



Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica



Dirección General de Educación Superior Tecnológica



Dirección General de Institutos Tecnológicos

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ACAYUCAN

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

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

TESIS

Que para obtener el título de:

INGENIERO BIOQUÍMICO

Presenta:

HEIDY GUADALUPE MARTÍNEZ SÁNCHEZ
010B0204

Asesor:

DR. VÍCTOR MANUEL LOYOLA VARGAS

06-02-2009

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 RAÍCES 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.