

ANÁLISIS DEL EFECTO DE D-AMINOACIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE
ARABIDOPSIS THALIANA Y DE LA PARTICIPACION DE LOS TRANSPORTADORES
TRANS-MEMBRANA AAP1, AAP5 Y LHT1 EN ESTE PROCESO

JUAN SEBASTIAN SUAREZ VILLADA

Código 08218029

Biología

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA

Septiembre de 2014

ANÁLISIS DEL EFECTO DE D-AMINOACIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE
ARABIDOPSIS THALIANA Y DE LA PARTICIPACION DE LOS TRANSPORTADORES
TRANS-MEMBRANA AAP1, AAP5 Y LHT1 EN ESTE PROCESO

JUAN SEBASTIAN SUAREZ VILLADA Código 08218029

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
PREGRADO EN ___ Biología___

Nombre del DIRECTOR:

Dra. Thaura Ghneim Herrera.

Laboratorio de Fisiología Vegetal

Departamento de Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Icesi, Colombia

Nombre del CO-DIRECTOR

Dr. Üner Kolukisaoglu

Plant Physiology / Nano Science Department

Center of Plant Molecular Biology ZMBP

University of Tübingen, Germany

Septiembre de 2014

Florencia Ghione de

FIRMA DEL DIRECTOR

[Signature] Oct 16th 2014

FIRMA DEL CO-DIRECTOR

[Signature]

FIRMA DEL JURADO 1

[Signature]

FIRMA DEL JURADO 2

AGRADECIMIENTOS

Especiales agradecimientos a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi, Colombia y al Centro de Biología Molecular de Plantas (ZMBP) de la Universidad de Tübingen, Alemania, por permitirme realizar este trabajo en colaboración entre las dos instituciones. A mis tutores del proyecto Dra. Thaura Ghneim Herrera, profesora de fisiología vegetal en la universidad Icesi, y Dr. Üner Kolukisaoglu director del programa de estudios de Nano Ciencias en la universidad de Tübingen mis más sinceros agradecimientos por su paciencia y dedicación para conmigo. Especial agradecimiento a la Dra. Zaida Lentini Gil, decana de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi y al Prof. Dr. Klaus Harter director del departamento de Fisiología de plantas del ZMBP por su apoyo para la ejecución de este proyecto. A Eduardo Ruiz Duránte, por su apoyo y orientación en todo momento.

Al Dr. Dierk Wanke, Dra. Friederike Ladwig, Dra. Luise H. Brand, Andreas Hecker , Michael Heunemann, Anne Mohrholz, Rebecca Dautel y Sabine Hummel por recibirme, orientarme y apoyarme amablemente en el laboratorio. A la Dra. Virtudes Mira Rodado por su acompañamiento en la escritura de la versión final de este proyecto.

CONTENIDO

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ciclo del nitrógeno en el suelo. Se muestran las formas de nitrógeno inorgánico y orgánico utilizado por las plantas. También tiene en cuenta que los microbios son fuente de nitrógeno orgánico. (Tomado de Stevenson, 1965).....17
- Figura 2.** Diagrama de Dilución de Dosis de Aminoácidos.....26
- Figura 3.** Respuesta de *Col-0*, *lht-1*, *aap1* y *aap5* ante la exposición a dosis sub letales de algunos D-Aminoácidos. (A) *Col-0*, (B) *lht-1*, (C) *aap5*, (D) *aap1*.....34
- Figura 4.** Respuesta de *aap1*, *aap5*, *lht-1* y *Col-0* tratadas con diferentes D-Aminoácidos.....36
- Figura 5.** Respuesta de *Col-0* a bajas concentraciones de diferentes D-Aminoácidos..38
- Figura 6.** Respuesta de *Col-0* y *lht-1* ante tratamiento con D-Aminoácidos a concentraciones promotoras del crecimiento de estas plántulas.....40

Lista de Tablas

- Tabla 1.** Tabla de relación Genotipo, Aminoácido, Respuesta.....20
- Tabla 2.** Concentraciones tóxicas de D-Aminoácidos establecidas para *Col-0*, *aap1*, *aap5* y *lht-1*.....33

Lista de Anexos

- Análisis Estadístico**.....51

Tabla de Contenidos

1. Introducción	7
2. Descripción del Trabajo	10
2.1. Planteamiento del problema.....	10
2.2. Marco teórico y estado del arte.....	11
2.2.1 Nitrógeno Orgánico. Origen y Diferencia.....	11
2.2.2 D-Aminoácidos en Plantas.....	12
2.2.3. Nitrógeno Orgánico y su Uso por parte de las Plantas.....	15
2.2.4. Actores que Intervienen en la Adquisición de D-Aminoácidos.....	18
2.3. Objetivos.....	22
2.4. Metodología Utilizada.....	23
2.4.1 Organismos Utilizados.....	23
2.4.2 Tamaño de la muestra analizada.....	23
2.4.3 Lugar donde se realizó la investigación.....	23
2.4.4 Metodología Utilizada.....	24
2.4.5 Esterilización de semillas.....	24
2.4.6 Adición y Dilución de D-Aminoácidos en Medio de Cultivo.....	25
2.4.7 Siembra de semillas.....	28
2.4.8 Germinación y Crecimiento de Semillas.....	29
2.4.9 Toma de imágenes de las Plántulas.....	29
2.4.10 Peso seco y Peso fresco de las Plántulas.....	29
2.4.11 Análisis de los Datos y Análisis Estadístico.....	30
2.4.12. Matriz de marco lógico	31
2.5. Resultados.....	32
2.5.1. Experimento 1.....	32
2.5.2. Experimento 2.....	38
2.6. Discusión.....	42
2.7. Conclusiones.....	45
2.8. Recomendaciones.....	46
3. Bibliografía	47

Resumen

Los aminoácidos se presentan en dos configuraciones estructurales: Los enantiómeros levógiros (L-Aminoácidos) y los dextrógiros (D-Aminoácidos). Tradicionalmente, se ha asumido que los D-Aminoácidos representan especies tóxicas para las plantas pues no pueden ser metabolizados por éstas. El objetivo de este trabajo es abordar la situación contradictoria que ha surgido ya que algunos estudios publicados reportan que diferentes D-Aminoácidos tienen efectos tóxicos, mientras que otros reportan que estos compuestos pueden cumplir un rol fisiológico en las plantas o servir como fuente de nitrógeno y promover su crecimiento. En un primer experimento la meta era determinar la máxima concentración de diferentes D-Aminoácidos (D-Alanina, D-Fenilalanina, D-Triptófano, D-Metionina, D-Histidina, D-Glutamato, D-Leucina, D-Tirosina, D-Arginina y D-Serina) que puede ser tolerada por el genotipo silvestre *Col-0* y las líneas mutantes knock out: *aap1*, *aap5* y *lht-1* de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y comparar la tolerancia de estos genotipos a concentraciones tóxicas de estos D-Aminoácidos, lo cual permitiría evaluar si estos compuestos están siendo importados al interior de la planta de forma activa con la participación de los transportadores transmembrana LHT-1 (Lysine Histidine Transporter 1), AAP1 (Amino Acid Permease 1) y AAP5 (Amino Acid Permease 5) que primordialmente transportan L-Aminoácidos o si por el contrario estos D-Aminoácidos ingresan a la planta por difusión o algún otro mecanismo aún no identificado. Para este propósito, semillas del genotipo silvestre *Col-0* de *Arabidopsis thaliana* y de los mutantes *aap1*, *aap5* y *lht-1* fueron germinadas y luego cultivadas durante 15 días en platos de micro-titilación de 96 pozos con medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS y diferentes concentraciones de D-Aminoácidos. Se observó que los mutantes de estos transportadores poseen una mayor resistencia a altas dosis de diferentes D-Aminoácidos lo cual sugiere que estos compuestos son transportados activamente gracias a estos transportadores; se observó que el transportador LHT-1 media el transporte de D-Alanina y AAP5 podría estar involucrado en el transporte de D-Arginina. Finalmente, se observó que AAP1 media el transporte de D-Metionina y adicionalmente pareciera estar involucrado en el transporte de D-Fenilalanina. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los D-Aminoácidos son transportados activamente por las plantas aunque la función fisiológica de estos sigue por ser dilucidada. En un segundo experimento la pregunta abordada era si los D-Aminoácidos tienen un efecto promotor del crecimiento de las plantas. Se estudió el efecto de los D-Aminoácidos mencionados a concentraciones sub letales sobre el genotipo silvestre *Col-0*. Sin embargo, los resultados indican que no hay diferencias significativas entre las plantas tratadas y los grupos control.

Palabras clave: Enantiómeros, Aminoácidos, Transportador Transmembrana, *Arabidopsis thaliana*.

1. Introducción

Los aminoácidos se presentan en dos configuraciones estructurales: Los enantiómeros levógiros (L-Aminoácidos) y los dextrógiros (D-Aminoácidos). Tradicionalmente, se ha asumido que los D-Aminoácidos representan especies tóxicas pues no pueden ser metabolizadas por la planta (Erikson *et al.*, 2004). La captura y utilización preferencial de L-Aminoácidos por la planta han apoyado esta noción (Forsum *et al.*, 2008). Los D-Aminoácidos están presentes en casi todos los tipos de suelos sin que se observen efectos detrimentales sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Gördes *et al.*, 2010). Dado el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las plantas que algunos de ellos presentan en condiciones experimentales, así como su lenta degradación se ha señalado que son detrimentales para las plantas y se ha asumido que los D-Aminoácidos no pueden ser metabolizados y no cumplen ninguna función fisiológica en las plantas (Erikson *et al.*, 2004; Forsum *et al.*, 2008; Näsholm *et al.*, 2008). Sin embargo, diversos estudios han demostrado la existencia de enzimas específicas en plantas como la Oxidasa de D-aminoácidos (DAAO. por sus siglas en inglés) y la amino transferasa de D-Aminoácidos (DAAT. por sus siglas en inglés) involucradas en el metabolismo de D-Alanina, D-Metionina y D-Triptófano, lo cual sugiere un rol funcional para estas moléculas (Gördes *et al.*, 2010). También se ha identificado en plantas una racemasa de alanina lo cual sugiere un rol específico para la D-Alanina, mientras que existen evidencias de que el D-Triptófano es un precursor de auxinas (Rekoslovskaja *et al.*, 1991; Mano *et al.*, 2012), uno de los principales grupos de fitohormonas. Los D-Aminoácidos representan una proporción importante (5-16%) de los aminoácidos libres presentes en el suelo (Pollock *et al.*, 1977). Los niveles varían dependiendo del tipo de suelo y el manejo al cual ha

sido sometido. Los suelos bajo explotación agrícola, por ejemplo, presentan mayores contenidos pues los D-Aminoácidos son aportados como componentes de las heces, herbicidas, antibióticos e insecticidas sintéticos (Vranova *et al.*, 2011). En ecosistemas caracterizados por bajos niveles de nitrógeno inorgánico, los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno (Moe 2013, Näsholm *et al.*, 2008). Este sentido, es fundamental establecer si las plantas pueden hacer uso de los D-Aminoácidos disponibles en la solución del suelo o si por el contrario éstos limitan su crecimiento al acumularse en sus tejidos. El uso de líneas mutantes en estudios de fisiología vegetal ha sido una herramienta valiosa para dilucidar el rol de genes y proteínas en procesos fisiológicos o celulares. En el caso particular del uso de aminoácidos en plantas, la identificación y análisis de mutantes ha permitido identificar proteínas transportadoras que cumplen un rol clave en el transporte activo de diferentes aminoácidos (Fisher *et al.*, 1998). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres familias de estas proteínas: Las Permeasas de Aminoácidos (AAP. por sus siglas en inglés) con ocho proteínas (Bohlmann *et al.*, 2013): AAP1-8 clasificadas en dos subfamilias según su afinidad a la carga de los aminoácidos, los aminoácidos ácidos y neutros son transportados por AAP1, 2 y 4 mientras que las demás tienen una afinidad más amplia en cuanto a la carga del aminoácido. La segunda familia de proteínas está constituida por las permeasas NTR1 que tienen alta afinidad y baja especificidad por los péptidos (Frommer *et al.*, 1995). La tercera familia, denominada LHT, con LHT1 como único componente el cual es homólogo a AAP5 pero tiene una afinidad mucho mayor por la lisina e histidina (Chen *et al.*, 1997). Todos estos transportadores fueron identificados gracias al estudio de sus respectivos mutantes. En términos generales los mutantes *lht-1*, *aap1* y *aap5* muestran

reducción en el transporte de aminoácidos ya que no expresan la respectiva proteína transportadora (LHT-1, AAP1 y AAP5); el mutante *lht-1* presenta una disminución en el transporte de L-Glutamina, L-Alanina, L-Glutamato y L-Aspartato en un 61-85% al compararse con el genotipo silvestre, pero no tiene disminución en el transporte de L-Arginina o L-Lisina (Hirner *et al.*, 2006; Svennerstam *et al.*, 2007). El mutante *aap5* presenta una disminución muy fuerte en el transporte de L-Arginina y L-Lisina, hasta una reducción del 68-88% respecto al genotipo silvestre (Svennerstam *et al.*, 2007). El mutante *aap1* no expresa alteraciones en el transporte de aminoácidos; aunque en algunas concentraciones específicas el transporte de aminoácidos de este mutante fue entre 123-140% al compararse con el genotipo silvestre (Lee *et al.*, 2007). Estas proteínas tienen un rol en el transporte intra e intercelular, así también como en la captura apoplástica. La captura de aminoácidos desde el suelo por la raíz es mediada por estas proteínas dado que se ha encontrado que varias de estas son expresadas principal pero no exclusivamente en este órgano de la planta (Fischer *et al.*, 1998).

En este trabajo, se construyeron curvas de respuesta para el fenotipo silvestre *Col-0* de *Arabidopsis thaliana* contra diferentes concentraciones de los siguientes D-Aminoácidos: D-Alanina, D-Fenilalanina, D-Triptófano, D-Metionina, D-Histidina, D-Glutamato, D-Leucina, D-Tirosina, D-Arginina y D-Serina. Con esto se logró establecer el rango de concentraciones de cada aminoácido tolerado por esta planta al igual que el efecto de concentraciones tóxicas de éstos sobre los procesos de germinación y crecimiento de *Col-0*. La comparación de las curvas dosis respuesta del genotipo silvestre *Col-0* con las obtenidas para los mutantes *lht-1*, *aap-1* y *aap-5* afectados en la actividad de transportadores, permitió establecer que los transportadores LHT-1 y AAP1 también participan en el

transporte de D-Aminoácidos de manera específica lo cual evidencia que no son exclusivos para el transporte de L-Aminoácidos.

2. Descripción del Trabajo

2.1 Planteamiento del Problema

Existe controversia sobre el efecto de los D-Aminoácidos sobre las plantas (revisión detallada en Forsum *et al.*, 2008 y Näsholm *et al.*, 2008). Se señala que varios aminoácidos, en especial los enantiómeros D pueden inhibir el crecimiento de las plantas ya que éstas carecen de las enzimas necesarias para su metabolización (Erikson *et al.*, 2004, 2005; Forsum *et al.*, 2008). En la revisión sobre este tema, Forsum y colaboradores (2008) sugiere que solo los aminoácidos L-Glutamina, L-Asparagina, L-Aspartato, la Glicina, L-Arginina y L-Alanina promueven el crecimiento de las plantas. Algunos estudios sugieren que las plantas están en capacidad de absorber aminoácidos y utilizarlos como fuente de nitrógeno (Näsholm *et al.*, 1998), otros señalan que la utilización de los aminoácidos como fuente de nitrógeno es exclusiva en plantas micorríticas (Stribley & Read. 1980 y Turnbull *et al.*, 1995). Este trabajo busca evaluar si algunos de los diez D-Aminoácidos evaluados están siendo importados al interior de la planta de forma activa con la participación de los transportadores transmembrana LHT-1 (Lysine Histidine Transporter 1), AAP1(Amino Acid Permease 1) y AAP5 (Amino Acid Permease 5) que primordialmente transportan L-Aminoácidos y si alguno de estos D-Aminoácidos tiene un efecto promotor en el crecimiento de las plantas.

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Nitrógeno Orgánico. Origen y Diferencias

Se entiende como nitrógeno orgánico principalmente aquel nitrógeno que está unido covalentemente a una molécula orgánica, bien sea una proteína, un fragmento de ésta o los aminoácidos que la componen (Näsholm *et al.*, 2008). Normalmente, solo los enantiómeros L de aminoácidos proteo-génicos han sido considerados parte del “pool” de nitrógeno orgánico al cual las plantas tienen acceso (Vranova *et al.*, 2011). Sin embargo, los aminoácidos también existen como enantiómeros D y en esta conformación representan una proporción importante (0,5-4%) de los aminoácidos libres presentes en la solución del suelo (Vranova *et al.*, 2011), aunque este porcentaje puede variar de suelo a suelo y puede ser mayor en algunos casos (Näsholm *et al.*, 2008). Estos aminoácidos forman parte del suelo como producto de la descomposición de restos de animales, plantas y material orgánico microbiano, así como de antibióticos, insecticidas y otros materiales industriales (Näsholm *et al.*, 2008). La principal fuente de D-Aminoácidos en el suelo es de origen bacteriano, ya que la pared celular de las bacterias está conformada principalmente por péptidos macrocíclicos compuestos mayoritariamente por D- Aminoácidos (Vranova *et al.*, 2011), como también por cadenas lineales interconectadas por péptidos cortos que normalmente contienen D-Alanina y D-Glutamato (Van Heijenoort, 2001) y después de su autólisis éstos son liberados en el suelo (tanto los enantiómeros D como L). El uso de los enantiómeros D en la construcción de la pared celular bacteriana se explica bajo lo expuesto por Voet y Voet, (1995), que argumentan que estos compuestos juegan un papel muy importante al proteger los peptidoglicanos bacterianos de la actividad de las proteasas ya que estas

enzimas degradan proteínas constituidas principalmente de L-Aminoácidos y no reconocen los péptidos que contienen D-Aminoácidos, por tanto estas proteasas no actúan sobre estos peptidoglicanos. Los D-Aminoácidos también son sintetizados y utilizados por ranas, moluscos, lombrices de tierra, insectos, varios mamíferos y plantas, ya sea con metabolismo C3, C4 o CAM como formas libres o conjugadas y representan cerca del 1.5% del “pool” de aminoácidos total de la planta acumulándose principalmente en las semillas, frutas y hojas (Vranova *et al.*, 2011). Su síntesis en plantas es dada principalmente por la actividad enzimática de racemasas de aminoácidos, donde D-Aminoácidos son producidos *de novo* partiendo de su correspondiente enantiómero L (Gördes *et al.*, 2010).

2.2.2 D-Aminoácidos en Plantas

En las plantas, la preferencia nutricional por los L-Aminoácidos ha sido explicada principalmente por la toxicidad que los D-Aminoácidos generan al acumularse en los tejidos vegetales (Forsum *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios explican este efecto por la incapacidad de las plantas para metabolizar estos compuestos ya que carecen de las enzimas necesarias para su metabolización (Erikson *et al.*, 2004-2005; Forsum *et al.*, 2008). Algunos estudios sugieren que, como resultado de esta incapacidad, los D-Aminoácidos se acumulan en la planta hasta alcanzar niveles tóxicos (Brückner y Westhauser, 2003; Erikson *et al.*, 2004-2005). Sin embargo, hay dos problemas importantes con esta conclusión. El primero es que la metabolización además de la absorción de D-Aminoácidos tales como la D-Alanina y D-Triptófano en plantas se ha demostrado en varias ocasiones (Rekoslavskaya *et al.*, 1999; Gördes *et al.*, 2010). Los primeros estudios sobre la absorción de aminoácidos (Felle 1981) así como estudios más recientes sobre

las proteínas transportadoras implicadas en este proceso (Frommer *et al.*, 1995; Boorer *et al.*, 1996) indican que ambos enantiómeros (L y D) pueden ser absorbidos por la planta, y que en especial la D-Alanina es absorbida de forma relativamente rápida (Felle 1981). Además, las plantas poseen enzimas específicas como racemasas de serina y alanina, que participan en la síntesis *de novo* de D-Aminoácidos. El segundo problema es que la mayoría de los ensayos del efecto de D-Aminoácidos sobre el crecimiento vegetal se realizaron con soluciones de aminoácidos con concentraciones de hasta 10mM y esta es una concentración de 2 a 4 órdenes de magnitud más alta que las concentraciones encontradas en las soluciones del suelo naturales (Näsholm *et al.*, 2008). También hay estudios que demuestran que algunos D-Aminoácidos incluso pueden tener un efecto promotor del desarrollo de las plántulas si son suministrados en las dosis adecuadas (Näsholm *et al.*, 2008; Gördes *et al.*, 2010). Por lo tanto, parece paradójico que los D-Aminoácidos sean tóxicos para las plantas si se tiene en cuenta que otros grupos de organismos y las plantas mismas exhiben importantes funciones fisiológicas para los enantiómeros D de diferentes aminoácidos, por ejemplo, recientemente fue mostrado que el flujo de calcio y el crecimiento del tubo polínico son regulados por la D-Serina (Michard *et al.*, 2011); en otro estudio se postula a la D-Alanina como una señal de estrés ya que esta se acumula en grandes cantidades en plantas expuestas a luz UV (Monselise *et al.*, 2014). También formas libres de D-Aminoácidos son halladas en tejidos de angiospermas y gimnospermas en un rango de 0,2 al 8% relativo a sus correspondientes enantiómeros L (Brückner y Westhauser, 1994-2003). Aunque es aceptado y bien documentado que estos D-Aminoácidos existen de forma libre en la planta, la fuente de éstos aún se debate siendo la absorción

desde el suelo una de las mejores explicaciones ya que en la rizósfera se pueden encontrar concentraciones de hasta varios miligramos por kilogramo de suelo de D aminoácidos como la D-Alanina o D-Aspartato (Brodowski *et al.*, 2004). En resumen, desde un punto de vista tradicional argumentado principalmente por Forsum y colaboradores (2008) los D-Aminoácidos son tóxicos para las plantas. En los experimentos realizados por este autor las plantas fueron tratadas con L y D aminoácidos a concentraciones de 3mM y posteriormente se midió su biomasa. Sus resultados muestran que la mayoría de, pero no todos, los D-Aminoácidos inhiben el crecimiento de las plantas mientras que varios de los L-Aminoácidos lo promueven. Aunque la concentración utilizada de los diferentes aminoácidos fue alta (3mM) ellos concluyen que todos los D-Aminoácidos afectaron negativamente el crecimiento *Arabidopsis thaliana*. En este mismo trabajo se mostró que la D-Valina y la D-Isoleucina promueven el crecimiento de las plantas, pero este efecto es ignorado por el autor. La misma respuesta de *Arabidopsis thaliana* a D-Valina y D-Isoleucina ha sido mostrada también por Erikson y colaboradores (2004). En otro estudio, Hill y colaboradores (2011) trataron plantas de trigo con mezclas de diferentes L y D aminoácidos además de amoníaco y nitrato y finalmente midieron su absorción. Las concentraciones utilizadas fueron mucho más bajas, en el orden de 0.05mM. Con esto demostró que en diferentes mezclas la L-Alanina y el amoníaco son los mejores asimilados por la planta, y también que la D-Alanina es asimilada hasta cinco veces más rápido que el nitrato. Es importante resaltar que en el trabajo de Hill y colaboradores (2011) se midió la asimilación y absorción de aminoácidos y no la toxicidad de estos como en el trabajo de Forsum y colaboradores (2008).

2.2.3 El Nitrógeno Orgánico y su Uso por parte de las Plantas

La adquisición de nitrógeno disuelto en el suelo es tan esencial para las plantas como lo es la absorción de agua. Las plantas pueden usar diferentes especies químicas de éste: formas inorgánicas como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) o formas orgánicas como aminoácidos y proteínas fragmentadas (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2008). Esta capacidad media y facilita el flujo de nitrógeno (N) entre organismos y su conversión de formas inorgánicas a las orgánicas (Jackson *et al.*, 2008). La mineralización del nitrógeno hace referencia a la descomposición del N orgánico en NH_4^+ . La nitrificación hace referencia a la oxidación microbiana del NH_4^+ formando NO_3^- y la desnitrificación se refiere a la reducción de NO_3^- formando N_2O y gas N_2 (revisión detallada sobre el ciclo del nitrógeno en el suelo en Jackson *et al.*, 2008). Investigaciones sobre la nutrición vegetal y el uso de N fueron primordialmente focalizadas sobre las formas inorgánicas de éste, motivadas principalmente por su uso como fertilizante en varios sistemas de cultivo (Näsholm *et al.*, 2009). Después de las perturbaciones causadas por los humanos al ciclo global del carbono (C), las alteraciones antropogénicas al ciclo global del nitrógeno son la segunda causa más importante del cambio climático a nivel global (Näsholm *et al.*, 2008; Galloway *et al.*, 2008). Las alteraciones del ciclo del N se deben de manera extensa al aumento del uso de fertilizantes químicos durante las últimas décadas en las tierras cultivables así como también al uso del mismo en multitud de otros procesos industriales, esto ha permitido el aumento en la producción de alimentos, pero al mismo tiempo, gracias al aumento en la disponibilidad de nutrientes ha conllevado a problemas medioambientales como la eutrofización de ecosistemas terrestres y acuáticos entre otros (Gruber y Galloway, 2008). La

capacidad de las plantas de absorber y utilizar nitrógeno orgánico ha sido demostrada tanto en estudios de laboratorio como de campo (Vranova *et al.*, 2011), sin embargo, la relevancia ecológica de la asimilación de N orgánico en la nutrición vegetal es aún un tema de discusión (Näsholm *et al.*, 2008). Cómo las plantas se están adaptando a cambios en el medio ambiente, no solo como consecuencia directa del cambio climático sino también dados los cambios antropogénicos de las características del suelo tales como pH, fuentes de nitrógeno y la reducción de materia orgánica, representa aún un vacío en la comprensión de las dinámicas en el campo. Dado que todos estos factores juegan un papel importante en la determinación de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, en especial la del nitrógeno orgánico se considera importante entender cómo y bajo qué mecanismos fisiológicos las plantas interactúan con éstos. La determinación de diferentes especies de nitrógeno de diversos orígenes ha sido una herramienta para entender la interacción entre las plantas y el nitrógeno (Näsholm *et al.*, 2008; Vranova *et al.*, 2011). Estas mediciones se pueden hacer bien sea en la planta o en el suelo, además se puede medir la cantidad de nitrógeno inorgánico (NO_3^- y NH_4^+) independientemente del nitrógeno orgánico (proteínas y aminoácidos) en cada fuente. Esto ha llevado a la conclusión de que en varios ecosistemas, la tasa de producción de aminoácidos parece ser mayor que aquella de mineralización de nitrógeno (Näsholm *et al.*, 2008; Lipson *et al.*, 2001) lo cual significa que en algunos casos la producción de nitrógeno orgánico puede ser mayor que la del nitrógeno inorgánico. Aun así, se ha estimado que la tasa de producción de nitrógeno generalmente excede las tasas asumidas de requerimientos de las plantas (Näsholm *et al.*, 2008; Lipson *et al.*, 2001). Existen varios inconvenientes con los estudios realizados sobre este

tema. Si se comparan los valores obtenidos en diferentes estudios para una misma especie vegetal, estos varían enormemente y los estudios en los que se ha medido el contenido de nitrógeno en el suelo se han realizado en ecosistemas diferentes por lo cual las mediciones varían en rangos de varios órdenes de magnitud. Adicionalmente no se usa una metodología estándar para medir la concentración de nitrógeno orgánico en el suelo lo cual induce a que cada estudio obtenga valores diferentes (Forsum *et al.*, 2008; Näsholm *et al.*, 2008; Vranova *et al.*, 2011).

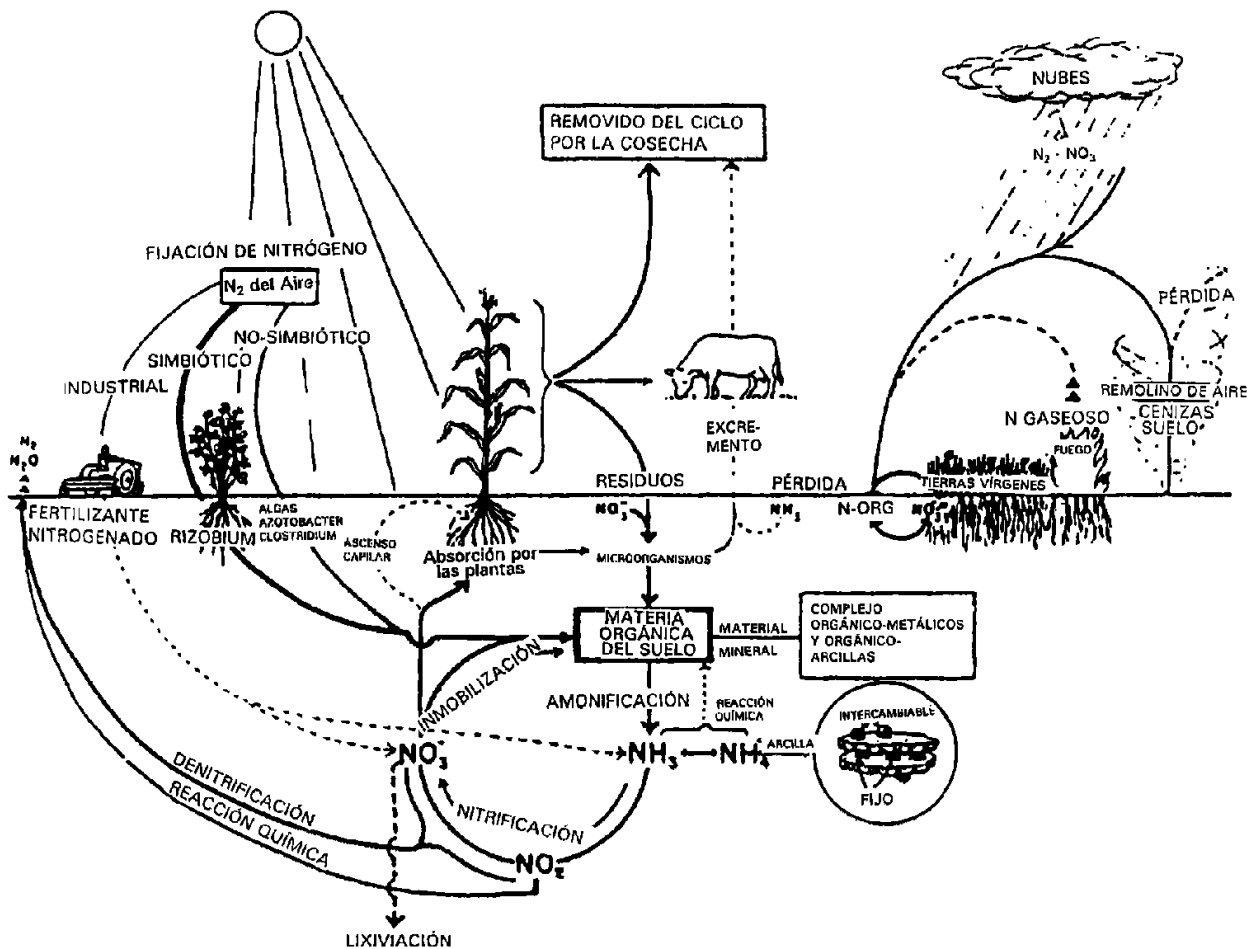


Figura 1. Ciclo del nitrógeno en el suelo. Se muestran las formas de nitrógeno inorgánico y orgánico utilizado por las plantas. También tiene en cuenta que los microbios son fuente de nitrógeno orgánico. (Tomado de Stevenson, 1965)

Trabajos previos han demostrado la capacidad de las plantas de usar nitrógeno orgánico como fuente de nitrógeno (Forsum *et al.*, 2008). Hasta la fecha todas las plantas evaluadas respecto a su capacidad de asimilar nitrógeno (tanto especies micorríticas como no micorríticas, incluyendo varias especies de cultivo masivo) poseen esta capacidad (Näsholm *et al.*, 2001; Lipson *et al.*, 2001). Sin embargo, los mecanismos implicados son aún poco entendidos (Näsholm *et al.*, 2008) aunque algunos componentes de éstos ya se hayan descrito, como es el caso de varios transportadores y enzimas que participan en este proceso; tampoco se entiende muy bien por qué algunas plantas crecen mejor cuando se les supe una mezcla de N orgánico e inorgánico comparado a cuando solo está disponible N inorgánico (Joy, 1969). Una explicación para esta observación está basada en que el nitrógeno inorgánico es importado desde el suelo por transportadores específicos ubicados en la raíz, los cuales tienen una capacidad limitada y una vez saturados las plantas no pueden asimilar más nitrógeno inorgánico. Como se ha mencionado previamente, las plantas también poseen transportadores para nitrógeno orgánico y cuando en el medio con nitrato también contiene arginina el crecimiento de la planta aumenta (Joy, 1969).

2.2.4 Actores que Intervienen en la Adquisición de Aminoácidos

Se ha demostrado que la adquisición de aminoácidos en la raíz es un proceso dependiente de energía y que es regulado por factores tanto externos como internos, lo cual indica que este proceso es mediado por transportadores específicos (Svennerstam *et al.*, 2007). Ha sido demostrado que las plantas poseen diferentes transportadores de amino ácidos con afinidades y especificidades que se solapan (Fisher *et al.*, 1998). Según Wipf y colaboradores (2002) hay cerca de 53 genes que codifican para proteínas transportadoras de amino ácidos solo en *Arabidopsis*

thaliana. La primera proteína transmembrana en ser identificada como un transportador de aminoácidos en la raíz de las plantas fue la Lysine Histidine Transporter 1 (LHT-1) identificada por Chen y Bush en 1997. Esta proteína integral transmembrana con 9 a 10 dominios putativos transmembranales muestra una alta afinidad por la lisina y la histidina; es una proteína compuesta por 446 aminoácidos y una masa molecular de 50.5 kDa; se presenta en el genoma de *Arabidopsis thaliana* en un gen con una sola copia y es expresada en todos los tejidos vegetales con una mayor expresión en los primordios foliares, flores, en la superficie de la raíz de plántulas y en el polen (Chen *et al.*, 1997). El mismo año, Chang y colaboradores identificaron el transportador Amino Acid Permease 1 (AAP1) inicialmente llamado NAT2 (Chang *et al.*, 1997). Los genes de la subfamilia Amino Acid Permease (AAP) son expresados en *Arabidopsis thaliana* primordialmente en el tejido vascular lo cual sugiere un rol en el transporte a largas distancias entre los órganos de las plantas (Hirner *et al.*, 2006). Esta proteína tiene un tamaño aproximado de 45 kDa y posee 11 dominios transmembranales con el terminal N en el citoplasma y el terminal C en el exterior de la célula (Chang *et al.*, 1997), participa en el transporte de varios aminoácidos de carácter neutro así como también para L-Glutamato, L-Histidina (Lee *et al.*, 2007). Este transportador se localiza en la membrana plasmática de las células de la epidermis de la raíz, así como también en los pelos radiculares y a lo largo de la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2007). Pero al igual que con LHT-1 no se detectó actividad en el transporte de L-Arginina y L-Lisina (Svennerstam *et al.*, 2007). En 2007, Svennerstam y colaboradores descubrieron el transportador Amino Acid Permease 5 (AAP5) y su rol crucial en el transporte de L-Arginina y L-Lisina. El transportador AAP5 tiene muchas similitudes tanto en el perfil de su sustrato como la carga de éste con respecto a AAP1 y se expresa en toda la

planta, especialmente en las hojas maduras, tallo, cotiledón, polen, flores y también en la corteza de la raíz (Svennerstam *et al.*, 2007). Se compone de 480 aminoácidos, tiene un tamaño aproximado de 52 kDa y cuenta con 10 dominios transmembranales. LHT-1 y AAP5 muestran un espectro complementario en la afinidad por los aminoácidos, con lo cual se ve que no hay redundancia respecto a la expresión genética (los productos de la expresión de estos dos genes no cumplen la misma función) y se indica que cumplen roles separados en el transporte de aminoácidos (Svennerstam *et al.*, 2011).

Tabla 1. Tabla de relación Genotipo, Aminoácido, Respuesta.

Transportador	Afinidad/Captura	Aminoácidos con que interactúa	Fenotipo Mutante expuesto a AA
LHT1	Baja	Básicos+ L-Arg; L-Lys	
	Alta	Neutros/Ácidos+ L-His; L-Gln; L-Ala; L-Glu; L-Asp	Adquisición de: L-Gln; L-Ala y L-Glu; L-Asp reducida entre 61-85%
AAP5	Baja		Adquisición de: L-Arg y L-Lys reducida entre 87-90%. Adquisición de L-His es normal
	Alta	L-Arg; L-Lys	
AAP1	Baja	Básicos+ L-Arg; L-Lys	A determinadas concentraciones, la adquisición de L-Arg y L-Lys aumenta hasta en 123-140%. Pero hay reducción de adquisición de L-His y L-Glu
	Alta	Neutros/Ácidos + L-Glu; L-His	

Hasta el momento únicamente se ha reportado que el transportador LHT-1 participa en el transporte de aminoácidos dextrógiros ya que su mutante no se ve afectado ante altas concentraciones de D-Alanina (Svennerstam *et al.*, 2011). Para los demás transportadores no hay información disponible que haga referencia al transporte de otros D-aminoácidos. Saber si estos transportadores son sensibles o no a la quiralidad de los aminoácidos que transportan es importante ya que dependiendo de

esto los transportadores facilitarían o no la asimilación de aminoácidos bajo el modelo llave cerradura, lo cual define o limita su especificidad (Bender *et al.*, 1966). La captación, el uso y el metabolismo de los aminoácidos y cualquier cambio en este proceso, afectará directamente a las plantas. Por lo tanto la comprensión de los procesos moleculares que tienen lugar en las plantas cuando los D-Aminoácidos están presentes en el suelo o en medios de cultivo, ayudará a entender el impacto de estos compuestos en las plantas.

2.3 Objetivos

Objetivo General

Evaluar la participación de los transportadores transmembranales LHT-1, AAP1 y AAP5 de *Arabidopsis thaliana*, en el transporte de enantiómeros D de aminoácidos y determinar si existe alguna relación entre la absorción de estos aminoácidos y cambios en la germinación y crecimiento vegetal.

Objetivos Específicos

- 1 Establecer y comparar el rango de concentraciones tóxicas de los enantiómeros D de los siguientes aminoácidos: Alanina, Arginina, Glutamato, Histidina, Leucina, Metionina, Fenilalanina, Serina, Triptófano y Tirosina que inducen alteraciones de crecimiento y desarrollo en los mutantes *aap1*, *aap5*, *lht-1* de *Arabidopsis thaliana* y su correspondiente fenotipo silvestre *Col-0*.
- 2 Establecer si los D-aminoácidos promueven el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (*Col-0*) mediante la construcción de curvas dosis-respuesta.

2.4. Metodología Utilizada

2.4.1 Organismos Utilizados

En este trabajo se evaluaron los mutantes *lht-1*, *aap1* y *aap5* de *Arabidopsis thaliana*, los cuales han sido descritos por distintos autores, como se mencionó anteriormente. Todos estos son mutantes “knockout” (KO) obtenidos por medio de inserciones de T-ADN y tienen como fondo genético al ecotipo silvestre *Col-0*.

Las semillas de estos mutantes se obtuvieron a través de Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, UK (NASC por sus siglas en inglés) con números de catálogo: AAP1 (At_1g_58360), SAIL_871_Co3 (*aap1-4*)/ N839145. AAP5 (At_1g_44100). LHT-1 SALK_034566/N534566. *Col-0*/N60000.

2.4.2 Tamaño de la muestra analizada

En este trabajo se analizaron 97 placas de micro-titulación con un total de 9.120 semillas plantadas. Estas se han dividido en dos experimentos: Experimento 1 con 70 placas y 6.720 semillas y Experimento 2 con 27 placas y 2.400 semillas.

2.4.3 Lugar donde se realizó la Investigación

Este trabajo se realizó en colaboración entre la Universidad Icesi de Cali, Colombia y la Universidad de Tübingen, Alemania. La preparación y escritura del trabajo tuvo lugar en Cali, Colombia bajo la supervisión de la Dra. Thaura Ghneim. Los experimentos fueron realizados en el Centro de Biología Molecular de Plantas (ZMBP por sus siglas en alemán) en Tübingen, Alemania bajo la supervisión de Dr. Üner Kolukisaoglu.

2.4.4. Metodología Utilizada

Se diseñaron dos experimentos de laboratorio. El experimento 1 se diseñó para determinar la concentración de D-Aminoácidos en el medio de crecimiento que causa efectos detrimentales sobre la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y la participación de los transportadores LHT-1, AAP1 y AAP5 en el transporte activo de diferentes D-Aminoácidos. En este experimento se trabajó con una metodología similar a la de Forsum y colaboradores (2008). El Experimento 2 fue dirigido a caracterizar la respuesta del genotipo silvestre *Col-0* de *Arabidopsis thaliana* a bajas dosis de distintos aminoácidos. En este experimento se trabajó con una metodología similar a la propuesta por Hill y colaboradores (2011), en la cual no se trabajó con concentraciones tóxicas de diferentes D-Aminoácidos sino a bajas concentraciones con potencial efecto promotor del crecimiento. Una vez conocida la concentración máxima de estos D-Aminoácidos tolerada por *Arabidopsis thaliana* (determinada como la concentración a la que la mitad o más de las plantas tratadas aún vive), se evaluaron en más detalle los efectos que estos aminoácidos tuvieron sobre la germinación y el crecimiento del genotipo silvestre *Col-0* exponiendo las plantas a estos aminoácidos a concentraciones que varían desde cero hasta la concentración tóxica.

2.4.5. Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizaron mediante exposición a gas clorhídrico dado que esta es una metodología muy eficiente para esterilizar un volumen grande de semillas (Clough y Bent., 1998). Dados los riesgos de trabajar con gas clorhídrico este procedimiento se realizó dentro de una cabina de extracción (Benchtop Protector

Premier Laboratory Hood No. Catalogo: 100400020). Dentro de un desecador (Exicator) se colocaron los tubos de reacción Eppendorf abiertos con las semillas que se deseaban esterilizar. Al lado, dentro del desecador, se puso un matraz que contenía 50mL de Hipoclorito de Sodio. Cuidadosamente se agregó 1.5mL de Ácido Clorhídrico al matraz (la mezcla de Hipoclorito de Sodio + Ácido Clorhídrico forma Gas Clorhídrico) e inmediatamente se cerró el desecador incluyendo su válvula. Se incubó durante un mínimo de 12 horas y luego se abrió la válvula del desecador. Se incubó durante 3 horas más y finalmente se abrió el desecador. Cuidadosamente se cerraron y rotularon los tubos de reacción Eppendorf. Las semillas estériles se sembraron posteriormente el medio adecuado según el objetivo del ensayo.

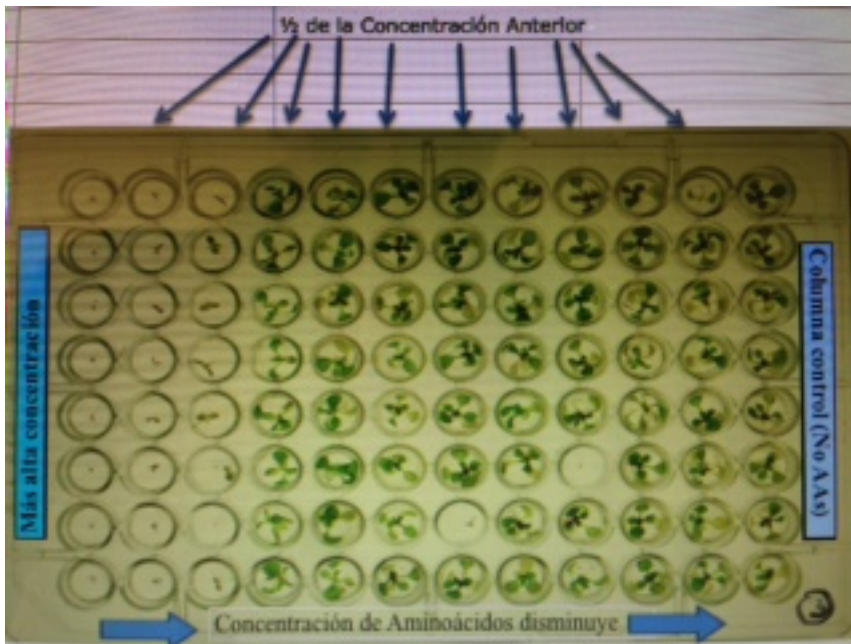
2.4.6 Adición y Dilución de D-Aminoácidos en Medio de Cultivo

Se preparó una solución madre de cada D-Aminoácido (Sigma-Aldrich D-AMINO ACIDS Calidad analítica: D-Triptófano, D-Histidina, D-Fenilalanina, D-leucina, D-Alanina, D-Serina, D-Arginina, D-Tirosina, D-Glutamato, D-Metionina. No. Catálogo 298662) con concentración final de 50mM diluido en HCl a [0.1]M y pH 7. Se diluyó la solución madre con medio de cultivo ½ MS + 1% sacarosa y pH 5.7 (Duchefa ½ MURASHIGE SKOOG Mezcla con Sales Basales + 1% sacarosa No. Prod. MO221.0050 y Sacarosa Carl Roth Art. No 4661.2) según la necesidad y se obtuvo una solución de trabajo de D-Aminoácidos a concentraciones específicas para cada caso.

Para el ensayo que evaluó la participación de los transportadores LHT-1, AAP1, AAP5, en el transporte de D-Aminoácidos (Experimento 1) se construyeron curvas de dosis-respuesta con los distintos mutantes de *Arabidopsis thaliana* respecto a diez D-

Aminoácidos. En una placa de micro-titulación (Rotilabor-microtest plates. (Art. Nr. 9297.1)) se agregó un solo D-Aminoácido en la primera columna (8 pozos) en una concentración de 10mM considerada como una concentración a la cual todos estos D-Aminoácidos son tóxicos para esta especie vegetal (Näsholm *et al.*, 2008). Esta solución se diluyó 1:1 con $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa en cada columna consecutiva de la placa de micro-titulación, de esta forma, 11 columnas de 8 pozos cada una fueron producidas con $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa + un D-Aminoácido en concentraciones que descendieron desde 10mM (en la primera columna) a 0.01mM (en la penúltima columna). La última columna contenía medio $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa sin ningún D-Aminoácido y sirvió como grupo control.

Figura 2. Diagrama de Dilución de Dosis de Aminoácidos



Se preparó de igual forma una placa de micro-titulación por cada genotipo de *Arabidopsis thaliana* y cada aminoácido. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* de los diferentes genotipos estudiados presentaron un comportamiento diferencial al ser tratadas con los siguientes D-Aminoácidos: D-Fenilalanina, D-Triptófano, D-Arginina, D-Alanina y D-Metionina. Por esta razón y teniendo en cuenta las concentraciones a

las que los genotipos mostraban una tolerancia diferencial a los D-Aminoácidos, en la segunda ronda de este ensayo se sembraron tres placas de micro-titulación de cada uno de los siguientes aminoácidos con sus respectivas concentraciones máximas: D-Fenilalanina (5mM), D-Triptófano (1mM), D-Arginina (10mM), D-Alanina (2mM) y D-Metionina (10mM).

En este caso, la primera columna contenía la concentración máxima a la que sobrevivieron las plántulas en la primera ronda. A partir de esta concentración, cada columna adyacente contenía un 10% menos de la concentración que la columna anterior y las últimas dos columnas sirvieron como grupo control pues eran solo medio $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa sin ningún D-Aminoácido.

Para el ensayo que evaluó la hipótesis de si los D-Aminoácidos promovían el crecimiento en *Arabidopsis thaliana*, se construyeron curvas dosis- respuesta con el genotipo silvestre *Col-0* para evaluar cada D-Aminoácido [1 de 10 aminoácidos, ya que se sembraron dos placas de micro-titulación por cada D-Aminoácido en esta primera ronda del experimento 2 se analizaron un total de 20 placas de micro-titulación]. En la primera columna (8 pozos) de la placa de micro-titulación, se agregó XmM de cada D-aminoácido (X=Concentración de determinado D-Aminoácido estimada en la primera parte de este experimento). Esta solución fue diluida entonces 1:1 con $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa en cada columna consecutiva de la placa de micro-titulación, de esta forma (Al igual que para el experimento 1) la concentración de aminoácidos en cada columna fue descendiendo de XmM –en la primera columna- a YmM –en la penúltima columna– (Y=Concentración de determinado D-Aminoácido al ser diluido en serie respecto a la concentración X estimada en la primera parte de este experimento). La última columna contenía medio $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa sin ningún D-Aminoácido agregado y representó el grupo control. Las

concentraciones de aminoácidos utilizadas en este último ensayo fueron establecidas según los resultados del experimento 1 que indicó cuales eran las concentraciones letales de cada D-Aminoácido, así que se trabajó con las siguientes concentraciones máximas (Correspondientes a concentración "X" indicada anteriormente): La D-Leucina y la D-Fenilalanina a 2.5mM, el D-Glutamato y la D-Histidina a 1mM, la D-Metionina y la D-Arginina a 0.5mM, el D-Triptófano a 0.2mM, la D- Serina, la D-Tirosina y la D-Alanina a 0.1mM.

En la segunda ronda de siembra de este experimento, las placas de micro- titulación se sembraron de forma que en la primera mitad de los pozos de cada placa (columna 1 a 6) se agregó solo $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa mientras que la segunda mitad de la placa (columna 7 a 12), además del $\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa, el medio también contenía un D-Aminoácido a la concentración que, de acuerdo a los resultados de la primera ronda, podrían tener un efecto positivo en el crecimiento de *Col-0* de *Arabidopsis thaliana*. Estas concentraciones fueron las siguientes: D-Alanina (0.05mM), D-Histidina (0.3mM), D-Triptófano (0.08mM y 0.2mM), D-Leucina (0.75mM). Adicionalmente se sembraron dos placas, una de D-Alanina (0.05mM) y otra de Histidina (0.3mM) pero estas dos con semillas del mutante *lht-1*.

2.4.7 Siembra de Semillas

Todo el procedimiento estándar de siembra se realizó en la cabina de flujo laminar (Lab Exchange Steril-Antares Modelo Anthos Antares 48) bajo condiciones estériles para evitar contaminación. Con la ayuda de un palillo de dientes de madera estéril, se sembró una semilla de *Arabidopsis thaliana* en cada pozo de una placa de micro- titulación que contenía medio de crecimiento ($\frac{1}{2}$ MS+ 1% sacarosa a pH 5.7) con adición de diferentes concentraciones de D-Aminoácido (el volumen final de medio

en cada pozo fue de 150µl). A continuación, se selló completamente la placa de micro-titulación con Parafilm.

2.4.8 Germinación y Crecimiento de Semillas

Después de haber sembrado las semillas en la placa de micro-titulación, ésta se almacenó a 4°C durante 48 horas con el fin de romper la dormancia de las semillas. Posteriormente, las placas se trasladaron a la cámara de crecimiento PERCIVAL INTELLUS Control System con temperatura constante de 22°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante ocho días. Tras este periodo, se inició la toma de imágenes diariamente durante los siguientes 8 días. Transcurrido este tiempo, las plántulas fueron cosechadas y se tomó su peso fresco y seco. En total, las plantas fueron cultivadas 15 días.

2.4.9 Toma de imágenes de las Plántulas

Todas las fotografías fueron tomadas sobre una mesa de luz con una iluminación constante de luz halógena a una distancia fija de 25cm entre la placa de micro-titulación y el sensor fotográfico. La cámara utilizada fue una Canon Power Shot SX150 IS.

2.4.10 Peso Fresco y Peso Seco de las Plántulas

Todas las plántulas de *Arabidopsis thaliana* ubicadas en la misma columna de la placa de micro-titulación se sacaron de los pozos y se secaron con una toalla de papel para eliminar el exceso de agua, posteriormente se almacenaron en un mismo tubo de reacción Eppendorf (previamente pesado). Cada tubo se pesó en una balanza analítica para así determinar la masa o peso fresco de cada muestra. Posteriormente se dejó secar el material vegetal a 80°C durante 12 horas en un

horno desecador Memmert y nuevamente se pesó cada tubo de reacción Eppendorf, con las plántulas en su interior, en la balanza analítica. De esta forma se obtuvo la masa o peso seco. Se tomó tanto el peso fresco como el seco para verificar si existía o no alguna diferencia en sus tendencias, lo cual indicaría la existencia de un efecto adicional no tenido en cuenta hasta el momento.

2.4.11 Análisis de los Datos y Análisis Estadístico

El peso neto por plántula se calculó restando el peso del tubo de reacción Eppendorf vacío al valor del peso seco o peso fresco y después dividiendo este valor por el número de plántulas en cada muestra. Como consecuencia el ruido o error de la balanza analítica se obtuvieron algunos valores negativos los cuales fueron llevados a un valor de cero. Con estos valores se realizaron entonces las gráficas que permitieron visualizar los efectos de los aminoácidos estudiados en la primera ronda de siembra de los experimentos 1 y 2. En base a esta información se decidió con cuales D-Aminoácidos y a qué dosis de los mismos se continuó en la segunda ronda de siembra de ambos experimentos. Para la segunda ronda de siembra del experimento 1, se realizó un t-student de dos colas con un alfa del 5% (0.05) para comparar las medias y así tener un soporte sólido para las conclusiones. Se escogió este análisis ya que los datos son independientes y estos pueden variar hacia arriba y hacia abajo con respecto de la media. En el segundo experimento se obtuvo la correlación entre las masas de las plántulas de cada columna con respecto a las masas de las plántulas de la columna control; con esta información se prosiguió a realizar las gráficas con los valores promedios de las correlaciones. Posteriormente se realizaron ANOVA para cada uno de estos para confirmar si las diferencias entre las plántulas tratadas y las que no, eran estadísticamente significativas. Estos análisis se realizaron con “StatPlus:mac LE Statistical tool for your Mac Workstation”.

2.4.12 Matriz de marco lógico

Objetivo general: Evaluar la participación de los transportadores transmembranales LHT-1, AAP1, AAP5 de <i>Arabidopsis thaliana</i> , en el transporte de enantiómeros D de aminoácidos y determinar si existe alguna relación entre la absorción de estos aminoácido y cambios en la germinación y crecimiento de las plantas			
Objetivos específicos	Actividad	Indicador	Supuestos (PARA TODOS OBJETIVOS)
Establecer y comparar el rango de concentraciones tóxicas de los enantiómeros D de los siguientes aminoácidos: Ala, Arg, Glu, His, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr que inducen alteraciones de crecimiento y desarrollo en los mutantes <i>aap1</i> , <i>aap5</i> , <i>lht-1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y su correspondiente fenotipo silvestre <i>Col-0</i> .	Germinación de semillas y desarrollo de plántulas en medio 0,5 MS con adición de D-AA en concentraciones Altas y variables	<i>Concentraciones de específicas de D-AAs a las cuales se genera una respuesta significativa en los mutantes seleccionados comparados con el genotipo silvestre.</i>	Contar con las semillas, materiales y condiciones necesarias para desarrollar el experimento
	Toma registro fotográfico de cada tratamiento		
	Análisis de los resultados obtenidos		
Establecer si los D-Aminoácidos promueven el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Col-0</i>) mediante la construcción de curvas dosis-respuesta.	Germinación de semillas y desarrollo de plántulas en medio 0,5 MS con adición de D-AA en concentraciones Bajas y variables	<i>Peso Fresco y Peso Seco (PF y PS) de las plántulas de Col-0 expuestas a dosis bajas y variables de D-Aminoácidos.</i>	En algún punto la concentración de D-AA debe generar un efecto fenotípico o detrimental observable.
	Medir PH y PS de cada tratamiento		

2.5 Resultados

2.5.1 Experimento 1. Concentración tóxica de D-Aminoácidos en el medio de crecimiento y participación de diferentes transportadores.

En este experimento se determinó la concentración tóxica a las que los aminoácidos: D-Alanina, D-Fenilalanina, D-Triptófano, D-Metionina, D-Histidina, D-Glutamato, D-Leucina, D-Tirosina, D-Arginina y D-Serina, son tóxicos para *Arabidopsis thaliana* cuando están presentes en el medio de cultivo. Dado que no se obtuvo una diferencia marcada entre los perfiles de las curvas de respuesta entre el peso fresco y el peso seco de las plántulas, solo se presentan los resultados en base al peso seco de las plántulas.

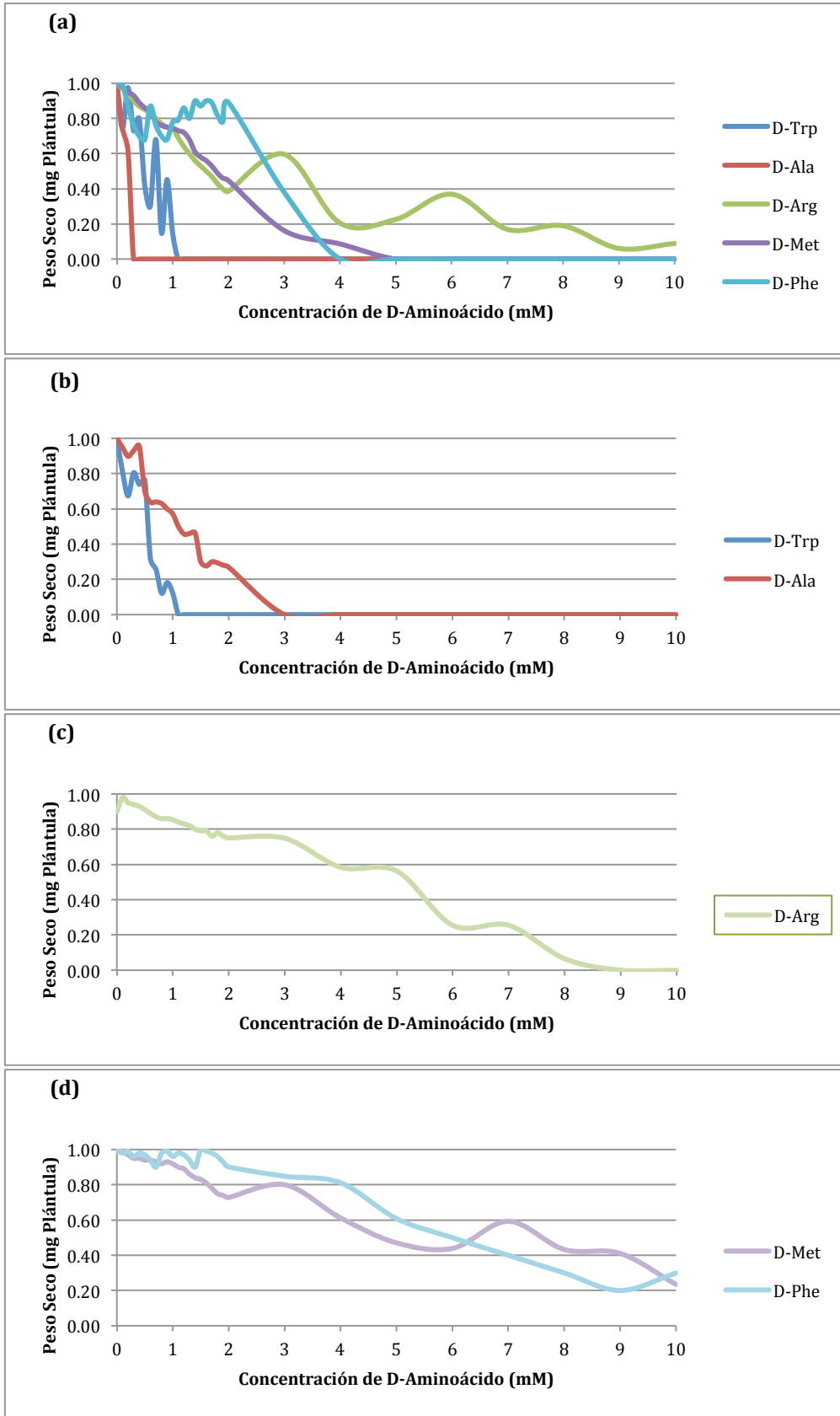
En general, para todas las líneas, tanto los mutantes como el genotipo silvestre, el grado de toxicidad de los diferentes aminoácidos examinados es el siguiente: D-Tirosina y D-Serina por encima de los 0.08mM y 0.2mM son letales para todas las líneas, luego está el D-Triptófano que a concentraciones cercanas a 0.6M alcanza su concentración tóxica. D-Alanina alcanza su concentración tóxica para las líneas *Col-0*, *aap1* y *aap5* a 0.45mM pero para *lht-1* la concentración tóxica es de 2mM. La D-Histidina a los 2mM ya es letal para todas las líneas. El D-Glutamato es letal para todas las líneas a concentraciones cercanas a 4.5mM. La D-Leucina a 5mM, La D-Metionina a 9mM es letal para todas las plantas. D-Fenilalanina, D-Arginina son letales en concentraciones de 10mM.

Tabla 2. Concentraciones tóxicas de D-Aminoácidos establecidas para *Col-0*, *aap1*, *aap5* y *lht-1*.

D-Aminoácido	Concentración Tóxica para cada Línea			
	<i>aap1</i>	<i>aap5</i>	<i>lht-1</i>	<i>Col-0</i>
Tirosina	0.08mM	0.08mM	0.08mM	0.08mM
Serina	0.2mM	0.18mM	0.2mM	0.16mM
Triptófano	0.6mM	0.3mM	0.6mM	0.3mM
Alanina	0.45mM	0.45mM	0.2mM	0.45mM
Histidina	2mM	2mM	2mM	2mM
Glutamato	4.5mM	2.5mM	4.5mM	2.5mM
Leucina	5mM	2.5mM	5mM	5mM
Metionina	9mM	2mM	4.5mM	5mM
Fenilalanina	9mM	2mM	4mM	4mM
Arginina	7mM	9mM	7mM	8mM

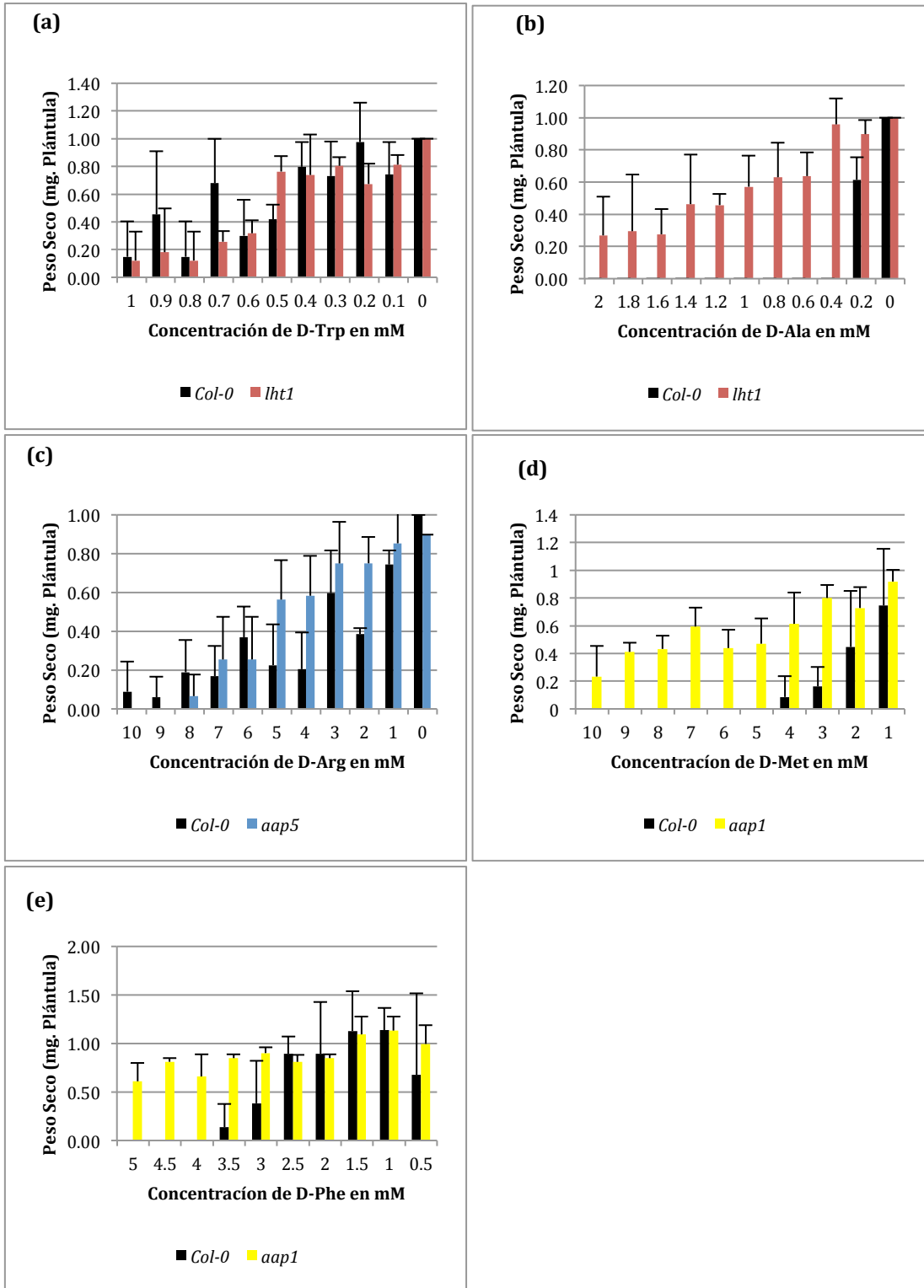
Los resultados obtenidos para los mutantes *lht-1*, *aap1* y *aap5* muestran que la respuesta de los tres mutantes a D-Histidina y D-Serina es igual a *Col-0*, lo cual indica que las mutaciones no afectan el transporte de estos dos aminoácidos y que debe existir un mecanismo alternativo de entrada de éstos a los tejidos. Para el resto de los aminoácidos las respuestas de cada genotipo son más diversas por lo que se decidió evaluarlas en más detalle excluyendo a la D-Leucina, D-Glutamato y D-Tirosina ya que el efecto de estas no varió mucho entre los genotipos. En la segunda ronda de siembra el D-Triptófano se evaluó con las líneas *lht-1* y *Col-0* entre 0mM y 1mM. La D-Alanina se evaluó con las líneas *lht-1* y *Col-0* entre 0mM y 2mM. La D-Metionina se evaluó entre 0mM y 10mM con las líneas *aap5* y *Col-0*. La D-Arginina se evaluó de 0mM a 10mM con las líneas *aap1* y *Col-0*. La D-Fenilalanina en el rango de 0mM a 5mM con las líneas *aap1* y *Col-0*.

Figura 3. Respuesta de *Col-0*, *lht-1*, *aap1* y *aap5* ante la exposición a dosis sub letales de algunos D-Aminoácidos. (a) *Col-0*, (b) *lht-1*, (c) *aap5*, (d) *aap1*.



En la Figura 3(a) (Respuesta *Col-0*) se observa que para *Col-0* el D-Aminoácido más tóxico es la D-Alanina a concentraciones cercanas a 0.5mM seguida por D-Triptófano a concentraciones de 1mM y la D-Metionina y D- Fenilalanina entre 4mM y 5mM. El menos tóxico de estos aminoácidos es la D-Arginina pues solo a concentraciones cercanas a 10mM las plántulas de *Col-0* mueren. También se presentan las respuestas de los demás genotipos a los D-Aminoácidos con los que fueron tratados (3(b) *lht-1*, 3(c) *aap5* y 3(d) *aap1*). Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la respuesta del mutante *lht-1* y el fenotipo silvestre *Col-0* ante el D-triptófano son muy similares ($p>0.05$), lo cual sugiere que este transportador no participa del transporte al interior de la planta de este D-Aminoácido (Figura 4(a)). Los resultados de este experimento indican que el transportador LHT-1 está involucrado en el transporte de D-Alanina ya que el mutante *lht-1* tolera concentraciones de hasta 2mM mientras que el fenotipo silvestre *Col-0* no tolera concentraciones de D-Alanina superiores a 0.3mM ($p<0.05$) (Figura 4(b)); lo cual significa que este transportador tiene una alta afinidad por la Alanina independientemente de su quiralidad y por tanto está implicado en el transporte de L y D-Alanina. Es importante recordar (ver marco teórico) que el transportador LHT-1 tiene una afinidad alta por la L-Histidina, L-Glutamina, L-Alanina, L-Glutamato y L-Asparagina y baja afinidad por L-Arginina y L-Lisina. Pero no se observa que este transportador participe del transporte de D-Aminoácidos más que de la D-Alanina. Los resultados obtenidos con el mutante *aap1* y los enantiómeros D muestran que este mutante tolera concentraciones de hasta 10mM de D-Metionina, mientras que el genotipo silvestre *Col-0* es afectado considerablemente a concentraciones de 4mM de este mismo aminoácido ($p<0.05$)(Figura 4(d)).

Figura 4. Respuesta de *aap1*, *aap5*, *lht-1* y *Col-0* tratadas con diferentes D-Aminoácidos.

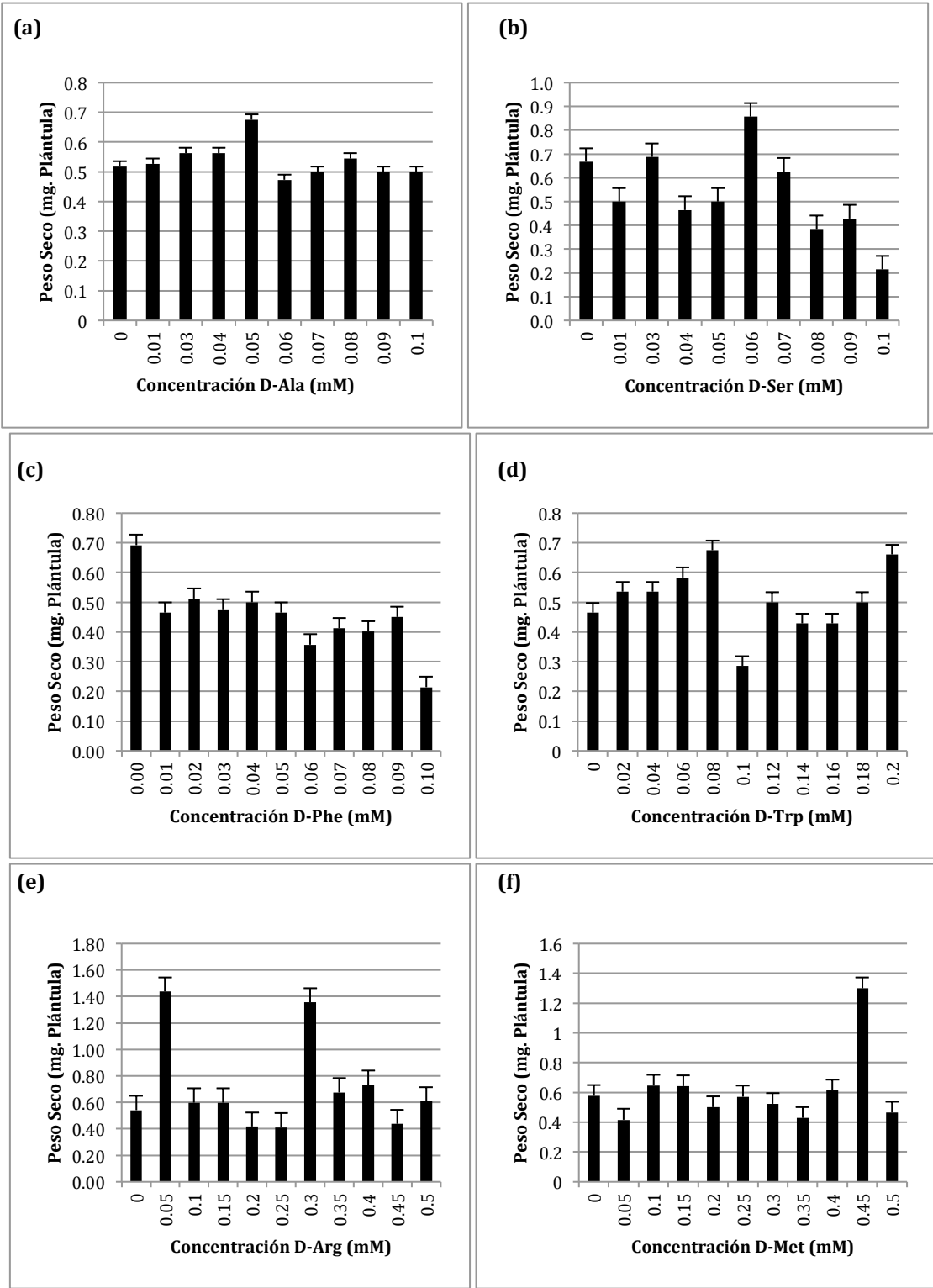


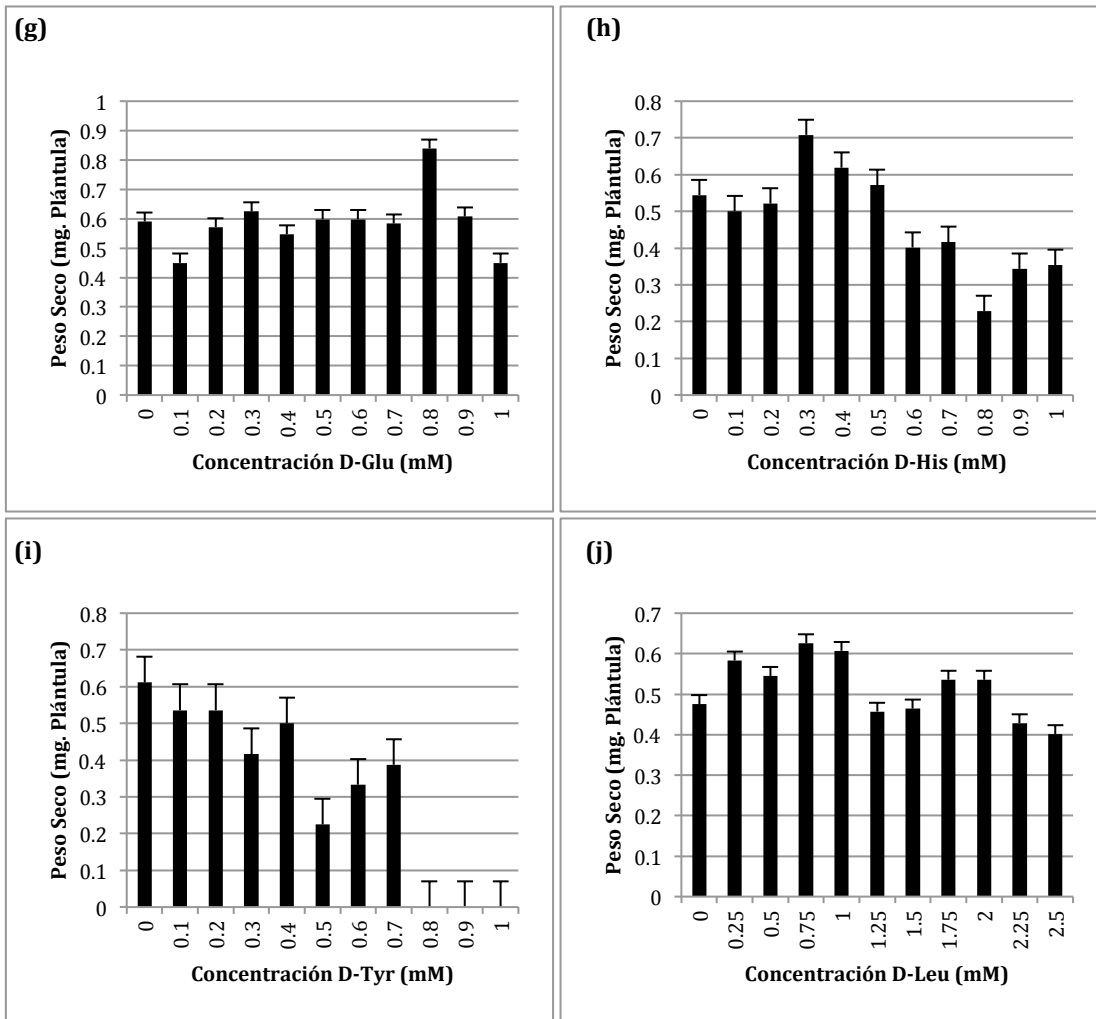
Es por esto que se propone que el transportador AAP1 media el transporte de D-Metionina. Este transportador también parece estar involucrado en el transporte de D-Fenilalanina ya que tolera concentraciones de hasta 5mM mientras que *Col-0* a concentraciones de 3.5mM es notoriamente afectado ($p > 0.05$) (Figura 4(e)). El transportador AAP1 tiene una baja afinidad por la L-Arginina y L-Lisina y alta afinidad por la L-Glutamato y L-Histidina. Se observó que este transportador media el transporte de D-Aminoácidos que no son isómeros de ninguno los L-Aminoácidos que transporta, caso contrario al del transportador LHT-1 que transporta tanto L como D-Alanina.

Los resultados obtenidos con el mutante *aap5* muestran que este mutante tiene una alta tolerancia a la D-Arginina (Figura 4(c)), sin embargo, esta respuesta es muy similar a la respuesta de *Col-0* ($p > 0.05$) ante este mismo D-Aminoácido, lo cual no permite asignar el transporte de este aminoácido a dicho transportador, aunque previamente se ha reportado que el transportador AAP5 transporta la L-Histidina, L-Arginina y L-Lisina pues el mutante *aap5* muestra una reducción de entre 87-90% en el transporte de L-Arginina y L-Lisina, vemos que la D-Arginina no afecta a este mutante más de lo que afecta al fenotipo silvestre, así que la D-Arginina parece no ser tóxica para *Arabidopsis thaliana*. Joy (1969) basado en su trabajo con *Lemna minor* indicó que “El efecto beneficioso de la Arginina es excepcional” haciendo referencia a que este aminoácido incrementó el crecimiento de esta planta. En este experimento se pudo observar que este D-Aminoácido no causó un efecto tóxico en *Col-0* ni en el genotipo *aap5*, aunque esto no prueba que haya un efecto beneficioso de la D-Arginina sobre estas plantas.

2.5.2. Experimento 2. Efectos de D-Aminoácidos a bajas concentraciones sobre *Col-0*.

Figura 5. Respuesta de *Col-0* a bajas concentraciones de diferentes D-Aminoácidos.



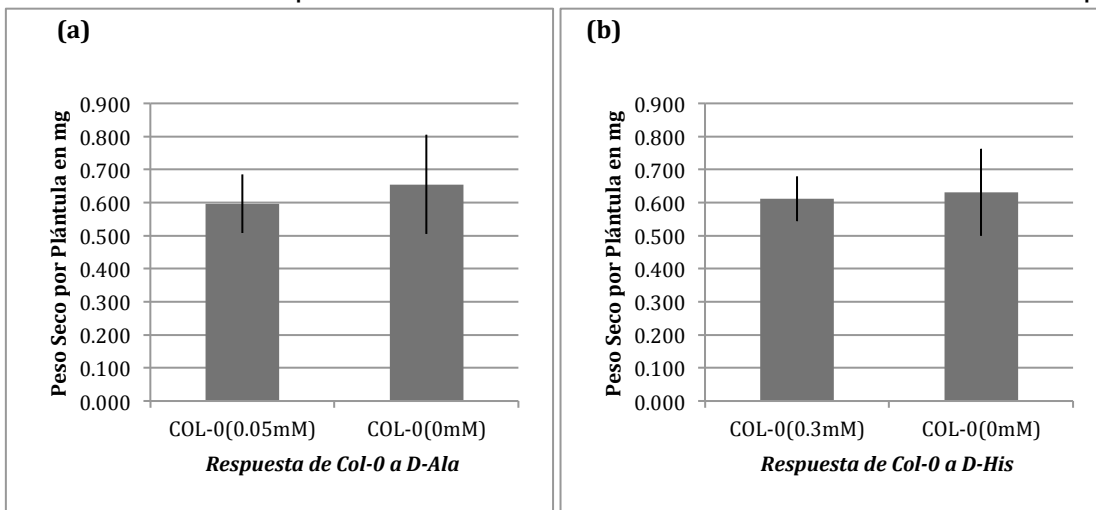


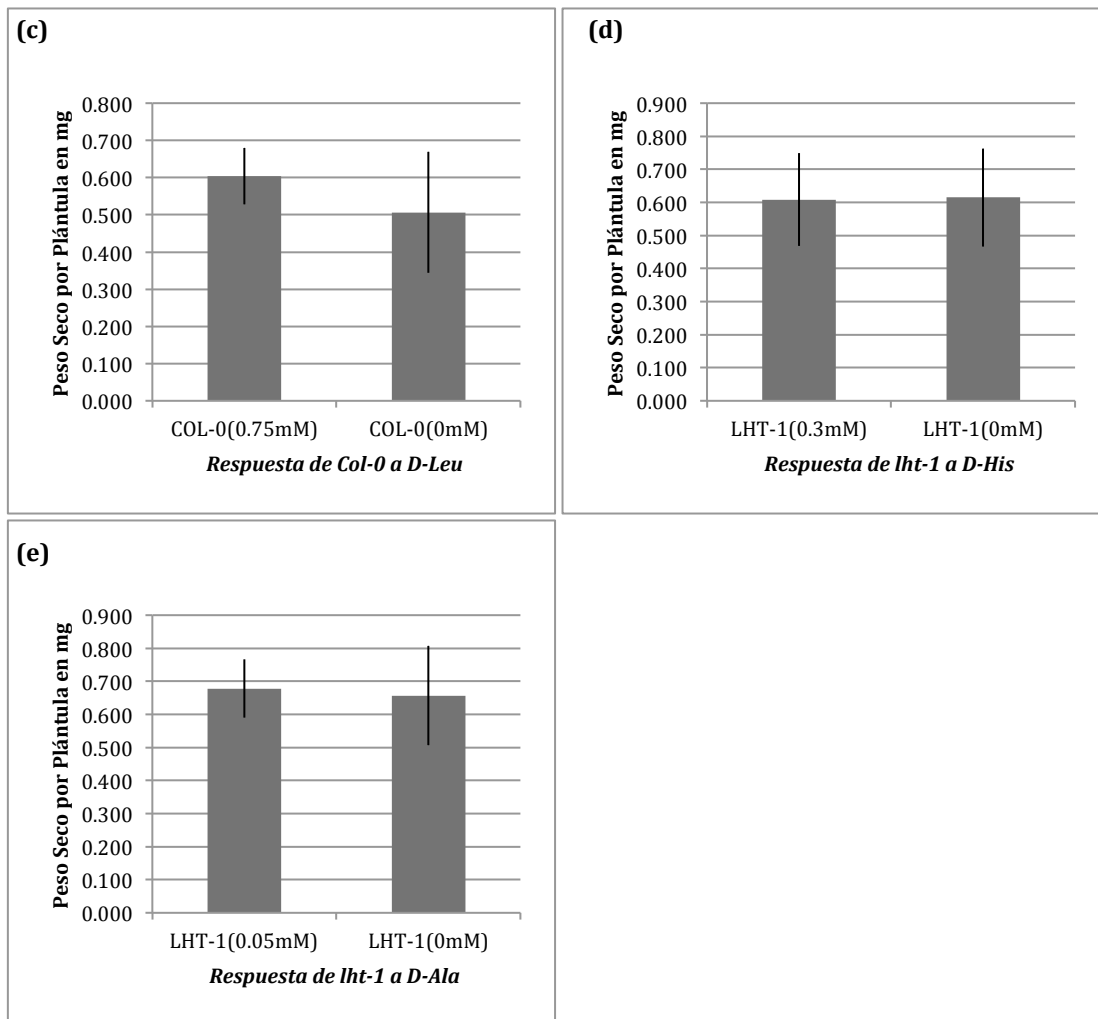
Los resultados indican efectos detrimentales para el genotipo silvestre *Col-0* al ser tratado con D-Serina a 0.07mM, D-Fenilalanina a 0.08mM, D-Arginina a 0.04mM, D-Metionina a 0.4mM, D-Tirosina a 0.07mM y D-Glutamato a 1mM (Figura 5(b), 5(c), 5(e), 5(f), 5(i), 5(g)). Al haber una variabilidad en los datos asociada al manejo experimental, se obtuvieron datos que no siguen la tendencia general como es el caso del aumento en el peso de las plántulas tratadas con D-Metionina, D-Arginina y D-Glutamato, por esta razón, estos datos fueron ignorados.

En los cuatro casos siguientes se observó que cada aminoácido a la concentración indicada generó un aumento en el peso de las plántulas de *Col-0*. El caso de la D-Alanina (Figura 5(a)) a 0.05mM, para el D-Triptófano (Figura 5(d)) a 0.08mM. La D-

Histidina a 0.3mM (Figura 5(h)), y la D-Leucina a 0.75mM (Figura 5(j)). Estos picos pueden darse por efectos positivos que estos D-Aminoácidos ejercieron sobre las plántulas o producto de la variación de los datos, razón por la cual este efecto se exploró en mayor detalle en la segunda ronda de siembra de este segundo experimento. En la segunda ronda de siembra se decidió sembrar placas de microtitulación como se indica a continuación: Para el fenotipo silvestre *Col-0* una placa para D-Alanina a 0.05mM, una placa para D-Histidina a 0.3mM, una placa para D-Triptófano a 0.08mM y una de D-Leucina a 0.75mM. Se sembraron dos placas adicionales con el mutante *Iht-1* tratado con D-Alanina a 0.05mM y D-Histidina a 0.3mM.

Figura 6. Respuesta de *Col-0* y *Iht-1* ante tratamiento con D-Aminoácidos a concentraciones promotoras del crecimiento de estas plántulas.





Los resultados obtenidos para todos los platos de micro-titulación (Figura 6), muestran que la variabilidad obtenida en la respuesta es muy alta y no permite alcanzar una conclusión respecto a diferencias entre las plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas y las control. Aún así, se realizó el análisis estadístico de los datos, los cuales indicaron que no existen diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas con D-Aminoácidos ($p > 0.05$). (Figura 6(a) *Col-0* D-Alanina $p = 0.42 > 0.05$; Figura 6(b), *Col-0* D-Histidina $p = 0.75 > 0.05$; Figura 6(c) *Col-0* D-Leucina $p = 0.21 > 0.05$. Figura 6(d) *lht-1* D-Histidina $p = 0.93 > 0.05$; Figura 6(e) *lht-1* D-Alanina $p = 0.58 > 0.05$) entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias y por tanto todos estos genotipos se comportan de igual manera con o sin adición de estos D-Aminoácidos en las concentraciones estudiadas.

Lamentablemente, no se obtuvieron resultados para los platos de D-Triptófano ya que estas se contaminaron y por cuestiones de tiempo no se logró repetir esta parte del experimento.

2.6 Discusión

El objetivo principal de este estudio es contribuir a establecer si los D-Aminoácidos son tóxicos para las plantas o si por el contrario contribuyen al metabolismo de nitrógeno de las mismas y repercuten positivamente sobre su crecimiento (Näshol *et al.*, 2008; Forsum *et al.*, 2008). Distintos autores reportan que estos D-Aminoácidos contribuyen directamente en la nutrición de nitrógeno (Hill 2011), incluso se han reportado que estos pueden tener funciones fisiológicas como moléculas de transducción de señal, como es el caso de la D-Serina en el desarrollo del tubo polínico (Michard *et al.*, 2011).

Con los resultados del experimento 1 se logró mostrar que hay diferentes transportadores responsables de la captura de diferentes D-Aminoácidos disueltos en el medio de cultivo, LHT-1 estando involucrado en el transporte de D-Alanina y AAP1 en el transporte de D-Metionina y D-Fenilalanina. Esto apoyado en que se cuenta con una verificación positiva del sistema de trabajo, ya que se reportó una sensibilidad diferencial entre *lht-1* y *Col-0* a la D-Alanina reportada previamente en otros estudios. Para el transportador AAP5 no se pudo asignar el transporte de ninguno de los diez D-Aminoácidos estudiados. Como se expone en la sección de resultados, este transportador parece estar involucrado en el transporte de D-Arginina, pero como la respuesta observada en este experimento es muy similar a la respuesta de *Col-0* ($p\text{-level}=0.54>0.05$), entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias y por tanto no se le asigna el transporte de este D-

Aminoácido. Ninguno de los mutantes estudiados en este trabajo se comporta diferente que el fenotipo silvestre *Col-0* cuando se exponen a D-Histidina y D-Serina, por lo cual se indica que estos transportadores no participan en el transporte de estos dos D-Aminoácidos, por tanto se concluye que debe existir algún mecanismo alternativo que facilite el transporte de éstos D-Aminoácidos al interior de la planta.

Con el experimento 2, se buscaba establecer si estos D-Aminoácidos influyen el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* al servir como fuente de nitrógeno. De acuerdo con los resultados obtenidos, los D-Aminoácidos aquí estudiados no representan una fuente de nitrógeno para las plantas, pero esto puede deberse a que las condiciones experimentales no eran apropiadas en el sentido de que el medio utilizado ($\frac{1}{2}$ MS+1% sacarosa pH 5.7), contiene diferentes especies de nitrógeno (NH_4NO_3 , KNO_3) y esto puede enmascarar el efecto que los D-Aminoácidos pudieran tener sobre el crecimiento de las plantas. Es por esto que se recomienda trabajar con medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS+ 1% sacarosa libre de nitrógeno para identificar el efecto sobre el crecimiento de las plántulas causado únicamente por los D-Aminoácidos. También es importante resaltar que aquí solo hemos estudiado diez de los diecinueve aminoácidos proteogénicos, por lo cual aún quedan nueve más por estudiar y caracterizar sus efectos sobre las plantas. Ya ha sido demostrado el transporte al interior de la planta de otros D-aminoácidos (Kolukisaoglu *et al.*, no publicado), pero el efecto que estos tienen aún sigue siendo una pregunta abierta, así mismo si hay otros transportadores para estos otros D-aminoácidos que así como el LHT-1 y AAP1 participan activamente en el transporte tanto de D como L aminoácidos, o si por el contrario existe algún transportador exclusivo para los enantiómeros D.

Se considera apropiado recomendar la repetición del experimento 2, ya que no se contó con suficientes réplicas y por ende la variabilidad de los datos es alta y no permite concluir con seguridad sobre la respuesta estudiada. Trabajar con un mayor número de plantas (platos de micro-titulación) puede mejorar la calidad del análisis estadístico.

Se abren entonces nuevas preguntas de acuerdo a estos resultados, entre ellas el ¿Por qué no se pudo asignar el transporte de ninguno de los diez D-Aminoácido aquí estudiados al transportador AAP5? Quizás este transportador simplemente no transporta ninguno de estos D-Aminoácido dadas sus propiedades bioquímicas y estructura terciaria o cuaternaria lo cual determina su afinidad por un sustrato específico y la quiralidad del aminoácido es un factor de selección de sustrato según el modelo llave- cerradura (Bender *et al.*, 1966). También existe la posibilidad que este transportador medie el transporte de alguno de los D-aminoácidos no estudiados aquí o que sí participe del transporte de algún D-Aminoácido, específicamente la D-Arginina, pero de manera conjunta con otro transportador. El transporte específico de D-Aminoácidos en el caso particular de los transportadores LHT-1 y AAP1 es señal de que los D-Aminoácidos tienen alguna importancia fisiológica o ejercen un efecto bien sea beneficioso o nocivo sobre las plantas aunque hoy en día tal efecto no sea claro. Dado que por mucho tiempo se asumió que estos compuestos eran tóxicos o inútiles, no han sido objeto de estudio para la comunidad científica. Con los resultados de este trabajo se espera incentivar a la realización de nuevas investigaciones que proporcionen mayor información sobre cómo y cuales D-Aminoácidos generan un efecto fisiológico en las plantas. El tema aquí estudiado, aunque bastante específico es también poco entendido, por lo tanto, con los resultados de este trabajo solo se ha

logrado agregar una pieza al rompecabezas que significa el entender estos procesos.

A nivel ecológico sigue abierta la pregunta de cómo se distribuye el consumo del nitrógeno orgánico que se acumula en la rizósfera; qué tanto es consumido por las plantas y qué tanto por los microorganismos. Ahora bien, aquí se concluye que sí existe una maquinaria molecular en plantas que además de reconocer también transporta D-Aminoácidos al interior de la planta, pero la respuesta de esta o el destino de los D-Aminoácidos una vez dentro aún sigue siendo una incógnita.

2.7. Conclusiones

* El transportador transmembrana LHT-1 media el transporte de D-Alanina, y se ha confirmado que el transportador LHT-1 está involucrado en el transporte de D-Alanina.

*El transportador transmembrana AAP1 media el transporte de D-Metionina y parece estar involucrado en el transporte de D-Fenilalanina.

*El transportador transmembrana AAP5, no participa del transporte de ninguno de los diez D-Aminoácidos aquí estudiados.

*No hay diferencias significativas entre las plantas tratadas con D-aminoácidos en dosis sub letales y los grupos control.

*Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que los D-Aminoácidos son importados activamente por las plantas desde el suelo y que estos cumplen una función fisiológica en las plantas.

*Debe considerarse que aunque no se ha podido asignar la participación de ninguno de estos tres transportadores transmembrana en el transporte de varios de los D-Aminoácidos aquí estudiados, sin duda estos aminoácidos son importados al interior de las plántulas y a determinadas concentraciones generan un efecto tóxico y finalmente la muerte de estas. Razón por la cual deben existir otros transportadores o mecanismos involucrados en el transporte de estos D-Aminoácidos.

*Se refuta la hipótesis de que los D-Aminoácidos pueden tener un efecto promotor sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

2.8. Recomendaciones

Repetir y con un número de muestras más grande, el ensayo A2 ya que los resultados obtenidos en este ensayo no son confiables estadísticamente.

Utilizar otras técnicas como la espectroscopía de masas y aminoácidos marcados con radio isótopos que pueden ayudar a generar una mejor imagen sobre el metabolismo de estos compuestos ya que indicaría la cantidad de D-Aminoácidos que entran a la planta y su ubicación/ destino después de haber ingresado al interior de la planta.

A la hora de identificar más transportadores responsables del transporte de D-Aminoácidos es importante tener en cuenta revisar tanto transportadores para L-Aminoácidos como otros transportadores no asociados al transporte de aminoácidos hasta el momento.

3. Bibliografía

Baojing. (2013). The role of industrial nitrogen in the global nitrogen biogeochemical cycle SCIENTIFIC REPORTS | 3 : 2579 | DOI: 10.1038/srep02579

Myron L. Bender , Robert L. Van Etten , George A. Clowes , John F. Sebastian. (1966). A Pictorial Description of the “Lock and Key” Theory . Am. Chem. Soc., 1966, 88 (10), pp 2318–2319

Bohlmann H, Elashry A, Okumoto S, Siddique S, Koch W, Kreil D. (2013). The AAP gene family for amino acid permeases contributes to development of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in roots of *Arabidopsis* Plant Physiology and Biochemistry 70 (2013) 379e386

Brodowski S, Amelung W, Lobe I, Du Preez CC. (2004). Losses and biogeochemical cycling of soil organic nitrogen with prolonged arable cropping in the South African Highveld – evidence from D- and L-amino acids Biogeochemistry 71: 17–42, 2004.

Boorer KJ, Frommer WB, Bush DR, Kreman M, Loo DDF, Wright EM. (1996) Kinetics and specificity of a H⁺/amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 271: 2213–2220

Brückner & Westhauser (1994). Chromatographic Determination of D-Amino Acids as Native Constituents of Vegetables and Fruits Chromatographia Vol. 39, No. 7/8.

Brückner & Westhauser. (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Amino Acids 24:43–55

Clough S. J. and Bent A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 16(60): 735-743.

Hui-Chu Chang and Daniel R. Bush. (1997). Topology of NAT2: a prototypical example of a new family of amino acid transporter. J. Biol. Chem. 1997, 272:30552-30557.

Chen L, Bush DR. (1997). LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. Plant Physiol 115: 1127–1134

Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T. (2004). A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. Nature Biotechnology Volume 22 No. 4. 2004

Erikson O. (2005). The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation Plant Molecular Biology (2005) 57:425–433 DOI 10.1007/s11103-004-7902-9

Felle H (1981) Stereospecificity and electrogenicity of amino acid transport in *Riccia fluitans*. Planta 152: 505–512

Frommer WB, Rentsch D, Laloi M, Ila Rouhara, Schmelzer E, Delrot S. (1995). NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. FEBS Letters 370 (1995) 264-268

Frommer WB, Fischer W-N, Andre´ B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breikreuz KE. (1998). Amino acid transport in plants. Trends Plant Sci 3: 188–195

Forsum O, Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T. (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. New Phytol 179:1058–1069

N Fujii (2002). D-Amino Acids in Living Higher Organism of Life and Evolution of the Biosphere 32: 103–127, 2002.

Fujitani Y, Nakajima N, Ishihara K, Oikawa T, Ito K, Sugimoto M (2006) Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 67:668–674

Fujitani Y, Horiuchi T, Ito K, Sugimoto M (2007) Serine racemases from barley *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. Phytochemistry 68:1530–1536.

Funakoshi M, Sekine M, Katane M, Furuchi T, Yohda M, Yoshikawa T, Homma H (2008). Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behaviour during germination. FEBS J 275:1188–1200

Galloway J N, Townsend A R, Erismann J W, Bekunda, Cai Z , Freney R, Martinelli A, Seitzinger SP, Sutton M. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. Science 320: 889–892.

Gördes D, Kolukisaoglu Ü, Thurow K (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. Amino Acids 40:553–563.

Gruber N, Galloway JN. (2008). An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. Nature 451, 293-296

Hamase et al (2002). D -Amino acids in mammals and their diagnostic value. Journal of Chromatography B, 781 (2002) 73–91

Hill PW, Quilliam RS, DeLuca TH, Farrar J, Farrell M, Roberts P, Newsham KK, Hopkins DW, Bardgett RD, Jones DL (2011) Acquisition and assimilation of nitrogen as peptide-bound and D-enantiomers of amino acids by wheat. PLoS One 6:1–4

Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W (2006). *Arabidopsis* LHT1 is a highaffinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. Plant Cell 18:1931–1946

Jackson, L. E., M. Burger, and T. R. Cavagnaro. 2008. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. Annual Review of Plant Biology 59: 341–363.

Joy (1969) Nitrogen Metabolism of *Lemna minor*. I. Growth, Nitrogen Sources and Amino Acid Inhibition Plant Physiol. (1969) 44, 845-848

Lee YW, Foster J, Chen J, M. Voll L, Andreas P.M. Weber and Mechthild Tegederet (2007). AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. The Plant Journal (2007) 50, 305–319

Lipson D, Näsholm T (2001). The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia* 128: 305–316.

Lipson DA, Raab TK, Schmidt SK, Monson RK. 2001. An empirical model of amino acid transformations in an alpine soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 189–198.

Yoshihiro Mano, and Keiichirou Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*. Page 1 of 20 doi:10.1093/jxb/ers091

Erwan M, Pedro T. Lima, Borges F, Silva A.C, Portes M, Carvalho J, Gilliam M, Liu L, Obermeyer G, Feijó J. (2011). Glutamate receptor-like genes from Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-Serine. *Science* 332:434-437

Moe L. A. (2013). Amino Acids in the Rhizosphere: From Plants to Microbes. *American Journal of Botany* 100(9): 1–14. 2013.

Monselise EB, Levkovitz A, Kost D. (2014). Ultraviolet radiation induces stress in etiolated *Landoltia punctata*, as evidenced by the presence of alanine, a universal stress signal] *Plant Biol*. 2014 May 29.

Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högborg M, Högborg P. (1998). Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914–916

Näsholm T, Persson J. (2001). Organic nitrogen acquisition by boreal forest plants. *Physiologia Plantarum* 111: 419–426.

Oskar Erikson, Magnus Hertzberg & Torgny Näsholm. (2004). A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants *Nature Biotechnology* 22, 455 - 458 (2004)

Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U. (2008). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* (2009) 182: 31–48

Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Rentsch D, Robinson N, Christie M, Webb RI, Gamage HK, Carroll BJ, Schenk PM, Schmidt S. (2008). Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105: 4524–4529.

Pollock, G.E., Cheng, C.-N., Cronin, S.E. (1977). Determination of the D and L isomers of some protein amino acids present in soils. *Analytical Chemistry* 49, 2±7.

Rekoslovskaya NI, Yurjeva OV, Salyaev RK, Mapelli S, Kopytina TV. (1999). D-tryptophan as IAA source during wheat germination. *Bulg J Plant Physiol* 25:39–49

Stribley & Read. (1980). Read the Biology of Mycorrhiza in the Ericaceae VII. The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen sources. *New Phytol.* (1980) 86, 365-371.

Stevenson, F. J. (1965). Origin and distribution of nitrogen in the soil, p. 1-42. In W. V. Bartholomew and F. E. Clark [ed.] *Soil nitrogen*. Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin.

Svennerstam H, Ganeteg U, Bellini C, Näsholm T. (2007). Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiol* 143:1853–1860

Henrik Svennerstam, Ulrika Ganeteg, Catherine Bellini and Torgny Näsholm (2007). LHT-1 Mediates Root-Uptake of Amino Acids.

Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T. (2008). Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist* 180: 620–630.

Henrik Svennerstam, Sandra Jämtgard, Iftikhar Ahmad, Kerstin Huss-Danell, Torgny Näsholm and Ulrika Ganeteg. (2011). Transporters in *Arabidopsis* roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations. *New Phytologist* (2011) doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03699.x

M. H. Turnbull, Susanne Schmidt, Peter D. Erskine, Suanne Richards and George R. Stewart. (1995). Root adaptation and nitrogen source acquisition in natural ecosystems. *Tree Physiology* 16, 941—948

Van Heijenoort J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*. 2001 Mar;11(3):25R-36R.

Voet D, Voet JG. (1995). *Biochemistry*. Wiley, New York Waldhier MC, Dettmer K, Gruber MA, Oefner PJ Comparison of derivatization and chromatographic methods for GC-MS analysis of amino acid enantiomers in physiological samples. *J Chromatogr B* 878:1103–1112

Vranova V, Zahradnickova D, Janous D, Skene K, Matharu A, Rejsek K, Formanek P. (2011). The significance of D-amino acid in soil, fate and utilization by microbes and plants: Review and identification of knowledge gaps. *Plant & Soil* . May2012, Vol. 354 Issue 1/2, p21-39. 19p.

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB. (2002). Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci* 27:139–147

Anexos

Análisis Estadístico.

Experimento 1. Segunda siembra.

Comparing Means [t-test assuming unequal variances (heteroscedastic)]

Descriptive Statistics

D-Triptofano	Sample size	Mean	Variance
	11	0.58105	0.09321
	11	0.52647	0.107

Summary

<i>Degrees of Freedom</i>	20	<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0.E+0
<i>Test Statistics</i>	0.40454	<i>Pooled Variance</i>	0.10011

Two-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.69011	<i>t Critical Value (5%)</i>	2.08596
----------------	---------	------------------------------	---------

One-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.34506	<i>t Critical Value (5%)</i>	1.72472
----------------	---------	------------------------------	---------

G-criterion

<i>Test Statistics</i>	0.06307	<i>p-level</i>	0.14039
<i>Critical Value (5%)</i>	0.233		

Pagurova criterion

<i>Test Statistics</i>	0.40454	<i>p-level</i>	0.30986
<i>Ratio of variances parameter</i>	0.46555	<i>Critical Value (5%)</i>	0.0635

p-level=0.69011>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Comparing Means [t-test assuming unequal variances (heteroscedastic)]

Descriptive Statistics

D-Alanina	Sample size	Mean	Variance
	11	0.14671	0.114
	11	0.58665	0.0725

Summary

<i>Degrees of Freedom</i>	19	<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0.E+0
<i>Test Statistics</i>	3.37866	<i>Pooled Variance</i>	0.09325

Two-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.00315	<i>t Critical Value (5%)</i>	2.09302
----------------	---------	------------------------------	---------

One-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.00158	<i>t Critical Value (5%)</i>	1.72913
----------------	---------	------------------------------	---------

G-criterion

<i>Test Statistics</i>	0.50831	<i>p-level</i>	0.00065
<i>Critical Value (5%)</i>	0.233		

Pagurova criterion

<i>Test Statistics</i>	3.37866	<i>p-level</i>	0.9968
<i>Ratio of variances parameter</i>	0.61127	<i>Critical Value (5%)</i>	0.06355

p-level=0.00315<0.05 entonces se puede concluir que SI hay diferencia entre las medias.

Comparing Means [t-test assuming unequal variances (heteroscedastic)]

Descriptive Statistics

D-Arginina	Sample size	Mean	Variance
	11	0.36655	0.08835
	11	0.45182	0.12027

Summary

Degrees of Freedom	20	Hypothesized Mean Difference	0.E+0
Test Statistics	0.61924	Pooled Variance	0.10431

Two-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.54275	<i>T Critical Value (5%)</i>	2.08596
----------------	---------	------------------------------	---------

One-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.27138	<i>T Critical Value (5%)</i>	1.72472
----------------	---------	------------------------------	---------

G-criterion

Test Statistics	0.09282	<i>p-level</i>	0.12457
Critical Value (5%)	0.233		

Pagurova criterion

Test Statistics	0.61924	<i>p-level</i>	0.45705
Ratio of variances parameter	0.4235	<i>Critical Value (5%)</i>	0.06352

p-level=0.54275>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Comparing Means [t-test assuming unequal variances (heteroscedastic)]

Descriptive Statistics

D-Metionina	Sample size	Mean	Variance
	11	0.22179	0.1247
	11	0.59424	0.04874

Summary

<i>Degrees Of Freedom</i>	17	<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0.E+0
<i>Test Statistics</i>	2.96621	<i>Pooled Variance</i>	0.08672

Two-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.00866	<i>T Critical Value (5%)</i>	2.10982
----------------	---------	------------------------------	---------

One-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.00433	<i>T Critical Value (5%)</i>	1.73961
----------------	---------	------------------------------	---------

G-criterion

<i>Test Statistics</i>	0.44207	<i>p-level</i>	0.00147
<i>Critical Value (5%)</i>	0.233		

Pagurova criterion

<i>Test Statistics</i>	2.96621	<i>p-level</i>	0.99096
<i>Ratio of variances parameter</i>	0.71899	<i>Critical Value (5%)</i>	0.06368

p-level=0.00866<0.05 entonces se puede concluir que sí hay diferencia entre las medias.

Comparing Means [t-test assuming unequal variances (heteroscedastic)]

Descriptive Statistics

D-Fenilalanina	Sample size	Mean	Variance
	11	0.56805	0.22336
	11	0.87296	0.02582

Summary

<i>Degrees Of Freedom</i>	12	<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0.E+0
<i>Test Statistics</i>	2.02591	<i>Pooled Variance</i>	0.12459

Two-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.0656	<i>t Critical Value (5%)</i>	2.17881
----------------	--------	------------------------------	---------

One-tailed distribution

<i>p-level</i>	0.0328	<i>T Critical Value (5%)</i>	1.78229
----------------	--------	------------------------------	---------

G-criterion

<i>Test Statistics</i>	0.36727	<i>p-level</i>	0.00241
<i>Critical Value (5%)</i>	0.233		

Pagurova criterion

<i>Test Statistics</i>	2.02591	<i>p-level</i>	0.9341
<i>Ratio of variances parameter</i>	0.89639	<i>Critical Value (5%)</i>	0.06404

p-level=0.0656>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Experimento 2. Segunda siembra.

Lht-1 D-His a 0.03mM vs. 0mM

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

<i>Groups</i>	<i>Sample size</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>
<i>lht-1 a 0.03mM</i>	6	3.65	0.60833	0.0198
<i>lht-1 a 0mM</i>	6	3.68929	0.61488	0.02208

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-level</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.00013	1	0.00013	0.00614	0.93908	4.9646
Within Groups	0.20944	10	0.02094			
<i>Total</i>	0.20956	11				

p-level=0.94>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Col-0 D-His a 0.03mM vs. 0mM

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

<i>Groups</i>	<i>Sample size</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>
<i>Col-0 a 0.03mM</i>	6	3.67143	0.6119	0.00466
<i>Col-0 a 0mM</i>	6	3.78571	0.63095	0.0174

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-level</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.00109	1	0.00109	0.09866	0.75989	4.9646
Within Groups	0.11032	10	0.01103			
<i>Total</i>	0.11141	11				

p-level=0.75989>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Lht-1 D-Ala a 0.05mM vs. 0mM

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

<i>Groups</i>	<i>Sample size</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>
<i>lht-1 a 0.05mM</i>	6	4.07024	0.67837	0.00337
<i>lht-1 a 0mM</i>	6	3.94048	0.65675	0.00535

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-level</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.0014	1	0.0014	0.32183	0.58302	4.9646
Within Groups	0.0436	10	0.00436			
<i>Total</i>	0.045	11				

p-level=0.58302>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Col-0 D-Ala a 0.05mM vs. 0mM

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

<i>Groups</i>	<i>Sample size</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>
<i>Col-0 a 0.05mM</i>	6	3.57738	0.59623	0.00777
<i>Col-0 a 0mM</i>	6	3.93095	0.65516	0.0226

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-level</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.01042	1	0.01042	0.686	0.42685	4.9646
Within Groups	0.15186	10	0.01519			
<i>Total</i>	0.16228	11				

p-level=0.42685>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

Col-0 D-Leu a 0.75mM vs. 0mM

Analysis of Variance (One-Way)

Summary

<i>Groups</i>	<i>Sample size</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>
<i>Col-0 a 0.75mM</i>	6	3.62381	0.60397	0.00581
<i>Col-0 a 0mM</i>	6	3.0381	0.50635	0.02653

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-level</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.02859	1	0.02859	1.76819	0.21314	4.9646
Within Groups	0.16168	10	0.01617			
<i>Total</i>	0.19027	11				

p-level=0.21314>0.05 entonces se puede concluir que no hay diferencia entre las medias.

