

## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

### ABSTRACT

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                         | 1  |
| 2. MARCO TEÓRICO .....                                                        | 4  |
| 2.1 Generalidades del chile habanero .....                                    | 4  |
| 2.1.1 Distribución del genero Capsicum .....                                  | 4  |
| 2.1.2 Origen y llegada del chile habanero a la Península de Yucatán .....     | 5  |
| 2.1.3 Clasificación taxonómica .....                                          | 6  |
| 2.1.4 Características del chile habanero de la Península de Yucatán .....     | 6  |
| 2.1.4.1 Descripción del fruto .....                                           | 7  |
| 2.1.4.2 Pungencia del fruto .....                                             | 8  |
| 2.1.4.3 Características de la semilla .....                                   | 8  |
| 2.1.5 Nutrición nitrogenada en el chile habanero .....                        | 8  |
| 2.2 Estructura de la raíz.....                                                | 9  |
| 2.2.1 Raíces: diferentes áreas, absorben diferentes iones minerales .....     | 12 |
| 2.2.2 Mecanismos de absorción de nutrientes por las raíces .....              | 13 |
| 2.2.3 Respuesta radicular del chile habanero a la presencia de nitrógeno..... | 14 |
| 2.3 Distribución y disponibilidad de nutrientes en el suelo.....              | 15 |
| 2.3.1 Nitrógeno en el suelo .....                                             | 16 |
| 2.3.2 Nitrógeno inorgánico.....                                               | 17 |
| 2.3.3 Nitrógeno orgánico .....                                                | 17 |
| 2.4 Transportadores de Nitrógeno .....                                        | 18 |
| 2.5 Mecanismo de detección de la presencia de Nitrógeno en el suelo .....     | 19 |
| 2.5.1. Receptores de aminoácidos .....                                        | 20 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.2 Receptores de glutamato de mamíferos .....                                 | 20 |
| 2.5.2.1 Receptores de glutamato tipo AMPA/KA .....                               | 21 |
| 2.5.2.2 Receptores de glutamato en plantas .....                                 | 23 |
| 2.5.2.3 Herramientas farmacológicas para el estudio de los iGluRs .....          | 24 |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....                                                           | 26 |
| 4. OBJETIVOS .....                                                               | 28 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL .....                                                       | 28 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                  | 28 |
| 5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....                                                     | 29 |
| 5.1 REACTIVOS QUÍMICOS .....                                                     | 29 |
| 5.2 REACTIVOS BIOLÓGICOS .....                                                   | 33 |
| 5.2.1 Productos biológicos .....                                                 | 33 |
| 5.2.2 Material biológico .....                                                   | 35 |
| 5.3 EQUIPOS .....                                                                | 35 |
| 5.4 METODOLOGÍA .....                                                            | 35 |
| 5.4.1. Material vegetal .....                                                    | 35 |
| 5.4.1.1 Esterilización de material de laboratorio .....                          | 36 |
| 5.4.1.2. Desinfestación de semillas .....                                        | 36 |
| 5.4.1.3 Germinación de semillas .....                                            | 36 |
| 5.4.1.4 Crecimiento de plántulas .....                                           | 36 |
| 5.4.1.5 Transferencia de las semillas germinadas a las cajas de crecimiento..... | 36 |
| 5.4.1.6 Experimentos con D-Ala/DNQX y D-Ala/BMAA .....                           | 37 |
| 5.4.2 Clonación del gen del receptor de glutamato de C. chinense .....           | 37 |
| 5.4.2.1 Diseño de los oligonucleótidos .....                                     | 38 |
| 5.4.2.2 Extracción de ADN genómico .....                                         | 39 |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.4.2.3 Extracción de ARN total.....                                                                                                            | 39 |
| 5.4.2.4 Obtención del ADN complementario.....                                                                                                   | 40 |
| 5.4.2.5 Obtención del fragmento con similitud a un GLR.....                                                                                     | 41 |
| 5.4.2.6 Purificación de los productos de amplificación .....                                                                                    | 41 |
| 5.4.2.7 Clonación en el vector pJET1.2/blunt .....                                                                                              | 41 |
| 5.4.2.8 Transformación de células de la cepa Top10 y DH5α de E. coli .....                                                                      | 42 |
| 5.4.2.9 Recuperación de clones .....                                                                                                            | 42 |
| 5.4.2.10 Extracción y purificación del plásmido .....                                                                                           | 42 |
| 5.4.2.11 Análisis de las transformantes .....                                                                                                   | 42 |
| 5.4.2.12 Análisis de las secuencias obtenidas .....                                                                                             | 43 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                                                                 | 44 |
| 6.1 ESTUDIO DEL PAPEL DE UN RECEPTOR DE GLUTAMATO EN EL EFECTO DE LA D-ALANINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE CHILE HABANERO. .... | 44 |
| 6.1.1 Efecto de los tratamientos DNQX-BMAA en el crecimiento de la raíz primaria de chile habanero, tratada con D-Ala .....                     | 44 |
| 6.1.2 Efecto de la D-Alanina y/o el agonista y/o antagonista de los receptores de glutamato sobre la aparición de pelos radiculares.....        | 49 |
| 6.1.3 Efecto de la D-Alanina y/o el agonista y/o antagonista de los receptores de glutamato sobre la aparición de raíces laterales.....         | 50 |
| 6.2 OBTENCIÓN DEL RECEPTOR DE GLUTAMATO DE C. chinense Jacq. ....                                                                               | 53 |
| 6.2.1 Diseño y especificidad de los iniciadores .....                                                                                           | 53 |
| 6.2.2 Amplificación de los genes a partir de ADN total y ADNc.....                                                                              | 55 |
| 6.3 CLONACIÓN PARCIAL DE UN POSIBLE RECEPTOR DE GLUTAMATO DE C. chinense.....                                                                   | 57 |
| 6.3.1 Clonación parcial del gen GLR en el vector de expresión pJET1.2/blunt ....                                                                | 57 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3.2 Análisis de las clonas de <i>E. coli</i> transformantes .....          | 58 |
| 6.3.3 Identificación del receptor de glutamato de chile habanero .....       | 59 |
| 6.3.4 Determinación del grado de identidad contra genes GLRs homólogos ..... | 61 |
| 6.3.5 Dominios funcionales de la secuencia CcGLR .....                       | 62 |
| 6.3.6 Perfil de hidrofocidad y organización de dominios en CcGLR .....       | 63 |
| 7. CONCLUSIÓN .....                                                          | 65 |
| 8. PERSPECTIVAS .....                                                        | 68 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA .....                                                        | 69 |
| 10. ANEXOS .....                                                             | 77 |
| 10.1 Secuencia nucleotídica del gen SIGLR2.2 de <i>S. lycopersicum</i> ..... | 77 |
| 10.2 Secuencia nucleotídica del gen SIGLR2.3 de <i>S. lycopersicum</i> ..... | 79 |
| 10.3 Secuencia nucleotídica del gen SIGLR2.4 de <i>S. lycopersicum</i> ..... | 81 |
| 10.4 Secuencia nucleotídica SIGLR2.5 de <i>S. lycopersicum</i> .....         | 83 |
| 10.5 Mapa y características del vector de clonación pJET1.2/blunt .....      | 86 |