



Dirección General de Institutos Tecnológicos

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ACAYUCAN

UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATAN A. C.
CICY

*"Patrones proteicos extracelulares en cultivos hidropónicos de chile
habanero (Capsicum chinense Jacq) bajo condiciones de inducción"*

T E S I S

Que para obtener el título de:

INGENIERO BIOQUÍMICO

Presenta:

HEIDY GUADALUPE MARTÍNEZ SÁNCHEZ
010B0204

Asesor:

DR. VÍCTOR MANUEL LOYOLA VARGAS

Enero de 2009

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1.....	4
1.1 GENERALIDADES.....	7
1.1.1 Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq).....	7
1.2 TAXONOMÍA.....	9
1.3 ESPECIES.....	11
1.4 RAÍCES.....	11
1.5 RAÍCES COMO VÍA DE SECRECIÓN Y EXCRECIÓN.....	13
1.6 EXUDADOS DE RAÍCES.....	14
1.6.1 Interacciones de los exudados entre planta-planta, planta-microbio.....	16
1.8 MECANISMO DE DEFENSA EN PLANTAS.....	18
1.8.1 Inductores.....	18
1.8.1.1 Ácido jasmónico y su éster metílico.....	19
1.8.1.2 Ácido salicílico (AS).....	20
1.8.1.3 Óxido nítrico (NO).....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
CAPITULO 2.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO (SEMILLAS).....	25
2.2 CONDICIONES DE CULTIVO DEL MATERIAL VEGETAL.....	25
2.3 INDUCCIÓN CON JASMONATO DE METILO, ÁCIDO SALICÍLICO Y ÓXIDO NÍTRICO.....	27
2.4 RECOLECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS.....	28
2.6 ELECTROFORESIS DE DOBLE DIMENSIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA (2D-PAGE).....	30
2.6.1 Electroenfoque.....	30
2.6.2 Fase de equilibrio.....	31
2.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	31
2.8 TINCIÓN DEL GEL (2D-PAGE) CON NITRATO DE PLATA.....	31
2.9 EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES.....	32
2.10 ANÁLISIS EN HPLC.....	33
CAPITULO 3.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS HIDROPÓNICOS.....	35
3.2 EXUDADOS DE CHILE HABANERO.....	36
3.3 EL PH DEL MEDIO DE CULTIVO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.....	37
3.4 ANÁLISIS DE 2D PAGE DE LOS EXUDADOS PROTEICOS DEL MEDIO DE CULTIVO.....	38
3.5 CANTIDAD EN [PPM] DE CAPSAICINOIDES SECRETADOS AL MEDIO DE CULTIVO POR LAS RAICES DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.....	53
3.6 IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE CAPSAICINOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	54

CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS.....	63
REFERENCIAS.....	64
COMENTARIOS.....	73
ANEXOS.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la raíz.....	11
Figura 2. Diseño experimental del proyecto.....	23
Figura 3. Esquema general de cultivos hidropónicos de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq).	35
Figura 4. Contenido de proteínas totales en exudados radiculares en cultivos hidropónicos de chile habanero, a través de un curso temporal de 60 días.....	36
Figura 5. Variabilidad del pH en los diferentes tratamientos.....	37
Figura 6. Análisis 2D de los exudados radiculares en cultivos hidropónicos de <i>Capsicum chinense</i>	38
Figura 7. Comparación del patrón proteico en las regiones A y B de los geles testigo y etanol, después de 72 horas de inducción.....	39
Figura 8. Comparación del patrón proteico en las regiones A Y B de los geles etanol y Meja, después de 72 horas de inducción.....	41
Figura 9. Comparación del patrón proteico en las regiones A Y B de los geles testigo y ácido salicílico, después de 72 horas de inducción.....	42
Figura 10. Comparación del patrón proteico en las regiones A y B de los geles testigo y óxido nítrico, después de 72 horas de inducción.....	43
Figura 11. Comparación del patrón proteico en las regiones C, D y E de los geles testigo y etanol, después de 72 horas de inducción.....	45
Figura 12. Comparación del patrón proteico en las regiones C, D y E de los geles etanol y Meja, después de 72 horas de inducción.....	47
Figura 13. Comparación del patrón proteico en las regiones C, D y E de los geles testigo y ácido salicílico, después de 72 horas de inducción.....	48
Figura 14. Comparación del patrón proteico en las regiones C, D Y E de los geles testigo y óxido nítrico, después de 72 horas de inducción.....	50
Figura 15. Número total de proteínas observadas en cada tratamiento.....	52
Figura 16. Proteínas diferenciales, que aparecen y desaparecen de acuerdo al tratamiento.....	52
Figura 17. Contenido de capsaicinoides en el medio de cultivo producido por los diferentes tratamientos.....	54
Figura 18. Cromatograma de HPLC de compuestos capsaicinoides obtenidos de la muestra testigo.....	55
Figura 19. Efecto del Jasmonato de metilo, etanol absoluto y el testigo con respecto a la secreción de capsaicina y dihidrocapsaicina al medio de cultivo.....	57
Figura 20. Efecto del ácido salicílico en relación con la secreción de capsaicina y dihidrocapsaicina al medio de cultivo.....	57
Figura 21. Efecto del óxido nítrico en relación la secreción de capsaicina y dihidrocapsaicina al medio de cultivo.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio Gamborg a 10X.....	26
Cuadro 2. Tratamientos.....	27
Cuadro 3. Análisis cuantitativo de proteínas presentes en los diferentes geles.....	51

RESUMEN

El tema sobre los exudados producidos por las raíces es de gran importancia para este proyecto, se sabe que un amplio número de especies vegetales secretan moléculas de bajo y alta masa molecular, entre las cuales encontramos a las proteínas, las cuales son un grupo muy importante de macromoléculas. Algunas de ellas están relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas. Actualmente en la literatura hay poca información sobre exudados radiculares, ya que es más común enfocarse a los órganos aéreos de las plantas que a su raíz, a la que comúnmente sólo se le asignan las funciones de anclaje y de toma de nutrientes y agua. Por ello y para profundizar en el tema se planteó trabajar en cultivos hidropónicos con una especie de gran importancia cultural y económica, como es el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Para analizar la producción diferencial de proteínas que exuda esta planta, se utilizaron diferentes condiciones de inducción y cada uno de los diferentes tratamientos se compara con respecto a un testigo (sin inductor), en la muestra sin tratar se pudieron detectar alrededor de 135 proteínas en sus exudados, en las muestras tratadas con MeJA se detectaron 81 proteínas, con ácido salicílico 80 proteínas y con óxido nítrico 46 proteínas.

El patrón de secreción cambia de manera notable dependiendo del inductor empleado. El cambio más importante es la disminución al 50% en la secreción de proteínas producida por el óxido nítrico.