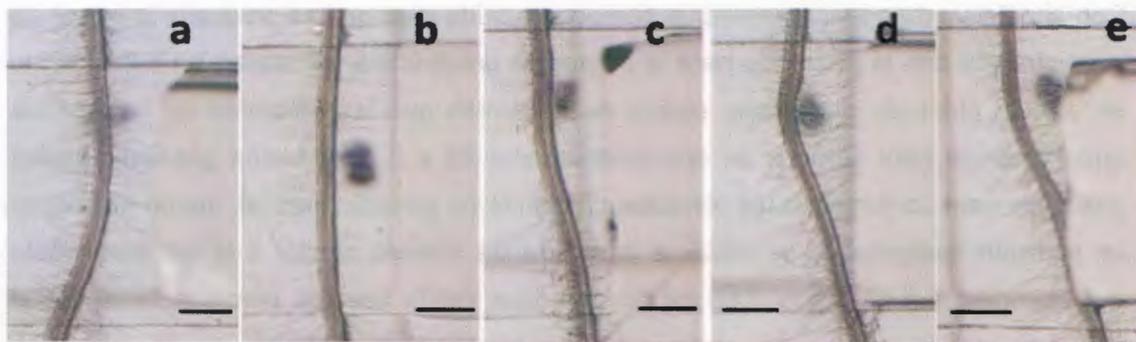
## **2.3. RESULTADOS.**

### **2.3.1 Caracterización de la respuesta quimiotrópica de la raíz de chile habanero a glutamato**

#### **2.3.1.1 Curva dosis-respuesta**

Anteriormente, se había observado que la raíz primaria de chile habanero redingía su crecimiento, acercándose a parches conteniendo 1 mM de *L*-GluK (Palacios-Medel, 2009). Para definir la sensibilidad de las raíces al aminoácido, se colocaron plántulas de chile habanero en el sistema de cajas Petri, descrito previamente en la sección 2.2.4. En este experimento, se adicionaron al parche diferentes concentraciones de *L*-GluK, desde 0 hasta 1000 $\mu$ M y se evaluó el ángulo de curvatura de la raíz primaria después de 24 h.

Los resultados indicaron que el efecto quimiotrópico fue dependiente de la concentración del estímulo. La menor concentración utilizada (50  $\mu$ M) no provocó una modificación significativa en la trayectoria de crecimiento de la raíz primaria; sin embargo, se logró observar un quimiotropismo positivo a partir de una concentración de 100  $\mu$ M de Glu, presentando ángulos de desviación del crecimiento de la raíz primaria entre 5 y 8 °, con respecto a la vertical. También, se observó que la respuesta positiva incrementó en función de la concentración de Glu, presentando ángulos de curvatura de 5 a 15 ° en respuesta a 500  $\mu$ M y hasta 20 ° a 1000  $\mu$ M de *L*-GluK (Figura 2.4).



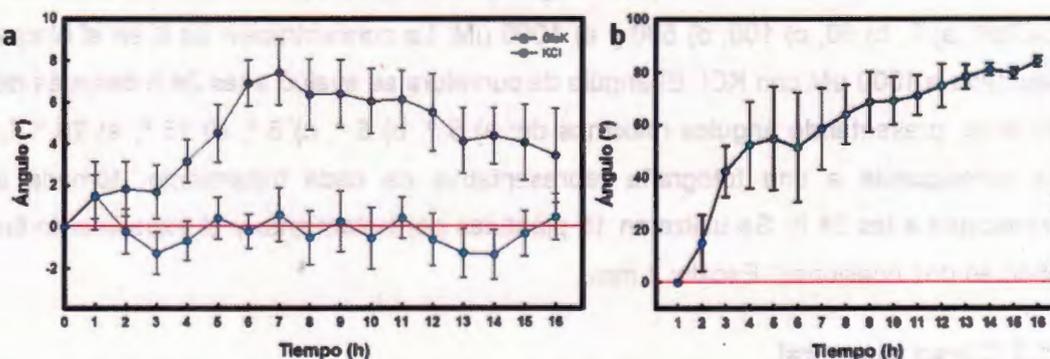
**Figura 2.4.** Efecto de la concentración de Glu sobre la respuesta quimiotrópica de las raíces de chile habanero. El ápice radical fue colocado a una distancia de aproximadamente 2 mm de un bloque de agar que contenía concentraciones crecientes de *L*-GluK: a) 0, b) 50, c) 100, d) 500 y e) 1000  $\mu$ M. La concentración de K en el bloque fue ajustada a 1000  $\mu$ M con KCl. El ángulo de curvatura se evaluó a las 24 h después del tratamiento, presentando ángulos máximos de: a) 5 °, b) 5 °, c) 8 °, d) 15 °, e) 20 °. La figura corresponde a una fotografía representativa de cada tratamiento, tomada al estereoscopio a las 24 h. Se utilizaron 15 plántulas por tratamiento y el experimento fue repetido en dos ocasiones. Escala: 1 mm.

### 2.3.1.2 Curso temporal

Por otra parte, se realizó un curso temporal para definir el tiempo requerido para que ocurra la curvatura quimiotrópica y, evaluar cómo influye el tiempo de exposición en el mantenimiento de esta respuesta. En este experimento las plántulas se sometieron al tratamiento quimiotrópico y se documentó el crecimiento y el ángulo de curvatura de la raíz primaria a través de la toma de fotografías cada hora después de colocadas al tratamiento.

A partir de las cinco horas de tratamiento se observó una curvatura positiva, la cual fue estadísticamente significativa, comparada con los valores obtenidos en las plántulas creciendo en presencia del testigo con KCl (Figura 2.6a). El ángulo de curvatura máximo se registró a las siete horas de exposición y se mantuvo significativamente superior al testigo hasta las 11 horas. A las 16 horas este valor fue similar al de las plántulas testigo (Figura 2.6a).

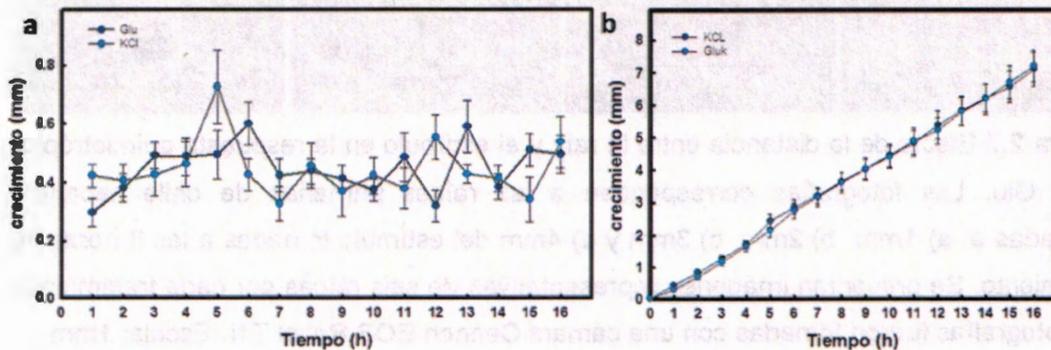
Con el objetivo de poder comparar el tiempo requerido para que se produzca la curvatura quimiotrópica con el requerido para la respuesta gravitrópica, se realizó un experimento en el cual plántulas del mismo estado de desarrollo que las utilizadas en los análisis quimiotrópicos (raíz primaria de aproximadamente  $22 \pm 2$  mm) fueron graviestimuladas (las cajas petri conteniendo las plántulas creciendo en posición vertical, fueron colocadas en posición horizontal) y se midió la curvatura de manera similar a la del tratamiento quimiotrópico. En la Figura 2.6b se observa que desde las dos primeras horas de la graviestimulación hubo una redirección del crecimiento a favor de la gravedad, aumentando el ángulo de curvatura con el tiempo.



**Figura 2.5** Evaluación de la respuesta trópica de la raíz primaria de chile habanero durante un curso temporal. A) Ángulo de curvatura de la raíz hacia el Glu. B) Ángulo de curvatura de las raíces graviestimuladas. Cada punto representa la media de 27 (A) ó 6 (B) plántulas y las líneas verticales son el error estándar. Se obtuvieron diferencias significativas (*t*-student's) entre el tratamiento con KCl y L-GluK (A) a las 5 ( $P=0.022$ ), 6 ( $P=0.021$ ), 7-11 ( $P=0.001$ ), 12 ( $P=0.005$ ), 13 ( $P=0.019$ ), 14 ( $P=0.008$ ) y 15 ( $P=0.003$ ) horas después de la quimioestimulación. En la figura a se presentan los resultados obtenidos en dos experimentos.

Se observó una disminución significativa en el crecimiento de la raíz primaria de las raíces quimioestimuladas, comparadas con las testigos, a las 12 horas de tratamiento (Figura 2.7a). Sin embargo, en el resto de las horas evaluadas, así como en el crecimiento acumulado no se observaron cambios importantes entre los tratamientos (Figura 2.7a y b). La tasa de crecimiento promedio calculada hasta las 16 horas fue de  $0.44 \pm 0.004$  mm/h y  $0.42 \pm 0.01$  mm/h, para el tratamiento con KCl y Glu, respectivamente. Ambos

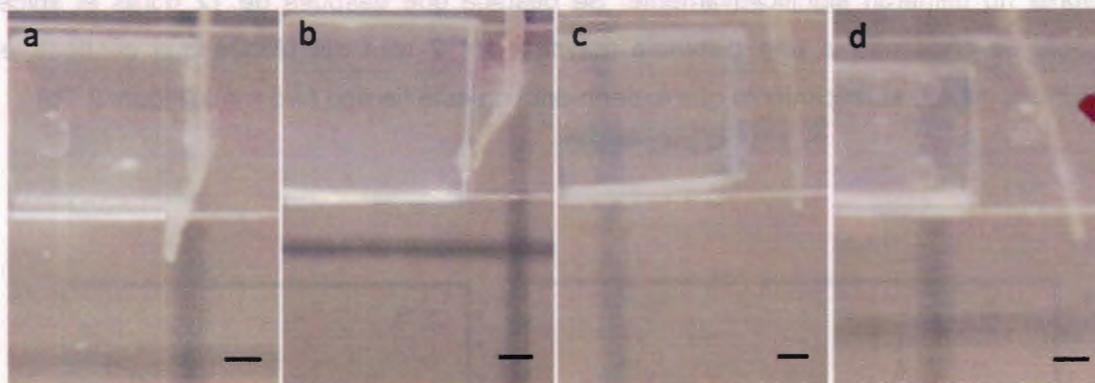
valores no difirieron significativamente. Se destaca que después de 12 horas el ápice radical se encuentra a una distancia mayor a los 2 mm del bloque que contiene el estímulo, debido al crecimiento que experimenta en este tiempo (> 5 mm) (Figura 2.7b)



**Figura 2.6** Crecimiento de la raíz primaria de chile habanero durante el tratamiento quimiotrópico. a) crecimiento por hora. b) crecimiento acumulado. Los datos en ambas gráficas corresponden a 27 plantas analizadas en el curso temporal y las líneas verticales son el error estándar de la media. Se encontró diferencia significativa (*t*-student's) entre tratamientos exclusivamente a las 12 horas ( $P=0.02$ ) en los valores de crecimiento por hora.

### 2.3.1.3 Efecto de la distancia entre la raíz y el estímulo

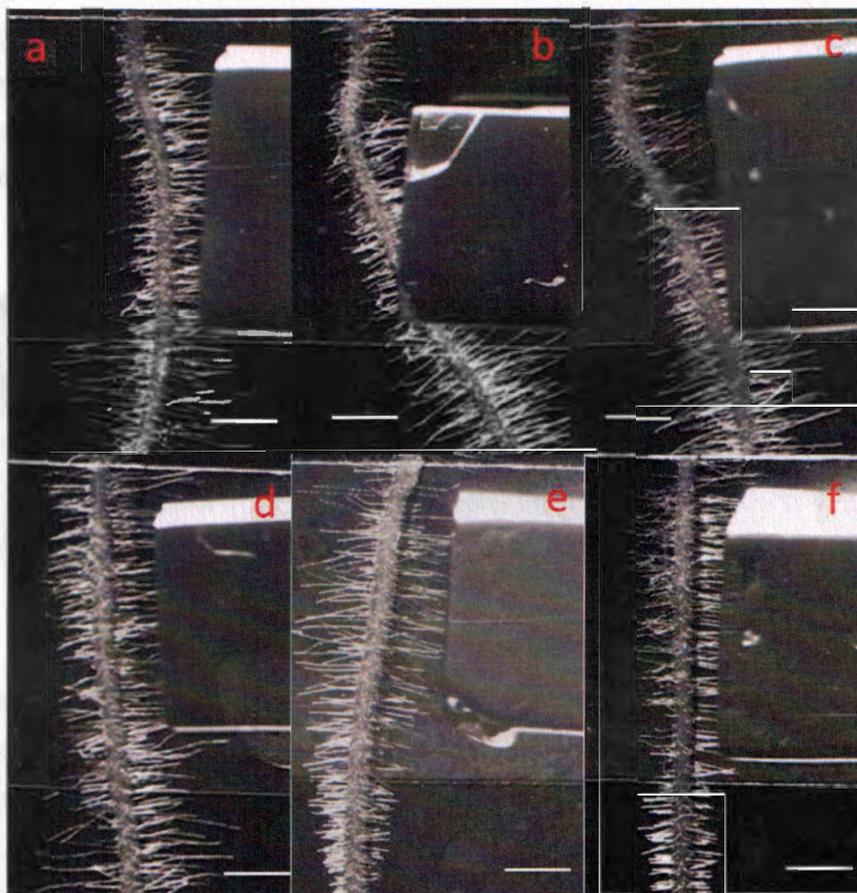
En este experimento se colocó la punta del ápice a distintas distancias del bloque con el tratamiento. Las raíces colocadas a 1 y 2 mm de los bloques de agar respondieron normalmente a favor del estímulo (Glu 1mM), no así a partir de la distancia de 3 mm, donde el efecto quimiotrópico se abolió (Figura 2.5).



**Figura 2.7** Efecto de la distancia entre la raíz y el estímulo en la respuesta quimiotrópica hacia Glu. Las fotografías corresponden a las raíces primarias de chile habanero colocadas a: a) 1mm b) 2mm, c) 3mm y d) 4mm del estímulo tomadas a las 8 horas de tratamiento. Se presentan imágenes representativas de seis raíces por cada tratamiento. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Cannon EOS Rebel T1i. Escala: 1mm

### 2.3.2 Especificidad de la respuesta quimiotrópica hacia glutamato

Para el análisis de la especificidad en la respuesta quimiotrópica se utilizaron otros aminoácidos como: Gly, GABA, Asp y Ser. Los resultados demuestran que la glicina provocó una respuesta quimiotrópica similar a la del Glu; sin embargo, este efecto no fue observado con el resto de los tratamientos (Figura 2.8 y Cuadro 2.1).



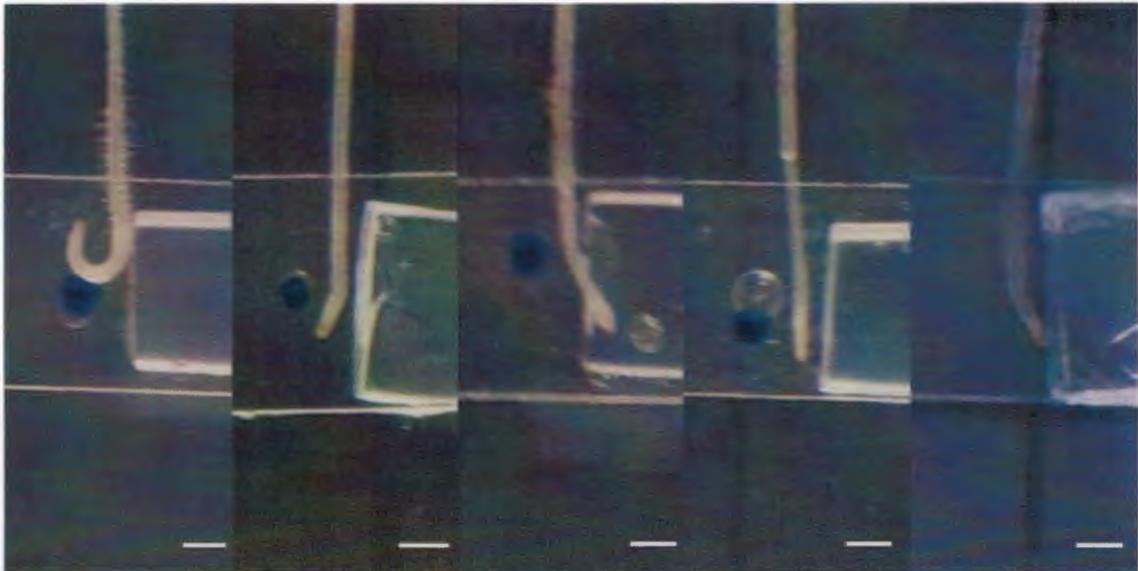
**Figura 2.8.** Especificidad de la respuesta quimiotrópica al Glu. Las raíces se sometieron a 1 mM de los siguientes compuestos: (a) KCl (b) *L*-Glu (c) Gly (d) GABA (e) *L*-AspK y (f) *D*-Ser. Cada fotografía tomada al estereoscopio corresponde a una planta representativa de cada tratamiento tomada a las 24 horas de tratamiento.

**Cuadro 2.1** Respuesta quimiotrópica a distintos compuestos relacionados químicamente al glutamato. Los valores representan el ángulo promedio de 15 raíces  $\pm$  el error estándar. El número dentro del paréntesis indica el número de raíces que presentaron un ángulo positivo hacia el estímulo, en relación con el número total de plantas por tratamiento.

Compuesto (1 mM)	KCl	Glu	Gly	GABA	Asp	Ser
Ángulo (°)	0 $\pm$ 5.77 (1/15)	6 $\pm$ 10.84 (8/15)	8.09 $\pm$ 9.5 (10/15)	2.4 $\pm$ 16.06 (4/15)	-0.12 $\pm$ 10.82 (4/15)	0.19 $\pm$ 4.78 (3/15)

### 2.3.3 Papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica hacia Glu.

La cofia es la estructura que participa en la percepción de varias respuestas trópicas; por ello, se estudió si ésta era importante en la respuesta quimiotrópica de las raíces de chile habanero hacia el Glu. En este experimento la cofia fue eliminada usando un bisturí y posteriormente estas plántulas fueron colocadas en el modelo quimiotrópico. Como se observa en la Figura 2.9, las raíces a las que se les removió la cofia no presentaron respuesta quimiotrópica hacia Glu, presentando una dirección de crecimiento errática, con ángulos de 5 a 180°, tanto a favor como en contra del parche conteniendo 1 mM de L-GluK (Figura 2.9)



**Figura 2.9** Papel de la cofia en la respuesta quimiotrópica. Las imágenes representan el comportamiento de cinco raíces representativas a las cuales se les removió la cofia quirúrgicamente y se colocaron en el modelo quimiotrópico. Las fotos fueron tomadas al estereoscopio a las 16 horas de tratamiento con *L-GluK*.

#### **2.3.4. Efecto del glutamato sobre la morfología del ápice radical.**

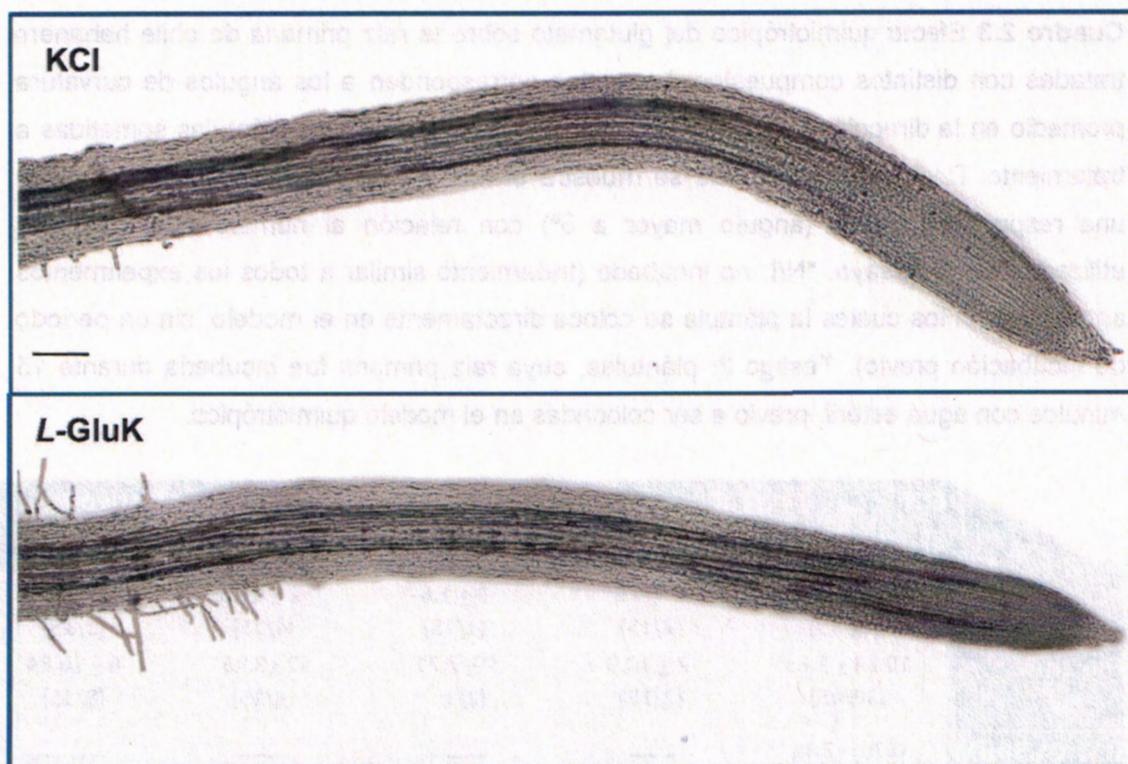
Para realizar un análisis más profundo del efecto del tratamiento quimiotrópico sobre el crecimiento, las raíces expuestas durante ocho horas a KCl o *L-GluK* en el modelo quimiotrópico fueron aclaradas y, las imágenes tomadas al microscopio óptico, fueron utilizadas para determinar el tamaño de la cofia, y de las zonas meristemática así como la de elongación con ayuda del programa ImageJ.

No se observaron diferencias significativas en el tamaño de las mismas, al menos en el tiempo evaluado (Cuadro 2.2). Sin embargo, se observa una ligera reducción en el tamaño de la zona de elongación en presencia de Glu comparada con el tratamiento con KCl, aunque este cambio no fue estadísticamente significativo. (Cuadro 2.2, Figura 2.10).

**Cuadro 2.2.** Tamaño de las distintas zonas del ápice radical expuestas al tratamiento quimiotrópico. Cada valor corresponde al promedio de seis raíces aclaradas y observadas al microscopio. Las mediciones se realizaron en el programa ImageJ. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

	KCL	Glu
cofia	114.735 $\mu\text{m} \pm 13.93$	113.212 $\mu\text{m} \pm 15.43$
zona meristemática	690.14 $\mu\text{m} \pm 68.56$	649.705 $\mu\text{m} \pm 112.53$
zona de elongación	2084.08 $\mu\text{m} \pm 541.18$	1723.6 $\mu\text{m} \pm 137.72$

Las distancias a las cuales se formó el primer pelo radical desde el ápice fueron  $2888.96 \pm 582.47 \mu\text{m}$  y  $2486.51 \pm 233.07 \mu\text{m}$  para las raíces tratadas con KCl y L-GluK, respectivamente, no difiriendo estos valores estadísticamente. Sin embargo, se pudo observar una mayor formación y desarrollo de pelos radicales en las raíces expuestas a Glu (Figura 2.10)



**Figura 2.10.** Morfología de las raíces sometidas durante ocho horas al tratamiento quimiotrópico. En la imagen se presenta la fotografía de una raíz aclarada representativa de cada tratamiento. Escala: 100 mm.

### **2.3.5. Papel de un receptor del tipo iGLR y del $\text{Ca}^{2+}$ en la respuesta quimiotrópica.**

Se optó por hacer un acercamiento de tipo farmacológico para definir la posible participación de un iGLR en la respuesta a Glu. El uso de BMAA, el cual es un agonista de los receptores del tipo ionotrópico, no indujo una respuesta quimiotrópica similar a la del Glu (Cuadro 2.3). También, se utilizó DNQX, el cual es un antagonista de los iGluRs de mamíferos, que ha sido utilizado para este tipo de estudio en plantas. En este experimento, se obtuvo que el 75% de las raíces de las plántulas que fueron previamente tratadas durante 15 minutos con DNQX presentaron ángulos de curvatura menores a  $5^\circ$  cuando fueron expuestas al bloque conteniendo *L*-GluK, mientras que el 70% de las plántulas testigos, fueron previamente tratadas con una solución sin el antagonista respondieron, presentando un quimiotropismo positivo. Estos resultados indican que el DNQX inhibió la respuesta quimiotrópica de las raíces hacia Glu (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3** Efecto quimiotrópico del glutamato sobre la raíz primaria de chile habanero tratadas con distintos compuestos. Los datos corresponden a los ángulos de curvatura promedio en la dirección del crecimiento de la raíz primaria de las plántulas sometidas a tratamiento. Dentro del paréntesis se muestra el número de plántulas que presentaron una respuesta positiva (ángulo mayor a 5°) con relación al número total plántulas utilizadas en el ensayo. \*N/I: no incubado (tratamiento similar a todos los experimentos anteriores, en los cuales la plántula se coloca directamente en el modelo, sin un período de incubación previo). Testigo 2: plántulas, cuya raíz primaria fue incubada durante 15 minutos con agua estéril, previo a ser colocadas en el modelo quimiotrópico.

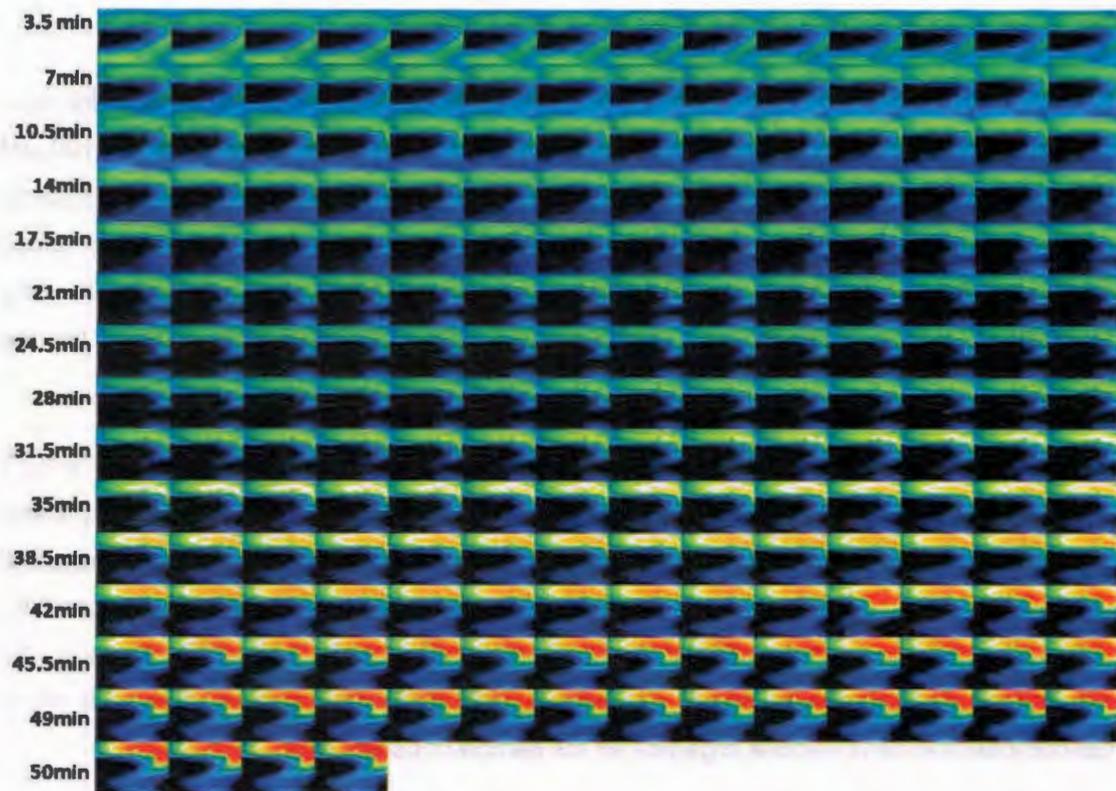
	N/I	LaCl <sub>3</sub> (2.5 mM)	EGTA (1 mM)	DNQX (0.5 mM)	Testigo 2 (H <sub>2</sub> O d)
KCl 1mM	2.91 ± 0.83 (15/45)	-1 ± 6.9 (2/15)	0 ± 1.6 (1/15)	-2 ± 11.5 (4/15)	0 ± 5.77 (1/15)
Glu 1mM	10.83 ± 1.63 (30/45)	-2 ± 10.9 (2/15)	0 ± 7.71 (2/15)	-2 ± 8.86 (4/15)	6 ± 10.84 (8/15)
BMAA 50µM	0.70 ± 7.41 (4/15)	-----	-----	-----	-----

Por otra parte, para estudiar el posible papel del Ca<sup>2+</sup> en esta respuesta, se utilizaron dos compuestos: el LaCl<sub>3</sub>, el cual es un agente bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> y el EGTA, que es un agente quelante de cationes divalentes. En estos experimentos se pudo observar que las plantas tratadas con ambos compuestos presentaron ángulos de curvatura en el crecimiento menores a 5 ° en más del 80% de las plantas, considerándose esto una respuesta quimiotrópica nula (Cuadro 2.3). Este resultado indica que para que se produzca la curvatura quimiotrópica de la raíz en respuesta a Glu se requiere de la entrada extracelular del Ca<sup>2+</sup>.

### 2.3.5. La exposición de la raíz al glutamato induce cambios en el pH extracelular

Para estudiar si el tratamiento exógeno de Glu indujo cambios en el pH extracelular, las plántulas fueron expuestas a parches de KCl y de L-Glu, como se muestra en la Figura 2.3. El flujo de protones hacia el exterior fue evaluado con el uso de un fluoróforo sensible a cambios de pH. En este experimento se pudo observar un cambio asimétrico

en el pH alrededor del ápice, presentando una acidificación del medio en el área del ápice con que estuvo expuesta al *L*-GluK, incluso antes de los cinco minutos de exposición (Figura 2.11). Esta disminución en el pH aumentó con el tiempo de exposición, alcanzando un máximo relativo a los 40 minutos y manteniéndose a lo largo de todo el tiempo de evaluación (Figura 2.11). Este efecto fue observado solo en el lado expuesto al aminoácido y no en el de KCl.



**Figura 2.11** Efecto del Glu sobre el pH alrededor del ápice. Las fotografías fueron tomadas cada 15 segundos, iniciando a los 15 segundos después de colocar el ápice de la raíz primaria en el tratamiento descrito en la sección 2.2.9.2. El color rojo indica un pH más ácido y el color azul indica las secciones con el pH más básico. Este experimento se realizó con cinco raíces y en la figura se presentan los resultados obtenidos en un experimento representativo.

### 2.4. DISCUSIÓN.

Hoy en día son pocos los reportes existentes acerca del quimiotropismo de las raíces de las plantas y son menos aun las sustancias que se conoce son capaces de provocar un efecto quimiotrópico en las raíces. Aunque el glutamato es quimiotrópicamente activo en varias especies, este es el primer reporte del efecto quimiotrópico de este aminoácido en una especie vegetal. Los resultados presentados en este trabajo proponen un nuevo campo en la investigación de este fenómeno en las plantas.

El Glu es uno de los aminoácidos más abundantes en las proteínas (13 al 19% del peso total de las proteínas) (USDA). Además, las concentraciones de Glu a partir de 100  $\mu\text{M}$  han sido reportadas como presentes en el suelo en las inmediaciones de la materia orgánica en descomposición (Jones y Kielland, 2002). Esto significa que las raíces creciendo en los suelos pudieran estar expuestas a dicha concentración de este aminoácido, siendo este valor un umbral mínimo para que pueda ser percibido por las raíces.

La vida media de los aminoácidos en forma libre en el suelo puede ser de 1.7 a 28.7 horas (Jones, 1999). En este trabajo se observó que el efecto quimiotrópico del Glu sobre las raíces de chile habanero se presenta a partir de las cinco horas de exposición al aminoácido y el mayor efecto a las siete horas, en las condiciones evaluadas (Figura 2.6). Esto coloca al Glu en la posibilidad de modificar efectivamente la arquitectura de la raíz primaria de habanero para captar de manera óptima los nutrimentos, derivados de la descomposición de la materia orgánica en los parche ricos en Glu.

Las raíces a las que se les removió la cofia no presentaron respuesta quimiotrópica hacia Glu (Figura 2.9), lo cual indica que la presencia de esta estructura es esencial para que ocurra esta respuesta. Esto concuerda con otros reportes en los que se plantea que la integridad de la cofia es necesaria para la percepción de los estímulos trópicos, como el gravitropismo (Boonsinchai *et al.*, 2002) y el hidrotropismo (Miyazawa *et al.*, 2008).

La presencia de Gly al igual que el Glu, fue capaz de provocar un efecto quimiotrópico sobre la raíz de chile habanero (Figura 2.8). Este aminoácido es un coagonista de los receptores de Glu de mamíferos. También, existen reportes en los cuales se menciona

---

que ciertas subunidades de los receptores de Glu de plantas podrían acoplar mejor a la Gly que al Glu, según análisis estructurales y electroquímicos (Dubos *et al.*, 2005). Además, ha sido reportado que la Gly tiene un rol en la entrada de  $Ca^{2+}$  a las células vegetales, posiblemente a través de un receptor de Glu de tipo NMDA (Dubos *et al.*, 2003).

Por otra parte, el GABA aunque es uno de los principales neurotransmisores en mamíferos y ha sido propuesto como una posible molécula señal en plantas, no se ha reportado una homología entre los receptores sensibles a GABA de mamíferos y genes reportados en plantas (Bouche y Fromm, 2004). El GABA es también un producto del metabolismo del Glu; debido a que no tuvo un efecto similar al presentado por el Glu, se sugiere que el efecto quimiotrópico hacia Glu observado en este trabajo podría ser el resultado de eventos de señalización más que de un efecto metabólico.

Se ha reportado que la Ser provoca entrada de  $Ca^{2+}$  en el tubo polínico de *Arabidopsis*, probablemente al activar el receptor AtGLR1.2 (Michard *et al.*, 2011). En cambio en la raíz primaria de chile habanero este aminoácido no generó respuesta quimiotrópica (Figura 2.8). Esto podría deberse a la composición específica del receptor de Glu, la cual puede estar presente en la raíz de chile. Se sabe que el iGluR activo está conformado de varias subunidades que pueden o no ser iguales (Bigge, 1999). Además, en *Arabidopsis* existen veinte genes que codifican los receptores y de los cuales cuatro se expresan exclusivamente en la raíz (Roy *et al.*, 2008).

En otro caso, las raíces se expusieron a una concentración de 50  $\mu$ M de BMAA, que es un agonista de los iGLuR de tipo NMDA de mamífero. Este compuesto no provocó efectos quimiotrópicos en la raíz de chile habanero a la concentración aplicada (Cuadro 2.3). Brenner *et al.*, (2000) reportaron que la aplicación de este agonista a plántulas de *Arabidopsis* provoca una elongación y una inhibición en la apertura de los hipocótilos, además de una fuerte inhibición del crecimiento de la raíz primaria. El mayor efecto fue observado a la concentración de 50  $\mu$ M de este agonista. También, se reportó que mutantes de *Arabidopsis*, tanto hipersensibles como hiposensibles a Glu, no presentaron diferencias en la sensibilidad a BMAA (Walch-Liu *et al.*, 2006).

La incubación de la raíz primaria de chile habanero con DNQX, previo al tratamiento

quimiotrópico, inhibió la respuesta quimiotrópica a Glu. Este resultado parece indicar la participación de un receptor parecido a los del tipo AMPA de mamífero. Este reporte concuerda con reportes anteriores donde el DNQX inhibió la entrada de iones al interior de las raíces de *Arabidopsis* provocado por la aplicación de Glu externo (Dubos *et al.*, 2003).

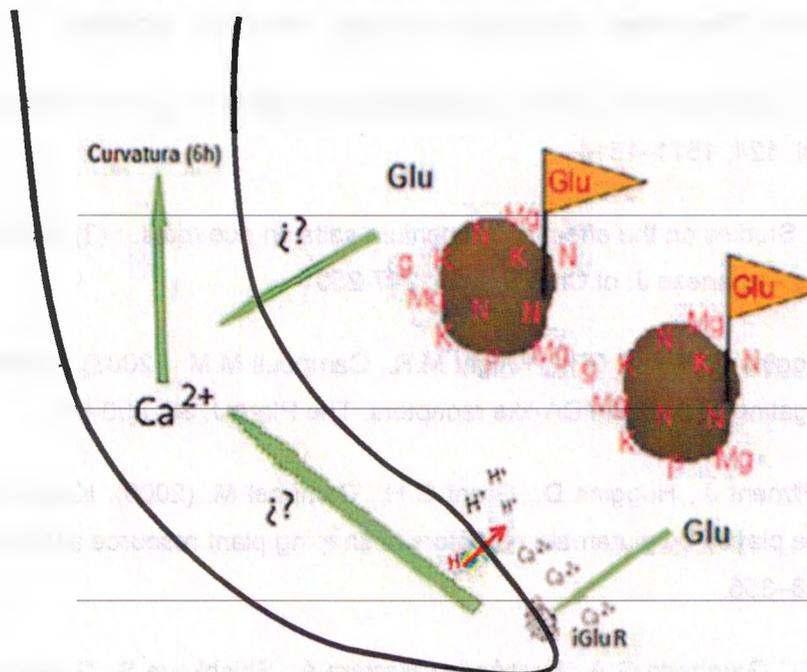
La aplicación de  $\text{LaCl}_3$  y EGTA inhibieron la respuesta quimiotrópica a Glu (Cuadro 2.3). Ambos compuestos impiden el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones al interior de las células por distintos mecanismos; el  $\text{La}^{3+}$  bloquea por obstrucción los canales por donde puede pasar el  $\text{Ca}^{2+}$ , en tanto el EGTA quela iones divalentes alrededor de la raíz, impidiendo así su disponibilidad. Ambos compuestos han sido usados para bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las raíces de *Arabidopsis*, como reportan Dennison y Spalding, (2000). Estos resultados demuestran que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la respuesta quimiotrópica a Glu, siendo necesaria su presencia y capacidad de entrar a las células para que esta respuesta se lleve a cabo.

Por otra parte el  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido reportado como una molécula fundamental en las respuestas trópicas; en el gravitropismo, la aplicación de EGTA en las raíces inhibe la respuesta gravitrópica (Lee *et al.*, 1983), la aplicación de este quelante también suprime la respuesta hidrotópica (Takahashi y Suge, 1991; Takano *et al.*, 1997). Específicamente, en las respuestas quimiotrópicas el  $\text{Ca}^{2+}$  es una molécula esencial en distintos organismos: en animales el quimiotropismo en el crecimiento direccional de los conos de las neuronas es mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Zeng *et al.*, 1996). En plantas, por ejemplo el crecimiento direccional del tubo polínico está mediado por un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en la punta del tubo polínico (Hepler *et al.*, 2001).

La aplicación lateral de Glu provocó un cambio asimétrico del pH, con una acidificación del medio alrededor de la sección del ápice expuesta a Glu (Figura 2.10). Esto indica una salida de protones, posiblemente provocada por una rectificación de la polaridad de la membrana plasmática por una ATPasa en las células expuestas a Glu. Algunos reportes indican que el Glu provoca una despolarización de la membrana en raíces de *Arabidopsis* (Dennison y Spalding 2000). Esto podría sugerir una relación entre el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  y un GLR presente en el ápice de las raíces de chile habanero.

Por otra parte, los cambios de pH en el ápice de las raíces han sido reportados como necesarios para las respuestas trópicas, en específico es necesario un cambio de pH localizado en el ápice de raíces graviestimuladas para que la respuesta trópica se lleve a cabo, alterar el pH en las células de la columela en las fases iniciales de la graviestimulación retrasa significativamente la respuesta trópica (Fasano *et al.*, 2001).

En resumen, a partir de los resultados obtenidos se propone el modelo presentado en la Figura 2.11. El Glu y podría actuar como indicadore de la presencia de nutrimentos activando un iGluR, el cual generaría una entrada de cationes al interior de las células, provocando una despolarización de la membrana en el ápice radical. Esta despolarización puede generar un cambio de pH en el medio circundante, debido a la rectificación de la polaridad por una ATPasa de membrana. El  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a las células, ya sea por el canal catiónico no selectivo de los iGLR o por otro transportador, podría actuar como mensajero secundario, donde se generaría un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  asimétrico en la células del ápice, lo cual podría provocar una cascada de señalización que culminaría con la respuesta quimiotrópica a las cinco horas de exposición al Glu.



**Figura 2.11** Modelo de la respuesta quimiotrópica a glutamato. En este modelo se exponen los posibles factores involucrados en la respuesta quimiotrópica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bigge C., (1999) Ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 441-447.
- Boonsirichai K., Guan C., Chen R., Masson P.H. (2002). Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and Molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53:421-47.
- Bouche N., Fromm H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant SCI.* 9: 110-115.
- Brenner E.D., Martinez-Barboza N., Clark A.P., Liang Q.S., Stevenson D.W., Coruzzi G.M. (2000). *Arabidopsis* mutants resistant to S(+)-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol.* 124:1615-24.
- Darwin, C. (1881). *The power of movement in plants.* :New York. Appleton.
- Dennison K.L., Spalding E.P. (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 1511-1514.
- Doi Y. (1951). Studies on the effect of ammonium salts on rice roots. : (2) Chemotropism of roots. *Japanese J. of Crop Sci.* 19: 247-250
- Dubos C., Huggins D., Grant G.H., Knight M.R., Campbell M.M. (2003). A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *The Plant J.* 35: 800-810.
- Dubos C., Willment J., Huggins D., Grant G.H., Campbel M. (2005). Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation. *Plant J.* 43: 348-355.
- Dubrovsky J.G., Gambetta G.A., Hernández-Barrera A., Shishkova S., González I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann. Bot.* 97:903-15.

- 
- Fasano J.M., Swanson S.J., Blancaflor E.B., Dowd P.E., Kao T.H., Gilroy S. (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* Root Plant Cell. 13: 907–921
- Filippenko V.N. (2001) Evidence for the active and passive chemotropisms in Roots Russian J. of Plant Physiol., 48, No. 4: 431–437.
- Filleur S., Walch-Liu P., Gan Y. and Forde B.G. (2005). Nitrate and glutamate sensing by plant roots Biochem. Soc. Trans. 33:283-286.
- Gamborg O.L.; Miller R.A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.
- Hepler P.K., Vidali L., and Cheung A.Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. Ann. Rev. Cell and Dev. Biol. 17: 159-187
- Jones DL (1999) Amino acid biodegradation and its potential effects on organic N capture by plants. Soil Biol Biochem 31: 613-622
- Jones D.L. Kielland K. (2002). Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. Soil Biol. and Biochemistry 34, 209-219.
- Kim S., Mollet J.C., Dong J., Zhang Kangling, Park S.Y., Lord E. (2003). Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism PNAS 100: 16125-16130
- Lee J.S., Mulkey T.J., Evans M.L. (1983). Reversible loss of gravitropic sensitivity in maize roots after tip application of calcium chelators. SCI. 220: 1375-1376.
- Michard E., Lima P.T., Borges F., Silva A.C., Portes M.T., Carvalho J.E., Gilliam M., Liu L.H., Obermeyer G., Feijó J.A. (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine SCI. 332: 434-437
- Miller G. (2006). "Guam's Deadly Stalker: On the Loose Worldwide?". SCI. 28 (313): 428-431.

- Miyazawa Y., Sakashita T., Funayama T., Hamada N., Negishi H., Kobayashi A., Kaneyashu T., Ooba A., Morohashi K., Kakizaki T., Wada S., Kobayashi Y., Fujii N., Takahashi H. (2008). Effects of locally targeted heavy-ion and laser microbeam on root hydrotropism in *Arabidopsis thaliana*. *J Radiant Res* 49: 373-379.
- Newcombe F.C. Rhodes. A.L. (1904) Chemotropism of roots. *Botanical Gazette*. 23-35
- Palacios-Medel E. (2009) Efecto quimiotrópico del glutamato en la raíz de chile habanero. Tesis de licenciatura Tecnológico de Mérida. ITM
- Roy S.J., Gilliam M., Berger B., Essah P.A., Cheffings C., Miller A.J., Davenport R.J., Liu L.H., Skynner M.J., Davies J.M., Richardson P., Leigh R.A., Tester M. (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31: 861-871.
- Takahashi H., Suge H. (1991). Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, ageotropum. *Physiol. Plant.* 82: 24-31.
- Takano M., Takahashi H. Suge H. (1997). Calcium requirement for the induction of hydrotropism and enhancement of calcium-induced curvature by water stress in primary roots of pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 385-391.
- USDA (1998). National Nutrient Database for Standard Reference
- Van Houten J.L., Wan Q.Y., Bergeron A. (2000). Chemosensory signal transduction in *Paramecium*. *J. Nutr.* 130: 946-949
- Walch-Liu P., Liu L.H., Remans T., Tester M., Forde B.G. (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell. Physiol.* 47, 1045-1057
- Zheng J.Q., Poo M.M., Connor J.A. (1996) Calcium and chemotropic turning of nerve growth cones. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 4(2-3):205-13.

Zeng J.Q., Wan J., Poo M. (1996) Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient *The J. of NeuroSCI.*, 76(3):1140- 1149



---

## CAPÍTULO III

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 3.1. CONCLUSIONES.

A continuación se enlistan las principales conclusiones que se derivaron del presente trabajo:

1. El Glu provocó una respuesta quimiotrópica sobre la raíz de chile habanero a partir de concentraciones de 100 $\mu$ M.
2. Se requiere que el estímulo se encuentre a una distancia igual o menor a 2mm del ápice para que se presente la respuesta quimiotrópica a Glu.
3. La curvatura en la respuesta quimiotrópica se presentó a partir de las cinco horas de exposición al estímulo.
4. La respuesta quimiotrópica también se observó con glicina.
5. La cofia fue necesaria para que ocurriera la curvatura quimiotrópica a Glu.
6. Al bloquear la entrada extracelular de Ca<sup>2+</sup>, se bloqueó la respuesta quimiotrópica.
7. Los resultados sugieren la participación de un receptor de Glu en la respuesta quimiotrópica a Glu.
8. El Glu indujo una salida de protones en el área del ápice expuesta a este compuesto.

#### 3.2. PERSPECTIVAS.

La respuesta quimiotrópica a aminoácidos en plantas es un fenómeno nunca antes reportado. Este trabajo es un parteaguas para nuevas líneas de investigación en el campo de los tropismos en plantas y arquitectura de raíz. Los resultados y conclusiones expuestas en este trabajo son apenas la punta del iceberg en un nuevo y amplio campo de investigación sobre el papel de los aminoácidos libres en la rizósfera y aceptados por las raíces de plantas.

Los resultados de este trabajo sugieren que el Ca<sup>2+</sup> y un receptor de tipo GLR participan en la respuesta quimiotrópica a glutamato, esto propone nuevas interrogantes de los mecanismos por los cuales esta respuesta se lleva a cabo. Así mismo, estos resultados

proponen las bases para una caracterización más profunda de esta respuesta en el futuro. Bajo esta premisa podemos proponer diversas perspectivas para la investigación venidera en esta línea:

- Estudiar la respuesta quimiotrópica de Glu en las raíces laterales de chile habanero. Las raíces laterales juegan un papel importante en la exploración y captación de recursos. Podría existir la posibilidad de que éstas respondan de manera parecida a la raíz primaria a la presencia de Glu en el medio.
- Clonar un receptor de glutamato en chile habanero. La clonación de genes es una herramienta muy útil al momento de caracterizar una respuesta permiten el uso de mutantes, silenciamiento de genes, entre otras herramientas. Esto podría ayudar a esclarecer más sobre los mecanismos de esta respuesta.
- Estudiar el papel de las hormonas en la respuesta quimiotrópica a Glu. La auxina y el ácido abscísico tienen una participación importante en otros tropismos como son el hidro y gravitropismo la investigación de la participación de éstas y otras hormonas sería importante para definir los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta respuesta.