

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

"REGULACIÓN HORMONAL Y OSMÓTICA DE LA
EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE SACAROSA Y DE
UN TRANSPORTADOR DE HEXOSAS PUTATIVO EN
EMBRIONES GERMINADOS DE MAÍZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GIOVANNA PAULINA AGUILERA ALVARADO



MÉXICO D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: BLAS LOTINA HENNSEN**

VOCAL: **Profesor: HOMERO HERNÁNDEZ Y MONTES**

SECRETARIO: **Profesor: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**

1er. SUPLENTE: **Profesor: ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES**

2° SUPLENTE: **Profesor: CARMEN GIRAL BARNÉS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 114, Departamento de Bioquímica, Edificio E,
Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUSTENTANTE:

Giovanna Paulina Aguilera Alvarado

AGRADECIMIENTOS

A la M.en C. Manuela Nájera-Martínez por su asesoría en las técnicas de biología molecular.

Al Dr. Fausto Rivero-Cruz por su asesoría en la obtención de los niveles de GA₃ en las muestras, mediante la técnica de HPLC.

Este trabajo se realizó con apoyos de

- PAPIIT IN203708, DGAPA, UNAM
- CONACYT 90021
- Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" de la Facultad de Química

A la UNAM, a la Facultad de Química y a todos mis profesores, quienes fueron parte fundamental de mi formación.

A los miembros del jurado, por sus comentarios y críticas para el mejoramiento de este trabajo.

A mis papás, por todo su apoyo, confianza, amor, consejos y enseñanzas que me han ayudado a ser quien soy.

A mi hermana por su ayuda y cariño, y en especial por todos esos momentos tan especiales de mi infancia que siempre recordaré.

A mi abuelita por todo su cariño, comprensión y apoyo.

A Marco, gracias por quererme, acompañarme, escucharme, entenderme, por ser mi soporte, por creer siempre en mí y por toda la felicidad que ha traído a mi vida.

A la Dra. Sobeida Sánchez por su tiempo, por los consejos, las enseñanzas, el apoyo y por todo el cariño que me ha brindado a lo largo de estos dos años.

A Catita, Piby, Maci, Torta, Sujhey, Zuvis, Chiva, Susy Sonrisas, Lucoa, Sam, Óscar y Marco "Bostik" por darme la oportunidad de conocerlos, por todas las risas compartidas, por sus ocurrencias y consejos, por estar ahí en los momentos más difíciles. Simplemente, gracias por ser mis amigos.

A mis amigos del laboratorio Silvia (con bebé incluido), Mariel, Viri Luna, Viri Jefa, Eneas, Érick y Fer por las sugerencias para enriquecer este trabajo, por su compañía, por las palabras de apoyo y por hacer tan amena mi estancia en el laboratorio; en especial gracias a Fer por alimentarnos en los momentos de hambre durante los seminarios.

A todas las niñas de la casa de Amparito y de manera especial a Amparo, Miriam, Marlene y Susy.

A Narda, Pao, Dianita Rivera, Piter, Bochm, Carlinis, Natha y Lucio, a todos mis compañeros de la facultad, que me ayudaron y que con su presencia hicieron que mi estadía fuera tan agradable.

Dedicado a mis papás, a mi hermana y a mi abuelita

*"La vida es aquello que te va sucediendo mientras estás
ocupado haciendo otros planes."*

John Lennon

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
Estructura de la semilla de maíz	4
Germinación	5
Giberelinas	8
<i>Estructura de las giberelinas y frecuencia en plantas superiores.</i>	8
<i>Sitios de biosíntesis de Giberelinas.</i>	9
<i>Función fisiológica de las giberelinas en plantas superiores.</i>	9
<i>Giberelinas y su papel en la germinación</i>	9
Ácido Abscísico	12
<i>Estructura y frecuencia en plantas superiores.</i>	12
<i>Funciones de Ácido Abscísico.</i>	12
<i>Ácido Abscísico: su papel en la germinación y el cierre de estomas.</i>	13
<i>Acumulación de Osmolitos y Tolerancia al Estrés.</i>	14
<i>Carbohidratos y fitohormonas.</i>	16
Transporte de Carbohidratos	17
<i>Transportador de Sacarosa ZmSUT1.</i>	18
<i>Transportador putativo de hexosas ZmHT.</i>	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS GENERALES	25
Objetivos Particulares	25
METODOLOGÍA	26
Germinación de ejes y embriones de maíz	27
Extracción de RNA (Método del TRIZOL)	27
Visualización en gel de agarosa	29
Reacción de RT-PCR	30
Cuantificación de los niveles de expresión	32
Determinación de carbohidratos solubles	32
Cuantificación de niveles internos de Ácido Abscísico y Ácido Giberélico	34
RESULTADOS	40
Efecto de Ácido Giberélico y Ácido Abscísico en los parámetros germinativos de los ejes y embriones de maíz	40
<i>Porcentaje de Germinación.</i>	40

<i>Captación de agua.</i>	42
<i>Cuantificación de los niveles internos de Ácido Abscísico y Ácido Giberélico.</i>	43
<i>Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 en tejido embrionario de maíz.</i>	50
<i>Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT en tejido embrionario de maíz.</i>	52
<i>Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 en tejido embrionario de maíz.</i>	54
<i>Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT en tejido embrionario de maíz.</i>	56
<i>Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 en tejido embrionario de maíz.</i>	58
<i>Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT en tejido embrionario de maíz.</i>	60
<i>Cuantificación de carbohidratos solubles: Sacarosa, Glucosa y Fructosa.</i>	62
DISCUSIÓN	67
<i>Regulación del transportador de sacarosa ZmSUT1.</i>	67
<i>Regulación del transportador putativo de hexosas ZmHT.</i>	73
CONCLUSIONES	79
PERSPECTIVAS	80
APÉNDICE	81
<i>Cuantificación de GA₃.</i>	81
REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de la semilla de maíz.	5
Figura 2. Curva de Germinación.	6
Figura 3. Mecanismo de acción Ácido Giberélico.....	10
Figura 4. Mecanismo de Ácido Giberélico dentro de las células de la aleurona.	11
Figura 5. Mecanismo de acción de Ácido Abscísico que provoca el cierre de los estomas.	14
Figura 6. Compensación Osmótica.	16
Figura 7. Diagrama general de trabajo.	26
Figura 8. Curva Estándar para la determinación de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz.	35
Figura 9. Curva Estándar de Ácido Giberélico. Concentración de Ácido Giberélico en función del área bajo la curva.	37
Figura 10. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 100 µg/mL (20µL)..	37
Figura 11. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 75 µg/mL (20µL). 38	
Figura 12. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 50 µg/mL (20µL)..38	
Figura 13. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 25 µg/mL (20µL). 39	
Figura 14. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 10 µg/mL (20µL). 39	
Figura 15. Efecto de la imbibición en A) Ácido Giberélico, B) Ácido Abscísico y C) Osmolitos sobre el porcentaje de germinación en embriones de maíz.	41
Figura 16. Efecto de la imbibición en A) Ácido Giberélico y B) Ácido Abscísico sobre la captación de agua en embriones germinados de maíz.	42
Figura 17. Efecto de la adición exógena de Ácido Giberélico sobre el contenido de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz.	44
Figura 18. Efecto de la adición exógena de Ácido Abscísico sobre el contenido de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz.	45
Figura 19. Efecto de la adición exógena de Ácido Giberélico sobre el contenido de Ácido Giberélico en embriones germinados de maíz.	47
Figura 20. Efecto de Ácido Abscísico sobre el contenido de Ácido Giberélico en embriones germinados de maíz.	48
Figura 21. Índice GA ₃ / ABA.	49
Figura 22. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador de sacarosa <i>ZmSUT1</i> bajo diferentes concentraciones de Ácido Giberélico.	51
Figura 23. Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión de <i>ZmSUT1</i> en ejes embrionarios y embriones de maíz.....	51
Figura 24. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador putativo de hexosas <i>ZmHT</i> en presencia de diferentes concentraciones de Ácido Giberélico.	53
Figura 25. Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión de <i>ZmHT</i> en embriones y ejes embrionarios de maíz.	53
Figura 26. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador de sacarosa <i>ZmSUT1</i> bajo diferentes concentraciones de Ácido Abscísico.	55
Figura 27. Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión de <i>ZmSUT1</i> en ejes y embriones de maíz.....	55
Figura 28. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador putativo de hexosas <i>ZmHT</i> en diferentes concentraciones de Ácido Abscísico.	57

Figura 29. Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión de <i>ZmHT</i> en ejes y embriones de maíz.....	57
Figura 30. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador de sacarosa <i>ZmSUT1</i> bajo diferentes concentraciones de sorbitol y manitol con el fin de variar la presión osmótica del medio	59
Figura 31. Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión de <i>ZmSUT1</i> en ejes y embriones de maíz.	59
Figura 32. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador putativo de hexosas <i>ZmHT</i> en diferentes concentraciones de manitol y sorbitol.	61
Figura 33. Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión de <i>ZmHT</i> en ejes y embriones de maíz.	61
Figura 34. Efecto de Ácido Giberélico sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en embriones germinados de maíz.....	64
Figura 35. Efecto de Ácido Abscísico sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en embriones germinados de maíz.....	65
Figura 36. Efecto de la Presión Osmótica sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en embriones germinados de maíz.. . . .	66
Figura 37. Vía metabólica putativa de manitol y sorbitol en caña de azúcar...	72
Figura 38. Modelo propuesto para la regulación hormonal y osmótica de <i>ZmSUT1</i> y <i>ZmHT</i> en embriones germinados de maíz	78
Figura 39. Cromatograma de la muestra 0 μM GA_3 . 50 μL	81
Figura 40. Cromatograma de la muestra 100 μM GA_3 . 50 μL	81
Figura 41. Cromatograma de la muestra 50 μM GA_3 . 50 μL	81
Figura 42. Cromatograma de la muestra 10 μM GA_3 . 50 μL	82
Figura 43. Cromatograma de la muestra 5 μM GA_3 . 50 μL	82
Figura 44. Cromatograma de la muestra 0 μM GA_3 . 50 μL	82
Figura 45. Cromatograma de la muestra 50 μM GA_3 . 50 μL	83
Figura 46. Cromatograma de la muestra 30 μM GA_3 . 50 μL	83
Figura 47. Cromatograma de la muestra 10 μM GA_3 . 50 μL	83
Figura 48. Cromatograma de la muestra 5 μM GA_3 . 50 μL	84
Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los transcritos de los transportadores de sacarosa y el putativo de hexosas en tejido embrionario de maíz	31
Tabla 2. Condiciones a las cuales se programó el termociclador de Applied Biosystems, PCR Systems 9700.....	32

ABREVIATURAS

GA	Giberelinas
GA ₃	Ácido Giberélico
ABA	Ácido Abscísico
ATPasa	Trifosfato de Adenosina hidrolasa
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
EST	Secuencias de Expresión Marcadas
DEPC	Dietilpirocarbonato
PCI	Fenol Cloroformo Isoamílico
EtOH	Etanol
TRIS	Trisamina
EDTA	Ácido Dietilendiaminotetraacético
TBE	Tris Borato EDTA
TAE	Tris Acetato EDTA
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
RT-PCR	Transcriptasa Reversa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pb	Pares de bases
GC	Guanina-Citosina
HK	Hexocinasa
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
G6PDH	Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
SPS	Sacarosa Fosfato Sintasa
MeOH	Metanol
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

RESUMEN

La germinación de la semilla es la transición del embrión en reposo hacia una nueva planta fotosintéticamente activa; inicia con la toma de agua por la semilla (imbibición) y termina con la emergencia de la radícula. Para que la germinación ocurra, las semillas en reposo, solo necesitan ser hidratadas bajo condiciones que promuevan el metabolismo como una temperatura adecuada y la presencia de oxígeno. Sin embargo, la germinación también puede ser detenida por la dormancia, un proceso que involucra la interacción entre dos factores de crecimiento de las plantas, las giberelinas (GA's) y el ácido abscísico (ABA). Estas fitohormonas y los carbohidratos también interactúan en la regulación de la germinación de la semilla. De manera adicional, los carbohidratos están implicados en la expresión de diversos genes involucrados en procesos esenciales como la fotosíntesis, la glucólisis, metabolismo de la sacarosa y el almidón entre otros. Todas estas interacciones pueden ser un blanco interesante para mejorar el proceso de germinación de especies tan importantes como el maíz.

Se sugieren cuatro mecanismos mediante los cuales los carbohidratos interactúan con las fitohormonas: 1) carbohidratos afectando el metabolismo y/o transporte de las fitohormonas, 2) fitohormonas afectando el metabolismo y/o transporte de los carbohidratos, 3) carbohidratos regulando la expresión de intermediarios de las vías de respuesta a fitohormonas y viceversa; y 4) compartiendo intermediarios entre las vías de respuesta. Por lo anterior, se decidió determinar el efecto que Ácido Giberélico, Ácido Abscísico y la presión osmótica producen sobre la expresión de los RNAm del transportador de sacarosa *ZmSUT1* y del transportador putativo de hexosas *ZmHT* en tejido embrionario de maíz (ejes y embriones).

Se encontró que al tratar a los embriones de maíz con Ácido Abscísico exógeno los niveles de Ácido Abscísico endógeno se incrementaron y los de Ácido Giberélico disminuyeron así como los niveles de los carbohidratos solubles; mientras que el tratamiento con Ácido Giberélico exógeno solo provocó una disminución en el contenido de Ácido Abscísico endógeno; y originó un incremento en el contenido de sacarosa. En el caso de los osmolitos, se observó que produjeron un aumento en la concentración de hexosas principalmente de fructosa.

En cuanto a los niveles de los transcritos de los transportadores, se encontró que *ZmSUT1* no se expresa bajo ningún tratamiento en ejes embrionarios y que en los embriones es regulado por el contenido de sacarosa y fructosa. La concentración de ambos carbohidratos sólo se modifica por Ácido Abscísico, mientras que el Ácido Giberélico sólo afecta la concentración de sacarosa. También se encontró que en embriones germinados de maíz el transportador putativo de hexosas *ZmHT* es sensible a la presión osmótica, mientras que en ejes embrionarios, se regula de manera positiva por la presencia de fructosa, carbohidrato que disminuyó cuando se incubó el tejido con Ácido Abscísico.

Los resultados obtenidos muestran que, dependiendo de la concentración, ambas hormonas modifican el nivel de expresión de los transcritos estudiados (*ZmSUT1* y *ZmHT*), lo cual tiene impacto en la concentración de sacarosa y/o fructosa. Se encontró que existe una regulación cruzada entre la síntesis de *ZmSUT1* y *ZmHT* y el nivel de hexosas y sacarosa disponibles; y que la regulación hormonal de ambos depende principalmente del balance hormonal que existe entre Ácido Giberélico y Ácido Abscísico.

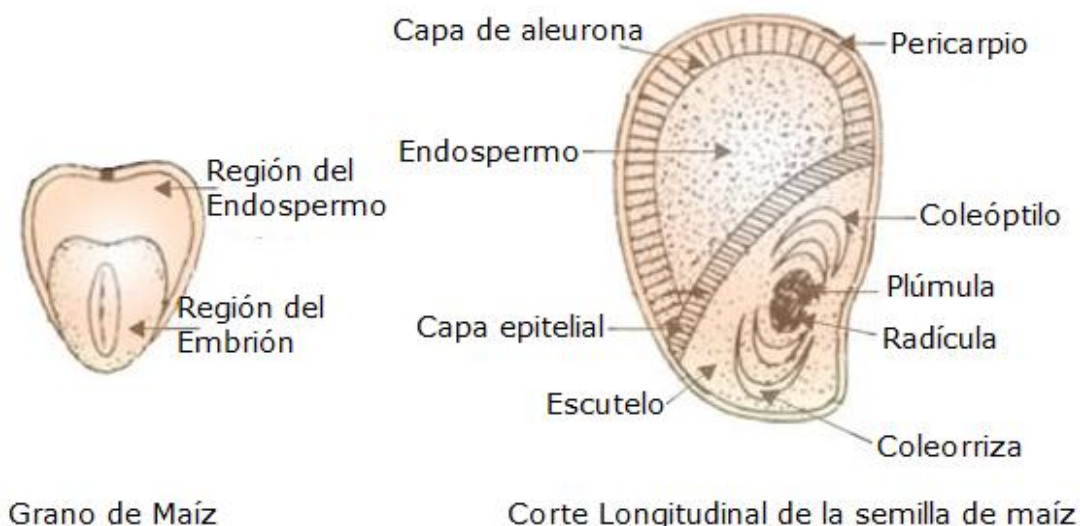
INTRODUCCIÓN

Estructura de la semilla de maíz

El maíz, *Zea mays*, es una especie monocotiledónea de la familia de las poáceas. La semilla de maíz está constituida por 3 partes esenciales (Fig. 1):

- **Pericarpio.** Protege a la semilla de los cambios ambientales o del ataque de microorganismos.
- **Endospermo.** Ocupa aproximadamente 2/3 partes de la semilla y está localizado en la parte más amplia del grano del maíz. Éste contiene una capa continua de grandes células cúbicas a la que se le conoce como **capa de aleurona**. Esta capa contiene gránulos de proteína. El resto del endospermo está constituido por células que almacenan almidón y algunos lípidos. Siendo el 80% del peso total del endospermo almidón.
- **Embrión.** Se encuentra por debajo del endospermo, separado del mismo por una capa de células epiteliales. Podemos encontrar dos tejidos claramente separados en él, el eje embrional o embrionario y el escutelo o cotiledón modificado. El primero está formado por una radícula y una plúmula. La plúmula está parcialmente cubierta y protegida por la coleorriza. Todas estas partes están completamente encerradas o rodeadas por el escutelo. Las células presentes en la capa epitelial del escutelo segregan enzimas hidrolíticas (estearasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas y ribonucleasas) durante la fase de germinación, las cuales digieren los nutrientes presentes en el escutelo (lípidos, proteínas y

carbohidratos) para que posteriormente puedan ser absorbidos por el tejido en crecimiento, el eje embrionario.



Estructura de la Semilla de Maíz

Figura 1. Esquema de la semilla de maíz. Se muestran los tejidos que la conforman. El embrión de maíz está constituido por el escutelo y el eje embrionario (plúmula y radícula), este último alberga los tejidos que conformarán la nueva plántula y en el cual se pueden observar las zonas de formación del sistema vascular. (Tomado de internet).

Germinación

La germinación de la semilla es la transición del embrión en reposo hacia una nueva planta fotosintéticamente activa; inicia con la toma de agua por la semilla (imbibición) y termina con la emergencia de la radícula; siendo entonces el resultado de una combinación de diversos eventos celulares y metabólicos (Fig. 2).

La germinación es afectada tanto por factores ambientales (disponibilidad de agua, oxígeno, luz) como intrínsecos (dormancia¹, permeabilidad de la testa al agua y al oxígeno y la obstrucción de la emergencia de la radícula por el endospermo). Una rápida fase de

¹ Dormancia. Incapacidad del embrión a germinar por alguna insuficiencia inherente (Bewley y Black, 1994)

imbibición (Fase I) lleva a la reanudación del metabolismo basal. Durante esta fase, conocida como "imbibición física", la activación paso a paso de las vías metabólicas es resultado del incremento gradual en la hidratación. Cuando el nivel de hidratación excede el 60% (Fase 2), la velocidad de hidratación disminuye y nuevos mecanismos fisiológicos preparan a las células para la expansión en el eje embrionario. Sustancias osmóticamente activas como azúcares, iones K^+ y aminoácidos, se acumulan y la acidificación de la pared celular conduce a una pérdida de los enlaces entre los polímeros que la conforman.

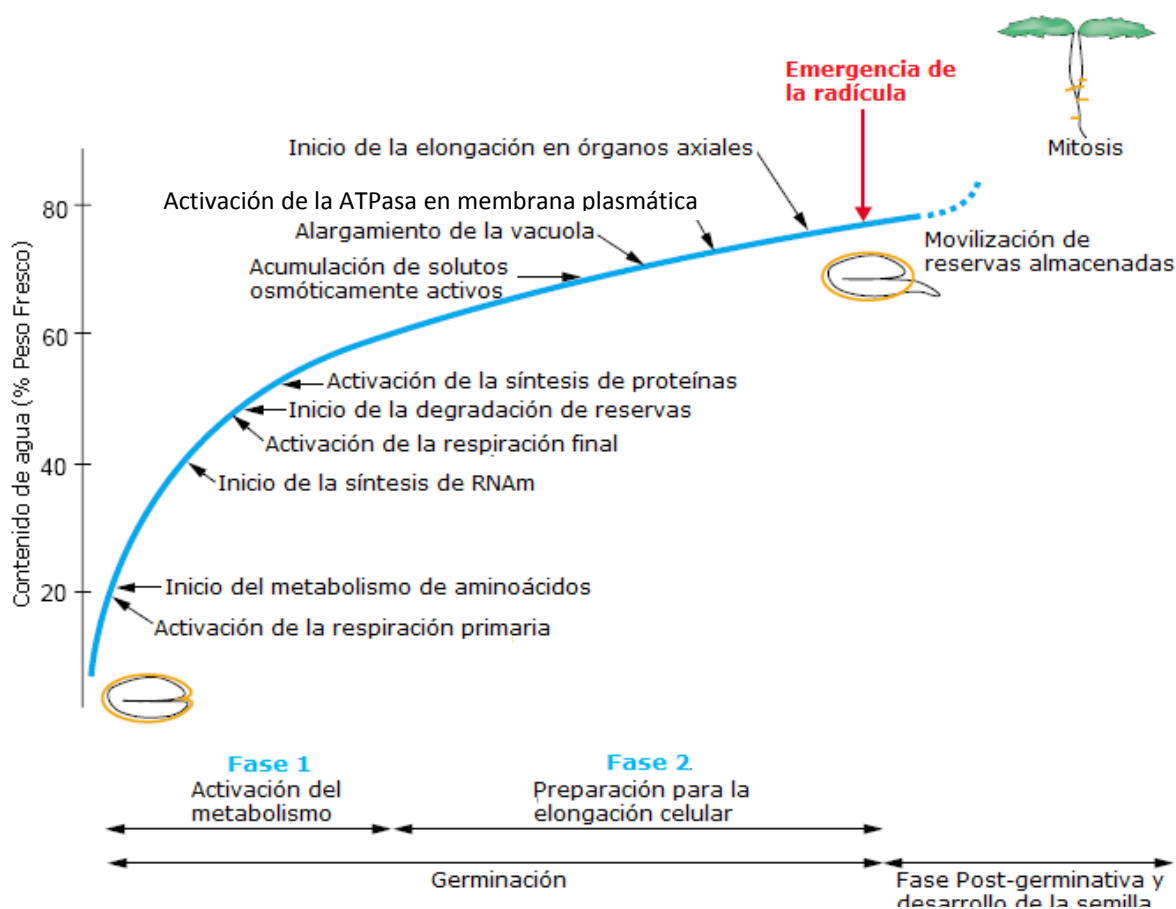


Figura 2. Curva de Germinación. La germinación es afectada por factores ambientales (disponibilidad de agua, oxígeno, luz) e intrínsecos (dormancia, permeabilidad de la testa al agua y al O_2 y la obstrucción de la emergencia de la radícula por el endospermo). La finalización de la germinación puede ser bloqueada temporalmente por la dormancia controlada por las interacciones antagonistas entre los factores de crecimiento endógenos de las plantas (Ácido Giberélico y Ácido Abscísico). (Modificado de Bove *et ál.*, 2001).

Todos estos eventos coinciden con la activación de la ATPasa H^+ en la membrana plasmática, lo que permite un incremento adicional en la toma de agua y que coincide con el debilitamiento de las estructuras que rodean al eje embrionario (endospermo) permitiendo su elongación y que la germinación sea completada (Bove *et ál.*, 2001).

Para que la germinación ocurra, las semillas en reposo, solo necesitan ser hidratadas bajo condiciones que promuevan el metabolismo como una temperatura adecuada y la presencia de oxígeno. Sin embargo, la germinación también puede ser detenida por la dormancia, un proceso que involucra la interacción entre dos factores de crecimiento de las plantas, las giberelinas (GA's) y el Ácido Abscísico (ABA) (Bove *et ál.*, 2001).

Diversas evidencias soportan dicha hipótesis, por ejemplo, se ha observado que en semillas mutantes en la síntesis de Ácido Giberélico (*gib1* en tomate, *ga1* en *Arabidopsis*) es necesaria la adición exógena de Ácido Giberélico para completar la germinación; y en semillas mutantes en la síntesis de Ácido Abscísico (en tomate) la semilla germinada es rica en agua o requiere de bajas concentraciones de Ácido Giberélico exógeno para poder completar el proceso de germinación en comparación con las semillas silvestres.

De manera similar, mutantes insensibles a Ácido Abscísico requieren elevadas concentraciones de Ácido Abscísico para poder inhibir la germinación. En contraste, las mutantes insensibles a Ácido Giberélico (*gai*, *spy* de *Arabidopsis*) requieren pequeñas cantidades de Ácido Abscísico exógeno para suprimir la germinación de la semilla (Srivastava, 2002).

Giberelinas

Estructura de las giberelinas y frecuencia en plantas superiores.

Las giberelinas fueron descubiertas como un subproducto metabólico del hongo *Gibberella fujikuroi*, el cual causa la maduración y el rápido elongamiento de los granos de arroz.

Las giberelinas son definidas por su estructura más que por su actividad biológica. Todas ellas son diterpenoides cíclicos con una estructura básica de anillo *ent*-giberelano. Se reconocen dos tipos principales de giberelinas, aquellas que poseen por completo 20 átomos de C, las GAs-C₂₀, y las GAs-C₁₉ que han perdido un átomo de C y poseen una lactona. Las giberelinas biológicamente activas en plantas superiores son aquellas que poseen 19 átomos de carbono (GAs-C₁₉). Son ácidos débiles con un pK_a de $\approx 4,8$ y se encuentran de forma disociada a pH neutro.

En la actualidad se conocen alrededor de 136 giberelinas (<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>), sin embargo, solo un número muy reducido de ellas son biológicamente activas. Algunas son intermediarias en vías biosintéticas o son formas inactivas.

Numerosas giberelinas se encuentran exclusivamente en plantas superiores, algunas solo se encuentran en hongos y otras en ambos. En los hongos, las giberelinas son productos del metabolismo secundario cuya función es hasta ahora desconocida.

Sitios de biosíntesis de Giberelinas.

La biosíntesis de giberelinas, en las plantas superiores, ocurre en las partes jóvenes de la planta, en ápices, hojas jóvenes, frutos y semillas en desarrollo, y en raíces jóvenes; en contraste, en las hojas maduras y en los tallos se cree que son deficientes en su síntesis.

Función fisiológica de las giberelinas en plantas superiores.

Las giberelinas están involucradas de manera importante en respuestas morfogénicas y bioquímicas. Una de las respuestas más comunes es la promoción de la elongación en órganos axiales, como tallos, pétalos y pedicelos florales.

Las semillas de muchas plantas almacenan cantidades grandes de alimentos de reserva (almidón, proteínas y lípidos) los cuáles son hidrolizados durante la germinación para proporcionar energía y esqueletos de carbono que servirán para el crecimiento inicial de la plántula. En granos de cereales, las giberelinas inducen la síntesis *de novo* y/o la activación de muchas enzimas diferentes para la hidrólisis de los productos almacenados. Otras respuestas incluyen la diferenciación del tejido del floema, promover la germinación de algunas semillas, el desarrollo floral, y, a bajas concentraciones, la estimulación del crecimiento de la raíz.

Giberelinas y su papel en la germinación

Se cree que la producción de α -amilasas en la capa de la aleurona es un proceso esencial para la germinación de las semillas de cereales, y que esta es altamente regulada por Ácido Abscísico y Ácido Giberélico. Durante la germinación de las semillas, Ácido Giberélico es sintetizado

en los embriones y secretado hacia la capa de la aleurona (Fig. 3), disparando la expresión de un gran número de genes que codifican para enzimas hidrolíticas, que incluyen a la α -amilasa, las proteasas y a las enzimas que degradan la pared celular; las cuales son las responsables de la hidrólisis de las reservas almacenadas en el endospermo (Olszewski *et ál.*, 2002).

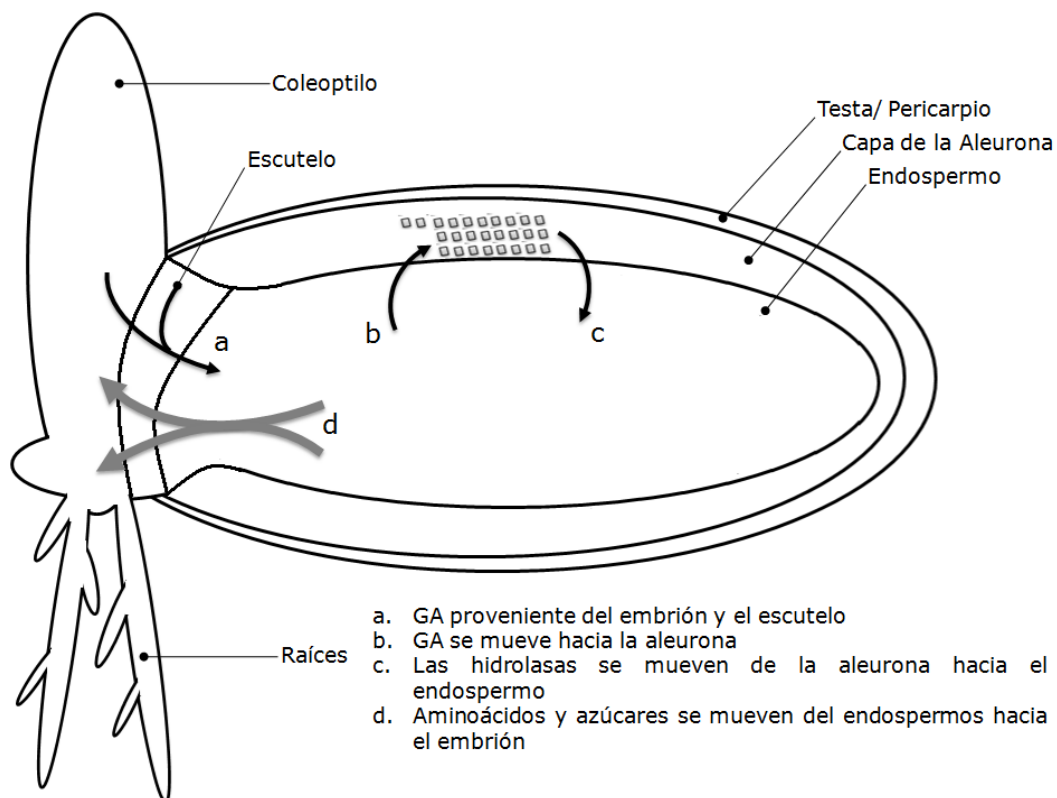


Figura 3. Mecanismo de acción Ácido Giberélico. Corte sagital de un grano germinado en el que se muestra el movimiento de Ácido Giberélico del embrión hacia la aleurona (a y b), de las enzimas hidrolíticas hacia el endospermo (c) y de los productos de hidrólisis del endospermo hacia el embrión (d). (Modificado de Srivastava, 2002).

En las células de la aleurona, el Ácido Giberélico es percibido por receptores como GID1, resultando en la degradación de reguladores negativos, un incremento en los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} y GMPc, y la inducción de factores de transcripción que promueven la expresión de α -amilasas (Zhen *et ál.*, 2006), por ejemplo, GAMYB (Olszewski *et ál.*, 2002). Los componentes de la cadena de transducción de señales en

las células de la aleurona (Fig. 4) han sido identificados en la membrana plasmática, el citosol y el núcleo (Sponsel, 2006).

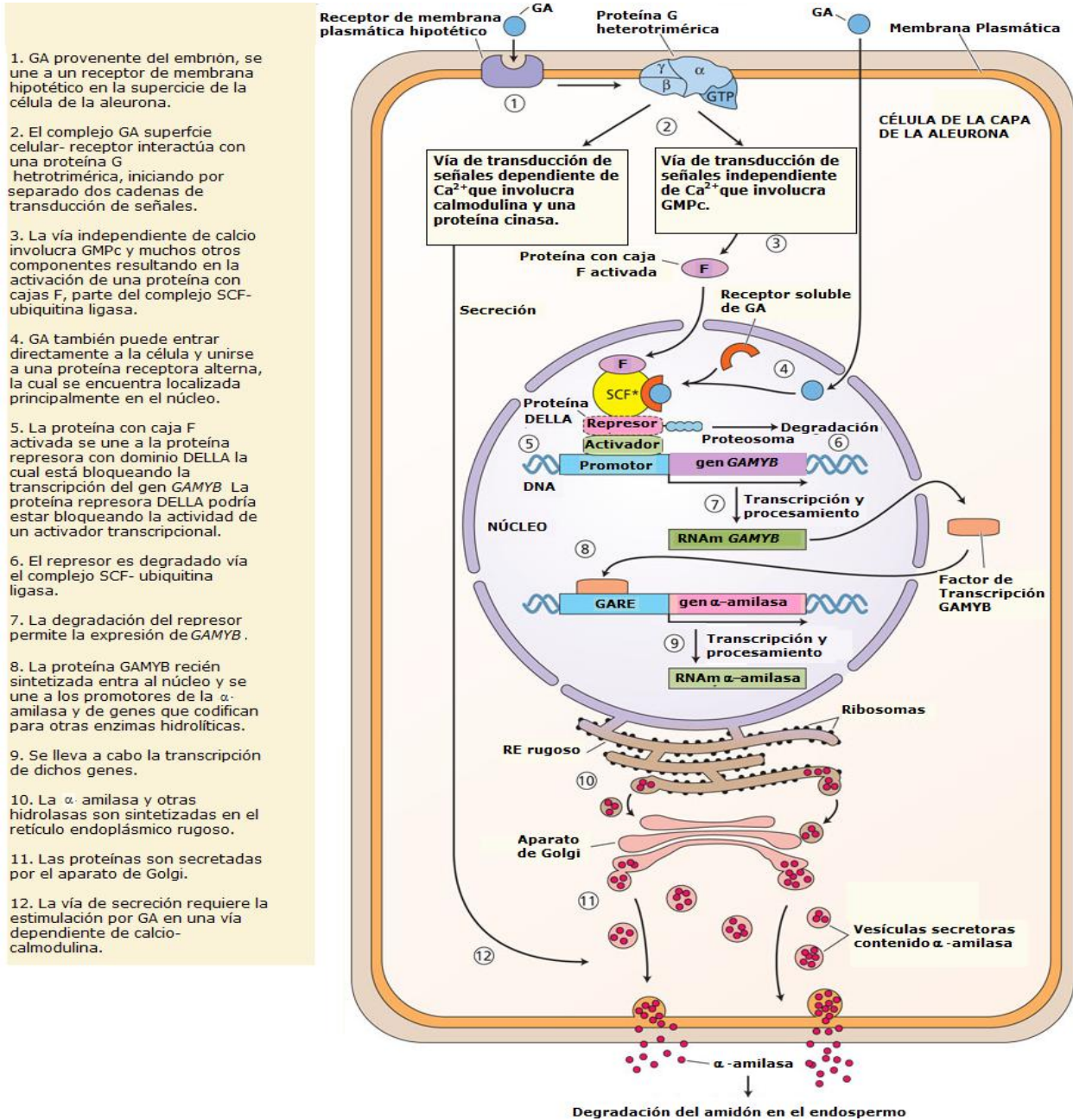


Figura 4. Mecanismo de Ácido Giberélico dentro de las células de la aleurona. Modelo compuesto para la inducción de la síntesis de α -amilasa en las células de la aleurona por Ácido Giberélico. La vía independiente de Ca^{2+} induce la transcripción del gen de la α -amilasa; la vía dependiente de Ca^{2+} está involucrada en la secreción de la α -amilasa. (Modificado de Sponsel, 2006)

Ácido Abscísico

Estructura y frecuencia en plantas superiores.

Ácido Abscísico es un sesquiterpenoide (terpenoide C₅) conformado por un anillo y una cadena lateral. Presenta asimetría en el C-1' el cuál puede presentarse de las siguientes formas: (+) y (-) ó (R) y (S). Sólo el enantiómero S-(+) se encuentra de manera natural en las plantas.

De manera adicional, en la cadena lateral también se presenta asimetría en el C-2. Éste puede presentarse en las formas *cis*, *trans* y *trans, trans*. El isómero más abundante en las plantas es el 2-*cis*, 4-*trans* y en muy pequeñas cantidades el isómero 2-*trans*, 4-*trans*. Ácido Abscísico se encuentra de manera universal en las plantas (Srivastava, 2002).

Ácido Abscísico es un ácido débil que en solución a pH neutros se encuentra en su estado disociado; mientras que a pH ácido predomina la forma protonada. La forma protonada difunde libremente a través de las membranas, la forma aniónica requiere de un transporte de tipo activo vía acarreadores. Dependiendo del pH en los diferentes compartimentos celulares, las cantidades de Ácido Abscísico pueden ser compartimentalizadas. Ácido Abscísico es sintetizado en hojas maduras, tallos, semillas y frutos en desarrollo, raíces y ciertamente en muchas otras partes de la planta.

Funciones de Ácido Abscísico.

Esta hormona se encuentra implicada en la regulación de la fisiología, el crecimiento y el desarrollo de las plantas superiores. Está involucrada en la generación de respuestas al estrés ambiental, como la sequía, el estrés salino y el frío (Sai-Yong *et ál.*, 2007); en el cierre de los

estomas, en la activación de muchos genes relacionados con el estrés y en los procesos de desarrollo como la maduración de la semilla y la dormancia (Suzuki *et ál.*, 2004).

Ácido Abscísico: su papel en la germinación y el cierre de estomas.

Ácido Abscísico reprime la germinación al favorecer el estado de dormancia de la semilla. Ácido Abscísico al igual que otras hormonas, funciona a través una compleja vía de señalización que se inicia con la percepción de Ácido Abscísico por la célula lo cual dispara una cascada de señalización que induce al efecto fisiológico final (Rodríguez-Gacio *et ál.*, 2009). Muchas de las respuestas generadas por Ácido Abscísico como la síntesis de osmolitos compatibles o proteínas relacionadas con la defensa o de resistencia al déficit hídrico, involucran la regulación en la expresión génica; mientras que otros, como el cierre de los estomas por la deficiencia de agua, involucran sólo cambios en los volúmenes celulares. Los estomas juegan un papel crítico en el suministro de CO₂ atmosférico para la fotosíntesis y en la prevención de una pérdida excesiva de agua vía la transpiración (Srivastava, 2002).

Las plantas sintetizan Ácido Abscísico en respuesta a la sequía, desatando una cascada de señales en las células guarda que resultan en el cierre del estoma (Fig. 5) para así reducir la pérdida de agua (Wei-Yi *et ál.*, 2008).

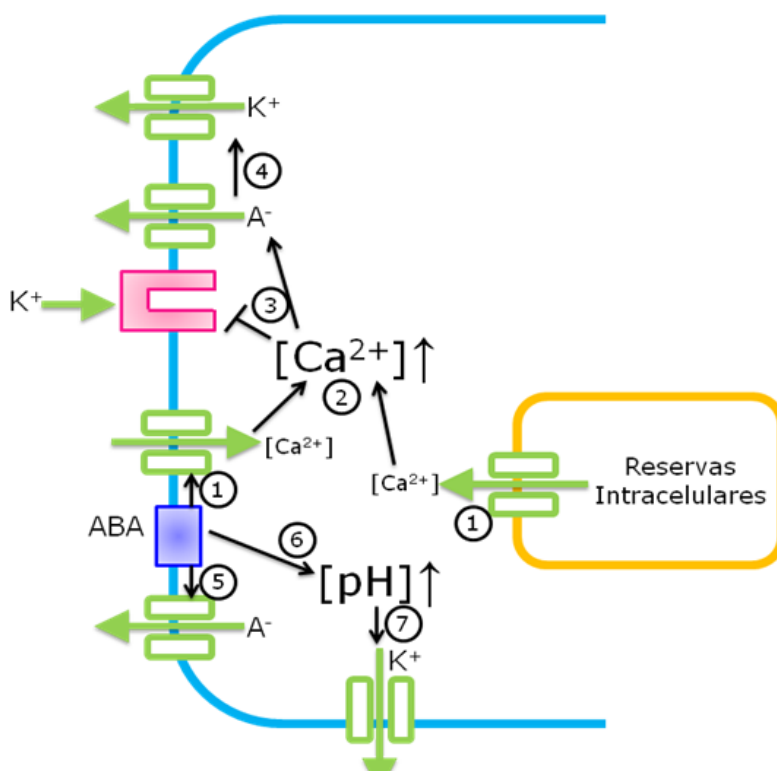


Figura 5. Mecanismo de acción de Ácido Abscísico que provoca el cierre de los estomas. ABA se une a un receptor hipotético en la membrana plasmática. Esto provoca la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular y/o la liberación de las reservas intracelulares almacenadas (1). El incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico (2) causa la inhibición de los canales iónicos de K^+ (dirigidos hacia el interior) y la activación de los canales aniónicos lentos (3). La despolarización resultante de la membrana plasmática lleva a la apertura de los canales iónicos de K^+ (dirigidos hacia el exterior) (4). El eflujo de iones de K^+ resulta en el cierre del poro. Además, ABA también induce la apertura de los canales aniónicos (5) e inhibe la actividad de la ATPasa- H^+ , provocando un incremento en el pH citosólico (6). Este incremento ocasiona una fuerte despolarización y activa los canales iónicos de K^+ (dirigidos al exterior) (7) provocando finalmente el cierre del estoma. (Modificado de Srivastava, 2002).

Acumulación de Osmolitos y Tolerancia al Estrés.

La sequía, salinidad y el frío llevan a la deshidratación celular, lo que provoca daño en las membranas celulares y macromoléculas. Una de las principales maneras mediante la cual las células de las plantas se protegen contra la pérdida de agua, es por la acumulación de iones o moléculas, que incrementan la presión osmótica y disminuyen el potencial hídrico de las células. Los compuestos que restringen la

pérdida de agua y que vigilan la pérdida de la turgencia en las células son referidos como osmolitos y al fenómeno mediante el cual ocurre esto se conoce como compensación osmótica o ajuste osmótico (Fig. 6). La compensación osmótica permite que ocurran el crecimiento celular, la fotosíntesis y otros fenómenos metabólicos mientras continúan las condiciones de estrés.

Los osmolitos incluyen iones y compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Los iones son acumulados solo en algunas plantas, principalmente halófitas. Son acumulados selectivamente en vacuolas porque una elevada concentración de iones en el citosol inhibe la actividad de diversas enzimas.

Los compuestos orgánicos de bajo peso molecular comprenden los azúcares (sacarosa, hexosas), polioles (manitol, sorbitol) y compuestos nitrogenados o sulfurados. Estos solutos son acumulados en el citosol y, en algunos casos, en organelos; su acumulación no inhibe la actividad de las enzimas.

Hay dos maneras por las cuáles actúan estos compuestos en contra de la desecación. Primero, su acumulación disminuye el potencial hídrico citosólico, lo cual restringe la pérdida de agua hacia el exterior de la célula. Segundo, protegen los complejos protéicos en los organelos y el citosol contra el daño por deshidratación presumiblemente manteniéndolos hidratados (Srivastava, 2002).

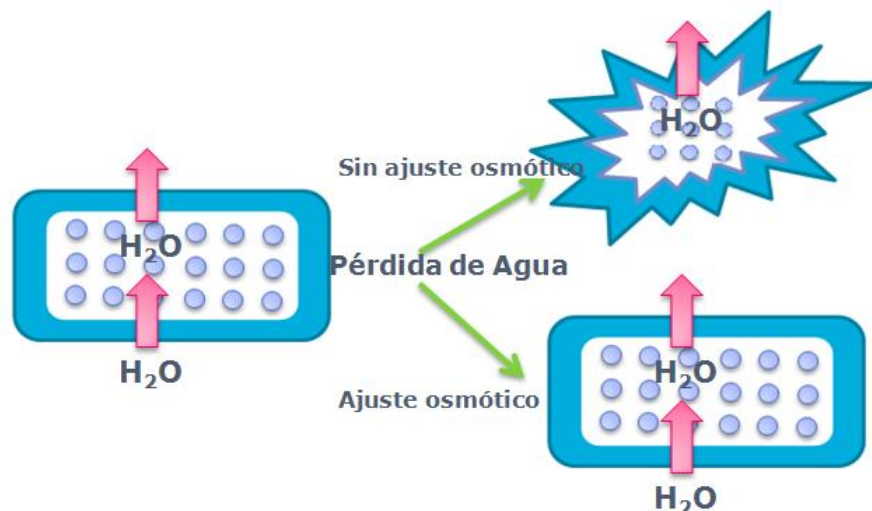


Figura 6. Compensación Osmótica. Cuando el agua es abundante, entra y sale de la célula, pero la célula mantiene su presión (pequeñas flechas negras apuntando contra la pared). Cuando el potencial hídrico en el medio ambiente es más negativo que en la célula, el agua de la célula sale de ella causando estrés hídrico. Un incremento de los osmolitos intracelulares disminuye el potencial hídrico dentro de la célula y previene la salida del agua. (Modificado de Srivastava, 2002).

Carbohidratos y fitohormonas.

Los carbohidratos y las fitohormonas también interactúan en la regulación de la germinación de la semilla. Por ejemplo, se sabe que Ácido Abscísico inhibe el proceso de germinación de las semillas y de manera sorprendente se ha encontrado que la adición exógena de glucosa (en baja concentración) permite la germinación de semillas de *Arabidopsis* contrarrestando el efecto de Ácido Abscísico (Gibson *et al.*, 2003). De manera adicional, los carbohidratos están implicados en la expresión de diversos genes involucrados en procesos esenciales como la fotosíntesis, la glucólisis, el ciclo del glioxilato, el metabolismo del nitrógeno, la sacarosa y el almidón; y en la regulación del ciclo celular (Delrot *et al.*, 2000).

Existen evidencias que sugieren que las interacciones entre carbohidratos y hormonas en algunos casos pueden ser directas y en

otras indirectas. Por ejemplo, un componente de una vía puede interactuar directamente con componentes de otra vía para formar un complejo. Y de manera alternativa pueden interactuar directamente para alterar los niveles de un mismo segundo mensajero. Se sugieren cuatro mecanismos mediante los cuales los carbohidratos interactúan con las fitohormonas:

- i. Carbohidratos afectando el metabolismo y/o transporte de las fitohormonas.
- ii. Fitohormonas afectando el metabolismo y/o transporte de los carbohidratos.
- iii. Carbohidratos regulando la expresión de los componentes de las vías de respuesta a fitohormonas y viceversa.
- iv. Compartiendo intermediarios entre vías de respuesta (Gibson *et ál.*, 2003).

La percepción de los carbohidratos y su variación en cuanto a concentración en el apoplasto, en las células y su transporte puede afectar la morfogénesis mediante el control en la división celular, y el metabolismo a nivel transcripcional, traduccional y post- traduccional (Delrot *et ál.*, 2000).

Transporte de Carbohidratos

Los transportadores de carbohidratos son la maquinaria central para mediar el transporte de carbohidratos a través de la membrana hacia el interior y en la distribución de los mismos a lo largo de toda la planta.

La sacarosa es el carbohidrato más abundante y transportado en las plantas superiores. Después de la sacarosa, los polioles (como el manitol y el sorbitol) y la rafinosa también pueden ser transportados.

Los transportadores de sacarosa se han identificado en una variedad de especies de plantas y son los transportadores de carbohidratos mejor caracterizados. Los transportadores de sorbitol y manitol han sido identificados en numerosas especies de plantas como en el manzano y en *Arabidopsis*. Ambos transportadores, de sacarosa y polioles, pertenecen a la superfamilia de facilitadores mayores. De manera adicional a estos miembros de la superfamilia, en muchas plantas se han identificado transportadores de hexosas, generalmente en tejidos demanda, y se ha postulado que catalizan el importe de glucosa y fructosa (productos de la hidrólisis de la sacarosa por acción de las invertasas) desde el floema hacia el interior de los tejidos demandantes (Ren- Chun *et ál.*, 2009).

Se cree que para el mantenimiento de la homeostasis en las células, los transportadores de carbohidratos deben ser altamente regulados a diferentes niveles: mediante modificaciones en la transcripción, estabilidad del RNAm, durante la traducción y por control post-traducciona (Delrot *et ál.*, 2000). De hecho también se ha buscado que como sustratos de su actividad los carbohidratos ejercen una acción reguladora. Hasta el momento las evidencias son contradictorias en cuanto a si la sacarosa o la glucosa son las moléculas que afectan de manera positiva o negativa los niveles de los RNAm para los transportadores de carbohidratos. Por ejemplo en tomate la sacarosa induce la expresión de *LeSUT2*, sin embargo en remolacha es inhibida su expresión.

Transportador de Sacarosa ZmSUT1.

Los transportadores de sacarosa (SUTs o SUCs) importan sacarosa del apoplasto en las células del floema. Presumiblemente contienen 12

dominios transmembranales que forman un poro a través del cual la sacarosa cruza la membrana. Los SUTs funcionan como simportadores de sacarosa/ H⁺ con una estequiometría de 1:1. El gradiente de H⁺ que proporciona la energía para el simporte de sacarosa es generado por las ATPasas-H⁺ presentes en la membrana de las células del floema.

Generalmente en una planta se pueden encontrar diferentes formas de los transportadores, con excepción del maíz. La familia de los transportadores SUT/SUC puede ser dividida en tres subfamilias basadas principalmente en su homología estructural y su actividad: La subfamilia SUC2/SUT1, en la que los transportadores presentan una Km de alta afinidad para sacarosa (100µM a 2 mM), familia presente en dicotiledóneas y ausente en monocotiledóneas; la subfamilia SUC4 la mayor parte de sus miembros son transportadores de baja afinidad Km alrededor de 5 mM y la subfamilia SUC3/SUT2 con miembros que presentan actividad de transporte de sacarosa de baja afinidad, además la mayor parte de sus integrantes contienen al dominio central y al N-terminal más extenso que las otras dos subfamilias, dominios considerados importantes para la afinidad del transportador por sacarosa o para la regulación de la actividad de transporte o ambos (Shiratake *et ál.*, 2007). *ZmSUT1* pertenece a ésta última subfamilia SUC3/SUT2, resultando interesante su estudio.

Se conoce que el transportador de sacarosa en maíz *ZmSUT1*, se expresa fuertemente en tejidos fuente (hojas) con un patrón diurno, teniendo su máximo de expresión al final del día y su mínimo de expresión durante la noche. De manera adicional, en las hojas en desarrollo, se expresa con un gradiente de menor a mayor que refleja la transición de tejido demandante a fuente (Slewinski *et ál.*, 2009).

A pesar de que es el único gene que codifica para el transportador de sacarosa identificado en maíz (Aoki *et ál.*, 1999), existen tejidos que no lo contienen como es el caso del eje embrionario (Gómez-Calderas, 2008). Su ausencia indica que existe un mecanismo de regulación de su expresión en un tejido que esencialmente requiere del aporte de nutrientes o también denominado demandante, papel que en la planta adulta también desempeñará, expresarse en tejidos netamente aportadores o fuente de nutrimentos como las hojas. Gómez-Calderas (2008) encontró que la expresión del RNAm para *ZmSUT1* en los embriones completos aumenta en presencia de fructosa, glucosa, sacarosa y manosa, excepto con sorbitol que lo reduce. Sin embargo, no se puede descartar que el efecto que los carbohidratos exógenos produjeron en los niveles de los RNAm para el transportador es sólo o en conjunto con la presencia de hormonas ya que el sorbitol produjo un efecto que no se esperaba y que puede deberse a un efecto de cambio de potencial osmótico o de Ácido Abscísico.

Transportador putativo de hexosas ZmHT.

Los transportadores de hexosas también pertenecen a la superfamilia de facilitadores mayores, presentando una topología en la membrana similar a la del transportador de sacarosa. Los transportadores de hexosas pertenecen a una familia con al menos 6 o 7 subfamilias y que en *Arabidopsis* se han propuesto que son: 1) Subfamilia STP, en la que se encuentran los simportadores de monosacárido- H^+ en la membrana plasmática; 2) subfamilia PLT, transportadores de amplio espectro de transporte en simporte con H^+ de polioles y azúcares; 3) subfamilia INT, simportadores H^+ -miositol o inositol localizados en la membrana plasmática y fuertemente expresados en polen y en las células acompañantes; 4) subfamilia pGlucT transportadores de glucosa en el

plastidio; 5) subfamilia AZT probables proteínas sensoras de monosacáridos; 6) subfamilia ERD6 transportadores inducidos por frío y estrés por deshidratación y la subfamilia 7 la de los transportadores de xilosa denominados VGT (Johnson *et ál.*, 2006 y Büttner, 2007).

Respecto a su regulación poco se sabe, a nivel transcripcional y post transcripcional. Los datos de algunos microarreglos indican que hay efecto de un amplio rango de factores ambientales y del desarrollo en la expresión de los transportadores de monosacáridos. En la uva del vino, el promotor del gen del transportador de hexosas *VvHT1* contiene dos cajas de respuesta a carbohidratos y su actividad es inducida por sacarosa y glucosa. Además, la unión del factor de transcripción *VvMSA*, inducido por Ácido Abscísico, a estas cajas ha sido demostrada; sugiriendo que *VvMSA* está involucrado en una vía de transducción común de carbohidratos y señalización de Ácido Abscísico (Büttner, 2007).

En la búsqueda de un transportador de hexosas en maíz en un trabajo previo en el laboratorio se obtuvo una clona parcial de un transportador de hexosas, el cual presenta su mayor expresión en el embrión de maíz, transportador al que llamamos *ZmHT* (Gómez-Calderas, 2008). La homología de *ZmHT* con los transportadores de hexosas es alta, presentando hasta un 96% de homología con uno descrito en la caña de azúcar. El análisis de su expresión en diferentes tejidos y durante la germinación mostró que la abundancia del transportador es mayor durante el proceso germinativo, aunque en el tejido seco también se encuentra presente. La clona fue obtenida a partir de una secuencia que se encuentra en el banco de genes EST (NCBI Reference Sequence: NM_001158464.1) y actualmente se planea obtener la clona completa (trabajo en progreso Zurita-Villegas).

JUSTIFICACIÓN

El maíz es un cultivo que tiene al menos tres aplicaciones posibles: como alimento, forraje y materia prima para la industria. Ésta última aplicación es la que más ha llamado la atención en los últimos años, ya que debido al aumento de los precios del petróleo se ha impulsado la investigación acerca de la fermentación del maíz para la producción de biocombustibles.

Sin embargo, si la producción de maíz no es suficiente para cubrir las necesidades alimentarias, entonces no puede ser factible su uso para la producción de biocombustibles.

El maíz es el cultivo agrícola más importante que hay en México, tanto a nivel alimentario, industrial, económico, político y social. Durante el periodo 1996-2006 se produjo un promedio anual de 19,3 millones de toneladas de maíz, mostrando una tasa media anual de crecimiento de 2,0%, con decrementos registrados en la producción obtenida durante 2002 y 2005 debidos a la afectación ocasionada por los fenómenos meteorológicos acaecidos en diversas entidades de la República Mexicana (SAGARPA).

Se ha observado que el metabolismo de las fitohormonas tiene un impacto considerable en la regulación de la germinación de las semillas de *Arabidopsis*. Los genes involucrados en la biosíntesis y desactivación de Ácido Abscísico y Ácido Giberélico; así como su metabolismo, participación en otras rutas metabólicas e interacción (balance GA_3/ABA), pueden ser blancos para mejorar el proceso de germinación de otras especies (Bewley, 2010).

En nuestro laboratorio hemos acumulado evidencia sobre la regulación de la expresión de algunas proteínas en la germinación del maíz. Por ejemplo, el escutelo ejerce a varios niveles un control estricto de las concentraciones de azúcares que le llegan al eje embrionario -tejido que secretará el ácido giberélico para iniciar la movilización de las reservas (Thomas y Rodríguez, 1994)-, contiene una alta concentración de lípidos que no son movilizados hasta que las concentraciones de azúcares solubles decrecen importantemente (Ramírez-Sóstenes, 2008), presenta una concentración alta de sacarosa y un transporte activo de éste hacia los apoplastos (Gómez-Calderas, 2008; Martínez-Marcelo, 2008), metabolito que es utilizado por las invertasas de pared celular (Martínez-Marcelo, 2008) y sus productos deben ser utilizados por el eje embrionario para sostener su crecimiento, en vista de que no contiene transportador de sacarosa en sus membranas plasmáticas (Greaves-Fernández, 2001). Por lo que es también probable que si los metabolitos y las hormonas están cambiando en concentración estos pudieran estar ejerciendo un efecto sobre la expresión de los dos transportadores de carbohidratos que hemos estudiado, *ZmSUT1* y *ZmHT*.

HIPÓTESIS

- Sí el Ácido Giberélico promueve la germinación de la semilla de maíz y Ácido Abscísico su estado de dormancia, y siendo necesaria la utilización de las reservas internas del embrión para que la germinación ocurra entonces la expresión de los genes del transportador de sacarosa *ZmSUT1* y del transportador putativo de hexosas *ZmHT* será promovida por la adición exógena de Ácido Giberélico e inhibida por Ácido Abscísico.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar el efecto que Ácido Abscísico, Ácido Giberélico y la presión osmótica producen sobre la expresión de los RNAm para el transportador de Sacarosa *ZmSUT1* y el transportador putativo de Hexosas *ZmHT* en tejido embrionario de maíz.

Objetivos Particulares

1. *Determinación del efecto de las hormonas Ácido Abscísico y Ácido Giberélico en los parámetros fisiológicos de los embriones de maíz.*
 - A. Porcentaje de germinación y la acumulación de peso fresco
 - B. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en embriones germinados de maíz tratados con Ácido Giberélico, Ácido Abscísico y osmolitos.
 - C. Cuantificación de Ácido Giberélico en embriones germinados de maíz tratados con Ácido Giberélico y Ácido Abscísico.
 - D. Cuantificación de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz tratados con Ácido Giberélico y Ácido Abscísico.
2. *Medición de los transcritos para los transportadores de carbohidratos en embriones germinados en presencia de Ácido Giberélico y Ácido Abscísico.*
 - A. Expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* en presencia de Ácido Giberélico, Ácido Abscísico y osmolitos.
 - B. Expresión del transportador de hexosas *ZmHT* en presencia de Ácido Giberélico, Ácido Abscísico y osmolitos.
 - C. Análisis de la posible relación entre los niveles de los transcritos de *ZmSUT1* y *ZmHT* y los cambios en los contenidos de Ácido Giberélico y Ácido Abscísico.

METODOLOGÍA

El trabajo experimental que se realizó en el presente trabajo se dividió en tres partes (Fig. 7). Primero se obtuvieron los perfiles de expresión de los RNAm del transportador de sacarosa *ZmSUT1* y del transportador putativo de hexosas *ZmHT* en presencia de diferentes concentraciones de Ácido Abscísico, Ácido Giberélico y osmolitos (sorbitol y manitol) en ejes y embriones germinados de maíz; posteriormente se midieron los niveles de los carbohidratos solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) en embriones germinados de maíz bajo los diferentes tratamientos; y por último se cuantificaron los niveles internos de Ácido Abscísico (ELISA) y Ácido Giberélico (HPLC) de embriones germinados de maíz en presencia de dichas fitohormonas.

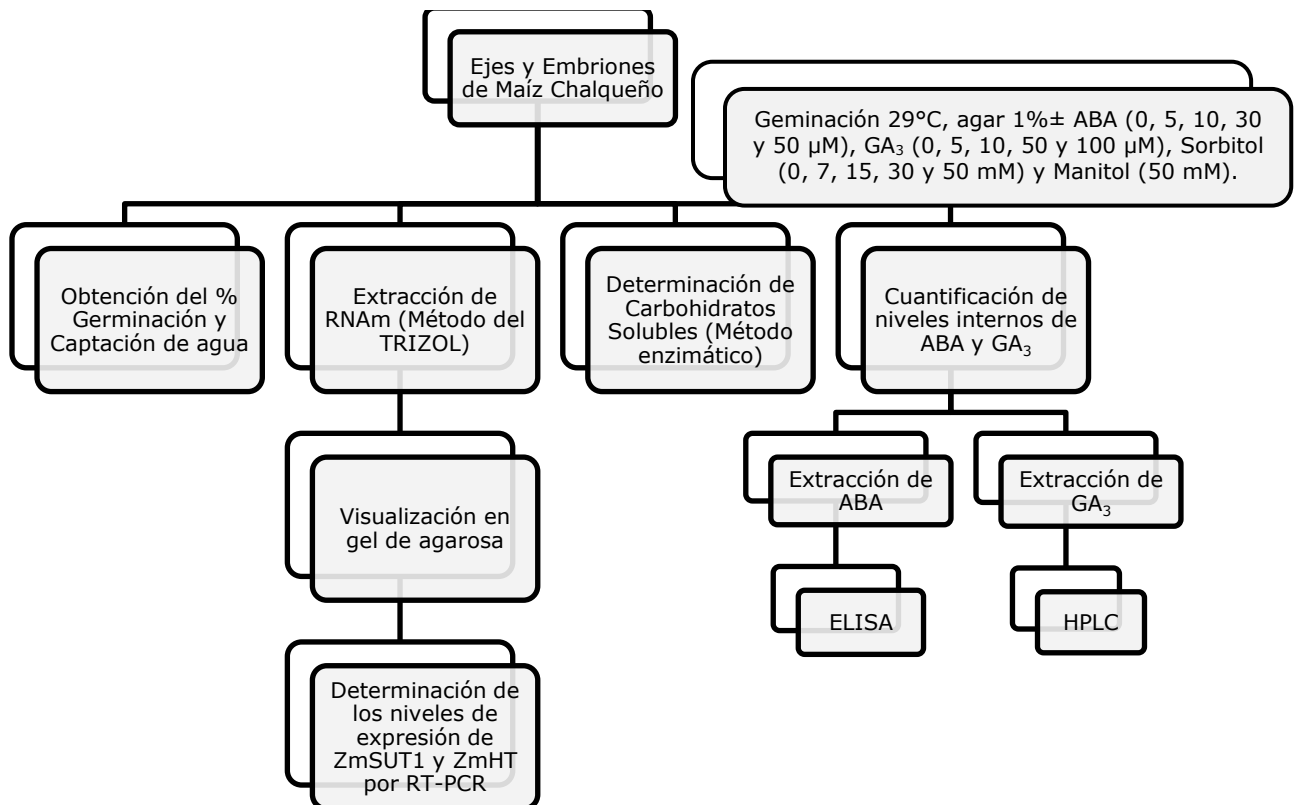


Figura 7. Diagrama general de trabajo.

Germinación de ejes y embriones de maíz

Desinfección. Se obtuvieron ejes y embriones de maíz chalqueño obtenidos mediante extracción manual. Se lavaron los tejidos con una solución de hipoclorito de sodio al 2% agitando vigorosamente durante 2 minutos. Posteriormente, se enjuagaron con agua estéril hasta que el olor a cloro ya no fuera percibido.

Germinación. Se embebieron 20 ejes o 10 embriones de maíz en diferentes cajas Petri estériles conteniendo agar al 1%. Antes de la solidificación del agar, se adicionaron diferentes soluciones de Ácido Abscísico SIGMA (50, 30, 10, 5 y 0 μM), Ácido Giberélico SIGMA (100, 50, 10, 5 y 0 μM), Sorbitol SIGMA (50, 30, 15, 7 y 0mM) y Manitol SIGMA (50mM); se homogenizó perfectamente. Los ejes y embriones se incubaron durante 24 horas a 29°C; en el caso del tratamiento con GA₃, se incubaron durante 1 hora en presencia de la hormona y posteriormente se transfirieron a cajas Petri con agar al 1% para continuar con la germinación.

Captación de agua y porcentaje de germinación. Ejes y embriones se pesaron antes y después de la imbibición, el peso húmedo inicial se consideró como el 100%. Para considerar al tejido germinado, se utilizó como criterio que la elongación de la radícula de los embriones fuera mayor a 2 mm. Posterior a estas determinaciones, los tejidos se congelaron a -70°C.

Extracción de RNA (Método del TRIZOL)

Condiciones del material. Se utilizaron morteros y pistilos previamente lavados con unas gotas de H₂SO₄ (en la campana de extracción), se

enjuagaron con H₂O-DEPC, se secaron y se envolvieron en papel aluminio, se colocaron en la estufa a 160°C durante toda la noche. Al día siguiente se sacaron del horno, una vez tibios se almacenaron a -70°C. Los tubos de microfuga y las puntas se depositaron en frascos con H₂O-DEPC al 0,01%, se dejaron en agitación durante 24 horas y se esterilizaron en autoclave (121°C, 15 lb/in²) durante 40 minutos. Se retiró el H₂O-DEPC de los frascos mediante filtración con gasas estériles en la campana de flujo laminar y se dejó el material en el horno hasta sequedad. Las espátulas utilizadas y el H₂O-DEPC se esterilizaron en autoclave (121°C, 15 lb/in²) durante 40 minutos.

Extracción de RNA total. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Se pesaron 400 mg del tejido vegetal (en el caso de los embriones, para los ejes se utilizaron 100 mg de tejido) y se pulverizó con N₂ líquido hasta la obtención de un polvo fino evitando la hidratación del tejido. Se adicionó 1 mL de TRIZOL (Invitrogen) por cada 100 mg de tejido y se mezcló perfectamente con el pistilo hasta obtener una pasta homogénea, la cual se transfirió a un tubo de microfuga con ayuda de una espátula estéril previamente enfriada en N₂ líquido. Se incubó el tejido a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 12210 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Universal 320R, Hettich; Rotor angular 1420-A). El sobrenadante se transfirió a un tubo de microfuga frío y se le añadieron 200 µL de PCI (25:24:1, Fluka) por cada mL de TRIZOL utilizado, se agitó por inversión durante 15 segundos y se centrifugó a 12210 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microfuga frío y se le agregaron 200 µL de CHCl₃ por cada mL de TRIZOL, se agitó por inversión durante 15 segundos, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12210 rpm

durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se traspasó a un tubo de microfuga frío, se le adicionaron 500 µL de isopropanol por cada mL de TRIZOL, se mezcló perfectamente, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12210 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el botón se dejó secar a temperatura ambiente por 1 minuto, se le agregó 1 mL de EtOH al 75%, se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, se dejó secar el botón aproximadamente 10 minutos y se resuspendió en 500 µL de H₂O-DEPC. Se agregaron 167 µL de LiCl 8 M y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en 250 µL de H₂O-DEPC, 750 µL de EtOH al 95% y 25 µL de Acetato de Sodio 3 M; se incubó a -70°C por toda la noche. Se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el botón obtenido se lavó con 1 mL de EtOH al 75% (centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C) en dos ocasiones. Se eliminó el EtOH y se secó el botón a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las muestras se resuspendieron en 100 µL de H₂O-DEPC y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de RNA total. Se preparó una dilución 2:50 con H₂O-DEPC de cada una de las muestras de RNAm obtenidas, se obtuvo su absorbencia a 260/280 nm y se determinó su concentración de acuerdo a la siguiente equivalencia: 1 unidad de Absorbencia_{260nm} = 40 µg RNA/mL (Espectro Beckman Coulter DU® 530).

Visualización en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y

H₂O-DEPC. La cámara de electroforesis utilizada se lavó con SDS al 10%, se enjuagó y se dejó en agitación con H₂O-DEPC durante 30 minutos.

Preparación de las muestras. Para verificar la integridad del RNA obtenido y obtener los perfiles de expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* y del transportador putativo de hexosas *ZmHT*, se cargaron los geles con 1 µg de RNA de todas las muestras obtenidas ajustando los volúmenes cuando fuera necesario para que el contenido de RNA utilizado para la producción de cDNA fuera el mismo en todos los casos. Los geles se corrieron a 85 V, 49 mA durante 50 minutos en un cámara libre de RNAsas.

Reacción de RT-PCR

Producción de cDNA. En un tubo de microfuga se agregó el volumen de RNA necesario para tener 1 µg de RNA, 1 µL de OligodT 20mM y el H₂O-DEPC necesaria para tener un volumen final de 10 µL (RNA molde). Se desnaturalizó a 70°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo por 5 minutos. En otro tubo de microfuga, se preparó la mezcla de reacción con 4 µL de Buffer ImProm-II™ 5X (Promega); 2,4 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP's 10mM, 1 µL de Transcriptasa Reversa ImProm-II™ (Promega) y el H₂O-DEPC necesaria para tener un volumen final de 10 µL por cada reacción, se agitó en vortex. Al tubo de microfuga con el RNA molde, se le añadieron 10 µL de la mezcla de reacción, se agitó, se incubó a 25°C por 5 minutos para el alineamiento, posteriormente a 42°C durante 1 hora y a 70°C por 5 minutos para la inactivación de la Transcriptasa Reversa. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ensayo de PCR. Para determinar los perfiles de expresión del transportador *ZmSUT1* y del transportador putativo de hexosas *ZmHT*, se utilizaron los oligonucleótidos empleados en trabajos previos en el laboratorio (Greaves-Fernández, 2001 y Gómez-Calderas, 2008) y cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1.

Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Tm	Longitud (pb)	Contenido GC (%)
<i>ZmSUT1</i> Sentido	TCCTCTGGTTCCACAAACAAC	60	21	48
<i>ZmSUT1</i> Antisentido	ACGAGCTGAATCCTAGAACGA	59	21	48
<i>ZmHT</i> Sentido	CTTCTACGCGCCGGTCC	62,9	17	70,5
<i>ZmHT</i> Antisentido	GCGATGACGAAGGTGAAGAG	60,9	20	54,5

4

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los transcritos de los transportadores de sacarosa y el putativo de hexosas en tejido embrionario de maíz.

Para la amplificación del transportador de sacarosa *ZmSUT1*, se preparó una mezcla de reacción conteniendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega); 0,1 µL de oligonucleótido sentido, 0,1 µL de oligonucleótido antisentido, 1 µL de cDNA y 11,3 µL de H₂O. En el caso del transportador putativo de hexosas *ZmHT*, se elaboró una mezcla de reacción con 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega); 0,25 µL de oligonucleótido sentido, 0,25 µL de oligonucleótido antisentido, 1 µL de cDNA y 11 µL de H₂O. Las condiciones óptimas para la amplificación de los transcritos de ambos transportadores fueron de acuerdo a las obtenidas con anterioridad en el laboratorio (Gómez-Calderas, 2008) y que se exponen en la Tabla 2.

Predesnaturalización	Amplificación PCR/Ciclo (35 ciclos)	Extensión final
94°C por 3 minutos	Desnaturalización: 94°C por 30 segundos Templado: 60°C por 1 minuto Extensión: 72°C por 2 minutos	72°C por 1 minuto

Tabla 2. Condiciones a las cuales se programó el termociclador de Applied Biosystems, PCR Systems 9700.

Cuantificación de los niveles de expresión

Preparación de gel de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y H₂O estéril. Los geles se corrieron a 85 V, 49 mA durante 50 minutos.

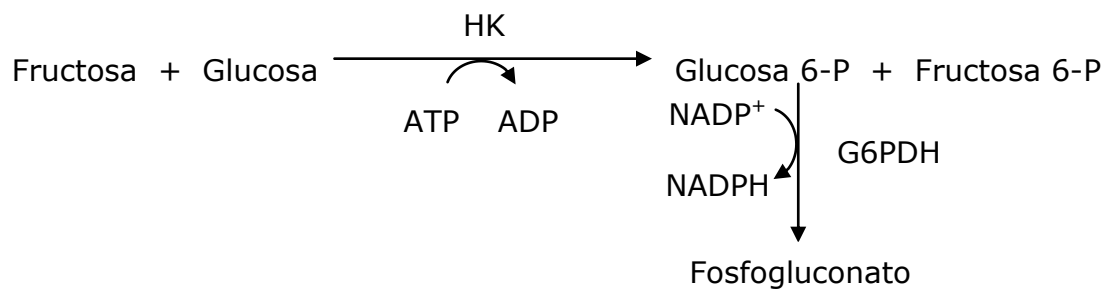
Densitometría. Se realizó la densitometría de las bandas obtenidas en los geles de agarosa para cada uno de los transportadores con ayuda del sistema de imagen cuantitativo Bio-Rad Fluor-S MultiImager. Los controles de cada uno de los tratamientos se consideraron como 100% de expresión.

Determinación de carbohidratos solubles

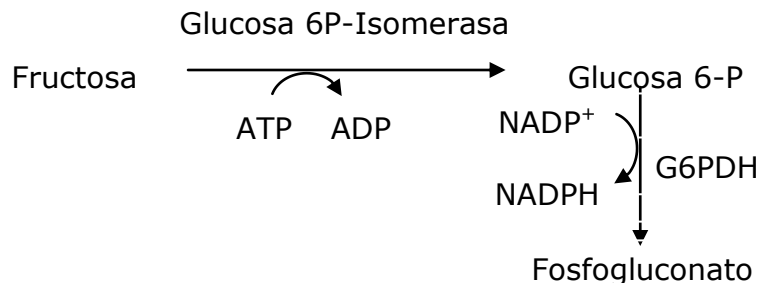
Extracción. Se pesaron 0,2 g de tejido embrionario (embriones de maíz chalqueño), se molieron con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregó 1 mL de EtOH al 80% a temperatura de ebullición y se mezcló perfectamente. La mezcla alcohólica se transfirió a un tubo de microfuga. Al remanente del mortero se le añadió 1 mL de H₂O a temperatura de ebullición; se mezclaron los extractos y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se separó y se colocó en un

tubo de ensayo pequeño, el cual se calentó a 70°C en un bloque de calentamiento para evaporar el disolvente (EtOH: H₂O). La pastilla obtenida se resuspendió con 200 µL de H₂O destilada y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cuantificación. Se hicieron reaccionar 2, 4 y 6 µL con 200 µL de una mezcla enzimática con 1,0 U/mL de HK y 1,0 U/mL de G6PDH durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante la reacción se produce una cantidad equimolar de NADPH con respecto a la glucosa y se leyó su absorbencia a 340 nm. La absorbencia obtenida fue directamente proporcional a la concentración de glucosa.

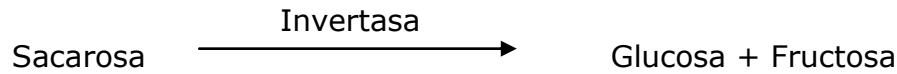


Después de la primera lectura se añadieron al mismo pozo de reacción 2 µL de glucosa 6-P isomerasa (1,2 U/mL). Se realizó una segunda lectura y el incremento en absorbencia a 340 nm correspondió a la sumatoria de la glucosa en la primera determinación más la concentración de fructosa.



Para la determinación de sacarosa se realizó una hidrólisis en medio ácido de la sacarosa de la muestra (2, 4 y 6 µL de muestra y H₂O

destilada hasta alcanzar un volumen de 12 μL) con invertasa de levadura de SIGMA (4 μL de la solución de 80 mg/mL de invertasa disuelta en $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 mM pH 4,5). Se incubó a 37°C por 2 horas, y se determinó el contenido de glucosa y fructosa de acuerdo a lo anteriormente establecido.



El contenido de glucosa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Glucosa (mg / g tejido)} = \frac{(\text{Abs}_m - \text{Abs}_b) \times 0.00614 \times F \times \text{Vol}_{\text{Susp}}}{\text{Vol}_{\text{Alic}} \times g_{\text{tejido}}}$$

Abs_m = Absorbencia de la muestra

Abs_b = Absorbencia del blanco

F = Factor de dilución

Vol_{Alic} = Volumen de alícuota

Vol_{Susp} = Volumen de resuspensión

Cuantificación de niveles internos de Ácido Abscísico y Ácido Giberélico

Extracción de Ácido Abscísico. Se germinó 1 gramo de embriones de maíz chalqueño por cada concentración de Ácido Abscísico (50, 30, 10, 5 y 0 μM) y Ácido Giberélico (100, 50, 10, 5 y 0 μM) utilizadas, durante 24 horas a 29°C. Una vez transcurrido el tiempo de germinación, el tejido se congeló en N_2 líquido y se pulverizó. Se suspendió en 15 mL de la solución de extracción (MeOH al 80%). Se dejó toda la noche en dicha solución a 4°C y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y seco. El procedimiento se repitió con el botón obtenido, los extractos alcohólicos se juntaron y se secaron al vacío. El residuo seco se disolvió en 1 mL de buffer TRIS (45

mM TRIS-HCl, pH 7,8, 90 μ M MgCl₂, 0,135 NaCl y 10% de MeOH) y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos (Oliver *et ál.*, 2007). El sobrenadante se filtró con un filtro estéril de 0,45 μ m y la concentración de Ácido Abscísico se determinó por medio de una prueba de ELISA del kit Phytodetek™ ABA (SIGMA).

Cuantificación de Ácido Abscísico. Se siguió el protocolo contenido en el inserto del kit. Brevemente, se preparó un estándar de Ácido Abscísico de una concentración de 5,286 mg/mL en MeOH absoluto. Se tomaron 100 μ L de esta solución y se disolvieron en 9,90 mL de MeOH para formar una nueva solución de 0,1 μ M Ácido Abscísico /mL. A partir de dicha solución estándar se hicieron diluciones para producir concentraciones de 1000, 100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 picomoles Ácido Abscísico /mL. El ensayo de Ácido Abscísico utilizó anticuerpos monoclonales anti-ABA y se basó en la unión competitiva de Ácido Abscísico contenido en las muestras con trazas de Ácido Abscísico marcadas con fosfatasa alcalina teniendo como sustrato para-nitrofenol, y se leyó la absorbencia a 405 nm. La intensidad del color amarillo producido fue inversamente proporcional a la cantidad de Ácido Abscísico presente en la muestra (Fig. 8).

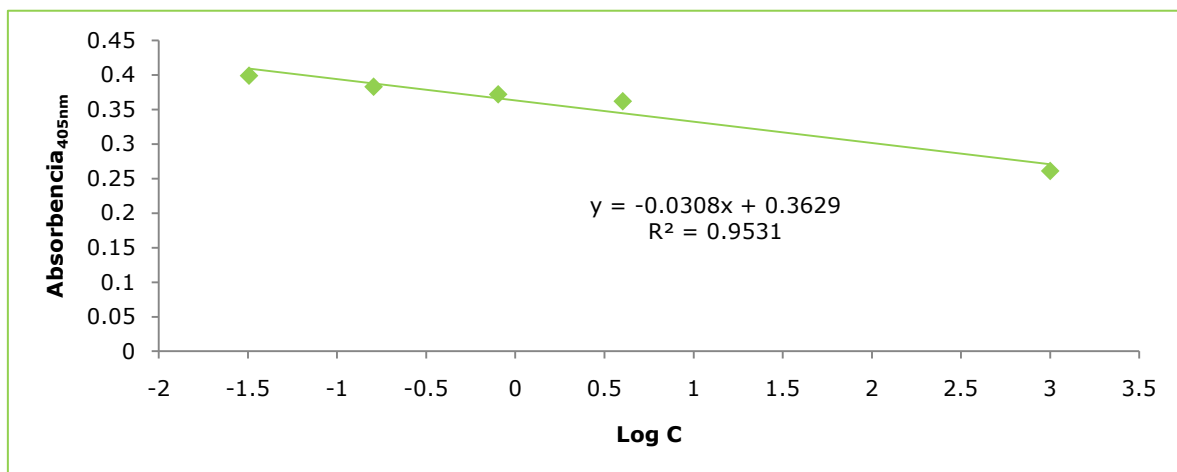


Figura 8. Curva Estándar para la determinación de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz.

Extracción Ácido Giberélico. Se germinaron 5 gramos de embriones de maíz chalqueño por cada concentración de Ácido Abscísico (50, 30, 10, 5 y 0 μM) y Ácido Giberélico (100, 50, 10, 5 y 0 μM) utilizadas, durante 24 horas a 29°C. Transcurridas las 24 horas, el tejido se congeló en N_2 líquido y se pulverizó, el polvo obtenido se homogenizó con 25 mL de EtOH al 80%. El Ácido Giberélico se extrajo con 30 mL de EtOH al 80% durante 24 horas a 4°C, en 3 ocasiones. Los extractos obtenidos se mezclaron, se filtraron con un embudo Buchner y se concentraron en un baño de agua a menos de 40°C. Para eliminar los pigmentos y las proteínas, la fase acuosa obtenida se acidificó con HCl 1N, pH 2,5-3,0 y se congeló durante 24 horas a -20°C. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 800 g durante 20 minutos. Las giberelinas libres se extrajeron del sobrenadante con volúmenes iguales de Acetato de Etilo bidestilado en un embudo de separación en 3 ocasiones. Las giberelinas unidas se extrajeron de la fase acuosa con n-butanol saturado con agua en un embudo de separación en 3 ocasiones y se realizó la misma extracción que para las giberelinas libres; se combinaron los extractos se evaporaron en seco a temperatura ambiente y se resuspendieron en 1 mL de una solución de 70% de H_3PO_4 0,01 M pH=3 y 30% de MeOH grado HPLC (Castillo y Martínez, 1997; Nefed'eva y Mazey, 2009).

Cuantificación de Ácido Giberélico.

Fase Móvil. La fase móvil utilizada fue una solución de 70% H_3PO_4 0,01 M pH= 3,0 y 30% de MeOH absoluto grado HPLC.

Fase Estacionaria. Columna Fortis C18 (5 μM , 150x4,6 mm), en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Shimadzu Serie 10A.

Para la obtención de la concentración de Ácido Giberélico en la muestra se realizó el método del estándar externo, usando concentraciones de

GA₃ entre 10 y 100 µg/mL. Se muestra la curva estándar de Ácido Giberélico (Fig. 9), que fue generada al obtener las áreas bajo la curva de los cromatogramas obtenidos (Fig. 10, 11, 12, 13 y 14).

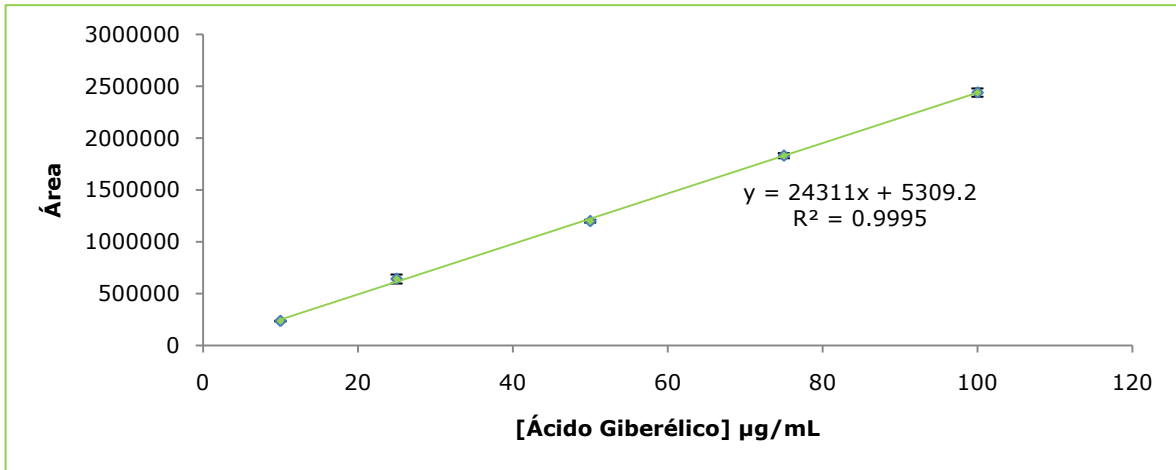


Figura 9. Curva Estándar de Ácido Giberélico. Concentración de Ácido Giberélico en función del área bajo la curva.

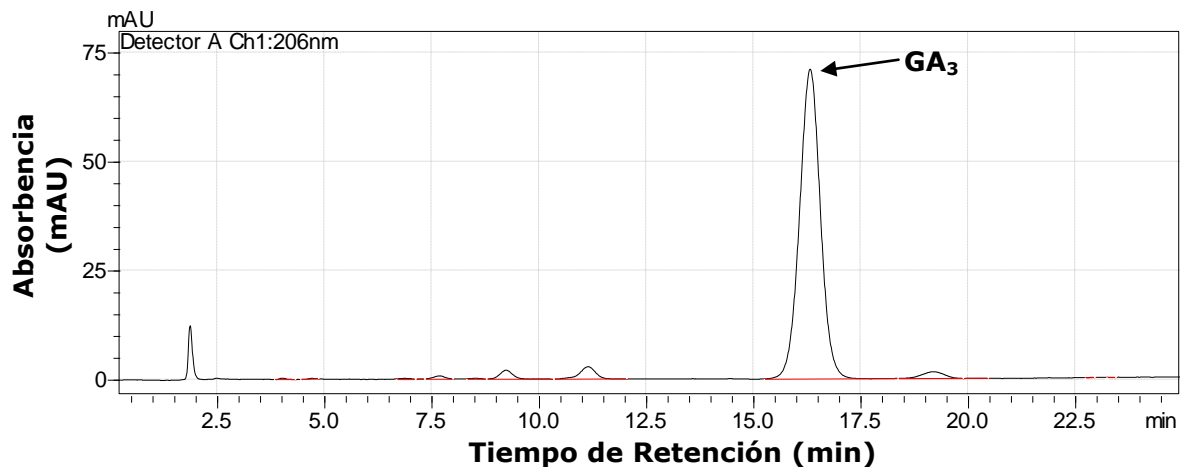


Figura 10. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 100 µg/mL (20µL). Tiempo de retención: 16 minutos.

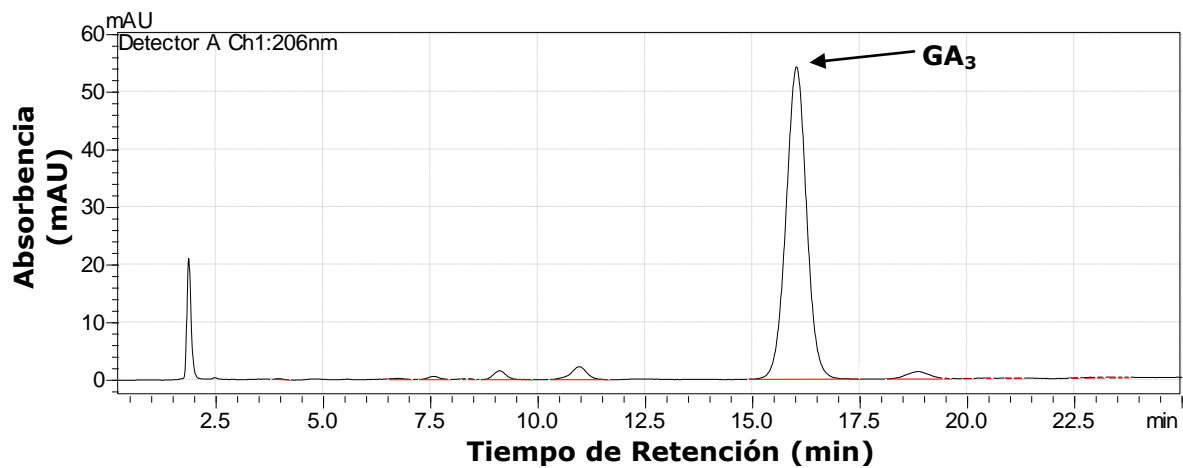


Figura 11. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 75 µg/mL (20µL). Tiempo de retención: 16 minutos.

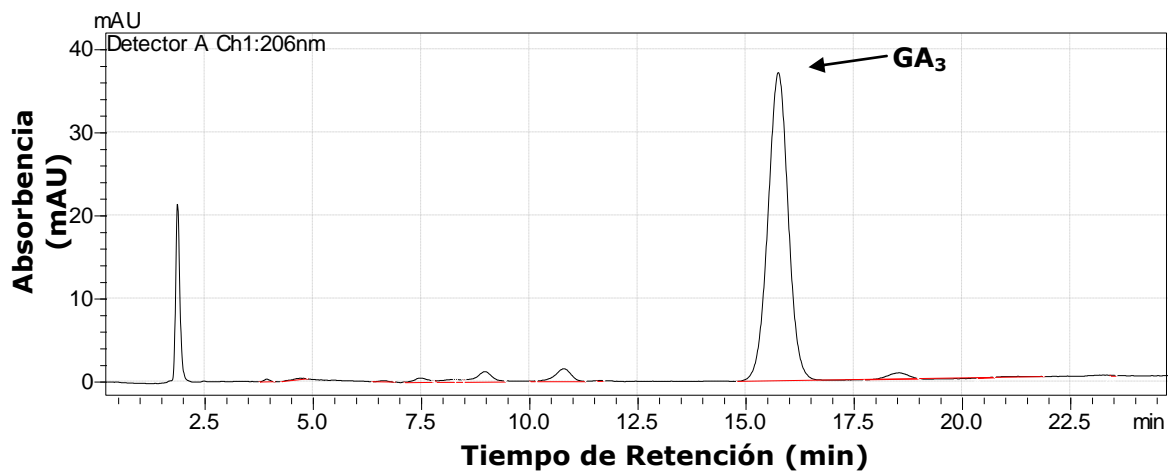


Figura 12. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 50 µg/mL (20µL). Tiempo de retención: 16 minutos.

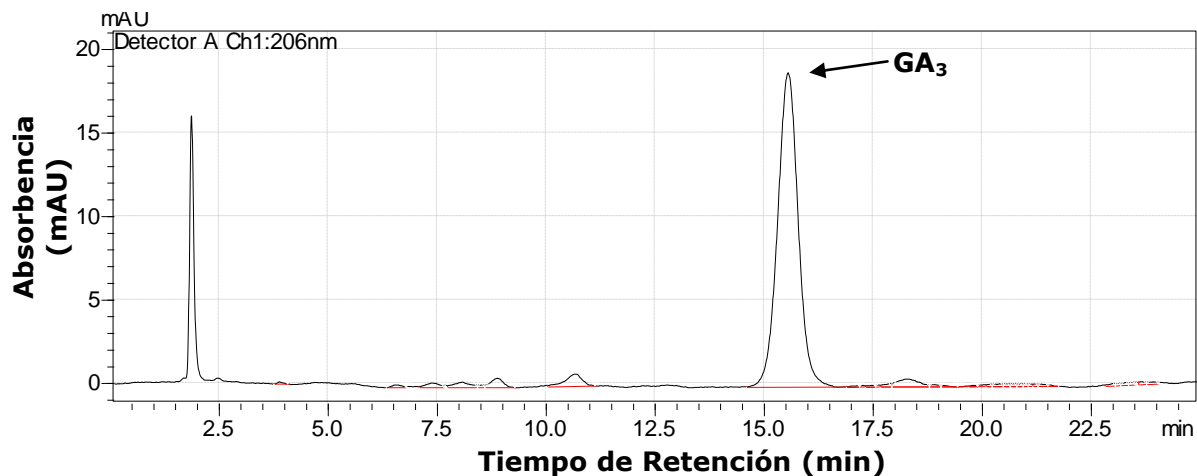


Figura 13. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 25 µg/mL (20µL). Tiempo de retención: 16 minutos.

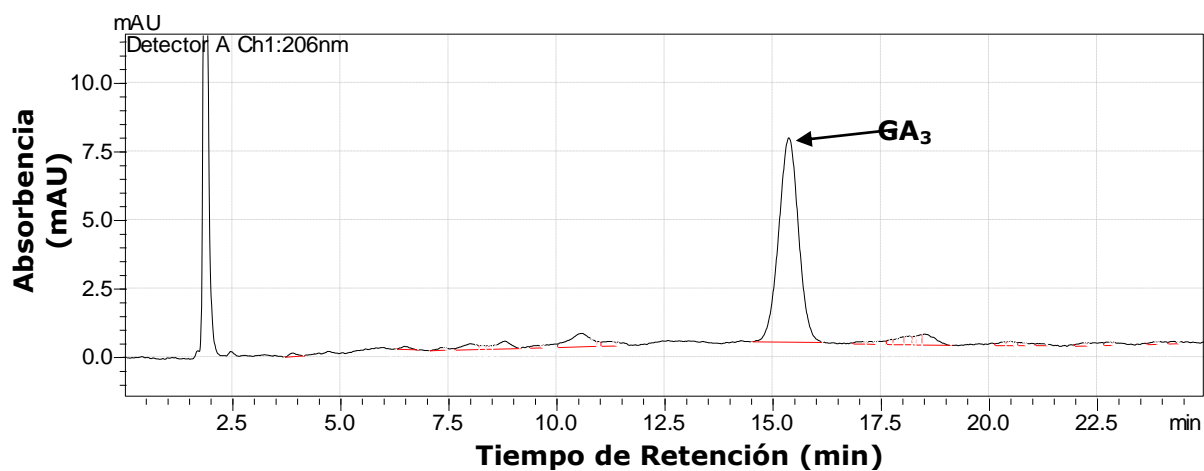


Figura 14. Cromatograma de estándar de Ácido Giberélico 10 µg/mL (20µL). Tiempo de retención: 16 minutos.

RESULTADOS

Efecto del Ácido Giberélico y Ácido Abscísico en los parámetros germinativos de los ejes y embriones de maíz

Porcentaje de Germinación.

Se sabe que Ácido Giberélico promueve la germinación de las semillas y que Ácido Abscísico favorece el estado de dormancia (Srivastava, 2002). Con la finalidad de comprobar lo reportado en la literatura y de conocer cuáles eran las concentraciones a las cuales las fitohormonas mostraban su mayor efecto; se determinó el porcentaje de germinación de los embriones de maíz a diferentes concentraciones de hormona, y para descartar que se tratase de un simple efecto osmótico, a diferentes concentraciones de osmolitos.

En el caso del tratamiento con Ácido Giberélico, se observó que sólo a la concentración de 5 μM se favoreció el porcentaje de embriones germinados (aproximadamente 20% más, Fig. 15A), coincidiendo con lo reportado en la literatura.

Respecto al tratamiento con Ácido Abscísico, ninguna de las concentraciones probadas mostró un porcentaje de germinación mayor al del control y tampoco lo hicieron las concentraciones utilizadas de osmolitos (Fig. 15B y 15C).

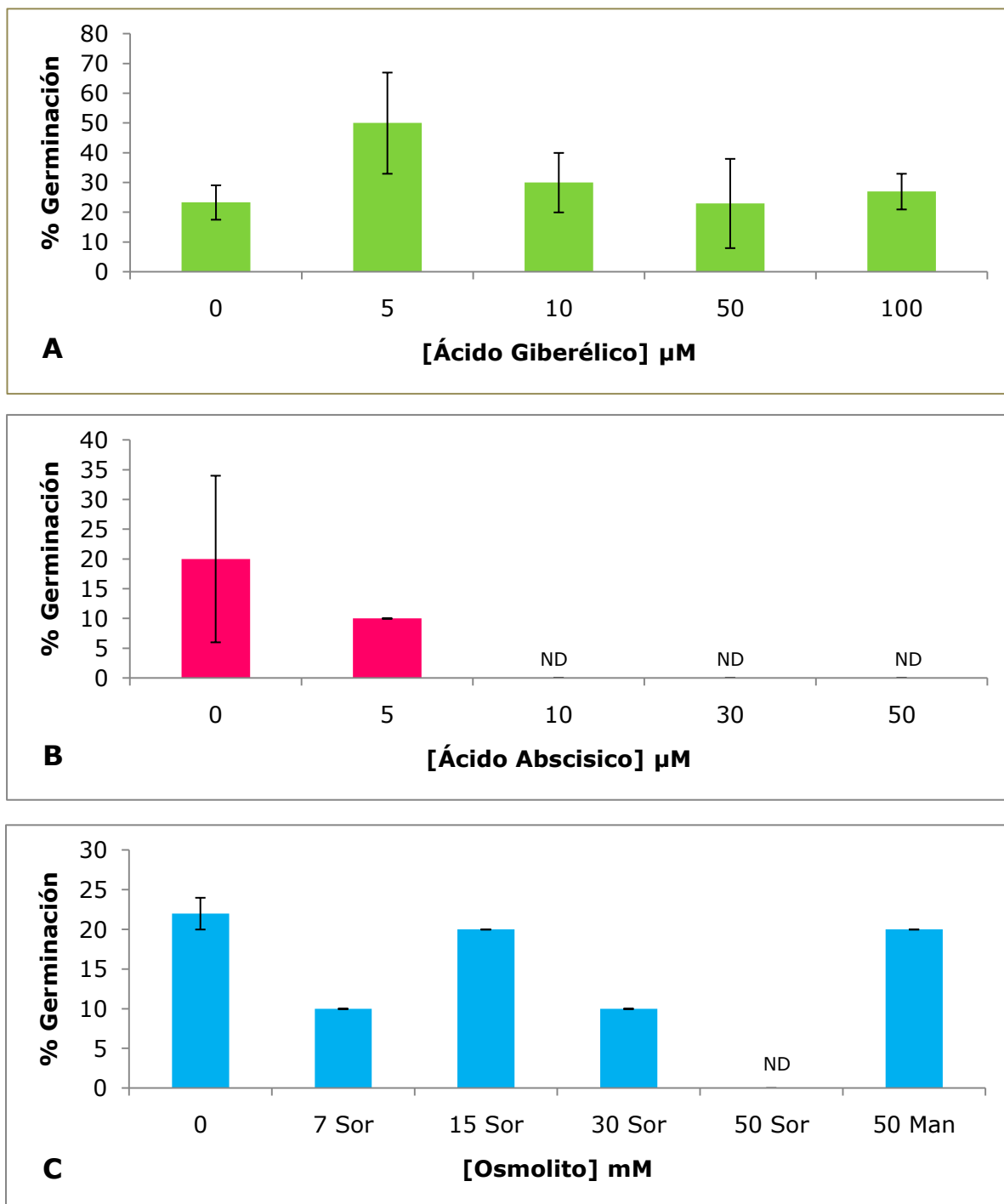


Figura 15. Efecto de la imbibición en A) Ácido Giberélico, B) Ácido Abscísico y C) Osmolitos sobre el porcentaje de germinación en embriones de maíz. Las barras de error indican \pm desviación estándar (n=2). ND= No Detectado

Captación de agua.

Por otra parte, también se midió el efecto de las diferentes concentraciones de fitohormonas sobre la captación de agua durante la germinación en los embriones de maíz. Se obtuvo que bajo el tratamiento con Ácido Giberélico (50 y 10 μM) la captación de agua fue ligeramente mayor que con respecto al control (aproximadamente 10%) excepto a la concentración de 100 μM ; y que con Ácido Abscísico, en todos los casos fue menor de 10 a 30% (Fig. 16).

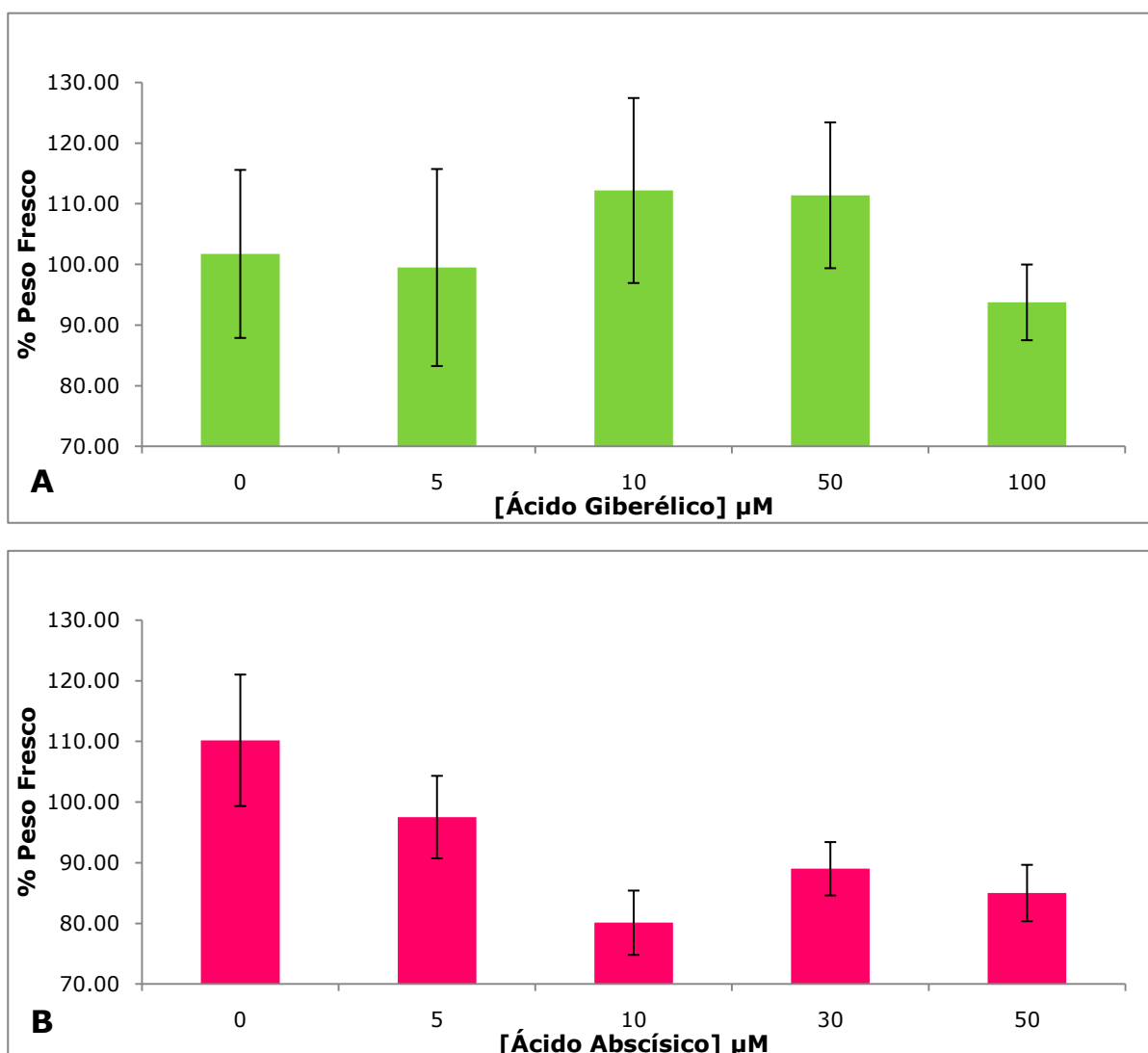


Figura 16. Efecto de la imbibición en A) Ácido Giberélico y B) Ácido Abscísico sobre la captación de agua en embriones germinados de maíz. Las barras de error indican \pm desviación estándar ($n=2$).

Cuantificación de los niveles internos de Ácido Abscísico y Ácido Giberélico.

La germinación y la dormancia son dos estados metabólicos distintos pero que depende de la interacción entre dos factores de crecimiento de las plantas el Ácido Giberélico y el Ácido Abscísico; lo que se conoce como balance GA_3/ABA (Bewley, 2010), dependiendo del valor de este se puede dirigir a la semilla hacia completar la germinación o detenerla y permanecer en estado de dormancia.

Se consideró que por lo anterior era necesario cuantificar los niveles internos de Ácido Giberélico y Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz, no solo en las condiciones normales sino también con la adición exógena que se hizo de las fitohormonas.

Los datos muestran que la presencia de Ácido Giberélico redujo los niveles internos de Ácido Abscísico en todas las concentraciones probadas (Fig. 17A), marcadamente a $50 \mu M$ donde la cantidad de Ácido Abscísico fue 60% menor en comparación con el control (fig. 17B); a concentraciones más pequeñas de Ácido Giberélico los niveles de Ácido Abscísico se vieron menos afectados.

La adición exógena de Ácido Abscísico a los embriones durante la germinación, mostró que en todas las concentraciones utilizadas, el contenido interno de Ácido Abscísico fue mayor con respecto al control, mostrando un máximo a la concentración de $30 \mu M$ (400%) (Fig. 18A y 18B).

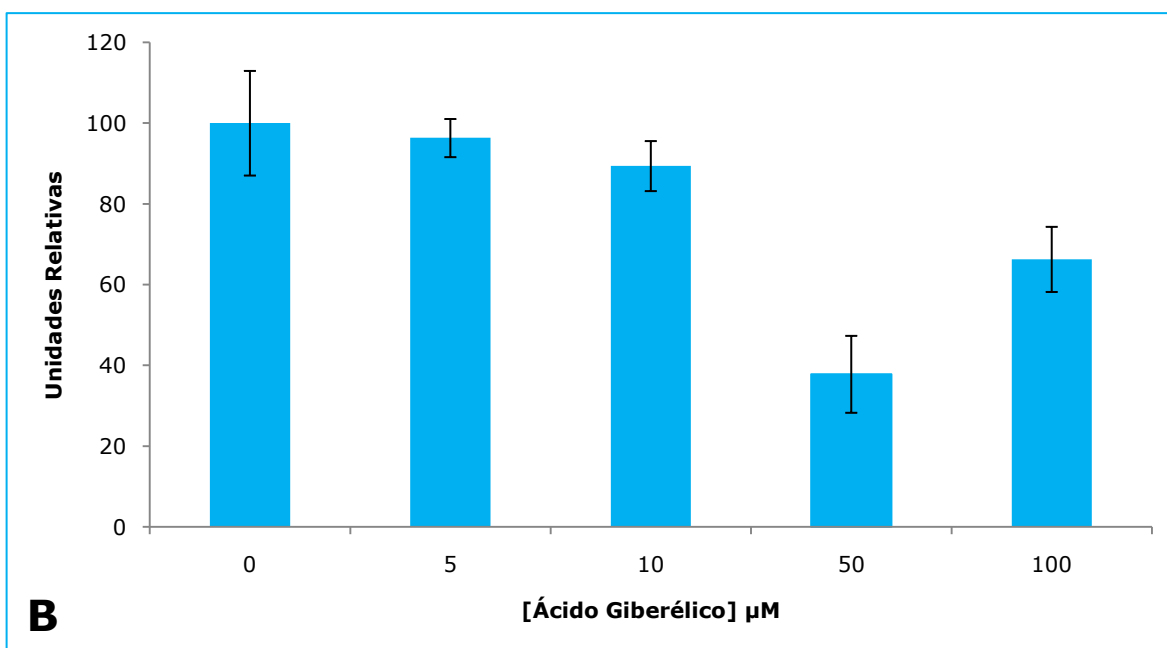
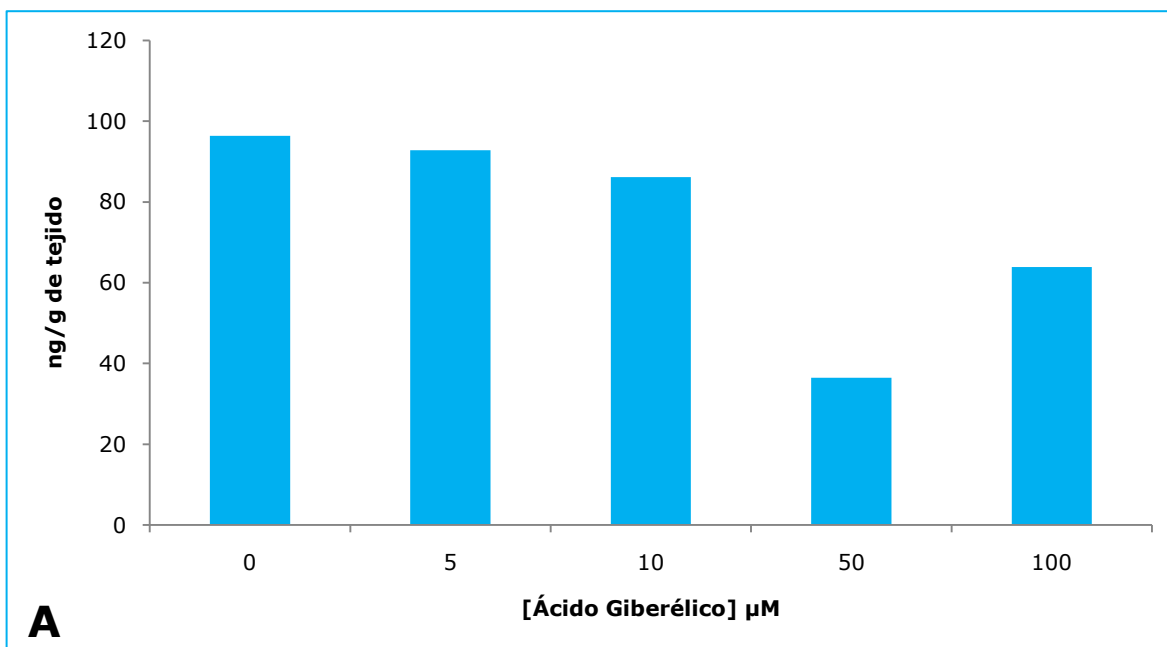


Figura 17. Efecto de la adición exógena de Ácido Giberélico sobre el contenido de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz. Contenido de Ácido Abscísico en A) ng/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de Ácido Abscísico presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar ($n=2$).

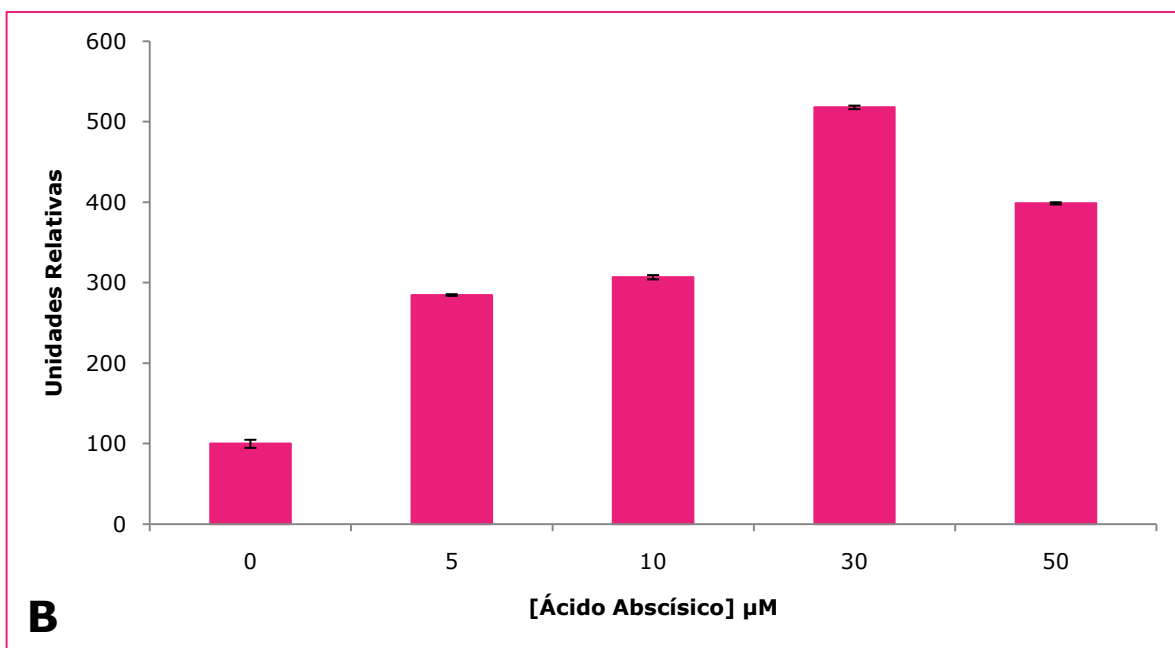
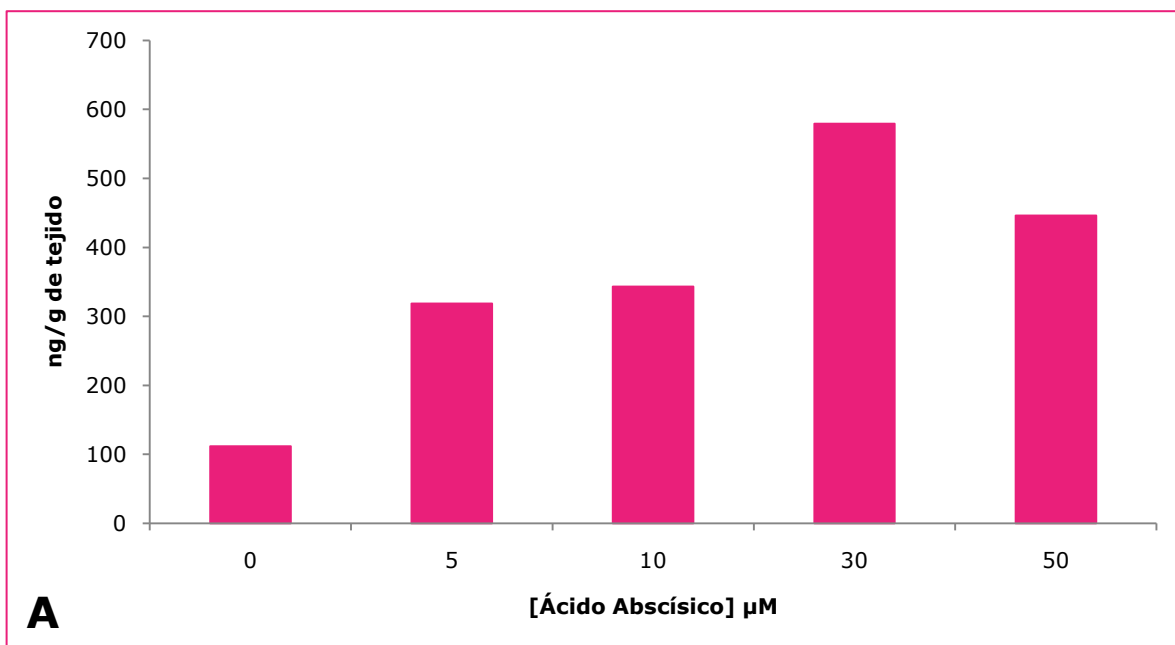


Figura 18. Efecto de la adición exógena de Ácido Abscísico sobre el contenido de Ácido Abscísico en embriones germinados de maíz. Contenido de Ácido Abscísico en A) ng/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de Ácido Abscísico presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar ($n=2$).

Para el caso de la cuantificación de Ácido Giberélico se encontró que solo en presencia de 100 μM de Ácido Giberélico hubo un incremento de aproximadamente 50% en los niveles internos de Ácido Giberélico, las demás concentraciones probadas provocaron una disminución cercana al 30% (Fig. 19B).

En el caso del tratamiento con Ácido Abscísico exógeno, se observó que bajo todas las concentraciones con las que se experimentó, hubo una disminución en los niveles internos de Ácido Giberélico (Fig. 20B).

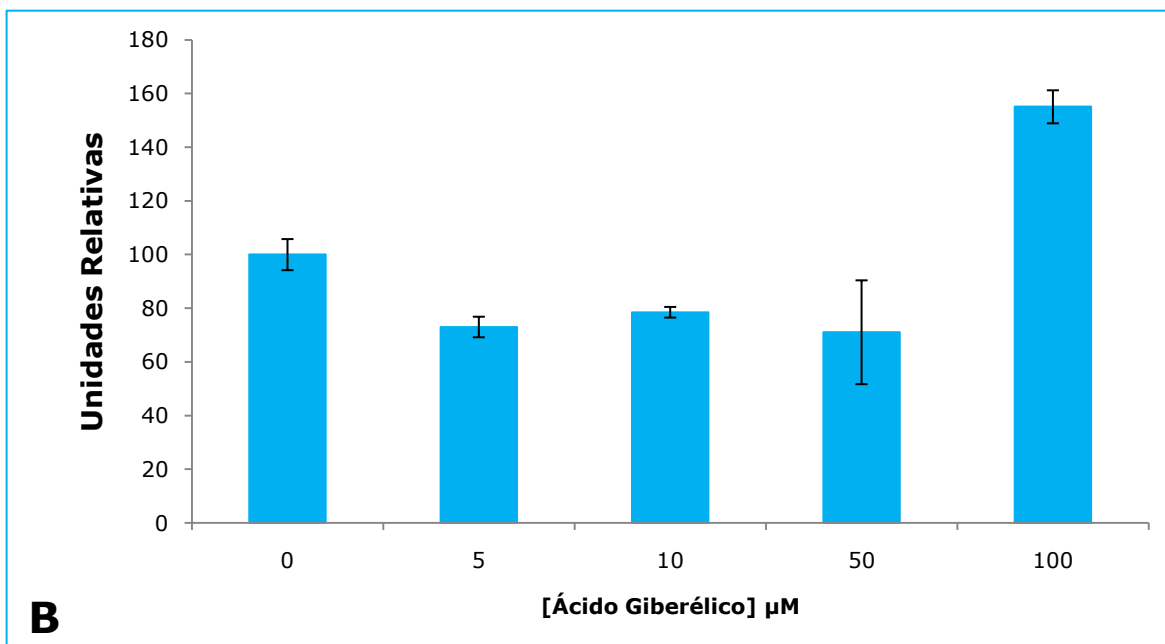
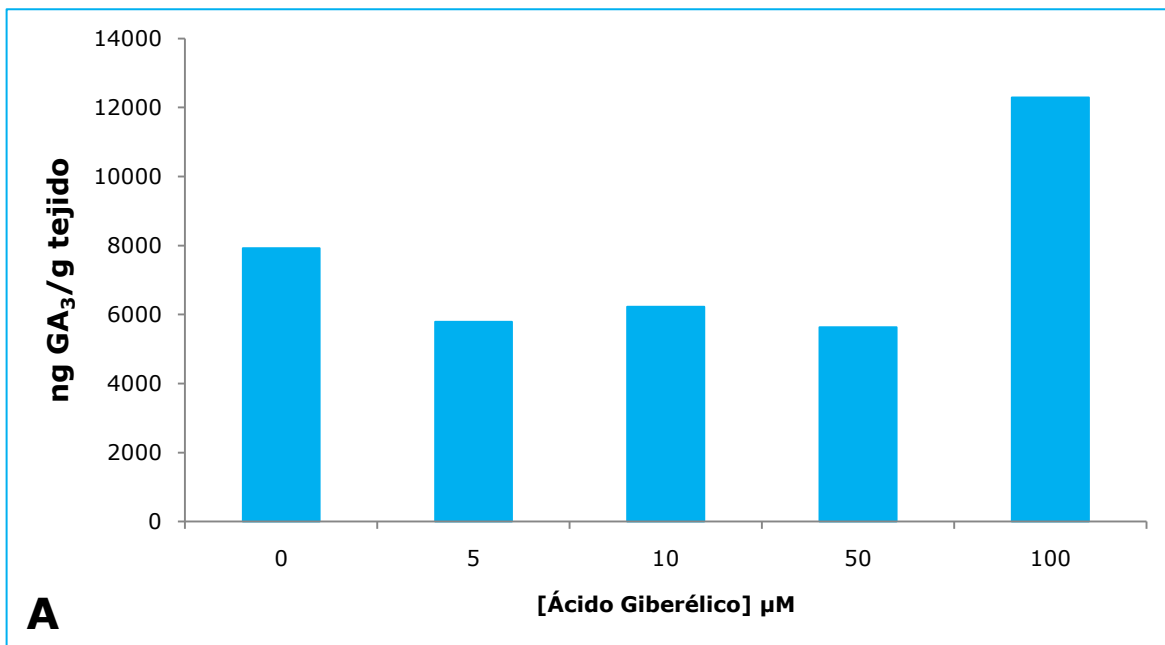


Figura 19. Efecto de la adición exógena de Ácido Giberélico sobre el contenido de Ácido Giberélico en embriones germinados de maíz. Contenido de Ácido Giberélico en A) ng/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de Ácido Giberélico presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar ($n=3$).

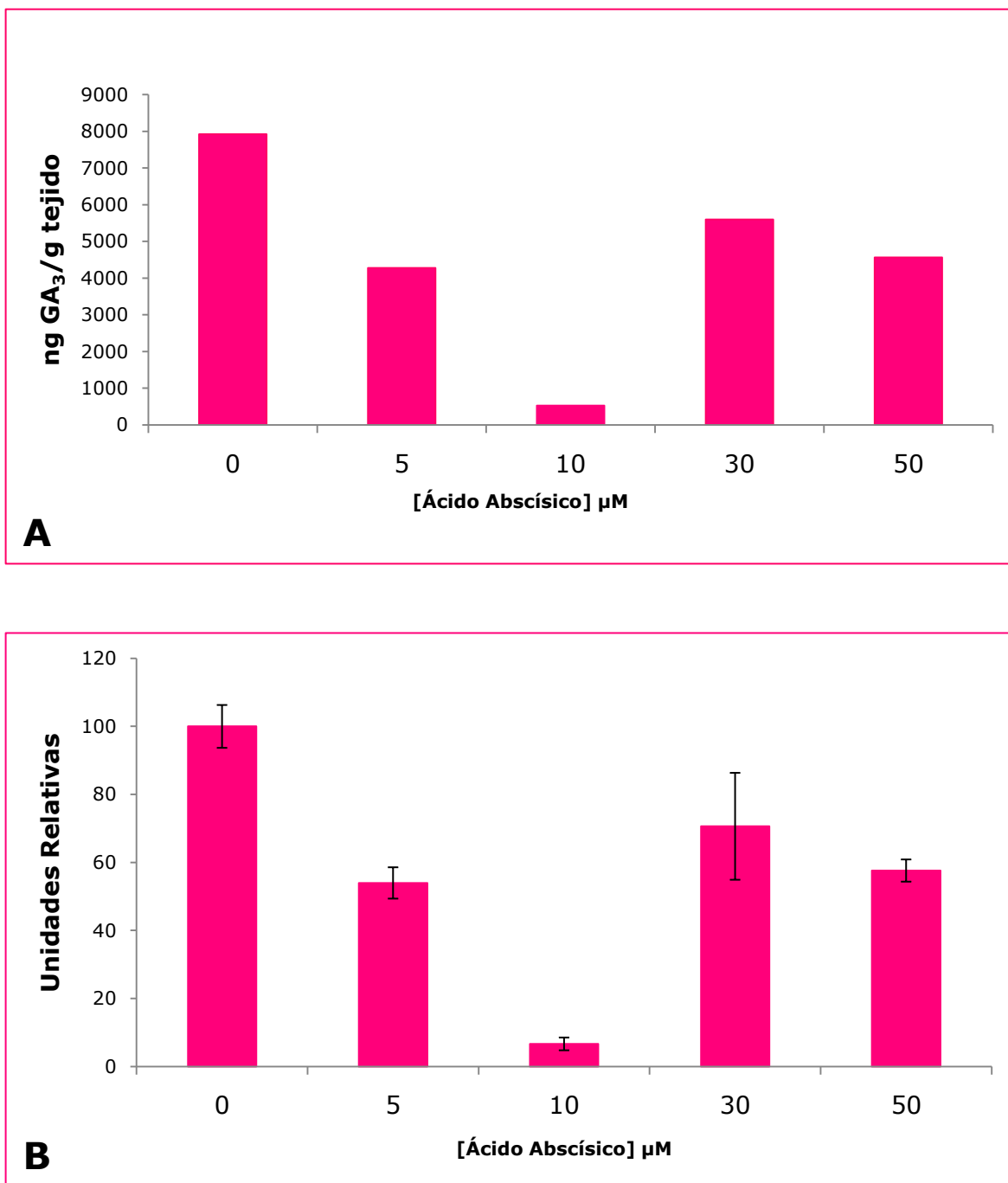


Figura 20. Efecto de Ácido Abscísico sobre el contenido de Ácido Giberélico en embriones germinados de maíz. Contenido de Ácido Giberélico en A) ng/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de Ácido Giberélico presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar ($n=3$).

Con los valores de Ácido Abscísico y Ácido Giberélico internos, se calculó el índice GA_3/ABA . Para ello se tomó como el índice normal la relación entre el porcentaje de Ácido Giberélico y el porcentaje de Ácido Abscísico obtenido en los embriones control a las 24 horas de germinación; es decir el índice normal fue de 1 (Fig. 21).

Índices arriba de 1 nos indican que los niveles internos de Ácido Giberélico son mayores que los de Ácido Abscísico, condiciones que promueven el estado de germinación de las semillas; mientras que, los índices menores a 1 señalan que la concentración endógena de Ácido Giberélico es menor respecto a la de Ácido Abscísico, condición que promueve el estado de dormancia de la semilla (Fig. 21).

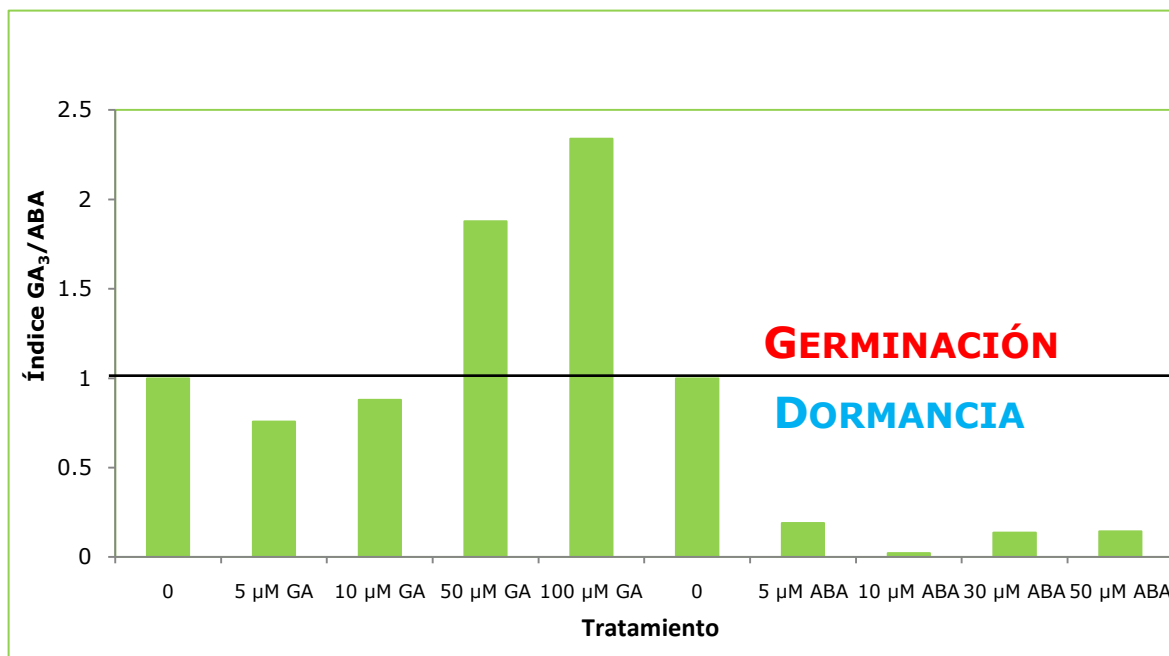


Figura 21. Índice GA_3/ABA . Se observa que solo a las concentraciones de 100 y 50 μM de Ácido Giberélico hay un desplazamiento marcado hacia el estado de germinación de la semilla. En el caso de Ácido Abscísico, bajo todas las concentraciones probadas se promueve el estado de dormancia.

Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 en tejido embrionario de maíz.

Teniendo como antecedente que el ácido giberélico promueve la germinación de las semillas y que lleva a la inducción de enzimas que promueven el metabolismo como son las α -amilasas y las endomanasas durante la fase III de la germinación (Sponsel *et ál.*, 2006; Srivastava, 2002), nos preguntamos si los niveles de los transportadores de carbohidratos también responden a los niveles cambiantes de Ácido Giberélico, adicionalmente en trabajos previos en el laboratorio se demostró que el transportador de sacarosa sólo se expresa en escutelos (Greaves-Fernández, 2001, Zavala-Zendejas, 2001); se decidió medir la expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* bajo diferentes concentraciones de Ácido Giberélico con el fin de conocer si este transportador es regulado a nivel hormonal y si el Ácido Giberélico es capaz de promover su expresión en otro tipo de tejido embrionario como son los ejes embrionarios.

Utilizando los oligonucleótidos específicos para la amplificación del transportador de sacarosa *ZmSUT1*, se pudieron observar bandas de aproximadamente 490 pares de bases (Fig. 22).

Se encontró que a las concentraciones de 100 μM y 50 μM de Ácido Giberélico hubo un ligero aumento de transcrito en los embriones de maíz teniendo un pico máximo de expresión 10% más elevada con respecto al control (Fig. 23), pese a que ambas concentraciones de Ácido Giberélico no fueron las que indujeron el mayor porcentaje de germinación. Por debajo de esta concentración, se observó una disminución gradual del transcrito *ZmSUT1* hasta lograr aproximarse a los niveles de transcrito presentes en el control.

Para el caso de los ejes embrionarios se demostró que bajo ningún tratamiento con Ácido Giberélico se logró provocar la expresión del transportador de sacarosa luego de 24 horas de imbibición (Fig. 22).

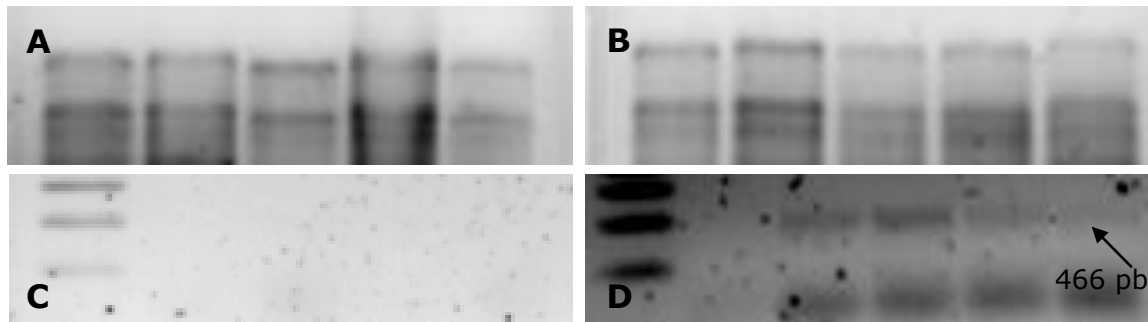


Figura 22. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* bajo diferentes concentraciones de Ácido Giberélico. En C) ejes y D) embriones de maíz. Se muestran los geles de agarosa de RNA donde se demuestra su integridad y que la cantidad de éste utilizado para la reacción de RT-PCR para A) ejes y B) embriones de maíz era similar en cada tratamiento.

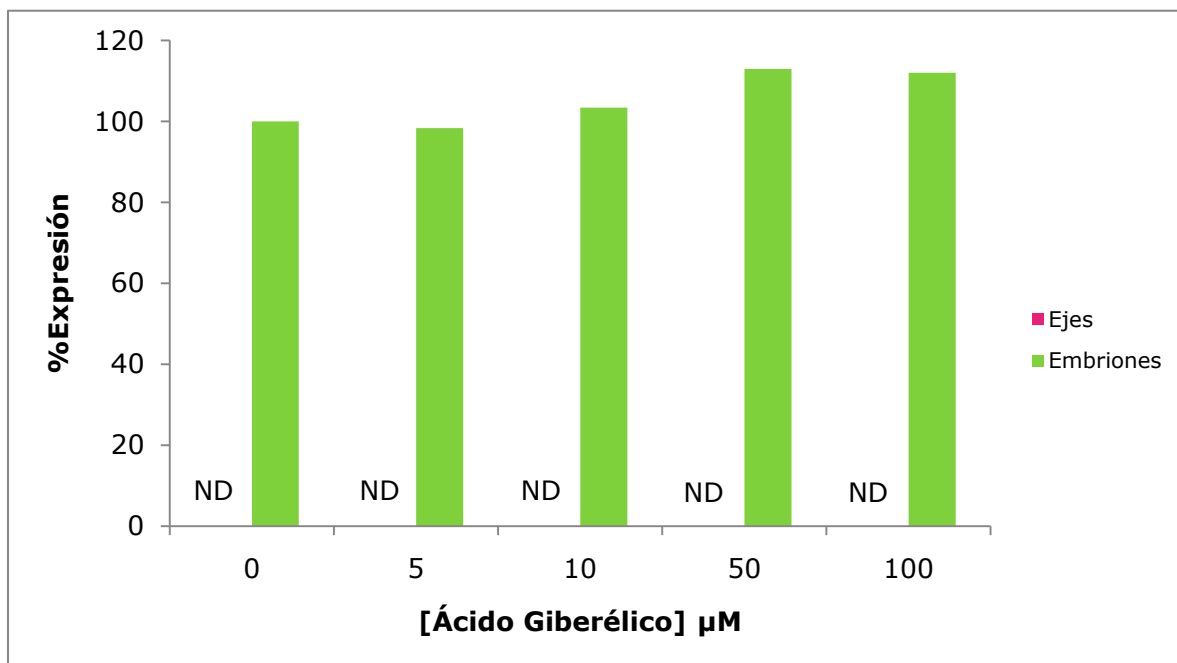


Figura 23. Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión de *ZmSUT1* en ejes embrionarios y embriones de maíz. Densitometría de las bandas encontradas correspondientes al transportador de sacarosa *ZmSUT1*. Se tomó como 100% de expresión la densidad de la banda de los controles de ejes y embriones. ND= No Detectado.

Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT en tejido embrionario de maíz.

Se sabe que Ácido Giberélico induce la síntesis de factores de transcripción que promueven la expresión de α -amilasas (Sponsel *et ál.*, 2006; Zhen *et ál.*, 2006) lo que provoca que existan cambios en los niveles de carbohidratos (principalmente hexosas) lo que hace suponer que también hay cambios en su transporte. Por esta razón, se investigó si los niveles del transcrito del transportador putativo de hexosas *ZmHT*, se modificaban por la adición exógena de Ácido Giberélico.

Se observó que el nivel de transcrito de *ZmHT* en embriones de maíz tratados con Ácido Giberélico disminuye en un 20% a la concentración de 100 μM , presenta un ligero incremento en 50 μM y vuelve a disminuir cerca de un 15% en las concentraciones de 10 y 5 μM (Fig.24B y D y 25).

En los ejes embrionarios se puede distinguir que respecto al control hay un incremento a una concentración de 100 μM de Ácido Giberélico, y una disminución para las otras concentraciones probadas, siendo más pronunciada en la concentración de 5 μM , cerca del 20% (Fig. 24A y C y 25).

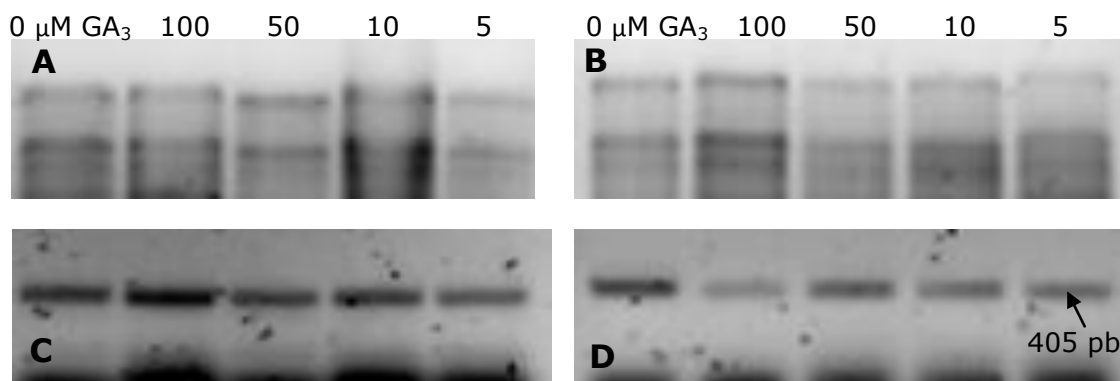


Figura 24. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador putativo de hexosas *ZmHT* en presencia de diferentes concentraciones de Ácido Giberélico. En C) ejes y D) embriones de maíz. También se presentan los geles de agarosa de RNA donde se observa su integridad y que la cantidad de éste utilizado para la reacción de RT-PCR para A) ejes y B) embriones de maíz era similar en cada tratamiento.

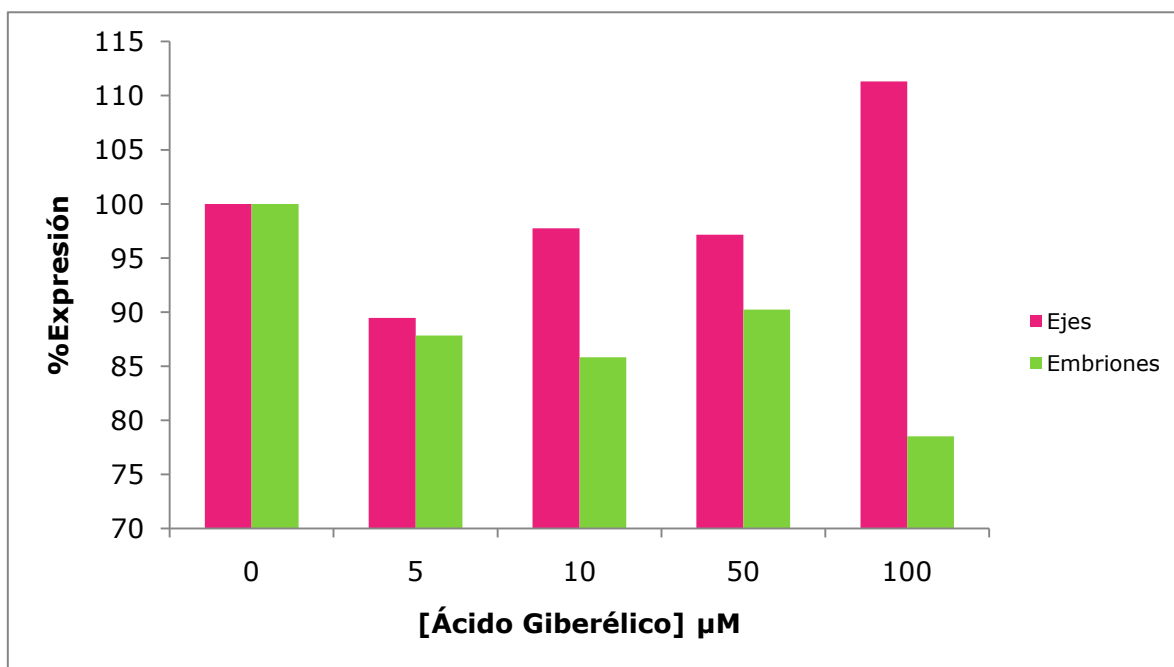


Figura 25. Efecto de Ácido Giberélico sobre la expresión de *ZmHT* en embriones y ejes embrionarios de maíz. Densitometría de las bandas encontradas correspondientes al transportador putativo de hexosas *ZmHT*. Se tomó como 100% de expresión la densidad de la banda de los controles de ejes y embriones.

Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 en tejido embrionario de maíz.

Se conoce que Ácido Abscísico detiene el proceso de germinación de las semillas (Srivastava, 2002) y ya que Ácido Giberélico había modificado el nivel del transcrito de los transportadores de sacarosa, era probable que la hormona antagonista también afectara el nivel de los transcritos para el transportador (Fig. 26).

Ya que en estudios previos, no se había detectado la presencia del transportador de sacarosa *ZmSUT1* en ejes embrionarios, en esta ocasión se decidió estudiar el efecto de Ácido Abscísico para comprobar si era capaz de inducir la expresión del transportador de sacarosa en ejes embrionarios de maíz.

En embriones de maíz, Ácido Abscísico provocó una disminución en la expresión del transcrito de *ZmSUT1* a las concentraciones de 50, 30 y 10 μM , teniendo el mínimo en 30 μM (30% por debajo con respecto al control) mientras que a 5 μM se observa un aumento con el cual se logró restablecer el nivel de expresión presente en los embriones control (Fig. 26D y 27).

Se encontró que Ácido Abscísico tampoco es capaz de inducir la expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* en ejes embrionarios de maíz bajo ninguna de las concentraciones probadas (Fig. 26C y 27).

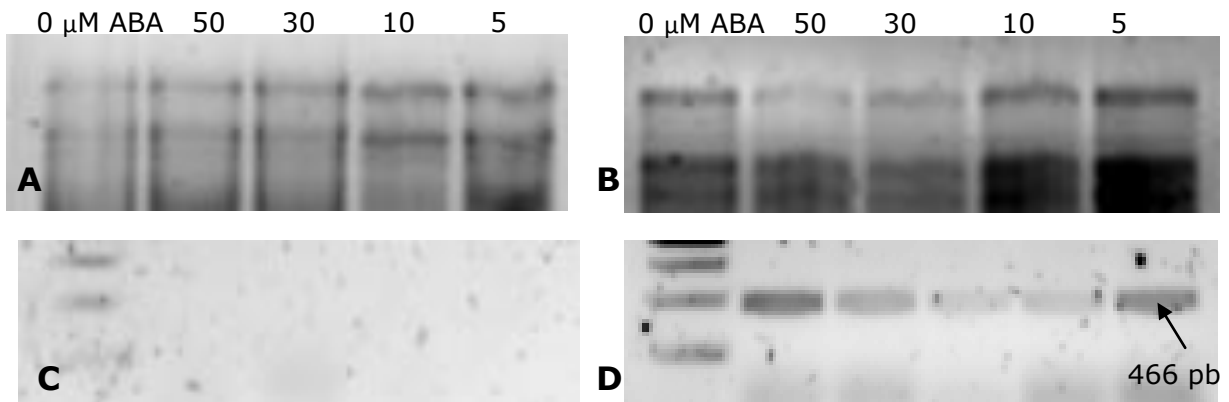


Figura 26. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* bajo diferentes concentraciones de Ácido Abscísico. En C) ejes y D) embriones de maíz. Se muestran los geles de agarosa de RNA donde se observa su integridad y que la cantidad de éste utilizado para la reacción de RT-PCR para A) ejes y B) embriones de maíz era similar en cada tratamiento.

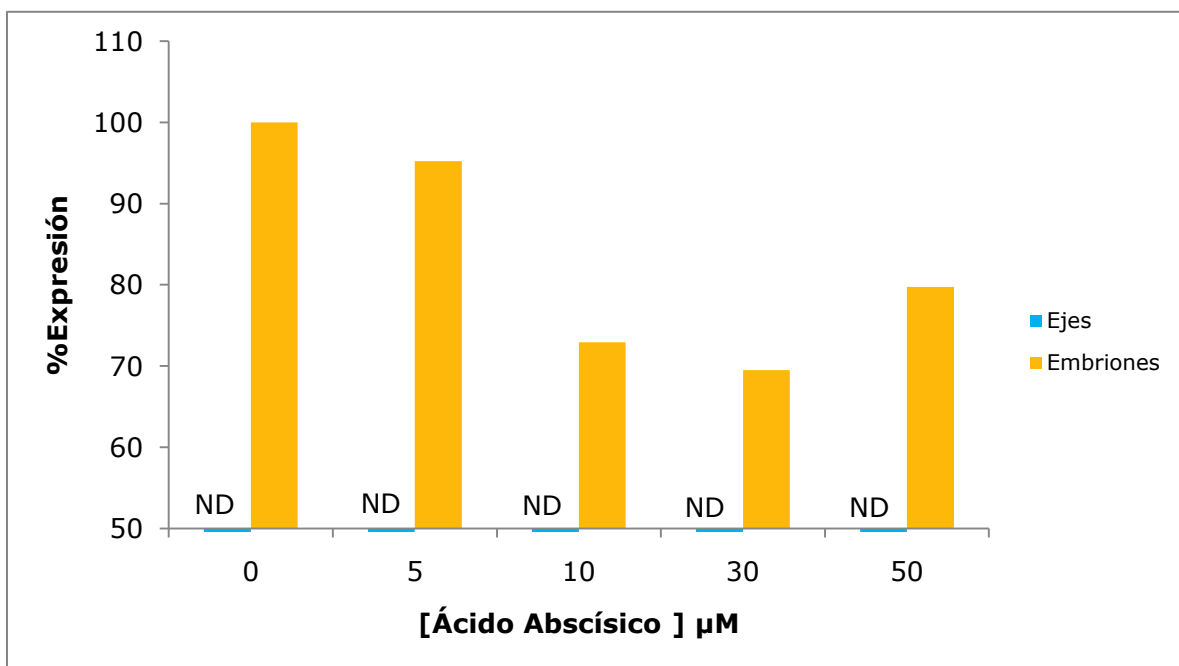


Figura 27. Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión de *ZmSUT1* en ejes y embriones de maíz. Densitometría de las bandas encontradas correspondientes al transportador de sacarosa *ZmSUT1*. Se tomó como 100% de expresión la densidad de la banda de los controles de ejes y embriones. ND= No Detectado.

Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT en tejido embrionario de maíz.

Se tiene evidencia de que Ácido Abscísico inhibe el proceso de germinación de las semillas y que la adición exógena de glucosa (en baja concentración) permite la germinación de las semillas de *Arabidopsis* contrarrestando el efecto de Ácido Abscísico (Gibson *et ál.*, 2003). Esto demuestra que existe una relación estrecha entre Ácido Abscísico y el metabolismo de los carbohidratos durante la germinación.

Teniendo como base lo anterior, sugerimos que Ácido Abscísico es capaz de alterar los niveles de expresión del transportador putativo de hexosas *ZmHT* en los diferentes tejidos embrionarios, siendo este uno de los mecanismos a través del cual se relaciona el metabolismo de los carbohidratos y Ácido Abscísico.

Con este propósito, se determinó el efecto de la adición de Ácido Abscísico en el nivel transcripcional de *ZmHT* en ejes y embriones de maíz (Fig. 28).

Los resultados muestran que Ácido Abscísico no altera de manera importante los niveles de expresión de *ZmHT* en los embriones, solo a la concentración de 5 μM , donde se ve una disminución cercana al 20% con respecto al control (Fig. 28C y 29).

Para los ejes embrionarios, se observó una disminución especialmente en 5 μM dónde es aproximadamente un 30% menor con respecto al control (Fig. 28D y 29).

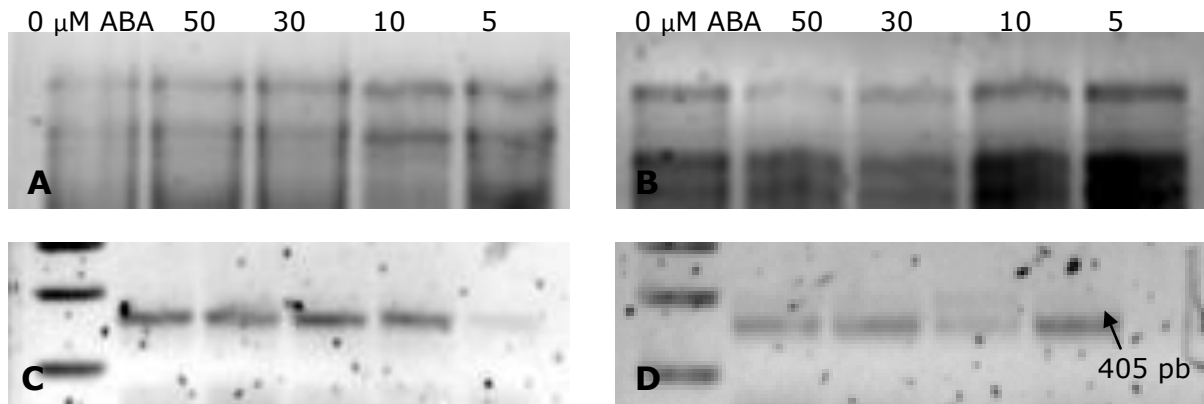


Figura 28. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador putativo de hexosas *ZmHT* en diferentes concentraciones de Ácido Abscísico. En C) ejes y D) embriones de maíz. Se muestran los gels de agarosa de RNA donde se observa su integridad y que la cantidad de éste utilizado para la reacción de RT-PCR para A) ejes y B) embriones de maíz era similar en cada tratamiento.

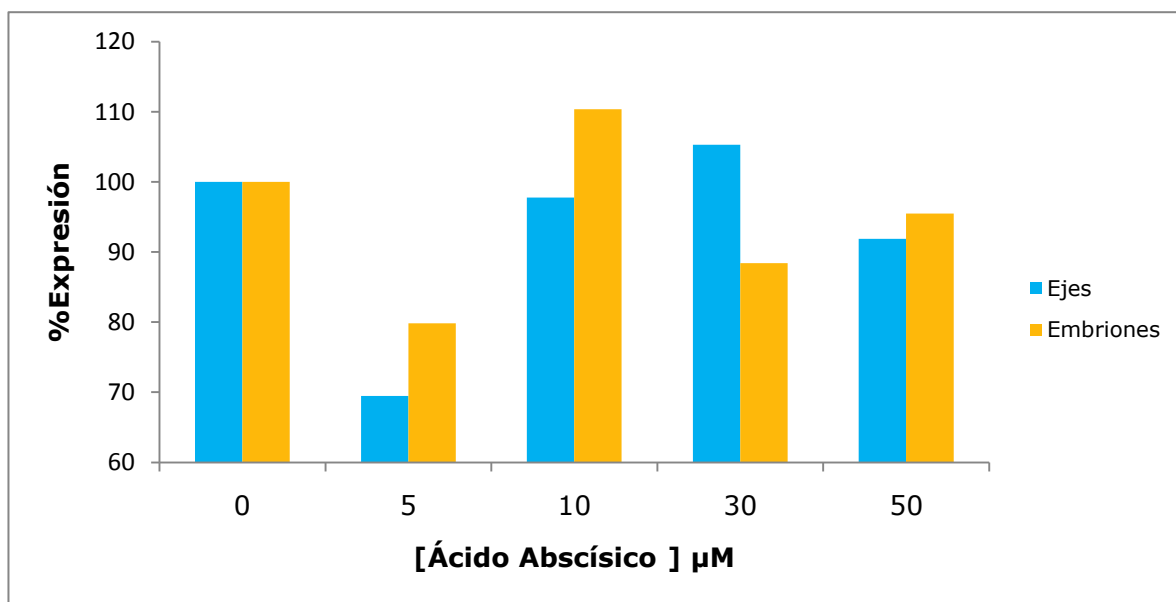


Figura 29. Efecto de Ácido Abscísico sobre la expresión de *ZmHT* en ejes y embriones de maíz. Densitometría de las bandas encontradas correspondientes al transportador putativo de hexosas *ZmHT*. Se tomó como 100% de expresión la densidad de la banda de los controles de ejes y embriones.

Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 en tejido embrionario de maíz.

Debido a que Ácido Abscísico es una hormona que suele presentarse o incrementarse en respuesta al estrés hídrico, déficit hídrico o salino, se decidió medir el efecto que el sorbitol producía en la expresión de los transportadores de carbohidratos en los tejidos embrionarios de maíz. Además se conoce que a lo largo de la germinación, los tejidos embrionarios sufren cambios en la presión osmótica al pasar del estado seco al hidratado (Bove *et ál.*, 2001), provocando también cambios en la expresión de algunas proteínas a nivel transcripcional.

Se utilizaron diferentes concentraciones de sorbitol con el fin de modificar la presión osmótica del medio y determinar si las variaciones en los niveles de transcripción de *ZmSUT1* (Fig. 30) se debían a la acción directa de las fitohormonas o si bien era meramente un efecto osmótico. El manitol fue utilizado también para establecer si los efectos observados se debían al sustrato (sorbitol) o a la presión osmótica. A una concentración de 50 mM el sorbitol induce la expresión de *ZmSUT1* en un 50% en embriones de maíz y sorpresivamente se encontró que debajo de esta concentración, los niveles de transcripción disminuyeron, especialmente a una concentración de sorbitol 7 mM, donde el porcentaje de expresión se reduce a un 50% con respecto al control. El manitol, un isómero del sorbitol disminuye la expresión de *ZmSUT1* cerca de un 30% (Fig. 30D y 31).

Teníamos como antecedente (Gómez-Calderas, 2008) que el sorbitol era capaz de inducir la expresión de *ZmSUT1* en los ejes embrionarios sin embargo, en nuestros experimentos no se observó ningún efecto en todas las concentraciones de empleadas de sorbitol (Fig. 30C y 31).

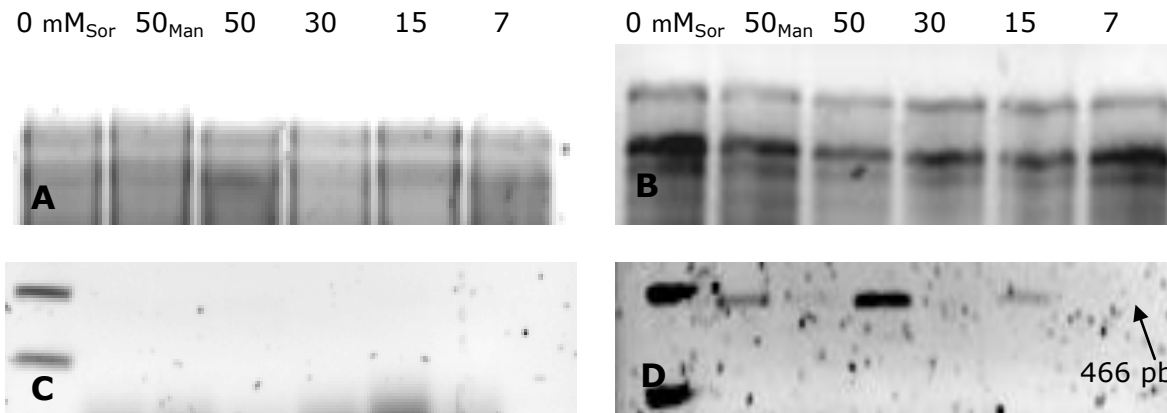


Figura 30. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador de sacarosa *ZmSUT1* bajo diferentes concentraciones de sorbitol y manitol con el fin de variar la presión osmótica del medio. En C) ejes y D) embriones de maíz. Se muestran los geles de agarosa de RNA donde se observa su integridad y que la cantidad de éste utilizado para la reacción de RT-PCR era similar en cada tratamiento para A) ejes y B) embriones de maíz.

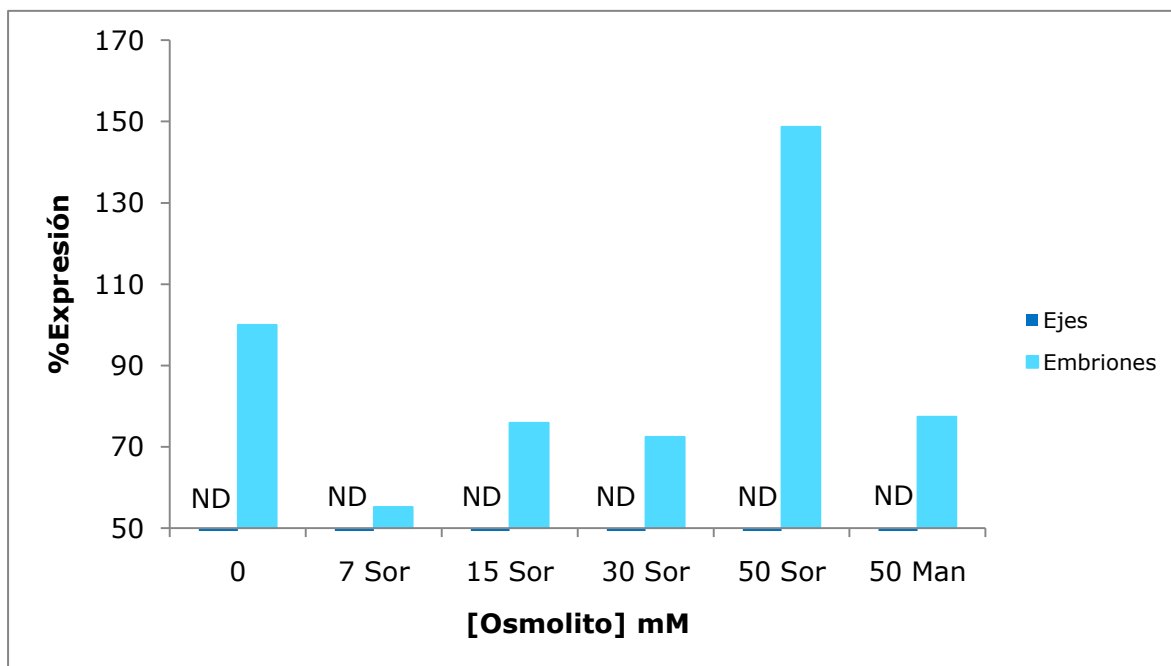


Figura 31. Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión de *ZmSUT1* en ejes y embriones de maíz. Densitometría de las bandas encontradas correspondientes al transportador de sacarosa *ZmSUT1*. Se tomó como 100% de expresión la densidad de la banda de los controles de ejes y embriones.

Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT en tejido embrionario de maíz.

Demostramos que los niveles de Ácido Abscísico modificaron la expresión del transcrito de *ZmHT*. Estos resultados sugieren que el efecto de la presión osmótica podría también mostrar una modificación, por lo que se determinó el efecto de diferentes concentraciones de sorbitol sobre la expresión de *ZmHT* (Fig. 32).

En el caso de los embriones, con 50 mM de manitol se observa una ligera disminución en los niveles de expresión y una inhibición gradual de hasta un 50% en 7 mM sorbitol (Fig. 32D y 33).

En los ejes embrionarios, se encontró un incremento de un 45% en 50 mM de sorbitol y del 70% bajo 50 mM de manitol (Fig. 32C y 33).

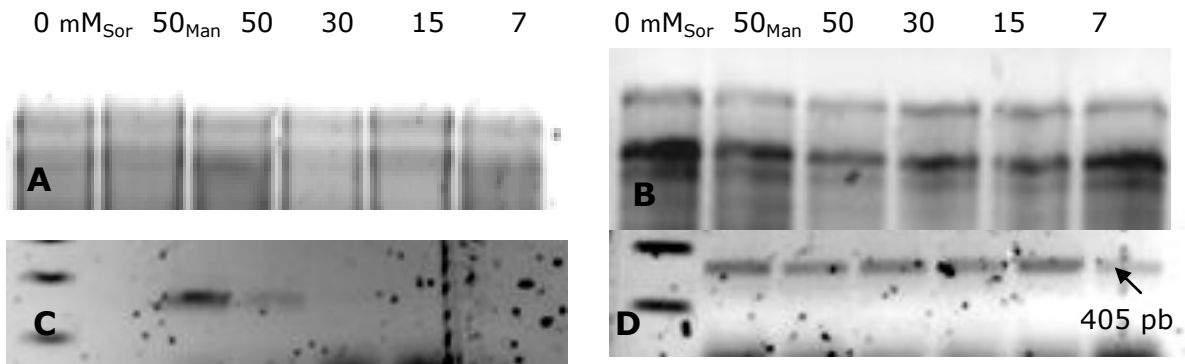


Figura 32. Análisis por RT-PCR de la expresión del transportador putativo de hexosas *ZmHT* en diferentes concentraciones de manitol y sorbitol. En C) ejes y D) embriones de maíz. Se muestran los geles de agarosa de RNA donde se observa su integridad y que la cantidad de éste utilizado para la reacción de RT-PCR para A) ejes y B) embriones de maíz era similar en cada tratamiento.

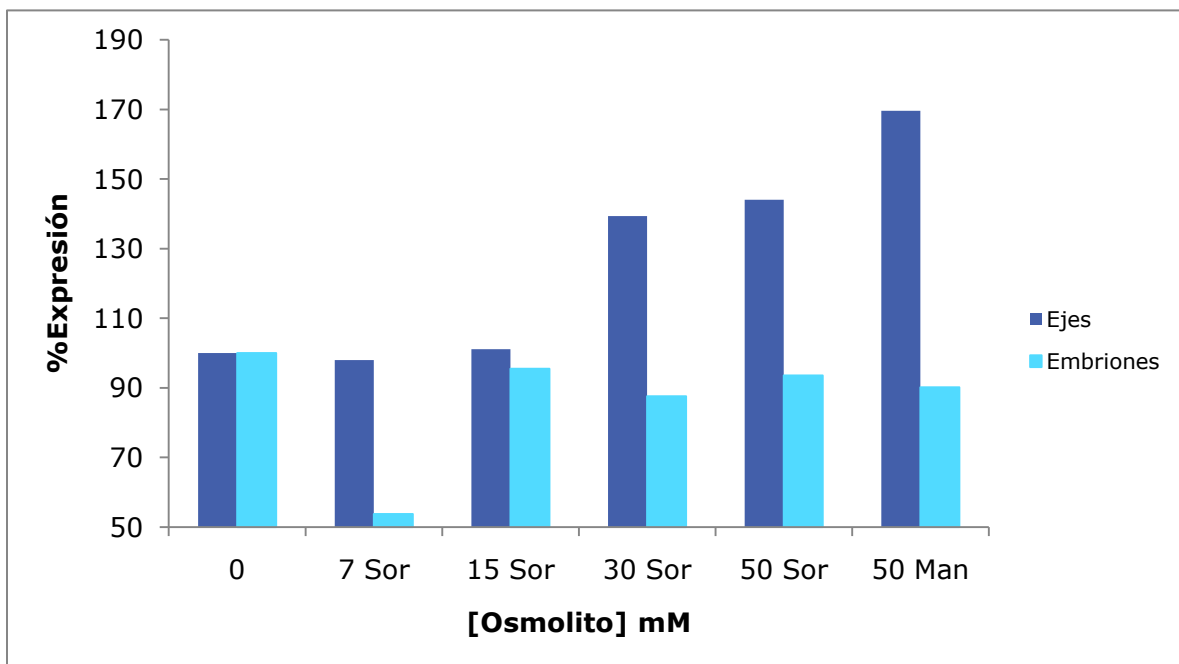


Figura 33. Efecto de la Presión Osmótica sobre la expresión de *ZmHT* en ejes y embriones de maíz. Densitometría de las bandas encontradas correspondientes al transportador putativo de hexosas *ZmHT*. Se tomó como 100% de expresión la densidad de la banda de los controles de ejes y embriones.

Cuantificación de carbohidratos solubles: Sacarosa, Glucosa y Fructosa.

Las interacciones entre los carbohidratos y las hormonas pueden ser directas o indirectas, las fitohormonas pueden afectar el metabolismo y/o transporte de los carbohidratos (Gibson *et ál.*, 2003). Sabiendo que Ácido Giberélico promueve la síntesis de α -amilasas (Sponsel *et ál.*, 2006) y que Ácido Abscísico la inhibe, además de que los carbohidratos a determinadas concentraciones pueden actuar como moléculas señal y que sus concentraciones cambian a lo largo de la germinación (Martínez-Marcelo, 2008); se decidió que era necesario cuantificar el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa bajo los diferentes tratamientos con Ácido Abscísico, Ácido Giberélico y sorbitol con el fin de establecer si había alteraciones en el metabolismo del carbono.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Ácido Giberélico en los embriones germinados de maíz, produjo un aumento en el contenido de glucosa ($\approx 100\%$ respecto al control) a la concentración de $50 \mu\text{M}$ (Fig 34); para las otras concentraciones probadas hubo disminución especialmente para la concentración de $100 \mu\text{M}$ de Ácido Giberélico 50% menos con respecto al control, sugiriendo que esta es transportada de manera eficiente o bien está siendo metabolizada por las células del embrión para su crecimiento.

De manera similar los niveles de fructosa disminuyeron entre 20 a 70%, sin embargo el mayor decremento en la concentración de fructosa ocurrió a la concentración menor de Ácido Giberélico añadido, excepto en $5 \mu\text{M}$ en el que el contenido de fructosa se incremento hasta un 150% con respecto al control.

De manera interesante, el contenido de sacarosa en presencia de Ácido Giberélico fue siempre mayor con respecto al control desde un 70% hasta un 180%; lo cual podría deberse a una deficiencia en su hidrólisis, en su transporte, a un incremento en su síntesis o una combinación de las posibilidades mencionadas (Fig. 34).

Bajo el tratamiento con Ácido Abscísico, se observa que el contenido de glucosa es menor en todas las concentraciones probadas desde un 10% hasta un 40% veces con respecto al control.

De manera similar, aunque no observan diferencias significativas, se encontró que los niveles de fructosa son siempre menores en comparación con el control desde un 30% hasta un 80%.

En el caso del contenido de sacarosa, no se observan diferencias significativas con respecto al control, excepto por la concentración de 30 μM donde el nivel de sacarosa es 50% menor (Fig. 35).

Finalmente, respecto al efecto de los osmolitos sobre los contenidos de carbohidratos se encontró que a una concentración de 50 mM de manitol los niveles de glucosa se incrementan ligeramente en un 30%, y que al disminuir la presión osmótica también disminuye el contenido de glucosa desde un 20% hasta un 50%.

De manera contraria, los niveles de fructosa muestran incrementos de un 200% hasta un 600% bajo todas las concentraciones probadas de sorbitol y manitol. Esto podría deberse a un aumento en la hidrólisis de sacarosa, cuyo contenido muestra una ligera disminución, excepto en 7mM de sorbitol donde se muestra una elevación de 30% (Fig. 36), aunque los contenidos de glucosa no se modifican. Otra explicación es

que la fructosa no sea eficientemente metabolizada o transportada por lo que se empieza a acumular.

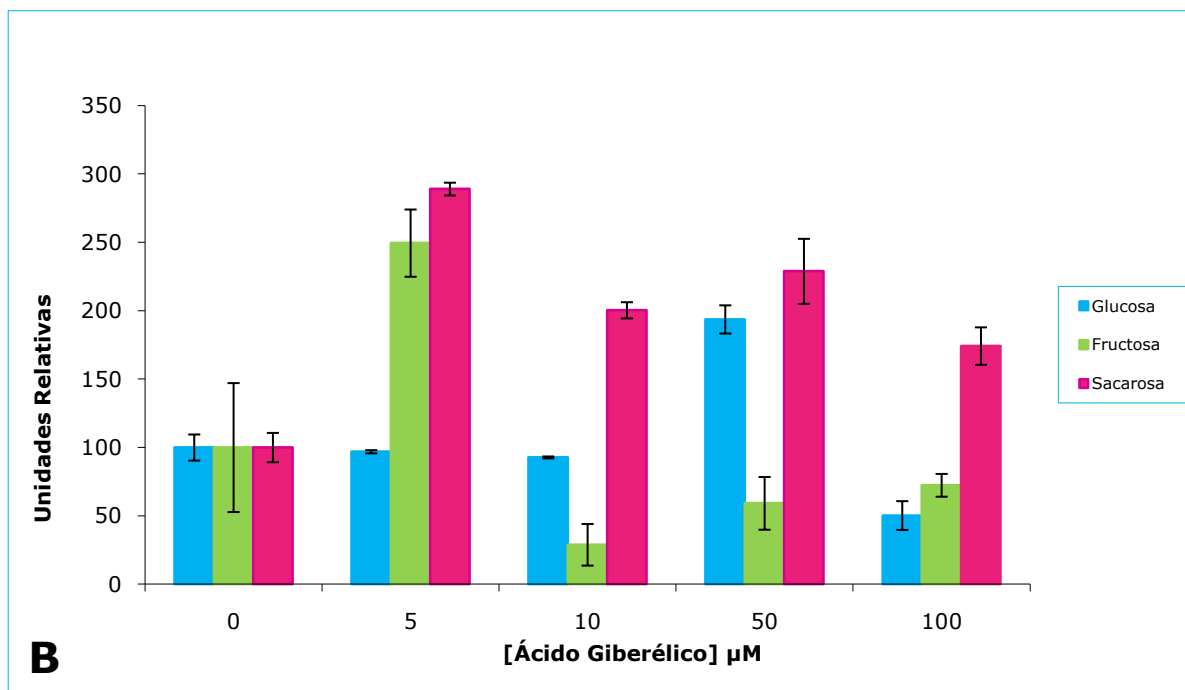
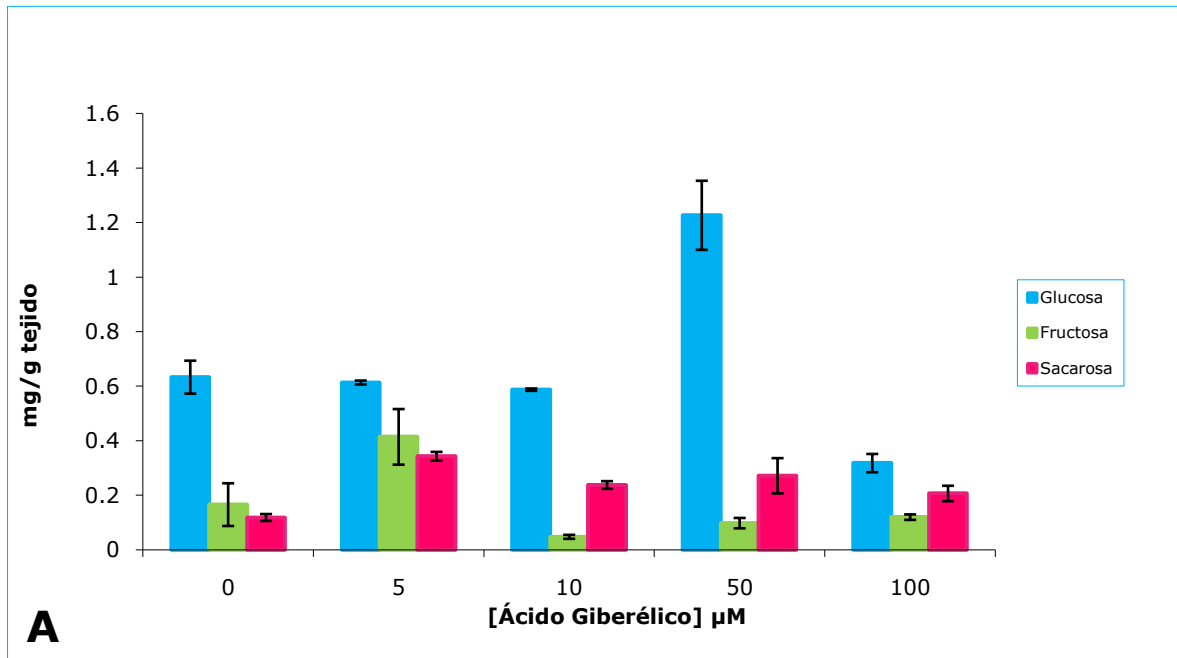


Figura 34. Efecto de Ácido Giberélico sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en embriones germinados de maíz. Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en A) mg/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar (n=2).

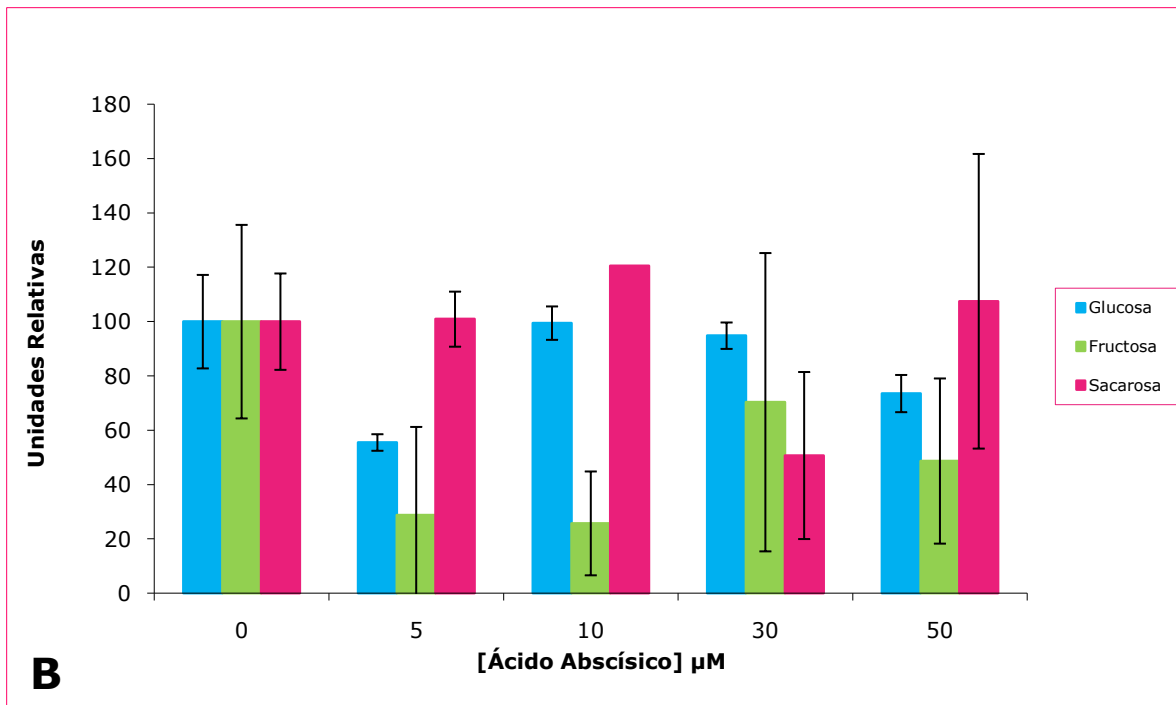
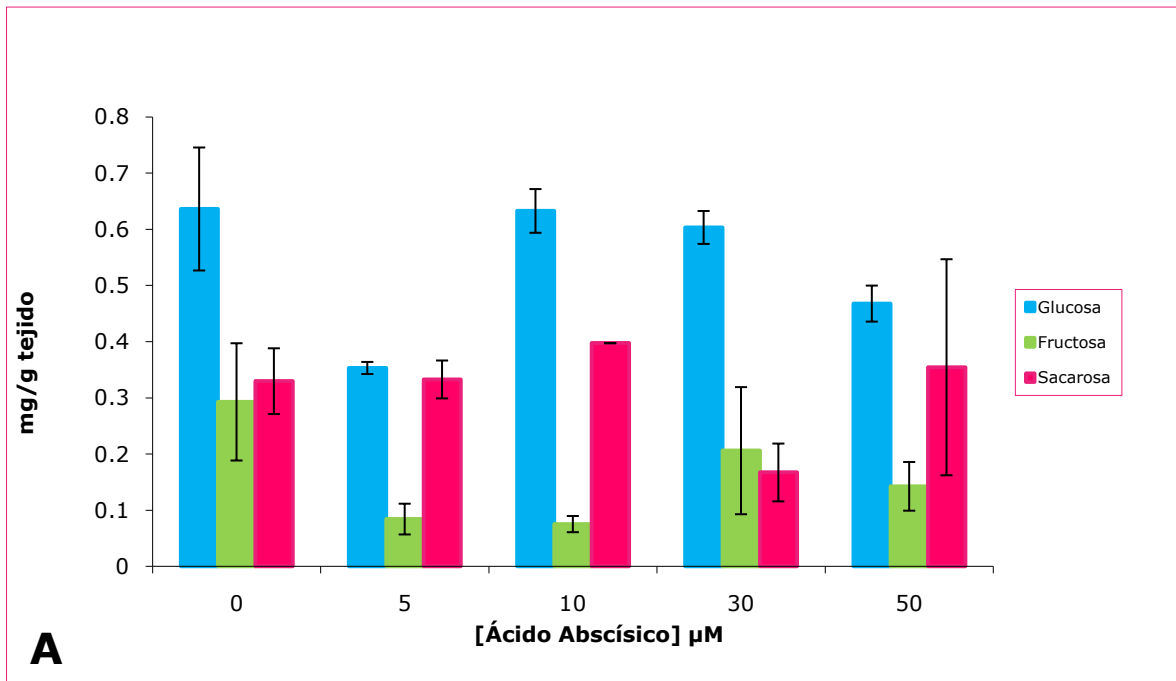


Figura 35. Efecto de Ácido Abscísico sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en embriones germinados de maíz. Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en A) mg/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar (n=2).

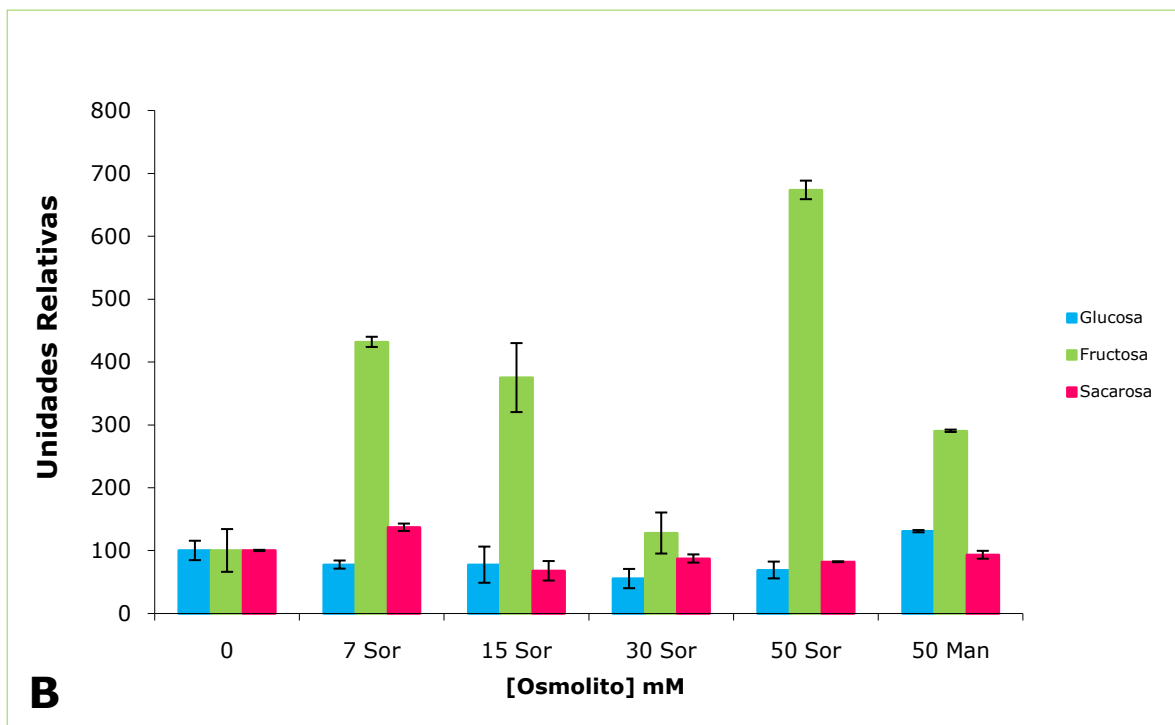
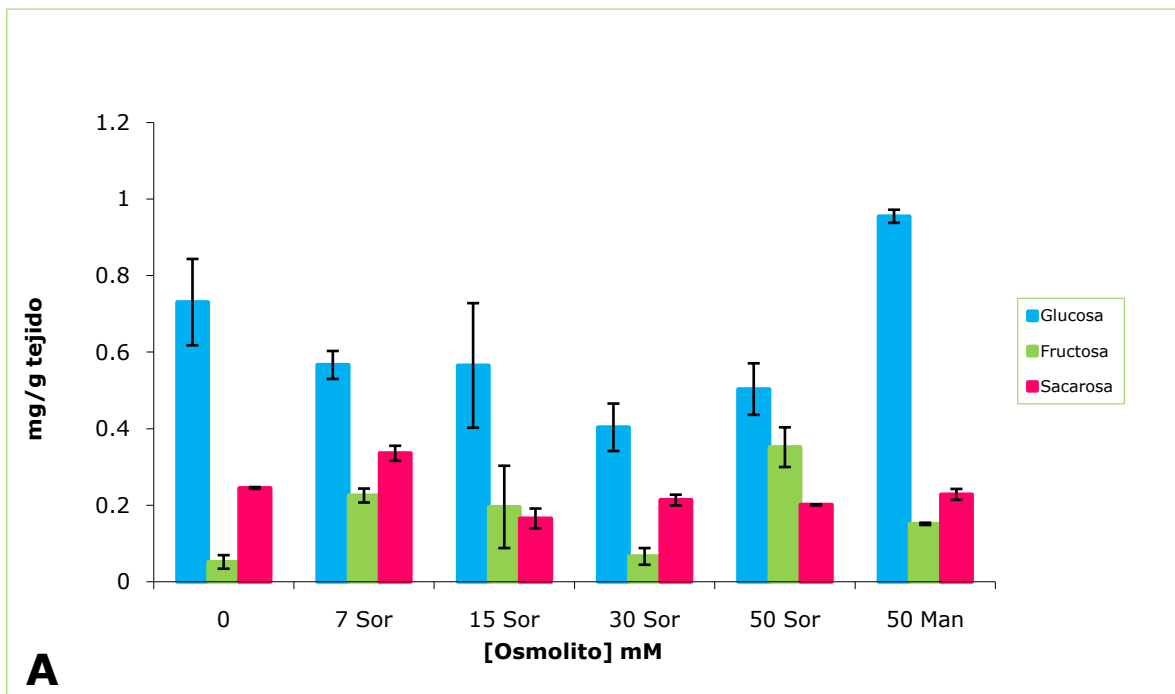


Figura 36. Efecto de la Presión Osmótica sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en embriones germinados de maíz. Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en A) mg/ g de tejido y en B) Unidades Relativas; se tomó como 100% el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa presente en los embriones control. Las barras de error indican \pm desviación estándar (n=2).

DISCUSIÓN

Regulación del transportador de sacarosa ZmSUT1.

Las plantas producen carbohidratos a partir de la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis, sin embargo no todas sus células son capaces de hacerlo, sólo las células de la hoja y los tallos, mientras que las raíces, las estructuras reproductivas, los órganos en desarrollo y de almacenamiento son enteramente importadores de carbohidratos. Las hojas maduras por tanto producen un exceso de carbohidratos y los exportan. Los tejidos exportadores son comúnmente denominados fuente y los tejidos importadores demanda. En los embriones de maíz, distinguimos también estos tejidos los escutelos son el tejido fuente de nutrimentos, mientras que los ejes embrionarios son los tejidos demanda (Lim *et ál.*, 2006).

Los transportadores de carbohidratos son las proteínas que facilitarán el aporte de carbono entre los tejidos fuente y demanda. Por ejemplo, la importancia del funcionamiento de los transportadores de sacarosa en la planta se demostró al producir plantas transgénicas de tabaco y papa, en donde se expresaron en antisentido los RNAs para el transportador tipo SUT1 para reducir el nivel del transportador en el floema. Las plantas mutantes presentaron un fenotipo de crecimiento disminuido y las hojas exportaban poco carbohidrato, llevando a su acumulación en las hojas con una reducción en la producción de tubérculos (Kühn *et ál.*, 1996; Riesmeier *et ál.*, 1994).

En nuestro sistema experimental, el transportador de sacarosa en maíz *ZmSUT1* se comporta como un transportador esencial para el cargado del floema, ya que se encuentra expresado a nivel de RNA únicamente

en las células fuente, el escutelo del embrión y no en los tejidos demanda como serían los ejes embrionarios (Gómez-Calderas, 2008 y Fig. 17C, 21C y 25C). El escutelo es un tejido que es capaz de usar sacarosa como fuente de carbono, pero también de llevar a cabo su síntesis a partir del carbono almacenado en sus células en forma de lípidos, dado que se enciende el ciclo del glioxilato (Bewley y Black, 1994; Longo y Longo, 1970.).

En el 2009 se demostró que efectivamente el transportador de sacarosa en maíz tiene un papel importante de concentrar la sacarosa en las células del floema. A las plantas a las que se les suprimió la expresión del gen *SUT1* mostraron una significativa reducción en la exportación de sacarosa marcada con ^{14}C , por lo que las hojas acumulaban carbohidratos y presentaban un fenotipo de exudación de azúcares, además de una severa reducción en el crecimiento y desarrollo (Slewinski *et ál.*, 2009).

Se han sugerido varias formas de regulación de la expresión del transportador de sacarosa, una de ellas es la regulación mediada por su sustrato la sacarosa o bien por otros carbohidratos (Chiou y Bush 1998; Vaughn *et ál.*, 2002), sin embargo, se tienen resultados difíciles de interpretar, si bien se ha continuado su estudio ya que los transportadores de carbohidratos de levadura presentan una regulación estricta de los niveles de transportadores de carbohidratos altamente dependiente del soluto que transportan (Rolland *et ál.*, 2006).

En un trabajo previo en el laboratorio encontramos que la cantidad de RNAm para *ZmSUT1* aumentaba al embeber los embriones en presencia de carbohidratos, resultado que sugiere que hay una regulación del transportador y que probablemente en condiciones nativas también

ocurra. Conocemos que durante la germinación hay cambios importantes en los niveles de carbohidratos, una disminución del 80% del inicial de sacarosa a partir de las 8 h de imbibición y después de las 24 h un ligero incremento (Martínez-Marcelo, 2008), además de un aumento del transcrito de *ZmSUT1* a las 24 h de germinación (Gómez-Calderas, 2008), el cual no sabemos si depende del contenido de carbohidratos a ese tiempo.

Adicional a los cambios en los contenidos de carbohidratos también hay cambios en los niveles hormonales durante la germinación, sobre todo una disminución en el contenido de Ácido Abscísico y el aumento de la concentración de Ácido Giberélico, se conoce que las vías de transducción de señales de ambas hormonas y los carbohidratos tienen puntos en común, aunque se desconocen todos los componentes de cada una de las vías de transducción de señales (Hey *et ál.*, 2010). Sobre la regulación de los transportadores de carbohidratos recientemente se encontró que existe un factor de transcripción que se une a una región promotora denominada ABRE (del inglés “**A**bscisic **r**esponsive **e**lement”) que regula la transcripción del transportador SUC1 en *Arabidopsis thaliana* y aumenta los niveles de sacarosa en el tejido (Holth *et ál.*, 2010).

En *ZmSUT1* encontramos que Ácido Abscísico reduce el contenido del transcrito de *ZmSUT1* de un 20 a 30% con concentraciones añadidas de Ácido Abscísico de 10 a 50 μ M.

Se ha reportado que en papa, al exponer a microtubérculos a concentraciones exógenas de Ácido Abscísico el contenido endógeno de Ácido Abscísico se incrementa (Suttle *et ál.*, 1994). En nuestro caso, al medir la concentración de Ácido Abscísico en los embriones encontramos

que la adición exógena de Ácido Abscísico si incrementa la concentración de Ácido Abscísico, especialmente a la concentración de 30 μM donde se alcanza un máximo, 4 veces más hormona que la que hay en los embriones control. Y es a esa concentración en la que se presenta la reducción más pronunciada (30% menos con respecto al control) del transcrito de *ZmSUT1* y también el menor nivel de sacarosa en el tejido (50% menos con respecto al control). Lo anterior sugiere que el nivel de expresión de *ZmSUT1* tiene un impacto en la concentración de sacarosa en el embrión. Aunque no se puede descartar que la hormona tenga primero un impacto en la disponibilidad de sacarosa en el tejido y que esto sea lo que afecte el nivel del transcrito.

Otra propuesta para la modificación de los niveles de transcrito en presencia de Ácido Abscísico es que la hormona se encuentre modificando la osmolaridad del medio, ya que se conoce que la hormona aumenta cuando hay niveles de osmolaridad bajos (Srivastava, 2002). Por ello se decidió modificar la osmolaridad del medio, y se encontró que el transcrito para el transportador de sacarosa se induce a 50 mM de sorbitol y se reduce con 50 mM de manitol. Además se observó que a otras concentraciones de sorbitol se reduce la expresión del transportador, similar a lo que encontramos con Ácido Abscísico. Notamos de manera interesante que la presencia de los osmolitos a determinadas concentraciones afectan el contenido de fructosa, efecto que no encontramos con la adición de Ácido Abscísico, por lo que los efectos del osmolito y Ácido Abscísico pueden estarse llevando a cabo por vías distintas. Así que el aumento o la disminución en el transcrito del transportador *ZmSUT1* debido a la presencia del osmolito ocurre cuando los niveles de fructosa están afectados, para 50 mM sorbitol la fructosa aumenta alrededor de 6 veces comparado con el control y el transcrito de *ZmSUT1* aumenta, mientras que a 50 mM de manitol y 7 y

15 mM de sorbitol también inducen la acumulación de fructosa, pero en estos tres últimos tratamientos hay una disminución en el nivel de transcrito para *ZmSUT1*. Lo que sugiere que la alteración en los niveles de fructosa está relacionado con el nivel de los transcritos para *ZmSUT1*, aunque con los resultados que tenemos es aún difícil proponer a qué nivel ocurre el cambio en el nivel de transcritos, si los cambios en los contenidos de fructosa son la señal que modifica la expresión del transportador o bien al aumentar la fructosa hay un cambio en la osmolaridad local.

Analizando la vía de síntesis y uso tanto de manitol y sorbitol, vías que sí pueden estar presentes en maíz, encontramos que hay puntos en los que convergen ambas vías, y uno de ellos es la producción o uso de fructosa, glucosa y sacarosa (Fig. 37), especialmente con la producción de fructosa, por lo que no es difícil de entender que los niveles de fructosa se encuentren alterados cuando se incubó el tejido con sorbitol o manitol, ya que al tener disponible el tejido a ambos osmolitos no necesita sintetizarlos y por tanto la fructosa se acumula. Lo anterior entonces puede ocasionar una regulación en la expresión del transportador de sacarosa, ya que este transportador proveería de fructosa al tejido, aunque de manera indirecta. Al respecto se puede comentar que Gómez-Calderas (2008) incubó los embriones de maíz en 50 mM de fructosa, el carbohidrato indujo la expresión del transportador, sugeriendo de un papel importante de la fructosa en la regulación del transportador *ZmSUT1*. No obstante, no rechazamos la idea de un cambio en la osmolaridad al aumentar el contenido de fructosa. No podemos entonces con los resultados presentados descartar ambas posibilidades, pero sí podemos postular que Ácido Abscísico reduce el nivel de transcrito de *ZmSUT1* no a través de cambios en la osmolaridad del medio, sino que probablemente exista

una región promotora en el gen del transportador de sacarosa que pueda unir algún factor de transcripción inducido por Ácido Abscísico y por tanto afectar la expresión del transportador, similar a lo que se mencionó que ocurre con el transportador *AtSUC1* (Holth *et ál.*, 2010); o bien que la expresión del transportador sea modificado por la acción de proteínas como las ASR (**A**BA [abscisic acid]-, **s**tress-, and **r**ipening-induced) las cuáles se unen a la región promotora de un transportador putativo de monosacáridos en uva y modifican su expresión (Çakir *et ál.*, 2003).

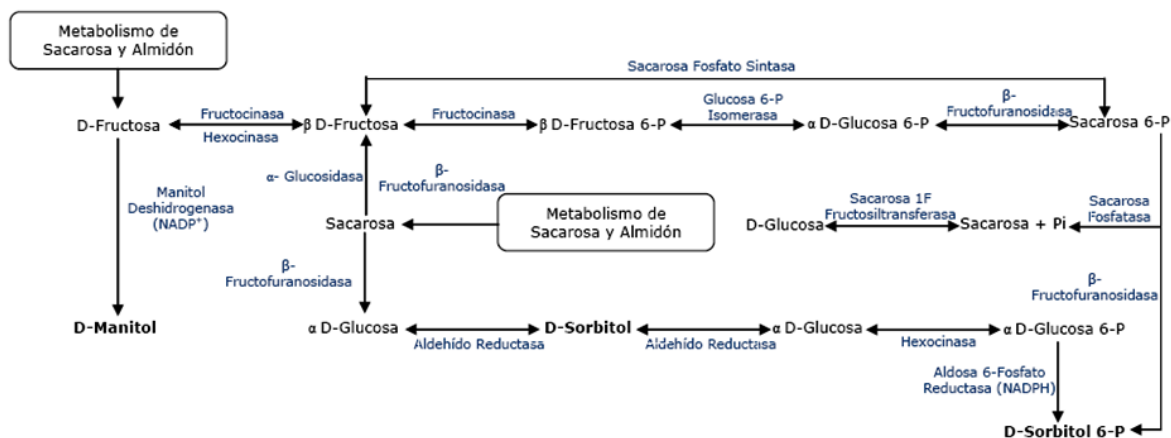


Figura 37. Vía metabólica putativa de manitol y sorbitol en caña de azúcar. Modificado de Marino *et al*, 2003.

En cuanto a la otra hormona estudiada, el Ácido Giberélico, encontramos que aumentó el nivel de transcrito de *ZmSUT1* en los embriones de maíz. La regulación por ácido giberélico no ha sido determinada para otros transportadores de sacarosa, sin embargo es factible que ocurra, ya que el Ácido Giberélico induce la expresión de α -amilasas, enzimas que al final aumentan la concentración de glucosa disponible para el crecimiento del tejido (Sponsel, 2006). Por otra parte, se ha encontrado que la hormona es antagónica al Ácido Abscísico, y que en *Arabidopsis*

induce la expresión del transportador de sacarosa *AtSUC1* (Holth *et ál.*, 2010), por lo que también era posible que Ácido Giberélico regulara su expresión. Lo que encontramos cuando se llevo a cabo la incubación con Ácido Giberélico es que hubo una reducción en el contenido de Ácido Abscísico en los embriones sobre todo a 50 μ M de Ácido Giberélico, tiempo en el que observamos también el mayor nivel de transcrito para *ZmSUT1*. La reducción en el contenido de Ácido Abscísico cuando se incubaba con Ácido Giberélico ya se ha observado en avena, lechuga y *Nicotiana plumbaginifolia* (Grappin *et ál.*, 2000; Gonai *et ál.*, 2004; Leymarie *et ál.*, 2004). Y lo que se sugiere pero no se ha demostrado es que el Ácido Giberélico incrementa la síntesis de al menos una de las proteínas que degradan al Ácido Abscísico (Leymarie *et ál.*, 2004).

Por lo tanto, los resultados en conjunto sobre la reducción en el contenido de sacarosa en los embriones y la de los transcritos de *ZmSUT1* al incubar con Ácido Abscísico, así como el incremento de *ZmSUT1*, la reducción de la concentración de Ácido Abscísico y el aumento en la concentración de sacarosa cuando el tejido se incubaba con Ácido Giberélico, sugieren que el transportador de sacarosa es regulado de manera conjunta por Ácido Abscísico y sacarosa, y que la disminución de Ácido Abscísico ocasionada por la presencia de Ácido Giberélico lleva a modificar la cantidad de transportador y de sacarosa en el tejido. Y desconocemos aún cuál es el papel de la concentración de fructosa en su regulación pero sí que tiene un impacto.

Regulación del transportador putativo de hexosas ZmHT.

En maíz no se tiene información respecto a cuáles son los transportadores de hexosas que presenta, sin embargo es necesaria su presencia para la toma de hexosas al menos en los tejidos demanda. En el caso de la germinación de la semilla de maíz se ha propuesto que los

transportadores de hexosas deben encontrarse localizados en las células que rodean al embrión, debido a que el almidón contenido en el endospermo se degrada poco antes de que la raíz emerja. Ya en el embrión, el escutelo puede tomar la glucosa usarla o enviarla al eje embrionario para su crecimiento. En el laboratorio, hemos encontrado que tanto en el eje embrionario como en las células del parénquima del escutelo hay reacción contra el anticuerpo anti-transportador de hexosas de la membrana plasmática de plantas. Anticuerpo policlonal que reacciona contra una región con alta identidad en diferentes transportadores de hexosas de plantas (Ramírez-Verdejo, 2009). El transportador en el escutelo probablemente sea del tipo difusivo ya que la concentración de glucosa producida en el endospermo es alta, mientras que el transportador del escutelo sea del tipo simportador hexosa-H⁺.

Respecto a la regulación del transportador de hexosas se ha documentado que puede ocurrir a través de los cambios en los contenidos de carbohidratos que normalmente ocurren en la planta (Atassanova *et ál.*, 2003; Conde *et ál.*, 2006; Sherson *et ál.*, 2000). Sin embargo hay pocos estudios sobre el efecto de hormonas en la expresión de los transportadores de hexosas y en general de carbohidratos. El único ejemplo documentado del efecto de hormonas en el transportador de hexosas se encuentra en hojas de uva en donde se encontró que el Ácido Abscísico aumenta los niveles de un transportador, el transportador *VvHT1* a través del incremento en la transcripción de una cinasa inducida por carbohidratos, *VvSK1*; y que de manera paralela el tejido también aumenta los niveles de las invertasas de pared celular, enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de sacarosa y por tanto aumentan la disponibilidad del sustrato al transportador de hexosas (Lecourieux *et ál.*, 2010). En este trabajo se encontró que los

niveles del transcrito para el transportador putativo de hexosas de maíz, al que denominamos *ZmHT* se reduce a concentración de 5 μM de la hormona tanto en ejes y embriones y también a 30 μM en el caso de los embriones.

A 5 μM de Ácido Abscísico hay una disminución del contenido de ambas hexosas, glucosa y fructosa, lo que podría ser el resultado de la disminución del transportador o bien una reducción en la actividad de las invertasas, sin embargo no observamos acumulación de sacarosa. Por otra parte, encontramos que la concentración de Ácido Abscísico en los embriones embebidos desde 5 hasta 50 μM con Ácido Abscísico, aumentaba cerca de 2 veces, pero solo a la concentración de 5 μM encontramos efecto de Ácido Abscísico, la reducción de glucosa, fructosa y del transcrito para el transportador, lo que sugiere que el efecto es más por el cambio en el contenido de fructosa que en el del contenido de Ácido Abscísico. En el laboratorio Gómez-Calderas (2008) encontró que la germinación del tejido en presencia de fructosa aumenta el nivel del transcrito del transportador *ZmHT*, apoyando nuestra sugerencia sobre el efecto del carbohidrato sobre la expresión del transportador.

Al igual que en el transportador de sacarosa examinamos si el efecto de Ácido Abscísico tenía que ver con la osmolaridad del medio, y observamos que el transportador de hexosas es más sensible a la osmolaridad del medio que el transportador de sacarosa. Hubo una reducción del transportador de hexosas en los embriones a todas las concentraciones probadas de sorbitol, y a la más baja concentración se obtuvo un 50% menos de transcrito de *ZmHT*, y con manitol también hubo una reducción de solo 10%. En el caso de los ejes en 50 mM de ambos osmóticos hubo un incremento de un 50 a 70%. Aquí probablemente tenemos un efecto combinado entre la presión osmótica

del medio y el aumento en las concentraciones de fructosa, las cuales ocurren en presencia de ambos osmóticos y a todas las concentraciones de sorbitol. Un experimento que sería necesario hacer es incubar los embriones a diferentes concentraciones de fructosa, incluyendo aquellas a las que se llegan cuando los osmóticos cambian, para determinar si el efecto es de tipo osmótico o debido a la señalización por carbohidratos, o que cambiáramos a otro osmolito pero no metabolizable como el xilitol.

Al igual que Ácido Abscísico, Ácido Giberélico redujo los niveles del transcrito de *ZmHT*; pero si comparamos el efecto de Ácido Giberélico sobre los niveles del transcrito del transportador de sacarosa encontramos que estos últimos se incrementan, sugiriendo que en los embriones la síntesis incrementada del transportador de sacarosa podría reducir los niveles del transportador de hexosas, ya que en los embriones lo que se necesita transportar de preferencia al eje embrionario es la sacarosa que se encuentra contenida en las células del escutelo, y de la cual se producirán dos hexosas, es decir más carbono para el eje embrionario. Aunado a esto encontramos que el Ácido Giberélico induce un incremento en la concentración de sacarosa desde un 75 hasta un 190% más que el control, con una reducción en el contenido de hexosas, lo cual nos está hablando de que la disponibilidad de sacarosa es alta y por tanto el transportador de sacarosa debe aumentar. Gómez Calderas (2008) encontró que la incubación del tejido con sacarosa reduce la expresión del transcrito para el transportador de hexosas en el eje embrionario y en el embrión no modifica su expresión. Por lo que sugerimos que existe una regulación cruzada entre la síntesis de ambos transportadores, y que probablemente tenga que ver con el nivel de hexosas o sacarosa disponible en el tejido, niveles que pueden modificar las enzimas sensibles o inducidas por el Ácido Giberélico,

como las α -amilasas (Sponsel, 2006) y como observamos también, el Ácido Abscísico.

Finalmente, respecto al balance hormonal entre Ácido Giberélico y Ácido Abscísico, se tuvo que solo para las concentraciones de 100 y 50 μM de Ácido Giberélico, si bien no hubo un incremento en la concentración endógena de Ácido Giberélico sí se presentó una reducción en el contenido de Ácido Abscísico, lo cual coincide con el incremento en los niveles de expresión de *ZmSUT1* y *ZmHT*; y se observó un claro desplazamiento hacia la germinación de la semilla (Fig. 36), mientras que en el caso de Ácido Abscísico se observó que bajo todas las concentraciones probadas el contenido de Ácido Giberélico disminuyó y que el balance GA_3/ABA siempre se desplazó hacia el estado de dormancia de la semilla (Fig.37), especialmente a la concentración de 30 y 10 μM de Ácido Abscísico coincidiendo con la disminución más marcada en la expresión de los transcritos de *ZmSUT1* y *ZmHT*. Lo anterior nos lleva a sugerir que la regulación hormonal de dichos transportadores depende en gran medida del balance hormonal entre Ácido Giberélico y Ácido Abscísico (Fig. 38).

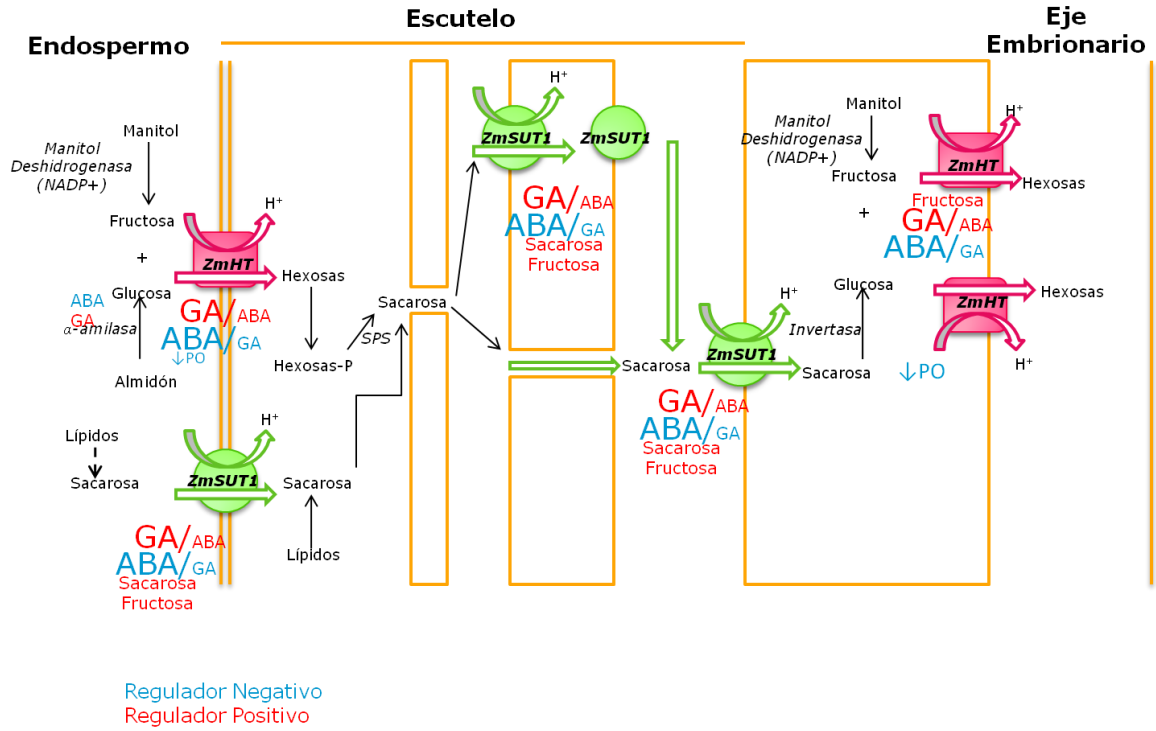


Figura 38. Modelo propuesto para la regulación hormonal y osmótica de ZmSUT1 y ZmHT en embriones germinados de maíz

CONCLUSIONES

- El tratamiento con Ácido Abscísico exógeno incrementa los niveles de Ácido Abscísico endógeno y disminuye los de Ácido Giberélico endógeno en embriones germinados de maíz.
- El tratamiento con Ácido Giberélico exógeno disminuye los niveles de Ácido Abscísico endógeno.
- El transportador de sacarosa *ZmSUT1* es regulado de manera conjunta por el contenido de Ácido Abscísico endógeno y de sacarosa.
- El contenido de fructosa modifica de manera positiva el nivel de transcripción de *ZmSUT1* en embriones germinados de maíz; y de *ZmHT* en ejes embrionarios.
- El transportador de sacarosa *ZmSUT1* no se expresa en ejes embrionarios.
- El transportador putativo de hexosas *ZmHT* en embriones germinados de maíz es sensible a la presión osmótica.
- Probablemente existe una regulación cruzada entre la síntesis de *ZmSUT1* y *ZmHT* que tenga que ver con el nivel de hexosas o sacarosa disponible en el tejido.
- La regulación hormonal de *ZmSUT1* y del transportador putativo de hexosas *ZmHT* depende en gran medida del balance hormonal entre Ácido Giberélico y Ácido Abscísico.

PERSPECTIVAS

- Determinar si el efecto de ABA y GA₃ sobre la transcripción de ZmSUT1 y ZmHT es directo o es debido a los cambios en la concentración de CHO's.
- Buscar secuencias en la región promotora de los genes que sean elementos de respuesta a ABA (ABRE).
- Determinar el patrón de expresión de los transportadores en presencia de diferentes concentraciones de CHO's (Sacarosa y Fructosa).
- Determinar de qué manera GA₃ provoca la disminución en el contenido interno de ABA.

APÉNDICE

Cuantificación de GA₃.

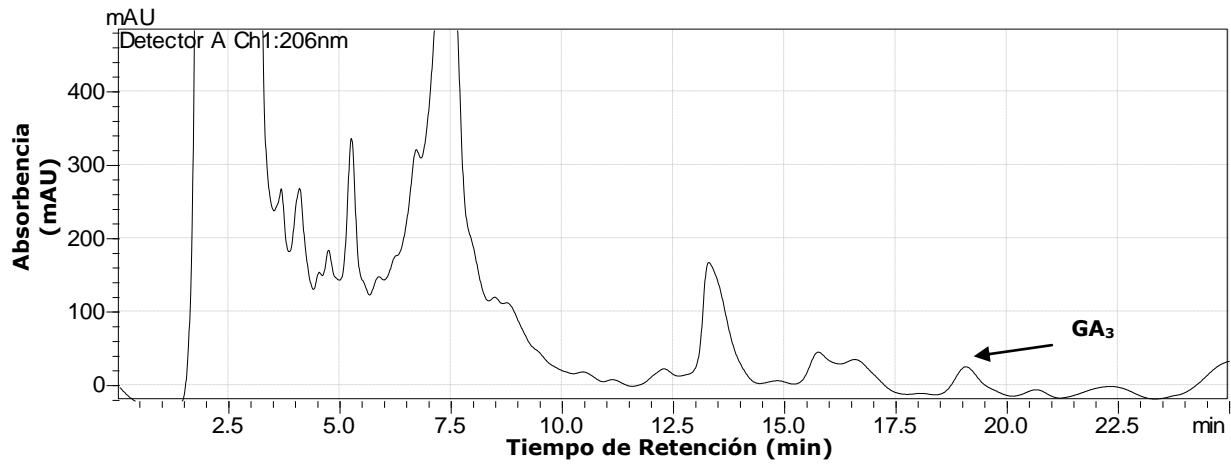


Figura 39. Cromatograma de la muestra 0 μM GA₃. 50 μL.

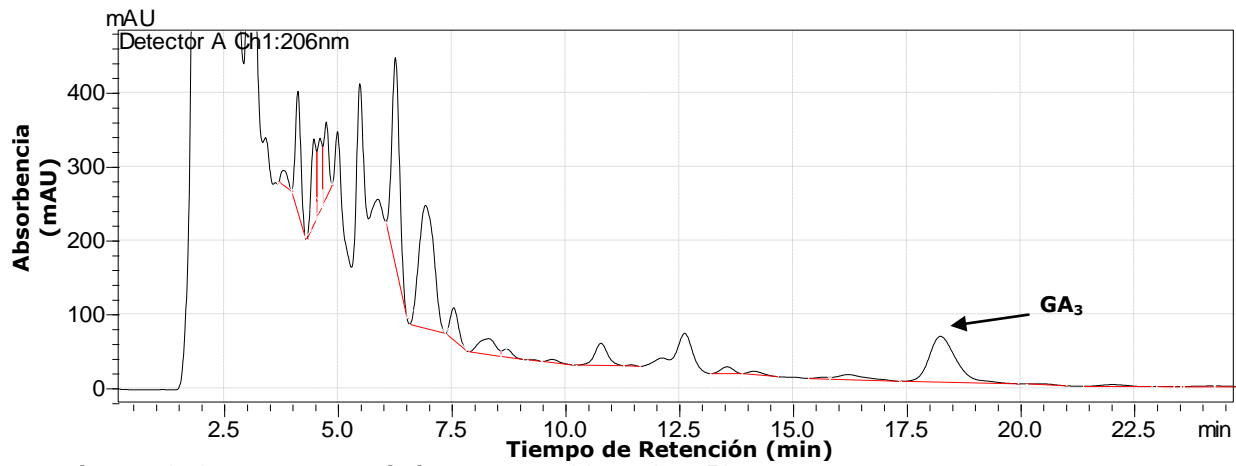


Figura 40. Cromatograma de la muestra 100 μM GA₃. 50 μL.

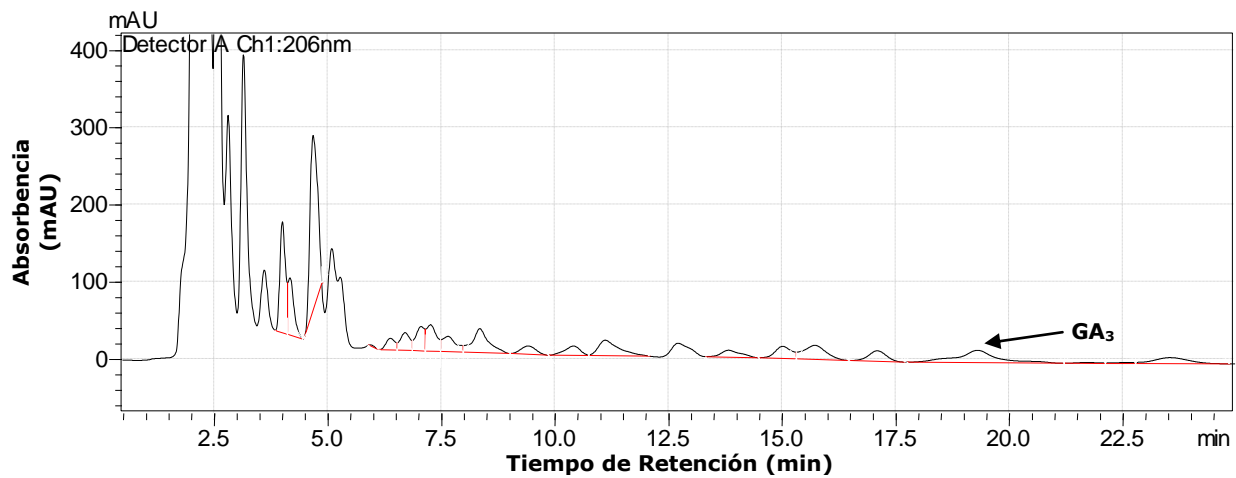


Figura 41. Cromatograma de la muestra 50 μM GA₃. 50 μL.

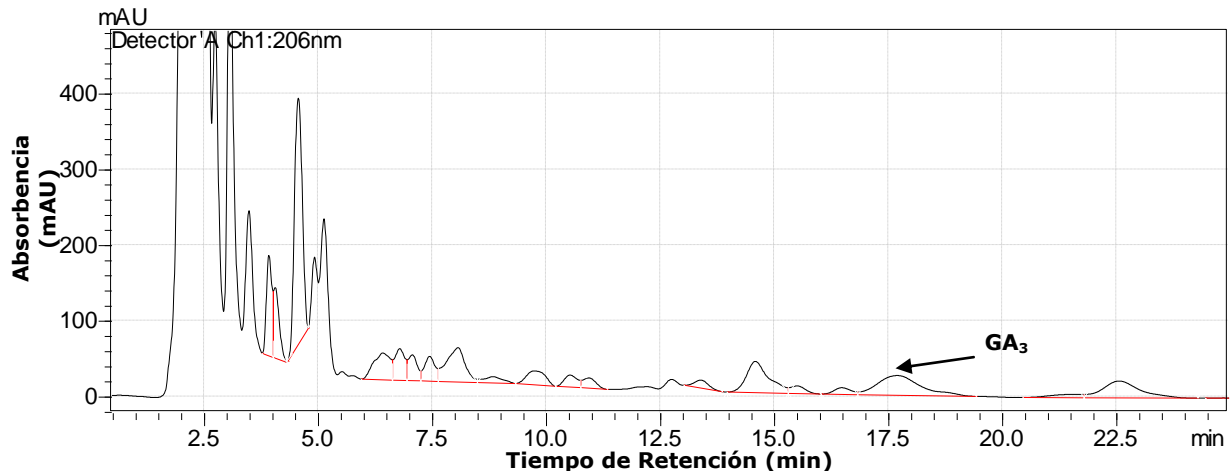


Figura 42. Cromatograma de la muestra 10 µM GA₃. 50 µL.

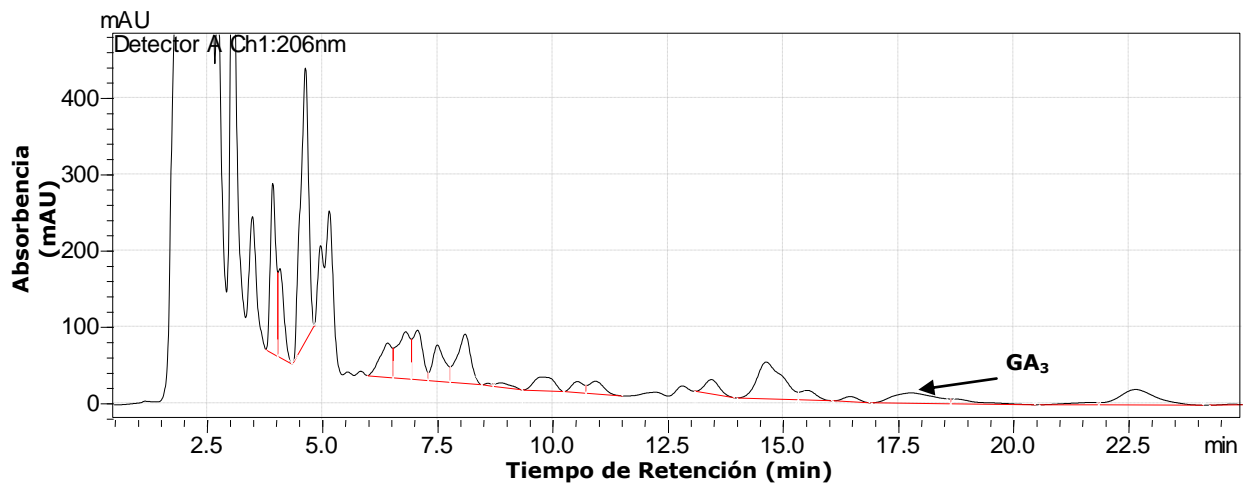


Figura 43. Cromatograma de la muestra 5 µM GA₃. 50 µL.

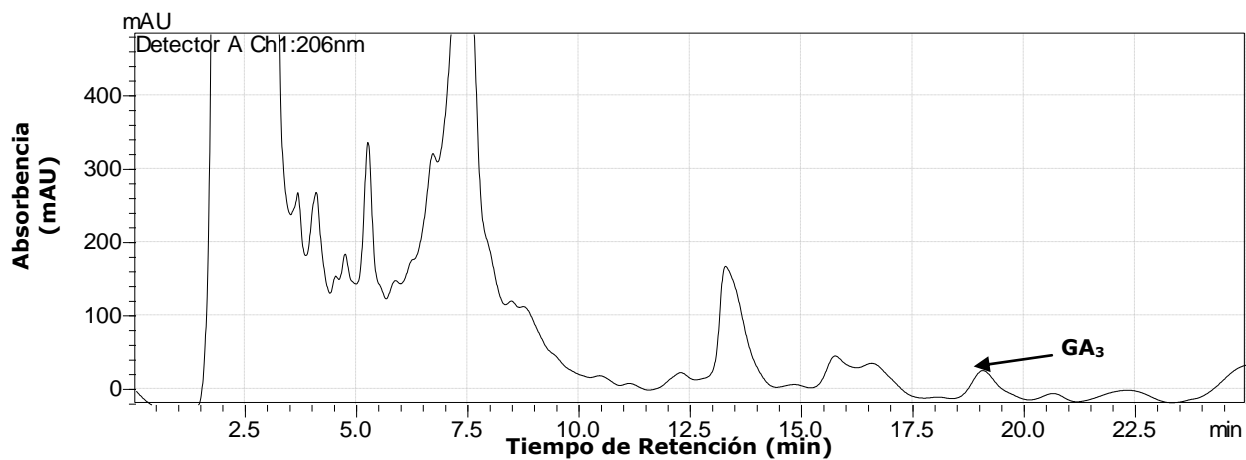


Figura 44. Cromatograma de la muestra 0 µM ABA. 50 µL.

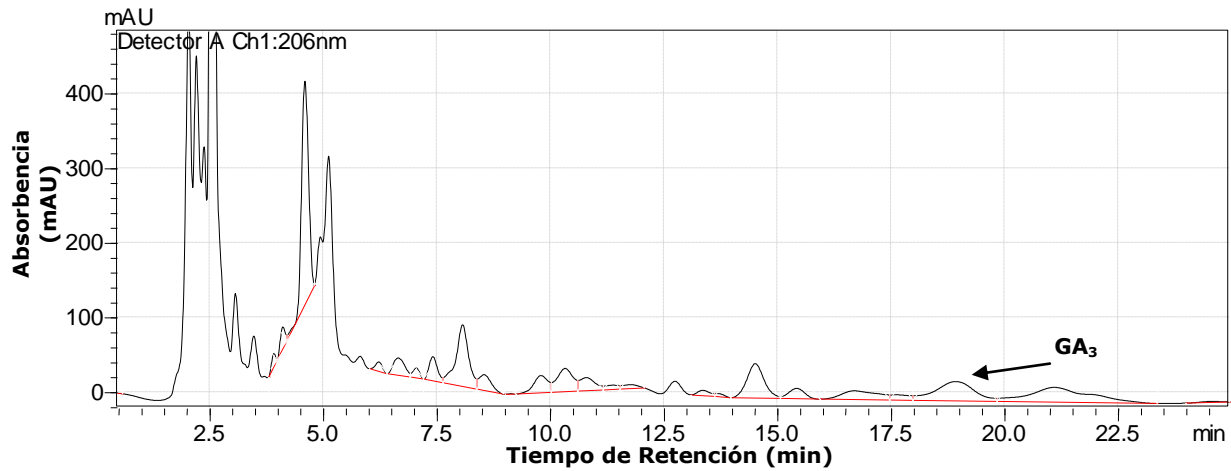


Figura 45. Cromatograma de la muestra 50 µM ABA. 50 µL.

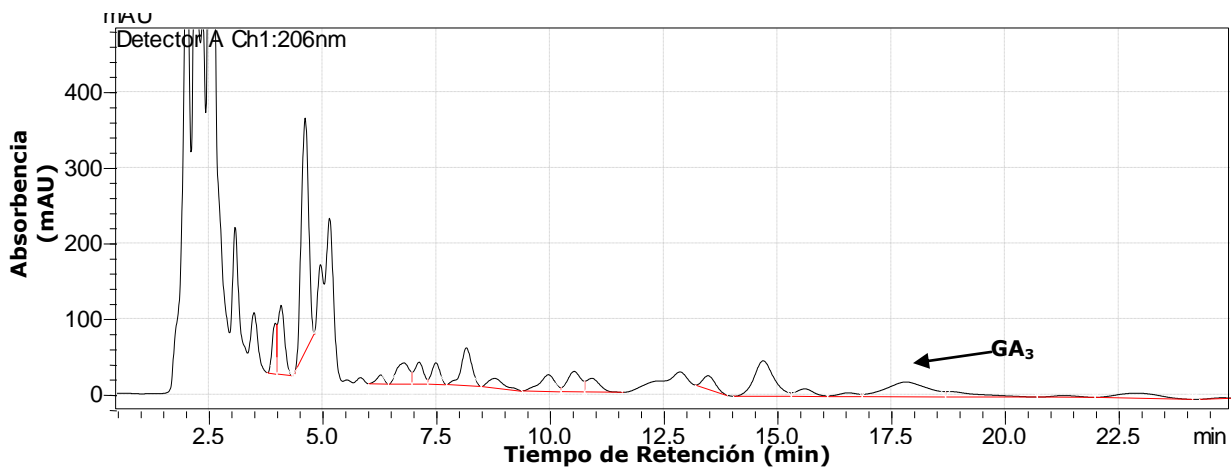


Figura 46. Cromatograma de la muestra 30 µM ABA. 50 µL.

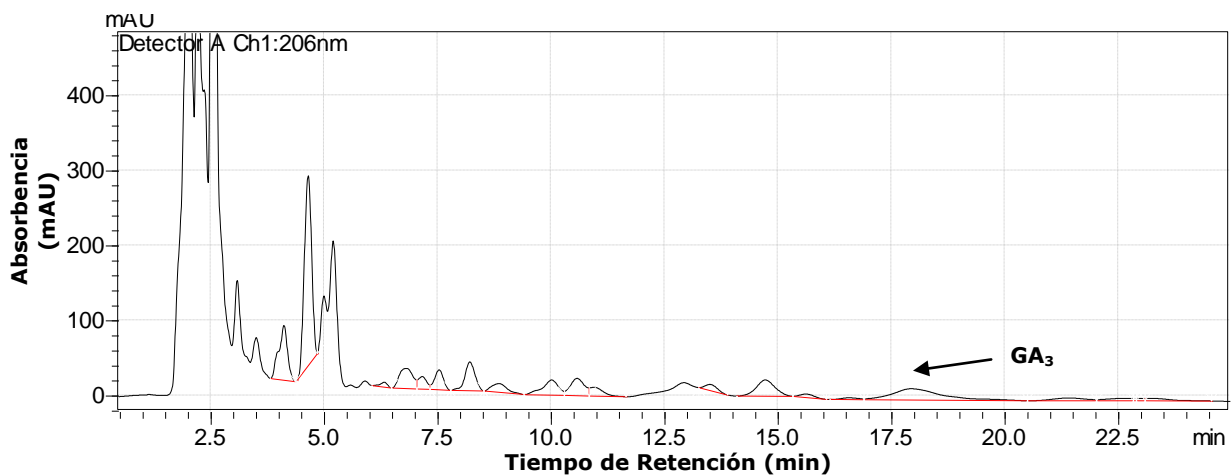


Figura 47. Cromatograma de la muestra 10 µM ABA. 50 µL.

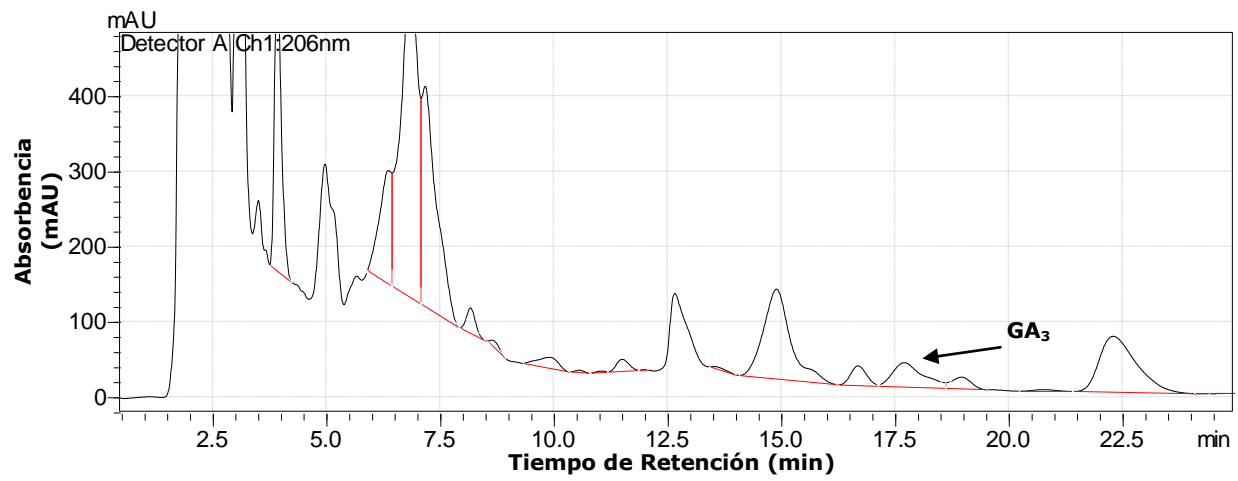


Figura 48. Cromatograma de la muestra 5 μ M ABA. 50 μ L.

REFERENCIAS

- Aoki, N., Hirose, T., Takahashi, S., Ishimaru, K., & Ohsugi, R. (1999). Molecular Cloning and Expression Analysis of a Gene for a Sucrose Transporter in Maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol.* , 40 (10), 1072-1078.
- Atassanova, R., Leterrier, M., Gaillard, C., Agasse, A., Sagot, E., Coutos-Thévenot, P., et al. (2003). Sugar-Regulated Expression of a Putative Hexose Transporter Gene in a Grape. *Plant Physiol.* , 131, 326-334.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Physiology and Biochemistry of seeds. *Springer-Vela* , 6, 147-151, 177.
- Bewley, J. D., Bassel, G. W., & Nonogaki, H. (2010). Germination-Still a mystery. *Plant Sci.* , 500-507.
- Bove, J., Jullien, M., & Grappin, P. (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Gen. Biol.* , 3 (1), 1002.1-1002.5.
- Büttner, M. (2007). The monosaccharide transport(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* , 581, 2318-2324.
- Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saomonneau, A., Delrot, S., & Atassanova, R. (2003). A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell* , 15, 2165-2180.
- Castillo, G., & Martínez, S. (1997). Reversed-phase C18 high-performance liquid chromatography of gibberellins GA₃ and GA₁. *J. Chr. A.* , 782, 137-139.
- Chiou, T., & Bush, D. R. (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 95, 4784-4788.
- Conde, C., Agasse, A., Glissant, D., Tavares, R., Gero's, H., & Delrot, S. (2006). Pathways of Glucose Regulation of Monosaccharide Transport in Grape Cells. *Plant Physiol.* , 141, 1563-1577.
- Delrot, S., Atassanova, R., & Maurousset, L. (2000). Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica* , 281-306.
- Gibson, S. (2004). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* , 55 (395), 253-264.
- Gómez-Calderas, A. (2008). *Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Gonai, T., Kawahara, S., Tougou, M., Satoh, S., Hashiba, T., & Hirai, N. (2004). Abscisic acid in the thermoinhibition of the lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *J. Exp. Bot.* , 55, 111-118.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., & Jullien, M. (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-

imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* , 210, 279-285.

- Greaves-Fernández, N. (2001). *Estudio de la expresión del transportador de sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

- Hey, S., Byrne, E., & Halford, G. (2010). The interface between metabolic and stress signalling. *Ann Bot* , 105, 197-203.

- Hoth, S., Niedermeier, M., Feuerstein, A., Hornig, J., & Sauer, N. (2010). An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression. *Planta* , 10, 1228-1234.

- Johnson, D. A., & Hill, J. P. (2006). The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evol. Biol.* , 6, 64.

- Kühn, C., Quick, W. P., Schulz, A., Riesmeier, J. W., Sonnewald, U., & Frommer, W. B. (1996). Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell* , 19, 1115-1123.

- Lecourieux, F., Lecourieux, D., Vignault, C., & Delrot, S. (2010). A Sugar-Inducible Protein Kinase, VvSK1, Regulates Hexose Transport and Sugar Accumulation in Grapevine Cells. *Plant Physiol.* , 152, 1096-1106.

- Leymarie, J., Benech-Arnold, R. L., Farrant, J. M., & Corbineau, F. (2009). Thermodormancy and ABA metabolism in barley grains. *Plant Sign. & Beh.* , 4 (3), 205-207.

- Lim, J. D., Cho, J. I., Hahn, T. R., B, C. S., & S, J. J. (2006). Sucrose transport from sucrose to sink sedes in rice. *Plant Physiol.* , 126, 572-584.

- Longo, C. P., & Longo, G. P. (1970). The Development of Glyoxysomes in Peanut Cotyledons and Maize Scutellal. . *Plant Physiol.* , 45, 249-254.

- Marino, C. L., Leite, S. M., Farro, A. P., Sasaki, C., Veronezi de Campos, H. L., & Coscrato, V. E. (2003). Putative metabolic pathway of manitol and sorbitol. *Sci. Agr.* , 60 (4), 723-728.

- Martínez-Marcelo, V. (2008). *Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

- Nefed'eva, E. E., & Mazey, N. G. (2009). Gibberellin A3 Detection in Plants with High-Performance Liquid Chromatography. *App. Bioch. & Mic.* , 45 (4), 454-458.

- Oliver, S., Dennis, E., & Dolferus, R. (2007). ABA Regulates Apoplastic Sugar Transport and is a Potential Signal for Cold-Induced Pollen Sterility in Rice. *Plant Cell Physiol.* , 48 (9), 1319-1330.

- Olszewski, N., Sun, T., & Gubler, F. (2002). Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *Plant Cell* , 80, 61.

- Ramírez-Sótenes, J. (2008). *Alteraciones en el metabolismo de carbono durante priming natural de semillas de Opuntia tomentosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Ramírez-Verdejo, S. (2007). *Detección in situ de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación de carbohidratos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Ren-Chun, F., Chang-Cao, p., Yang-Hong, X., Xiao-Fang, W., Yan, L., Yi, S., et al. (2009). Apple Sucrose Transporter SUT1 and Sorbitol Transporter SOT6 Interact with Cytochrome b5 to Regulate Their Affinity for Substrate Sugars. *Plant Physiol.* , 150, 1880-1901.
- Riesmeier, W., Willmitzer, L., & Frommer, W. B. (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J.* , 13, 1-7.
- Rodríguez-Gacio, M. C., Matilla-Vázquez, M. A., & Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling. The breakthrough goes on. . *Plant Sign. & Beh.* , 4 (11), 1035-1048.
- Rolland, F., Baena-González, E., & Sheen, J. (2005). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* , 57, 675-709.
- Sai-Yong, Z., Xiang-Chun, Y., Xiao-Jing, W., Rui, Z., Yan, L., Ren-Chun, F., et al. (2007). Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* , 19, 3019-3036.
- Sherson, S. M., Hemmann, G., Wallace, G., Forbes, S., Germain, V., Stadler, R., et al. (2000). Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 play a major role in uptake and response of Arabidopsis sedes and seedlings to sugar. *Plant J.* , 24, 849-857.
- Shiratake, K. (2007). *Genetics of Sucrose Transporter in Plants. Genes, Genomes and Genomics*. Global Science Books.
- Slewinski, T. L., Meeley, R., & Braun, D. M. (2009). Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *J. Exp. Bot.* , 60 (3), 881-892.
- Sponsel, V. (2006). Second Messengers in GA Signaling in Cereal Aleurone. *Plant Physiol.* , 4 (20), 7.
- Srivastava, L. M. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Academic Press.
- Suttle, J. C., & Hulstrand, J. F. (1994). Role of Endogenous Abscisic Acid in Potato Microtuber Dormancy. *Plant Physiol.* , 105, 891-896.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K., Uchiumi, T., et al. (2004). Control of Nodule Number by the Phytohormone Abscisic Acid in the Roots of Two Leguminous Species. *Plant Cell Physiol.* , 45 (7), 914-922.

- Thomas, B. R., & Rodríguez, R. L. (1994). Metabolite signals regulate gene expression and source sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* , 106, 1235-1239.
- Vaughn, M., Harrington, G. N., & Bush, D. R. (2002). Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Pro. Natl. Acad.Sci. USA* , 99, 10876-10880.
- Wei-Yi, S., Zheng-Bin, Z., Hong-Bo, S., Xiu-Lin, G., Hong-Xing, C., Hong-Bin, Z., et al. (2008). Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *J. Biol. Sci.* , 4 (2), 116-125.
- Zavala-Zendejas, S. (2001). *Caracterización del simportador de sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Patrón de la proteína y de la actividad.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Zhen, X., Zhong-Lin, Z., Xiaolu, Z., Guangxiao, Y., Setsuko, K., & Qingxi, J. S. (2006). Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant J.* , 42, 231-242.
- Referencias electrónicas:
<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>
<http://www.sagarpa.gob.mx>