UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Efecto del estrés Hídrico sobre la actividad de Hexocinasa en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

IRALDA HERNÁNDEZ LÓPEZ

MÉXICO D.F. 2007

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco:

A Dios por la vida y todo lo que me ha dado.

A mis padres Irene López P. y Moisés Hernández M. por la vida, amor, apoyo y comprensión. Los amo.

A mi abuelo Florencio López M. por el cariño que siempre nos brindó.

A mis hermanos Emilio A., Marina, Elda, Edith, Karina y Emilio M., por estar siempre apoyándome, los quiero mucho.

A mi asesora la Doctora Sobeida Sánchez Nieto por todo el apoyo para la realización de ésta tesis.

A mis amigos Verónica J., Verónica P., Tania, Paola, Eric y Ernesto por su amistad incondicional.

A mis compañeros de laboratorio Aida, Adriana, Sonia y Víctor por el tiempo que compartimos.

A la Facultad de Química y todos los profesores que contribuyeron en mi formación profesional.

Dedico este trabajo a mi hija Thelma con todo mi amor.

Gracias a Dios llegaste a mi.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……6

1. INTRODUCCIÓN:….....8

1.1. Hexocinasa……...8

1.2. Propiedades bioquímicas de las hexocinasas……9

1.3. Estructura……...12

1.4. Localización subcelular y función específica……16

1.5. Papel de las hexocinasas en el mecanismo de señalización por carbohidratos……17

1.6. Estrés Hídrico……19

3. JUSTIFICACIÓN……23

4. HIPÓTESIS……25

5. OBJETIVOS……25

5.1. Objetivo General……25

5.2. Objetivos Particulares……...25

6. MATERIALES Y MÉTODOS……26

6.1. Material biológico……26

6.2. Establecimiento de estrés hídrico……26

6.2.1. Determinación de los parámetros fisiológicos……26

6.2.1.1. Medida de Tallos y Hojas……27

6.2.1.2. Peso húmedo……27

6.2.1.3. Transpiración y Conductancia estomática……27

6.2.2. Recolección del material biológico……..27

6.3. Obtención del extracto enzimático citosólico……..28

6.4. Determinación de la cantidad de proteína……..28

6.5. Medición de la actividad de hexocinasa……..29

6.6. Obtención de la cinética de saturación por sustratos……31

6.6.1. Obtención de parámetros cinéticos……..31

7. RESULTADOS……32

7.1 Efecto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas de jitomate……..32
7.2. Medición de los cambios en la conductancia estomática durante el periodo de déficit hídrico..34
7.3. Efecto del déficit hídrico sobre la actividad de las hexocinasas citosólicas……..37
7.4. Comparación de las constantes cinéticas de las hexocinasas citosólicas de hojas y raíces de plantas que fueron sometidas a estrés hídrico……...42
8. DISCUSIÓN……51
8.1. Efectos morfológicos y fisiológicos del estrés hídrico en las plantas de jitomate……..51
8.2. Cambios en la actividad de las hexocinasas durante el estrés hídrico. I Hexocinasas que usan glucosa como sustrato……55
8.3. Cambios en la actividad de las hexocinasas durante el estrés hídrico. II Hexocinasas que usan fructosa como sustrato……...59
CONCLUSIONES……65
BIBLIOGRAFÍA……66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Papel dual de las hexocinasas en el metabolismo……..8

Figura 2. Estructura tridimensional de la hexocinasa……12

Figura 3. Análisis de distancias de las proteínas hexocinasa, fructocinasa y glucocinasa……15

Figura 4. Representación de los factores que influencian la generación de información química que es transducida desde el suelo hacia la parte aérea de la planta……..22

Figura 5. Plantas de jitomate sometidas a estrés hídrico por diferentes tiempos……32

Figura 6. El efecto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas de jitomate……..33

Figura 7. Curso temporal del efecto del déficit hídrico en el contenido de humedad de diferentes partes de las plantas de jitomate……..35

Figura 9. Actividad de hexocinasa cuando se le añadió glucosa como sustrato en hojas maduras y raíces de jitomate sometidas a estrés hídrico……39

Figura 10. Actividad de la hexocinasa de hojas maduras y raíces de jitomate control y sometidas a estrés hídrico cuando se le añadió fructosa como sustrato……41

Figura 11. Curvas de saturación de hexocinasa de extractos citosólicos obtenidos de las hojas maduras……42

Figura 12. Curvas de saturación de la actividad de hexocinasa de extractos citosólicos de hojas maduras usando como sustrato fructosa……...45

Figura 13. Curvas de saturación de la actividad de la hexocinasa de extractos citosólicos de las raíces empleando glucosa como sustrato……...47

Figura 14. Curvas de saturación de la actividad de hexocinasa de extractos citosólicos de las raíces usando fructosa como sustrato……..49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Propiedades bioquímicas de hexocinasas de diferentes organismos……10

Tabla II. Volúmenes empleados en la mezcla de reacción para medición de actividad de hexocinasa usando glucosa o fructosa como sustrato……30

Tabla III. Parámetros cinéticos de las hexocinasas de extractos citosólicos de hojas maduras…...43

Tabla IV. Constantes cinéticas de la actividad de la hexocinasa……...46

Tabla V. Constantes cinéticas de de la actividad de la hexocinasa de extractos citosólicos de raíces usando como sustrato glucosa……48

Tabla VI. Constantes cinéticas de las hexocinasas de extractos citosólicos de raíces……..50

ABREVIATURAS.

ABA	Ácido abscísico
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
CC	Capacidad de campo
FRK	Fructocinasa
G6P	Glucosa-6-Fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GK	Glucocinasa
HXK	Hexocinasa
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de Michaelis-Menten
NADPH	Nicotinamida adenosinfosfato dinucleótido
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
Vmax	Velocidad máxima
UDP	Uracil-difosfato
SPS	Sacarosa fosfato sintetasa

RESUMEN

En este estudio se estableció el estrés hídrico en las plantas de jitomate durante diferentes tiempos de su desarrollo, con la finalidad de examinar si la actividad de las hexocinasas citosólicas se modificaba, como un trabajo paralelo al que se está llevando a cabo en el laboratorio para estudiar la regulación del metabolismo de carbono y en particular de los transportadores de carbohidratos. La hexocinasa (EC 2.7.1.1), es una enzima que tiene una gran relevancia en el metabolismo celular, ya que al producir la G6P, forma un metabolito que puede canalizarse a vías metabólicas como la glucólisis, el ciclo de las pentosas, la síntesis de almidón, o hacia la síntesis de sacarosa. Además, se ha planteado que la enzima es capaz de participar en la vía de transducción de señales involucrada en la percepción de carbohidratos, y que lleva a modificar la expresión de genes de proteínas clave en el metabolismo de carbono.

Se realizaron curvas temporales de crecimiento de las plantas de jitomate sometidas a 11 días de déficit hídrico, encontrándose que el fenotipo de las plantas se encuentra alterado, el crecimiento en general es reducido, disminuyó la talla, el peso húmedo acumulado de raíces, hojas maduras y jóvenes, así como el número de hojas. Adicionalmente, el cierre de los estomas ocasionado por la disminución en el agua de riego disminuyó la transpiración, lo que sugiere que la tasa fotosintética se modificó. De hecho en otro trabajo en nuestro laboratorio se encontró que sacarosa y fructosa aumentan a partir del día 3 en las hojas, mientras que glucosa solo aumenta en dos tiempos durante el estrés; por otra parte en las raíces se incrementan la glucosa y la fructosa.

La actividad de las hexocinasas de las hojas aumentó en el día 3, 2.8 veces al medir la actividad con glucosa y de 2.5 veces cuando el sustrato utilizado era fructosa. El incremento en la actividad de las hexocinasas no sólo se encontró en la Vmax sino también en la Km, 1.8 cuando el sustrato fue glucosa y 20 veces

cuando el sustrato fue fructosa. Es probable que la menor afinidad de las hexocinasas sea producto del aumento en la concentración de los carbohidratos solubles al día 3.

Mientras que en las raíces la actividad de las hexocinasas medida a 3 mM de glucosa o de fructosa no se modificó por efecto del déficit hídrico. Aún que al obtener los parámetros cinéticos de las enzimas en las raíces encontramos que la Km para glucosa en el día tres es el doble en las raíces de las plantas estresadas comparadas con las control (15 μM y 7.8 μM respectivamente). En cuanto la Km para fructosa cambió a los tres días examinados, 1, 3 y 7 días. De tal manera que las hexocinasas de las raíces se afectaron también por el déficit hídrico.

La fructocinasa fue la enzima que se afectó mayormente por el estrés hídrico, enzima que se ha planteado importante en la regulación de la entrada de fructosa hacia la síntesis de sacarosa. Además, no descartamos, como ocurre en los mamíferos, que la actividad de la fructocinasa podría afectar la actividad de las hexocinasas en general, ya que la fructosa-P se ha encontrado que altera la unión de las hexocinasas a su proteína represora en el núcleo, lo que lleva a la activación de las hexocinasas. Aunque, también es probable que de manera transitoria se exprese una forma diferente de enzima para responder al déficit hídrico, sin embargo, aún necesitamos mayores evidencias experimentales para poder encontrar que población de las hexocinasas presentes en nuestra preparación citosólica es la que se modifica por el estrés.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hexocinasas.

La hexocinasa (EC.2.7.1.1 ATP: D-Hexosa 6 fosfotransferasa) es una enzima ubicua que se encuentra en organismos tales como, bacterias, levaduras, plantas y mamíferos. La hexocinasa es la primera enzima en el metabolismo de las hexosas, la enzima cataliza la fosforilación de carbohidratos, una reacción esencial e irreversible. Esencial debido a que uno de los productos principales es la glucosa 6 fosfato (G6P), metabolito de encrucijada que participa en diferentes vías tales como el almacenamiento (en forma de moléculas de almidón o glucógeno), obtención de energía (glucólisis), formación de metabolitos intermediarios empleados en otras vías (NADPH, anabolismo). Además, la hexocinasa ha sido implicada en el mecanismo de señalización por carbohidratos, en donde la producción de G6P no se encuentra involucrada sino más bien su cambio conformacional (Figura 1, Sheen*, et al.* 1999; Wilson *et al.* 2003).

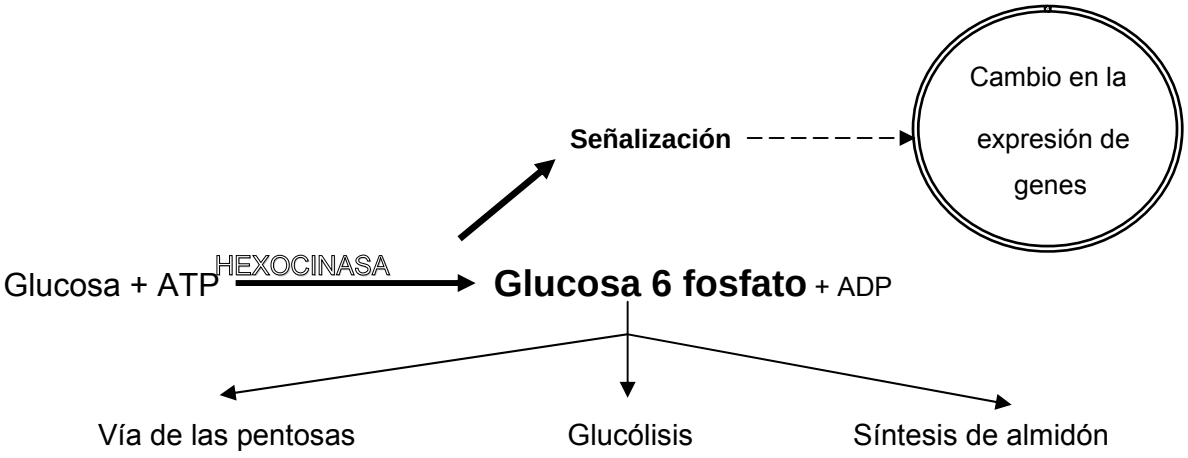


Figura 1. Papel dual de las hexocinasas en el metabolismo. Obtención de G6P, producto que es usado en importantes vías metabólicas y su participación en la vía de transducción de señales por carbohidratos, independiente de la formación de G6P, y que podría ser a través de su cambio conformacional o bien por fosforilación o por asociación con otras proteínas.

1.2. Propiedades bioquímicas de las hexocinasas

La glucosa que entra en la célula debe ser inmediatamente fosforilada para prevenir su salida y continuar con el metabolismo celular. La transferencia de un grupo fosfato del complejo Mg:ATP, a la glucosa para formar G6P, provee a la glucosa de una carga negativa, necesaria para evitar su libre difusión en la membrana plasmática. Las hexocinasas también fosforilan a otras D-hexosas como la fructosa, manosa, galactosa, glucosamina y 2-desoxiglucosa. En condiciones normales de temperatura y presión a las cuales se llevan acabo las biocatálisis se ha comprobado que la hexocinasa aumenta la velocidad de reacción por un factor mayor de 10^{10} (Díaz, 1998).

Algunas hexocinasas fosforilan mejor a la glucosa que a la fructosa, aunque hay formas que usan de igual manera ambos sustratos. Algunas hexocinasas usan al ATP como donador del grupo fosfato, sin embargo, otras usan UTP. Como ya se mencionó, el sustrato o los sustratos de las hexocinasas son las hexosas, aunque el sustrato real es el complejo Mg^{2+}-ATP. De hecho, el ATP libre es un potente inhibidor competitivo de la hexocinasa, mientras que el Mg^{2+} es esencial en las reacciones de las cinasas ya que este catión mantiene protegidas las cargas negativas del fosfato, permitiendo que el fosfato en la posición γ sea más accesible al ataque nucleofílico (oxhidrilo de carbono 6 de glucosa) (Díaz y Hicks, 1998).

En plantas hay múltiples formas de hexocinasas que pueden fosforilar diferentes carbohidratos, basados en la especificidad del sustrato, se han clasificado como fructocinasas (FRK), glucocinasas (GK) y hexocinasas (HXK). Generalmente las hexocinasas son enzimas capaces de fosforilar un amplio espectro de hexosas como la glucosa, fructosa y usualmente manosa y galactosa; mientras que la fructocinasa y glucocinasa son más específicas por el sustrato que les da su nombre. La mayor parte de las hexocinasas presentan Kms para glucosa en el rango micromolar (30-100 μM), mientras que la Km para fructosa se encuentran en

el intervalo milimolar (2.5 a 26 mM; Tabla I). Sin embargo, las fructocinasas presentan Kms para fructosa entre 41 hasta 1300 µM (Tabla I).

Tabla I. Propiedades bioquímicas de hexocinasas de diferentes organismos. ND = no determinada

Organismo	Isoforma	Sustrato	Km (mM)	Peso molecular (kDa)	Referencia
Entamoeba histolytica	HKX1	glucosa	0.067	50	Kroschewski *et al.* 2000
	HXK2	glucosa	0.033	50	
Tuber borchii mycelium	HK_{M1}	glucosa	0.35	50 ± 2	Ceccaroli *et al.* 1998
		fructosa	4.5		
		manosa	0.25		
	HK_{M2}	glucosa	0.1	50± 2	
		manosa	0.68		
	HK_{M3}	glucosa	0.3	50±2	
		fructosa	2.5		
		manosa	0.5		
S.cereviseae	PI	fructosa	0.33	54	Cárdenas *et al*., 1998
	glucocinasa	glucosa	0.12	54	
Mamíferos	HXK I	glucosa	0.03	100	Wilson 2003
	HXK II	glucosa	0.3	100	
	HXK III	glucosa	0.003	100	
	glucocinasa	glucosa	12	50	
Arabidopsis thaliana	HXK I	glucosa	0.044	47	Dai *et al.* 2000
		fructosa	17		
	FRK1	Fructosa	ND	37.1	Pego y Semeekens, 2000.
	FRK2	Fructosa	ND	37.1	
	FRK3	Fructosa	ND	37.1	
Embriones de arroz	FRK	glucosa	0.09	35-55	Guglielminetti *et al.* 2000
	HXK_2	glucosa	0.63		
	HXK_1	glucosa	4.27		
	GK_3	glucosa	7.44		
	GK_2	glucosa	0.19		
	GK_1	glucosa	0.13		
Tabaco	HXK	glucosa	0.03	34	Giese *et al.* 2005
		fructosa	0.082		
		manosa	0.021		
Maíz	HXKmitocondrial	glucosa	0.129		Galina *et al.,* 1995
	HXK citosólica	glucosa	0.049		
	FRK1	fructosa	0.149	36.7	Zhang *et al.* 2003
	FRK2	fructosa	0.121	35.5	
Jitomate	Glucocinasa	glucosa	0.065	70-85	Martínez-Barajas *et al.* 2003
	HXK I	glucosa	0.045	54 (se predice de la secuencia de aa)	Dai et al., 2002
		fructosa	26.03		
		manosa	0.084		
	HXK II	glucosa	0.093		
		fructosa	86.09		
		manosa	0.37		
	FRK1	fructosa	1.3	37.3	Kanayama *et al.,* 1998.
	FRK1	fructosa	0.131	35.0/72.4	Martínez-Barajas, *et al.,* 1997.

Las hexocinasas de levadura y mamíferos son inhibidas por ADP, en trigo se determinó un valor de Ki de 1mM con una inhibición de tipo no competitiva en un medio de reacción que contenía glucosa como sustrato (Grossbard y Schimke, 1966; Liu et al, 1999). La G6P se ha reportado que también puede llegar a inhibir a la enzima, por ejemplo en la hexocinasa de germen de trigo se encontró una inhibición de tipo no competitivo con una Ki de 16.2mM (Higgins y Easterby, 1976), mientras que en papa la inhibición no competitiva se presento con una Ki de 4.1mM (Renz y Stitt, 1993). Por otra parte, las fructocinasas no son inhibidas por la G6P. Si bien en la hexocinasa de mamíferos se inhibe por G6P de manera competitiva y a concentraciones bajas (Ki 0.04mM), en levadura ocurre una inhibición mixta con una Ki 20-30 mM. Adicionalmente, el fosfato puede inhibir de manera moderada a la hexocinasa de corazón de bovino y no se ha observado algo similar en las de plantas.

Un número importante de análogos D-glucosa como D-manosa, 2-deoxi D-glucosa, D-glucosamina son substratos de la enzima, sin embargo, la incubación de tejido en estos compuestos inhibe el crecimiento de las plantas, así como también de algunos microorganismos, insectos y animales, aún cuando los sustratos fosforilados sean posteriormente metabolizados. Se han encontrado grandes decrementos en las concentraciones de algunos metabolitos como ATP, fosfato, G6P y fosfoenolpiruvato, cuando se embeben tejidos con los análogos unos minutos ya sean células tumorales o pedazos de escutelo de maíz (Hernández y De la Fuente, 1989; Garrard LA y Humpreys, 1969).

Los efectos de los análogos de carbohidratos sobre el crecimiento no ha sido totalmente dilucidado, sin embargo, se presume que la 2-deoxiglucosa-6P puede ser convertida a UDP 2-deoxiglucosa y esto modifica la síntesis de polisacáridos. Algunos análogos fosforilados pueden también inhibir a cuatro enzimas importantes que usan a la G6P, la fosfoglucosa isomerasa (PGI) en la glucólisis, la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en la síntesis de pentosas, la mio-inositol-P-sintasa en la vía de formación de inositol-fosfato y la fosfoglucosa

mutasa en la síntesis de nucleótidos y azúcares. La manosa-6P inhibe a la PGI y la 2-deoxiglucosa a la G6PDH y a la PGI (Hernández y De la Fuente, 1989; Graham, *et al.,* 1994).

1.3. Estructura

En tejidos de mamíferos se han logrado separar cuatro isoenzimas de hexocinasas designadas I, II, III, y IV, las cuales presentan estructuras similares pero difieren en sus propiedades regulatorias y catalíticas. La isoenzimas de I a III son proteínas de 100 kDa de peso molecular (Figura 2A), que probablemente evolucionaron por fusión y duplicación de una hexocinasa ancestral de 50 kDa , ya que estas tres isoenzimas presentan una repetición en la secuencia interna, y al comparar la mitad de la proteína cercana al N- y la del C-terminal se encuentran al menos 1 secuencia con una alta identidad. Por otra parte la isoenzima IV presenta un peso molecular de 50 kDa (Wilson *et al.* 2003). Mientras que en plantas se han encontrado hexocinasas que se encuentran en los intervalos de peso molecular entre los 30-110 kDa (Tabla I).

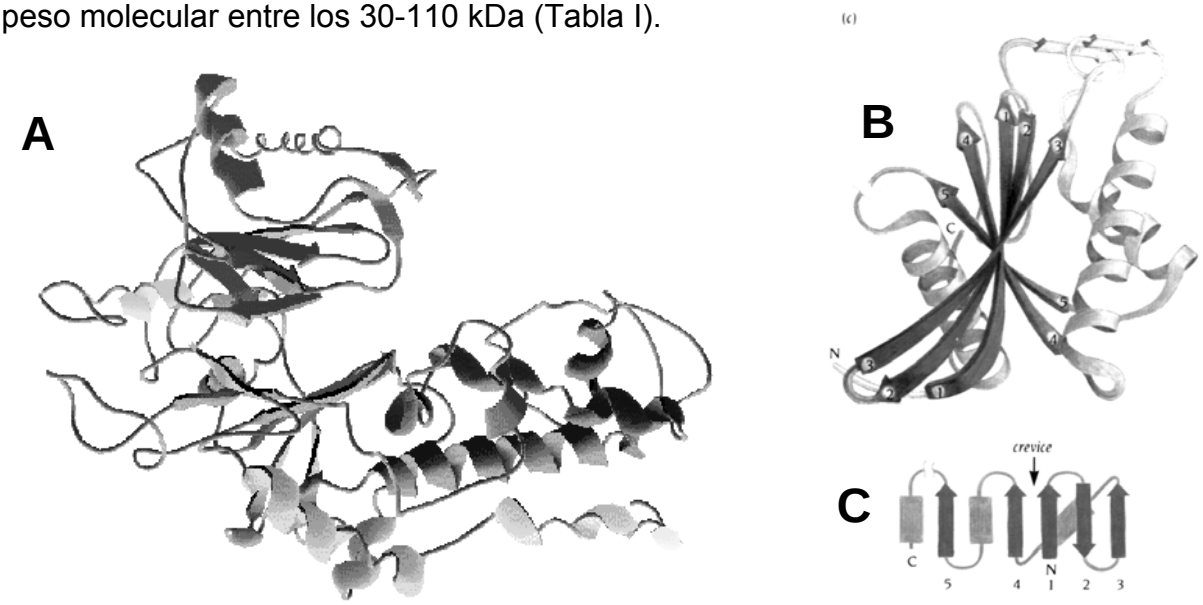


Figura 2. Estructura tridimensional de la hexocinasa. A) Dímero de hexocinasa, B) monómero y C) caricatura de la disposición y número de estructuras secundarias en la hexocinasa. Tomado de http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/valmir/bioquimica/glicolise/glycolisis.html

En la Figura 2 se muestra un modelo de listones de la hexocinasa en el que se observa como el monómero se encuentra formado de 5 hojas beta y 3 alfa-hélices, estructura que se denomina alfa/beta abierta (Figura 2B y 2C), formándose dos dominios con las alfas hélices separadas por el centro en el que se encuentran las hojas beta.

La enzima, en su conformación abierta, permite que la hexosa se acomode en su sitio activo; cuando esto ha sucedido, la enzima adquiere su conformación cerrada en la cual se desplazan a las moléculas de agua y disminuye la energía de solvatación, necesaria para que se lleve a cabo la reacción de fosforilación. La glucosa induce una rotación de 12° de un lóbulo con respecto al otro con un desplazamiento de 8 Å de tal manera que la hexosa queda atrapada dentro de la molécula de proteína salvo el grupo 6-hidroximetilo donde tiene lugar la transferencia del grupo fosfato del ATP (Núñez, 2001).

Se sabe que en el dímero, uno de los monómeros no presenta una actividad catalítica fosforilante si no más bien de actividad regulatoria, ya que no contiene el sitio de transferencia del grupo fosfato, aunque sí el de unión de la glucosa. Por lo que este dominio al unir a la G6P llega a inhibir la actividad de la enzima. (Harrington y Bush, 2003).

La estructura tridimensional de la enzima de plantas no ha sido dilucidada aún, pero se conoce que el peso molecular de la hexocinasa varía grandemente dependiendo de las especies, aunque también dentro de la misma planta, p ej. en maíz el peso molecular de las HXKs varía de 39 a 59 kDa, mientras que en papa se han reportado valores de peso molecular de 66, 102, 105 y 118 (Tiessen et al., 2003). Lo anterior sugiere que la proteína puede formar un dímero y que las diferentes proporciones de dímero a monómero en las diferentes preparaciones analizadas han llevado a obtener pesos moleculares que no coinciden con el monómero o el dímero. Para el trigo germinado se han identificado cuatro formas de isoenzimas, dos con masa molecular de 52 kDa y dos de 100 kDa (Meunier et

al. 1971), para el caso de *Arabidopsis thaliana* cuatro isoenzimas, tres con un peso de 37.1 kDa y una de 47 kDa, en embriones de arroz seis isoenzimas con pesos que van desde 35 a 55 kDa (tabla I). Sin embargo, estudios recientes presumen que la mayor parte de las especies de plantas presentan solo dos isoenzimas de hexocinasas y que han sido mal clasificadas como hexocinasas o glucocinasas y que en realidad pertenecen a la familia de isoenzimas de fructocinasa (Dai *et al.,* 2002).

Las hexocinasas de plantas presentan dominios muy conservados y similares a de enzimas de levadura y mamíferos, estos son las regiones de unión al fosfato y al carbohidrato (Dai *et al*. 2002). Por ejemplo, la secuencia **LGTFS** es la región probable de unión al carbohidrato, y se encuentra en plantas, animales y levadura pero no se encuentra en las bacterias. En contraste, como se observa en la Figura 3, la similitud entre las hexocinasas y las fructocinasas es baja, apoyando la sugerencia de que hubo una evolución convergente en función entre las hexocinasas y las fructocinasas, ya que no presentan un plegamiento similar (Bork *et al*., 1993). Por lo que encontrar actividad fosforilante hacia la fructosa puede implicar dos poblaciones muy diferentes de enzimas.

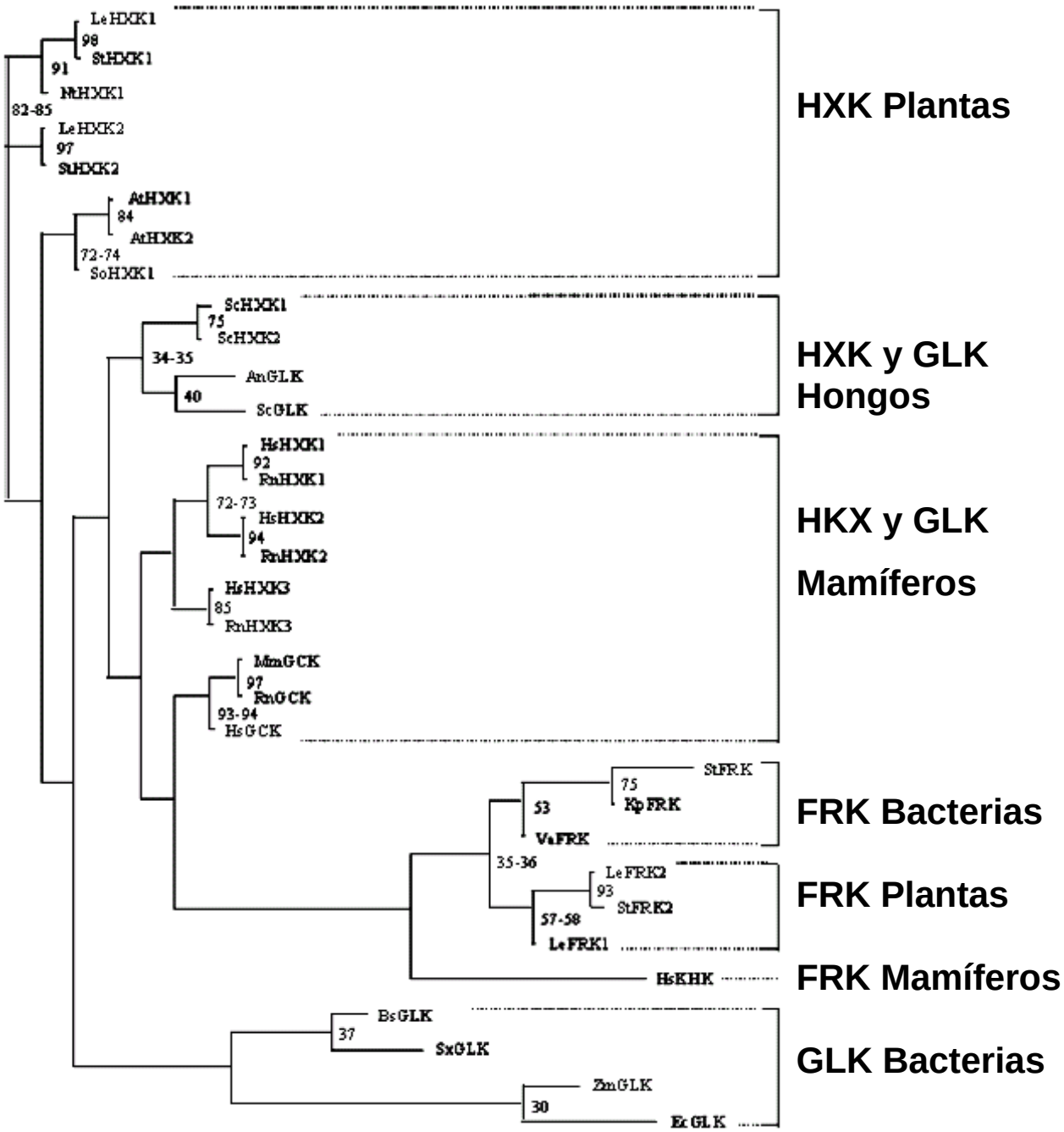


Figura 3. Análisis de distancias de las proteínas hexocinasa, fructocinasa y glucocinasa de plantas, hongos, mamíferos y bacterias (Tomado de Dai et al., 2002). El análisis fue hecho con el método de Neighbor-joining/UPGMA, versión 3.572c CuraToolsTM (http://curatool.curagen.com). HXK-hexocinasa, GLK y GCK-glucocinasa, FRK y KHK-fructocinasa. Las HXK de plantas son: jitomate (L. esculentum) LeHXK1 y LeHXK2 (Números de acceso GenBank AJ401153 y AF208543, respectivamente), papa (S. tuberosum) StHXK1 y St HXK2 (X94302), Arabidopsis thaliana AtHXK1 y AtHXK2 (U28214 y U28215), Nicotiana tabacum NtHXK1 (AF118133), S. oleracea SoHXK (AF118132). HXK y GLK de hongos: Saccharomyces cerevisiae ScHKX1, SCHXK2, ScGLK (M14410, 14411, M24077) y Aspergillus níger AnGLK (S74210). HXK y GLK de

mamíferos: Homo sapiens HsHXK1, HsHXK2, HsHXK3, HsGCK (NM_0001888, NM_0001889, NM_002115, NM_000162), Rattus norvegicus RnHXK1, RnHXK2, RnHXK3, RnGCK (NM_012734, NM_012735, U73859, NM_012565), Mus musculw NmGCK (L41631). FRKs de bacteria: Vibrio alginolyticus VaFRK (M76768), Klebsiella pneumonia KpFRK (X61004), Salmonella typhimurium StFRK (X61005). FRK de plantas: jitomate LeFRK1 y LeFRK2 (U64817, U64818), papa StFRK2 (Z12823). FRK de mamíferos H. sapiens HsKHK (NM_000221). GLK de bacteria: Bacillus subtilis BsGLK (Z99116), Staphylococus xylosus SxGLK (Q56198), Zymononas mobili ZmGLK (D37855), Escherichia coli EcGLK(U22490). Los números representan porcentajes de identidad entre las proteínas como se calcula con el análisis de alineamiento de secuencias de proteínas ClustalW del CuraToolsTM.

1.4. Localización subcelular y función específica.

El metabolismo glucolítico es generalmente considerado como un proceso citosólico, pero en muchos organismos superiores hay múltiples isoformas que pueden localizarse en diferentes compartimentos celulares como por ejemplo el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, el Golgi, la mitocondria y la membrana externa del cloroplasto (Frommer *et al.,* 2003).

Las funciones características de estas hexocinasas asociadas a organelos o estructuras subcelulares se desconoce, aunque se ha propuesto que las diferencias en la localización subcelular de las isoenzimas de hexocinasa puede resultar en una compartimentación del metabolismo de la glucosa con la canalización de G6P a vías metabólicas particulares. Por ejemplo, en los mamíferos se ha encontrado a la glucocinasa asociada con la actina del citoesqueleto, capacidad que se ha sugerido podría ayudarle a percibir diferentes condiciones fisiológicas y esto propicie su movimiento hacia el núcleo llevando a alterar la expresión genética. La hexocinasa del cloroplasto se ha sugerido que podría fosforilar a la glucosa antes de que se exporte la glucosa y entre al citosol (Frommer *et al.*, 2003). La hexocinasa tipo I de mamíferos se encuentra unida a la mitocondria, y se ha propuesto que introduce la glucosa al metabolismo glucolítico para producción de energía, ya que se ha encontrado que se expresa en altos niveles en tejidos como el cerebro que se sabe depende del metabolismo glucolítico (Wilson, 2003)

En contraste, la hexocinasa tipo II tiene una expresión más limitada, está presente en tejidos como músculo esquelético y adiposo y se ha sugerido que tiene un papel anabólico como fuente de G6P para la resíntesis de glucógeno en el músculo esquelético después de la contracción, o como fuente de G6P para la vía de las pentosas-fosfato suministrando NADPH requerido para la síntesis de lípidos. En el caso de la tipo III se ha sugerido que también puede estar asociada al metabolismo anabólico aunque esto aún no ha sido probado (Wilson, 2003)

Para las radículas de maíz se encontró una isoforma soluble en el citosol y otra unida a mitocondria, encontrándose que la isoforma unida a mitocondria presenta una mayor actividad en la fosforilación de glucosa y se inhibe por ADP y G6P (Galina *et al.* 1995).

1.5. Papel de las hexocinasas en el mecanismo de señalización por carbohidratos

Las hexocinasas son conocidas por su aspecto clásico de enzimas con un papel respiratorio, es decir de catalizar el primer paso de la glucólisis, durante el cual son fosforiladas la glucosa, fructosa u otras hexosas. Sin embargo, se ha descubierto que las hexocinasas también inician las señales de percepción de carbohidratos. De manera interesante parece que está función no involucra a los productos *per se* de la reacción, hexosas-fosfato. En su lugar, estudios en humanos sugieren una característica distinta de la enzima en la cual su conformación, fosforilación o asociación con otras proteínas se encuentra involucrada. Las posibilidades incluyen la interacción con cinasas, fosfatasas y/o proteínas de membrana. Esto último ha sido planteado para las células humanas y también en plantas (Rolland y Sheen, 2005).

El mecanismo para el inicio de la señal vía hexocinasas aún no se ha dilucidado, y para algunos grupos no es clara la función de las hexocinasas en la percepción de los carbohidratos, argumentando que la mayoría de los estudios que se han hecho

para adjudicarle este papel a la enzima, incluyen el uso de una gran variedad de carbohidratos análogos o intermediarios metabólicos fosforilables o no por la hexocinasa, resultados que no descartan que los cambios en la actividad celular se deban a la alteración en la poza de nucleótidos o bien a un efecto metabólico y no de señalización. No obstante, hay reportes que indican que las hexocinasas pueden ser participantes en las señales en respuesta al flujo de carbono, más que una modificación de su actividad por cambios en la concentración de sus substratos o los productos (hexosas y hexosas-fosfato, respectivamente; Halford *et al.* 1999; Rolland *et al.,* 2002).

Una pieza clave que da evidencias del papel dual de las hexocinasas en plantas ha sido la separación de la actividad de fosforilación de la función de señalización, que se logró gracias a la transformación de plantas de Arabidopsis que contenían hexocinasas tipo silvestre en plantas que contenían hexocinasas con una actividad fosforilante muy reducida (aproximadamente 10% comparada con el control), pero éstas últimas plantas conservaban aún la capacidad de responder al estímulo por carbohidratos. Empero si se eliminaba la expresión del gen para la hexocinasa las plantas presentaban un crecimiento alterado e incapaces de responder a la adición externa de glucosa (Moore *et al*, 2003).

La percepción de la señal de carbohidratos en la que se encuentra involucrada la hexocinasa ha sido estudiada con detalle en las células β del páncreas de mamíferos, ya que se conoce que la enzima actúa como un sensor de la concentración de glucosa y regulador de la secreción de insulina. Las mutantes que no presentan el gene HXKIV o de una proteína que regula a la hexocinasa denominada GCKR (del inglés “glucokinase regulatory protein”), producen fenotipos asociados a la diabetes juvenil o a una forma de diabetes no dependiente de insulina. En este sistema una fructocinasa juega un papel central en la regulación de la actividad de la hexocinasa, ya que se conoce que la GCKR se une a la matriz nuclear de los hepatocitos y es capaz de reprimir la actividad de la hexocinasa IV al unirse fuertemente a ella. La interacción de ambas proteínas

disminuye en presencia de fructosa-1-fosfato, el producto de la reacción catalizada por la FRK, sobre la GCKR. Por esto se propone que la actividad de la FRK modula la actividad de sensor de glucosa de la HXKIV en las células β del páncreas (Malaise et *al.,* 1990). Así entonces la regulación cruzada entre hexocinasas es una característica interesante de estudio.

1.6. Estrés Hídrico

Las plantas durante su desarrollo están sometidas constantemente a las condiciones cambiantes del medio que las rodea y cuando éstas no son favorables, la planta responde llevando a un desequilibrio en el funcionamiento y con alteraciones en el desarrollo de la planta (Bray, 1993). El estrés que más comúnmente se encuentra, es el que afecta el estado hídrico de la planta, éste puede ser originado por sequía, bajas temperaturas o alta salinidad. El agua tiene muy diferentes papeles celulares además de ser solvente y medio de transporte de solutos, es el donador de electrones en la reacción de Hill y su evaporación permite disminuir la temperatura celular (Bohnert *et al.,* 1995).

La baja disponibilidad de agua es percibida en la planta y lleva a modificar la actividad celular. Los genes que se expresan durante el estrés promoverán la tolerancia celular a la deshidratación, proteger las funciones del citoplasma, alterar el potencial de agua para promover la entrada de agua, controlar la concentración de iones y regular la expresión de genes. Se desconoce el flujo metabólico, la compartimentación y la función de los productos génicos que se encienden por la situación de estrés. Sin embargo las vías de transducción de señales que llevan a la modificación de la actividad celular en la planta deben ser varias para enfrentar la tolerancia al calor, la desecación, y el ajuste osmótico, entre otros (Zhu, 2002).

El agua debe perderse durante la transpiración, pero durante el estrés hídrico el agua no puede ser totalmente remplazada, entonces la planta, como mecanismo de defensa, disminuye la transpiración cerrando los estomas. Cuando los estomas

se cierran la toma de carbono también se reduce llevando a una disminución en la asimilación de carbono. Sin embargo, a pesar de una tasa reducida de fijación de CO_2 se ha encontrado una acumulación de diferentes hexosas, sacarosa o de algunos oligosacáridos en respuesta al estrés, en tejidos como las hojas de manzana y las hojas maduras de maíz. La función de los compuestos hidroxilados se ha planteado que es para ayudar al ajuste osmótico y también para la protección de las estructuras celulares, es decir el reemplazo de los puentes de hidrógeno y las interacciones débiles que se establecían con el agua (Bray, 1993; Bray, 2001; Nuccio *et al.,* 1999).

De hecho, la acumulación de sacarosa y otros carbohidratos es una característica común en muchas especies de plantas (Bohnert *et al.,* 1995). Se ha encontrado por ejemplo, que en hojas de manzana sometidas a estrés moderado que desde el día 2 hay un aumento del contenido de sacarosa, glucosa y fructosa llegando a ser al día doce del 62%, y cuando el estrés hídrico es severo, el incremento en glucosa y fructosa llegaba a ser del 490% (Li y Li, 2005). En hojas maduras de maíz también se encontró un incremento en los tres carbohidratos (Pelleschi *et al.,* 1997), sin embargo, hay tejidos que no llegan a acumular sacarosa o sólo acumulan las hexosas. Varias enzimas podrían ser las responsables de estos aumentos pero la sacarosa fosfato sintetasa (SPS) que produce sacarosa fosfato a partir de fructosa y UDPglucosa es la que en general se ha detectado que aumenta por efecto del estrés hídrico (Yang *et al.,* 2002). Las invertasas ácidas de la pared celular y de la vacuola son importantes en establecer gradientes de concentración de carbohidratos para favorecer ya sea la nutrición celular, su crecimiento y o almacenamiento de carbohidratos. Esta última enzima es regulada por las concentraciones de hexosas y podría participar en la acumulación de hexosas en los tejidos de plantas sujetas a déficit hídrico (Koch, 2004).

Después de la exposición de las plantas a suelos secos, la conductancia y el crecimiento de las hojas es regulada por señales químicas que viajan a distancia desde las raíces hasta los tallos, independientemente del estado hídrico de los

tallos. Se ha observado que los estomas permanecen parcialmente cerrados aún cuando el pH o el potencial hídrico de la hoja permanezca en valores similares que los de una planta colocada en un suelo seco (Sobeih *et al*., 2004). Numerosos reportes han aportado evidencias de que en las raíces ocurre la percepción del estrés por agua y lo transducen a distancia a los diferentes tejidos. Uno de los compuestos que se ha planteado de manera recurrente en la literatura, responsable de los efectos moleculares del estrés hídrico es el ácido abscísico (ABA), debido a que se ha implicado en el control de la apertura estomatal. Otras hormonas probablemente asociadas en el proceso son las citocininas, ya que al ocurrir el estrés hídrico también se acelera la senescencia de las hojas maduras.

Se han planteado varios modelos en los que el ABA es un participante importante, y su acumulación inicia una serie de eventos, muchos de los cuales promoverán la adaptación (la inducción de genes específicos) a la condición al déficit hídrico. Sin embargo, el mecanismo de reconocimiento de ABA aún se desconoce, se ha sugerido que dentro de la vía de señalización participan proteínas fosfatasas. Por otro lado, algunos genes presentan secuencias conservadas tanto en la región próxima a la región 3' como a la 5' del gen que pueden ser sitios potenciales para la unión de factores de transcripción, que modulan la expresión de genes por la acumulación o disminución de ABA (Bray, 2001).

En el contexto fisiológico la acumulación de ABA y de iones, así como la disminución de las citocininas en conjunto podrían llevar a explicar los efectos fisiológicos del estrés hídrico, la reducción en la conductancia estomatal, el incremento en la formación de raíces secundarias, la disminución en el crecimiento y función del tallo, el incremento en la senescencia de las hojas entre otros (Davies y Zhang, 1991; Figura 4).

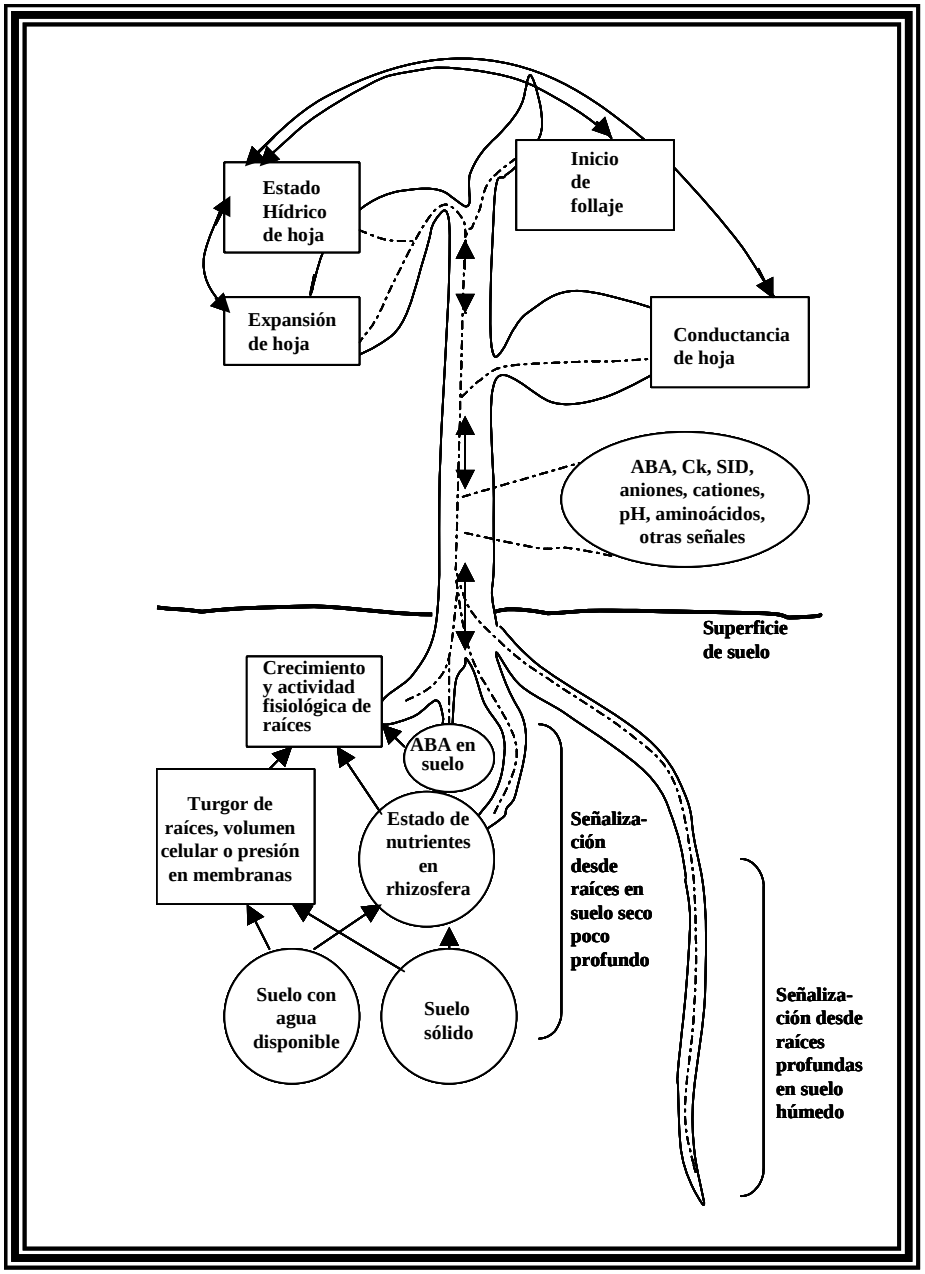


Figura 4. Representación de los factores que influencian la generación de información química que es transducida desde el suelo hacia la parte aérea de la planta (Adaptado de Davies y Zhang, 1991). Se afecta el crecimiento de los tallos y hojas, se lleva a la senescencia y maduración temprana de las hojas y al crecimiento de las raíces secundarias así como al proceso de adaptación de las raíces para cambiar la presión de turgor y el volumen celular, que debe ocurrir para que las raíces no sufran daño ya que el suelo se encuentra más compacto.

3. JUSTIFICACIÓN

El principal carbohidrato transportado en las plantas es la sacarosa, que debe ser hidrolizada ya sea por la sacarosa sintetasa hacia UDPglucosa y fructosa, o bien por la invertasa hacia glucosa y fructosa. En ambos casos se produce al menos una hexosa. Se reconoce que tanto la sacarosa como las hexosas pueden llevar a cabo funciones importantes en la célula como son la de ser unidades estructurales ó fuente de energía, pero también son moléculas que controlan la expresión de genes, el metabolismo, la fisiología, el ciclo celular y el desarrollo tanto en los procariontes como los eucariontes.

En las plantas, los carbohidratos afectan procesos como la germinación, el crecimiento, la floración, la senescencia, el metabolismo de carbono y la fotosíntesis. El aumento en las concentraciones externas de carbohidratos o la modificación interna del contenido de los carbohidratos inhibe la fotosíntesis y causa una reducción en el crecimiento de la planta (Smeekens, 2000).

El estudio de la regulación mediada por carbohidratos es compleja, ya que existen múltiples vías metabólicas y proteínas afectadas, sin embargo, se han planteado diferentes formas de regulación en las plantas. La regulación mediada vía la hexocinasa, en donde se propone que la entrada a la célula de las hexosas y su reconocimiento por la, o las hexocinasas puede llevar a la modificación de la expresión de genes importantes en su uso; otra vía posible es aquella en donde la hexocinasa no se encuentra involucrada y es entonces la respuesta celular mediada por los cambios metabólicos de la fuente carbonada y las concentraciones de los adenilatos lo que se percibe. En ella se encuentran involucradas las cinasas de proteínas denominadas SNF1 (del inglés “sugar non fermenting”) que son capaces de transducir y controlar la expresión de genes a través de la fosforilación de las enzimas citosólicas en respuesta a la disponibilidad de carbohidratos. Otra de las vías de regulación es la percepción a través de un sensor membranal, en él se ha planteado que podrían encontrarse

los transportadores de la sacarosa y las hexosas o bien otras proteínas membranales que sólo tengan la función de receptores de membrana (Geingenberg *et al.,* 2005; Koch *et al.,* 2000).

En nuestro laboratorio se está investigando la relación entre los carbohidratos y la expresión de los transportadores de carbohidratos, y se tienen evidencias que apuntan a que la hexocinasa puede ser la responsable de mediar los cambios "tejido específico" y de los niveles de expresión de al menos el transportador de la sacarosa en el maíz. En resumen, la expresión del transportador de la sacarosa en la germinación del maíz se encuentra restringida al escutelo (cotiledón modificado y zona que rodea al tejido que propiamente crecerá y se diferenciará en planta), y al germinar el tejido en presencia de glucosa y fructosa se reprime su expresión, pero la imbibición del tejido en manosa induce la expresión de la proteína no sólo en el escutelo sino también en el eje embrionario. Siendo la manosa un carbohidrato que es fosforilado por la hexocinasa pero que es escasamente utilizado en el metabolismo posterior (Jang y Sheen, 1994), se sugiere que la manosa se encuentra funcionando de manera análoga a la glucosa, por lo que la hexocinasa podría ser la enzima clave para regular la expresión del transportador de sacarosa, si bien no descartamos la posibilidad de que la actividad fosforilante sobre la manosa reduzca la poza de adenilatos y sea esto lo que produzca el cambio en la expresión del transportador, por lo que aún nos encontramos trabajando en estos aspectos.

En el sistema que es tema de este trabajo de manera fisiológica se impone un cambio en el contenido de carbohidratos, tanto en el tejido que es fuente de los mismos, las hojas, como en los tejidos que los requieren o demandan como las raíces, las flores, los frutos, y los meristemos entre otros. Con la finalidad de aportar evidencias sobre la regulación que la hexocinasa podría estar llevando a cabo sobre la expresión de los transportadores de las hexosas y la sacarosa en las plantas, se desarrolló un protocolo para inducir estrés hídrico y llevar a la modificación *in vivo* de las concentraciones de los carbohidratos en los diferentes tejidos de la planta.

4. HIPÓTESIS

Ya que la hexocinasa es una enzima importante en el metabolismo de carbohidratos y en los mecanismos de percepción de éstos, entonces su actividad se modificará cuando se altere el reparto de carbohidratos inducido por el déficit hídrico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar el efecto que el tratamiento de déficit hídrico causa sobre la actividad de las hexocinasas citosólicas de las plantas de jitomate.

5.2. Objetivos Particulares

1. Determinar la actividad de la hexocinasa en tejidos de plantas de jitomate, que fueron o no sometidas a déficit hídrico.

2. Comparar la actividad de la hexocinasa proveniente de los tejidos sometidos a déficit hídrico con la de los tejidos control de las plantas de jitomate.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material biológico.

Semillas de jitomate *Lycopersicon esculentum* L. Var. Río Grande de la compañía Sun Seeds, Parma, CA. USA.

6.2. Establecimiento de estrés hídrico.

Las semillas de jitomate se plantaron en semilleros de manera individual y se permitió su desarrollo durante los primeros quince días en condiciones de invernadero y con un riego a capacidad de campo (CC), es decir, con el agua suficiente para lograr la saturación de la tierra (aprox. 1L). Posteriormente la plántula se transplantó en macetas de 20.5 cm de diámetro y 5 Kg de capacidad las cuales contenían una mezcla de 2 partes de tierra por una parte de agrolita. Se dejaron crecer las plantas en invernadero con riego a CC y a los 81 días se separaron las plantas en dos lotes, uno llamado plantas control en el cual se continuó el riego a CC y otro lote llamado plantas estrés o con déficit hídrico, el cual se comenzó a regar con 1/8 de la CC.

El periodo de tratamiento de estrés hídrico se realizó entre los 81 y 96 días, y durante este período se analizó el fenotipo, se determinaron algunos parámetros fisiológicos de las plantas y se cosecharon los tejidos.

6.2.1. Determinación de los parámetros fisiológicos.

Durante el desarrollo y establecimiento del estrés hídrico en las plantas de jitomate se realizó la cuantificación de algunos parámetros fisiológicos tales como: longitud

del tallo, número de hojas jóvenes, número de hojas maduras, peso húmedo de la raíz, la hoja y tallo, conductancia estomática, y transpiración.

6.2.1.1. Medida de Tallos y Hojas.

La medida de los tallos y el conteo de las hojas se realizó de manera manual.

6.2.1.2. Peso húmedo.

La obtención de peso húmedo se realizó con el tejido fresco recién cosechado por determinación gravimétrica

6.2.1.3. Transpiración y Conductancia estomática.

La determinación de los valores de la transpiración y conductancia estomática se efectuó usando un porómetro de difusión de balance nulo modelo LI-1600 (Licor Instruments Co, USA) utilizándose la cara abaxial de hojas completamente expandidas de la quinta rama de la planta. Con la finalidad de reducir las variables que podía tener el clima sobre las lecturas realizadas en el registro de la conductancia estomática y transpiración, siempre se realizaron las medidas entre las 11 y 12 p.m. cuando la incidencia de la luz era aproximadamente de 800 quanta ($\mu molm^{-2}s^{-1}$).

6.2.2. Recolección del material biológico.

La cosecha y recolección de los tejidos (hojas maduras y raíces) se realizaron los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11, que correspondieron a los días 81, 84, 86, 88, 90, y 92, días respectivamente del crecimiento de las plantas.

6.3. Obtención del extracto enzimático citosólico.

El día de la cosecha se obtuvó el extracto enzimático de tres plantas para el lote control así como el sometido a estrés hídrico, todo se realizó a 4°C. Se pesaron 10 g de hojas maduras o raíces, se molieron por separado con nitrógeno líquido y arena de sílice de manera manual con mortero y pistilo hasta su completa pulverización. Se homogeneizó añadiendo por cada gramo de tejido 2 mL de amortiguador de extracción (HEPES 50mM, EDTA 1mM, DTT 2mM, PMSF 1mM y glicerol 10%). La mezcla obtenida se filtró usando cuatro capas de gasa, y el filtrado se centrifugó a 5000 xg durante 10 minutos a 4°C, en el rotor Sorvall superT21 (Dupont). El sobrenadante se separó y se centrifugó a 10,000 xg 15 minutos a 4°C en el rotor 60 Ti (Beckman). Por último el sobrenadante se centrifugó a 200,000 xg durante una hora a 4°C en rotor 60 Ti (Beckman), el sobrenadante obtenido se separó y almacenó a –80°C.

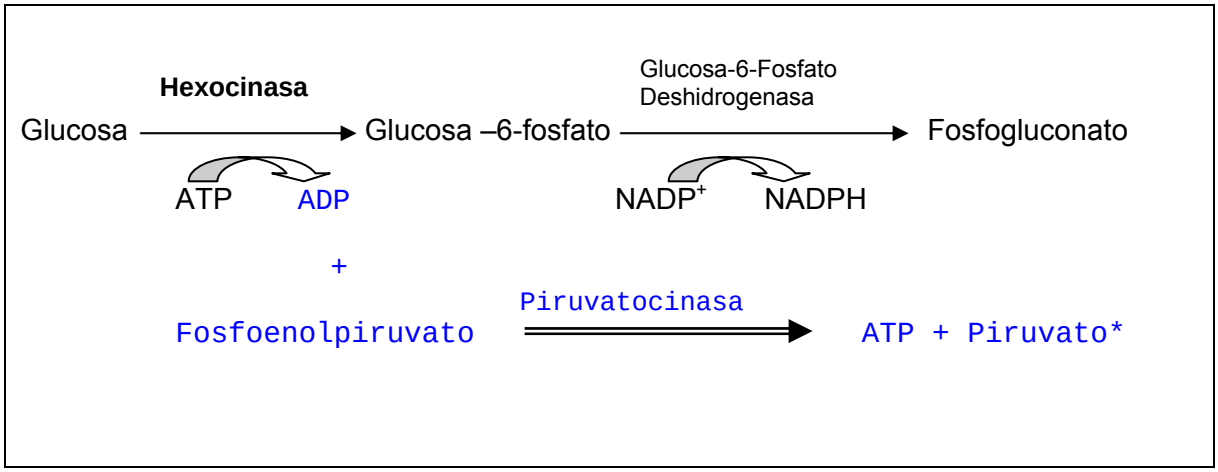
Se realizó un posterior enriquecimiento en la cantidad de hexocinasa al adicionar 50% (p/v) de sulfato de amonio a 10 mL del extracto anterior, posteriormente se centrifugó a 25,800 xg durante 15 minutos a 4°C en el rotor 60 Ti (Beckman), al sobrenadante obtenido se le añadió sulfato de amonio para alcanzar la concentración de 60% p/v y se centrifugó en las condiciones anteriores, el precipitado obtenido se resuspendió en 300 μL de amortiguador de resuspensión (HEPES 50mM, EDTA 1mM, DTT 2mM, PMSF 1mM y 10% de glicerol), y se centrifugó en una membrana de Amicon 4K, y se almacenó a –80°C hasta su uso (da-Silva *et al.,* 2001).

6.4. Determinación de la cantidad de proteína

Se realizó mediante el protocolo reportado por Ghosh *et al.* 1988 usando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar.

6.5. Medición de la actividad de hexocinasa.

El procedimiento que se siguió es el reportado por Dai *et al.* 1999. El ensayo de fosforilación de las hexosas es un ensayo acoplado donde se monitorea la formación de NADPH según la reacción:



Reacciones enzimáticas para determinar la actividad de la hexocinasa. La reacción se conduce a 37°C, con ATP 1mM y continuamente se registra la absorbencia a 340 nm. *Sistema regenerador de ATP.

El ensayo de actividad se realizó en 250 µl totales de medio de reacción. Se preparó la mezcla de reacción en el orden como se encuentran citados en la Tabla II excepto el $NADP^+$ y la enzima que se adicionaron al final. Una vez que se añade el $NADP^+$ y el extracto enzimático directamente sobre cada uno de los pozos de una microplaca de 96 pozos, se agitan 10 segundos y se registra la primera lectura de la absorbencia a 340 nm en un lector de microplacas modelo MCC/340 (Labsystems Multiskan), posteriormente se incuba la mezcla de reacción a 37ºC y se registra la lectura a 340 nm cada minuto por diez minutos.

Tabla II. Volúmenes empleados en la mezcla de reacción para medición de actividad de hexocinasa usando glucosa o fructosa como sustrato.

Reactivo	Solución madre (mM excepto los indicados)	Vol. adicionado (µL)	Concentración final (mM excepto los indicados)
HEPES / NaOH (N-2hidroxipiperazina) pH 7.06	500	15	30
$MgCl_2$	2460	0.203	2
EDTA	476	0.315	0.6
KCl	200	11.25	9
$NADP^+$	10	25	1
ATP	300	0.83	1
Fosfoenolpiruvato	33.3	15	2
Fosfoenolpiruvatocinasa	11.7 U/mL (sigma)	0.85	10 U
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	700 U/mL (Roche)	2.85	2 U
Fosfoglucosa isomerasa**	2500 U/mL (sigma)	0.5	3.5 U
Agua y extracto citosólico		Variable*	
Glucosa	50	15	3
Fructosa**	50	15	3

*El volumen del agua adicionado a la mezcla de reacción fue variable hasta ajustar 250 µL de volumen final, así como el volumen de extracto citosólico necesario para tener 20 µg de proteína en el medio.
**Solo cuando la actividad fue medida como fructocinasa se omitió la adición de glucosa y se añadió al medio fructosa, y fosfoglucosa isomerasa.

Cálculos:

Se realizó una curva de absorbencia contra tiempo (curva de 0 hasta 10min, con lecturas cada minuto) y de ella se obtuvo la pendiente (en unidades de absorbencia / min.), que posteriormente se empleo en el cálculo de la actividad expresado en µmol-$min^{-1}mg^{-1}$, según la siguiente ecuación:

$$\textbf{Actividad} = \frac{\textbf{[}(m) * \text{vol del extracto } (\mu L)\textbf{]}}{\textbf{[}(6.22 \text{mmol/ cm L}) * \text{concentración de proteína } (\mu g)\textbf{]}} \quad X\ 1000$$

Donde **m** es la pendiente, **6.22** corresponde al coeficiente de absortividad molar del NADPH y **1000** para obtener las unidades de µmol-$min^{-1}mg^{-1}$. Cada muestra se realizó al menos por duplicado y en tres diferentes lotes de plantas.

6.6. Obtención de la cinética de saturación por sustratos

6.6.1. Obtención de parámetros cinéticos.

Para obtener los parámetros cinéticos de la enzima en los extractos citosólicos de hojas y raíces control y sometidas a estrés, se midió la actividad de la enzima según se describió anteriormente pero variando las concentraciones de glucosa o fructosa de 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mM. Los valores de Km y Vmax se determinaron mediante el uso de los algoritmos en el programa Microcal Origin ver 4.0 de Microcal Software, Inc., Northampton MA, USA, así como también el análisis estadístico de los datos.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas de jitomate.

Se sometieron plantas de jitomate a déficit hídrico durante un período de 11 días evaluándose el efecto que induce en el crecimiento de la planta completa. El fenotipo de las plantas sometidas a estrés hídrico claramente se modificó después de los 7 días de tratamiento (Figura 5). La talla de las plantas fue menor en las plantas sometidas a estrés, así como el número de hojas por planta y su coloración cambio a verde opaco y en el envés de la hoja violáceo. Para documentar las observaciones del efecto del estrés hídrico en el fenotipo de la planta se midió el tallo de la planta, el número de hojas jóvenes y maduras, así como se tomaron los pesos de tallos, hojas y radículas.

Figura 5. Plantas de jitomate sometidas a estrés hídrico por diferentes tiempos. Se muestran plantas representativas de los lotes control (❍) y sometidos a estrés hídrico (⊘) por A) tres días, B) siete días, C) nueve días y D) once días.

El efecto de disminuir a 1/8 la CC fue la de retrasar el crecimiento de la planta, la longitud del tallo es 17% mayor en las plantas bien irrigadas que en las plantas sometidas a déficit hídrico a los 9 días del tratamiento, y continúa aumentando la diferencia, 21% a los 11 días de tratamiento (Figura 6A). En cuanto al número de hojas/planta este valor empieza a ser significativamente menor a los 7 días de iniciado el tratamiento de déficit hídrico, y en el día nueve se tiene la mayor diferencia, 59% menos hojas en las plantas sometidas a estrés que en las plantas control (Figura 6B).

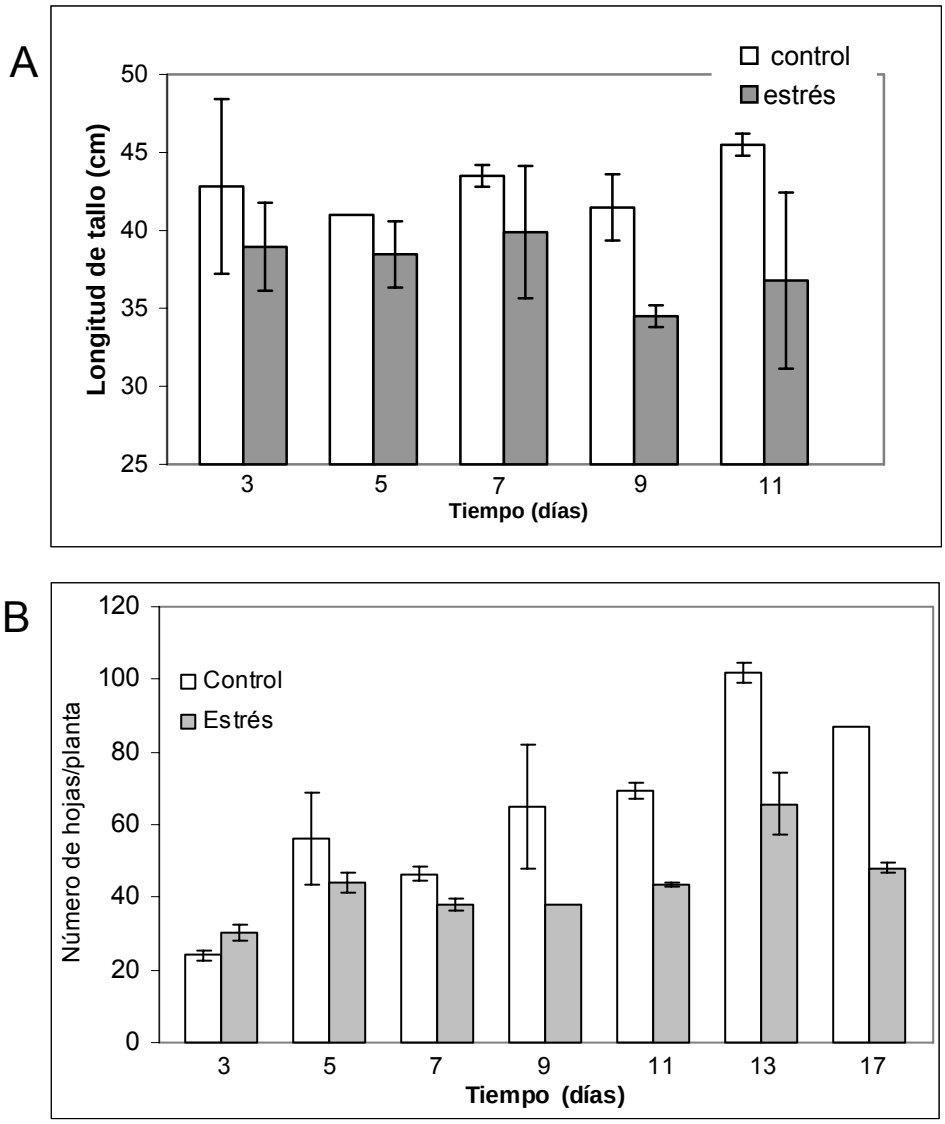


Figura 6. El efecto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas de jitomate. A) Longitud del tallo y B) número de hojas por planta. Se realizó para cada tiempo la determinación en 3 plantas en tres lotes distintos.

La reducción en el peso húmedo de las hojas maduras se observó hasta el día 9 de haber impuesto el déficit hídrico, con un decremento del 33% con respecto al grupo control (Figura 7A). El peso húmedo de las hojas jóvenes de las plantas sometidas al déficit hídrico fue 33% menor al peso de las hojas control, sin embargo este valor se obtiene cuatro días antes que en las hojas maduras (Figura 7B). Por otra parte, tanto el peso de los tallos y las raíces de las plantas sometidas a estrés hídrico disminuyó a los 9 días del tratamiento del déficit hídrico, 44.5 y 56% respectivamente con respecto a esos tejido en las plantas control (Figura 7C y 7D).

7.2. Medición de los cambios en la conductancia estomática durante el periodo de déficit hídrico.

Uno de los efectos conocidos del déficit hídrico es la disminución en la apertura estomatal, por lo que medimos mediante un porómetro la conductancia estomatal, la transpiración y el contenido de humedad que circunda a la hoja. La determinación se realizó en la quinta rama de las hojas maduras y sobre la primera hoja, siempre la misma durante todo el tiempo que duró el déficit hídrico.
Desafortunadamente el aparato que teníamos disponible presentaba un diámetro de la cámara de medición de aproximadamente 2 cm, por lo que se realizaron las determinaciones de conductancia estomatal a partir del quinto día de haber iniciado el tratamiento de estrés. Al quinto día encontramos una disminución de 3.5 veces en la conductancia estomatal de las hojas de las plantas estrés, diferencia que se mantuvo a lo largo de los 11 días de tratamiento de déficit hídrico (Figura 8A).
Una consecuencia conocida del cierre estomatal es la disminución en la tasa de transpiración de la planta (Bonhert et al. 1995; Liang et al., 2002), misma que se detectó en nuestro experimento, con una reducción de 2.7 veces a los 5 días de tratamiento, pero la máxima diferencia se observó al día nueve, 7.6 veces con respecto a las plantas control (Figura 8B). De manera paralela se encontró que la humedad relativa que circunda a la hoja es menor en las plantas con déficit hídrico

y con una tendencia a disminuir conforme avanza el tiempo de restricción del agua de riego (Figura 8C).

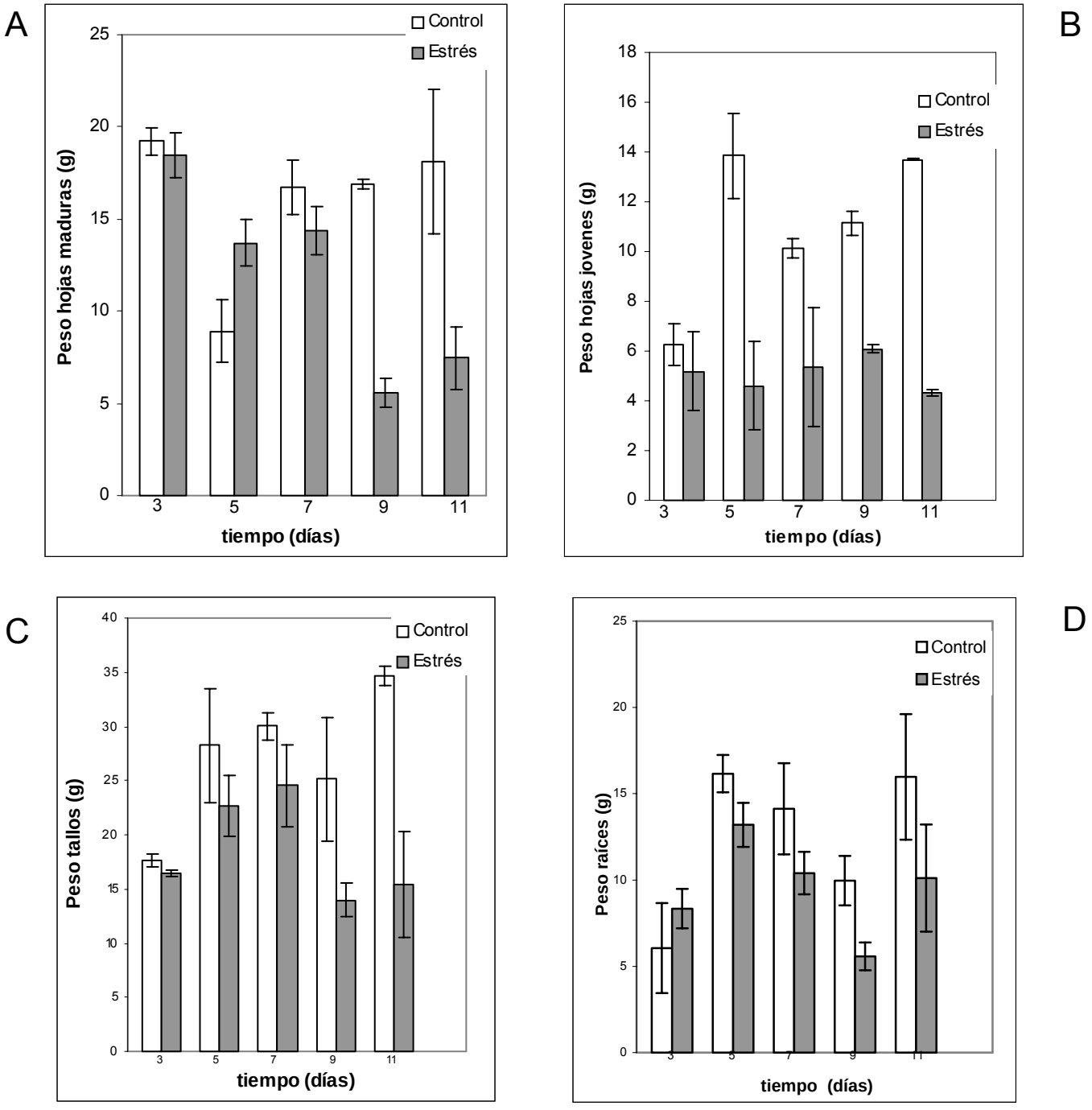


Figura 7. Curso temporal del efecto del déficit hídrico en el contenido de humedad de diferentes partes de las plantas de jitomate. A) hojas maduras, B) hojas jóvenes, C) tallos y D) raíces. Se realizó para cada tiempo la determinación en 3 plantas en cada uno de los tres lotes examinados.

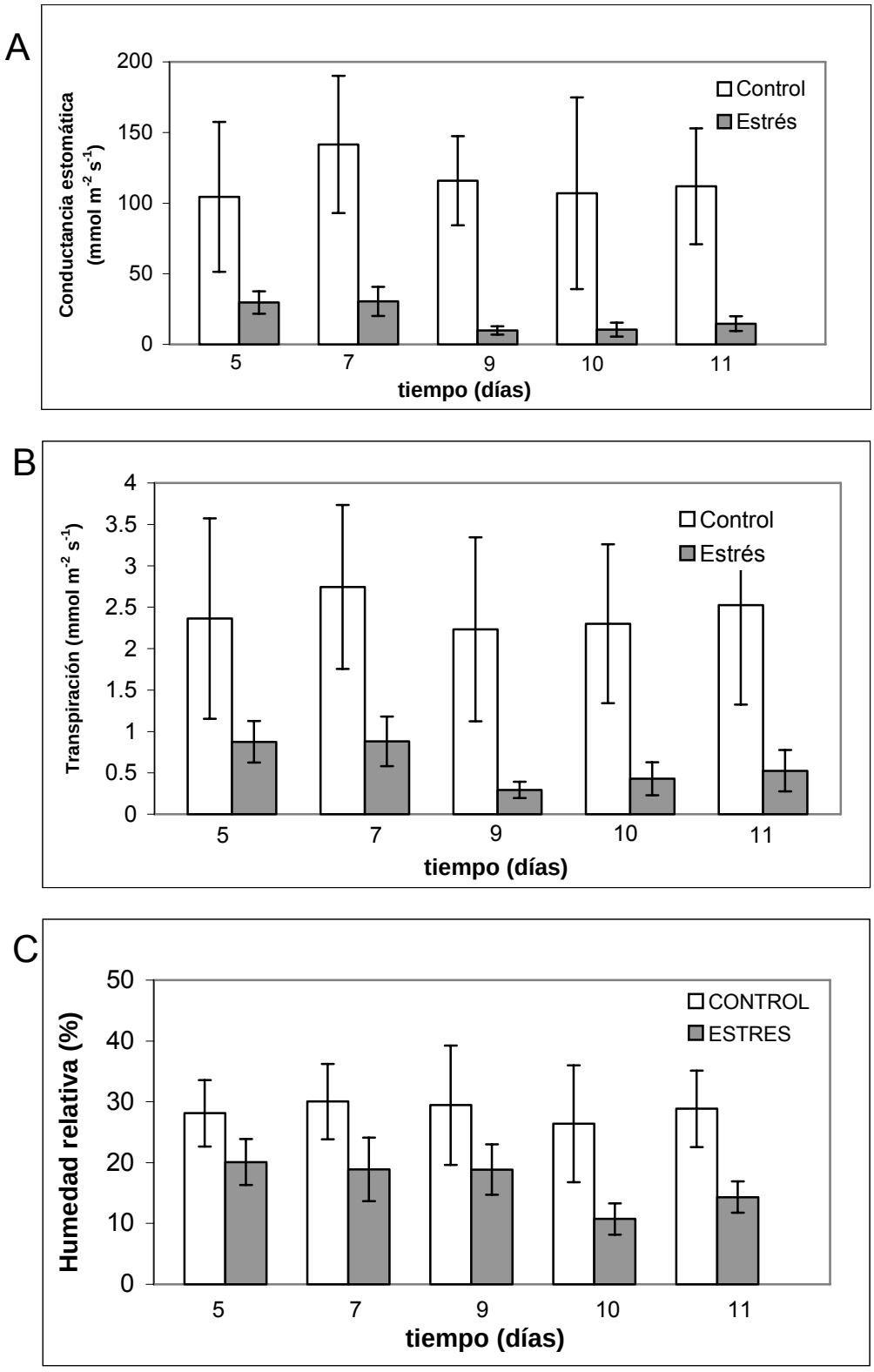


Figura 8. Efecto del estrés hídrico en los parámetros fisiológicos de las plantas. A) conductancia estomatal, B) transpiración y C) humedad relativa de la hoja.

El conjunto de estos resultados coincide en que el tratamiento de reducir la cantidad del agua de riego a 1/8 de la CC, produce los efectos conocidos del déficit hídrico. Considerando que el objetivo del presente trabajo es medir la actividad de las hexocinasas cuando el ajuste inicial a la condición de estrés se realiza, decidimos colectar los tejidos entre las 0 y 9 días de tratamiento y no en tiempos posteriores, en donde los mecanismos de adaptación a una situación sostenida de estrés pudieran ya estarse llevando a cabo.

7.3. Efecto del déficit hídrico sobre la actividad de las hexocinasas citosólicas.

La disminución en la apertura estomatal que lleva a la reducción en la pérdida de agua por la planta, conduce también a la disminución en la concentración de CO_2 en las hojas del mesófilo, y esto generalmente lleva a alteraciones en el reparto de carbono durante el estrés por agua. Se ha reportado que los carbohidratos y otros metabolitos como la prolina se acumulan en las plantas durante la sequía (Bray, 2001). En nuestro laboratorio se ha encontrado que se acumulan tanto la glucosa, la sacarosa como el almidón a partir del tercer día de haber sometido las plantas a estrés hídrico por lo que evaluamos el efecto que producía el estrés hídrico a nivel bioquímico y en particular en una enzima importante, la hexocinasa, ya que está enzima sabemos está involucrada en la formación de un metabolito clave que conduce a varias vías metabólicas, la G6P, y segundo porque ha sido involucrada como una enzima participante en el mecanismo de transducción de señales por carbohidratos. Así que exploramos si la actividad de la enzima cambiaba durante el estrés y si esto tenía alguna relación con los contenidos de carbohidratos.

Las curvas temporales de la actividad de las hexocinasas se midieron usando dos diferentes sustratos, glucosa y fructosa. La determinación se realizó de manera comparativa en un tejido fuente de carbohidratos, las hojas maduras y en un tejido que la demanda, como son las raíces.

Durante el tiempo de restricción del agua de riego se observó que las hojas maduras presentaron una actividad máxima de hexocinasa al día tres del tratamiento medida con glucosa como sustrato, la cual representaba 2.8 veces el valor del control; días posteriores al tres la actividad fue mayor con respecto a las hojas maduras de plantas no estresadas, sin embargo, la diferencia con las control fue de 1.32 veces para el día 5 y de 2.5 veces para el día 7, contrario a lo que se observó al día 9 en el que la actividad de la hexocinasa fue 16.7 veces menor (Figura 9A).

En el caso de las raíces la curva temporal de actividad de hexocinasa usando glucosa como sustrato tanto para las plantas control como para las que se sometieron a déficit hídrico no fueron distintas. (Figura 9B). Con el fin de visualizar mejor los cambios en actividad entre los tejidos de las plantas control y las sometidas a estrés hídrico se calculó el efecto del estrés hídrico sobre la actividad de la hexocinasa, se obtuvo la relación de la actividad del tejido afectado en relación al tejido control (Fig. 9C), mostrando claramente que en las hojas la proporción se incrementa a partir del día 3, mientras que en las raíces el índice permanece por debajo de 1.

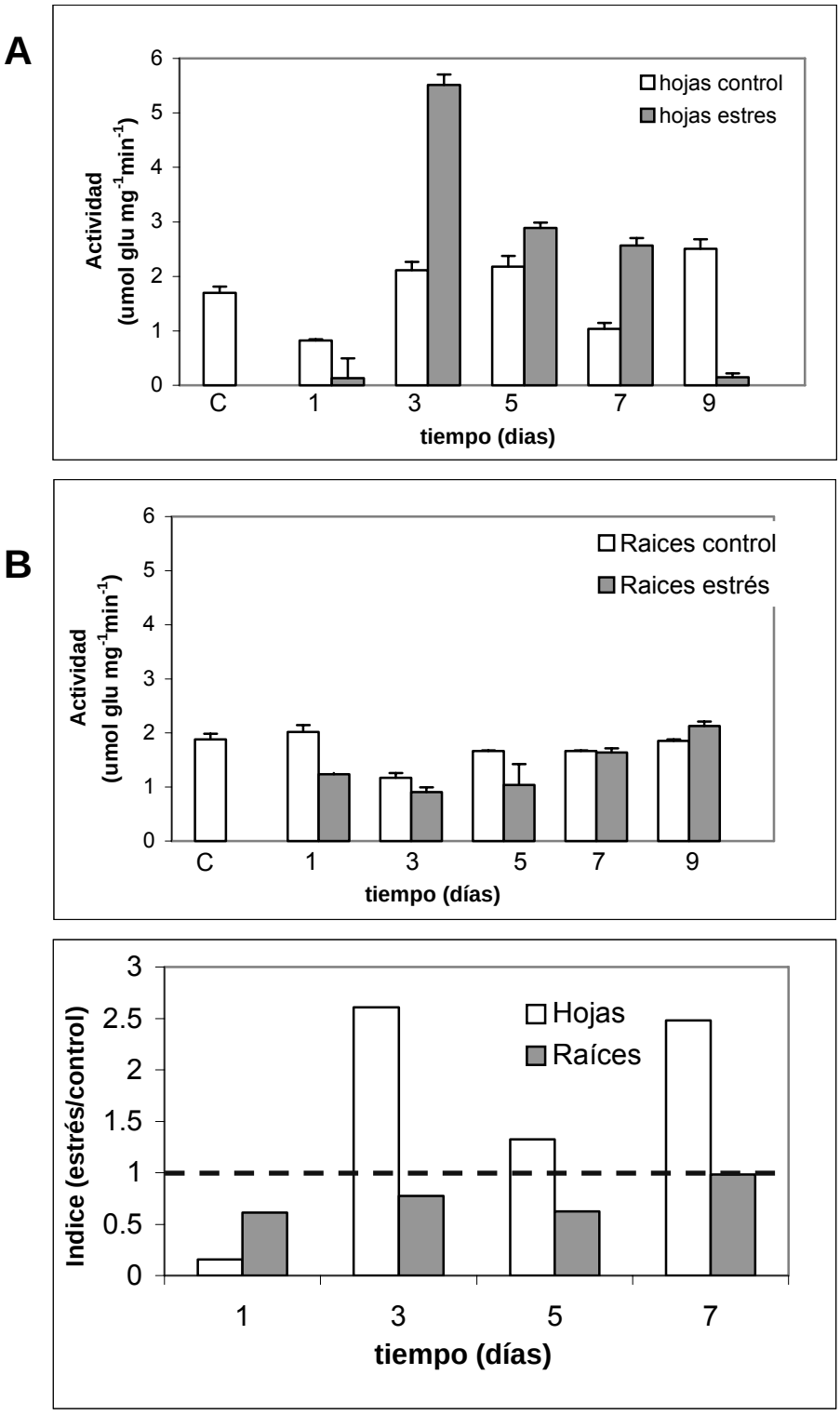


Figura 9. Actividad de hexocinasa cuando se le añadió glucosa como sustrato en hojas maduras y raíces de jitomate sometidas a estrés hídrico. A) Actividad en las hojas; B) actividad de las raíces y C) comparación de los índices de actividad de la hexocinasa de plantas en estrés y control para las raíces y las hojas.

Al medir la actividad del extracto citosólico utilizando la fructosa como sustrato se encontró que nuevamente al día 3 hubo un máximo de actividad de hexocinasa en las hojas de las plantas sometidas al estrés hídrico, una reducción al día 5 y un nuevo incremento al día 7 (Figura 10A). Mientras que en las raíces no hubo diferencias significativa entre la actividad de la enzima de las plantas afectadas por el estrés hídrico y los controles, en todos los tiempos estudiados (Figura 10 B).

Lo anterior se observó claramente en la gráfica comparativa de los índices de la actividad de hexocinasa, usando fructosa como sustrato, de los tejidos control entre la actividad de los tejidos sometidos a estrés, mostrando que en los días 5 y 7 hubo un aumento discreto en la actividad de la hexocinasa en las hojas de las plantas estresadas, ya que el índice fue mayor a 1 y que en las raíces no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las estresadas (Figura 10C).

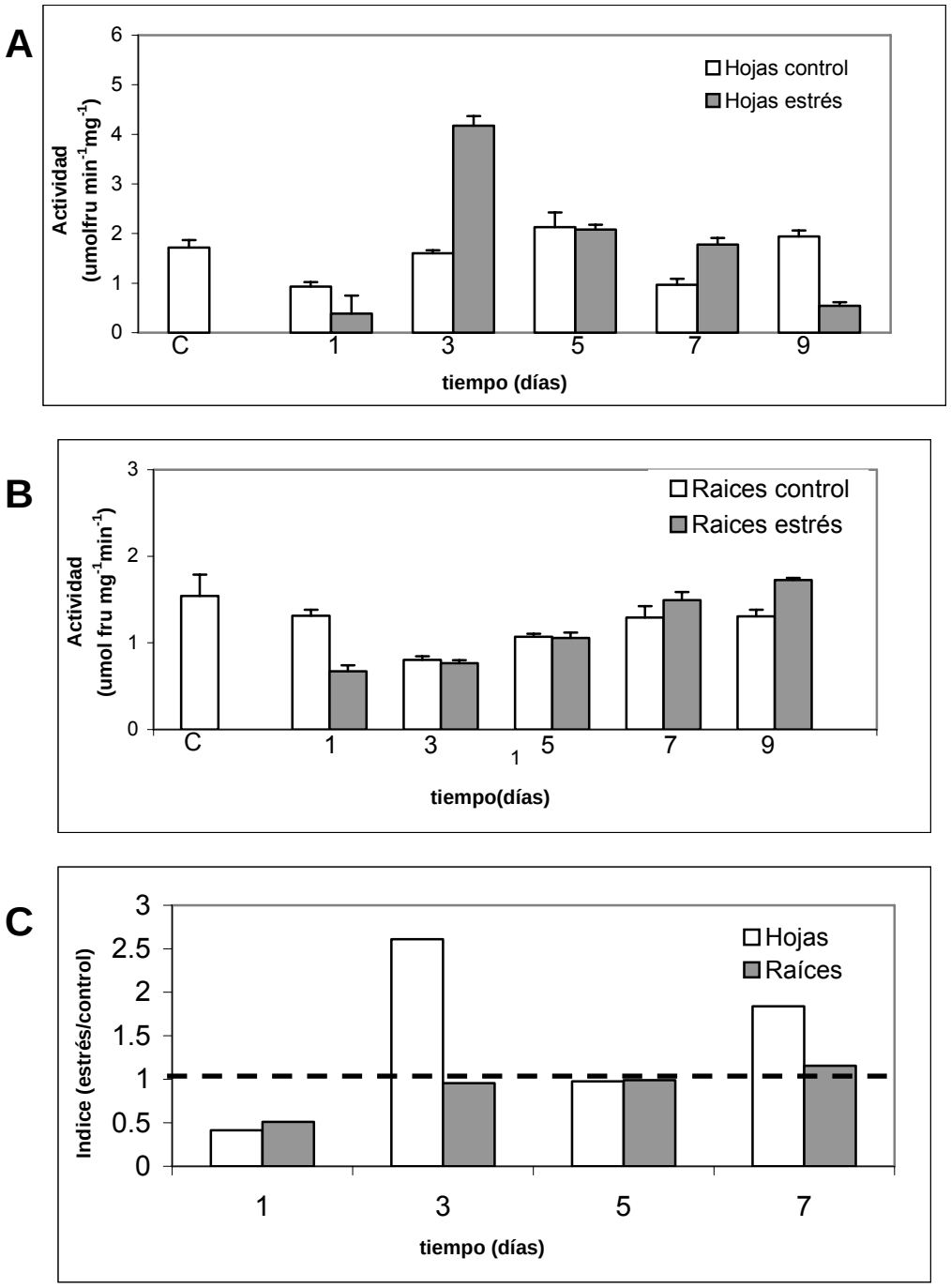


Figura 10. Actividad de la hexocinasa de hojas maduras y raíces de jitomate control y sometidas a estrés hídrico cuando se le añadió fructosa como sustrato. A) Actividad en hojas. B) Actividad en raíces y C) comparación de los índices de actividad de la hexocinasa de plantas en estrés y control para las raíces y las hojas.

7.4. Comparación de las constantes cinéticas de las hexocinasas citosólicas de hojas y raíces de plantas que fueron sometidas a estrés hídrico.

Debido a que observamos aumentos en las actividades de las hexocinasas en las hojas de plantas sometidas a estrés hídrico, actividad medida tanto con glucosa como con fructosa, entonces decidimos determinar las características cinéticas de la actividad de hexocinasa usando los dos sustratos anteriormente determinados y comparar si la Km o Vmax había cambiado por efecto del déficit hídrico. Aún cuando no encontramos cambio en la actividad de la enzima en las raíces, determinamos también la actividad de las hexocinasas en este tejido con el fin de comparar los resultados con los de las hojas.

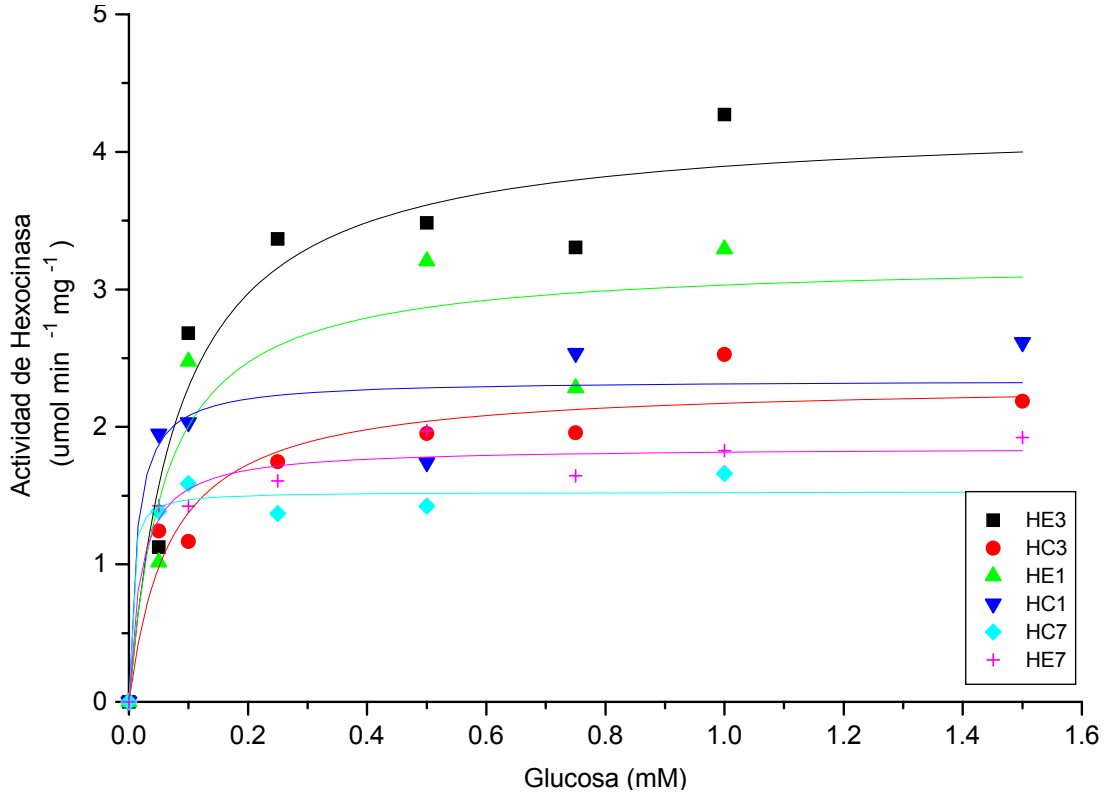


Figura 11. Curvas de saturación de hexocinasa de extractos citosólicos obtenidos de las hojas maduras de las plantas sometidas a estrés hídrico y en las plantas control, usando glucosa como sustrato. HC es hoja proveniente de plantas control o riego suficiente y HE hoja proveniente de plantas sometidas a estrés hídrico. La gráfica es representativa de tres extractos diferentes y cada punto es producto de una curva temporal de actividad, realizada con 10 puntos distintos. No se muestran las desviaciones estándar para visualizar las tendencias de las 6 curvas, pero ésta no fue mayor al 10%.

Las curvas de saturación de la actividad de hexocinasa de las hojas maduras usando glucosa como sustrato se muestran en la Figura 11. Se observa que la forma de las curvas cambio dependiendo del tiempo de tratamiento. A partir de éstas curvas se obtuvieron los valores de Km y Vmax, considerándose que la curva se ajustaba a un modelo tipo Michaelis-Menten, esto es a una hipérbola cuadrática, los valores obtenidos de este análisis se encuentran en la Tabla III.

Tabla III. Parámetros cinéticos de las hexocinasas de extractos citosólicos de hojas maduras, cinéticos obtenidos al usar glucosa como sustrato.

Tiempo (días)	Hojas Control			Hojas Estrés		
	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax
1	$12.5 \pm 1x10^{-3}$	$2.34 \pm 2x10^{-2}$	5.34	$60.4 \pm 3x10^{-3}$	$3.21 \pm 4x10^{-2}$	18.8
3	$70.0 \pm 2x10^{-3}$	$2.32 \pm 1x10^{-2}$	30.2	$84.6 \pm 3x10^{-3}$	$4.22 \pm 3x10^{-2}$	20.0
7	$4.0 \pm 6x10^{-4}$	$1.53 \pm 8x10^{-3}$	2.6	$20.0 \pm 7x10^{-4}$	$1.85 \pm 7x10^{-3}$	10.8

Al comparar los valores de Vmax entre las hojas de las plantas control a los 1, 3 y 7 días se observa que la actividad disminuye al día siete, este patrón de actividad fue similar a lo que ya habíamos observado anteriormente (Figura 9A), cuando se determinó la actividad usando 3mM de glucosa. En cuanto a los valores de Km encontramos que está es distinta entre los diferentes estadios del desarrollo, presentándose la Km más baja al día 7.

En las hojas de las plantas que fueron sometidas a estrés hídrico los valores de Vmax fueron más altos que los determinados para las hojas de las plantas control a cada uno de los tiempos determinados, anteriormente no habíamos observado diferencias al día 1 entre las plantas control y estrés al medirla a 3mM de glucosa (Figura 9A y Tabla III).

Otra diferencia importante es que en el día 1 hubo un cambio en la Km para la glucosa de las hojas sometidas a estrés hídrico, el valor de 60.4 μmol glucosa que es 4.8 veces mayor que en las hojas control, sin embargo es similar al que se encontró al día 3 en las hojas control, la pérdida de afinidad por glucosa a este tiempo podría deberse a que aumento el contenido de la glucosa, sin embargo datos de Ramírez-Palma (2007) no muestran un aumento importante de 0.0103 mmolGlu/g peso fresco en las hojas control a 0.0132 mmolGlu/g peso fresco de las hojas estrés. La relación de Km/Vmax es muy cercana entre el día 1 y 3 de las hojas estrés, es entonces probable que la aparición de la isoforma que normalmente (hojas control) se encontraba a los 3 días ahora aparece antes, día 1 en las plantas estrés y que aún podría mantenerse al día 7, aún cuando disminuyó el valor de Km/Vmax en 1.85 veces.

Cuando se midió la actividad de la hexocinasa usando como sustrato la fructosa se obtuvieron las curvas que se muestran en la Figura 12. Se observó que la forma y la magnitud de las actividades al día 1 fueron similares entre las plantas control y las sometidas a estrés hídrico, sin embargo, tanto las curvas del día 3 y 7 no sólo presentaron actividades más altas en las hojas sometidas a estrés sino que la forma de la curvas fueron distintas.

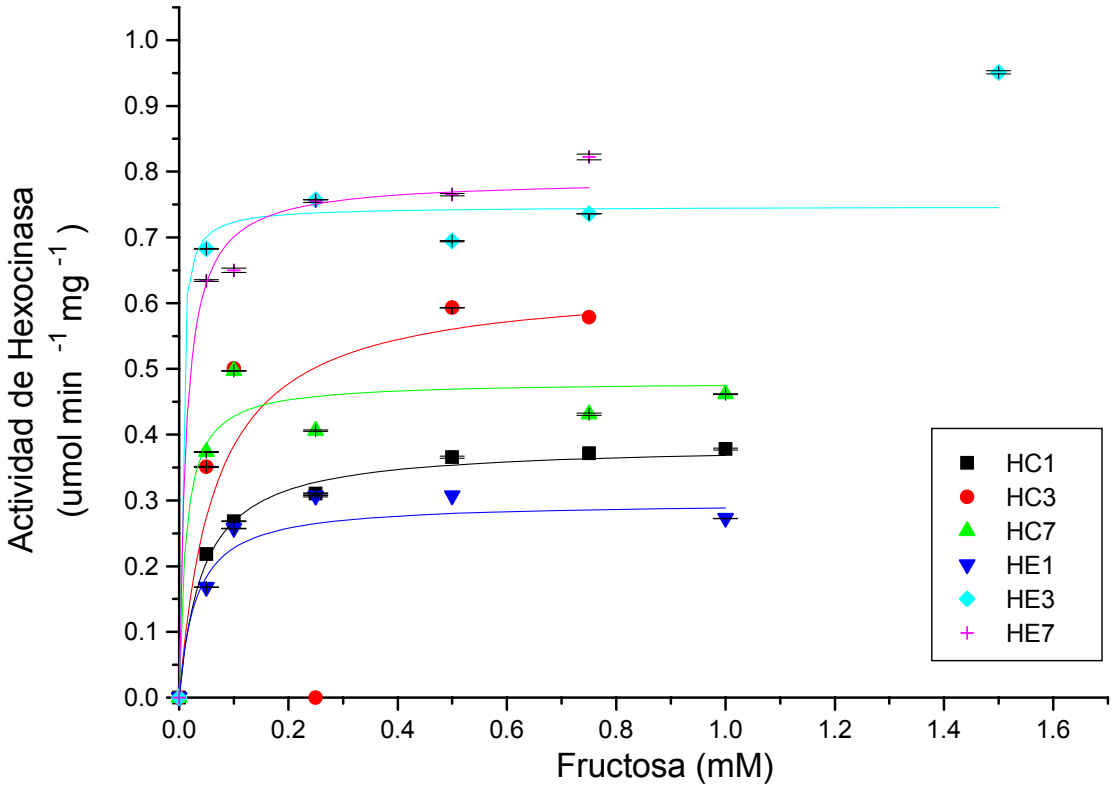


Figura 12. Curvas de saturación de la actividad de hexocinasa de extractos citosólicos de hojas maduras usando como sustrato fructosa. HC es hoja proveniente de planta control o riego suficiente y HE hoja proveniente de planta sometida a estrés hídrico. La gráfica es la representativa de tres extractos diferentes y cada punto es producto de una curva temporal de actividad, realizada con 10 puntos distintos.

Para comparar mejor las actividades de hexocinasa cuando se utilizó la fructosa como sustrato entre las hojas de plantas control y de las sometidas a déficit hídrico obtuvimos los valores de Km y Vmax de las curvas de la Figura 12 y se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Constantes cinéticas de la actividad de la hexocinasa de extractos citosólicos de hojas maduras usando como sustrato fructosa de plantas a riego suficiente, (plantas control) y de plantas sometidas a déficit hídrico, (plantas estrés.)

Tiempo (días)	Hojas Control			Hojas Estrés		
	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax
1	43.5 ± 5x10^{-4}	0.39 ± 9x10^{-4}	111.54	30.7 ± 1x10^{-5}	0.29 ± 3x10^{-4}	105.86
3	65.6 ± 3x10^{-4}	0.63 ± 3x10^{-4}	104.1	3.3 ± 4x10^{-5}	0.74 ± 2x10^{-4}	4.45
7	12.35 ± 8x10^{-5}	0.48 ± 4x10^{-4}	25.73	12.6 ± 1x10^{-5}	0.78 ± 2x10^{-3}	16.15

Las Vmax determinadas para las hexocinasas en hojas control describe un patrón variable. A los días 1 y 7 la actividad fue baja, mientras que a los 3 días la actividad fue alta (Tabla IV). Sin embargo, los niveles de actividad fueron similares a los que se encontraron en la Figura 10A. Al comparar los valores de Vmax de las hojas control con los de las hojas provenientes de plantas sometidas a déficit hídrico, detectamos un aumento a los 3 y 7 días en las hojas estrés, similar a cuando se determinó la actividad usando 3mM de fructosa (Figura 10A), pero observamos que la magnitud del aumento fue menor en esta ocasión. Adicionalmente, la Km para fructosa fue 10 veces menor entre el día 1 y el día 3 para las hojas en estrés, y de 19.7 veces menor que comparada con el día 3 de las hojas control, la mayor afinidad por la fructosa es la que hace la diferencia entre la actividad detectada al día 3 entre las plantas estrés y las control, llevando a una disminución del valor de Km/Vmax de 25 veces en las plantas estrés.

Resumiendo, de los datos de las Tablas III y IV, encontramos que las hexocinasas que usan a glucosa como sustrato al día 3 presentaron tanto un aumento en la Vmax de 1.82 veces como en la Km 1.21 veces, mientras que las que usan como sustrato fructosa disminuyen el valor de la Km en 20 veces.

En cuanto a las raíces se determinaron las curvas de saturación de la hexocinasa para glucosa, a los días 1, 3 y 7 de estrés. La Figura 13 muestra que la magnitud y

forma de las curvas son muy similares entre sí. La actividad parece ser similar a la determinada cuando usamos 3mM de glucosa, para determinar si existía alguna diferencia en sus propiedades bioquímicas, se obtuvieron los valores de Km y Vmax de las curvas en la Figura 13.

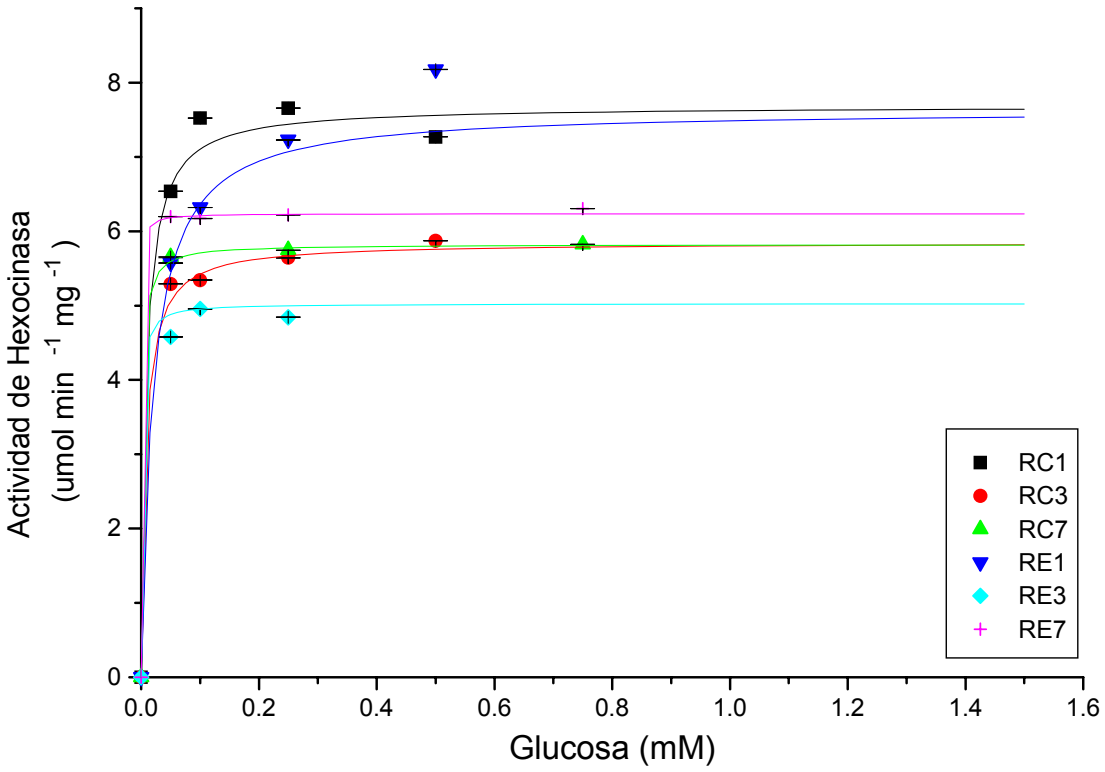


Figura 13. Curvas de saturación de la actividad de la hexocinasa de extractos citosólicos de las raíces empleando glucosa como sustrato. La gráfica es la representativa de tres extractos diferentes y cada punto es producto de una curva temporal de actividad, realizada con 10 puntos distintos.

En la Tabla V se observa que al comparar las Vmax de la hexocinasa usando como sustrato glucosa, fueron similares entre el mismo día del tratamiento para las raíces estrés y las control, dato que corrobora el previamente obtenido (Figura 9B). Sin embargo, aún cuando las Vmax no cambiaron los valores de Km sí difieren, al día 1 y 3 los valores fueron del doble en las raíces de las plantas estresadas en comparación con las plantas controles y cuatro veces menores al día 7. Lo anterior lleva a que el valor de Km/Vmax sea en los tres tiempos examinados diferentes a los de la hexocinasa control.

Tabla V. Constantes cinéticas de de la actividad de la hexocinasa de extractos citosólicos de raíces usando como sustrato glucosa de plantas a riego suficiente (plantas control) y de las plantas sometidas a déficit hídrico.(plantas estrés).

Tiempo (días)	Raíces Control			Raíces Estrés		
	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax
1	8.2 ± 2x10^{-5}	7.7 ± 1x10^{-3}	1.07	20.02 ± 1x10^{-5}	7.63 ± 8x10^{-4}	2.65
3	7.8 ± 3x10^{-5}	5.8 ± 2x10^{-3}	1.34	15.0 ± 4x10^{-5}	5.03 ± 2x10^{-3}	2.99
7	2.1 ± 7x10^{-5}	5.8 ± 2x10^{-3}	0.36	0.5 ± 1x10^{-5}	6.23 ± 6x10^{-4}	0.08

La determinación de la actividad de la hexocinasa en las raíces usando diferentes concentraciones de fructosa presentó un patrón de actividad muy diferente al mostrado cuando se usó glucosa como sustrato (Figura 13), en el sentido de que las actividades fueron mayores y que el aumento en la actividad de la enzima fue gradual (Figura 14).

En la determinación de actividad de hexocinasa, usando fructosa 3 mM en la Figura 10B, habíamos encontrado que las raíces no presentaban diferencias significativa en la actividad, sin embargo, si comparamos las Vmax (Tabla VI) de las raíces de las plantas control y las provenientes de las plantas con déficit hídrico encontramos que sólo al día 1 las raíces de las plantas con déficit hídrico hubo cambio y fue una disminución del 70%. Adicionalmente, encontramos que a todos los tiempos determinados hubo modificación en el valor de la Km, al día uno fue 3.9 veces mayor, al día 3 fue 11 veces menor y al día 7 fue 9.3 veces mayor para las plantas estresadas. Estos valores mostraron que durante el estrés la actividad fosforilante para fructosa se encuentra alterada, debido a que los valores de Km están en el intervalo micromolar es posible que la enzima sea una fructocinasa.

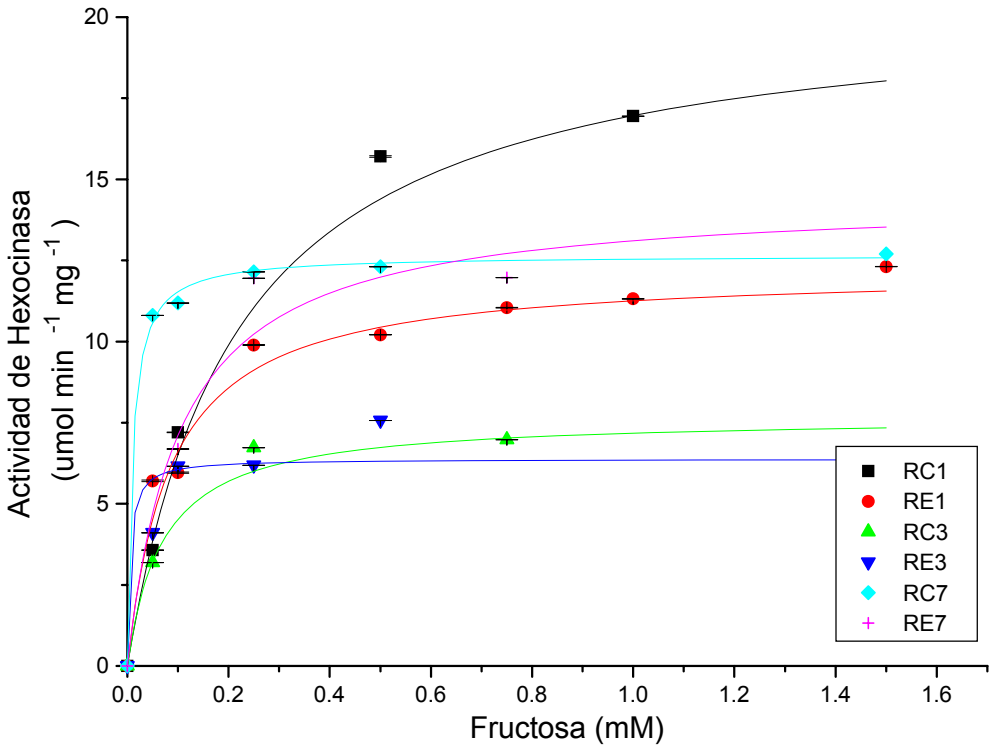


Figura 14. Curvas de saturación de la actividad de hexocinasa de extractos citosólicos de las raíces usando fructosa como sustrato. La gráfica es la representativa de tres extractos diferentes y cada punto es producto de una curva temporal de actividad, realizada con 10 puntos distintos.

Tabla VI. Constantes cinéticas de las hexocinasas de extractos citosólicos de raíces usando como sustrato fructosa.

Tiempo (días)	Raíces Control			Raíces Estrés		
	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax	Km (μmol)	Vmax (μmolmin^{-1} mg^{-1})	Km/Vmax
1	21.8 ± 4x10^{-4}	20.66 ± 9x10^{-3}	1.05	84.6 ± 3x10^{-4}	12.21 ± 6x10^{-3}	6.93
3	69.8 ± 4x10^{-5}	7.67 ± 1x10^{-3}	9.1	5.3 ± 3x10^{-6}	6.37 ± 1x10^{-4}	0.83
7	9.8 ± 1x10^{-5}	12.66 ± 6x10^{-4}	0.77	103.5 ± 5x10^{-4}	14.5 ± 14x10^{-3}	7.14

En resumen a pesar de que no encontramos diferencias en las actividades de las hexocinasas en las raíces usando glucosa o fructosa como sustrato, la Km si varió en los tres tiempos examinados por lo que es probable que este cambio en Km sea debido a la expresión de isoformas de la hexocinasa.

8. DISCUSIÓN

8.1. Efectos morfológicos y fisiológicos del estrés hídrico en las plantas de jitomate

Las plantas viven en ambientes variables a los cuales deben de aclimatarse durante su crecimiento y desarrollo. El crecimiento de las plantas es habitualmente limitado por la deficiencia en agua y típicamente la parte aérea se afecta mayormente que las raíces, las que generalmente continúan creciendo (Davies y Zhang, 1991, Hsiao y Xu, 2000). En este trabajo se propició estrés hídrico en las plantas de jitomate que tenían 81 días de crecimiento, y como otras plantas éstas presentaron una reducción en la talla, y el número de hojas maduras no se incrementó, mientras que las raíces continuaron su crecimiento, siendo más delgadas (datos no mostrados). Sin embargo, el peso total de las raíces provenientes de plantas control respecto a las provenientes de plantas sometidas a déficit hídrico no se alteró.

En plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés hídrico el diámetro de la raíz es menor que en plantas control (van der Weele *et al.,* 2000). No obstante, que la raíz primaria continúa creciendo, contrario a lo que se observó con las raíces del jitomate ya que las raíces secundarias fueron las que incrementaron su crecimiento deteniendo el de la raíz primaria, pero está última característica es más común que ocurra durante el estrés por agua (Hsiao y Xu, 2000; Pelleschi *et al.,* 1997; Spollen *et al.,* 1993). Una explicación al crecimiento en la región apical de las raíces a bajos potenciales de agua es el incremento en los factores que intervienen en la extensión de la pared celular, como por ejemplo, la mayor expresión de las expansinas (Wu *et al.*, 1996). Otra de las posibilidades que se han planteado en la literatura es que la raíz es capaz de ajustarse osmóticamente en un tiempo menor que las hojas (Hsiao y Xu, 2000).

Adicionalmente, el ABA reduce el crecimiento del tallo y de las hojas cuando se acumula por algún tipo de estrés, pero induce el crecimiento de las raíces, es probable que gracias a la acción antagonista con etileno (Sharp *et al*., 2000).

Durante el estrés, la estructura de la hoja se modifica considerablemente y usualmente llegan a tamaños finales menores y una estructura citológica alterada en comparación con los controles (Davies y Zhang, 1991). En las hojas del jitomate el estrés hídrico no permitió la producción de más hojas maduras, sin embargo, es probable que las hojas jóvenes adelantaran su transición de hoja joven a madura para contender con el estrés. Consideramos como jóvenes, hojas por arriba de la quinta rama de la planta que en general llegaron a un tamaño de 4.8 cm, mientras que las hojas que consideramos maduras por debajo de la quinta rama alcanzaron tamaños entre 8.5 a 9.5 cm, es probable entonces que las hojas jóvenes experimentaran el cambio a hoja madura antes de lo programado. En hojas de ricino se encontró que las hojas jóvenes de plantas sometidas a estrés alcanzan su madurez 2 a 3 días antes que las hojas provenientes de plantas bien irrigadas. Esto fue medido como densidad y madurez estomatal, con tamaños de alrededor de 5 a 8 cm, en comparación con las hojas maduras de plantas control que alcanzan su madurez entre los 8 a 12 cm de longitud (Schurr *et al.,* 2000).

La transición de hoja joven a madura bajo condiciones ambientales adversas es factible, ya que aún cuando la hoja no está completamente capacitada para ser tejido fuente de nutrimentos, se hace necesario desarrollar esta función debido a que la capacidad fotosintética de las hojas maduras se ha reducido. El decremento en la fijación de CO_2 en las hojas maduras se debe a que para reducir los estragos de la deficiente captación de agua por las raíces se cierran parcialmente los estomas, disminuye entonces la pérdida de agua por transpiración pero también la capacidad de tomar CO_2 del ambiente (Liang *et al.,* 2002: Sobeih *et al.,* 2004). La disminución de la conductancia en las hojas de jitomate por el tratamiento de estrés hídrico fue de 3.5 veces y se reflejó en una disminución de 2.7 hasta 7.6 veces en la transpiración de las hojas. Por lo que es factible que las hojas jóvenes

tuvieran la capacidad de cambiar a hoja madura antes de lo que el programa de desarrollo dictaba.

Adicionalmente en la superficie abaxial de las hojas cambió la coloración de la hoja de verde brillante a opaco y en la cara adaxial a color púrpura, estos cambios en coloración no son exclusivos del estrés hídrico sino de otros tipos de estrés de tipo abiótico. Sin embargo, aún no se ha encontrado una función clara de la expresión de las antocianinas durante el estrés hídrico, se ha planteado por lo ecólogos que disminuye el ataque por herbívoros, mientras los fisiólogos prefieren la hipótesis de función foto-protectora, ya que perturba la excitación de la clorofila y la capacidad de toma de electrones, o bien como osmoprotector o antioxidante (Kytridis y Manetas, 2006). No obstante, su función, se conoce que ABA se acumula durante el estrés hídrico (Bray, 2001), y está asociada con la expresión aumentada de está vía, debido a que el gene que codifica para un factor de transcripción denominado MYB, presenta dos motivos, una caja SpH y una secuencia GTGTC que se sabe son regulados por esta fitohormona (Shinozaki y Shinozaki, 1997).

El crecimiento de hojas y raíces debe estar coordinado, esto es sus tamaños relativos deben variar de manera dinámica en respuesta a las condiciones del ambiente, de forma que puedan optimizar la utilización de asimilados que vienen ya sea del CO_2 atmosférico, o de los que se encuentran presentes en la vecindad de la raíz o de otros tejidos (por ejemplo las hojas senescentes) (Rontein *et al.,* 2002). Así se conoce que durante el estrés hídrico, la planta experimenta cambios en la denominada relación fuente-demanda, es decir la distribución de fotosintatos se modifica y es la raíz la que se convierte en un tejido fuertemente demandante, lo que implica una alteración en la distribución del carbono y el nitrógeno en la planta (Roitsch, 1999). Se sugiere que la raíz no debe detener su crecimiento ya que se encuentra en busca de agua en el suelo.

No obstante la reducción en la fijación de CO_2 por el cierre parcial de los estomas, deben establecerse mecanismos que favorezcan la acumulación de los compuestos osmoprotectores como la sacarosa, la rafinosa u otros polioles necesarios para sustituir los puentes de hidrógeno que habitualmente se establecían con el agua. También hay proteínas que presentan particularmente este papel osmótico, por lo que la alteración en el metabolismo debe ocurrir (Bohnert *et al.,* 1995; Bray, 1993, 2001). En hojas se ha encontrado que el estrés hídrico lleva a una acumulación de hexosas y/o sacarosa, no solo para contender con los cambios osmóticos que propició la disminución del agua en el suelo, sino también para que los tejidos demandantes continúen recibiendo su dosis de esqueletos carbonados y continúen creciendo. En un estudio paralelo a éste se detectó que existía una acumulación de fructosa y sacarosa desde los 3 y hasta los 11 días de tratamiento de estrés en las hojas, mientras que en las raíces se acumulan la glucosa, la fructosa y el almidón. En granos de maíz en desarrollo se encontró que la actividad de las invertasas ácidas soluble e insoluble disminuyen por estrés hídrico, lo que lleva a un aumento en la concentración de sacarosa en la hoja y a una disminución en el contenido de almidón (Zinselmeier *et al.,* 1999). En contraste, en hojas de maíz (Pelleschi *et al.,*1997) ocurre acumulación de hexosas e inducción de la invertasa vacuolar.

Resumiendo los cambios que el estrés hídrico provoca lleva a modificaciones fisiológicas importantes como la reducción de la fotosíntesis, la regulación transcripcional y postranscripcional de varios genes, el recambio de proteínas y la síntesis de osmolitos. En el protocolo de estrés hídrico que se desarrolló para las plantas de jitomate, observamos características típicas de estrés por agua, tanto morfológicamente como fisiológicamente.

8.2. Cambios en la actividad de las hexocinasas durante el estrés hídrico. I Hexocinasas que usan glucosa como sustrato.

La sacarosa es el producto final de la fotosíntesis y es el principal carbohidrato transportado a distancia. Sin embargo, la sacarosa debe ser escindida para entrar al metabolismo celular, ya sea a través de las invertasas (β-fructosidasa, EC 3.2.1.26) o la sacarosa sintetasa (UDP-D-Glc: D-Fru-2-α-D-glucosyl-transferasa, EC 2.4.1.13; Susy). Por cualquiera de los dos caminos se producen hexosas que deben ser fosforiladas para canalizarlas al metabolismo celular, siendo importante la actividad de las hexocinasas en este paso. Por otro lado, los carbohidratos son moléculas que pueden actuar como señales que modifican la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo (Rolland *et al.,* 2005).

Las hexocinasas fosforilan a las hexosas pero también funcionan como transmisoras de la señal por carbohidratos (Rolland *et al.,* 2005). En las plantas que se sometieron a estrés hídrico se llevó a cabo el ajuste a la nueva situación fisiológica incrementando las hexosas y la sacarosa, entonces en ellas estudiamos si la actividad de la hexocinasa se modificaba durante este proceso.

Los estudios sobre la actividad de la HXK1 en el jitomate obtenido por la sobreexpresión de la enzima en levadura arrojan un valor de Km de 77μM (Dai *et al.,* 2002), valor similar al que obtuvimos en este estudio al día 3 en las hojas de las plantas control y que también se ha encontrado en papa (Renz y Sttit, 1993), Arabidopsis (Dai *et al.*, 1999) y maíz (Galina *et al.,* 1995). No obstante, los valores de Km que encontramos en las plantas control de este estudio son menores en los días 1 y 7, 17 a 5 veces menores, respectivamente, pero aún dentro del intervalo micromolar.

Se detectó que la actividad de la hexocinasa citosólica se incrementó a los días 3, 5 y 7 del tratamiento de estrés en las hojas, midiendo la actividad en presencia de glucosa o fructosa (3 mM). Se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima en tres tiempos del tratamiento 1, 3 y 7 observándose que efectivamente la Vmax

de la enzima fue mayor; adicionalmente, la Km para la glucosa fue 4.8 veces mayor al día 1 en las hojas de plantas con déficit hídrico en comparación con el control. Sin embargo, el valor de 60.4 μM no está alejado del que se encuentra al día 3 en las plantas control y aún en las plantas con tratamiento de déficit hídrico al día 3 (77 y 84.6 μM, respectivamente). Al final, la relación de Km/Vmax en las hojas de las plantas que fueron sometidas a estrés hídrico se mantiene en valores similares entre el día 1 y 3. Lo anterior sugiere que la forma de enzima que se encuentra al día 1 es similar a la del día 3 tanto en las plantas tratadas como las controles, por lo que el estrés sólo indujo la aparición temprana de la forma de la hexocinasa que usa glucosa como sustrato.

El significado de la expresión temprana esta forma de enzima es difícil de explicar con los resultados que tenemos, sin embargo, existen reportes sobre los efectos tanto morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que ocasiona el aumento en la actividad de la enzima. En un estudio en jitomate, Dai *et al.* (1999), sobre-expresaron a la hexocinasa1 de *Arabidopsis thaliana*. El aumento en la actividad de la hexocinasa redujo el contenido de clorofila en las hojas, la velocidad fotosintética, y la eficiencia cuántica del fotosistema II, comparada con las plantas que sólo presentaban la actividad de la hexocinasa nativa. Además, se encontró que las plantas transgénicas mostraban una senescencia adelantada respecto a las control, sugiriendo que la hexocinasa también se encuentra involucrada en la regulación de la senescencia. El peso, el contenido de almidón, los sólidos totales en los frutos también se redujo en las plantas transgénicas. Los resultados sugieren que la actividad de la hexocinasas no es limitante para el crecimiento, pero regula funciones importantes como la fotosíntesis y la senescencia (Dai *et al.,* 1999).

El análisis de expresión de la LeHXK1 indica que su expresión es baja en las hojas y en las raíces, y los autores sugieren que al menos en las hojas la enzima podría tener un papel regulador, pero que al ser alta su actividad en el fruto y sobre todo en el periodo de llenado del fruto, la enzima podría tener un papel metabólico más que regulador. Entonces, el aumento en la actividad de la enzima

y el cambio de la Km para la glucosa podría estar relacionado con un mecanismo de regulación en las hojas, que podría haberse inducido o potenciado por el estrés hídrico de la planta (Dai *et al.,* 2002).

Trethewey *et al*. (1998) realizaron de manera combinada la sobreexpresión de la glucocinasa y de la invertasa en tubérculos de papa y encontraron que la papa reducía su capacidad de sintetizar glucosa y que principalmente llevaba a cabo el papel glucolítico, la estrategia fue inicialmente planteada para aumentar la cantidad de G6P para que ésta fuera canalizada a la formación de almidón, ya que la sola sobreexpresión de la invertasa aumentaba la cantidad de almidón y mantenía niveles bajos o casi indetectables de sacarosa en el tubérculo, pero niveles altos de glucosa, pero el resultado no fue el esperado. Sin embargo, nos permite sugerir que en nuestro sistema experimental, en el que encontramos una actividad aumentada de hexocinasa estamos cambiando el flujo metabólico de la glucosa ya que hemos observado que la cantidad de almidón se reduce conforme avance el estrés hídrico. En este sentido la actividad de la hexocinasa debe ser importante para mantener los flujos metabólicos para que la célula decida si acumula o degrada al almidón, situación que es importante para que la célula exportadora decida y exporte la sacarosa para los tejidos demandantes de este carbohidrato.

La variación en los valores de Km, se puede explicar por la expresión de formas diferentes de la enzima. Esto es posible en jitomate pues en las plantas hay por lo menos dos genes para las hexocinasas (Dai *et al.,* 2002). También es posible que la actividad enzimática se regule por alguna modificación covalente, misma que no se ha descrito para está enzima. Asimismo, podría estar presente como ocurre en animales, una proteína inhibidora de la hexocinasa. Bajo esta última posibilidad, la enzima presentaría una actividad basal en las hojas durante condiciones normales y que al haber un aumento en el contenido de la fructosa en las hojas, como ocurre en el estrés hídrico, se favoreciera la formación de fructosa 6 fosfato o de fructosa 1 fosfato, metabolito que libera a la enzima de su proteína inhibidora y entonces efectúa su función metabólica y de señalización (Van Schaftingen *et al.,*

1994). La enzima que fosforila a la fructosa en posición 1 es la ceto-hexocinasa y no se ha encontrado en plantas, sin embargo, debido a que hay reportes sobre la presencia del producto de la enzima, se ideó una estrategia para medir el efecto que la expresión de la enzima produciría en el fenotipo de las plantas. Cuando la cetohexocinasa de rata es sobreexpresada en papa, las plantas transgénicas presentaron desarrollo de venas y tamaño anormal, disminución radical del crecimiento de la planta y con una inhibición en la velocidad fotosintética (Geingenberg *et al.,* 2004). De manera interesante, la cetohexocinasa inhibe el transporte de sacarosa en las hojas lo que lleva a una reducción en la cantidad y calidad del tubérculo y a una acumulación de sacarosa y almidón en las hojas. Por lo que la regulación de las hexocinasas por fructosa fosforilada es factible.

En cuanto a la actividad de hexocinasa en las raíces, encontramos que al usar como sustrato 3mM de glucosa no hubo un cambio aparente de la actividad de la enzima durante el tratamiento de estrés. Sin embargo la Vmax y la Km sí cambiaron, pues se observó presenta un decremento en la afinidad de la enzima por glucosa, y que lleva a que el índice Km/Vmax sea de 2 a 2.6 veces mayor en las raíces provenientes de plantas tratadas con déficit hídrico, por 3 y 5 días, mientras que al día 7 se presentó un incremento en la afinidad por la enzima. Lo anterior supone que la planta se encuentra ajustando la actividad de la enzima por efecto del estrés.

La represión en la expresión de la hexocinasa en papa produce un aumento en la acumulación de almidón en las hojas, sugiriendo que la enzima está involucrada en la vía de exportación de carbono en los cloroplastos en la noche (Veramendi *et al.,* 1999). Estos datos concuerdan con nuestros resultados en el sentido de que en las raíces encontramos acumulación de almidón durante el estrés (Ramírez-Palma, 2006) y una eficiencia catalítica reducida de la hexocinasa.

También hay que hacer notar que los valores de afinidad en las hexocinasas citosólicas de las raíces son de 3 a 10 veces más altas que las que encontramos

en las raíces, probablemente la forma de hexocinasa que se expresa en las hojas sea diferente a la de las raíces.

8.3. Cambios en la actividad de las hexocinasas durante el estrés hídrico. II Hexocinasas que usan fructosa como sustrato.

Por otra parte, también se midió la actividad de hexocinasa en el extracto citosólico de hojas en presencia de fructosa y se encontró que hubo un aumento en la actividad de la enzima pero sólo al día 3, cuando se mide con fructosa 3 mM. Sin embargo, al realizar el análisis cinético de la actividad se encontró que la Vmax fue mayor en las hojas de las plantas estresadas tanto a 3 como a 7 días, pero ocurrió solo la disminución de la Km para fructosa al día 3. Los valores de Km encontrados fueron más pequeños que los encontrados para una hexocinasa que usa como sustrato fructosa, que generalmente se encuentra en el rango mM, pero en la célula sí hay enzimas que fosforilan fructosa de manera muy eficiente en el rango μM y son las fructocinasas (Pego *et al.,* 2000).

En el jitomate se han identificado dos fructocinasas denominadas FRK1 y FRK2 y en general en otras plantas no hay más de dos enzimas (Kanayama *et al.,* 1997). La sobreexpresión de la enzima en células de levadura muestra que la FRK1 sólo presenta actividad en presencia de glucosa, además el análisis de la secuencia de aminoácidos provee evidencia de que no es una hexocinasa sino una enzima diferente que cataliza la fosforilación de fructosa (Pego *et al.*, 2000). En nuestro estudio fuimos capaces de detectar a esta enzima, encontramos un incremento en la afinidad por fructosa lo que lleva a que el índice Km/Vmax en las hojas de plantas tratadas con déficit hídrico disminuyera 25 veces, esto es la enzima es más eficiente catalizando la reacción.

Los estudios de supresión de la expresión de los genes de frk1 y frk2 de manera independiente en tomate revelan que ambas enzimas presentan diferentes

fenotipos. Las plantas que presentan una actividad disminuida en FRK1 se tardan más en florecer y presentar la primera inflorescencia, mientras que las plantas con actividad reducida en FRK2 disminuye el crecimiento tanto de tallos como de raíces, además de un decremento en el número de flores y frutos (Odana *et al.,* 2002). Adicionalmente encontraron que en las plantas silvestres la FRK1 se expresa específicamente en el desarrollo temprano de la semilla de tomate. Los autores sugieren que el gene frk2 contribuye al crecimiento de la raíz, el tallo y al desarrollo de la semilla a través de ayudar al abastecimiento de carbohidratos en estos tejidos.

En otro estudio en el jitomate también produjeron la supresión del gene frk2 y encuentran que se inhibe el crecimiento del tallo y que las hojas se marchitan pronto (German *et al.,* 2003), sin embargo, las plantas pueden continuar su ciclo de vida, presumiblemente por la actividad de las hexocinasas y la otra fructocinasa. El marchitamiento, explican los autores, podría haberse ocasionado por una interferencia con el metabolismo de carbohidratos lo que no facilita el desarrollo del xilema y por tanto se reduce el transporte de agua en un 28%. En nuestro caso tenemos que las plantas que fueron sometidas a estrés hídrico llevan a un aumento en la eficiencia catalítica de la enzima y sugiere que se necesita una mayor actividad de la fructocinasa para la formación de más sacarosa a través de la acción concertada de la fructocinasa con la SPS ayudando así a incrementar la exportación de los fotoasimilados al tallo y a los tejidos en crecimiento. Hay que recordar que el trabajo de Ramírez-Palma (2007) se encontró que los niveles de fructosa aumentaron y que la glucosa sólo aumento en dos tiempos durante el estrés hídrico en las hojas, mientras que sacarosa se mantuvo alta durante todos los tiempos del estrés, por lo que sugiere que la actividad de la enzima es alta para dar uno de los componentes necesarios para la síntesis de sacarosa, la fructosa-6P. Sin embargo, respecto al papel potencialmente regulador de la enzima no se ha planteado con anterioridad y es probable que tampoco esté ocurriendo en este caso, sino más bien se encuentra funcionando como una enzima metabólica.

Por otra, parte en las raíces hubo un discreto decremento en la actividad de hexocinasa del extracto citosólico con fructosa al día 1 de las plantas con déficit hídrico cuando se midió la actividad usando fructosa 3mM. Sin embargo, al comparar los índices de Km/Vmax entre las raíces control y las plantas tratadas encontramos que a los tres tiempos determinados hay modificación, aunque no hay una tendencia clara de aumento o disminución de la afinidad. Es probable que la raíz se encuentre sometida a cambios de manera continua conforme el estrés avanza y entonces las enzimas se van ajustando de acuerdo a como las condiciones circundantes cambian.

Nuevamente, la actividad de fructocinasa sería un papel metabólico como activador de las moléculas de azúcares más que regulatorio, sin embargo, su actividad es importante ya que puede influenciar la cantidad de sustratos para que se lleve a cabo la síntesis de almidón o bien el crecimiento de la raíz, que durante el estrés hídrico es muy importante.

En este estudio se presentaron cambios en la actividad de las hexocinasas durante el estrés hídrico tanto en hojas como en raíces, en general detectamos dos poblaciones de enzima de las cuatro posibilidades, es decir se sabe que hay un par de hexocinasas que usan glucosa y fructosa pero con afinidades diferentes y 2 fructocinasas. Encontramos primero a una hexocinasa que es muy afín por glucosa, a la cual no podemos adscribir como glucocinasa hasta no realizar experimentos que nos permitan afirmar si presenta está exclusiva actividad y la segunda enzima presenta una Km baja para fructosa por lo que en este caso sí la denominaremos fructocinasa. El análisis cinético realizado en los datos nos permitió identificar que sólo teníamos una actividad de enzima medida con glucosa y otra medida con fructosa, ya que el análisis de los datos mediante los regráficos de Lineaweaver-Burk y Eadie-Hofftie nos dieron en ambos casos una línea recta, lo que supone la presencia de una única enzima en la preparación. Para dilucidar si son varias enzimas se tendrían que realizar experimentos a concentraciones más altas de sustratos y también el análisis por corrimiento electroforético por

punto isoeléctrico, que se ha probado para discriminar entre diferentes formas de hexocinasas o fructocinasas en arroz (Guglielminetti *et al*., 2000) y que se realizarán en breve en el laboratorio.

En el laboratorio hay resultados sobre el contenido de carbohidratos, los niveles de actividad de las invertasas así como de la expresión de los transportadores, en la Figura 15 se resume lo más relevante de estos estudios y lo que se realizó en este trabajo. En la célula fuente se encontró por efecto del estrés hídrico un aumento en el contenido de fructosa y sacarosa, y una disminución en el contenido de almidón. Aún cuando no sabemos en qué compartimento está ocurriendo el aumentó en fructosa ya que se hizo la determinación en el tejido completo, conocemos que la actividad de la invertasa en la pared celular aumento, lo que podría entonces aumentar la concentración de las dos hexosas resultantes, sin embargo, la glucosa no aumentó en el tejido por lo que podría ocurrir que la glucosa se esté usando de manera más eficiente en el tejido regresando al interior celular y suministrar energía a través de la glucólisis, encontramos que la hexocinasa está aumentada y entonces esto podría llevar a la reducción en la glucosa libre y por tanto no la observamos. Sin embargo, qué tanto la enzima contribuye al metabolismo glucolítico y qué tanto a la señalización, no lo podemos decir con nuestros datos, ni qué tanto la presencia de altas concentraciones de fructosa pueden afectar su actividad. Por otra parte, la fructosa que se introdujo al interior celular por el transportador de hexosas o que se produjo a través de la transformación de la glucosa o bien se obtuvo de la vía de hidrólisis de almidón. La fructosa tiene en gran medida como destino la síntesis de sacarosa, ya que Ramírez-Palma (2007) encontró que aumentaba el contenido de sacarosa en algunos tiempos durante el estrés en la hoja. En este sentido si podemos decir que la fructocinasa presentó una actividad fosforilante preferentemente.

Por otro lado en la célula demanda, aumentó el contenido de almidón, así como el de glucosa y fructosa, y los usó para aumentar el crecimiento radicular. Por lo que la glucosa y la fructosa fueron susceptibles de fosforilarse, ya que también ambas

enzimas cambiaron su actividad, la hexocinasa aumentó claramente en el estrés hídrico y esto nos lleva a que pueda funcionar la glucólisis pero también otras vías metabólicas, sin embargo, debido a que sí hubo cambios en la expresión de los transportadores de hexosas, es posible que la hexocinasa participara en su regulación. Mientras que, la fructosa tuvo un comportamiento errático y al no encontrar un aumento en la síntesis de sacarosa pero sí en la de almidón sugerimos que la fructosa-6P que se produce por la actividad de la fructocinasa se puede llevar tanto a la glucólisis como a la síntesis de almidón, por lo que la actividad fosforilante de esta última enzima podría ser clave en dirigir el metabolismo a una u otra vía.

En resumen, se identificó una hexocinasa que usa como sustrato glucosa con una Km de entre 20-80 μM tanto en hojas como en raíces y que aumenta su actividad solo en las hojas. Se detectó una posible fructocinasa con Kms de alrededor de 1-20 μM y que en las hojas aumento su actividad por efecto del estrés hídrico.

Los parámetros cinéticos de las hexocinasas en las hojas se modificaron, la Km aumento cerca de 5 veces en el primer día de estrés, aunque a los demás tiempos no hubo modificación en este parámetro. Las hexocinasas de raíces presentaron un aumento de cerca 2 veces en la Km para glucosa. Mientras que, las fructocinasas en hojas redujeron su Km en alrededor de 25 veces. Pero las fructocinasas en raíces tuvieron un patrón cambiante en este parámetro.

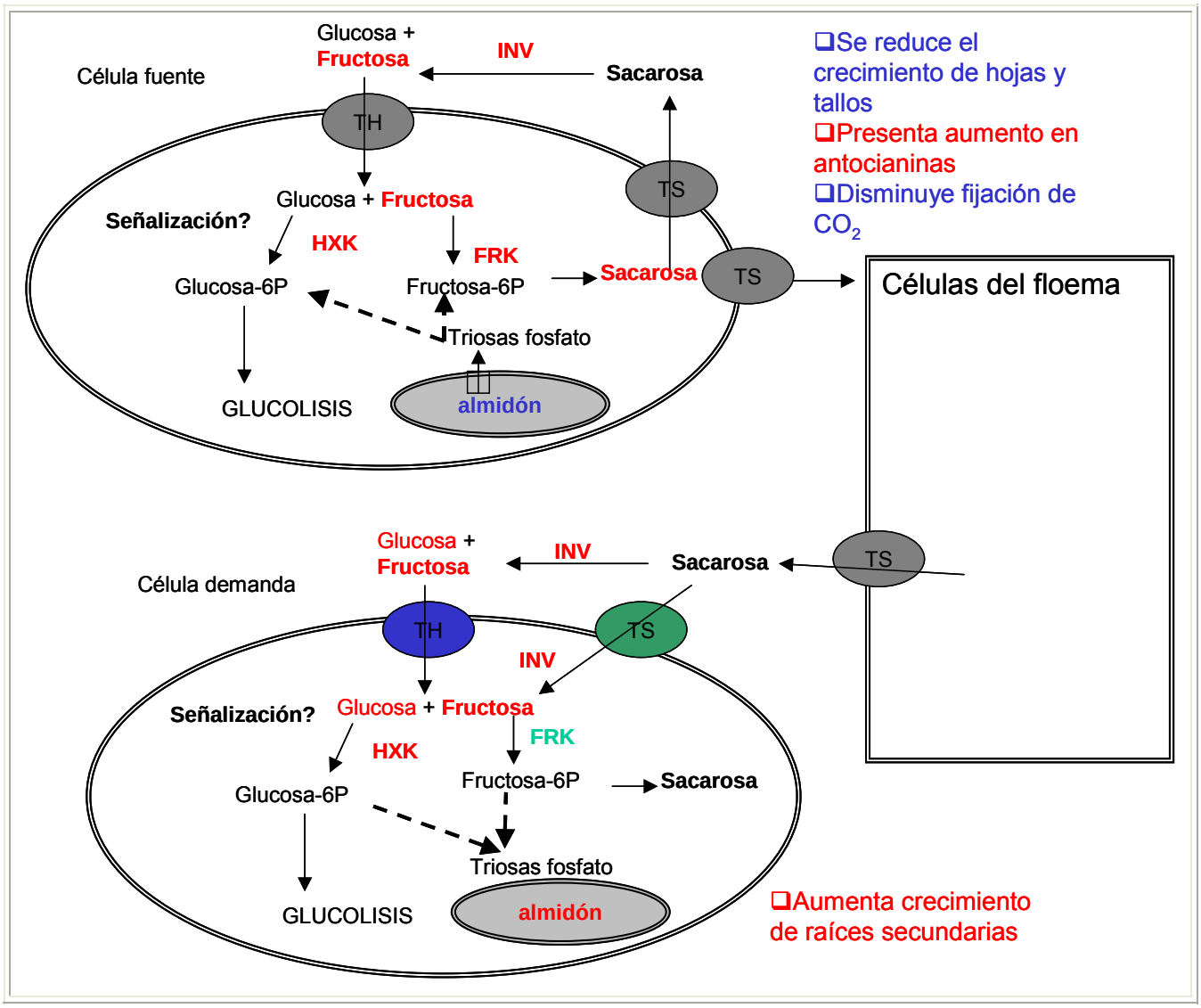


Figura 15. Modelo del efecto del estrés hídrico en la actividad de la hexocinasa, en los niveles de los carbohidratos y en el fenotipo de las plantas. Se encuentran marcados con rojo aquellos metabolitos, enzimas o efectos fisiológicos que se encuentran incrementadas por efecto del estrés hídrico, en azul aquellos que disminuyen y en verde los que presentan un comportamiento diferente pero errático respecto a lo que se observa en el tejido control.

CONCLUSIONES

- Por lo que la actividad de fosforilación de hexosas, medida con glucosa o fructosa como sustrato si cambia por efecto del estrés hídrico.

- Las hexocinasas que usaron preferentemente fructosa se sugiere que están participando solo en su papel fosforilante ya que canalizan la fructosa 6P en las hojas para la producción de sacarosa y en las raíces para la síntesis de almidón y la glucólisis. Sin embargo, no se descarta que el producto de está enzima podría participar en la regulación la actividad de la hexocinasa, aún cuando no se ha adscrito esa función para la fructosa-6P sino para la fructosa 1-P
- Las hexocinasas podrían participar no sólo en el metabolismo sino también en la señalización, tanto en las hojas como en las raíces, pero no tenemos datos suficientes que confirmen está suposición.

BIBLIOGRAFÍA

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell. 7: 1099-1111.

Bork P, Sander C, Valencia A. 1993. Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds. The hexokinase, ribokinase, and galoctokinase families of sugar kinases. Protein Sci. 2. 31-40.

Bray EA. 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol. 103: 1035-1040.

Bray EA, 2001. Plant response to water deficit stress. Ency. Life Sci. 1-5.

Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. 1998. Evolution and regulatory role of hexokinases. Biochem Biophys. Acta 1401: 242-264.

Ceccaroli P, Saltarelli R, Buffalini M, Piccoli G, Stocchi V. 1999. Three different forms of hexokinase are identified during *Tuber borchii* mycelium growth. Mol. Cell. Biochem.194:71-77.

da-Silva WS, Lazzaro GR, Galina A. 2001. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. J. Exp. Bot. 52: 1191-1201.

Dai N, Kandel-Kfir M, Petreikov M, Hanael R, Levin I, Ricard B, Rothan C, Schaffer A, Granot D. 2002. The tomato hexokinase LeHXK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationships. Plant Science 163: 581-590.

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shanak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence. Plant Cell. 11: 1253-1266.

Davies WJ y Zhang J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 55-76.

Díaz JC, Hicks JJ. 1998. Bioquímica. Mc Graw-Hill 2da edición. 205-207.

Frommer WB, Schulze WX, Lalonde S. 2003. Hexokinase, jack-of-all-trades. Science 300: 261-263.

Galina A, Reis M, Albuquerque M C, Puyou AG, Puyou MT, de Meis L. 1995. Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. Biochem. J. 309:105-112.

Garrard LA, Humpreys TE. 1969. The effect of D-Manose on sucrose storage in corn scutelum: evidence of two sucrose transport mechanism. Phytochem. 8: 1065-1077.

Geingenberg P, Kolbe A, Tiessen A. 2005. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. J. Exp. Bot. 56: 1469-1479.

Geingenberg P, Regierer B, Lytovchenko A, Leisse A, Schauer N, Springer F, Kossman J, Fernie AR. 2004. Heterologous expression of a ketohexokinase in potato plants leads to inhibited rates of photosynthesis, severe growth retardation and abnormal leaf development. Planta 218: 569-578.

Germain V, Ricard B, Raymond P, Saglio H. 1997. The role of sugars, hexokinase, and sucrose synthase in the determination of hipoxically induced tolerance to anoxia in tomato roots. Plant Physiol. 114: 167-175.

German MA, Dai N, Matsevitz T, Hanael R, Petreikov M, Berstein N, Ioffe M, Shanak Y, Schaffer AA, Granot D. 2003. Suppression of fructokinase encoded by LeFRK2 in tomato stem inhibits growth and causes wilting of young leaves. Plant J.l 34: 837-846.

Giese JO, Hebers K, Hoffman M, Klösgen RB, Sonnewald U. 2005. Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. FEBS 1579: 827-831.

Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. Plant Cell 6:761-772.

Grossbard K, Schimke RT. 1966. Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. J Biol. Chem. 241:3546-60.

Guglielminetti L, Perata P, Morita A, Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A. 2000. Characterization of isoforms of hexose kinases in rice embryo. Phytochemistry, 53: 195-200.

Halford NG, Purell PC, Hardie DG. 1999. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? Trends Plant Sci. 4: 117-120.

Harrington GN y Bush DR. 2003. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. The Plant Cell. 15: 2493-2496.

Hernández D, De la Fuente M. 1989. Mannose toxicity in Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. Cell Biol. 67:311-4.

Higgins TJ, Easterby JS. 1976. Wheat germ hexokinase (LII): fluorimetric measurement of the binding of substrates and products. Eur. J. Biochem. 65: 513-6.

Hsiao TC, Xu LK. 2000. Sensitivity of growth or roots versus leaves to water stress: Biophysical analysis and relation to water transport. J. Exp. Bot. 51: 1595-1616.

Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. Plant Cell 6: 1665-1679.

Kanayama Y, Granot D, Dai N, Petreikov M, Schaffer A, Powell A, Bennett AB. 1998. Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. Plant Physiol. 117: 85-90.

Kanayama Y, Dai N, Granot D, Petreikov M, Shaffer A, Bennet AB. 1997. Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato. Plant Physiol. 113: 1379-1384.

Koch KE. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 235-246.

Koch KE, Ying Z, Wu Y, Avigne WT. 2000. Multiple path of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. J. Exp. Bot. 51: 417-427.

Kroschewski H, Ortner S, Steipe B, Scheiner O, Wiedermann G, Duchene M. 2000. Differences in substrate specificity and kinetic properties of recombinant hexokinases HXK1 and HXK2 from *Entamoeba histolytyca*. Mol. - Biochem. Parasitol. 105:71-80.

Kytridis VP, Manetas Y. 2006. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. J. Exp. Bot. 57: 2203-2210.

Li T, Li SH. 2005. Leaf responses of micropropagated apple plants to water stress: nonstructural carbohydrate composition and regulatory role of metabolic enzymes. Tree Physiol. 25: 495-504.

Liang Z, Zhang F, Shao M. 2002. The relations of stomatal conductance, water consumption, growth rate to leaf water potential during soil during and rewatering cycle of wheat (*Triticum aestivum*). Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 187-192.

Liu X, Kim CS, Kurbanov HT, Honzatko RB, Fromm HJ. 1999. Dual mechanisms for glucose 6-phosphate inhibition of human brain hexokinase. J. Biol. Chem. 274 :31155-31159.

Martínez-Barajas E, Randall D. 1998. Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) fruit. Planta 205: 567-573.

Malaisse WJ, Malaise-Lagae F, Davies DR, Vandercammen A, Van Schaftingen E. 1990. Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets. Eur. J. Biochem. 190: 539-545

Matheson NK, Myers D. 1998. Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. Phytochemistry. 48: 241-248.

Meunier JC, Buc J, Ricard J. 1971. Purification and characterization of wheat germ hexokinases. FEBS Lett. 14: 25–28.

Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science 300: 332-336.

Nuccio ML, Rhodes D, McNeill SD, Hanson AD. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 128-134.

Nuñez I. 2001. Enzimología. Editorial Pirámide 71-80. Odanaka S, Bennet AB, Kanayama Y. 2002. Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of Frk1 y Frk2 expression in tomato. Plant Physiol. 129: 119-1126.

Pego JV, Wiesbeek PJ, Smeekens SCM. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. Plant Physiol. 119: 1017-1023.

Pelleschi S, Rocher JP, Prioul L. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature leaves. Plant Cell Environ. 20: 493-503.

Price J, Laxmi A, Martin SK, Jang JC. 2004. Global transcription profiling revals multiple sugar signal transduction mechanism in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 2128-2150.

Ramírez-Palma TA. 2007. El estrés hídrico altera el reparto de carbono en tejidos fuente y demanda de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Renz A, Sttit. 1993. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. Planta 190: 166-175.

Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. Curr. Opin. Plant bio. 2: 198-206.

Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. sugar sensing and signaling in plants. Plant Cell 14: S185-S-205.

Rolland F, Sheen J. 2005. Sugar sensing and signaling networks in plants. Biochem. Soc. Trans. 33: 269-271.

Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. 2001. Glucose-sensing mechanism in eukaryotic cells. Trends Biochem. Sci. 26: 310-317.

Rontein D, Dieuaide-Noubjani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D. 2002. The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. J. Biol. Chem. 46: 43948-43960.

Schurr U, Heckenberger U, Herdel K, Walter A, Fell R. 2000. Leaf development in Ricinus communis during drought stress. Dynamics of growth processes, of cellular structure and of sink-source transition. J. Exp. Bot. 51: 1515-1529.

Sharp RE., LeNoble ME., Else MA., Thorne ET., Gherardi R. 2000. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. J. Exp. Bot. 51: 1575-1584.

Sheen J, Zhou L, Jang JC. 1999. Sugars as signaling molecules. Curr. Opin. Plant Biol. 2. 410-234.

Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA. 1999. nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. J. Biol. Chem. 274: 37125-37130.

Smeekens S. 2000. Sugar induced signal transduction in plants. Plant Mol. Biol. 51: 49-81

Sobeih WY, Dood IC, Bacon MA, Grierson D, Davies WJ. 2004. Long –distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato *(Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. J Exp. Bot. 55: 2353-2363.

Spollen WG, Sharp RE, Saab IN, Wu Y.1993. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. In: Smith JAC, Griffith H, eds. Water deficits: plant responses from cell to community. Oxford: Bios Scientific Publishers 37-52.

Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geingenber P. 2003. Evidence that SNF-1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. Plant J. 35: 490-500.

Trethewey RN, Geingenberger P., Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier J, Willmitzer L. 1998. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. Plant J. 15: 109-118.

Van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE. Baskin TI. 2000. Growth of *Arabidospis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. J. Exp. Bot. 51: 1555-1562.

Van Schaftigen E, Detheux M, Veiga-Da-Cunha M. 1994. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. FASEB J. 8: 414-419.

Veiga-Da-Cunha M, Van Schaftingen E. 2002. Identification of fructose 6-phosphate- and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase. J. Biol. Chem. 277: 8466-8473.

Veramendi J., Roessner U., Renz A., Willmitzer L., Trethewey R.1999. Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. Plant Physiol. 121: 123-133.

Wagner SS., Rezende GL., Galina A. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: Implications for hexose phosphorylation. J. Exp. Bot. 52: 1191-1201.

Wilson JE. 2003. Isoenzymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. J. of Exp. Biol. 206: 2049-2057.

Wu Y, Sharp RE, Durachko DM, Crosgrove DJ. 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. Plant Physiol. 111: 765-772.

Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L. 2002. Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. Planta 215: 645-652.

Zhang S, Nichols SE, Dong JG. 2003. Cloning and characterization of two fructokinases from maize. Plant Sci. 165: 1051-1058.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 247-273.

Zinselmeier C, Westgate M, Schussler J, Jones R. 1995. Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L.) ovaries. Plant Physiol. 107: 385-391.

Zinselmeier C, Jeong B-R, Boyer JS.1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. Plant Physiol. 121: 25-36