



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CAMBIOS EN LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS
EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN DEL SISTEMA
RADICAL DE *Capsicum chinense* Jacq. A NITRATO**

Tesis que presenta

RICARDO DE JESÚS CUXIM HUCHIM

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



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 CAMBIOS EN LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN DEL SISTEMA RADICAL DE *Capsicum chinense* Jacq. A NITRATO 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,

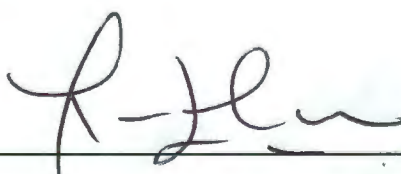
Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 28 de Mayo del 2012.

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: IBQ. Ricardo de Jesús Cuxim Huchim

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

AGRADECIMIENTOS

- Primeramente agradecer a Dios por la oportunidad de vivir esta experiencia y por todas las personas que me permitió conocer a lo largo de mi paso por el CICY.
- A mi familia por apoyarme, confiar en mí y por todo el amor brindado, en especial a mi mamá Margarita Huchim Manzanero y a mi hermana Martha Cuxim Huchim.
- Quiero expresar mi gratitud a mi directora de tesis, a la Dra. Ileana Echevarría Machado por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por ser mi guía, mi maestra, mi consejera y haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia durante estos años.
- Gracias al Dr. Manuel Martínez Estévez por ser un excelente maestro y amigo, por sus consejos, y toda la ayuda brindada.
- Gracias a mi comité tutorial al Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Ignacio Islas Flores, Dra. Sara Solís Pereira, por asesorarme durante toda la maestría.
- A mis revisores de tesis a la Dra. Ileana Echevarría Machado, al Dr. Manuel Martínez Estévez, al Dr. Ignacio Islas Flores, a la Dra. Sara Solís Pereira, y a la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, por sus comentarios, consejos y ayuda brindada.
- Gracias al M.C. Mildred Carrillo Pech, por todas las metodologías enseñadas, su apoyo en la realización de muchos experimentos y por su amistad.
- Al M.C. Armando Muñoz por toda su ayuda, tanto en la realización de experimentos, así como en la facilitación de equipos y reactivos.
- Gracias también a toda la gente que ha compartido conmigo mi paso por el laboratorio: a Gladys, Mildred, Neto I, Marta, Neto II, Anahí, Celsi, Teresita, Ángel, Enid, Luis F., Tochis, Camilo, Nancita.
- Muchísimas gracias a Gladys, por todos sus consejos, su apoyo, pero sobre todo por todas las cenas y coca-colas compartidas.
- A Camilo por toda su ayuda brindada, así como su amistad durante estos años.
- No me puedo olvidar de mis amigos de la maestría: Mayra, Yas, Mike, Felipe, Emily, por todas las aventuras vividas así como todas las escapadas a lapa-lapa y gran plaza.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
BIBLIOGRAFÍA	3
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 FUNCIÓN DE LA RAÍZ.....	5
1.2 ESTRUCTURA DE LA RAÍZ Y PROCESOS QUE CONDUCEN AL CRECIMIENTO RADICAL	5
1.3 NUTRIENTES PARA EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.....	8
1.4 NITRÓGENO EN EL SUELO.....	8
1.5 ABSORCIÓN DE NITRATO POR LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS.....	9
1.6 ASIMILACIÓN Y METABOLISMO DEL NITRATO EN PLANTAS.....	10
1.7 RESPUESTA DEL SISTEMA RADICAL A NITRATO	12
1.8 NITRATO COMO MOLÉCULA SEÑAL	14
1.9 FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLANTAS.....	17
1.10 RELACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN CON LA RESPUESTA A NITRATO	20
1.11 LAS MAP KINASAS EN PLANTAS.....	21
1.11.1 MAP KINASAS EN RESPUESTA A NITRÓGENO	22
1.12. CHILE HABANERO.....	23
1.12.1 IMPORTANCIA Y ORIGEN.....	23
1.12.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	23

1.12.3 ANTECEDENTES DEL EFECTO DEL NITRATO SOBRE EL SISTEMA RADICAL DE <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
BIBLIOGRAFÍA	28
CAPÍTULO II	39
ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS Y DE LA ACTIVIDAD DE LAS MAP KINASAS DE RAÍCES DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO	39
2.1 INTRODUCCIÓN.....	39
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	41
2.2.2 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS.....	41
2.2.3 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.....	41
2.2.4 CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS	42
2.2.5 TRATAMIENTOS CON NITRATO.....	42
2.2.6 COSECHA DE TEJIDOS	42
2.2.7 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	43
2.2.8 FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i>	43

2.2.9 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CONTENIENDO DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).....	43
2.2.10 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE MAP CINASAS	44
2.2.10.1 ENSAYO EN GEL.....	44
2.2.10.2 INMUNODETECCIÓN DE MAP CINASA	45
2.3 RESULTADOS.....	45
2.3.1 CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO	45
2.3.2 EFECTO DEL NITRATO SOBRE LA FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO	46
2.3.2.1 FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS TOTALES	47
2.3.2.2 FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS.....	48
2.3.2.3 FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS MEMBRANALES	50
2.3.3 ACTIVIDAD DE MAP CINASA EN EXTRACTO TOTAL DE RAICES DE CHILE HABANERO TRATADAS CON NITRATO	52
2.4 DISCUSIÓN	53
2.5 BIBLIOGRAFÍA.....	56
CAPÍTULO III	61
IDENTIFICACIÓN POR INMUNODETECCIÓN DEL TIPO DE RESIDUO AMINOACÍDICO FOSFORILADO EN LAS PROTEÍNAS DE RAÍCES DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO.....	61
3.1 INTRODUCCIÓN.....	61
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	62

3.2.2 INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO	63
3.3 RESULTADOS.....	63
3.3.1 ENSAYO DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS CON LAS PROTEÍNAS DE RAÍZ DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO	63
3.3.2. DETERMINACIÓN DE FOSFOAMINOÁCIDOS POR MEDIO DE INMUNODETECCIÓN EN EL EXTRACTO DE PROTEICO TOTAL DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO	64
3.3.3 INMUNODETECCIÓN DE LOS DIFERENTES FOSFOAMINOÁCIDOS EN LAS PROTEÍNAS CITOSÓLICAS PROVENIENTES DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO.....	66
3.3.4 IDENTIFICACIÓN POR INMUNODETECCIÓN DE RESIDUOS AMINOACÍDICOS FOSFORILADOS EN LAS PROTEÍNAS PROVENIENTES DE UN EXTRACTO MEMBRANAL DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO	68
3.4 DISCUSIÓN	72
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	74
CAPÍTULO IV	77
FOSFORILACIÓN <i>in vivo</i> DE PROTEÍNAS DE RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO	77
4.1 INTRODUCCIÓN.....	77
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	78
4.2.1 FOSFORILACIÓN <i>in vivo</i>	78
4.3 RESULTADOS	79
4.3.1 EFECTO SOBRE LA FOSFORILACIÓN <i>in vivo</i> DE PROTEÍNAS PRESENTES EN	

LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A NITRATO		79
4.4 DISCUSIÓN		80
4.5 BIBLIOGRAFÍA.....		82
CAPÍTULO V		85
5.1 DISCUSIÓN GENERAL		85
5.2 BIBLIOGRAFÍA.....		90
CAPÍTULO VI		93
6.1 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		93
6.1.1 CONCLUSIONES		93
6.1.2 PERSPECTIVAS		93

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la raíz.	6
Figura 1.2 Tipos de desarrollo del sistema radical.....	7
Figura 1.3 Nitrógeno en el suelo.	9
Figura 1.4 Absorción, reducción y acumulación de nitrato en los diferentes tejidos de la planta.....	11
Figura 1.5 Efecto de diferentes nutrientes sobre raíces de <i>Hordeum vulgare</i>	13
Figura 1.6 Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> expuestas a tratamiento localizado de KCl (testigo) o de KNO ₃ (tratamiento).	14
Figura 1.7 Desarrollo de raíces laterales en respuesta a nitrato.....	16
Figura 1.8 Proceso de fosforilación/desfosforilación de proteínas.	18
Figura 1.9 Modelo de regulación del transportador AtNRT1.1 por fosforilación.	21
Figura 1.10 Efecto del nitrato sobre el sistema radical de <i>Capsicum chinense</i>	24
Figura 2.1 Efecto sobre la fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas totales de raíces de chile habanero expuestas a 1 mM de KNO ₃ durante diferentes tiempos de exposición.....	48
Figura 2.2 Efecto sobre la fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas citosólicas de raíces de chile habanero expuestas por diferentes tiempos a 1 mM de KNO ₃	49
Figura 2.3 Efecto sobre la fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas de membrana de raíces de chile habanero expuestas por diferentes tiempos a 1 mM de KNO ₃	51
Figura 2.4 Ensayo de la actividad de MAPK en gel, usando a la proteína básica de mielina (MBP) como sustrato	52
Figura 2.5 Inmunodetección de MAPK.	53

Figura 3.1 Ensayo de reconocimiento en gota de los anticuerpos con las proteínas de raíz de chile habanero en respuesta a nitrato	64
Figura 3.2 Inmunodetección de los diferentes fosfoaminoácidos presentes en las proteínas totales de raíces de chile habanero expuestas a nitrato.	66
Figura 3.3 Identificación de los residuos aminoacídicos fosforilados en las proteínas provenientes de un extracto citosólico de raíces de chile habanero expuesta a nitrato. Se aplicaron 30 µg de proteína. La membrana se inmunodetectó en una dilución 1:500 de: (A) anti-P-Thr, (B) anti-P-Ser y (C) anti-P-Tyr, y una dilución de (1:1000) de anticuerpo secundario, (D) gel de poliacrilamida conteniendo el perfil de proteínas teñidas con nitrato de plata.....	68
Figura 3.4 Identificación de los residuos aminoacídicos fosforilados en las proteínas provenientes de extractos membranales de raíces de chile habanero expuestas a nitrato.	69
Figura 4.1 Efecto del nitrato sobre la fosforilación <i>in vivo</i> de proteínas totales de raíces de chile habanero sometida a 1 mM de KNO ₃ durante diferentes tiempos de exposición	80
Figura 5.1 Diagrama de comparación de la fosforilación de proteínas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de raíces de chile habanero en respuesta a nitrato.....	88

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1 Contenido de proteínas totales y porcentaje de proteínas presentes en las membranas respecto al total, de las raíces de plántulas de chile habanero durante un curso temporal de exposición a nitrato..... 46

Cuadro 2.2 Resumen de las bandas de fosfo-proteínas que se detectan después de la fosforilación *in vitro* de proteínas de raíces de plántulas de chile habanero sometidas a nitrato durante un curso temporal. 52

Cuadro 3.1 Resumen de los residuos aminoacídicos fosforilados en las proteínas de raíces de chile habanero sometidas a un curso temporal a nitrato. 71

20 50

25

100

150

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ASR	Arquitectura del sistema radical
BSA	Albúmina sérica de bovino
Ca ²⁺ /CaMPKs	Cinasas dependientes de calcio/calmodulina
Cdck	Cinasas dependientes de ciclina
CDPKs	Cinasas dependientes de calcio
chATS	Transportador de alta afinidad expresado de manera constitutiva
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N, N, N, N-tetraacético
Fe-EDTA	Ácido etilen diamino tetracético de hierro
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GOGAT	Glutamino oxoglutarato aminotransferasa
GS	Glutamina sintetasa
HATS	Sistema de transporte de alta afinidad
iHATS	Sistema de transporte de alta afinidad expresado inducible
LATS	Sistema de transporte de baja afinidad
MAP cinasa	Proteína cinasa activada por mitógenos
NI	Nitrógeno inorgánico

NiR	Nitrito reductasa
NO	Nitrógeno orgánico
NRT1.1	Transportador de nitrato de baja afinidad
NRT2.1	Transportador de nitrato de alta afinidad
NR	Nitrato reductasa
RL	Raíz lateral
RP	Raíz primaria
Pi	Fósforo inorgánico
PK	Proteínas cinasas
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
[³² P] γ ATP	Adenosin trifosfato marcado con ³² P en el fosfato γ

RESUMEN

El nitrógeno es uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que es parte importante de moléculas fundamentales de la vida, como nucleótidos, aminoácidos y proteínas. El nitrato es la principal fuente de nitrógeno en la mayoría de las plantas y la disponibilidad de este nutriente afecta a muchos procesos de desarrollo de la planta y la arquitectura de las raíces, la floración, la senescencia y la fotosíntesis, entre otros. Las respuestas típicas a las bajas concentraciones de NO_3^- incluyen el aumento en la actividad de los sistemas de captación y una mayor proliferación del sistema radicular. La mayoría de los mecanismos de regulación que participan en estas respuestas se han caracterizados a niveles fisiológicos y moleculares.

Estos estudios han demostrado que el NO_3^- afecta la expresión de un gran número de genes, incluyendo aquellos que codifican para proteínas cinasas y fosfatasa. La fosforilación de proteínas parece ser un importante regulador en la respuesta de las plantas a NO_3^- y este proceso ha sido poco estudiado. Los escasos antecedentes que existen han sido descritos en la planta modelo *Arabidopsis* pero no existen estudios en otras plantas de importancia económica.

El objetivo de este trabajo se centró en los cambios en el patrón de fosforilación de proteínas de las raíces de chile habanero, causados por la adición de 1 mM de KNO_3 a la solución hidropónica, durante un curso temporal. Los resultados revelaron bandas de proteínas fosforiladas diferencialmente en respuesta a NO_3^- , así como también la regulación de algunas proteínas por fosforilación a diferentes tiempos de exposición.

ABSTRACT

Nitrogen it is one of the essential macronutrients for plant growth and development, as important part of fundamental molecules for life, such as nucleotides, amino acids, and proteins. Nitrate is the main source of nitrogen in most plants, and the availability of this nutrient affects many processes development of plant and architecture of roots, flowering, senescence and photosynthesis, among others. Typical responses to low concentrations of NO_3^- include: increased activity of absorption systems, and further proliferation of the root system. Regulatory mechanisms involved in these responses have been mostly characterized at physiological and molecular levels.

These studies have shown that NO_3^- affects the expression of large number of genes including those that encode protein kinases and phosphatases. Protein phosphorylation appears to be an important regulating mechanism in response to the concentration of NO_3^- , and this process is poorly understood. All these mechanisms have been described in the model plant *Arabidopsis*, but not in other plants of economic importance.

The aim of this work was focused on studying the changes in protein phosphorylation pattern of the roots of habanero pepper, caused by the addition of 1 mM KNO_3^- in a hydroponic solution over a time curse. The results revealed protein bands differentially phosphorylated in response to NO_3^- as well as the regulation of some proteins by phosphorylation at different exposure times.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del tomate. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye con más de un 90% al volumen de producción estatal (Borges-Gómez *et al.*, 2008). El suelo, es el principal factor limitante para la producción de chile habanero en Yucatán (Tun, 2001). Estos suelos presentan condiciones extremadamente adversas para el desarrollo de los cultivos; son altamente pedregosos, poco profundos y pobres en nitrógeno (Ramírez *et al.*, 2005). A pesar de ello, en estos suelos se pueden obtener altos rendimientos, mediante la aplicación de prácticas de manejo adecuadas (Borges-Gómez *et al.*, 2008; Latournerie *et al.*, 2001).

Cuando las plantas crecen bajo estas condiciones, los sistemas radicales sufren modificación en su crecimiento, y le confieren a las plantas la posibilidad de adaptarse al ambiente que las rodea y ser más eficientes en la captación de los recursos del suelo.

El sistema radical de las plantas terrestres realiza dos funciones primarias: la adquisición de recursos del suelo (principalmente nutrientes y agua) y el anclaje. De todos los órganos de la planta, la raíz es el más expuesto a condiciones adversas, ya que se desarrolla en un reto constante por la adquisición de los nutrientes (compite por ellos con los microorganismos presentes en el suelo, así como por los que están adsorbidos en las partículas del suelo), tiene que crecer en busca de agua, evadir obstáculos, etc (Jackson, 1997).

Los nutrientes se encuentran distribuidos de forma heterogénea en los suelos, por lo tanto el sistema radical tiene que percibir eficientemente gradientes de nutrientes y redirigir su crecimiento en respuesta a ello. Este mecanismo le permite explotar más eficientemente los recursos, especialmente en suelos pobres en nutrientes. Entre los principales nutrientes para el desarrollo de las plantas se encuentra el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K).

El N es el elemento que más limita la productividad de los cultivos y está presente en el suelo como N orgánico (NO) y N inorgánico (NI). Dentro de esta última categoría, el

INTRODUCCIÓN

nitrate (NO_3^-) es la mayor fuente de N disponible para las plantas que crecen en suelos aeróbicos. En muchos suelos agrícolas, la concentración de NO_3^- se encuentra en un rango de 1 a 5 mM (Owen y Jones, 2001). Sin embargo, como consecuencia de la utilización de este nutriente por las plantas y los microorganismos, además de su lixiviación, las concentraciones del mismo en la solución del suelo son variables.

Debido a la heterogeneidad ambiental, las plantas modifican su desarrollo, proceso conocido como plasticidad. En estos cambios deben intervenir procesos de señalización que conlleven a la expresión de genes, conduciendo a la síntesis de nuevas proteínas que sostengan los cambios en el desarrollo de los órganos, tales como la raíz. Dentro de ellos, la fosforilación de proteínas es un evento que participa y se modifica en respuesta de los organismos al ambiente (Castaings *et al.*, 2011).

La fosforilación de proteínas se refiere a la adición de grupos fosfato a las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos de una proteína; este evento generalmente se lleva a cabo en los residuos tales como serina, treonina, tirosina e histidina (Walker y Stone, 1995).

El proceso de fosforilación, tiene un papel importante en el metabolismo y en la transducción de señales; las vías de transducción de señales en las plantas son indispensables para que respondan adecuadamente a los estímulos ambientales y para estudiarlas, éstas se pueden dividir arbitrariamente en cinco grupos, aquellas involucradas en: a) respuestas a estímulos luminosos, b) respuestas a hormonas, c) la regulación del ciclo celular, d) respuestas a patógenos y depredadores y, e) a las interacciones célula-célula. Las alteraciones en la fosforilación de proteínas pueden conllevar a cambios fisiológicos o patológicos en un sistema vivo (Sedko, 2003).

Estudios realizados han demostrado que la expresión de muchos genes reguladores, incluyendo aquellos que codifican factores de transcripción y cinasas, también son afectados. Algunos de los genes regulados por el NO_3^- responden a la pérdida de P, K y Fe (Luan, 2003). Sin embargo, no se han hecho estudios que relacionen la fosforilación de proteínas en respuesta a NO_3^- y el desarrollo radicular. El objetivo de este proyecto fue estudiar los cambios en la fosforilación de proteínas de raíces de chile habanero en respuesta a la exposición a NO_3^- .

BIBLIOGRAFÍA

- Borges-Gómez L., Cervantes-Cárdenas L., Ruiz-Novelo J., Soria-Fregoso M., Reyes-Oregel V. y Villanueva-Couoh E. (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana*, 28: 35-41.
- Castaings L., Marchive C., Meyer C. y Krapp A. (2011). Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to obtain insights into a complex signalling network. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1391-1397.
- Jackson M. (1997). Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. *Trends in Plant Science*, 2: 22-28.
- Latorneire L., Chávez J.L., Pérez M., Hernández C.F., Martínez R., Arias L.M. y Castañón G. (2001). Exploración de la diversidad morfológica de chiles regionales en Yaxcabá Yucatán México. *Agronomía Mesoamericana*, 12: 41-47.
- Luan S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annual Review Plant Biology*, 54: 63-92.
- Owen A.G. y Jones D.L. (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology Biochemistry*, 33: 651-657.
- Ramírez G., Góngora S., Pérez L., Chel L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J. y López H. (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP- SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mocochoá, Yucatán; México, pp: 7-51.
- Sedko D. (2003). Protein Phosphorylation: a global regulator of cellular activity. *The science Creative Quarterly*, 73: 121-125.
- Tun J.C. (2001). Chile habanero, características y tecnología de producción. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional

INTRODUCCIÓN

de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Yucatán, México (URI:
<http://hdl.handle.net/123456789/3030>)

Walker J.C. y Stone M.J. (1995). Plant protein kinase families and signal transducción.
Plant Physiology, 108: 451-457

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 FUNCIÓN DE LA RAÍZ

Se sabe que la raíz tiene una función fundamental para la vida de las plantas y que su crecimiento se afecta en respuesta a muchos estímulos ambientales. La raíz no solo provee a la planta de los nutrientes y el agua necesarios para su crecimiento y desarrollo, sino que además envía señales hacia la parte aérea (hormonas tales como el ácido abscísico y citocininas), regulando eventos bioquímicos y fisiológicos que tienen una función crucial para la sobrevivencia de las plantas (Davies *et al.*, 1994; Jackson 1997; Walch-Liu *et al.*, 2000; Forde, 2002). De esta forma, es capaz de regular el crecimiento de la planta integralmente.

En las plantas podemos observar tres partes fundamentales: la raíz, el tallo y las hojas. El tallo y las hojas conforman la parte aérea, cuya función prioritaria es la captación de energía química generada por la fotosíntesis. La raíz actúa como sostén y también para la absorción de agua y nutrientes. La gran mayoría de las raíces se desarrollan en el suelo, en condiciones de oscuridad, por lo tanto, son totalmente dependientes de la energía asimilada y producida por la fotosíntesis realizada en la parte aérea. En concordancia, la parte aérea, que crece expuesta al aire y a la luz, es completamente dependiente del agua y los nutrientes minerales absorbidos del suelo por la raíz. En conjunto, estas actividades son decisivas para garantizar el aumento en masa y en volumen, tanto de la raíz como de la parte aérea (Kolek y Kozinka, 1992).

1.2 ESTRUCTURA DE LA RAÍZ Y PROCESOS QUE CONDUCEN AL CRECIMIENTO RADICAL

La raíz está formada por tres tipos de tejido: epidermis, o capa superficial; tejido fundamental o córtex y estela o cilindro vascular, situado en el centro (Figura 1.1). Algunas células de la epidermis se modifican para desempeñar la función de absorción; de ellas parten largas proyecciones tubulares llamadas pelos radicales que se sujetan a las partículas del suelo. El agua absorbida por los pelos radicales penetra al cilindro vascular, para ser conducida al tallo.

CAPÍTULO I

La organización del cilindro vascular de la raíz es muy distinta de la disposición del tejido vascular del tallo. En éste último, xilema y floema se agrupan en haces vasculares; por el contrario, la raíz tiene un núcleo central formado por bandas radiales de xilema, que se extienden hacia el córtex externo, entre las cuales se forman hileras de floema (Kolek y Kozinka, 1992).

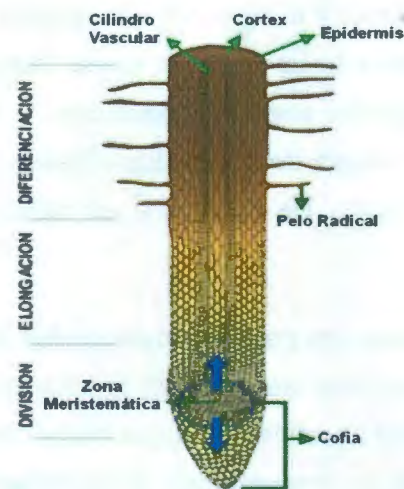


Figura 1.1 Estructura de la raíz. La raíz primaria está organizada en una zona protectora llamada cofia, una zona de división o zona meristemática, una zona de elongación y una de diferenciación o maduración (Fuente, www.puc.clsw_educbiologiabio100).

El crecimiento del sistema radical es el producto de tres procesos: la división celular del meristemo de la raíz primaria (RP), que provoca el crecimiento en longitud, la formación de raíces laterales (RL), que aumenta la capacidad de exploración del sistema radical y la formación de pelos radiculares que incrementa el área total de la RP y las RL (Figura 1.2) (López-Bucio *et al.*, 2003).

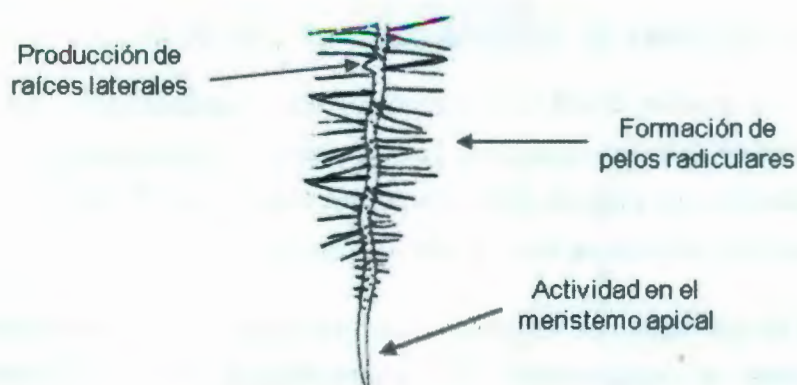


Figura 1.2 Tipos de desarrollo del sistema radical (adaptado de Schiefelbein y Benfey, 1991).

En el meristemo apical se lleva a cabo la división celular, tanto en dirección hacia la base radical (para formar células que se diferenciarán dentro de los tejidos), como en dirección contraria (para la formación de la cofia). Por lo tanto, la RP está organizada en una zona protectora llamada cofia, una zona de división o zona meristemática, una zona de elongación y una de diferenciación o maduración (Figura 1.1).

La zona de elongación inicia de 0.7 a 1.5 mm del ápice, donde las células se extienden rápidamente en longitud, y sufren una serie de divisiones para producir un cilindro de células endodérmicas. En el cilindro vascular, el floema empieza a diferenciarse entre 3 y 4 mm del ápice. Este tejido lleva a cabo el transporte de carbohidratos, producto de la fotosíntesis, para el crecimiento del ápice. En los tejidos jóvenes en donde el floema todavía no se desarrolla, el transporte de carbohidratos y de N depende de una difusión simplástica.

En el caso de la zona de diferenciación, ésta inicia entre los 5 y 20 mm del ápice, donde el xilema desarrolla la capacidad de translocar agua y solutos hasta los brotes; también es la zona donde ocurre la formación de pelos radicales (Bloom *et al.*, 2003).

Las raíces responden a nutrientes localizados en determinadas partes del suelo, modificando su velocidad y dirección de crecimiento, así como ampliando sus ramificaciones y formando pelos radiculares, todo ello para acceder a las fuentes de agua y nutrientes (Mouchel *et al.*, 2004).

CAPÍTULO I

1.3 NUTRIENTES PARA EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

Los nutrientes se pueden dividir en macronutrientes y micronutrientes, de acuerdo a las concentraciones en que son requeridos por las plantas. Utilizando esta clasificación, los siguientes elementos se pueden definir como macronutrientes: C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Na, Si. Los micronutrientes son: Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Cl y Ni.

Esta división de los nutrientes vegetales es un tanto arbitraria, y en muchos casos, las diferencias entre la concentración de macronutrientes y micronutrientes son poco precisas. Por ejemplo, la concentración de Fe o Mn en los tejidos vegetales es casi tan alta como la concentración de S o Mg (Mengel y Kirkby, 2001).

El N es un nutriente esencial para los seres vivos, ya que es uno de los constituyentes principales de compuestos vitales como los aminoácidos, las proteínas, las nucleoproteínas, los ácidos nucleicos, así como también de las paredes celulares y la clorofila. Es además el nutriente, que en general, influye mayormente en los rendimientos y en la calidad de los productos generados por la actividad agropecuaria (Tisdale y Nelson, 1991).

1.4 NITRÓGENO EN EL SUELO

Este elemento debe cumplir dos requisitos para que pueda ser utilizado por los cultivos: debe encontrarse en una forma asimilable por las raíces y debe estar disponible en el suelo. De la cantidad de N presente en el suelo, solo una pequeña parte se encuentra en formas asimilables para las plantas (Silva, 2002), siendo la materia orgánica del suelo, una de las reservas más importantes de N, puesto que ~98% de éste se encuentra formando compuestos orgánicos (Stevenson, 1982). Estas formas orgánicas incluyen proteínas, aminoácidos (aa) y azúcares aminorados.

El NI (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) disponible para las plantas generalmente representa entre 2 y 3% del N total (Marschner, 2002). El nitrato (NO_3^-) es la principal fuente de N disponible para las plantas en los suelos aeróbicos. En muchos suelos agrícolas la concentración de NO_3^- se encuentra en un rango entre 1 y 5 mM. Las concentraciones de NH_4^+ en el suelo se encuentran en un rango de entre 20 y 200 μM (Owen y Jones, 2001) (Figura 1.3).

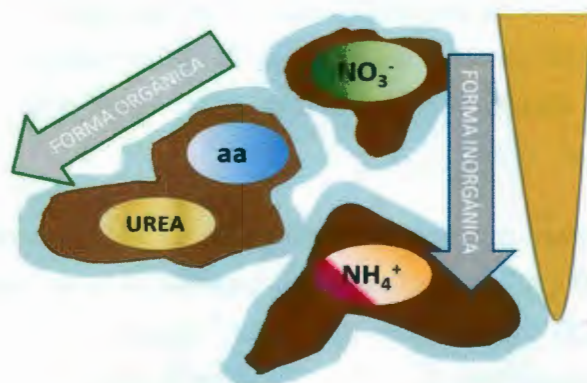


Figura 1.3 Nitrógeno en el suelo. El nitrógeno se encuentra en el suelo en forma orgánica (aa y urea) y en forma inorgánica (NO_3^- y NH_4^+).

1.5 ABSORCIÓN DE NITRATO POR LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS

La absorción de NO_3^- está sujeta a una regulación positiva o de inducción y otra negativa. La última parece depender del nivel de N en la planta. Se ha sugerido que el contenido de los aa en el tallo y en las raíces proporciona un indicativo del nivel de N en la planta y de esta manera las raíces podrían regular la absorción de N (Cooper y Clarkson, 1989).

El NO_3^- es transportado activamente a través de la membrana plasmática de la epidermis y las células corticales de la raíz, pero la absorción neta es el equilibrio entre la entrada activa y la salida pasiva del mismo.

La toma de NO_3^- requiere energía y el paso de dos protones en contra del gradiente electroquímico, por lo que depende del ATP suministrado por la H^+ -ATPasa, que mantiene el gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática (McClure *et al.*, 1990; Meharg y Blatt, 1995; Miller y Smith, 1996).

Para el almacenamiento de NO_3^- en las células vegetales el transporte en la membrana del tonoplasto requiere diferentes mecanismos, sugiriéndose el antiporte con H^+ (Miller y Smith, 1996). El mecanismo de toma de NO_3^- está asociado a una bomba de protones-ATPasa (H^+ -ATPasa) que mantiene el gradiente del potencial electroquímico para permitir el co-transporte (Miller y Cramer, 2004).

La toma de NO_3^- en las células de la raíz ocurre a través de tres sistemas de transporte

que coexisten en las raíces de las plantas superiores: dos sistemas de transporte de alta afinidad (HATS): **1)** HATS constitutivo (cHATS) y **2)** HATS inducible (iHATS) y un sistema de transporte de baja afinidad (LATS) (Siddiqi *et al.*, 1989; King *et al.*, 1993; Glass y Siddiqi, 1995; Zhuo *et al.*, 1999).

Los cHATS se caracterizan por presentar valores de K_m y V_{max} pequeños (típicamente 6 - 20 μM y 0.3 - 0.82 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$, respectivamente). Los iHATS presentan mayores valores de K_m y V_{max} (típicamente 20 - 100 μM y 3 - 8 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$, respectivamente) y son inducidos en horas o días de exposición a NO_3^- . Finalmente, los LATS pueden contribuir significativamente a la toma de NO_3^- a concentraciones mayores de 250 μM , saturándose a concentraciones mayores de 50 mM (Crawford y Glass, 1998).

1.6 ASIMILACIÓN Y METABOLISMO DEL NITRATO EN PLANTAS

Las plantas superiores son organismos autótrofos, que pueden sintetizar sus componentes moleculares orgánicos a partir de nutrientes inorgánicos obtenidos del medio ambiente. Este proceso involucra la absorción de muchos nutrientes minerales y su incorporación en compuestos orgánicos que son esenciales para el crecimiento y desarrollo. Esta incorporación de nutrientes minerales en sustancias orgánicas tales como pigmentos, enzimas, cofactores, lípidos, ácidos nucleicos o aminoácidos se denomina asimilación de nutrientes.

El NO_3^- , una vez internalizado, puede tener diferentes destinos: reducirse hasta NH_4^+ en la raíz, ser traslocado vía xilema hasta otros órganos de la planta para ser metabolizado o almacenado en los mismos, o bien acumularse en las vacuolas de las células de la raíz (Lea y Leegood, 1993).

La asimilación del N requiere una serie compleja de reacciones bioquímicas con un alto costo energético (Figura 1.4). El primer paso de la asimilación de NO_3^- , que se produce tanto en las raíces, como en la parte aérea, implica su reducción a NH_4^+ por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), seguido de la transferencia de amonio al ácido α -cetoglutarico por la acción de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamino oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) (Hochman *et al.*, 1988). Otra enzima que participa en la asimilación del NH_4^+ es la glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual cataliza una reacción reversible, sintetiza o desamina el glutamato.

La NR (EC 1.6.6.1.3) cataliza la reducción de NO_3^- a nitrito (NO_2^-), transfiriéndose dos electrones en dicha reacción. Esta enzima se localiza tanto en la membrana plasmática, como en el citosol (Krämer *et al.*, 1988). La NiR (EC 1.7.7.1), es una enzima que cataliza la reducción de NO_2^- a amonio (NH_4^+). El NH_4^+ se genera gracias a la NiR asimilativa dependiente de NADH, como en *Klebsiella oxytoca*, o bien gracias a una NiR asimilativa que emplea ferredoxina como donador de electrones, como ocurre en cianobacterias (Luque *et al.*, 1993) y en las plantas (Campbell y Kinghorn, 1990).

En las plantas superiores, la NiR dependiente de ferredoxina está presente tanto en los cloroplastos (Coombs *et al.*, 1985), como en los plastidios de tejidos no fotosintéticos, donde la ferredoxina es reducida por la poza de NADPH producido vía el ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Swamy *et al.*, 2005). Esta enzima también puede encontrarse en el citoplasma.

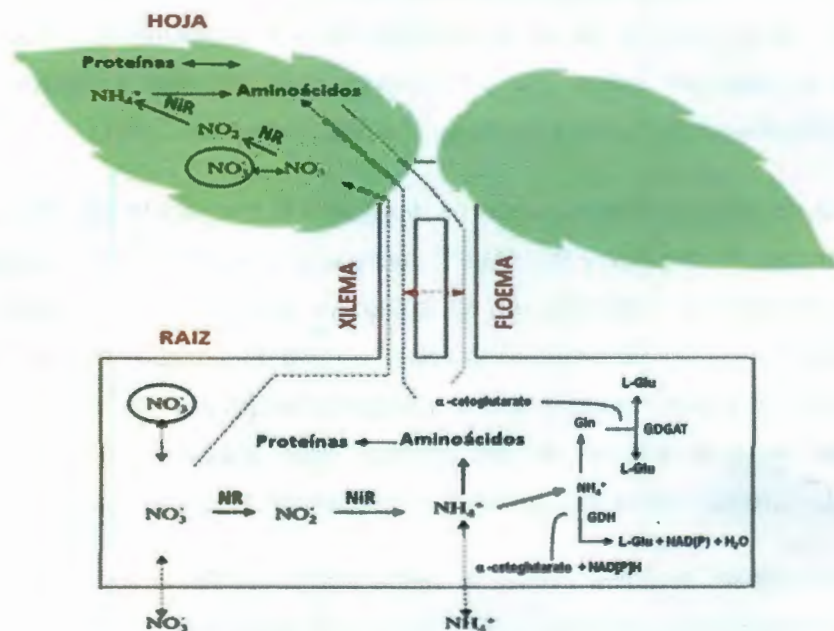


Figura 1.4 Absorción, reducción y acumulación de nitrato en los diferentes tejidos de la planta. El NO_3^- al ser internalizado tiene tres destinos: puede ser metabolizado en la raíz por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), almacenado en vacuola o ser traslocado vía xilema hacia la parte aérea. (Modificado de Lea y Leegood, 1993).

Una gran cantidad de compuestos que se encuentran presentes en las células vegetales

CAPÍTULO I

contienen N, tales como: aminoácidos, nucleósidos fosfatos, componentes de fosfolípidos, proteínas, metabolitos secundarios, hormonas y clorofila, entre otros. Solamente el oxígeno, el carbono y el hidrógeno son elementos más abundantes en las plantas que el N. La mayoría de los ecosistemas naturales y agrícolas, al ser fertilizados con NI, muestran importantes incrementos en la productividad de los cultivos, poniendo en evidencia la importancia de este elemento y que sus concentraciones en el suelo son limitantes (Pereyra-Cardozo, 2001).

1.7 RESPUESTA DEL SISTEMA RADICAL A NITRATO

La absorción neta de nutrientes depende de dos factores: la actividad de absorción y la arquitectura de la raíz. Por lo tanto, la modulación de la arquitectura de la raíz en respuesta a los cambios en la concentración externa de los nutrientes es un proceso de adaptación que permite a las plantas sobrevivir durante períodos de severa deficiencia de los nutrientes. La plasticidad de la arquitectura de las raíces regulada por nutrientes permite que el sistema radical sea optimizado para acceder eficientemente a los nutrientes distribuidos heterogéneamente en el suelo (Tsay *et al.*, 2011).

En el suelo, la disponibilidad de recursos es desigual y la mayoría lo son en un alto grado de heterogeneidad (Lechowicz y Bell, 1991; Jackson y Caldwell, 1993). La disponibilidad espacial y temporal de nutrientes en el suelo no es uniforme, pudiendo variar su concentración en un orden de hasta 1000 veces, en una distancia de centímetros o en un curso de horas, tal y como sucede con el nitrógeno inorgánico (Bloom *et al.*, 2006). El desarrollo del sistema radical en las plantas está altamente relacionado con la disponibilidad y distribución de los nutrientes minerales en el suelo (Zhang y Forde, 2000).

Uno de los primeros estudios sobre la respuesta a la distribución heterogénea de nutrientes, es el reportado por Drew, (1975), en el cual realizaron experimentos con raíces de cebada creciendo en diferentes condiciones heterogéneas. Utilizaron como tratamiento control concentraciones altas del nutriente en las tres secciones expuestas de la raíz (HHH) y en los tratamientos con NO_3^- , K y P, solo en la parte media la raíz estuvo expuesta a altas concentraciones del nutriente respectivo (LHL).

El desarrollo, tanto de la RP como de las RL, fue similar en todas las secciones, mientras que en los tratamientos en donde se encontraba localizada la raíz a concentraciones

bajas del nutriente, el desarrollo de las RL fue pobre, pero se observó que proliferaron abundantemente en el segmento donde se encontraba el nutriente (NO_3^- y PO_4) a una alta concentración (Figura 1.5). Sin embargo, las raíces de cebada fueron insensibles a la presencia de K^+ , ya que se observó una morfología radical similar a la del testigo.

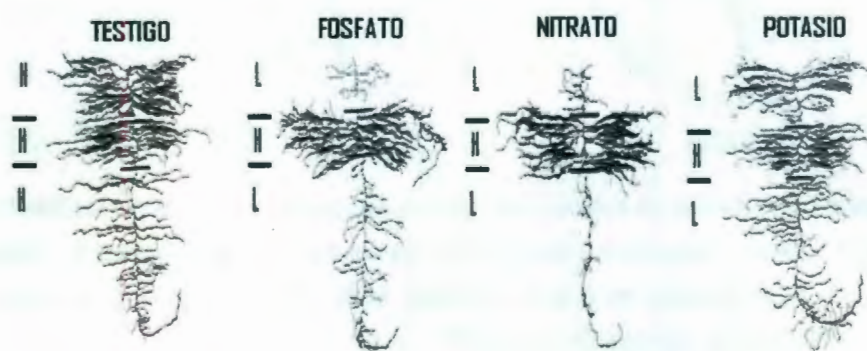


Figura 1.5 Efecto de diferentes nutrientes sobre raíces de *Hordeum vulgare*. Todas las zonas del sistema radical de la planta testigo fueron expuestas uniformemente a una solución concentrada de nutrientes (HHH). En los tratamientos localizados (LHL), solo en el segmento medio la raíz se expuso a la solución completa, los segmentos superior e inferior contenían una solución deficiente en PO_4^- , NO_3^- o K^+ . (Modificado de Drew, 1975).

Zhang y Forde (2000) realizaron experimentos con plántulas de *Arabidopsis thaliana*, en los cuales estudiaron el efecto del NO_3^- en condiciones heterogéneas, suministrando concentraciones basales de NO_3^- ($10 \mu\text{M}$ de NH_4NO_3) en los segmentos superior e inferior y concentraciones mayores del nutriente (1 mM de KNO_3) en el segmento medio. Estos autores encontraron que el NO_3^- estimuló la elongación de las RL, pero no incrementó el número de las mismas en el segmento donde se aplicó el tratamiento (Figura 1.6). Esto también ha sido observado en otras especies, como el trigo, en el cual se estimuló la elongación de las RL (Hackett, 1972) y en el maíz, en el cual se afectó la tasa de extensión y la elongación de estas raíces (Granato y Raper, 1989).

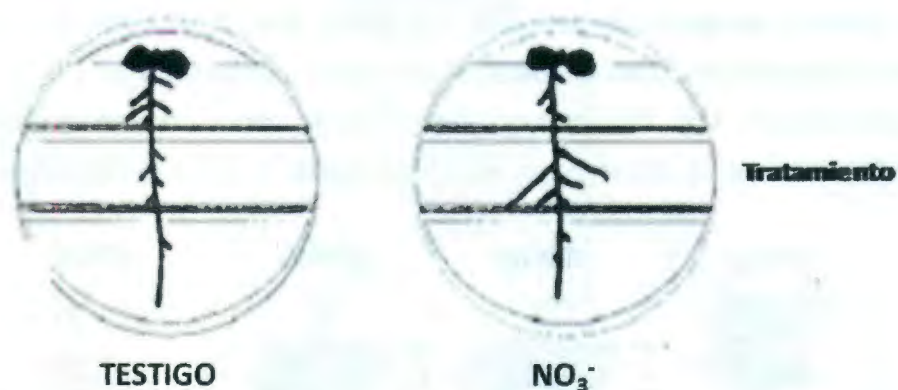


Figura 1.6 Plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a tratamiento localizado de KCl (testigo) o de KNO₃ (tratamiento). Se colocó el sistema radical en cajas de agar segmentadas, en el cual se aplicó 1mM del nutriente en el segmento medio (tomado de Zhang y Forde, 2000).

Por otro lado, en *Arabidopsis* se han observado cambios en la RP en respuesta a condiciones homogéneas de NO₃⁻, detectándose una inhibición a altas concentraciones (50 mM); sin embargo, a concentraciones menores (0.1 y 10 mM) no se ha observado efecto (Signora *et al.*, 2001). De igual manera, Zhang y Forde (1998b) no pudieron observar inhibición en la RP de *Arabidopsis*, incluso a concentraciones altas de NO₃⁻ (50 mM). Una reducción en la longitud de RP en respuesta a NO₃⁻ también ha sido reportada para *Medicago truncatula*, específicamente a una concentración homogénea de 1 mM de NO₃⁻ y después de tres semanas de tratamiento (Yendrek *et al.*, 2010); así como en *Zea mays* a una concentración que fluctuó entre 5 mM y 20 mM de NO₃⁻, dependiendo del genotipo estudiado (Tian *et al.*, 2005).

1.8 NITRATO COMO MOLÉCULA SEÑAL

Existen evidencias que permiten considerar al NO₃⁻ como una molécula señal, debido a que induce la expresión de genes en mutantes que no presentan actividad de la NR (Scheible *et al.*, 1997; Daniel-Vedele *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004). El NO₃⁻ *per se* estimula su propio sistema de transporte (Rao y Rains, 1976), induce la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en su metabolismo (Krouk *et al.*, 2010a), incrementa la actividad meristemática en las RL, y regula la ramificación de la raíz (Drew y Saker, 1975; Zhang y Forde, 1998a y b).

Con base a los resultados observados por Zhang y Forde (1998b), ellos propusieron un modelo de regulación del crecimiento y desarrollo de RL en *A. thaliana*, en el que se plantea la existencia de dos posibles vías de regulación. Por un lado, se postula que el NO_3^- , después de ser internalizado en la célula por transportadores específicos, puede ser metabolizado, o bien almacenado, modificando el balance interno de N/C, provocando una inhibición sistémica sobre el desarrollo y elongación de las RL. Por otro lado, se plantea la presencia de receptores de NO_3^- en la membrana plasmática, que al unirse con el ión, activan una cascada de señales, donde podrían participar el factor de transcripción ANR1, generando una respuesta estimuladora localizada sobre el desarrollo y elongación de las RL (Zhang y Forde, 1998b).

Estudios recientes reportan que la regulación de las RL en respuesta a NO_3^- en *Arabidopsis* involucra una red compleja de eventos coordinados (Tsay *et al.*, 2011). Por un lado, cuando el NO_3^- se encuentra a concentraciones altas en el medio en forma localizada, el transportador CHL1 actúa como receptor, percibiendo la presencia de NO_3^- y, en conjunto con el factor de transcripción ANR1, estimula el desarrollo de las RL. Sin embargo, cuando la concentración de NO_3^- es baja, entonces este transportador se fosforila, y actúa como transportador de alta afinidad. Bajo esta condición, también transporta auxinas, limitando su disponibilidad en el ápice de la raíz y provocando una inhibición en el crecimiento de las RL (Krouk *et al.*, 2010b).

Por otro lado, cuando las concentraciones de NO_3^- son bajas (0.01 a 0.5 mM), pero los contenidos de sacarosa varían, el transportador NRT2.1 también se encuentra involucrado en el desarrollo de las RL. En estas condiciones, el transportador NRT2.1 podría actuar también como un receptor de NO_3^- : cuando la concentración de sacarosa es alta, se reprime el desarrollo de las RL y cuando la concentración de sacarosa es baja actúa en forma positiva sobre la proliferación de RL (Little *et al.*, 2005).

El NO_3^- *per se* también juega un papel importante, estimulando la formación de RL a través del receptor de auxinas AFB3. Este receptor también se regula negativamente por un microRNA, el miR393, que curiosamente está regulado positivamente por los metabolitos producidos después de la asimilación del NO_3^- . El receptor de auxina AFB3, también participa en la función del NO_3^- de revertir el efecto negativo del glutamato sobre el crecimiento de la RP, así como el transportador NRT1.1 (CHL1) en forma fosforilada

CAPÍTULO I

(Figura 1.7). Sin embargo, no todas las especies vegetales responden de manera similar a la heterogeneidad de NO_3^- .

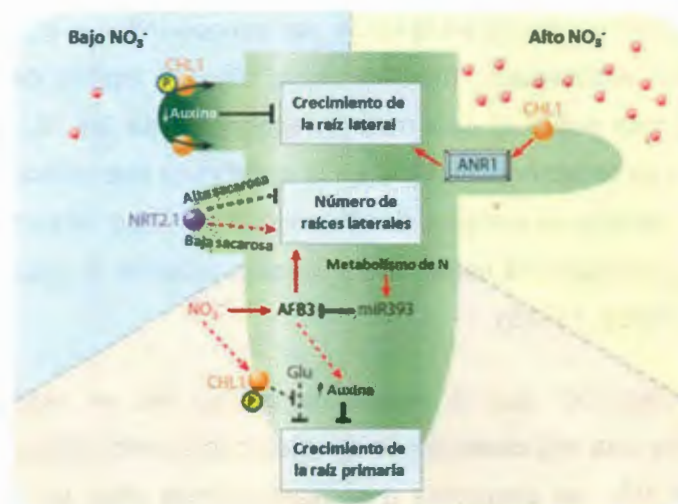


Figura 1.7 Desarrollo de raíces laterales en respuesta a nitrato. El nitrato, dependiendo de las concentraciones en las que se encuentre, regula de manera diferente el crecimiento de las raíces laterales, en la cual están involucrados los transportadores CHL1 y NRT2.1, el factor de transcripción ANR1, el receptor de auxina AFB3, el microRNA miR393 y los productos del metabolismo del nitrógeno (modificado de Tsay *et al.*, 2011).

Las vías de señalización activadas por NO_3^- en la detección y activación de las distintas respuestas a la presencia de dicho ión, están lejos de estar completamente caracterizadas. Sin embargo, varios componentes moleculares de estas vías han sido identificados, en su mayoría en la planta modelo *A. thaliana* (Bouguyon *et al.*, 2012). Por ejemplo, el factor de transcripción NLP7 (Castaings *et al.*, 2009), los factores de transcripción LBD37, 38, 39 (Rubin *et al.*, 2009), las proteínas de membrana/receptor de etileno EIN2/ETR1 (Tian *et al.*, 2009) y la cinasa CIPK8 (Hu *et al.*, 2009) se ha demostrado que participan en la regulación de la expresión génica en respuesta a NO_3^- .

Se sugiere que todas estas proteínas están implicadas en las vías de transducción de señales de NO_3^- .

1.9 FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLANTAS

Las plantas, como seres inmóviles, constantemente responden y se adaptan a los cambios que se producen en el ambiente que les rodea y pueden así crecer y desarrollarse normalmente. Son capaces de percibir los cambios que se producen en el ambiente y de transmitir de forma específica esta información a la maquinaria genética del núcleo, para regular la respuesta (Lee *et al.*, 2011). Distintos grupos de investigación han identificado y caracterizado diversas moléculas de señalización en las plantas y se ha puesto de manifiesto que la modificación post-traducciona de proteínas juega un papel central en las diferentes cascadas de señalización. En particular, la fosforilación y desfosforilación de proteínas están implicadas en la mayoría de las rutas de señalización (Luan, 2003; Huber, 2007., Lee *et al.*, 2011).

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales de las células eucariotas que más frecuentemente influyen en numerosos procesos celulares (Steen *et al.*, 2006). Se ha estimado que un tercio de todas las proteínas en una célula eucariota son fosforiladas (Hubbard y Cohen, 1993).

Las respuestas de una planta a un determinado estímulo resulta en cambios inter e intracelulares, produciendo una respuesta final particular. Para estudiar las diferentes vías de respuesta a estímulos, éstas se pueden dividir arbitrariamente en cinco grupos, aquéllas involucradas en: las repuestas a estímulos luminosos, las respuestas a hormonas, la regulación del ciclo celular, las respuestas a patógenos y depredadores y las interacciones célula-célula (Armienta-Aldana, 2000).

En cada uno de estos mecanismos la planta percibe el estímulo primario a través de receptores específicos que pueden o no estar localizados en la membrana plasmática. Este estímulo, o primer mensajero, desencadena el resto de señales y la activación de elementos transductores intermediarios hasta obtener una respuesta final (Heldin, 1995).

En todas las vías de transducción de señales en plantas y en cualquier otro organismo, los elementos que intervienen en ellas son de importancia fundamental. De estos elementos, las proteínas cinasas y fosfatasas, presentan una relevancia especial, ya que la actividad de muchas proteínas está regulada por su estado de fosforilación.

CAPÍTULO I

La fosforilación de las proteínas ocurre mayormente sobre los residuos de aminoácidos tales como serina, treonina y tirosina; sin embargo, otros aminoácidos tales como, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico también pueden ser fosforilados (Thomason y Kay, 2000).

La transferencia de los grupos fosfatos a las proteínas está catalizada por una variedad de enzimas que comparten ciertas características y se agrupan en una clase de proteínas, conocidas como proteínas cinasas. Las semejanzas de las proteínas cinasas se derivan de su capacidad para tomar un fosfato del ATP y colocarlo en una cadena lateral de un residuo aminoacídico de una proteína (Figura 1.8). Los grupos hidroxilo (^-OH) de los aminoácidos serina, treonina, tirosina o el (NH) de la histidina son el blanco más común (Lee *et al.*, 2009).

Una segunda clase de enzimas es responsable de la reacción inversa, en la que los fosfatos se eliminan de una proteína, éstas se denominan proteínas fosfatasas. El amplio uso de este mecanismo de control es evidente por el gran número de cinasas y fosfatasas que se encuentran en un organismo (Sedko, 2003). Se estima que del 1 al 3 % de los genes funcionales en células eucariotas codifican para proteínas cinasas, lo que sugiere que están involucradas en muchos aspectos de la regulación celular y el metabolismo (Stone y Walker, 1995).

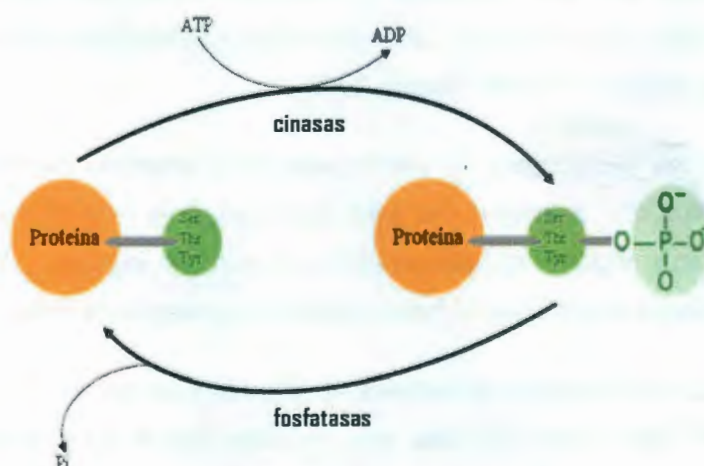


Figura 1.8 Proceso de fosforilación/desfosforilación de proteínas. Un grupo fosfato a partir del ATP es transferido por las cinasas a una proteína sustrato. Las proteínas fosfatasas revierten esta acción (modificado de Sedko, 2003).

Hay un gran número de proteínas cinasas que tienen funciones significativas en los procesos bioquímicos y fisiológicos que conllevan al desarrollo, permitiendo una respuesta particular de acuerdo al estímulo que las activan. En las plantas, se ha reportado la presencia de cinasas dependientes de calcio (CDPKs), cinasas dependientes de calcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)PKs, cinasas dependientes de calcio/fosfolípidos, cinasa C, cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasa), cinasas parecidas a receptores, cinasas dependientes de ciclina (cdck), cinasas dependientes de AMPc (PKA), entre otras. Las cinasas también se clasifican dependiendo del residuo aminoacídico que fosforilan en las proteínas como cinasas de Ser/Thr, de Tyr y de His (Sopory y Munshi, 1998).

La formación del complejo receptor/señal, induce señales posteriores que generan mensajeros, tales como el Ca^{2+} , el GMPc, los fosfolípidos, los policationes, los cuales pueden activar cinasas y fosfatasaes específicas (Mulligan *et al.*, 1997). Estos cambios en el estatus de fosforilación de los sustratos proteicos blancos, traen como consecuencia cambios en las funciones celulares, bioquímicas, fisiológicas y en los niveles de desarrollo (Armienta-Aldana, 2000).

La actividad de muchas proteínas está determinada por su estado de fosforilación (Armienta-Aldana, 2000). La unión o remoción del grupo fosfato de una proteína puede tener profundos efectos sobre la actividad y propiedades de esta proteína. Por ejemplo, la fosforilación de proteínas permite la regulación de las actividades enzimáticas, mediante cambios alostéricos conformacionales o bloqueando directamente el acceso al sitio catalítico de la enzima (Luan, 2003).

En la mayor parte de las vías de transducción de señales están involucrados fenómenos de fosforilación/desfosforilación de proteínas; por ejemplo, dos de los tres tipos de receptores de luz conocidos en plantas (los fitocromos y las fototropinas) son cinasas reguladas por la luz (Mulligan *et al.*, 1997). Los receptores membranales más diversos en las células vegetales son los receptores con actividad de cinasa (RLKs), los cuales perciben diversas señales como las hormonales, de patógenos, de células vecinas, entre otros (Iten *et al.*, 1999). En varias vías de transducción de señales se pueden encontrar cascadas de MAP cinasas o CDPKs.

CAPÍTULO I

Actualmente, se sabe que en muchos casos la fosforilación/desfosforilación de proteínas, también tiene una importante función en la regulación de la expresión de genes, probablemente regulando las propiedades de unión al ADN de factores de transcripción. La fosforilación de éstos produce dos grandes efectos: a) permite la translocación de éstos del citoplasma al núcleo o b) puede influir en la actividad de unión de los mismos al ADN (Sopory y Munshi, 1998).

1.10 RELACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN CON LA RESPUESTA A NITRATO

El NO_3^- es una señal que afecta el metabolismo del N y del C, así como el crecimiento de órganos y el desarrollo de las plantas (Crawford y Forde, 2002; Forde, 2002; Stitt *et al.*, 2002). Estos efectos están mediados, por lo menos en parte, por cambios en la expresión de genes (Stitt, 1999; Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000,2003; Stitt *et al.*, 2002). En cuestión de minutos, el NO_3^- induce la expresión de cientos de genes que codifican proteínas, incluyendo a los de sus propios transportadores (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004).

En diferentes trabajos se ha demostrado que el NO_3^- regula la expresión de muchos genes reguladores, incluyendo aquellos que codifican factores de transcripción y cinasas en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2000; 2003) y en tomate (Wang *et al.*, 2001). Sin embargo, no se han hecho estudios que relacionen la fosforilación de proteínas y el desarrollo radical en respuesta a NO_3^- .

La fosforilación de transportadores de nitrato se ha observado en *A. thaliana*, donde se ha reportado que el transportador de NO_3^- de baja afinidad NRT1.1 (CHL1), es capaz de regular su transporte por medio de la fosforilación que ocurre en el residuo aminoácido treonina 101 (T101) por la proteína cinasa CIPK23, cuando las concentraciones de NO_3^- son bajas, lo que le permite al transportador cambiar de baja a alta afinidad (Wang *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2009). Se sabe que este transportador está situado en la membrana y que para esta localización es necesario el residuo de prolina 492 (P492) (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011) (Figura 1.9).

Por otro lado, se ha reportado que el transportador de NO_3^- de alta afinidad Ynt1, de *Hansenula polymorpha*, se fosforila por la proteína cinasa Npr1 en el residuo de serina 246 (S246), lo cual provoca que el transportador se sitúe en la membrana para poder

regular el transporte a bajas concentraciones de NO_3^- (Navarro *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2011). Una serie de proteínas cinasas, con motivos conservados de reconocimiento en los dominios N-terminal y C-terminal, se han identificado en el transportador de NO_3^- de alta afinidad en cebada (HvNRT2.1) (Forde, 2000), siendo similar a los de *Arabidopsis* (AtNRT1.1) (Liu y Tsay, 2003), lo cual les permite regular el transporte de NO_3^- a través de la fosforilación del transportador.

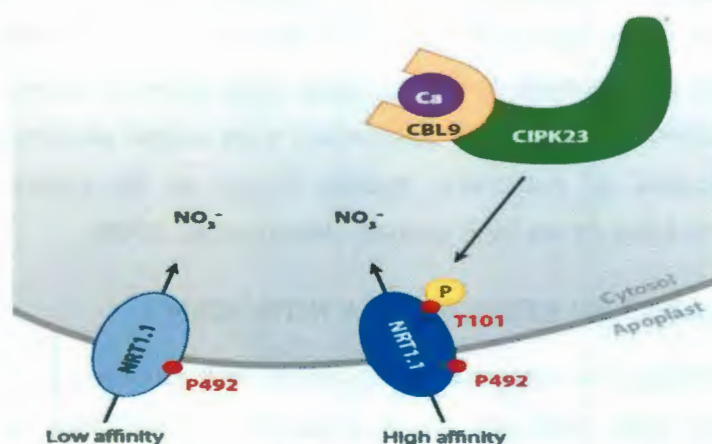


Figura 1.9 Modelo de regulación del transportador AtNRT1.1 por fosforilación. La presencia del aminoácido P492 es importante para que el transportador se sitúe en la membrana. Una vez en la membrana, cuando las concentraciones de NO_3^- bajan, el transportador es fosforilado por la proteína cinasa CIPK23 en el aminoácido T101 y participa así en el transporte de alta afinidad (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011).

1.11 LAS MAP CINASAS EN PLANTAS

En plantas se han identificado y clasificado distintos tipos de proteínas cinasas. Una de las categorías más importantes es la de las MAP cinasas (o MAPK, siglas correspondientes al término en inglés *mitogen activated protein kinase*), que se encuentran distribuidas tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula y participan en distintas rutas de transducción de señales (Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

La transducción de señales mediante las MAP cinasas tiene lugar a través de una cascada de señalización, formada generalmente por tres cinasas que se activan unas a otras de forma consecutiva mediante reacciones de fosforilación. El último componente de

CAPÍTULO I

la serie son las MAP cinasas (MAPK), que son fosforiladas y activadas por una MAP cinasa cinasa (MAPK cinasa, MAPKK, MEK o MAP2K), la cual ha sido a su vez activada por una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKK cinasa, MAPKKK, MEKK o MAP3K) (Raman y Cobb, 2003). En todos los eucariotas, la señalización a través de las cascadas de las MAP cinasas da lugar a un amplio número de respuestas celulares, incluyendo la división y la diferenciación celular así como la respuesta a distintos tipos de estrés. La señalización para la división celular y la respuesta a estrés en plantas se encuentra mediada por MAP cinasas y, de igual modo, las auxinas, el ácido abscísico y posiblemente el etileno y las citocininas también utilizan rutas de MAP cinasas. Gran parte del estrés de origen biótico (patógenos y elicitores derivados de patógenos) y de origen abiótico (salinidad, bajas temperaturas, escases de nutrientes) pueden inducir en las plantas respuestas de defensa a través de rutas de las MAP cinasas (Mishra *et al.*, 2006).

1.11.1 MAP CINASAS EN RESPUESTA A NITRÓGENO

En *Aspergillus fumigatus* se encontró una proteína MAP cinasa que responde a estrés osmótico, también está implicada en la detección de nutrición, ya que regula la germinación de conidios en respuesta a la fuente de N y se activa en respuesta a un déficit de C o N durante el crecimiento vegetativo (Xue *et al.*, 2004).

Recientemente se reportó la activación de proteínas MAP cinasas en *Arabidopsis* en respuesta a fuentes de N. En este estudio las plántulas se sometieron a una ausencia de N y, posteriormente se les restableció la fuente de N. Las evaluaciones fueron realizadas a tiempos cortos de exposición, usando como fuente de N: NO_3^- y NH_4^+ . En este trabajo se reportó la identificación de dos MAP cinasas (AT1G09000.1 y AT4G29810.1) en respuesta a una nutrición con NH_4^+ y una MAP cinasa (AT4G29810.1) en respuesta a la nutrición con NO_3^- (Engelsberger y Schulze, 2012).

Los resultados de la literatura presentados anteriormente sugieren que la fosforilación de proteínas puede ser un evento importante en la respuesta a NO_3^- , aunque esto no ha sido estudiado a gran escala en ninguna especie vegetal.

1.12 CHILE HABANERO

1.12.1 IMPORTANCIA Y ORIGEN

Las familias Solanáceae y Cucurbitáceae agrupan a las especies hortícolas de mayor importancia que se cultivan en Yucatán. Dentro de las Solanáceas, el cultivo del chile es de particular importancia para el estado por su gran demanda para la condimentación de platillos regionales y por su demanda actual en los mercados nacionales e internacionales. Todos los chiles cultivados pertenecen al género *Capsicum*, dentro del cual se han reconocido cinco especies domesticadas (*C. baccatum* L., *C. pubescens* R., *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* L.). El chile habanero (*C. chinense* Jacq.) es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate (Tun, 2001).

La importancia económica del chile se basa principalmente en el aumento en la utilización de sus frutos que ha experimentado desde hace algunos años. Según datos de la FAO, el chile es a nivel mundial el quinto producto hortícola, atendiendo a su superficie cultivada. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye con más de un 90% al volumen de producción estatal (Borges-Gómez *et al.*, 2008).

Generalmente, su fruto se comercializa en fresco para consumo directo o como una materia prima para procesamiento industrial. Sin embargo, la demanda por frutos de alta calidad, el polvo, las pastas, las salsas y otros derivados, excede la oferta actual de los productores, procesadores e industriales del chile habanero de Yucatán (Leyva Morales *et al.*, 2005). El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica; se ha demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, vitaminas como la C, E y A, así como de minerales (Guzmán *et al.*, 2004).

Las investigaciones botánicas confirman el origen y domesticación del género *Capsicum* en el Nuevo Mundo. No hay evidencia de su existencia en otros continentes antes del descubrimiento de América (Long-Solís, 1998).

1.12.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación del cultivo de chile puede establecerse fácilmente hasta el nivel de género (*Capsicum*), pero debido a su gran diversidad, la diferenciación a nivel de especie y

CAPÍTULO I

variedad es muy complicada. La clasificación taxonómica para el chile habanero, de acuerdo a Tun (2001), es la siguiente:

Reino	Plantas
Clase	Angiosperma
Subclase	Eudicotiledonea
Superorden	Simpetala
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>C. chinense</i> Jacq.

1.12.3 ANTECEDENTES DEL EFECTO DEL NITRATO SOBRE EL SISTEMA RADICAL DE *Capsicum chinense* Jacq.

En trabajos realizados en nuestro grupo, se ha observado que el chile habanero al estar en presencia de NO_3^- , modifica el crecimiento y desarrollo de su sistema radicular, aumentando el crecimiento de RL (Celis-Arámburo *et al.*, 2011). El NO_3^- también aumentó el número de las RL en el segmento en el que se encontraba dicho nutriente, al igual que se observó un desarrollo mayor en la cantidad de pelos radiculares, como se muestra en la figura 1.10.

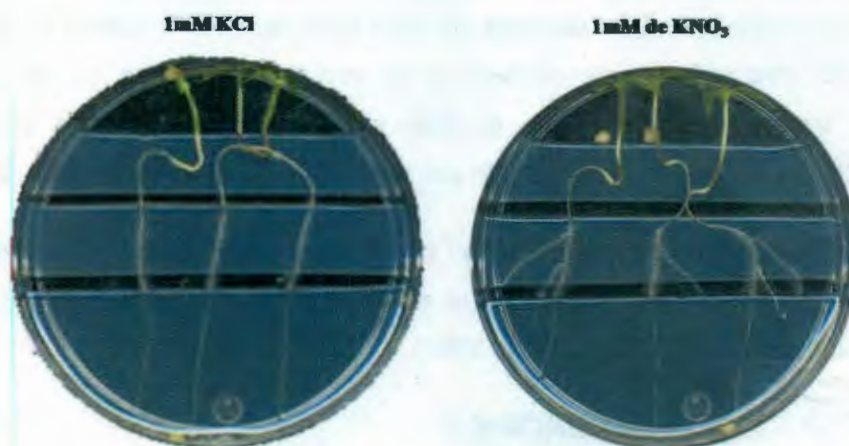


Figura 1.10 Efecto del nitrato sobre el sistema radical de *Capsicum chinense*. La fotografía representa plántulas sometidas a condiciones heterogéneas de

nitrate durante 10 días. El nutriente (1 mM de KNO_3) o el testigo (1 mM de KCl) se aplicó en el segmento medio (Celis Arámburo, 2011).

También, al exponer a las raíces a 1 mM de NO_3^- durante tiempos cortos (0-4 horas), se observaron modificaciones en la expresión de los genes que codifican a diferentes proteínas: una de transporte vacuolar (VPS6), una ATPasa vacuolar (V-ATPasa), una proteína 14-3-3 y la NR (Celis-Arámburo, 2011).

A partir de estos resultados fisiológicos y moleculares, se tiene el interés de estudiar cuales son los mecanismos involucrados en dicha respuesta sobre el crecimiento.

CAPÍTULO I

JUSTIFICACIÓN

La respuesta fisiológica observada en chile habanero, indica que la raíz de esta especie puede responder en parte a NO_3^- a través de vías diferentes a los de la planta modelo *Arabidopsis* (Celis-Aramburo *et al.*, 2011). A partir de ello, resulta interesante utilizar a chile habanero como modelo de estudio para profundizar en los mecanismos bioquímicos que poseen las plantas para responder a ambientes fluctuantes de N en el suelo. Los resultados que se obtengan a partir de estos estudios pueden ser novedosos y contribuirán a aumentar el conocimiento en este campo, particularmente, en una especie de interés agronómico.

HIPÓTESIS

Si el NO_3^- induce la expresión de genes que codifican proteínas cinasas y fosfatasa y provoca cambios morfológicos en el sistema radicular de algunas plantas, entonces es posible que se observen cambios en los patrones de fosforilación de proteínas al exponer a plántulas de chile habanero a este nutriente.

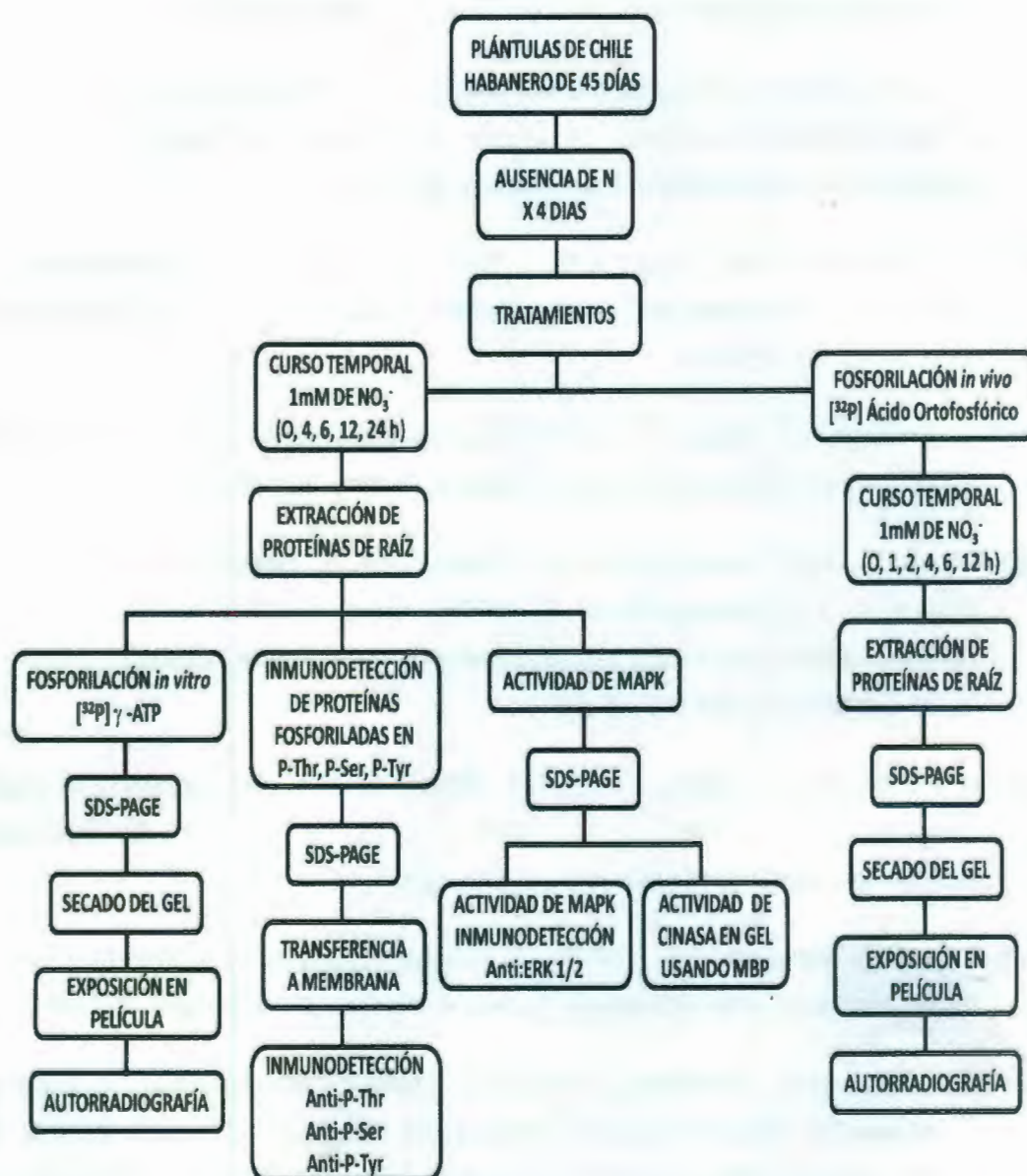
OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en la fosforilación de proteínas de raíces de chile habanero en respuesta a la exposición a nitrato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad de proteínas cinasas en general y particularmente de las MAPK en extractos proteicos de raíces de *C. chinense* Jacq. expuestas a NO_3^- .
- Identificar el tipo de residuo aminoacídico que se fosforila en las proteínas en respuesta a NO_3^- .
- Caracterizar el perfil de proteínas que se fosforilan *in vivo*, en respuesta a la exposición a tiempos cortos a NO_3^- .

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO I

BIBLIOGRAFÍA

- Armienta-Aldana E. (2000). Fosforilación en plantas. Tesis de Doctorado en Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria. pp. 121.
- Barbier-Brygoo A., Filleur S., Frachisse J-M., Gambale F., Thomine S. y Wege S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular basis to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 25-51.
- Bloom A.J., Meyerhoff P.A., Taylor A.R. y Rost T.L. (2003). Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 416-431.
- Bloom A.J., Frensch, J. y Taylor, A.R. (2006) Influence of inorganic nitrogen and pH on the elongation of maize seminal roots. *Annals of Botany*. 97: 867-873.
- Borges-Gómez L., Cervantes-Cárdenas L., Ruiz-Novelo J., Soria-Fregoso M., Reyes-Oregel V. y Villanueva-Couoh E. (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana*, 28: 35-41.
- Bouguyon E., Gojon A. y Nacry P. (2012). Nitrate sensing and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.004.
- Campbell W.H. y Kinghorn J.R. (1990). Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends in Biochemical Sciences*, 15: 315-319.
- Castaings L., Camargo A., Pocholle D., Gaudon V., Texier Y., Boutet-Mercey S., Taconnat L., Renou J.P., Daniel-Vedele F., Fernandez E., Meyer C. y Krapp A. (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 57: 426-435.
- Celis-Arámburo T. de J. (2011). Efecto de la distribución heterogénea de nitrato sobre el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

- Celis-Arámburo T. de J., Carrillo-Pech M., Castro-Concha L.A., Miranda-Ham M. de L., Martínez-Estévez M. y Echevarría-Machado I. (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49:1456-64.
- Clark G.B., Thompson G. y Roux S.J. (2001). Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Current Science*, 80: 170-177.
- Coombs J., Hall D.O., Long S.P. y Scurlock J.M.O. (1985). Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Second edition, pp: 165.
- Cooper H.D. y Clarkson D.T. (1989). Cycling amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals. A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal Experimental Botany*, 40: 753-762.
- Crawford N. y Glass A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trend in Plant Science*, 3: 389-395.
- Daniel-Vedele F., Filleur S. y Caboche M. (1998). Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion Plant Biology*, 1: 235-239.
- Davies W., Tardieu F. y Trejo C. (1994). How do chemical signals work in plants that grow in drying soil? *Plant Physiology*, 104: 309-314.
- Drew M.C. (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytologist*, 75: 479-490.
- Drew M.C. y Saker L.R. (1975). Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates of nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system. *Journal of Experimental Botany*, 26: 79-90.
- Engelsberger W.R. y Schulze W. X. (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 69: 978-99.

CAPÍTULO I

Forde B.G. (2002). The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany*, 53: 39-43.

Forde, B.G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 219-235.

Glass A.D.M. y Siddiqi M.Y. (1995). Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava HS, Singh RP, eds. Nitrogen nutrition in higher plants. New Delhi: Associated Publishing Company, pp. 21-56.

Granato T.C. y Raper C.D. (1989). Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *Journal of Experimental Botany*, 40: 263-275.

Guzmán M.S., Torres I., Gonzáles M., Mora M.A., Herrera M.G. y Hernández D. (2004). Análisis preliminar de compuestos fenólicos y capsaicinoides en variedades de chile con diferente capacidad pungente. Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya. Primera Convención Mundial del Chile 2004. 115-122.

Hackett C. (1972). A method of applying nutrients locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24: 1169-1180.

Heldin C.H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80: 213-223.

Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C. y Tsay Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138: 1184-1194.

Hochman A., Nissany A. y Azimur M. (1988). Nitrate reduction and assimilation by moderately halophilic, halotolerant bacterium Ba₁. *Biochimica et Biophysica Acta*, 965: 82-89.

Hu H.C., Wang Y.Y. y Tsay Y.F. (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant Journal*, 57: 264-278.

- Hubbard M.J. y Cohen P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochemistry Science*, 18: 172-177.
- Huber SC (2007). Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 35: 28-32.
- Iten M., Hoffmann T. y Grill E. (1999). Receptors and signaling components of plant hormones. *Journal of Receptors and Signal Transduction Research*, 19: 41-58.
- Jackson M. (1997). Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. *Trends in Plant Science*, 2: 22-28.
- Jackson R.B. y Caldwell M.M. (1993) Geostatistical patterns of soil heterogeneity round individual perennial plants. *Journal of Ecology* 81: 683-692.
- King B.J., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Warner R.L. y Glass A.D.M. (1993). Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiology*, 102: 1279-1286.
- Kolek J. y Kozinka V. (1992). *Physiology of the plant root system*. Fourth edition, pp. 380.
- Krämer E., Tischner R. y Schmidt A. (1988). Regulation of assimilatory nitrate at the level of nitrite in *Chlorella fusca*. *Planta*, 176: 28-35.
- Krouk G., Crawford N.M., Coruzzi G.M. y Tsay Y.F. (2010a). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 266-273.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P. y Gojon A. (2010b). Nitrate and auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell*, 18: 927-937.
- Lea P.J. y Leegood R.C. (1993). *Plant biochemistry and molecular biology*. Wiley & Sons. American Society of Plant Physiologists, fourth edition, pp. 297.

CAPÍTULO I

- Lechowicz M.J. y Bell G. (1991) The ecology and genetics of fitness in forest plants. II. Microspatial heterogeneity of the edaphic environment. *Journal of Ecology* 79: 687-696.
- Lee T-Y., Hsu J.B., Chang W-C., Wang T-Y., Hsu P-C. y Huang H-D. (2009). A comprehensive resource for integrating and displaying protein post-translational modifications. *Bio Med Central, Research Notes*, 2:111.
- Lee T-Y., Bretaña N.A. y Lu C-T. (2011). PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *Bio Med Central, Bioinformatics*, 12: 261-273.
- Leyva-Morales C., Magaña-Magaña M., Góngora-González S. y Pérez-Miranda L.A. (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Estudio de la trayectoria y prospectivas de los mercados del chile habanero. INIFAP-SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mocochoá, Yucatán; México.
- Little D.Y., Rao H., Oliva S., Daniel-Vedele F., Krapp A. y Malamy J.E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *PNAS of the United States of America*, 102: 13693-13698.
- Liu K. H. y Tsay Y. F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22: 1005–1013.
- Long-Solís J. (1998). *Capsicum* y cultura: la historia del chilli. segunda edición. Fondo de Cultura Económica, pp.146.
- López-Bucio J., Cruz Ramírez A. y Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 280-287.
- Luan S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annual Review Plant Biology*, 54: 63-92.

- Luque I., Flores E. y Herrero A. (1993). Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Molecular Biology*, 21: 1201-1205.
- Marschner H. (2002). Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic press. Great Britain, pp. 31-35.
- Martín Y., González Y.V., Cabrera E., Rodríguez C. y Siverio J.M. (2011). Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *Journal Biology Chemistry*, 286: 27225-27235.
- McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M. y Shaff J.E. (1990). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiology*, 93: 281-289.
- Meharg A. y Blatt M. (1995). NO_3^- transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: Kinetic control by pH and membrane voltage. *Journal Membrane Biology*, 145: 49-66.
- Mengel K. y Kirkby E.A. (2001) Principles of Plant Nutrition. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers, pp. 420
- Miller A.J. y Cramer M.D. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 274: 1-36.
- Miller A.J. y Smith S.J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal Experimental Botany*, 47: 843-854.
- Mishra N.S., Tuteja R. y Tuteja N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452: 55-68.
- Mouchel C.F., Briggs G.C. y Hardtke C.S. (2004). Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies *brevis radix*, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes & Development*, 18: 700-714.

CAPÍTULO I

Mulligan R.M, Chory J., Ecker J.R. (1997). Signalling in plants. PNAS of the United States of America, 94: 2793-2795.

Navarro F. J, Yuse M. y Siverio J. M. (2008). Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. Journal of Biological Chemistry, 31208-31217.

Owen A.G. y Jones D.L. (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. Soil Biology Biochemistry, 33: 651-657.

Pereyra-Cardozo M. (2001). Asimilación del nitrato en plantas. Tesis de doctorado en ciencias, Facultad de Agronomía. Universidad de la Pampa.

Raman M. y Cobb M.H. (2003). MAP kinase modules: many roads home. Current Biology, 13:886-888.

Ramírez G., Góngora S., Pérez L., Chel L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J. y López H. (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP-SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mococho, Yucatán; México.

Rao K.P. y Rains D.W. (1976). Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. Plant Physiology, 57: 55-58.

Rubin G., Tohge T., Matsuda F., Saito K. y Scheible W. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. Plant Cell, 21:3567-84.

Scheible W., González A., Lauerer M., Muller-Rober B., Caboche M. y Stitt M. (1997). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. Plant Cell, 9: 783-798.

Scheible W., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C. y Osuna D. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular

- growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136: 2483-2499.
- Schiefelbein, J. W. y Benfey, P. N. (1991). The development of plant roots: new approaches to underground problems. *Plant Cell*, 3: 1147-1154.
- Sedko D. (2003). Protein Phosphorylation: a global regulator of cellular activity. *The science Creative Quarterly*, 73:121-125.
- Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J. y Fernando M. (1989). Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{13}\text{NO}_3^{-1}$. *Plant Physiology*, 90: 806-813.
- Signora L., Smet I., Foyer C.H. y Zhang H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 28: 1-9.
- Silva B. (2002). Apuntes de cátedra de fertilidad y fertilizantes. Escuela de agronomía, universidad Mayor Santiago, Chile. 67-68.
- Sopory S.K. y Munshi M. (1998). Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews Plant Science*, 3: 245-318.
- Steen H., Jebanathirajah J.A., Rush J., Morrice N., Kirschner M.W. (2006). Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Molecular Cell Proteomics*, 5: 172-181.
- Stitt M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion Plant Biology*, 2: 178-186.
- Stitt M., Muller C., Matt P., Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W.-R. y Krapp A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal Experimental Botany*, 53: 959-970.

CAPÍTULO I

Stevenson F. J. (1982). *Organic forms of soil nitrogen*. (ed). Nitrogen in agricultural soils. Monography, American Society of Agronomy, Madison Wisconsin, USA. 22: 383– 411.

Stone J.M. y Walker J.C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology*, 108: 451-457.

Swamy U., Wang M., Tripathy J.N., Kim S-K., Hirasawa M., Knaff D.B. y Allen J.P. (2005). Structure of spinach nitrite reductase: Implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur:siroheme cofactor. *Biochemistry*, 44: 16054-16063.

Thomason P. y Kay R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of Cell Science*, 113: 3141-3150.

Tian Q.Y., Chen F.J., Zhang F.S. y Mi G.H. (2005). Possible involvement of cytokinin in nitrate-mediated root growth in maize, *Plant Soil*, 100: 1-12.

Tian Q.Y., Sun P. y Zhang W.H. (2009). Ethylene is involved in nitrate dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 184: 918-931.

Tisdale S., y Nelson W.L. (1991). *Fertilidad de los suelos y fertilizantes*. Primera edición. Editorial Hispano americana, pp. 760.

Tsay Y-F., Ho C-H., Chen H-Y. y Lin S-H. (2011). Integration of nitrogen and potassium signaling. *Annual Reviews Plant Biology*, 62: 207-26.

Tun J.C. (2001). *Chile habanero, características y tecnología de producción*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Yucatán, México (URI: <http://hdl.handle.net/123456789/3030>)

Vidal E.A., Araus V., Lu C., Parry G., Green P.J., Coruzzi G.M. y Gutierrez R.A. (2010). Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 107: 4477-4482.

- Walch-Liu P., Neumann G. y Bangerth E.C. (2000). Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 51: 227-237.
- Wang R., Liu D. y Crawford N. M. (1998). The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Plant Biology*, 95: 15134-15139.
- Wang R., Guegler K., Labrie S.T. y Cradford N.M. (2000). Genomics analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell*, 12: 1491-1510.
- Wang R., Okamoto M., Xing X. y Cradford N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* root and shoot reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol.* 136: 2512-2522.
- Wang R., Tischner R., Gutiérrez R., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G. y Crawford N.M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136: 2512-2522.
- Wang Y-H., Garvin D.F. y Kochian L.V. (2001). Nitrate-induced genes in tomato roots: array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 127: 345-359.
- Xue Tao., Ngyen K., Romans A., y May G. (2004). A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigates*. *Eukariotic Cell*, 3:557-560.
- Yendrek C.R., Lee Y.C., Morris V., Liang Y., Pislariu C.I., Burkart G., Meckfessel M.HSalehin., M., Kessler H., Wessler H., Lloyd M., Lutton H., Teillet A., Sherrier D.J., Journet E.P., Harris J.M. y Dickstein R. (2010). A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 62: 100-112.
- Zhang H. y Forde B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*, 51: 51-59.

CAPÍTULO I

- Zhang T., Liu Y., Yang T., Zhang L., Xu S., Xue L. y An L. (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology Biochemistry*, 44: 274-283.
- Zhang H. y Forde B.G. (1998a) Response: Nitrate and root branching. *Trends in Plant Science Research News*, 3: 204-205.
- Zhang H. y Forde B.G. (1998b). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279: 407-409.
- Zhuo D., Okamoto M., Vidmar J.J. y Glass A.D.M. (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2.1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 17: 563-568.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN *in vitro* DE PROTEÍNAS Y DE LA ACTIVIDAD DE LAS MAP KINASAS DE RAÍCES DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO

2.1 INTRODUCCIÓN

En los organismos vivos hay diferentes procesos que, aunque utilizados para fines distintos, están mediados por mecanismos comunes; un ejemplo de esto es la activación o inactivación de procesos mediante la fosforilación de proteínas por proteínas cinasas, las cuales están implicadas en la mayoría de las rutas de señalización (Clark *et al.*, 2001; Hardie, 1999; Luan, 2003). La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales de las células eucariotas que influyen con mayor frecuencia en numerosos procesos celulares (Steen *et al.*, 2006), ya que tiene un papel importante en el metabolismo y en la transducción de señales.

La fosforilación ocurre mayormente sobre residuos de aminoácidos tales como serina, treonina y tirosina; sin embargo, otros aminoácidos como, la histidina, el ácido aspártico y el ácido glutámico, pueden ser fosforilados (Thomason y Kay, 2000). Alrededor de un tercio de todas las proteínas en una célula eucariota son fosforiladas (Hubbard *et al.*, 1993) y se estima que del 1 al 3% de los genes funcionales en células eucariotas codifican para proteínas cinasas, lo que sugiere que están involucrados en muchos aspectos de la regulación celular y el metabolismo (Stone *et al.*, 1995).

Uno de los eventos en los que se comienza a elucidar la función de la fosforilación de proteínas es aquel que involucra la respuesta de las raíces a N, particularmente a NO_3^- (Ho *et al.*, 2009).

El NO_3^- es una molécula señal que afecta el metabolismo del N y está involucrado en el crecimiento de órganos y el desarrollo de las plantas (Crawford y Forde, 2002; Forde, 2002; Stitt *et al.*, 2002). Estos efectos están mediados, en parte, por cambios en la expresión de genes (Stitt, 1999; Wang *et al.*, 2000; 2001; 2003; Stitt *et al.*, 2002). En cuestión de minutos, el NO_3^- induce la expresión de cientos de genes, dentro de los que se destacan aquellos que codifican proteínas relacionadas con eventos de señalización,

CAPÍTULO II

como cinasas y fosfatasas, factores de transcripción, proteínas de transporte, incluyendo a sus propios transportadores (Wang *et al.*, 2001; 2003; Scheible *et al.*, 2004).

También, la regulación por fosforilación parece ser un mecanismo importante en la respuesta a NO_3^- . Se ha reportado que el transportador de NO_3^- de baja afinidad NRT1.1 de *Arabidopsis*, es capaz de regular su capacidad de transporte, dependiendo de su estado de fosforilación: a bajas concentraciones de NO_3^- , el transportador se fosforila y se modifica a un transportador de alta afinidad (Ho *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha reportado que el transportador de NO_3^- de alta afinidad Ynt1 de *Hansenula polymorpha* también se fosforila y se sitúa en la membrana para poder regular el transporte a bajas concentraciones de N (Navarro *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2011).

Sin embargo, a pesar de la existencia de estos reportes aislados, el papel de la regulación por fosforilación en respuesta a la presencia de NO_3^- es muy poco conocido. Todos estos mecanismos han sido descritos en la planta modelo *Arabidopsis*, pero no existen estudios en otras plantas de importancia económica.

En Yucatán, uno de los cultivos de gran importancia para los productores de la región es el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) (Ruiz-Lau *et al.*, 2011). Esta especie se cultiva en los suelos de la región, los cuales se caracterizan por presentar condiciones poco favorables para el desarrollo de los cultivos, como por ejemplo su alta pedregosidad, pH ligeramente alcalinos y son pobres en N (Ramírez *et al.*, 2005). A pesar de esto, se considera que el chile habanero que se obtiene en estos suelos es de alta calidad, por su picor, su aroma y su mayor vida de anaquel, aunque los rendimientos son bajos (Ramírez *et al.*, 2005, Borges-Gómez *et al.*, 2008).

Al exponer plántulas de chile habanero a condiciones heterogéneas de NO_3^- se observó una modificación del crecimiento del sistema radical; fundamentalmente, se inhibió transitoriamente el crecimiento de la RP y se observó una proliferación localizada de las RL en el segmento donde se aplicó el NO_3^- (Celis-Arámburo *et al.*, 2011). También, el NO_3^- indujo cambios en los niveles de los transcritos de diversos genes, como aquellos que codifican a una proteína 14,3,3, a una ATPasa vacuolar y a una proteína de sorteo vacuolar (Celis-Arámburo, 2011).

Se tiene el interés de estudiar los mecanismos que participan en esta respuesta de chile habanero a NO_3^- . Por ello, el objetivo de este capítulo es estudiar la actividad de proteínas cinasas en general y en particular de las MAPK en extractos proteicos de raíces de *C. chinense* Jacq. expuestas a NO_3^- . Se conoce que particularmente estas cinasas tienen una función importante en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés biótico (Pitzschke y Hirt, 2006; Apel y Hirt, 2004; Matsuoka *et al.*, 2002) y, aún cuando su papel en estrés abiótico es menos conocido, existen reportes que sugieren que estas enzimas pueden ser importantes en dichos eventos (Xiong y Yang, 2003; López-Berges *et al.*, 2010; Engelsberger y Schulze, 2012). Por ello, resulta interesante conocer si la actividad de estas enzimas se puede modificar en la raíz en respuesta a NO_3^- .

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

En este estudio, se utilizaron plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la variedad naranja, las cuales fueron obtenidas a partir de semillas comerciales (empresa Séminis Vegetable Seeds, Inc. Camino del sol Oxnard, CA 933030, USA. lote No. 935022).

2.2.2 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Antes de ser sembradas, las semillas se desinfectaron superficialmente. Éstas fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 ml y se les agregó alcohol al 80% (v/v), y se agitaron, durante 5 min. El alcohol se decantó, las semillas se lavaron 4 veces con agua estéril, se agregó hipoclorito de sodio (Cloralex) al 2.1% y se agitó durante 15 min, se retiró el Cloralex y se lavó con agua estéril cinco veces. Las semillas estériles se sometieron a un proceso de estratificación, consistente en mantener a las semillas a 4°C, embebidas en agua destilada estéril por 48 h, de modo que se supere el periodo de latencia en el que dichas semillas se encuentran y se favorezca así su germinación.

2.2.3 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Para la germinación, las semillas estériles mantenidas en la oscuridad durante 48 h, fueron colocadas en cajas de petri estériles que contenían un papel filtro cubierto con una capa fina de algodón, humedecido con 10 ml de H_2O destilada estéril. Las cajas de petri

CAPÍTULO II

conteniendo las semillas fueron colocadas en condiciones controladas, a 26°C en oscuridad.

2.2.4 CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS

Las semillas germinadas fueron trasladadas a botes de plásticos con vermiculita previamente estéril y humedecidas con solución de Hoagland esteril, a 1/5 de su fuerza iónica, (pH 6.8), que contenía: 500 μM CaCl_2 , 12.5 μM H_3BO_3 , 1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 μM ZnSO_4 , 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM de Fe-EDTA, 200 μM KH_2PO_4 , 200 μM MgSO_4 , 0.5 mM NH_4NO_3^- , 1 mM KNO_3 (Richard-Molard *et al.*, 2008). Para el crecimiento de las plántulas, los botes se mantuvieron durante 30-45 días, a 27 °C en fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) y fueron regados dos veces a la semana: una vez con 50 ml de agua destilada estéril y una vez con 75 ml de medio Hoagland hasta su uso.

2.2.5 TRATAMIENTOS CON NITRATO

Se seleccionaron plántulas de igual tamaño, se lavaron con agua destilada para eliminar los residuos de vermiculita y se transfirieron por cuatro días a una solución carente de nitrato, la cual contenía: 500 μM CaCl_2 , 12.5 μM H_3BO_3 , 1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 μM ZnSO_4 , 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM de Fe-EDTA, 200 μM KH_2PO_4 , 200 μM MgSO_4 y 1 mM KCl, en un sistema hidropónico. Al final del período de ausencia, las plántulas fueron expuestas a NO_3^- , desarrollándose experimentos de curso temporal. Para ellos, se seleccionaron 50 plántulas, divididas en cinco lotes de 10 plántulas y se sometieron a tratamiento con 1mM de KNO_3 durante tiempos de 0, 4, 6, 12, 24 h, en un sistema hidropónico. Estas plántulas se mantuvieron a una temperatura de 27° C, en condiciones de fotoperíodo (16 h luz/8 h oscuridad) y con aereación constante.

2.2.6 COSECHA DE TEJIDOS

Las plántulas se retiraron de los tratamientos y las raíces se secaron con un papel absorbente para eliminar residuos de agua. Se tomó toda la raíz y se pesó 1 g del tejido. Se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C, para el posterior análisis de proteína.

2.2.7 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El tejido se maceró en mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, al macerado se le adicionó polivinilpolipirrolidona (PVPP), para evitar la fenolización. El polvo se recuperó en un vial de cristal colocado en hielo y se le adicionó un amortiguador de extracción (2.5 ml/g de tejido fresco) que contenía: 50 mM de NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 250 mM sacarosa, 10% de glicerol, 1mM de PMSF, 10mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.2 mM de Na_3VO_4 , 1mM β -mercaptoetanol, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aprotinina y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ leupeptina. Se homogenizó con un politrón durante 1.5 minutos en hielo. El extracto se centrifugó a 12000 x g durante 30 min, a 4 °C, para eliminar los restos celulares. Se colectó el sobrenadante conteniendo las proteínas totales. Para la separación de las fracciones citosólicas y membranales el extracto se volvió a centrifugar a 100,000 x g durante 50 min, a 4°C. Se colectó el sobrenadante (extracto citosólico) y la pastilla (extracto membranar) se resuspendió en el mismo amortiguador de extracción. La cuantificación de proteínas se realizó según el sistema Bio-Rad Protein Assay Kit, empleando como referencia una curva patrón de albumina de suero bobino, basado en el método de Bradford (1976). Los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro (Recording Spectrophotometer UV-160, SHIMADZU).

2.2.8 FOSFORILACIÓN *in vitro*

Para la fosforilación *in vitro* se utilizó el método reportado por Martínez-Estévez *et al.*, (2001). Alícuotas de los tres extractos proteicos (18 μg para los extractos total y citosólico y 10 μg para el extracto membranar), fueron incubadas con el amortiguador de fosforilación, que contenía: 20 mM de HEPES, pH 7.5, 10 mM de MgCl_2 , 1mM de Na_3VO_4 , 1mM de glicerol, 10 μCi de $[^{32}\text{P}] \gamma\text{ATP}$, 1 μM ATP y H_2O . Para la fosforilación dependiente de calcio se utilizó 1 mM de CaCl_2 y 1 mM de EGTA, para tener una concentración de calcio libre de 25 μM , según los cálculos del programa EqCal. Después de 30 minutos, la reacción se detuvo con el amortiguador Laemmli (Laemmli, 1970).

2.2.9 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CONTENIENDO DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)

Después del ensayo de fosforilación, las fosfoproteínas fueron separadas por

CAPÍTULO II

electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a Laemmli (1970). Para ello, se elaboraron geles de separación al 12% (v/v) de poliacrilamida y geles de concentración al 4% (v/v) de poliacrilamida. La proteína aplicada en dichos geles fue resuelta en una cámara mini-protean II (Bio-Rad®), a 100 V durante 110 min y a temperatura ambiente. Los complejos proteína-SDS se tiñeron con azul de Coomassie. Para la tinción, los geles se colocaron durante una hora en una solución al 0.1% de Coomassie R-250 (Bio-Rad Laboratories), diluido en metanol al 50%, y 7% de ácido acético. Para el desteñido, los geles se incubaron en una mezcla que contenía 25% de metanol y 7% de ácido acético. Posteriormente, los geles se secaron entre dos hojas de papel de celofán en marcos de acrílico, formando un sándwich entre las hojas de celofán y el gel se expuso en película y fue desarrollada por autoradiografía.

2.2.10 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE MAP KINASAS

2.2.10.1 ENSAYO EN GEL

Se prepararon geles de acrilamida al 12 % (SDS-PAGE) copolimerizados con 0.5 mg/ml de la proteína básica de mielina (MBP), al gel se le cargó ~18 µg de proteína (extracto total) por carril, para cada una de las muestras analizadas. La electroforesis fue desarrollada a 100 V por 120 min.

Al concluir la electroforesis, el gel se colocó en amortiguador A (50 mM de Tris-HCl, pH.8 y 20% de propanol), y se sometió a cuatro lavados de 30 min cada uno; amortiguador B (50 mM de Tris-HCl, pH.8 y 5 mM de β-mercaptoetanol), tres lavados de 30 min cada uno; amortiguador C (8 M de urea, 50 mM de Tris-HCl, pH.8 y 5 mM de β-mercaptoetanol), 1 hr. Posteriormente, se hicieron lavados por 15 hrs (con intervalos de 2 hrs las primeras 8 hr) con el amortiguador D (50 mM de Tris-HCl, pH.8, 5 mM de β-mercaptoetanol y 0.04% de Twen-20). Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, excepto la realizada con el amortiguador D, la cual se realizó a 4 °C.

Para el ensayo de fosforilación, el gel se colocó durante una hora en un amortiguador de fosforilación (descrito en el apartado 2.2.8) sin ATP. Posteriormente, el gel se transfirió al amortiguador de fosforilación excepto que esta vez, contenía 80 µCi de [³²P] γ-ATP y se

incubó durante 1 h. Al concluir el tiempo de fosforilación, el gel se lavó seis veces de 30 min cada uno con ácido tricloroacético (TCA) al 5% y pirofosfato de sodio al 1%. Posteriormente, el gel se secó y se reveló como se mencionó en el apartado anterior.

2.2.10.2 INMUNODETECCIÓN DE MAP KINASA

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), en los cuales se resolvió el perfil de proteínas (~18 µg de proteínas totales). Después de la separación de las proteínas, éstas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD), la membrana fue bloqueada por 1 h con BSA al 5 %, diluida en TBST (NaCl 0.9 %, Tris-HCl 10 mM, Tween-20, pH 7.4). La membrana se lavó tres veces en agitación por 10 minutos con TBST y a continuación se incubó 8 h a 4°C en agitación, con el anticuerpo primario correspondiente: Anti-P ERK ½ (Cat. # SUV1018), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBST, la membrana fue incubada 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) conjugado con peroxidasa (dilución 1:5000). La detección se llevó a cabo, usando el paquete de quimioluminiscencia (Amersham ECL), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO

Plántulas de chile habanero sometidas previamente a un déficit de N durante 96 horas fueron colocadas en un medio conteniendo 1 mM de NO_3^- y posteriormente, las proteínas totales de las raíces fueron extraídas y cuantificadas durante diferentes intervalos de tiempos, como se describe en materiales y métodos.

Se observó que la concentración de proteínas totales en las raíces de las plántulas de chile habanero se mantuvo a valores aproximados de 2.7 mg/g PF durante las primeras seis horas después de ser tratadas con NO_3^- . Sin embargo, a partir de las 12 horas de exposición, la concentración de proteínas aumentó, alcanzando valores por encima de 4 mg/g PF y manteniéndose similar a este valor al final del periodo evaluado (Cuadro 2.1).

CAPÍTULO II

Estos resultados sugieren que la asimilación de NO_3^- pudo ocurrir en las raíces de chile habanero, evaluada ésta como la incorporación de N a los aminoácidos y a las proteínas.

Se observó que del total de proteínas en las raíces de chile habanero, aproximadamente el 10 % se encuentra en las membranas, al inicio del experimento cuando las plántulas están sometidas a un período de ausencia de NO_3^- por cuatro días. Sin embargo, este porcentaje aumentó hasta aproximadamente un 18 %, en las primeras cuatro y seis horas después de que las plántulas fueron re-abastecidas con NO_3^- (Cuadro 2.1). Estos resultados indican que, o bien hay síntesis de novo de proteínas, las cuales se incorporan a las membranas, o hay un reclutamiento hacia estos compartimentos de las ya existentes en el tejido.

Cuadro 2.1 Contenido de proteínas totales y porcentaje de proteínas presentes en las membranas respecto al total, de las raíces de plántulas de chile habanero durante un curso temporal de exposición a nitrato.

Tiempo (h)	Proteínas Totales (mg/g PF)	Frac. Membranal (%) ^a
0	2.61 ± 0.36	10.5 ± 0.95
4	2.54 ± 0.35	18.7 ± 1.5
6	2.85 ± 0.42	16.7 ± 0.05
12	4.11 ± 0.15	10.6 ± 0.5
24	4.18 ± 0.34	14.5 ± 1.7

Se representan los valores promedios de tres repeticiones ± el error estándar.

^a El 100% para cada valor correspondió al valor de la concentración de proteínas en el extracto total (Proteínas Totales) para cada tiempo, respectivamente.

2.3.2 EFECTO DEL NITRATO SOBRE LA FOSFORILACIÓN *in vitro* DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO

Los extractos proteicos obtenidos a partir de las raíces de las plántulas tratadas con NO_3^- fueron utilizados como fuentes de enzimas para llevar a cabo experimentos de

fosforilación *in vitro*. Para profundizar en este estudio se utilizaron tanto los extractos de proteínas totales, como las citosólicas y membranales; así también, se evaluó la fosforilación dependiente e independiente de calcio de estas proteínas. Los resultados se presentan a continuación.

2.3.2.1 FOSFORILACIÓN *in vitro* DE PROTEÍNAS TOTALES

Se llevó a cabo la fosforilación *in vitro* de las proteínas de las raíces de chile habanero, usando como fuente de enzima un extracto proteico total de raíz (18 μ g) y 10 μ Ci de [32 P] γ -ATP.

La fosforilación de proteínas presentes en el extracto total de raíces de chile habanero se muestra en la figura 2.1, donde en los paneles inferiores se observa el perfil de proteínas teñidas con azul de Coomassie, indicando una cantidad homogénea de proteínas en cada carril (Figura 2.1 C y D).

Se observó un total de seis bandas de proteínas que incorporaron 32 [P] a su estructura, las cuales correspondieron a los pesos moleculares de: 25, 37, 41, 49 y 55 kDa (Figura 2.1 A y D).

La fosforilación dependiente de calcio, mostró que las bandas correspondientes a los pesos moleculares de 41 y 49 kDa se mantuvieron a lo largo del experimento, pero su intensidad incrementó con el tiempo de exposición de las plántulas a NO_3^- . Sin embargo, el resto de las bandas correspondientes a proteínas fosforiladas aparecieron exclusivamente en tiempos determinados de exposición a NO_3^- , descrito como sigue: la banda de 25 kDa solo fue observada a los tratamientos de 12 y 24 horas, la banda de 37 kDa, a partir de las 4 horas, manteniéndose hasta las 24 horas, mientras que la banda de 55 kDa solo se observó a las 12 horas después de iniciado el tratamiento (Figura 2.1 A).

En la fosforilación independiente de calcio, se observaron dos bandas que se mantuvieron en todos los tiempos de exposición de las plántulas a NO_3^- , correspondiente a los pesos moleculares de 41 y 49 kDa, y su intensidad fue aumentando a más tiempo de exposición a NO_3^- . También se identificaron dos bandas exclusivamente a tiempos determinados de exposición, i.e; una banda de 37 kDa se observó a los tiempos de 4 y 6 horas de exposición a NO_3^- , y una banda de 55 kDa se observó únicamente a las 12 horas de

exposición (Figura 2.1 B).

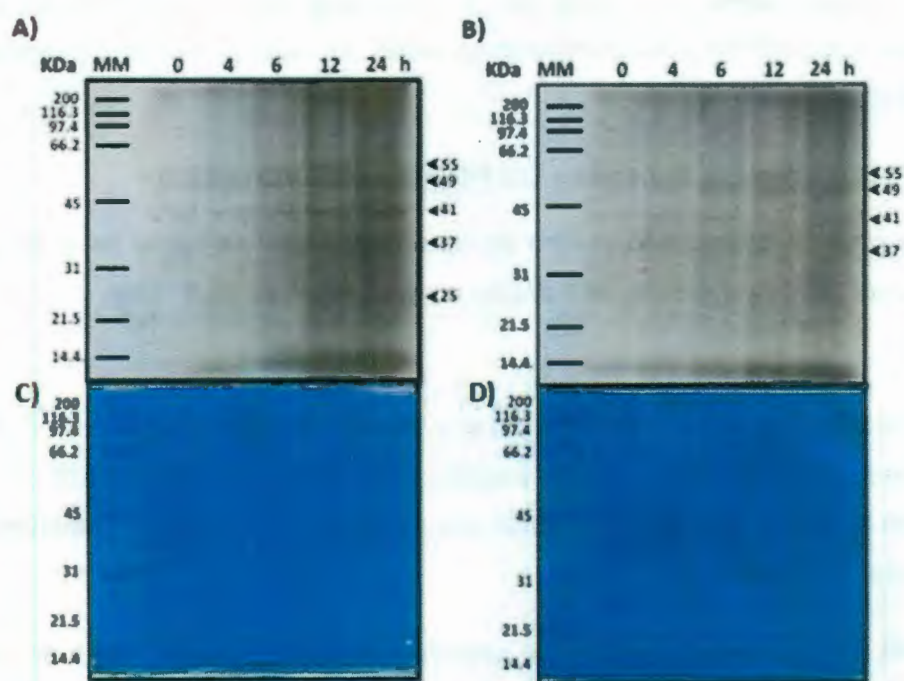


Figura 2.1 Efecto sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas totales de raíces de chile habanero expuestas a 1 mM de KNO_3 durante diferentes tiempos de exposición. A) Dependiente de Ca^{2+} , B) Independiente de Ca^{2+} . Se llevó a cabo la fosforilación *in vitro* de las proteínas de la raíz de chile habanero usando como fuente de enzima un extracto proteico total de raíz (18 μg) y 10 μCi de $[^{32}\text{P}] \gamma\text{ATP}$. Marcador de peso molecular (MM); 0, 4, 6, 12, 24 corresponden a los diferentes intervalos del tiempo de exposición de las raíces al nutriente. Parte superior (A y B): autoradiografía de proteínas fosforiladas. Parte inferior (C y D): perfil de proteínas teñidas con azul de Coomassie.

2.3.2.2 FOSFORILACIÓN *in vitro* DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS

Se llevó a cabo la fosforilación *in vitro* de las proteínas de la raíz de chile habanero usando como fuente de enzima un extracto proteico citosólico de raíz (18 μg) y 10 μCi de $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$. Los resultados obtenidos para la fosforilación de proteínas presentes en el extracto citosólico de raíces de chile habanero se muestran en la figura II.2, donde en los paneles inferiores (Figura 2.2 C y D), se observa el perfil de proteínas teñidas con azul de Coomassie, indicando una cantidad homogénea de proteínas en cada carril.

La autoradiografía de las proteínas fosforiladas en el extracto citosólico de raíces de chile

habanero mostró que tanto en la fosforilación dependiente (Figura 2.2 A) como independiente de calcio (Figura 2.2 B), un total de tres bandas que incorporaron un grupo fosfato a su estructura; sus pesos moleculares fueron de 44, 57 y 66 kDa, respectivamente.

En el caso de la fosforilación dependiente de calcio se observó una banda de 66 kDa y una de 57 kDa en todos los tiempos de exposición de las raíces a NO_3^- y, en contraste, una banda de 44 kDa sólo se observó en el tiempo cero de exposición (Figura 2.2 A).

La fosforilación independiente de calcio (Figura 2.2 B), mostró un perfil de polipéptidos fosforilados semejantes al observado en la fosforilación dependiente de calcio.

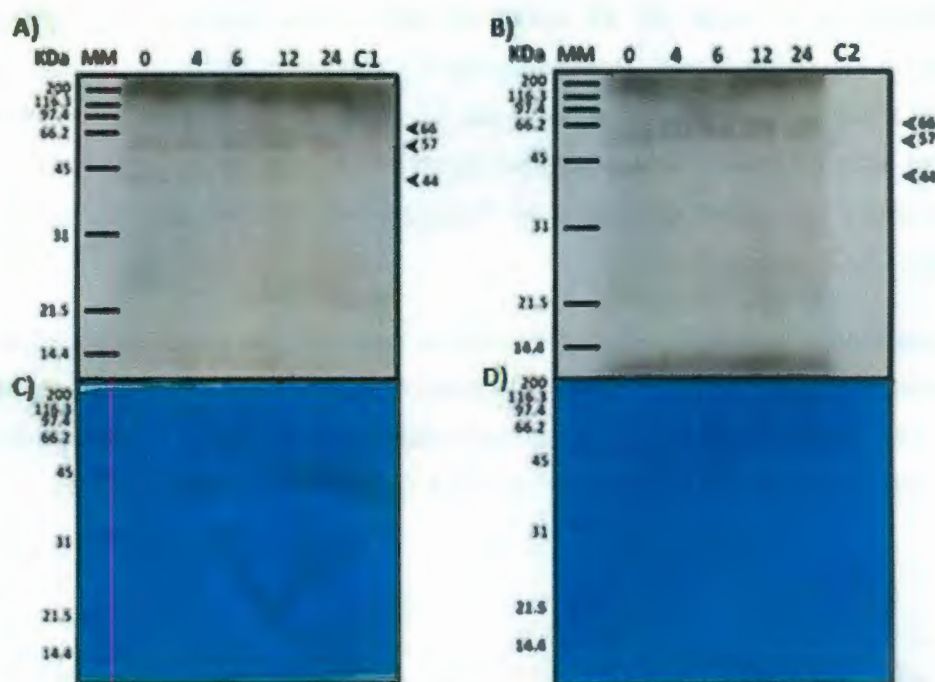


Figura 2.2 Efecto sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas citosólicas de raíces de chile habanero expuestas por diferentes tiempos a 1 mM de KNO_3 . A) Dependiente de Ca^{2+} , B) Independiente de Ca^{2+} . Se llevó a cabo la fosforilación *in vitro* de las proteínas de la raíz de chile habanero usando como fuente de enzima un extracto citosólico de raíz (18 μg) y 10 μCi de $[^{32}\text{P}] \gamma\text{ATP}$, Marcador de peso molecular (MM), 0, 4, 6, 12, 24 corresponden a los diferentes intervalos del tiempo de exposición de las raíces al nutriente. C1: control sin extracto proteico, C2: control sin $[^{32}\text{P}] \gamma\text{ATP}$. Parte superior (A y B): autoradiografía de proteínas fosforiladas. Parte inferior (C y D): perfil de proteínas

CAPÍTULO II

teñidas con azul de Coomassie.

2.3.2.3 FOSFORILACIÓN *in vitro* DE PROTEÍNAS MEMBRANALES

En lo que respecta a la fosforilación *in vitro* de las proteínas de la raíz de chile habanero usando como fuente de enzima a la fracción membranal de raíz (10 μ g) y 10 μ Ci de [32 P] γ -ATP. Los resultados se muestran en la figura II.3, donde en los paneles inferiores de la misma se observa el perfil de proteínas teñidas con azul de Coomassie (Figura 2.3 C y D); donde se destaca que se observaron muy pocas bandas definidas, cuyos pesos moleculares fueron mayores a 45 kDa.

Para la fosforilación dependiente de calcio, se observó una banda de 66 kDa a partir de las cuatro horas y hasta las 24 horas de tratamiento, observándose una máxima intensidad a las cuatro horas. Una banda de 52 kDa se detectó con menor intensidad desde las 0 horas, prolongándose hasta las 12 horas, tiempo en el cual mostró mayor intensidad. Otra banda de 46 kDa solo se observó con igual intensidad a las 4 y 12 horas de exposición y, una banda de 39 kDa se observó a partir de las cuatro hasta 12 horas de exposición a NO_3^- (Figura 2.3 A).

Cuando se realizó la fosforilación independiente de calcio, se observó una banda de 66 kDa a las cuatro y seis horas de exposición a NO_3^- , una banda de 46 kDa se observó a las 4 y 12 horas de exposición y, por último, una banda de 39 kDa se observó a partir de las 4 horas, lográndose observar hasta a las 12 horas de tratamiento (Figura 2.3 B).

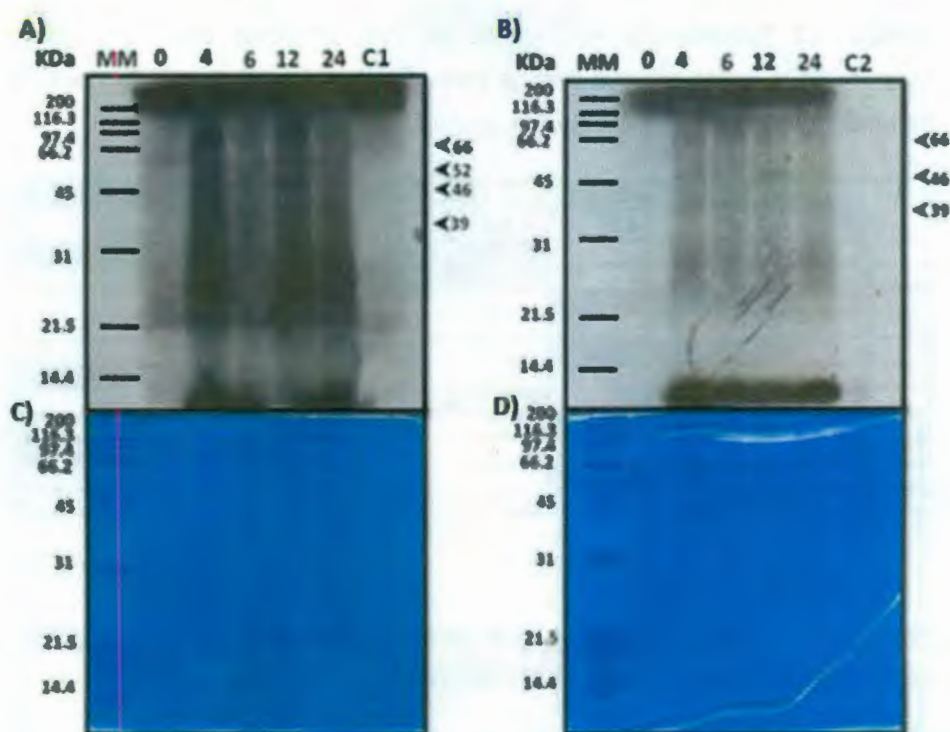


Figura 2.3 Efecto sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas de membrana de raíces de chile habanero expuestas por diferentes tiempos a 1 mM de KNO_3 . La fosforilación dependiente de Ca^{2+} (A) e independiente de Ca^{2+} (B) se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en materiales y metodos. C1: control sin extracto proteico, C2: control sin $[\text{}^{32}\text{P}]\gamma\text{-ATP}$. Las demás indicaciones son similares a las de la figura 2.2.

En el cuadro 2.2 se muestra el resumen de las proteínas que se fosforilan *in vitro* en la raíz de chile habanero en respuesta a NO_3^- , y se encuentran en el rango de 25 y 66 kDa y se observan cambios importantes para la fosforilación dependiente de calcio y la fosforilación independiente de calcio. Se obtuvieron un mayor número de bandas fosforiladas cuando se utilizó el extracto total (cinco bandas), mientras que al utilizar el extracto citosólico y membranal se observaron tres y cuatro bandas respectivamente.

CAPÍTULO II

Cuadro 2.2 Resumen de las bandas de fosfo-proteínas que se detectan después de la fosforilación *in vitro* de proteínas de raíces de plántulas de chile habanero sometidas a nitrato durante un curso temporal.

PM	E. TOTAL		E.CITOSÓLICO		E. MEMBRANAL	
	+ Ca ²⁺	-Ca ²⁺	+ Ca ²⁺	-Ca ²⁺	+ Ca ²⁺	-Ca ²⁺
66						
57						
55						
52						
49						
46						
44						
41						
39						
37						
25						

2.3.3 ACTIVIDAD DE MAP CINASA EN EXTRACTO TOTAL DE RAICES DE CHILE HABANERO TRATADAS CON NITRATO

El extracto proteico total recuperado de las plántulas sometidas a ausencia de N por cuatro días, fue utilizado en ensayos de cinasa en gel con [³²P] γ ATP, sobre el sustrato MBP. Se observaron dos bandas, una de 42 y otra de 39 kDa, las cuales disminuyeron su actividad en respuesta a los tratamientos con NO₃⁻, a partir del tiempo cero hasta las 24 horas (Figura 2.4).

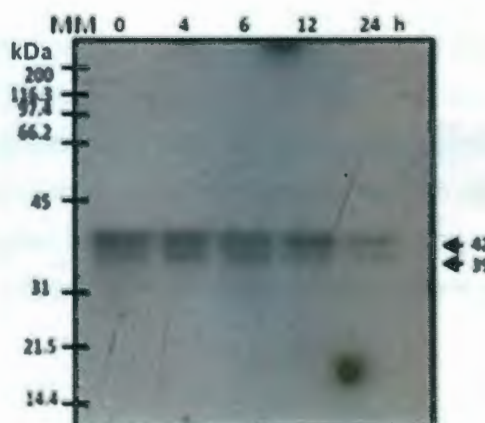


Figura 2.4 Ensayo de la actividad de MAPK en gel, usando a la proteína básica de mielina (MBP) como sustrato. Se aplicaron ~18 µg de proteínas totales por carril. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 12 %, conteniendo 0.5 mg/ml de MBP y el gel se incubó con 80 µCi de [³²P] γ-ATP como se indica en

materiales y métodos. Marcador de peso molecular (MM); 0, 4, 6, 12, 24, corresponden a los diferentes tiempos de exposición al nutriente.

El ensayo de inmunodetección, usando el anticuerpo Anti-P ERK ½ (este anticuerpo reconoce a las MAP cinasas activas fosforiladas en residuos característicos de treonina y tirosina), mostró dos bandas de 42 y 39 kDa, las cuales tuvieron un comportamiento similar al observado en el ensayo de cinasa en gel. Se observó una banda de 54 kDa, la cual está presente a partir de las cero horas hasta las 12 horas del tratamiento, y posteriormente desapareció. Una banda de 61 kDa fue observada únicamente a las 24 horas de exposición a NO_3^- (Figura 2.5).

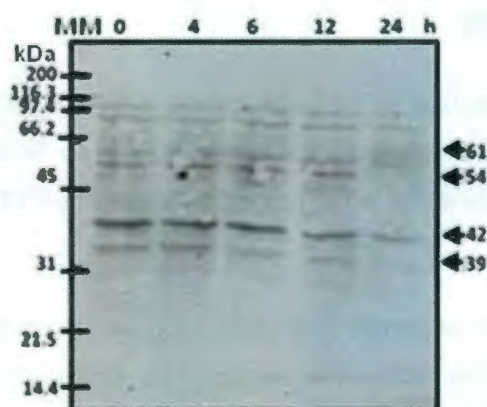


Figura 2.5 Inmunodetección de MAPK. Se aplicó aproximadamente 18 μg de proteínas totales por carril. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 12 % y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Dilución del anticuerpo primario (1:5000). Marcador de peso molecular (MM), 0, 4, 6, 12, 24, corresponden a los diferentes tiempos de exposición al nutriente.

2.4 DISCUSIÓN

Las proteínas presentes en las raíces de chile habanero sometidas a un curso temporal con 1 mM de NO_3^- , fueron capaces de incorporar *in vitro* en presencia de 10 μCi de $[^{32}\text{P}]$ γ -ATP fosfato marcado, particularmente aquellas que presentaron una masa molecular en un rango entre 25 a 66 kDa.

Se observaron cambios en la fosforilación dependiente de calcio de proteínas presentes en el extracto total, citosólico y membranal, comparada con la independiente de calcio. El ión

CAPÍTULO II

calcio actúa como segundo mensajero en las rutas de señalización inducidas por procesos fisiológicos y ambientales en las plantas (Trewavas y Malho, 1998; Sanders *et al.*, 2002; White y Broadley, 2003) y, algunas proteínas cinasas son dependientes de calcio (Flores-Vieyra *et al.*, 2005). Esto podría indicar que en chile habanero el NO_3^- podría estar regulando proteínas dependientes de calcio.

Dentro de las proteínas cinasas dependientes de calcio involucradas en procesos de fosforilación en respuesta a NO_3^- que han sido reportadas, se encuentra la proteína cinasa CIPK8, que tiene un peso molecular estimado de 54 kDa. Esta proteína está involucrada en la señalización por NO_3^- y su expresión es rápidamente inducida por el mismo ión (Batistic *et al.*, 2009, Hu *et al.*, 2009).

También, se ha reportado que la proteína cinasa CIPK23 de 55 KDa aproximadamente, participa en la fosforilación del transportador NRT1.1 de NO_3^- a bajas concentraciones (Krouk *et al.*, 2006), así como, en la fosforilación del canal AKT1 induciendo la absorción de K^+ (Rubio *et al.*, 2008).

Se observaron cambios en el patrón de fosforilación de las proteínas de las raíces de chile habanero en respuesta los diferentes tiempos de exposición a NO_3^- . Existen algunos reportes en *Arabidopsis* de la fosforilación de proteínas en respuesta a nitrato. Este es el caso del transportador NRT1.1, el cual tiene un peso molecular de 50 kDa, que se fosforila en respuesta a bajas concentraciones de NO_3^- (Liu y Tsay, 2003; Martin *et al.*, 2008).

Por otro lado, también se analizó la actividad de MAP cinasas en respuesta a NO_3^- , pudiendo observar dos bandas, las cuales fueron perdiendo su actividad a medida que incrementó el tiempo de exposición de las raíces a NO_3^- . Una posibilidad que pudiera existir es que estas cinasas se hubieran activado cuando las plantas estuvieron por cuatro días en ausencia de NO_3^- y que al suministrarles el nutriente estas proteínas se inactiven.

También en el ensayo de inmunodetección con el anticuerpo Anti-P ERK $\frac{1}{2}$, se observaron más bandas, de pesos moleculares más altos a los observados en el ensayo de cinasas en gel, las cuales no se descarta que estuvieran presentes en ese ensayo, pero debido a sensibilidad de las proteínas por el sustrato o a la cantidad de proteína presente en el ensayo no se hayan podido detectar.

Recientemente, se reportó que podría existir una relación entre la vía de señalización del N y la de las MAP cinasas durante la respuesta de las plantas a ataques de hongos (López-Berges *et al.*, 2010). Cuando plantas de tomate estuvieron sometidas a un déficit de N, éstas presentaron una mayor afectación al ataque de *Fusarium oxysporum*, síntomas que disminuyeron cuando las plantas fueron reabastecidas con NH_4^+ . Es de destacar que la vía de las MAP cinasas es estrictamente requerida para el proceso de infección y estos autores demostraron una interacción entre la respuesta a N y esta vía de señalización (López-Berges *et al.*, 2010).

En plantas, la señalización a través de las cascadas de las MAP cinasas da lugar a un amplio número de respuestas celulares que incluyen la división y diferenciación celular, así como respuesta a estrés abiótico o biótico (Mishra *et al.*, 2006). Numerosos estudios han demostrado que estas proteínas pueden estar reguladas a niveles de la transcripción y la traducción, así como post-traduccionamente (Mishra *et al.*, 2006; Pitzschke y Hirt, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Hasta el momento, este es el primer trabajo que relaciona a la vía de transducción de señales que involucran a las MAP cinasas con la respuesta de las plantas a la presencia exógena de NO_3^- .

CAPÍTULO II

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Apel K. y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*, 55:373-99.
- Batistic O., Kim K-N., Kleist T., Kudla J. y Luan S. (2009). The CBL-CIPK network for decoding calcium signals in plants. *Trends in Plant Science*, 14: 37-42.
- Borges-Gómez L., Cervantes-Cárdenas L., Ruiz-Novelo J., Soria-Fregoso M., Reyes-Oregel V. y Villanueva-Couoh E. (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana*, 28: 35-41.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Celis-Arámburo T. de J. (2011). Efecto de la distribución hererogénea de nitrato sobre el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Celis-Arámburo T. de J., Carrillo-Pech M., Castro-Concha L.A., Miranda-Ham M. de L., Martínez-Estévez M. y Echevarría-Machado I. (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49:1456-64.
- Clark G.B., Thompson G. y Roux, S.J. (2001). Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Current Science*, 80: 170-177.
- Crawford N.M. y Forde B.G. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *American Society of Plant Biologists*, 45: 2-24.
- Engelsberger W.R. y Schulze W. X. (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 69: 978-99.

- Flores-Vieyra R., Raya-Pérez J.C. y Torres-Márquez M.E. (2005). Proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} : características y activación. *Revista de educación bioquímica*, 24: 74-80.
- Hardie D.G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, 50: 97-131.
- Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C. y Tsay Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138: 1184-1194.
- Hu H.C., Wang Y.Y. y Tsay Y.F. (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant Journal*, 57: 264-278.
- Hubbard M.J. y Cohen P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochemistry Science*, 18:172-177.
- Krouk G., Tillard P. y Gojon A. (2006). Regulation of the high-affinity NO_3^- uptake system by NRT1.1 mediated NO_3^- demand signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142:1075-86.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liu K-H. y Tsay Y-F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22: 1005-1013.
- López-Berges M., Rispail N., Prados-Rosales R. y Di Pietro A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence in plant pathogenic fungi. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 1623-1625.
- Luan S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annual Reviews Plant Biology*, 54: 63-92.
- Martín Y., González Y.V., Cabrera E., Rodríguez C. y Siverio J.M. (2011). Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *Journal Biology Chemistry*, 286: 27225-27235.

CAPÍTULO II

- Martín Y., Navarro F.J. y Siverio J.M. (2008). Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* nitrate transporter CHL1 in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Plant Molecular Biology*, 68:215–224.
- Mishra N.S., Tuteja R. y Tuteja N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives Biochemistry Biophysics*, 452: 55-68.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikkawa U. y Yasuda T. (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant Journal* 29: 637-47.
- Navarro F.J, Yuse M. y Siverio J.M. (2008). Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. *Journal Biology Chemistry*, 283: 31208-31217.
- Pitzschke A. y Hirt H. (2006). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol* 141: 351-6.
- Prinsi B., Negri A.S., Pesaresi P., Cocucci M. y Espen L. (2009). Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by two-dimensional gel electrophoresis analysis. *BMC Plant Biology*, 9:113-129.
- Ramírez G., Góngora S., Pérez L., Chel L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J. y López H. (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP- SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mococho, Yucatán; México.
- Richard-Molard C., Krapp A., Brun F., Ney B., Daniel-Vedele F. y Chaillous S. (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *Journal Experimental Botany*, 59: 779-791.

- Rubio F., Nieves-Cordones M., Aleman F. y Martinez V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* 134:598-608.
- Ruiz-Lau N., Medina-Lara F. y Martínez-Estévez M. (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*, 32: 70-77.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C. y Harper J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signalling. *Plant Cell*, 14: 401-417.
- Steen H., Jebanathirajah J.A., Rush J., Morrice N. y Kirschner M.W. (2006). Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Molecular Cell Proteomics*, 5: 172-181.
- Stitt M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion Plant Biology*, 2: 178-186.
- Stitt M., Muller C., Matt P., Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W.R. y Krapp A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal Experimental Botany*, 53: 959-970.
- Stone J.M. y Walker J.C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology*, 108: 451-457.
- Thomason P. y Kay R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of Cell Science* 113: 3141-3150.
- Trewavas A.J. y Malho R. (1998). Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 428-443.
- Tsay Y-F., Ho C-H., Chen H-Y. y Lin S-H. (2011). Integration of nitrogen and potassium signaling. *Annual Reviews Plant Biology*, 62: 207-26.
- Wang R., Guelgler K., Labrie S.T. y Crawford N.M. (2000). Genomic analysis of nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic

CAPÍTULO II

and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell*, 12: 1491-1510.

Wang R., Okamoto M., Xing X. y Cradford N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over one thousand rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-P, iron and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, 132: 556-567.

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

White P.J. y Broadley M.R. (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92: 487-511.

Xiong L. y Yang Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15 745-59.

Zhang T., Liu Y., Yang T., Zhang L., Xu S., Xue, L. y An L. (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 274-283.

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN POR INMUNODETECCIÓN DEL TIPO DE RESIDUO AMINOACÍDICO FOSFORILADO EN LAS PROTEÍNAS DE RAÍCES DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO

3.1. INTRODUCCIÓN

La fosforilación se refiere a la adición de un fosfato a una de las cadenas laterales de los aminoácidos de una proteína. Las proteínas están compuestas por aminoácidos unidos entre sí y cada aminoácido contiene una cadena lateral particular, que lo distingue de otros aminoácidos (Budde y Chollet, 1988). Los fosfatos son de carga negativa (cada grupo fosfato presenta dos cargas negativas), de modo que su adición a una proteína influye en las características de esta última, este cambio es generalmente a nivel conformacional (Sedko, 2003).

La transferencia de los grupos fosfatos a las proteínas está catalizada por una variedad de enzimas que comparten ciertas características y se agrupan en una clase de proteínas, conocidas como proteínas cinasas. Sus semejanzas se derivan de la capacidad para tomar el fosfato γ del ATP y transferirlo a una cadena lateral de un residuo aminoacídico de una proteína (Stone y Walker, 1995). Los grupos hidroxilo (^-OH) de los residuos aminoacídicos serina, treonina y tirosina son el blanco más común. Sin embargo, otros aminoácidos tales como, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico pueden ser fosforilados (Thomason y Kay, 2000).

La adición del grupo fosfato a un residuo de serina, treonina, o tirosina puede dar lugar a la activación o la inactivación de la proteína, ya sea a través de inducir un cambio conformacional en la proteína, o por influir en las interacciones de la proteína con otras proteínas o moléculas (Sopory y Munshi, 1998), así como cambiar su localización dentro de la célula (Zhang *et al.*, 2009).

Se ha reportado la presencia de una gran cantidad de proteínas con actividad de cinasas de serina/treonina, así como de proteínas fosforiladas en estos aminoácidos, tanto en células animales, como en células vegetales (Saier *et al.*, 1990; Braun y Walker, 1996;

CAPÍTULO III

Douglas *et al.*, 1997). Sin embargo, también se han reportado proteínas con actividad de cinasas de tirosina (Trojanek *et al.*, 1996; Rodríguez-Zapata y Hernández-Sotomayor, 1998, Islas-Flores *et al.*, 1998), pero hasta el momento, las proteínas cinasas de serina-treonina parecen ser las más abundantes (Braun y Walker, 1996).

La capacidad de detectar los residuos fosforilados de una proteína en un compartimento específico es una herramienta valiosa para detectar la actividad de las vías de señalización celular y es una clave para entender muchos de estos procesos en la célula (Parvathi y Ram 2002).

Los anticuerpos anti-fosfotirosina han sido recientemente y exitosamente utilizados por Zhang *et al.*, (2005), para capturar péptidos fosforilados en dicho residuo. Este estudio permitió identificar 180 sitios de fosforilación en tirosinas. Gygi, (2007) identificó 385 residuos fosforilados partiendo de una concentración proteica mayor que la utilizada por Zhang *et al.*, (2005). También, se han generado y utilizado exitosamente anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina. Actualmente, estos anticuerpos no son extensivamente utilizados en estudios fosfoproteómicos, esto es debido a que tienen una especificidad menor comparada con la de los anticuerpos anti-fosfotirosina (López-Villar *et al.*, 2008).

En el capítulo anterior, se determinó que existen cambios en el perfil de proteínas que se fosforilaron en las raíces de las plántulas de chile habanero en respuesta a NO_3^- . Para profundizar en dicho estudio mediante anticuerpos específicos contra fosfotreonina, serina y tirosina, se evaluó cuales son los residuos aminoacídicos que se fosforilan en respuesta al tratamiento con NO_3^- . En este capítulo se describen los resultados de este análisis.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la variedad naranja, las cuales fueron obtenidas a partir de semillas comerciales (empresa Séminis Vegetable Seeds, Inc. Camino del Sol Oxnard, CA 933030, USA. lote No. 935022).

La desinfección de las semillas, su germinación, el crecimiento de las plántulas, la aplicación del tratamiento de nitrato, la cosecha de los tejidos, la extracción y cuantificación de las proteínas, fue realizada siguiendo las metodologías e indicaciones

que se describen en el capítulo II.

3.2.2. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO

Para este experimento, se utilizaron extractos proteicos obtenidos a partir de las raíces de las plántulas de chile habanero expuestas a nitrato durante diferentes intervalos de tiempo (0, 4, 6, 12 y 24 horas). Se evaluó la presencia de proteínas fosforiladas en los residuos de treonina, serina y tirosina, tanto en el extracto total, citosólico y membranal, a través del uso de anticuerpos específicos para cada uno de estos residuos.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE), en los cuales se resolvió el perfil de proteínas correspondiente a cada extracto particular. Después de la separación de las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD), la membrana fue bloqueada por 1 h con BSA al 5 %, diluida en TBST (NaCl 0.9%, tris 10 mM, tween-20, pH 7.4).

La membrana se lavó tres veces en agitación por 10 minutos con TBST y a continuación se incubó 8 h a 4°C en agitación, con el anticuerpo primario correspondiente: anti-fosfotreonina (Cat. #AB1607), anti-fosfoserina 4A4 (Cat. # 05-1000) o anti-fosfotirosina PY20 (Cat # 05-947), en una dilución de 1:500, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBST, la membrana fue incubada 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-IgG) conjugado con peroxidasa (dilución 1:1000). La detección se realizó por quimioluminiscencia (Amersham ECL), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. ENSAYO DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS CON LAS PROTEÍNAS DE RAÍZ DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO

Para profundizar en el estudio del efecto del NO_3^- sobre la fosforilación de proteínas y tomando en cuenta que se observaron cambios en estos perfiles en las proteínas de las raíces de chile habanero (resultados descritos en el capítulo II), se decidió estudiar los posibles residuos aminoacídicos fosforilados en dichas proteínas. Para esto se utilizaron

CAPÍTULO III

anticuerpos que reconocen a la fosfotreonina, fosfoserina y fosfotirosina en las proteínas.

Inicialmente, se realizó un dot-blot para asegurarnos de que los anticuerpos anti-fosfotreonina, anti-fososerina y anti-fosfotirosina, reconocieran a las proteínas fosforiladas de las raíces de chile habanero. En este ensayo, la proteína del extracto total (50 μ g) se aplicó directamente en la membrana; la membrana fue bloqueada con BSA al 5% e incubada con los anticuerpos contra los diferentes fosfoaminoácidos y con el anticuerpo secundario. Se observó que los tres anticuerpos, reconocieron a las proteínas fosforiladas en residuos de treonina, serina y tirosina en las proteínas de las raíces de chile habanero (Figura 3.1).

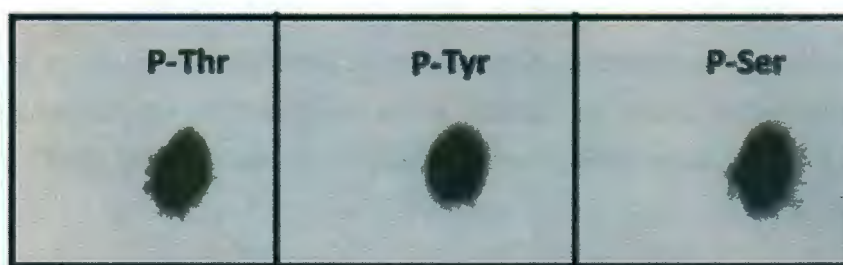


Figura 3.1 Ensayo de reconocimiento en gota de los anticuerpos con las proteínas de raíz de chile habanero en respuesta a nitrato. Se aplicaron 50 μ g de proteína del extracto total. La membrana fue bloqueada con BSA al 5% en TBS y luego inmunodetectada en una dilución 1:500 de anti-P-Thr, anti-P-Tyr, y anti-P-Ser, respectivamente y el anticuerpo secundario se usó a una dilución de 1:1000. El ensayo se realizó por separado para cada fosfoaminoácido.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE FOSFOAMINOÁCIDOS POR MEDIO DE INMUNODETECCIÓN EN EL EXTRACTO DE PROTEICO TOTAL DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO

Al realizar la inmunodetección usando el extracto total, se identificaron proteínas de entre 26 y 93 kDa que incorporaron un grupo fosfato en residuos de treonina, serina y tirosina.

a) Inmunodetección contra fosfo-treonina

La inmunodetección de residuos de fosfotreonina, mostró un total de ocho bandas. Dos bandas una de 37 y una de 93 kDa se observaron a las 4, 12 y 24 horas; otras tres

bandas de 35, 51 y 69 kDa estuvieron presentes en todos los tiempos de exposición, aunque tuvieron mayor intensidad a las cuatro horas de exposición de las raíces a NO_3^- . Una banda de 59 kDa estuvo presente a las 0 y 24 horas y posteriormente su fosforilación desapareció. En contraste la fosforilación de la banda de 45 kDa aumentó en el transcurso del tiempo de exposición a NO_3^- . Una banda de 31 kDa se inmunodetectó intensamente 4 horas después de la exposición al nutriente, desapareció a las 6 horas y se volvió a inmunodetectar a las 12 y 24 horas, pero con menor intensidad (Figura 3.2 A).

b) Inmunodetección contra fosfo-serina

La inmunodetección en residuos de fosfo-serina, mostró un total de nueve bandas, con pesos moleculares de 26, 32, 35, 37, 39, 45, 49, 66 y 73 kDa. La banda de 66 kDa se detectó a partir de las 6 horas y fue incrementando su intensidad hasta las 24 horas de exposición a NO_3^- . La banda de 49 kDa se observó en el tiempo 0 y fue incrementando durante todo el tiempo de evaluación. Para el resto de las bandas observadas, no se detectaron cambios significativos en la intensidad de las mismas en ningún tiempo de exposición a NO_3^- (Figura 3.2 B).

c) Inmunodetección contra fosfo-tirosina

La inmunodetección de residuos de fosfotirosina, reveló la presencia de ocho bandas de 26, 28, 30, 32, 37, 43, 47 y 52 kDa. Los cambios más importantes en este perfil fueron observados para la banda de 43 kDa, la cual fue disminuyendo conforme incrementó el tiempo de exposición y para la banda de 30 kDa, que fue observada en el tiempo 0, prolongándose hasta las 12 horas y desapareció a las 24 horas de exposición a NO_3^- (Figura 3.2 C).

Se realizó un perfil de las proteínas del extracto total de las raíces de chile habanero pudiéndose observar el comportamiento de las proteínas en respuesta a la exposición con NO_3^- (Figura 3.2 D).

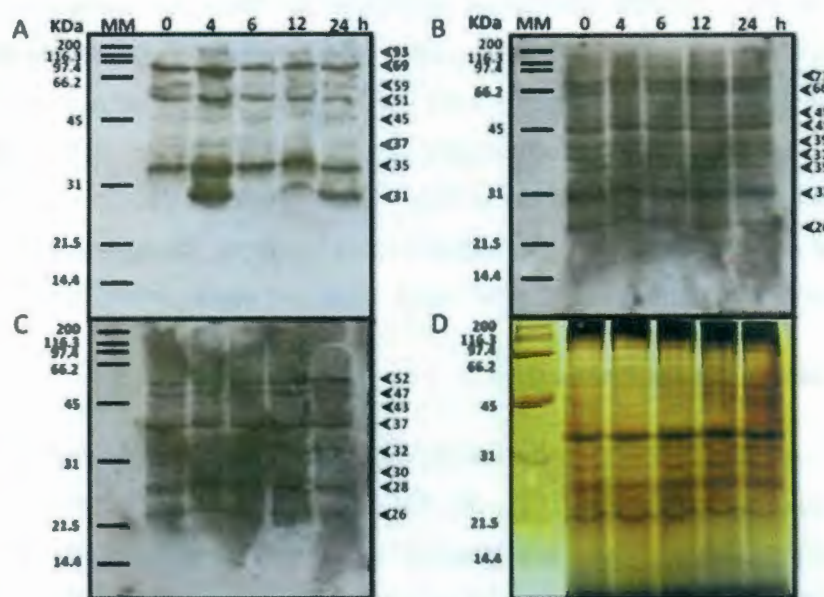


Figura 3.2 Inmunodetección de los diferentes fosfoaminoácidos presentes en las proteínas totales de raíces de chile habanero expuestas a nitrato. En este experimento se utilizaron 30 μ g de proteínas totales y para la inmunodetección, la metodología descrita en materiales y métodos, usando una dilución de 1:500 de: (A) anti-P-Thr, (B) anti-P-Ser y (C) anti-P-Tyr, y una dilución de (1:1000) del respectivo anticuerpo secundario (para A, anti-IGg de conejo y para B y C, el anti-IGg de ratón), (D) gel de poliacrilamida conteniendo el perfil de proteínas teñidas con nitrato de plata.

3.3.3 INMUNODETECCIÓN DE LOS DIFERENTES FOSFOAMINOÁCIDOS EN LAS PROTEÍNAS CITOSÓLICAS PROVENIENTES DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO

En las proteínas del extracto citosólico, a través de la inmunodetección con los anticuerpos contra los diferentes fosfoaminoácidos, se identificaron fosfoproteínas que incorporaron el grupo fosfato en residuos de treonina y tirosina. El tamaño de dichas proteínas comprendió entre 18 a 134 kDa.

a) Inmunodetección contra proteínas fosforiladas en treonina

La inmunodetección de proteínas fosforiladas en treonina, reveló un total de 13 bandas de

entre 18 y 134 kDa. Las bandas de 23, 30, 59, 93 y 134 kDa fueron inmunodetectadas en todos los tiempos de exposición; dos bandas de 36 y 101 kDa disminuyeron su nivel de fosforilación conforme más tiempo estuvieron expuestas las raíces a NO_3^- . En contraste cuatro bandas de 28, 44, 46 y 66 kDa respectivamente, aumentaron su nivel de fosforilación con el tiempo de exposición. Una banda de 26 kDa estuvo presente en tiempos iniciales de exposición de las raíces a NO_3^- , prolongándose hasta las 12 horas y desapareció a las 24 horas de tratamiento, mientras una banda de 18 kDa se detectó en todos los tiempos ensayados, observándose un aumento a las 6 horas de exposición de las raíces a NO_3^- (Figura 3.3 A).

b) Inmunodetección contra proteínas fosforiladas en tirosina

La inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina, mostró un total de 14 bandas: cinco bandas correspondientes a los pesos moleculares de 31, 40, 49, 66 y 101 kDa respectivamente, que no presentaron cambios en los diferentes tiempos de exposición, en contraste dos bandas de 37 y 93 kDa respectivamente aumentaron su presencia a las cuatro horas de exposición. Se observó una banda de 52 kDa que disminuyó de manera gradual conforme transcurrió el tratamiento. Una banda de 42 kDa fue visible solo a las 0 horas, mientras que otras dos bandas de 23 y 29 kDa aumentaron a las 4 horas y se prolongaron hasta a las 24 horas. Una banda de 25 kDa aumentó a las 12 y 24 horas, una de 21 kDa aumentó a las 4 y 12 horas y otra de 18 kDa aumentó a las 12 horas (Figura 3.3 C). El revelado con azul de Coomassie del perfil de proteínas del extracto citosólico mostró la separación de las proteínas y los cambios en respuesta a los diferentes tiempos de exposición a NO_3^- (Figura 3.3 D).

c) Inmunodetección contra proteínas fosforiladas en serina

En este extracto no se visualizaron proteínas fosforiladas en residuos de serina en las dos ocasiones que se realizó el experimento (figura 3.3 B). Como se observa en la figura 3.3 D, el perfil de proteínas indica la separación correcta de bandas bien definidas.

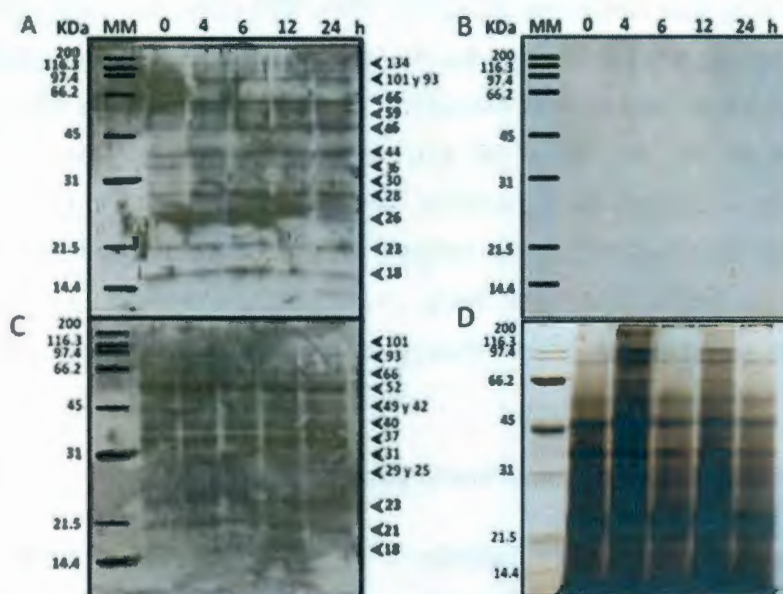


Figura 3.3 Identificación de los residuos aminoacídicos fosforilados en las proteínas provenientes de un extracto citosólico de raíces de chile habanero expuesta a nitrato. Se aplicaron 30 μ g de proteína. La membrana se inmunodetectó en una dilución 1:500 de: (A) anti-P-Thr, (B) anti-P-Ser y (C) anti-P-Tyr, y una dilución de (1:1000) de anticuerpo secundario, (D) gel de poliacrilamida conteniendo el perfil de proteínas teñidas con nitrato de plata.

3.3.4 IDENTIFICACIÓN POR INMUNODETECCIÓN DE RESIDUOS AMINOACÍDICOS FOSFORILADOS EN LAS PROTEÍNAS PROVENIENTES DE UN EXTRACTO MEMBRANAL DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EXPUESTAS A NITRATO

En las proteínas del extracto membranar, se inmunodetectaron proteínas de entre 26 y 89 kDa que incorporaron fosfato en residuos de treonina y tirosina.

En lo que respecta a las proteínas que contenían fosfotreonina se observaron un total de cinco bandas las cuales se modificaron durante el tratamiento con NO_3^- . Se observó una banda de 66 kDa a los tiempos de 6, 12 y 24 horas observándose con mayor intensidad a las 6 y 12 horas, una banda de 45 kDa se detectó a los tiempos de 0 y 24 horas de exposición a NO_3^- , una banda de 35 kDa que fue disminuyendo dependiendo del tiempo de exposición a NO_3^- y una banda de 28 kDa a cual varió en todo el tratamiento con NO_3^- .

(Figura 3.3 A).

El inmunoblot contra los residuos de fosfotirosina, reveló un total de ocho bandas: una banda de 89 kDa que se observó a las 24 horas de exposición de las raíces a NO_3^- , una banda de 66 kDa se observó a las 12 y 24 horas de exposición y una banda de 50 kDa a los tiempos de 0, 4, 12 y 24 horas de exposición de las raíces a NO_3^- . Una banda de 39 kDa disminuyó su intensidad mientras que incrementó el tiempo de exposición a NO_3^- , una banda de 35 kDa no mostró cambios durante el experimento. Una banda de 26 kDa, respectivamente, incrementó al aumentar el tiempo de exposición y otra banda de 27 kDa la cual desapareció a las 24 horas de exposición a NO_3^- (Figura 3.3 C).

El perfil de proteínas en el gel teñido con nitrato de plata, indica que se aplicaron cantidades iguales de proteínas en cada carril, excepto a las seis horas, donde al parecer la cantidad de proteína fue menor (Figura 3.3 D). Sin embargo, no se observa una degradación de proteínas en los extractos. Para el extracto membranar tampoco se pudo observar la fosforilación en residuos de serina, en los dos ensayos que se realizaron independientes (Figura 3.3 B).

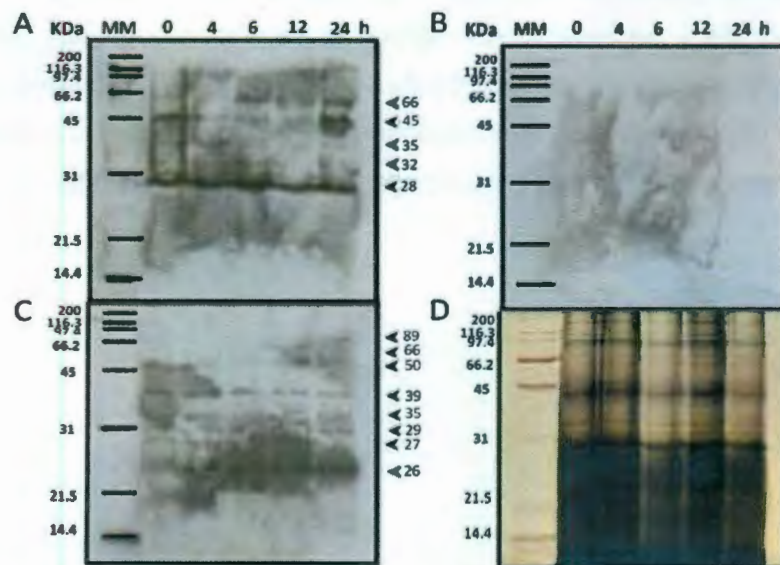


Figura 3.4 Identificación de los residuos aminoacídicos fosforilados en las proteínas provenientes de extractos membranales de raíces de chile habanero expuestas a nitrato. Se aplicaron 25 μg de proteína. Las membranas fue inmunodetectada con una dilución 1:500 de: (A) anti-P-Thr, (B) anti-P-Ser y (C) anti-P-Tyr, y una dilución de

CAPÍTULO III

(1:1000) del anticuerpo secundario respectivo, (D) perfil de proteínas teñidas con nitrato de plata.

Como controles se desarrollaron las inmunodetecciones, incubando las membranas sólo con los anticuerpos secundarios, anti-IGg de conejo y de ratón. Cada inmunodetección se hizo para las membranas conteniendo las proteínas totales y las proteínas citosólicas, respectivamente. A partir de ellas, se observó muy tenuamente una banda de aproximadamente 52 kDa al usar el anti-IGg de conejo y dos bandas de aproximadamente 37 y 52 kDa con el anti-IGg de ratón, indetectables después de ser escaneados las películas.

En el Cuadro 3.1 se resume el número de bandas que se fosforilaron en los diferentes extractos, así como su inmunodetección con los anticuerpos contra los diferentes fosfoaminoácidos. Al usar el extracto total, las proteínas fosforiladas se encuentran en un rango de 26 a 93 kDa, de las cuales ocho bandas se detectaron en residuos de treonina, nueve bandas en residuos de serina y ocho bandas en residuos de tirosina. Para el extracto citosólico las proteínas fosforiladas se encuentran en un rango de 18 a 134 kDa, de las cuales trece bandas se detectaron en residuos de treonina, catorce bandas en residuos de tirosina y en residuos de serina no se observó ninguna banda. Para el extracto membranal las proteínas fosforiladas se detectaron en un rango de 26 a 73 kDa, de las cuales cinco bandas se detectaron en residuos de treonina, ocho bandas en residuos de tirosina y no se detectó alguna banda en residuos de serina (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Resumen de las residuos aminoacídicos fosforilados en las proteínas de raíces de chile habanero sometidas a un curso temporal a nitrato.

PM (kDa)	E. TOTAL			E. CITOSÓLICO			E. MEMBRANAL		
	P-Thr	P-Ser	P-Tyr	P-Thr	P-Ser	P-Tyr	P-Thr	P-Ser	P-Tyr
134									
101									
93									
89									
73									
69									
66									
59									
52									
51									
50									
49									
47									
46									
45									
44									
43									
42									
40									
39									
37									
36									
35									
32									
31									
30									
29									
28									
27									
26									
25									
23									
21									
18									

3.4 DISCUSIÓN

La fosforilación de proteínas es uno de los principales eventos en la transducción de señales de las células en respuesta a diferentes estímulos, tanto bióticos como abióticos (Huber, 2007). Una herramienta utilizada para poder determinar los sitios blancos de fosforilación dentro de las proteínas es el uso de anticuerpos que detectan estos aminoácidos fosforilados, los cuales se denominan anticuerpos antifosfo o fosfoanticuerpos (Halk y Boer, 1985).

Existen anticuerpos de unión a tirosinas, serinas y treoninas fosforiladas, los cuales, en combinación con ensayos de inmunoprecipitación, permiten enriquecer la muestra en fosfoproteínas a partir de la mezcla compleja de proteínas de un lisado celular. Se ha comprobado que el uso de algunos anticuerpos para inmunoprecipitar proteínas cuyo nivel de expresión es bajo, poseen un rendimiento no muy elevado y cierta inespecificidad (Pandey y Mann, 2006).

La capacidad de detectar los residuos fosforilados de una proteína en un lugar específico es una herramienta valiosa para detectar la actividad de las vías de señalización celular, y es una clave para entender muchos procesos celulares (Lee *et al.*, 2011).

Se observó que la fosforilación de proteínas en las raíces de chile habanero ocurre en residuos de treonina, serina y tirosina para el caso del extracto total, y en residuos de treonina y tirosina para los extractos citosólico y membranal.

En las plantas se ha observado la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de Ser/thr, como el de una proteína de 57 kDa reportada en maíz (Trojanek *et al.*, 2004) y en *Arabidopsis* se han reportado la fosforilación de proteínas en un rango de 24 a 87 kDa en residuos de treonina (Parvathi *et al.*, 2006). También, se ha reportado fosforilación en residuos de tirosina; en chícharo dos proteínas de 47 y 92 kDa, respectivamente (Torruella *et al.*, 1986), en *Catharanthus roseus* una proteína de 63 kDa (Rodríguez-Zapata y Hernández-Sotomayor, 1998) y en maíz en un rango de 45 y 60 kDa (Trojanek *et al.*, 1996).

Por otro lado, en este trabajo se observaron cambios en la fosforilación de proteínas en respuesta a NO_3^- en las proteínas de las raíces de chile habanero, ya que existieron

cambios en la inmunodetección de las bandas en los tres residuos estudiados. Sin embargo, en respuesta a NO_3^- no existen muchos reportes, los únicos que hasta la fecha se saben es del transportador CHL1 en *Arabidopsis*, que tiene un peso molecular de 50 kDa y que se fosforila en el residuo de treonina 101 (Liu y Tsay, 2003; Martin *et al.*, 2008) y, recientemente se reportó la fosforilación del transportador de alta afinidad de NO_3^- Ynt1 de *Hansenula*, el cual se fosforila en el residuo de serina 246 (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez la identificación de residuos fosforilados en treonina, serina, y tirosina en las proteínas provenientes de las raíces de chile habanero en respuesta a la presencia exógena de NO_3^- . Estos resultados sugieren que este es un mecanismo que se modifica en dicha respuesta y que el papel que tienen estos cambios en la respuesta del desarrollo radical debe ser estudiado posteriormente.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Barbier-Brygoo A., Filleur S., Frachisse J-M., Gambale F., Thomine S. y Wege S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 25-51.
- Braun D.M. y Walker J.C. (1996). Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends in Biochemistry Science*, 21: 70-73.
- Budde R.J.A. y Chollet R. (1988). Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. *Physiologia Plantarum*, 72: 435-439.
- Douglas M.W., Johnson M.L. y Parsons C.M. (1997). Evaluation of protein and energy quality of rendered spent hen meals. *Poultry Science*, 76:1387-1391.
- Gygi S.P. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Proteome Research*, 6:1190-1197
- Halk E.L. y Boer S.H. (1985). Monoclonal antibodies in plant-disease research. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 321-350.
- Huber SC (2007). Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 35: 28-32.
- Islas-Flores I., Oropeza C. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1998). Protein phosphorylation during coconut zygotic embryo development. *Plant Physiology*, 118: 257-263.
- Lee T-Y., Bretaña N.A. y Lu C-T. (2011). PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinformatics*, 12:261-274.
- Liu K-H. y Tsay Y-F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22: 1005-1013.
- López-Villar E., Nombela-Cano C. y Rossel-Larsen M. (2008). Metodologías fosfoproteómicas útiles en estudios clínicos. *Inmunología*, 27: 36-44.

-
- Martín Y., Navarro F.J. y Siverio J.M. (2008). Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* nitrate transporter CHL1 in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Plant Molecular Biology*, 68:215–224.
- Pandey A. y Mann M. (2006). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405: 837–846.
- Parvathi R., Mamatha M. y Ram R. (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Molecular Biology*, 60: 293–319.
- Parvathi R. y Ram R. (2002). Developmentally regulated dual-specificity kinase from peanut that is induced by abiotic stresses. *Plant Physiology*, 130: 380–390.
- Rodríguez-Zapata L.C. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1998). Evidence of protein tyrosine kinase activity in *Catharanthus roseus* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Planta* 204: 70–77.
- Saier M.H., Wu L.F. y Reizer J. (1990). Regulation of bacterial physiological processes by three types of protein phosphorylating systems. *Trends Biochemistry Science*, 178: 391–395.
- Sedko D. (2003). Protein Phosphorylation: a global regulator of cellular activity. *The science Creative Quarterly*, 73:121–125.
- Sopory S.K. y Munshi M. (1998). Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews Plant Science*, 3: 245–318.
- Stone J.M. y Walker J.C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology*, 108: 451–457.
- Thomason P. y Kay R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of Cell Science*, 113: 3141–3150.
- Trojanek J.B, Ek P. Scoble, Muszyńska G y Engström L. (1996). Tyrosine phosphorylation in proteins of maize seedlings. *European Journal Biochemistry*, 235: 338–344.
-

CAPÍTULO III

- Trojanek J.B., Klimecka M.M., Fraser A., Dobrowolska G. y Muszyńska G. (2004). Characterization of dual specificity protein kinase from maize seedlings. *Acta Biochimica Polonica*, 51:635-47.
- Zhang Y., Wolf-Yadlin A., Ross P.L., Pappin D.J., Rush J., Lauffenburger D.A. y White F.M. (2005). Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules. *Molecular Cell Proteomics*, 4:1240-1250.
- Zhang Y., Nodzyn T., Pencik A., Rolcik J. y Friml J. (2009). PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *PNAS of the United States of America*, 107: 918-922.

CAPÍTULO IV

FOSFORILACIÓN *in vivo* DE PROTEÍNAS DE RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A NITRATO

4.1 INTRODUCCIÓN

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales más estudiada en las células eucariotas, ya que influye en numerosos procesos celulares (Steen *et al.*, 2006).

Las plantas, como organismos sésiles, están permanentemente expuestas a diferentes tipos de estrés, tanto abiótico como biótico, que ponen en peligro su supervivencia. Por lo tanto, han desarrollado mecanismos para responder a las señales ambientales que son de particular importancia, como es el caso de la fosforilación de proteínas, para la comunicación celular y la regulación del crecimiento y el desarrollo en respuesta a señales ambientales (Sopory y Munshi, 1998).

Se ha estimado que un tercio de todas las proteínas en una célula eucariota se fosforila (Hubbard *et al.*, 1993) y se estima que del 1 al 3% de los genes eucariotas funcionales codifican para proteínas cinasas, lo que sugiere que están involucrados en muchos aspectos de la regulación celular y el metabolismo (Stone *et al.*, 1995).

En el caso particular de cinasas de plantas, se ha visto que estas enzimas fosforilan una amplia variedad de proteínas sustrato (Stone *et al.*, 1995), por lo que la fosforilación de proteínas parece ser un mecanismo común de modificación post-traducciona l en los vegetales (Raymond y Chollet, 1998; Huber *et al.*, 1994; Huber y Huber, 1995).

El N es un nutriente esencial para los seres vivos, ya que es uno de los constituyentes principales de compuestos vitales como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleícos, así como también de las paredes celulares y la clorofila.

De la cantidad de N presente en el suelo, solo una pequeña parte se encuentra en formas asimilables para las plantas (Silva, 2002), siendo el NO_3^- la principal fuente de N en las plantas. El NO_3^- es una molécula señal que afecta el metabolismo del N, así como en el

CAPÍTULO IV

crecimiento de órganos y el desarrollo de las plantas (Crawford y Forde, 2002; Forde, 2002; Stitt *et al.*, 2002).

Estos efectos están mediados, por lo menos en parte, por cambios en la expresión de genes provocada por el NO_3^- (Stitt, 1999; Wang *et al.*, 2000; 2001; 2003; Stitt *et al.*, 2002). En cuestión de minutos, el NO_3^- induce la expresión de cientos de genes que codifican a muchas proteínas, dentro de los que se destacan genes relacionados con eventos de señalización como cinasas y fosfatasa, factores de transcripción y de transporte, e incluyendo a sus propios transportadores (Wang *et al.*, 2001; 2003; Scheible *et al.*, 2004).

En los capítulos anteriores, se observó que *in vitro* existieron cambios en el perfil de proteínas que se fosforilaron en las raíces de las plántulas de chile habanero en respuesta a NO_3^- , así como la detección de residuos aminoácidos de las proteínas fosforiladas en respuesta a NO_3^- . Por tanto, es de gran importancia estudiar la fosforilación *in vivo* de proteínas al momento de restablecer el NO_3^- a las raíces de chile habanero. A través de este estudio podremos tener un primer acercamiento *in vivo* de las proteínas cinasas y/o fosfatasa que se activan o inactivan en respuesta a NO_3^- .

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la variedad naranja, las cuales fueron obtenidas a partir de semillas comerciales (empresa Séminis Vegetable Seeds, Inc. Camino del sol Oxnard, CA 933030, USA. lote No. 935022). La esterilización de semillas, germinación de las semillas, crecimiento de plántulas, cosecha de tejidos, extracción de proteínas, electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) fueron realizados como se describe en el capítulo II.

4.2.1 FOSFORILACIÓN *in vivo*

Las plántulas de chile habanero de 50 días de edad fueron puestas en una solución modificada Hoagland (Richard-Molard *et al.*, 2008), en ausencia de N por 4 días. Posteriormente, se filtraron 500 ml de la solución Hoagland y se le adicionó 1.8 mCi de $[^{32}\text{P}]$ ácido fosfórico. Las plántulas fueron incubadas por dos horas en este medio y después del tiempo de incubación, las plántulas fueron divididas en lotes de 15 plántulas por cada tratamiento y se incubaron en 1 mM de NO_3^- durante 0, 1, 2, 4, 6 y 12 horas.

Se separaron las raíces de las plántulas y se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizó la extracción de proteínas totales como se describió en el capítulo anterior y éstas fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE.

El gel después de la electroforesis fue teñido con azul de Coomassie para visualizar las bandas, posteriormente secado en marcos de acrílico, y expuesto en película de la marca High performance autoradiography film (Amersham Hyperfilm™ MP) y visualizado por autoradiografía.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 EFECTO SOBRE LA FOSFORILACIÓN *in vivo* DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LAS RAÍCES DE CHILE HABANERO EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A NITRATO

Los resultados de la fosforilación *in vivo* de proteínas presentes en el extracto total de raíces de chile habanero se muestran en la figura 4.1, en donde en el panel inferior se muestra el perfil de proteínas teñidas con azul de Coomassie (4.1B), indicando una cantidad similar de proteínas en cada carril y en el panel superior se muestra la autoradiografía (4.1A).

Un total de ocho bandas de proteínas incorporaron ortofosfato a su estructura, dichas proteínas tuvieron pesos moleculares de: 26, 29, 35, 39, 42, 55, 66 y 101 kDa respectivamente, de las cuales cinco bandas con pesos moleculares de 26, 29, 35, 39 y 42 kDa fueron observadas a partir de la primera hora de exposición de las raíces a NO_3^- , prolongándose a lo largo de todo el tratamiento.

Por otro lado, una banda de 55 kDa se observó desde el tiempo 0 de exposición de las raíces a NO_3^- , y desapareció a las 12 horas de tratamiento. Una banda de 52 kDa se observó desde el tiempo 0, desapareció a las 6 horas, y se restableció a las 12 horas de exposición de las raíces a NO_3^- . Se observaron dos bandas de 66 y 101 kDa respectivamente, las cuales estuvieron presentes en el tiempo cero y aumentaron a partir de la primera hora, observándose hasta las 12 horas que duró el tratamiento de las raíces (Figura 4.1).

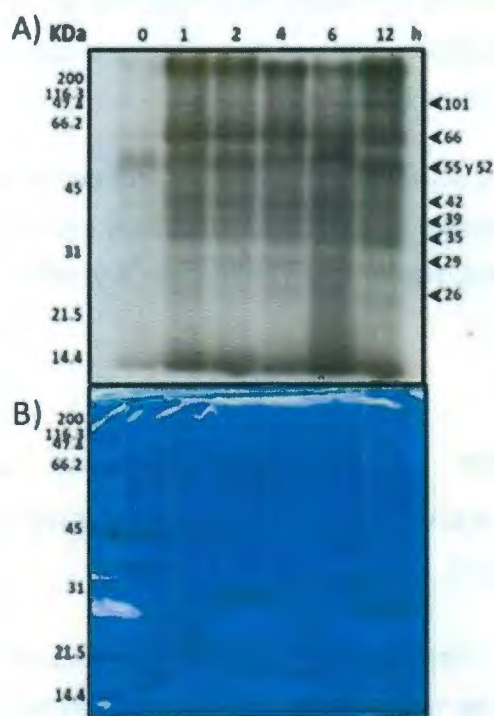


Figura 4.1 Efecto del nitrato sobre la fosforilación *in vivo* de proteínas totales de raíces de chile habanero sometida a 1 mM de KNO₃ durante diferentes tiempos de exposición. Se llevó a cabo la fosforilación *in vivo* de las proteínas de la raíz de chile habanero usando 1.8 mCi de [³²P] ácido fosfórico. Marcador de peso molecular (MM), 0, 1, 2 4, 6, 12 corresponden a los diferentes intervalos del tiempo de exposición en horas al nutriente. A): autoradiografía de proteínas fosforiladas. B): perfil de proteínas teñidas con azul de Coomassie del mismo gel.

4.4 DISCUSIÓN

Se observaron nueve bandas correspondientes a los pesos moleculares de: 26, 29, 35, 39, 42, 52, 55, 66 y 101 kDa en el perfil de fosforilación de proteínas *in vivo* en respuesta a la exposición de las raíces a 1 mM de NO₃⁻.

Se pudieron observar proteínas fosforiladas desde los primeros minutos de exposición de las raíces a NO₃⁻, como lo observado para la banda de 55 kDa, la cual se fosforila desde el primer contacto de las raíces con NO₃⁻ y se mantiene sin cambios a lo largo de todo el tratamiento. También se observa la fosforilación de las proteínas de 66 y 101 kDa al

tiempo cero, cuya fosforilación aumentan a la primera hora de exposición prolongándose a lo largo del tratamiento. En este caso pudiese tratarse de alguna proteína involucrada en la absorción de NO_3^- , señalización o en el metabolismo de la planta, ya que estas proteínas son de activación temprana en respuesta a NO_3^- (Wang *et al.*, 2003; Krout *et al.*, 2010; Krouk *et al.*, 2011), lo cual se tendría que demostrar posteriormente.

También, se observó la inducción de la fosforilación de proteínas a las primeras horas de exposición a NO_3^- . Existe un reporte de proteínas que se fosforilan en respuesta temprana a NO_3^- , como es el caso de proteínas involucradas en la asimilación de N, la síntesis de tetrapirrol, la síntesis de nucleótidos y las ATPasas, las cuales fueron fosforiladas con el reabastecimiento de N en *Arabidopsis* (Engelsberger y Schulze, 2012).

En cuanto a proteínas fosforiladas en residuos de treonina en respuesta a NO_3^- , el único reporte es el de la fosforilación del transportador NRT1.1 que se fosforila en un residuo de treonina T101 a bajas concentraciones de NO_3^- . Este transportador tiene un peso molecular de alrededor de 50 kDa (Liu y Tsay, 2003).

En las plantas existen reportes de la inducción de la fosforilación de proteínas en respuesta a estímulos, como la fosforilación inducida por sacarosa (Niittlä *et al.*, 2007), al tratamiento inductor xilanasa (Benschop *et al.*, 2007) y fructosa 2,6 -bifosfato (Nühse *et al.*, 2007), a fitohormonas (Chen *et al.*, 2010; Kline *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2008), a condiciones de luz y oscuridad en los cloroplastos (Reiland *et al.*, 2009). Sin embargo, excepto el trabajo reportado recientemente de Engelsberger y Schulze, (2012) no existe información de la fosforilación en experimentos *in vivo* de proteínas en respuesta a tratamientos de NO_3^- . Por tanto nuestros estudios en respuesta a NO_3^- son de gran importancia y relevancia.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Benschop J.J., Mohammed S., O'Flaherty M., Heck A.J., Slijper M. y Menke F.L. (2007). Quantitative phospho-proteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell Proteomics*, 6: 1705-1713.
- Chen Y., Ho W. y Weckwerth W. (2010). Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂ phosphopeptide enrichment and MAPA. *Plant Journal*, 63: 1-17.
- Crawford N.M. y Forde B.G. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *American Society of Plant Biologists*, 45: 2-24.
- Engelsberger W.R. y Schulze W. X. (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04848.x.
- Forde B.G. (2002). The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate starved *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 53: 39-43.
- Hubbard M.J., y Cohen P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochemistry Science*, 18: 172-177.
- Huber S.C. y Huber J.L. (1995). Metabolic activator of spinach leaf nitrate reductase: effects on enzymatic activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. *Planta*, 196: 180-189.
- Huber S.C., Huber J.L. y McMichael W.R. (1994). Control of plant enzyme activity by reversible protein phosphorylation. *International Review of Cytology* 149: 47-98.
- Kline K.G., Barrett-Wilt G.A. y Sussman M.R. (2010). In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *PNAS of the United States of America*, 107: 15986-15991.
- Krouk G., Mirowski P., LeCun Y., Shasha D.E. y Coruzzi G.M. (2010). Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biology*, 11: 123-141.

- Krouk G., Ruffel S., Gutierrez R.A., Gojon A., Crawford N.M., Coruzzi G.M. y Lacombe B. (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Science*, 16: 178-182.
- Liu K.H. y Tsay Y.F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO Journal* 22:1005-1013.
- Niittylä T., Fuglsang A.T., Palmgren M.G., Frommer W.B. y Schulze, W.X. (2007). Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of *Arabidopsis*. *Molecular Cell Proteomics*, 6: 1711-1726.
- Nühse T.S., Bottrill A.R., Jones A.M. y Peck S.C. (2007). Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant Journal*, 51: 931-940.
- Raymond J.A. y Chollet R. (1988). Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. *Physiol Plantarum*, 72: 435-439.
- Reiland S., Messerli G., Baerenfäller K., Gerrits B., Endler A., Grossmann J., Grissem W. y Baginsky S. (2009). Large-scale *Arabidopsis* phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiology*, 150: 889-903.
- Richard-Molard C., Krapp A., Brun F., Ney B., Daniel-Vedele F. y Chaillous S. (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *Journal Experimental Botany*, 59: 779-791.
- Scheible W., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C. y Osuna D. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136: 2483-2499.
- Silva B. (2002). Apuntes de cátedra de fertilidad y fertilizantes. Escuela de agronomía, Universidad Mayor Santiago, Chile. 67-68.

CAPÍTULO IV

- Sopory S.K. y Munshi M. (1998). Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews Plant Science*, 3: 245-318.
- Steen H., Jebanathirajah J.A., Rush J., Morrice N. y Kirschner M.W. (2006). Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Molecular Cell Proteomics*, 5: 172-181.
- Stitt M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion Plant Biology*, 2: 178-186.
- Stitt M., Muller C., Matt P., Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W.-R. y Krapp A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal Experimental Botany*, 53: 959-970.
- Stone J.M. y Walker J.C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology*, 108: 451-457.
- Tang W., Deng Z., Oses-Prieto J.A., Suzuki N., Zhu S., Zhang X., Burlingame A.L. y Wang Z.Y. (2008). Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Molecular Cell Proteomics*, 7: 728-738.
- Wang R., Guegler K., Labrie S.T. y Cradford N.M. (2000). Genomics analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell*, 12: 1491-1510.
- Wang R., Okamoto M., Xing X. y Cradford N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* root and shoot reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, 136: 2512-2522.
- Wang Y.-H., Garvin D.F. y Kochian L.V. (2001). Nitrate-induced genes in tomato roots: array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 127: 345-359.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

En este capítulo se hace una discusión general de los estudios de fosforilación *in vitro* e *in vivo*, de la inmunodetección de aminoácidos fosforilados en residuos de treonina, serina y tirosina, así como de actividad MAP cinasa de proteínas de raíces de chile habanero en respuesta a NO_3^- .

Debido a la heterogeneidad ambiental, las plantas modifican su desarrollo para poder adaptarse y responder a estas condiciones, proceso conocido como plasticidad. En estos cambios deben intervenir procesos de señalización que conlleven a la expresión de genes, conduciendo a la síntesis de nuevas proteínas que sostengan los cambios en el desarrollo de los órganos, tales como la raíz. Dentro de ellos, la fosforilación de proteínas es un evento que participa y se modifica durante la respuesta de los organismos al ambiente (Castaings *et al.*, 2011).

Uno de los eventos en los que se comienza a elucidar la función de la fosforilación de proteínas es aquel que involucra la respuesta de las raíces a N, particularmente a NO_3^- (Ho *et al.*, 2009). Se han llevado a cabo diversos estudios en las plantas que describen los cambios de la expresión génica en respuesta a tratamientos de déficit y restitución de NO_3^- . En estos estudios se han detectados cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en procesos de señalización, de metabolismo y de transporte (Krouk *et al.*, 2010; Morcuende *et al.*, 2007; Osuna *et al.*, 2007; Schieble *et al.*, 1997).

Actualmente, casi todos los estudios que se conocen de la fosforilación de proteínas en respuesta a NO_3^- son a partir de análisis bioinformáticos, los cuales son de mucha relevancia para este estudio, ya que nos proporcionan evidencia de la fosforilación de proteínas en respuesta a NO_3^- . Los únicos demostrados hasta el momento son: la fosforilación de la enzima NR, (Kaiser y Huber, 2001), y los transportadores NRT1.1 para el NO_3^- (Ho *et al.*, 2009) y AMT1.1 de NH_4^+ (Lanquar *et al.*, 2009; Loque *et al.*, 2007) los cuales son regulados por eventos de fosforilación.

En este trabajo se realizaron ensayos para evaluar la actividad de proteínas cinasas de

CAPÍTULO V

las raíces de chile habanero expuestas a 1 mM de NO_3^- durante tiempos cortos de 0, 4, 6, 12 y 24 horas.

La fosforilación *in vitro* de proteínas de las raíces de chile habanero expuesta a NO_3^- observada en este trabajo fue diferente para los tres extractos analizados (total, citosólico y membranal).

Estos cambios en parte fueron influenciados por la presencia de Ca^{2+} (Figura 2.1 y 2.3), ya que se observó que algunas proteínas se fosforilaron en presencia de Ca^{2+} , pero no fueron detectadas en ausencia del mismo. Existe un reporte en plantas que sugiere la participación del Ca^{2+} en respuesta a NO_3^- , participando en la activación de proteínas cinasas, la cual provoca una cascada de señalización que conduce a la activación de la expresión de genes en respuesta temprana a NO_3^- , los productos de dichos genes participan en el desarrollo y crecimiento de RL (Wang *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se observó la fosforilación de proteínas en el extracto total, las cuales no fueron detectadas en los extractos citosólico y membranal. Esto sugiere que posiblemente algunas de las fosforilaciones observadas en el extracto total se estén dando por una interacción de las proteínas citosólicas y membranales, o de algún otro componente, por eso al separarlas no se puede detectar dicha fosforilación.

También, se observó la fosforilación de proteínas en los extractos citosólico y membranal que no fueron detectados en el extracto total. Una posible causa podría ser la presencia de algún inhibidor en el extracto total, el cual al separarse los extractos no pueda ejercer la función inhibitoria, lo cual favorece la fosforilación de proteínas observadas en los extractos por separado.

En los estudios de inmunodetección de proteínas fosforiladas en residuos de treonina, serina y tirosina de los extractos total, citosólico y membranal, se observaron cambios significativos en respuesta a la exposición de las raíces a NO_3^- . En el extracto total se observaron cambios importantes en los niveles de fosforilación de proteínas, en residuos de treonina (Figura 3.2A), en este último se detectaron dos bandas mayoritarias de 31 y 35 kDa a las 6 h de exposición de las raíces a NO_3^- . Con base a estos resultados, en los ensayos de fosforilación *in vivo* decidimos inmunoprecipitar las proteínas utilizando un

anticuerpo primario anti-fosfotreonina, pero no pudimos detectar estas bandas.

También, en nuestro trabajo observamos que no se pudo detectar fosforilación en el residuo de serina en los extractos citosólicos y membranal (Figura 3.3 B y 3.4 B), evento que no se ha podido explicar, ya que se observó una buena separación y transferencia de las proteínas a la membrana.

Se realizó un ensayo para evaluar la actividad MAP cinasa de las raíces expuestas a 1 mM de NO_3^- a tiempos de exposición de 0, 4, 6, 12 y 24 horas.

Los resultados de la actividad de MAP cinasa en respuesta a NO_3^- muestran una disminución en la actividad de dos proteínas (Figura 2.4 y 2.5), las cuales se encontraban activas en las raíces de chile habanero que habían sido sometidas a un período de déficit de N y al restablecerles la fuente de N en forma de NO_3^- la actividad de las proteínas fue disminuyendo.

Una posible explicación de lo observado puede deberse a que el NO_3^- inhibe la señalización de ABA (Wang *et al.*, 2012). Reportes señalan que ABA, es capaz de promover la producción de óxido nítrico (NO) y de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a través de una activación de la proteína MAPK6 (Wang *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2008), mientras que el NO producido puede interactuar con las auxinas para promover el desarrollo de RL (Kolbert *et al.*, 2008).

Por último, se realizó un ensayo de fosforilación *in vivo* de proteínas de las raíces expuestas a 1 mM de NO_3^- a tiempos de exposición de 0, 1, 2, 4, 6 y 12 horas. En estos ensayos se observó que la fosforilación de proteínas ocurrió desde los primeros minutos de exposición de las raíces a NO_3^- y que algunas bandas aumentaron su intensidad a partir de la primera hora de exposición, prolongándose a lo largo de tratamiento (Figura 4.1). Estos resultados nos indican que pudiese tratarse de algunas proteínas involucradas en la absorción del NO_3^- , en la señalización o en el metabolismo de las plantas, debido a que estas proteínas son de activación temprana en respuesta a NO_3^- (Wang *et al.*, 2003; Krout *et al.*, 2010; Krouk *et al.*, 2011).

También, se observó la inducción de la fosforilación de proteínas a las primeras horas de exposición a NO_3^- , prolongándose en todos los tiempos ensayados (Figura 4.1).

CAPÍTULO V

Recientemente, se reportó la identificación de algunas proteínas que se fosforilan en respuesta temprana a NO_3^- , como es el caso de proteínas involucradas en la asimilación de N, en la síntesis de tetrapirroles, en la síntesis de nucleótidos y ATPasas, las cuales fueron fosforiladas con el reabastecimiento de N en *Arabidopsis* (Engelsberger y Schulze, 2012).

La integración de los resultados de fosforilación *in vitro* e *in vivo*, muestran un total de 11 bandas (25, 37, 39, 41, 44, 46, 49, 52, 55, 57, 66 kDa) y de 9 bandas (26, 29, 35, 39, 42, 52, 55, 66, 101 kDa) respectivamente, de las cuales 4 bandas de proteínas (39, 52, 55, 66 kDa) se presentaron en ambos experimentos (Figura 5.1).



Figura 5.1 Diagrama de comparación de la fosforilación de proteínas *in vitro* e *in vivo* de raíces de chile habanero en respuesta a nitrato.

Los ensayos de fosforilación *in vivo* son el resultado final de eventos de fosforilación / desfosforilación, esto podría explicar el hecho de que haya más bandas en la fosforilación *in vitro* que *in vivo*. Las proteínas que se fosforilan en respuesta al tratamiento, podrían ser blancos de fosfatasas que podrían activarse en respuesta a NO_3^- , en conjunto con las cinasas. Se sabe que existen genes de fosfatasas que se inducen en respuesta a NO_3^- (Engelsberger y Schulze, 2012), pero a nivel de actividad de estas proteínas no existen reportes.

El comportamiento de las bandas observadas en ambos ensayos es la siguiente:

La banda de 39 kDa *in vitro*, se observó a partir de las 4 horas hasta las 12 horas de

exposición de las raíces a NO_3^- en el extracto membranal, *in vivo* se observa sin variación desde el tiempo cero hasta las 12 horas de tratamiento. La banda de 52 kDa, *in vitro* se observó desde el tiempo cero, prolongándose hasta las 12 horas de tratamiento en el extracto membranal, *in vivo*, se observó desde el tiempo cero, desapareció a las 6 horas y se restableció a las 12 horas de tratamiento. La banda de 55 kDa *in vitro*, se observó únicamente a las 12 horas de exposición con NO_3^- en el extracto total, *in vivo* se observó desde el tiempo cero hasta las 12 horas de exposición. Por último, la banda de 66 kDa, *in vitro* se observó en todos los tiempos de exposición de las raíces a NO_3^- para el extracto citosólico y a partir de las 4 hasta las 24 horas de tratamiento para el extracto membranal, *in vivo*, se observó desde el tiempo cero, aumentando hasta las 12 horas de tratamiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelan la fosforilación de proteínas en respuesta a NO_3^- , así como también en respuesta al tiempo de exposición de las raíces de chile habanero a dicho nutriente. También revela, la fosforilación de proteínas en residuos de treonina, serina y tirosina.

BIBLIOGRAFÍA

- Castaings L., Marchive C., Meyer C. y Krapp A. (2011). Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to obtain insights into a complex signalling network. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1391–1397.
- Engelsberger W.R. y Schulze W. X. (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen. Doi / 10.1111/j.1365-313X.2011.04848.x.
- Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C. y Tsay Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138: 1184-1194.
- Kaiser W.M. y Huber S.C. (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal Experimental Botany*, 52: 1981-1989.
- Kolbert Z., Bartha, B. y Erdei L. (2008). Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal Plant Physiology*, 165: 967-975.
- Krouk G., Mirowski P., LeCun Y., Shasha D.E. y Coruzzi G.M. (2010). Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biology*, 11: 123-141.
- Krouk G., Ruffel S., Gutierrez R.A., Gojon A., Crawford N.M., Coruzzi G.M. y Lacombe B. (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Science*, 16: 178-182.
- Lanquar V., Loque D., Hörmann F., Yuan L., Böhner A., Engelsberger W.R., Lalonde S., Schulze W.X., Von Wiren N. y Frommer W.B. (2009). Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3610-3622.
- Loque D., Lalonde S., Looger L.L., von Wiren N. y Frommer W.B. (2007). A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*, 446: 195-198.

- Morcuende R., Bari R., Gibon Y., Zheng W., Pant BD., Bläsing O., Usadel B., Czechowski T., Udvardi MK., Stitt M. y Scheible WR (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ*, 30: 85-112.
- Osuna D., Usadel B., Morcuende R., Gibon Y., Bläsing O.E., Höhne M., Günter M., Kamlage B., Trethewey R., Scheible W.R. y Stitt M. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*. 49: 463-491.
- Scheible W., González A., Lauerer M., Muller-Rober B., Caboche M. y Stitt M. (1997). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, 9: 783-798.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D. y Song C.P. (2010). Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 22: 2981-2998.
- Wang R., Okamoto M., Xing X. y Cradford N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* root and shoot reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, 136: 2512-2522.
- Wang X., Bian Y., Cheng K., Zou H., Sai S., Sun M., y He J-X. (2012). A comprehensive differential proteomic study of nitrate deprivation in *Arabidopsis* reveals complex regulatory networks of plant nitrogen responses. *Journal of Proteome*, Doi /10.1021 /pr2010764.
- Xing Y., Jia W. y Zhang J. (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 54: 440-451.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Nuestro trabajo es pionero en estudios de fosforilación de proteínas de raíces en respuesta a NO_3^- y nuestro estudio proporciona información importante sobre la fosforilación de proteínas bajo condiciones de carencia y el reabastecimiento de dicho nutriente.

También contribuye a la comprensión de los complejos patrones de fosforilación con respecto a cambios a periodos cortos de exposición, bajo condiciones nutricionales externas de NO_3^- en la planta.

En resumen podemos decir que:

- El NO_3^- indujo cambios en la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de proteínas presentes en las raíces de chile habanero.
- Se identificaron proteínas que se fosforilan en residuos de serina, treonina y tirosina en respuesta a NO_3^- .
- Se identificaron proteínas MAP cinasas que se inactivan en respuesta a NO_3^- .

PERSPECTIVAS

La fosforilación de proteínas en respuesta a NO_3^- en plantas, es un fenómeno muy poco estudiado. Este trabajo es una primera aproximación que da la pauta para nuevas líneas de investigación en el campo de la fosforilación y de los mecanismos de señalización del NO_3^- en plantas. Los resultados y conclusiones de este trabajo, son apenas las evidencias de que ocurren cambios en la fosforilación de las proteínas en respuesta a NO_3^- , lo cual es de gran importancia ya que abre camino para entender las complejas redes de regulación a nivel proteómica en respuesta a la presencia del NO_3^- .

Aún falta mucho por conocer de esta compleja red de regulación en respuesta a NO_3^- , por

CAPÍTULO VI

tanto sería de gran importancia realizar estudios más profundos en este tema. A continuación se enlistan algunas de las perspectivas de este trabajo.

- Realizar una electroforesis en doble dimensión para obtener una mayor separación de las proteínas que se están regulando en respuesta a nitrato, ya que con los estudios realizados de electroforesis en una dimensión, no podemos tener la certeza de que se trate de una sola proteína o de un grupo de proteínas del mismo peso molecular.
- Purificar las bandas sobresalientes de las proteínas que modifican su intensidad de fosforilación para mandarlas a secuenciar y poder conocer cuál es la proteína que se está regulando en respuesta a dicho nutriente.
- Seguir estudiando el papel del Ca^{2+} en la regulación de la fosforilación en respuesta a NO_3^- .
- Utilizar inhibidores de cinasas, para saber el papel de la fosforilación en los cambios en el desarrollo de la raíz en respuesta a NO_3^- en chile habanero.