



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PAPEL DE LAS HORMONAS ÁCIDO SALICÍLICO,  
ÁCIDO ABSCÍSICO Y METIL-JASMONATO, EN LA  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS  
TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS DE  
EMBRIONES DE MAÍZ”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ROBERTO DASSAEVT CARVENTE GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** Dr. Blas Lotina Hennsen  
**Vocal:** Dra. Sobeida Sánchez Nieto  
**Secretario:** Dra. Gloria Gutiérrez Venegas  
**1er. Suplente:** Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra  
**2do. Suplente:** M. en C. Luis Tonatihut Sánchez Linares

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

---

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

**Asesor**

---

Roberto Dassaevt Carvente García

**Sustentante**

***“Hay que perseverar y sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”***

**Marie Curie**



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Se agradece a los sinodales

Dr. Blas Lotina Hennsen

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Por sus valiosos comentarios y aportaciones.

Así mismo, el presente trabajo se realizó con apoyos

- **PAPIIT IN220511, DGAPA, UNAM**
- **PAIP 4290-12, Facultad de Química UNAM.**



Gracias...

Primeramente a mi familia: mis tíos Martín, Max, Jaime, Javier, René y Ricardo porque cada encuentro familiar tiene asegurado un momento agradable. A mis tías Alicia, Elena, Hilda y Clarisa por los consejos, apoyo y motivación. A mi tía Lupita por ser un apoyo incondicional para mí y mi familia. A todos mis primos: Martín, Johana, Vick, Quetzalli, Liz, Jair, Aleida... por las pláticas, risas y diversión de cada reunión.

A Yoss, porque además de ser mi novia, siempre has sido mi mejor amiga, gracias por tu apoyo incondicional, por tu alegría y comprensión, por ayudarme en los momentos de desánimo, por tu paciencia y sinceridad, por acompañarme por tantos años y nunca dejar que el pesimismo se apoderara de mí, eres una niña muy valiosa para mí y te amo.

A mis mejores amigos: Leonel y Alberto Reyes (†), Alan García, Alex Perales, Alberto Minor, Irene Ávila, Martín Alfaro, Federico Acosta, Sergio Guzmán, Adriana Garibay, Omar Cruz, Omar Velasco, Giovanna Gutiérrez, Gabriel Gómez, Andrés Escandón, Alberto Rebollar, Ale García, Rosario Tavera y Luis Castillo; porque en cada etapa conté y aprendí de ustedes, porque aunque hemos cambiado y quizá la vida nos lleve por diferentes caminos cada momento lo he disfrutado, sé que con ustedes cuento siempre y que nos une más que una buena amistad.

Siempre he pensado que existen personas con las que te encuentras a lo largo de tu vida que influyen directamente en el camino que vas tomando, hoy estoy convencido que la Dra. Sobeida es una de ellas, pues descubrió en mí una gran pasión por lo que hoy hago, gracias por haberme brindado su apoyo y confianza desde el primer momento, le tengo un gran cariño y respeto, pues además de ser la mejor doctora, es un excelente ser humano.



Gracias también a mis compañeros y amigos del Lab 114. Fer, ViryZu, Pau, ViryLu, Adriana y Juan Ma, porque desde que los conocí me han brindado su amistad y me han enseñado las técnicas para que pudiera realizar esta tesis, gracias por los momentos tan agradables que me han hecho pasar en los tiempos “muertos” del experimento.

Finalmente, gracias a cada uno de mis profesores que a lo largo de estos 23 años han tenido la paciencia y dedicación para formar personas de bien, gracias a la Facultad de Química por todo el apoyo y conocimiento otorgado y por supuesto gracias a la UNAM, pues ahora tengo un compromiso y, aunque sé que nunca será suficiente lo que yo haga para compensar la formación brindada, estoy seguro que en un futuro podré regresarte un poco de todo lo que me has dado.

*“Por mi raza hablará el espíritu”*



---

## DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis padres, Virginia García y Roberto Carvente, por todos estos años en los que han sabido guiarme, criarme y educarme, porque estoy seguro que sin ustedes nunca habría logrado esta meta, gracias por los desvelos que les hice pasar desde pequeño, por no darse por vencidos nunca, por las pláticas y consejos, por los regaños, por su amor y comprensión, por siempre creer en mí y acompañarme en cada uno de mis sueños. Ustedes saben que los admiro por su compromiso, fortaleza y perseverancia, lo cual intento emular en cada etapa de mi vida. Gracias también por darme a los mejores hermanos que alguien pudiera tener, por que sé que sin ellos mi vida sería muy aburrida, cada día que pasa me enseñan una nueva lección y me ayudan a crecer como ser humano. Luis, agradezco y admiro tu entusiasmo, inteligencia y dedicación para hacerme ver las cosas, tienes un “Ángel”. Carlos tu perseverancia y habilidad te han llevado hasta dónde has querido y no sabes cuánto me ha ayudado cada charla mientras hacemos los reportes. Gracias a los cuatro.

Gracias también a mi abuelita Elena Caballero, por cuidarme cuando niño, por acompañar a mi familia en tantos momentos. Abue Dominga Flores (†) porque más que una promesa, me convenciste y me diste aliento para terminar esta etapa. Sigues en mi corazón y estoy seguro continúas guiando cada paso que doy, nunca olvidaré tu alegría.

¡¡LO HEMOS LOGRADO!!





---

ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
II.1 El maíz.....	1
II.1.1 Características de la planta.....	1
II.1.2 Estructura del grano del maíz .....	2
II.2 Germinación.....	4
II.3 Enfermedad y estrés en plantas .....	7
II.3.1 Estrés por factores bióticos .....	8
II.4 Hormonas y estrés en plantas.....	10
II.4.1 Ácido salicílico .....	11
II.4.1.1 Proteínas relacionadas con la patogénesis .....	13
II.4.2 Jasmonatos .....	14
II.4.3 Hormonas en la latencia y germinación .....	16
II.4.3.1 Ácido abscísico .....	17
II.4.3.2 Ácido giberélico.....	19
II.4.4 Antagonismo entre hormonas .....	20
II.5 Transporte de carbohidratos .....	22
II.5.1 Transporte de sacarosa .....	24
II.5.2 Transporte de monosacáridos.....	26
<b>III. ANTECEDENTES.....</b>	<b>28</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>32</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>33</b>



---

<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>33</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
VII.1 Estrategia experimental de trabajo.....	34
VII.2 Extracción y germinación de embriones de maíz .....	35
VII.3 Extracción de RNA por el método del Trizol.....	35
VII.4 Cuantificación y calibración del RNA extraído.....	37
VII.5 Reacción RT-PCR .....	37
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
VIII.1 Efecto de ABA, MeJA y SA sobre la germinación de embriones de maíz.....	41
VIII.1.1 Ácido abscísico.....	41
VIII.1.2 Metil jasmonato .....	43
VIII.1.3 Ácido salicílico .....	45
VIII.1.3.1 Efecto de diferentes concentraciones de SA sobre la germinación de embriones.....	45
VIII.1.3.2 Efecto de 1.5 mM de SA en la germinación de embriones de maíz. ....	46
VIII.2 Niveles de expresión de los transportadores de carbohidratos ZmHT y ZmSUT1 en embriones germinados en ABA, MeJA y SA.....	47
VIII.2.1 Efecto del ABA sobre la expresión de ZmSUT1, ZmHT, PRM y PDF .....	48
VIII.2.2 Efecto del MeJA sobre la expresión de ZmSUT1, ZmHT, PDF y AOS .....	51
VIII.2.3 Efecto del SA sobre la expresión de ZmSUT1, ZmHT, PRM y PAL .....	52
VIII.2.3.1 Curva temporal de expresión de los transcritos para ZmSUT1, ZmHT, PRM y PAL de los embriones incubados con 1.5 mM SA.....	54



VIII.3 Efecto de ABA, MeJA y SA sobre la transcripción de los transportadores de sacarosa y hexosas.....	57
VIII.4 Efecto de ABA, MeJA y SA sobre la transcripción de genes de defensa .....	59
VIII.5 Modelo propuesto. ....	60
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>XI. REFERENCIAS .....</b>	<b>64</b>



ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico	IPL	Isocorismato piruvato
ABRE	Elemento de respuesta a ABA	JA	Ácido Jasmónico
ACC	Ácido 1 carboxílico 1-aminociclopropano	LOX	Lipoxigenasa
AOS	Aleno óxido sintasa	MST	Transportador de monosacáridos
AOC	Aleno óxido ciclasa	MeJA	Metil jasmonato
ATP	Adenosin trifostato	OsSUT	Transportador de sacarosa en arroz
AtSUC	Transportador de sacarosa en Arabidopsis	OPDA	Ácido 12-ox-cis-10,15 fitodienoico
AtSTP	Transportador de azúcares en Arabidopsis	PAL	Fenilalanina amonio liasa
cDNA	DNA templado	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTP	Desoxinucleótidos trifostato	PDF	Defensina de planta
DNA	Ácido desoxiribonucleico	PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
DEPC	Dietil pirocarbonato	PTM	Transportador polioli/monosacárido
EDTA	Ácido etilendiamina tetra acético	RNA	Ácido ribonucleico
ET	Etileno	RNAm	RNA mensajero
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura	ROS	Especies reactivas de oxígeno
GA	Ácido giberélico	RT	Transcriptasa reversa
HvSUT	Transportador de sacarosa en cebada	SA	Ácido salicílico
ICS	Isocorismato sintasa	SAR	Respuesta sistémica adquirida
INV	Invertasa		



SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
STP	Proteína transportadora de azúcares
SUF	Facilitadores de sacarosa
SUT	Transportador de sacarosa
TAE	Tris-acetato-EDTA
TMT	Transportador tonoplástico de monosacáridos
VGT	Transportador vacuolar de glucosa
VvcwINV	Invertasa de pared celular en uva
VvHT	Transportador de hexosas en uva
VvSK	Cinasa inducida por carbohidratos en uva
VvSUT	Transportador de sacarosa en uva
ZmHT	Transportador putativo de hexosas en maíz
ZmSUT	Transportador de sacarosa en maíz



## I. RESUMEN

En la naturaleza las plantas están expuestas a factores que les generan estrés. Ante esta situación desfavorable, se induce un cambio en la concentración de hormonas que modifica la expresión de genes en respuesta al daño como un intento de retorno a la homeostasis. Se han descrito diferentes hormonas que actúan ante un estrés de tipo biótico, el ácido salicílico (SA) actúa ante el ataque por patógenos biotrófos, en tanto el metil-jasmonato (MeJA) y el etileno (ET) tienen participación activa durante una infección por patógenos necrotrofos, insectos y heridas. Por otro lado, el ácido abscísico (ABA) implicado ante el estrés abiótico, podría tener también un efecto indirecto ante un eventual ataque por patógeno.

En un estudio previo, el patógeno *Fusarium verticillioides* modificó la toma de carbohidratos de embriones de maíz, destacando el incremento en la transcripción de 2 transportadores de carbohidratos ZmHT y ZmSUT1 a las 12 h post-infección, así como niveles elevados de ABA. A tiempos prolongados los transcritos para ZmHT y ZmSUT1 se reducen, se mantienen los niveles altos de ABA y aumenta el SA. Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue evaluar si los cambios en los niveles hormonales ocurridos durante la interacción *Fusarium*-maíz son los responsables de los cambios en la expresión de los transcritos para ambos transportadores.

Se encontraron diferentes efectos con cada hormona evaluada. ABA redujo la longitud de la radícula a medida que aumentó su concentración. Sin embargo, el porcentaje de germinación disminuyó solo un 15% a todas las concentraciones probadas. A nivel transcripcional ABA no cambió los niveles de ZmHT, ZmSUT1 y tampoco la expresión de proteínas de defensa como PRM.

Por su parte, MeJA disminuyó el porcentaje de germinación de los embriones hasta un 33.9% a 300  $\mu$ M. Los transcritos mostraron una reducción de 3 y 2.5 veces para ZmSUT1 y ZmHT, respectivamente, en comparación con el tejido sin MeJA y a las concentraciones probadas de 50-300 $\mu$ M. Que podría deberse a la inhibición reportada de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y que lleva a la disminución de moléculas estructurales y ATP, indispensables para la elongación radicular.

De las hormonas probadas, el SA produjo el mayor descenso en la germinación de los embriones, a 0.5 mM redujo un 20% y a 5 mM ya no germinaron. A nivel de transcritos, SA disminuyó tanto ZmSUT1 como ZmHT, aunque éste último fue menos sensible a la adición de SA, ya que el transcrito aún fue detectable a 5 mM. La incubación con 1.5 mM de SA por 36 horas mostró una reducción en la cantidad de ambos transcritos, aunque mayor para ZmSUT1. Se ha documentado que SA aumenta la actividad de las nucleasas y también cambia el estado redox de las células, como al reducir el nivel de catalasas. Por lo tanto, el aumento observado en la degradación de los mensajeros a concentraciones mayores de 1.5 mM puede deberse a este efecto global de inhibición en la transcripción genética.

Por lo anterior, ninguna de las hormonas probadas es responsable del incremento en los transcritos para ambos transportadores de carbohidratos en la infección temprana del embrión por *Fusarium*. Sin embargo, es probable que SA y/o MeJA estén involucrados en la reducción de los transcritos a tiempos tardíos de la infección de *Fusarium*.

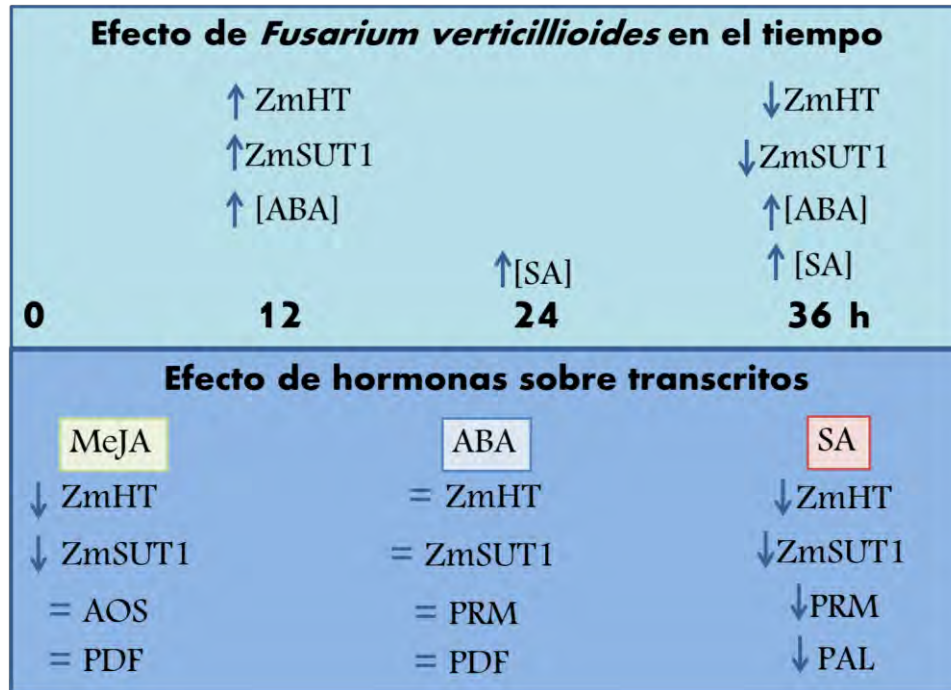


Figura I.- Resumen comparativo entre los efectos provocados por *F. verticillioides* y los causados por MeJA, ABA y SA en la expresión de transcritos de embriones de maíz. El efecto de las hormonas se describe después de 24 h de imbibición.



## II. INTRODUCCIÓN

### II.1 El maíz.

Por superficie cultivada, el maíz (*Zea mays*) es hoy el tercer producto agrícola en el mundo, después del arroz y el trigo. Se cosechan casi 150 millones de hectáreas con una producción mundial que supera los 600 millones de toneladas (Esteva y Merielle, 2007). Su importancia es tal, debido a que suministra elementos nutritivos a los seres humanos, a los animales y es una materia prima básica en la industria de la transformación, con la que se produce almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y recientemente combustible (FAO, 1992).

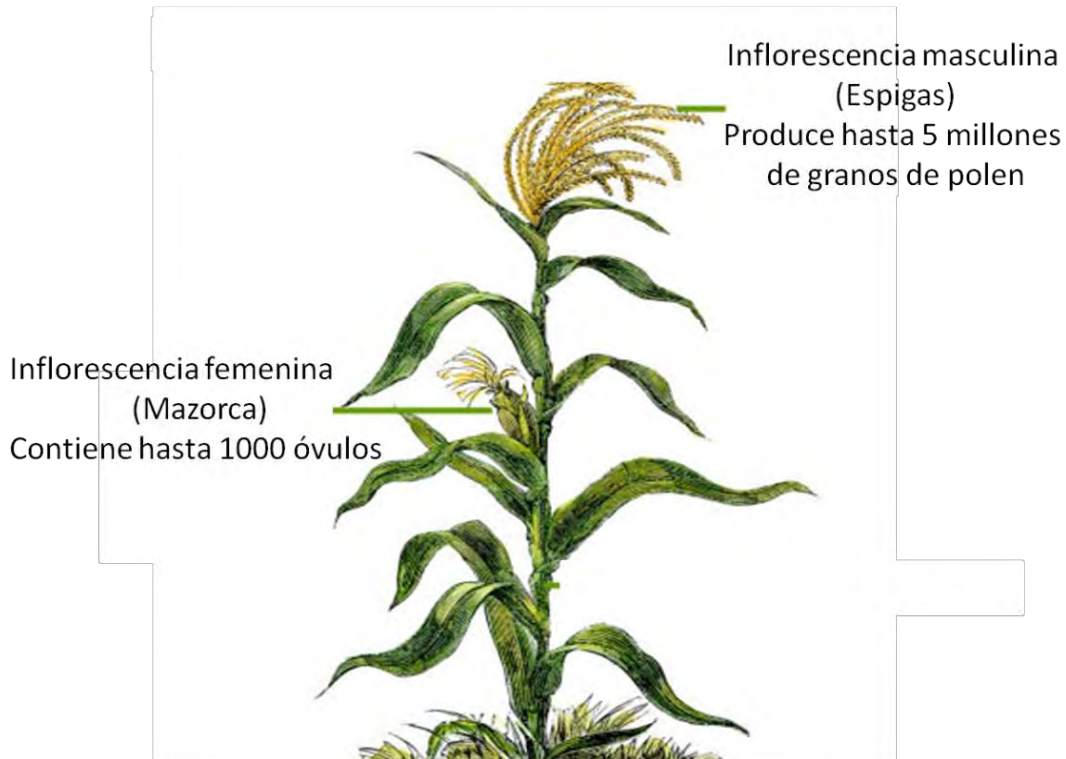
#### II.1.1 Características de la planta.

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas. Es una planta monocotiledónea de porte robusto y de hábitat anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud, alcanzando alturas de uno a cinco metros, con pocas ramificaciones. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo (Kato et al., 2009). El maíz, como excepción entre todos los cereales importantes, tiene inflorescencias masculinas y femeninas separadas (Figura 1), aunque se forman sobre la misma planta (Bartolini, 1990).

La inflorescencia masculina es terminal y se conoce como espiga, consta de un eje central y ramas laterales. En cada florecilla componente de la espiga hay tres estambres donde se desarrollan los granos de polen. Se producen alrededor de 2 y 5 millones de granos de polen, cantidad suficiente para asegurar la fecundación del órgano femenino, formado más abajo y denominado mazorca. La inflorescencia femenina o mazorca está constituida por un grupo cilíndrico de flores femeninas, cada una de las cuales forma una cariósida (grano) si la



polinización se realiza con normalidad. En una mazorca de dimensión normal y bien desarrollada se pueden contar de 700 a 1000 óvulos (futuras cariósides maduras), dispuestos siempre en un número par de filas (16,18 e incluso 22) una vez madura la mazorca, cada uno de estos granos o semillas son un fruto independiente que está insertado en el olote (Bartolini, 1990; Kato *et al.*, 2009).



**Figura 1.-Planta de maíz adulta.** Se muestran las inflorescencias masculinas y femeninas. Tomado y adaptado de SIAP, 2012.

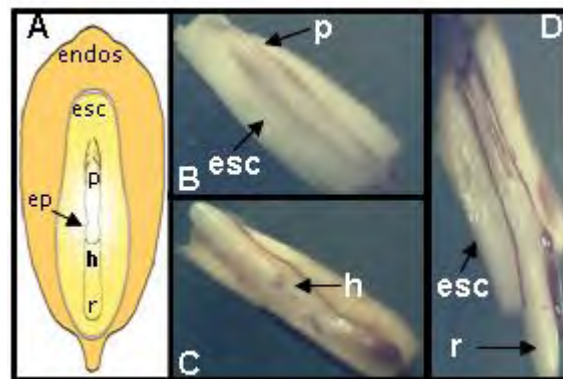
### II.1.2 Estructura del grano del maíz.

El grano constituye aproximadamente el 42% del peso en seco de la planta. En el grano maduro del maíz se distinguen tres partes principales: El revestimiento exterior de la semilla, denominado pericarpio, el endospermo amiláceo y el embrión, que dará origen a la nueva planta (Bartolini, 1990).

Pericarpio.- Tiene como función proteger el interior de eventuales ataques de patógenos externos (hongos y bacterias) y por ello, si se daña, la germinación se reduce considerablemente e incluso puede verse comprometida por completo.

Endospermo.- Constituye la principal reserva energética de la semilla, de la cual la plántula obtiene almidón y sustancias proteicas para hacer frente a sus necesidades durante el periodo previo al desarrollo de la radícula y a la aparición de las hojas. El endospermo, es la envoltura externa del embrión (Figura 2A). En general, supone 4/5 del peso total del grano y está constituido por un 87% de almidón y un 8% de proteína, así como pequeñas cantidades de lípidos y minerales.

Embrión.- Se puede definir como una planta de maíz en miniatura (Figura 2B, C y D). La plúmula y radícula forman conjuntamente el eje del embrión y están flanqueadas por el cotiledón o también denominado escutelo que hace las veces de depósito nutritivo, de alto contenido en aceite (30-40%) y en sustancias esenciales, en el primer estadio de la germinación y crecimiento de la cariósida (Bartolini, 1990).



**Figura 2.- Estructura de la semilla y embriones de maíz germinados.** A. Semilla de maíz mostrando algunos de sus tejidos. B, C y D Embriones de maíz germinados por 8 (B), 12 (C) y 24 h (D). El embrión se obtiene de la remoción del endospermo (endos) y en él se puede observar el eje embrionario constituido por la plúmula (p), el epicótilo (ep), el hipocótilo (h) y la radícula (r) y rodeado por el escutelo (esc). Las zonas moradas corresponden a la tinción del tejido para revelar la presencia de sacarosa. Tomado y adaptado de Sánchez-Linares *et al.*, 2012.



Como se puede observar en la Tabla 1 las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. El pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%) y aproximadamente 8% de proteínas (FAO, 1992).

**Tabla 1. Componentes principales de los tejidos principales de la semilla de maíz.** Tomado y adaptado de FAO, 1992.

Componente	Pericarpio (%)	Endospermo (%)	Embrión (%)
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Lípidos	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcares	0.34	0.62	10.8

## II.2 Germinación.

Una semilla es esencialmente un embrión en un estado latente. La latencia o dormancia se refiere a la incapacidad de la semilla intacta viable para completar la germinación bajo condiciones favorables (Bewley, 1997). En este estado, el embrión tiene una tasa metabólica extremadamente baja, de hecho muchas semillas pueden sobrevivir con sus reservas de almacenamiento por periodos prolongados antes de continuar con la siguiente etapa del desarrollo, la germinación (Pessarakli, 2002).

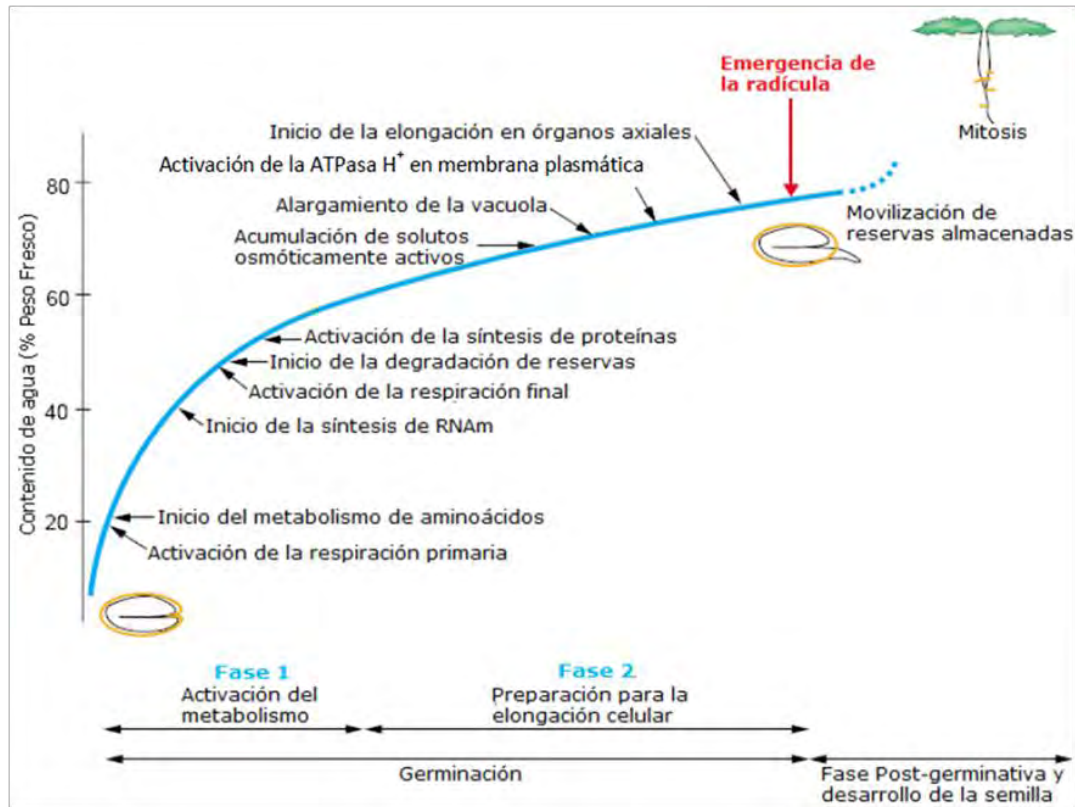
La germinación de la semilla es un proceso único que involucra la transición de semillas de un estado seco e inactivo a uno hidratado y activo. Este estado de transición está acompañado por la reanudación de la actividad respiratoria,



reparación de membranas y biosíntesis de macromoléculas. El proceso germinativo es afectado por factores ambientales como disponibilidad de agua, oxígeno y luz así como temperatura, e intrínsecos tales como la latencia, la permeabilidad del escutelo al agua y oxígeno entre otros (Bove *et al.*, 2001).

La germinación comienza con la toma de agua de la semilla seca y concluye cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar las estructuras que la rodean, este evento marca el inicio del crecimiento de la plántula (Bewley y Black, 1994; Bove *et al.*, 2001). Eventos subsecuentes, incluyendo la movilización de la mayor parte de las reservas almacenadas, son asociadas con el crecimiento de la plántula.

La toma de agua por una semilla seca madura es trifásica, con una toma rápida inicial en la primera fase, seguida de una fase de meseta y su final marca la conclusión de la germinación (Figura 3). Un consumo adicional de agua ocurre sólo después de que el eje embrionario se elonga. Las estructuras y enzimas necesarias para la reanudación inicial de la actividad metabólica se asume que están presentes dentro de la semilla seca, sobreviviendo parcialmente intactas. La reintroducción de agua durante la imbibición es suficiente para reanudar las actividades metabólicas (Bewley, 1997)



**Figura 3.-Curva de toma de agua de la semilla y los eventos metabólicos asociados a ella.** Se distinguen las tres fases características de la germinación, en donde propiamente las fases I y II son las germinativas y la fase III es una fase posgerminativa. Tomado y adaptado de Bove *et al.*, 2001.

### Fase I

La superficie de las proteínas, celulosa, almidón y otras sustancias se hidratan. La entrada del agua a las células de las semillas secas provoca el ablandamiento o ruptura de la cubierta de la semilla y un incremento en su volumen (Bove *et al.*, 2001; Pessaraki, 2002), además de perturbaciones estructurales temporales, particularmente de membranas, que conduce a una rápida fuga de solutos y metabolitos de bajo peso molecular a la solución de imbibición (Bewley, 1997). Al poco tiempo de rehidratación, la membrana regresa a su configuración más estable y la fuga de solutos se reduce (Calzada-Alejo, 2011). También durante esta fase, las vías glucolítica, la oxidativa de las pentosas fosfato y el metabolismo de aminoácidos se reanuda, así mismo se produce la activación de las enzimas del ciclo de Krebs, además comienza la síntesis de proteínas la cual es inicialmente dependiente de los ribosomas existentes. Por otro lado, después de la



imbibición comienza la reparación del DNA dañado durante la maduración y el secado, así como la síntesis de DNA mitocondrial (Bewley, 1997).

## **Fase II**

Fase también denominada “estacionaria”, en ella continúa la toma de agua aunque de manera más lenta que en la fase anterior. En esta fase hay una actividad metabólica alta, en donde se convierten en energía las moléculas de almacenamiento de bajo peso molecular y compuestos solubles (Sánchez-Linares *et al.*, 2012), usados para la producción de más células y tejidos, que culmina con la salida de la radícula. Además se acumulan sustancias osmóticamente activas como azúcares, aminoácidos e iones potasio y se acidifica la pared celular. Durante esta fase, la tasa de absorción de agua es modulada por el potencial osmótico interno (Pessarakli, 2002).

## **Fase III**

Esta fase se considera como post-germinativa. Se hace visible el rápido crecimiento de la radícula, ésta elongación es ocasionada por la movilización de las reservas almacenadas en tejidos tanto embrionarios como extraembrionarios (Bewley, 1997; Pessarakli, 2002).

### **II.3 Enfermedad y estrés en plantas.**

Una definición amplia de enfermedad engloba cualquier anormalidad fisiológica o que rompe significativamente la salud “normal” de una planta. Así las enfermedades conducen a estrés en la planta y son causadas por agentes vivos (bióticos) como los hongos, bacterias e insectos, o bien ambientales (abióticos) como la deficiencia nutricional, sequía, escasez de oxígeno, excesiva temperatura, irradiación ultravioleta, entre otros.



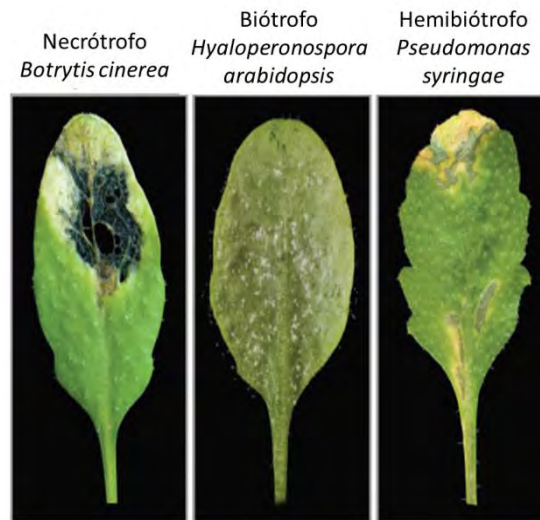
### II.3.1 Estrés por factores bióticos

La interacción de la planta con algún patógeno detona una respuesta especializada para contender con el patógeno. Aunque las plantas carecen de un sistema inmune comparable con el de los animales, han desarrollado una variedad de compuestos y proteínas para defenderse de organismos que las invadan y detenerlos antes de que causen un daño extenso (Pieterse *et al.*, 2009; Thoma *et al.*, 2001; Koornneef *et al.*, 2008). Algunos de los cambios en la planta en respuesta al estrés biótico incluyen aumento en los flujos de iones, generación de especies reactivas de oxígeno, activación de cascadas de proteínas cinasas, expresión de genes de defensa y acumulación de compuestos antimicrobianos (Halim *et al.*, 2006). Por otra parte, modifican los contenidos de algunas hormonas. Entre éstas últimas el ácido salicílico (SA), el etileno (ET) y los jasmonatos (JA) son las hormonas que contribuyen mayormente a la respuesta de defensa contra patógenos en plantas, aunque no se descarta la participación del ácido abscísico, los brasinoesteroides y las auxinas (Bari y Jones, 2009).

Las dos vías de señalización más estudiadas en la interacción planta-patógeno son: la vía del SA y la vía JA-ET. La participación de cada una de las vías depende del tipo de patógeno que ataque a la planta (Pieterse *et al.*, 2009; Thoma *et al.*, 2001; Koornneef *et al.*, 2008).

De acuerdo al estilo de vida, los microorganismos patógenos de plantas se clasifican en necrótrofos y biótropos. Los necrótrofos primero destruyen las células del hospedero, usualmente a través de la producción de fitotoxinas, para después alimentarse del contenido celular vegetal. Los biótropos obtienen los nutrientes de los tejidos del huésped en el que habitan, comúnmente a través de estructuras especializadas que invaginan en la célula hospedera sin destruirla, el crecimiento de la masa fúngica compete por los fotoasimilados dentro de los tejidos de su hospedero, en donde actúa como un tejido adicional y altera los patrones normales de reparto del carbono. No obstante lo anterior, hay patógenos de

plantas que muestran ambos estilos de vida, cambiando de biótrofos a necrótrofos, este cambio a crecimiento necrotrófico puede ser visto como un mecanismo para evitar el contacto directo con compuestos de defensa como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan a biótrofos. A este tipo de microorganismos se les conoce como hemibiótrofos o biótrofos facultativos (Pieterse *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2012).



**Figura 4.- Síntomas de enfermedad en hojas de *Arabidopsis* después de la interacción con diferentes microorganismos patógenos.** Los patógenos necrótrofos producen la muerte del tejido para alimentarse de su contenido posteriormente, la respuesta contra este ataque es mediada por JA-ET. Los biótrofos por su parte, obtienen nutrientes del tejido de la célula hospedera sin destruirla y activan la respuesta de defensa en la planta vía SA. Los patógenos hemibiótrofos son capaces de presentar ambos estilos de vida. Tomado de Pieterse *et al.*, 2009.

Se ha planteado que para montar una respuesta de defensa efectiva, la planta activa la vía de señalización selectiva para la defensa de la planta ante un tipo particular de patógeno por lo que la respuesta macroscópica evidentemente es distinta (Figura 4), dicha regulación se sugiere permite a la planta una rápida adaptación a un ambiente hostil y a utilizar sus recursos de una forma eficiente (Pieterse *et al.*, 2009). Por ejemplo, la vía de señalización dependiente de JA-ET se enciende por la presencia de herbívoros y por patógenos de tipo necrotrófo. Así se ha observado que en *Arabidopsis thaliana*, la vía JA-ET es necesaria para la resistencia a los patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea* y *Erwinia*

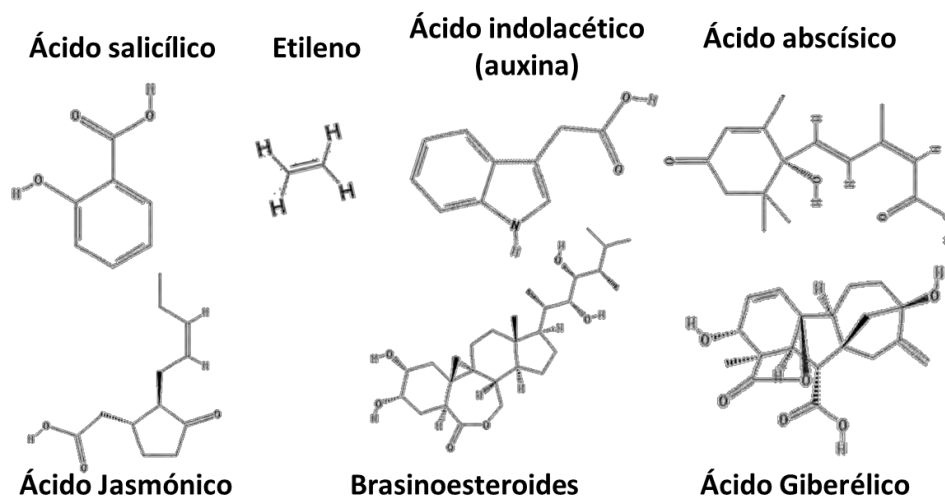




*carotovora*. En contraste, la señalización por SA media la resistencia a patógenos biotróficos como *Hyaloperonospora arabidopsis* y *Peronospora parasitica* (Anderson *et al.*, 2004).

## II.4 Hormonas y estrés en plantas.

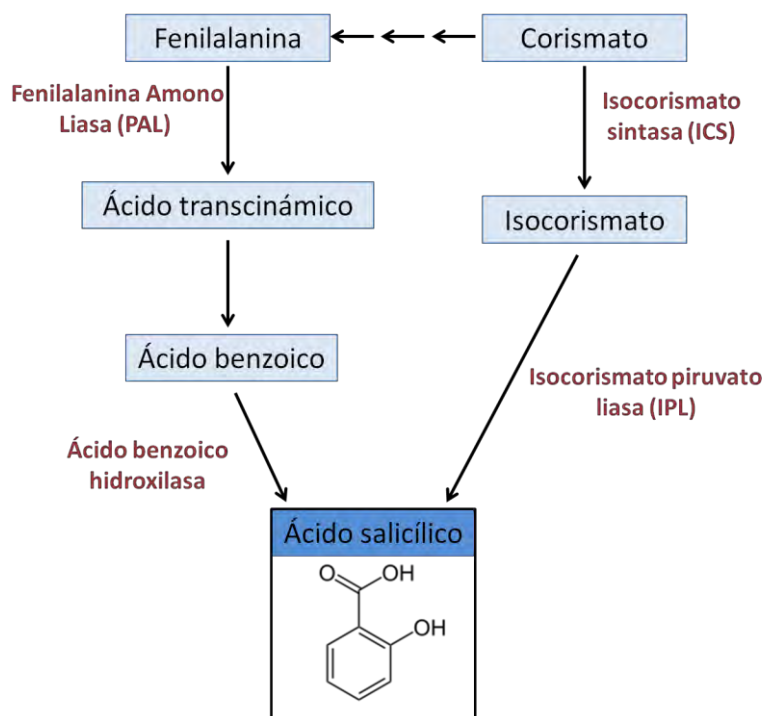
Las hormonas son moléculas pequeñas y esenciales para la regulación del crecimiento, desarrollo, reproducción y sobrevivencia de la planta. Actúan como moléculas señal y lo hacen a bajas concentraciones. Entre las hormonas de plantas encontramos al ácido abscísico (ABA), las auxinas, las citocininas, el etileno (ET), las giberelinas, los brassinosteroides, los jasmonatos y el ácido salicílico (SA) (Figura 5). Cambios en su concentración o la sensibilidad a alguna de éstas hormonas son provocadas bajo condiciones de estrés biótico o abiótico y llevan un amplio rango de respuestas adaptativas en la planta (Li y Huang, 2011; Anderson *et al.*, 2004).



**Figura 5.-** Hormonas y compuestos que regulan el desarrollo de plantas. Tomado de Pieterse *et al.*, 2009.

### II.4.1 Ácido salicílico.

El ácido salicílico (SA) forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. En la biosíntesis de SA, la fenilalanina es convertida en ácido salicílico por dos vías (Figura 6), una a través de una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la Fenilalanina Amonio Liasa (PAL por sus siglas en inglés) pasando por el ácido benzoico y la otra mediante el corismato, vía isocorismato, que implica la participación de la Isocorismato Sintasa e Isocorismato Piruvato Liasa (Rangel *et al.*, 2010).



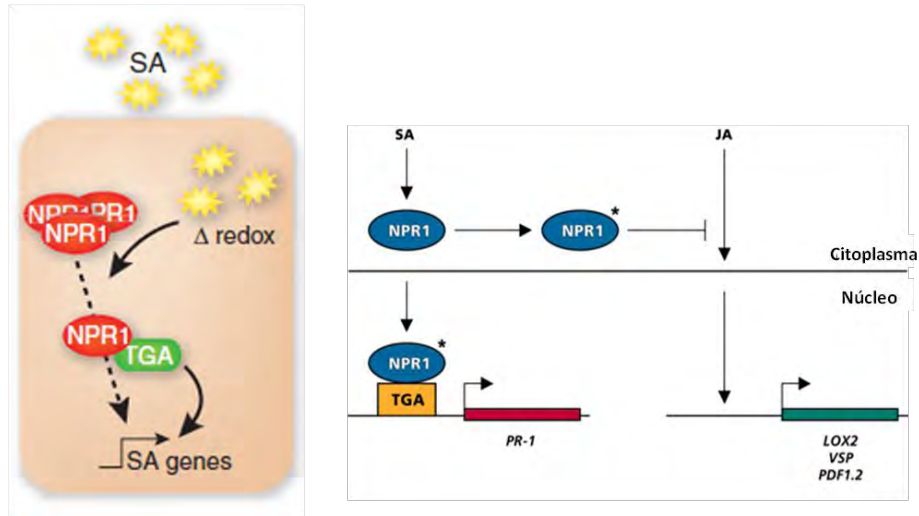
**Figura 6.- Vías de síntesis del ácido salicílico.** Tomado y modificado de Jordan y Casaretto, 2006.

Existe evidencia de que el ácido salicílico regula procesos como la germinación de la semilla, crecimiento vegetativo, fotosíntesis y senescencia. Mucha de la investigación en esta molécula se ha centrado en su papel en la respuesta local y sistémica contra patógenos microbianos, ya que se sabe juega un papel importante en las respuestas de defensa posteriores al ataque de patógeno, estas



incluyen entre otras, la activación de la muerte celular y la SAR (del inglés systemic acquired resistance). La SAR es la respuesta inmune basal inducida por la infección por patógenos y que induce necrosis localizada del tejido, así evita la propagación de la infección en toda la planta. Una indicación de que SA está presente y actuando como respuesta de defensa a nivel molecular es la inducción de la expresión de proteínas PR (de las siglas en inglés pathogenesis related protein) (Rangel *et al.*, 2010; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011).

La transducción de la señal por ácido salicílico requiere de la función de la proteína NPR1 (“Nonexpressor of PR genes”), una proteína reguladora de resistencia a enfermedad, que activa la expresión de los genes PR; además regula la expresión de GRX480 y WRKY70, genes que codifican para proteínas que suprimen la expresión de genes dependientes de la hormona JA (Figura 7). Los cambios redox inducidos por ácido salicílico activan a NPR1 mediante la reducción de oligómeros inactivos de NPR1 a monómeros activos. Estos monómeros son translocados al núcleo, donde interaccionan con factores de transcripción del tipo TGA (factores de transcripción básicos y de unión a “zipper” de leucina). La interacción entre NPR1 y la familia de factores de transcripción TGA es requerida para la unión de esos factores a los elementos del promotor que juegan un papel crucial en la activación de genes PR mediados por ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 2009; Spoel *et al.*, 2003; Koorneef *et al.*, 2008).



**Figura 7.- Vía de transducción de la señal por SA y la inducción de la expresión de genes para PR.** Tomado y modificado de Pieterse *et al.*, 2009; Spoel *et al.*, 2003.

Se sabe que el ácido salicílico es un intermediario necesario en la vía de señalización de SAR, ya que mutantes afectadas en la señalización por SA son incapaces de desarrollar SAR y no muestran activación de genes PR una vez que ha sucedido la infección. Dado que al haber muerte celular la respuesta hipersensible beneficia a necrófitos, se cree que esta respuesta es activada principalmente contra patógenos biótrofos (Pieterse *et al.*, 2009).

#### II.4.1.1 Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

Además de las reacciones locales, las plantas en ocasiones activan respuestas sistémicas de defensa en sitios no infectados de la planta, que son caracterizados por la activación sistémica de genes relacionados con la patogénesis o PR, que mejoran la resistencia a infecciones subsecuentes. Esta resistencia sistémica adquirida es de larga duración y es activa contra un amplio rango de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos (Halim *et al.*, 2006). Las PR's son definidas como proteínas codificadas por la planta huésped, inducidas específicamente en situaciones relacionadas con la patogénesis, no sólo se acumulan localmente en la zona infectada sino que también son inducidas sistémicamente. Muchas



proteínas PR poseen actividad antimicrobiana que se cree contribuyen al estado de resistencia alcanzado y están asociadas con el desarrollo del sistema de resistencia adquirido, siendo el principal papel de estas proteínas la adaptación a condiciones de estrés biótico (Van Loon y Van Strein, 1999). De hecho cuando se ha realizado el estudio de bibliotecas genómicas durante el proceso de infección en maíz se ha encontrado que alrededor del 15% de los genes identificados están relacionados con mecanismos de defensa de la planta, identificando en particular a PR1 y PR5 desde las 12 horas post-infección (Vargas *et al.*, 2012).

#### **II.4.2 Jasmonatos.**

Los jasmonatos son compuestos de origen lipídico de estructura molecular similar a la de las prostaglandinas en animales. Actúan como moléculas señal de las respuestas de las plantas a diversas situaciones de estrés y participan en diversos procesos del crecimiento y desarrollo. La ruta de biosíntesis es conocida como la vía de los octadecanoides, en esta los jasmonatos son formados a partir de los ácidos grasos linoleico y linolénico que se liberan de los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de lipasas. El ácido linolénico, por una serie de pasos que incluyen lipoxidación, ciclización y  $\beta$ -oxidación se transforma en el ácido-7-isojasmónico, el cual se isomeriza en ácido jasmónico. Los jasmonatos se esterifican con grupos metilo para formar metil-jasmonatos, los cuales son altamente volátiles. El paso limitante de la vía lo cataliza la enzima aleno óxido sintasa o AOS (Jordan y Casaretto, 2006) (Figura 8).

Se ha encontrado que las heridas y JA inducen la expresión de los genes AOS en *Arabidopsis* y maíz (Harms *et al.*, 1998; Laudert y Weiler, 1998). Aunque también en *Arabidopsis* la AOS es inducida por etileno, hormona que también actúa en conjunto con jasmonatos para regular la expresión de genes en respuesta a herida en tomate (O'Donnell *et al.*, 1996; Laudert y Weiler, 1998).

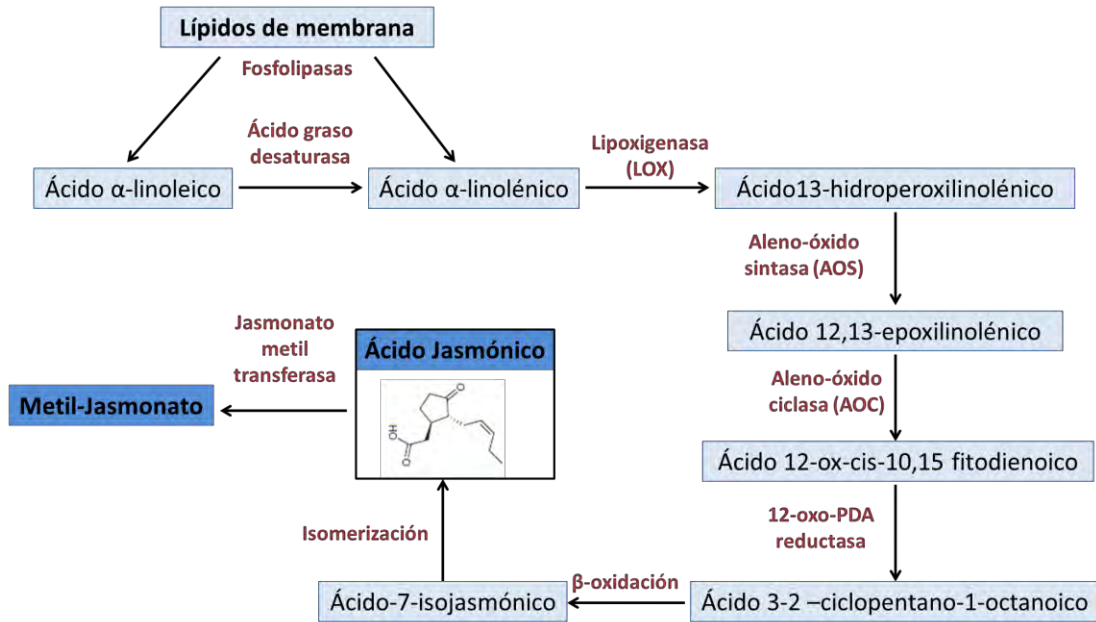
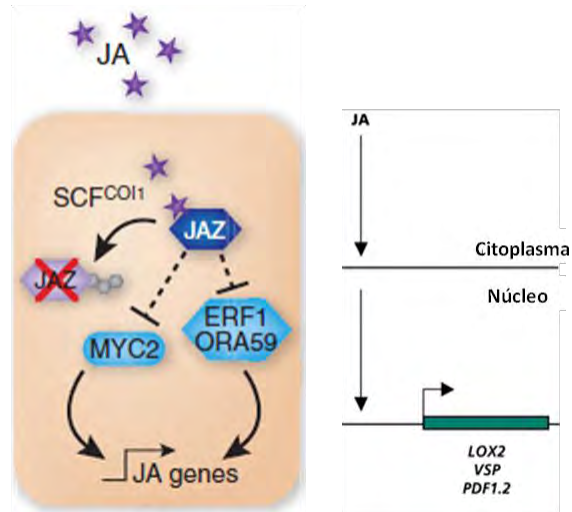


Figura 8.- Vía de síntesis de JA. Tomado y modificado de Jordan y Casaretto, 2006.

Tanto el ácido jasmónico como el etileno (ET) regulan a la defensina PDF.1 en *Arabidopsis*, un gen importante para la defensa. En la transducción de señales mediada por jasmónico se ha planteado que el complejo E3 ubiquitina ligasa SCF<sup>Col1</sup> y las proteínas JAZ forman un supracomplejo que reprime la transcripción de los genes de respuesta a JA. Una vez que se ha acumulado el JA, el JA-iso-leucina se une a la caja F de la proteína Col1 en el complejo SCF<sup>COL1</sup>, las proteínas JAZ son ubiquitinadas y subsecuentemente degradadas a través del proteosoma 26S, dando como resultado la activación de los genes de respuesta a JA a través de la acción de factores de transcripción como MYC2, ORA59 y ERF1. Estos últimos (ERFs) son miembros de una superfamilia de factores de transcripción. Dos miembros de esa superfamilia, ERF1 y ORA59 son los principales integradores de la vía de señalización JA-ET. Por su parte MYC2 funciona como un regulador positivo de los genes de respuesta del JA tales como VSP2 y LOX2. Esto supone otro nivel de regulación, ya que cuando la respuesta por JA es activada en combinación con ET, la rama de los ERFs es activada, en tanto que la rama MYC2 es activada cuando hay JA pero ET está ausente (Pieterse *et al.*, 2009).



**Figura 9.- Vía de señalización mediada por JA y la inducción de los genes LOX2 y PDF.** Tomado y modificado de Pieterse et al., 2009; Spoel et al., 2003.

#### II.4.3 Hormonas en la latencia y germinación.

En el sistema experimental que se usó en este trabajo hay otras dos hormonas que son parte importante de su fisiología, el ácido abscísico (ABA) y el ácido giberélico (GA), por lo que también se describe su función.

La latencia se define como una habilidad intrínseca para bloquear temporalmente la elongación de la radícula para optimizar la sincronización de la germinación, resultando en una tasa metabólica reducida. La latencia es un proceso que involucra la interacción entre dos hormonas principalmente, el ABA y el GA. El primero se encuentra involucrado en mantener la latencia y por tanto inhibir la germinación de semillas, mientras que el GA estimula la germinación (Bove *et al.*, 2001).



#### II.4.3.1 Ácido abscísico.

El ácido abscísico es un terpenoide que proviene de la escisión de un carotenoide de 40 carbonos, el primer producto en la ruta biosintética es la zeaxantina, la cual es producida como un trans-isómero después de una ciclización e hidroxilación. Los pasos siguientes consisten en la síntesis de los cis-isómeros de violaxantina y neoxantina que son escindidos para formar el precursor de 15 carbonos de ABA (Tuteja, 2007).

Como se ha mencionado, las plantas experimentan diferentes tipos de estrés abiótico, los cuales son percibidos para posteriormente responder adaptativamente a estos. Se sabe que en este proceso adaptativo ABA tiene una participación importante, ya que actúa con un mensajero endógeno en la regulación del balance de agua de la planta y tolerancia al estrés osmótico (Tuteja, 2007).

ABA juega un papel central en la maduración del embrión, al suprimir la germinación precoz e inducir la expresión de genes asociados a la maduración para la acumulación de productos de almacenamiento y la adquisición de tolerancia a la desecación (White *et al.*, 2000). Existe evidencia de que ABA está involucrado en regular el inicio de la latencia así como en el mantenimiento del estado latente, sin embargo no se conoce como ocurre esta regulación. ABA ha sido descrito típicamente como un inhibidor del crecimiento, por su efecto inhibitorio cuando ABA es aplicado exógenamente en germinación, y porque además los niveles de ABA disminuyen durante la imbibición de la semilla (Tuteja, 2007).

Aparte del bien establecido papel de ABA en la adaptación al estrés de tipo abiótico, existe evidencia que indica que ABA también está involucrado en la regulación y la integración de las respuestas de la planta frente al estrés de tipo biótico, aunque el papel de ABA en respuesta al ataque por patógenos resulta





contradictorio, ya que en general es un regulador negativo de la resistencia al estrés por patógenos sin embargo, a veces promueve las defensas de la planta (Asselbergh *et al.*, 2008; Ton *et al.*, 2009).

Por ejemplo, la regulación negativa de la defensa de la planta contra determinados patógenos biótrofos y necrótrofos ha sido observada cuando aplicaciones exógenas de ABA aumentan la susceptibilidad de varias especies de plantas a patógenos microbianos y fúngicos. Asimismo, se ha reportado que el tratamiento con ABA suprime la inducción de la SAR, lo cual sugiere una interacción antagonista entre la vía de respuesta por SA y la señalización de ABA inducida por estrés abiótico en *Arabidopsis* (Yasuda *et al.*, 2008).

También ha sido reportado el papel de ABA como regulador positivo en la defensa, ya que ABA es capaz de activar el cierre de estomas, proceso que funciona como barrera contra la infección bacteriana. Además se ha observado que el tratamiento con ABA protege a las plantas contra *A. brassicicola* y *P. cucumerina*, lo cual indica que esta hormona actúa como señal positiva para la defensa contra algunos necrótrofos. Se sugiere que ABA regula esta respuesta de defensa a través de sus efectos en la deposición de calosa, producción de intermediarios de especies reactivas de oxígeno y la regulación de la expresión de genes de defensa (Bari y Jones, 2009).

Por otra parte, hongos hemibiótrofos como *Colletotrichum* también podrían estar actuando en respuesta a ABA, pues Vargas y colaboradores, observaron que al adicionar ABA a maíz infectado con *C. graminicola*, ocurrieron efectos importantes en el tiempo de desarrollo de la hifa secundaria (cambio del patógeno de biótrofo a necrótrofo), formación de la lesión y crecimiento de la lesión. Un análisis cuantitativo, indicó que la enfermedad se acentuaba hasta 3 veces más cuando las plantas eran tratadas con ABA. Por lo tanto, ABA también podría estar afectando la expresión de algunos genes de resistencia y provocando un prematuro cambio en el estilo de vida del hongo (Vargas *et al.*, 2012).



### II.4.3.2 Ácido giberélico.

Las giberelinas constituyen una gran familia de ácidos diterpenos que son sintetizados como una ramificación de la ruta terpenoide. Los niveles más elevados de giberelinas se encuentran en las semillas inmaduras y en los frutos en desarrollo. Las giberelinas influyen en una gran variedad de procesos de desarrollo, como la elongación del tallo y la movilización de las reservas del endospermo. Además, las giberelinas biológicamente activas también son conocidas por estar presentes durante la embriogénesis temprana en algunas especies y es clara su importancia en la germinación de muchas clases de semillas maduras. En cebada y trigo, el ácido giberélico induce la expresión de varios genes de enzimas hidrolíticas, estimulando la movilización de las reservas del endospermo, así mismo, GA se encuentra involucrado en la liberación de la latencia en diversas especies de plantas (White *et al.*, 2000).

Se ha reportado que las giberelinas promueven el crecimiento de la planta al estimular la degradación de reguladores negativos del crecimiento llamados proteínas DELLA. Estas proteínas además promueven la expresión de genes que codifican enzimas destoxicantes de especies reactivas de oxígeno, por lo cual estarían implicadas en la regulación de las respuestas de defensa de la planta contra varios patógenos a través de la modulación de los niveles de ROS en las plantas. Así mismo, las proteínas DELLA ayudan a controlar la respuesta inmune de la planta mediante la modulación de la respuesta dependiente de SA y JA. Se ha sugerido que las proteínas DELLA promueven la resistencia a necrótrofos, por activación de la respuesta de defensa dependiente de JA/ET, y la susceptibilidad a biótrofos por represión de la defensa dependiente de SA en *Arabidopsis*. Por tanto, ya que GA estimulan la degradación de proteínas DELLA, es probable que promuevan la resistencia a patógenos biótrofos y la susceptibilidad hacia los necrótrofos (Bari y Jones, 2009).



En general, se ha establecido que GA juega un papel negativo en la resistencia basal a enfermedad en algunas especies de plantas. Yang y colaboradores (2008) reportaron que una enzima desactivante de GA (EUI) regula los niveles de GA y está involucrada en la resistencia a enfermedad ante bacterias y hongos en arroz. La pérdida de función en mutantes de *eui* acumula altos niveles de GA mostrando una resistencia comprometida, mientras que la sobreexpresión de EUI acumula bajos niveles de GA's y muestra una resistencia incrementada a *M. oryzae* (Yang *et al.*, 2008).

#### II.4.4 Antagonismo entre hormonas.

Generalmente en todos los organismos existen segundos mensajeros que son comunes en varias vías de señalización, punto de entrecruzamiento de vías que crea sitios potenciales de regulación. El entrecruzamiento puede llevar a que diferentes vías de señalización puedan actuar antagónicamente o sinérgicamente, dependiendo de los eventos ambientales a los que la planta se encuentre expuesta. El entrecruzamiento de las vías de señalización entre SA, JA y ET es un importante mecanismo de regulación para la inmunidad de la planta (Figura 10). Por ejemplo, la acumulación endógena de SA antagoniza la defensa dependiente de JA, para dar prioridad a la resistencia mediada por SA. Sin embargo, dependiendo de la especie de planta y la estrategia del atacante, el JA también antagoniza o actúa en sinergismo con la vía para el SA (Koornneef *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* por ejemplo, durante la respuesta adaptativa para el estrés por calor tanto el SA como el JA parecen actuar juntos. Por su parte, se ha encontrado que ABA es capaz de antagonizar el inicio de la defensa dependiente de SA y SAR e inversamente la SAR suprime la expresión de genes relacionados con ABA. Del mismo modo, hormonas como las auxinas, las giberelinas y los brassinosteroides pueden interactuar antagónicamente o sinérgicamente con el sistema SA-JA-ET en la respuesta inmune de la planta (Mohr y Cahill, 2006; Pieterse *et al.*, 2009).

Por otro lado, hay patógenos que manipulan las vías de señalización de la planta para inhibir las respuestas de defensa de las plantas y usarlas en su beneficio. Por ejemplo, se ha demostrado que *Fusarium oxysporum* es capaz de tomar el control de la vía por JA en *Arabidopsis* para conducir a la muerte de la planta. Otro ejemplo es *Pseudomonas syringae*, quién induce la producción de ABA para suprimir la biosíntesis y por lo tanto la acción de SA, resultando en una susceptibilidad mayor a este patógeno. Adicionalmente, *P. syringae* produce proteínas efectoras como la coronatina, la cual actúa como un análogo de la forma más activa del JA, HopI1 y AvrRpt2, los cuales manipulan el programa de señalización para suprimir la respuesta inmune del hospedero y promover virulencia (Pieterse *et al.* 2009).

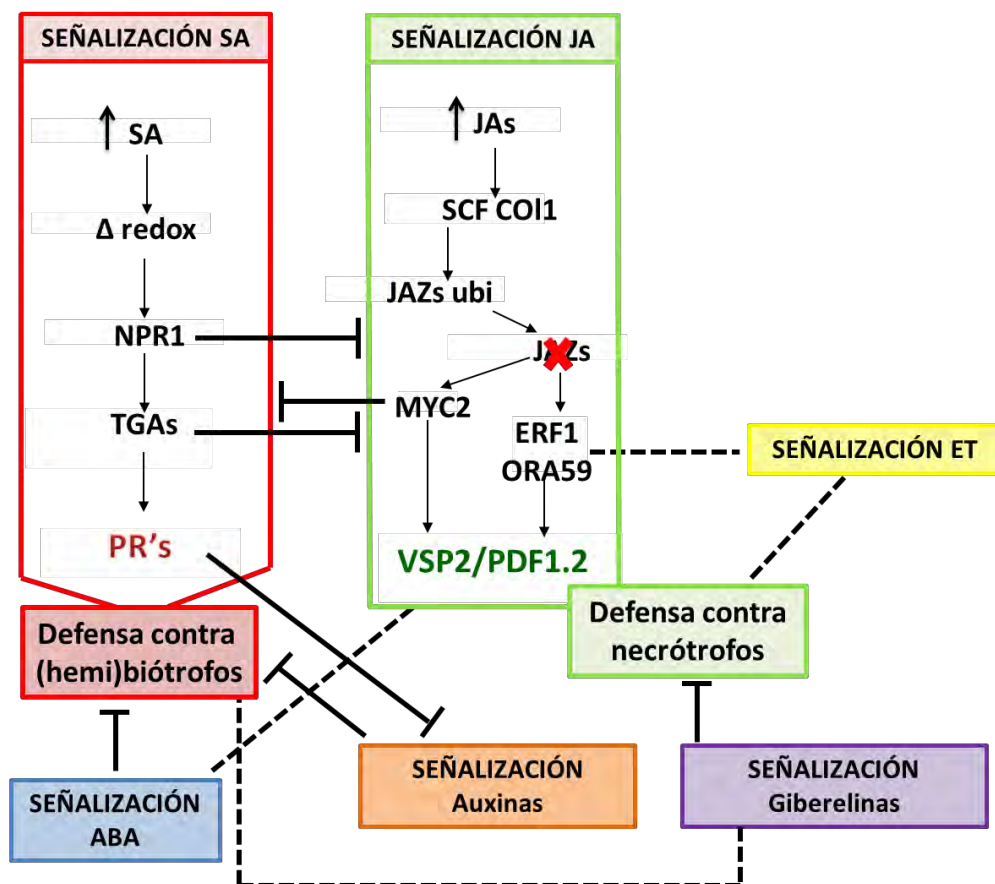


Figura 10.- Entrecruzamiento entre las vías de señalización mediadas por SA, JA, ET, ABA, auxinas y GA. Tomado y modificado de Pieterse *et al.*, 2009.

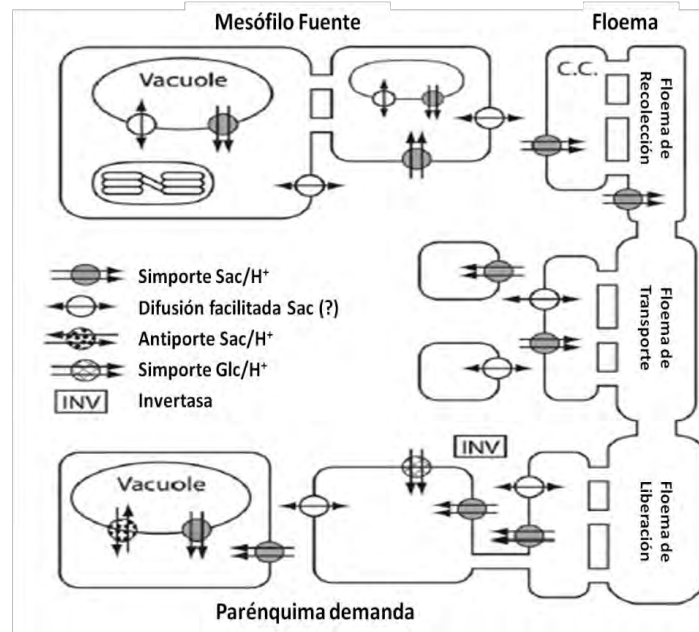


## II.5 Transporte de carbohidratos.

Se ha encontrado que durante la infección por hongos la actividad de enzimas que usan carbohidratos o su transporte se modifica (Berger *et al.*, 2010). Por ejemplo, Hayes y colaboradores encontraron que ante la infección fúngica se induce el transportador de hexosas VvHT5 en uva (*Vitis vinifera*) y la invertasa de pared celular VvcwINV, tal como sucede en presencia de heridas o daño. Sugiere que durante la infección la planta modifica su metabolismo probablemente para incrementar la toma de carbohidratos por la planta y reducir el carbono disponible para el patógeno. Coincidentemente durante la infección aumentan los niveles de ABA (Hayes *et al.*, 2010).

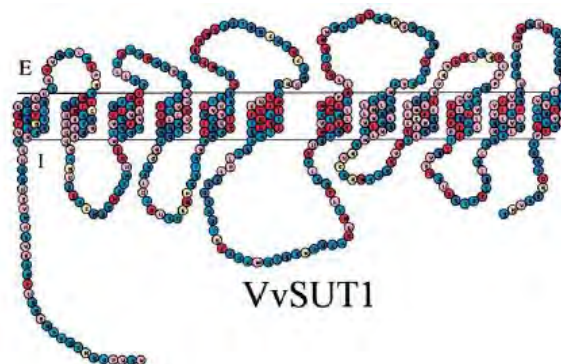
Las plantas regulan de manera muy fina los niveles de carbohidratos. Éstos no solo sirven como fuente de energía y de carbono, sino también representan importantes moléculas de señalización. Las plantas tienen mecanismos para detectar la ausencia o presencia de carbohidratos para modular y adaptar las respuestas celulares respecto al entorno. Se ha reconocido que los niveles de carbohidratos afectan la expresión de genes involucrados en procesos tales como la fotosíntesis, formación de tubérculos o biosíntesis de antocianinas (Doidy *et al.*, 2012).

Las plantas transportan sacarosa, hexosas y una amplia variedad de aminoácidos y péptidos, gracias a la especificidad de los transportadores localizados en sus membranas celulares. Los transportadores de carbohidratos son importantes en las células vegetales ya que participan en el control del transporte de los carbohidratos desde los tejidos denominados fuente o fotosintéticos hacia los tejidos demanda que no presentan la capacidad fotosintética (Figura 11) (Delrot *et al.*, 2001). Los sistemas transportadores de carbohidratos son necesarios para coordinar el reparto de carbono entre tejidos fuente y de demanda, el desarrollo de la planta, la comunicación célula-célula y la adaptación al ambiente.



**Figura 11.- Transporte de sacarosa entre los diferentes tejidos de la planta y diferentes compartimentos celulares.** Tomado de Ayre, 2011.

Dos de los transportadores de carbohidratos más representados en plantas son los transportadores de sacarosa (SUTs) y los de monosacáridos (MSTs). Ambos comparten una estructura común, 12 dominios transmembranales conectados por asas hidrofílicas y que principalmente funcionan como simportadores  $H^+$ /azúcar (Figura 12) (Doidy *et al.*, 2012). Aunque difieren en su distribución en la planta.



**Figura 12.- Topología de un transportador de sacarosa en la membrana.** Se reconocen los 12 cruces transmembranales y la posición de la región amino y carboxilo terminal de la proteína viendo hacia el lado interno de la célula (I), el carbohidrato es reconocido en el lado externo de la membrana (E). Tomado de Delrot *et al.*, 2001.



### II.5.1 Transporte de sacarosa.

La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis y es empleado como medio de transporte para la distribución del carbono en plantas. La sacarosa es producida en el citoplasma por dos vías: directamente de los productos de la fotosíntesis o bien de la movilización de las reservas (almidón). Son varios los destinos de la sacarosa, el primero es ser metabolizado en el citoplasma como fuente de carbono y energía para los procesos celulares. Otro destino es el medio extracelular, de donde se transporta hacia otras células, a aquellas que son incapaces de fijar el CO<sub>2</sub>, para ser utilizada como fuente de energía o carbono. Alternativamente, la sacarosa cruza una endomembrana para entrar a un organelo como la vacuola para su almacenamiento (Ayre, 2011).

La célula requiere proteínas para facilitar un movimiento eficiente de la sacarosa a través de sus membranas. Hay evidencias de que los simportadores Sacarosa/H<sup>+</sup> son necesarios para movilizar al carbohidrato. Los genes y proteínas que catalizan el movimiento en simporte de Sacarosa con H<sup>+</sup> han sido llamados transportadores de sacarosa (SUT) y aquellos que participan en transporte pasivo son denominados facilitadores de sacarosa (SUF). Todos los SUTs aislados hasta la fecha son simportadores Sacarosa/H<sup>+</sup> (Ayre, 2011).

El transporte de sacarosa es un proceso altamente regulado a nivel celular y de planta. Este responde a variaciones en la tasa fuente/demanda que depende a su vez de diversos parámetros internos y externos como el crecimiento, desarrollo, actividad fotosintética, luz, estado de agua, ataque por patógenos, etc. Esta flexibilidad ha sido posible por la presencia de una familia multigénica cuyos miembros son expresados en diferentes células, a diferentes tiempos y en diferentes condiciones. Lo anterior sugiere que su nivel de expresión varía entre células fuente y demanda, por lo que un transportador cumple diferentes papeles en diferentes órganos (Delrot *et al.*, 2001).



Todas las plantas poseen transportadores de sacarosa (SUT) involucrados en diversos pasos cruciales para el transporte a distancia de la sacarosa desde el tejido fuente a los sitios de demanda donde, los azúcares son empleados o almacenados. Se han descrito cinco diferentes grupos para clasificar a los SUTs: SUT1-SUT5 (Doidy *et al.*, 2012) a continuación se mencionan las principales características de cada uno.

**Grupo 1/SUT3.-** Comprende los SUTs específicos de monocotiledóneas involucrados en el transporte del floema, toma de sacarosa dentro de tejidos demanda y recuperación de la sacarosa del apoplasto. Están localizados en la membrana plasmática y tiene una afinidad moderada por la sacarosa, con valores de  $K_{0.5}$  en un rango de 3.7 mM para ZmSUT1 del maíz (*Zea mays*) a 10.6 mM para HvSUT1 de cebada (*Hordeum vulgare*).

**Grupo 2/ SUT1.-** Comprende los SUTs específicos de dicotiledóneas involucrados en el llenado del floema, toma de sacarosa en tejidos demanda y recuperación general del apoplasto. Se localizan en las membranas plasmáticas con una  $K_{0.5}$  en un rango de 0.066 mM para *Arabidopsis* AtSUC9 a 1.44 mM para AtSUC2. Tienen una especificidad de sustrato más amplia que el Grupo 1 con la capacidad de transportar una variedad de glucósidos.

Tanto el Grupo 1 como el Grupo 2, a pesar de sus diferencias de afinidad por la sacarosa son funcionalmente ortólogos.

**Grupo 3/SUT2.-** Se encuentran tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas y tienen aminoácidos adicionales en ambos extremos (amino y carboxilo) y en el asa 4 que se extiende dentro del citoplasma.

**Grupo 4/SUT4.-** Tienen aproximadamente un 47% de similitud con el Grupo 2, con 10 veces menos afinidad por la sacarosa. También transporta una variedad





más amplia de sustratos en relación al Grupo 1. Se localiza en el tonoplasto en algunas especies y en la membrana plasmática de otras.

**Grupo 5/SUT5.-** Específicos de monocotiledóneas y separado del Grupo 1. OsSUT5 de arroz es el único miembro de este grupo que ha sido bioquímicamente analizado, con una afinidad más alta que el OsSUT1 del Grupo 1 (Ayre, 2011).

### II.5.2 Transporte de monosacáridos.

Mientras las partes verdes fototróficas de la planta (fuente) sintetizan azúcares como producto de su actividad fotosintética durante el día, las partes no verdes (demanda) dependen de un constante importe de carbohidratos entregados vía floema. A pesar de que la sacarosa es el principal azúcar transportado en el floema, el transporte de monosacáridos juega un papel significativo en los intercambios intracelulares tanto en tejidos fuente como en tejidos demanda. En tejidos demanda la sacarosa importada vía floema es frecuentemente hidrolizada por invertasas extracelulares y los monosacáridos resultantes, glucosa y fructosa, son empleados para almacenamiento o su utilización directa (Figura 12). Además de la distribución del carbono a distancia, los azúcares son también distribuidos a nivel celular dentro de los diferentes organelos, dependiendo de los requerimientos en ese momento (Delrot *et al.*, 2001; Büttner, 2007).

La especificidad del sustrato en los transportadores de monosacáridos (MST) es más amplia que en los transportadores de sacarosa, cada transportador participa en la toma de un amplio rango de hexosas y pentosas, además, la mayoría de los transportadores de hexosas exhibe una expresión más alta en tejido demanda que en los tejidos fuente (Delrot *et al.*, 2001).

La familia de genes de MST de plantas es grande, comprenden 53 MSTs en *Arabidopsis*, 59 en la uva y 65 en arroz. Los MSTs están distribuidos en siete



subfamilias, de las cuales las STP (Proteína transportadora de azúcares) funcionan como simportadores  $H^+$ /Hexosas, muchos de los cuales aceptan un amplio espectro de monosacáridos como sustrato (con alta afinidad por glucosa), con ciertas excepciones como el AtSTP9 el cual es un transportador específico de glucosa y el AtSTP14 que es un transportador específico de galactosa. Las STP están bajo un fuerte control regulatorio, responden a señales de desarrollo y ambientales. Además de los STPs, miembros de la subfamilia de los PTMs (Transportadores poliol/monosacárido) puede también estar involucrados en la toma de hexosas a través de la membrana plasmática. Los PTMs son simportadores transportan hexosas y pentosas además de otros polioles como manitol y sorbitol. Dado que los polioles son azúcares importantes en el metabolismo de algunos hongos, se ha sugerido que los PTMs juegan un papel importante en las interacciones planta-hongo (Doidy *et al.*, 2012).

Siguiendo con la toma de azúcares intracelular, se conoce que el exceso de carbohidratos se almacena en la vacuola. El almacenamiento vacuolar y su removilización juega un papel clave en el mantenimiento del metabolismo celular, la osmoregulación y la adaptación a las condiciones ambientales, en este los transportadores principales implicados son los VGTs (transportador vacuolar de glucosa) y los TMTs (transportador tonoplástico de monosacáridos). Por su parte, los ESLs (proteínas de respuesta temprana a la deshidratación) en la membrana vacuolar están implicados en la removilización de azúcares de almacenamiento desde la vacuola en respuesta al estrés ambiental y posiblemente también al estrés biótico (Doidy *et al.*, 2012).



### III. ANTECEDENTES

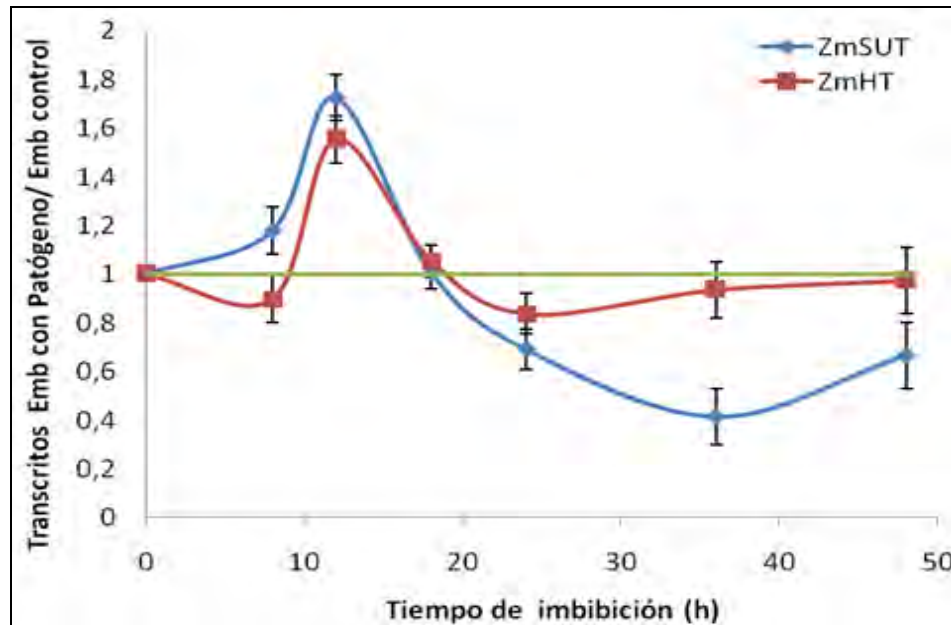
En la naturaleza las plantas se enfrentan a diferentes situaciones de estrés como son las temperaturas extremas, escasez de agua y la presencia de patógenos entre otros, lo cual desencadena respuestas hormonales y consecuentemente la expresión de diferentes genes que ayudan a la planta a regresar a su homeostasis (Koorneef *et al.*, 2008; Hey *et al.* 2010).

En respuesta al estrés, las plantas modifican la expresión de genes provocando funciones metabólicas alteradas que pueden mitigar dicho efecto y conducir a la adaptación del organismo. Se han identificado algunas hormonas que encienden las vías de defensa de la planta como el ácido abscísico, el ácido salicílico, el ácido jasmónico e incluso los azúcares (reconocidos como moléculas señal) (Tuteja y Sopory, 2008). Esta producción hormonal y la consecuente adaptación de la planta podría estar íntimamente ligada al metabolismo primario, pues se ha observado que aún cuando el metabolismo secundario es importante en la respuesta de defensa de la planta, debe ocurrir un desvío de los esqueletos carbonados y nitrogenados para producirlos (Berger *et al.*, 2007).

Al respecto se conoce que generalmente, los hongos son capaces de nutrirse de azúcares provenientes del tejido vegetal, por ejemplo en la interacción Ustilago-maíz, el hongo sintetiza un transportador de azúcares específico para la colonización de la planta y que le permite nutrirse del carbono apoplástico de la célula vegetal (Wahl *et al.*, 2010; Talbot, 2012). Lo anterior redundaría en una disminución de la poza de carbono para la célula vegetal y por ende un cambio en el metabolismo no sólo de las células que están siendo infectadas sino de las adyacentes e incluso de toda la planta (Talbot, 2012).

Uno de los factores de estrés estudiados en el laboratorio es el biótico, utilizando como agente patógeno a *Fusarium verticillioides*, hongo que infecta a maíz,

ocasionando enfermedad en diferentes tejidos de la planta, dentro de estos sitios blanco se encuentran los granos (Munkvol y Desjardins, 1997).



**Figura 13. Efecto de *Fusarium verticillioides* en los niveles de los transcritos para dos transportadores de carbohidratos.** Se embebieron embriones en presencia del hongo *Fusarium verticillioides*, después de cumplido el tiempo de imbibición se congelaron y se molieron para posteriormente extraerles el RNA y realizar una reacción de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para el transportador de sacarosa de maíz (ZmSUT1) y para un transportador putativo de hexosas (ZmHT). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. Se obtuvo la densitometría de las bandas de los productos amplificados y se realizó el índice de los niveles de transcritos en los embriones con patógeno entre los niveles de transcritos de los embriones control. Datos tomados de Guzmán-Chávez, 2011.

En el laboratorio se ha estudiado el efecto del patógeno *Fusarium verticillioides* sobre el transporte de carbohidratos a lo largo de la germinación de embriones de maíz (Calzada-Alejo, 2011; Guzmán-Chávez, 2010; Luna-Loaiza, 2011; Zurita-Villegas, 2011). *Fusarium* produce dos tipos de efectos en los embriones de maíz. En los efectos tempranos se encuentran la reducción en el tiempo en el que comienzan a germinar los embriones, un aumento en el consumo de oxígeno, la reducción en los niveles de sacarosa de los embriones a partir de las 18 h, pese a que hay un incremento en el nivel de los transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas y de la capacidad de toma de sacarosa de los embriones



germinados con el hongo a las 12 h post-infección (Guzmán-Chávez, 2010; Zurita-Villegas, 2011).

Entre los efectos tardíos que se inician a las 24 h post-infección se encuentran la reducción en la concentración de sacarosa (80% menores que el control), efecto probablemente ocasionado por la reducción del nivel de transcritos para el transportador de sacarosa aunque también hay una importante disminución en la permeabilidad membranal y al aumento en la proteólisis a esos tiempos. La muerte de las células del embrión es evidente (Guzmán-Chávez, 2010; Calzada-Alejo, 2011).

Es interesante que a tiempos tempranos de la infección haya un incremento en el nivel de transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas (Figura 13), es probable que el embrión esté intentando defenderse de la infección al disminuir el contenido de carbohidratos disponible para la nutrición del hongo. Respuesta transcripcional que puede deberse a los cambios en el contenido de carbohidratos (Guzmán-Chávez, 2010) o a los cambios hormonales que se presentan en el maíz ante la presencia de *Fusarium* (Arciniega-Ruiz, 2012).

En relación a los cambios hormonales durante la infección, se encontró que ABA se mantiene a niveles altos durante la germinación de embriones infectados, opuesto a lo que normalmente ocurre en los embriones sin infectar, ya que en éstos se reduce la concentración de ABA conforme aumenta el tiempo de germinación (Arciniega-Ruiz, 2012). Mientras que la infección aumenta la concentración del SA a partir de las 24 h de germinación de los embriones (De la Torre-Hernández *et al.*, 2010).

En cuanto a la regulación de los transportadores de carbohidratos por hormonas, se ha descrito que ABA puede regular la expresión de los transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas. Se ha encontrado que en la región promotora del gen para el transportador de sacarosa de *Arabidopsis* AtSUC1 hay



una secuencia ABRE (del inglés “ABA responsive element”) y en la cual los factores de transcripción ABI5 (AtbZIP39; At2g36270) y AREB3 (AtbZIP66; At3g56850) probablemente interactúan con él (Hoth *et al.*, 2002; Hoth *et al.*, 2010). Mientras que en hojas de uva se encontró que ABA aumenta los niveles de un transportador de hexosas a través del incremento en la transcripción de una cinasa inducida por carbohidratos, *VvSK1*; además 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 que también tienen influencia en el transporte de hexosas, ya que aumentan la disponibilidad del metabolito que transporta (Hayes *et al.*, 2010; Lecourieux *et al.*, 2010).

Por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de ABA, SA y MeJA en la expresión de los transcritos durante la germinación de embriones de un transportador de hexosas y del principal transportador de sacarosa en maíz. El objetivo es encontrar si los cambios en los niveles hormonales ocurridos durante la interacción *Fusarium*-maíz fueron los responsables del incremento en la expresión de los transcritos para ambos transportadores al inicio de la infección con *Fusarium*.



#### **IV. HIPÓTESIS**

- Si ABA, MeJA y SA son hormonas que están relacionadas con estrés de tipo abiótico (sólo ABA) y de tipo biótico, entonces se alterará la expresión de genes relacionados con el estrés.
  
- Si durante el estrés es necesario cambiar el flujo de carbono en la planta para defenderse, entonces ABA, MeJA y SA afectarán también la transcripción de genes esenciales para la toma de carbono por parte de la planta, los transportadores de carbohidratos.



## V. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Evaluar el efecto de las hormonas ABA, MeJA y SA, en la expresión de los transportadores de carbohidratos y de genes relacionados con la defensa durante la germinación de embriones maíz.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinación del porcentaje de germinación en embriones incubados con ABA, MeJa y SA
- Extracción del RNA de los embriones expuestos a las hormonas
- Obtención del perfil de expresión de un transportador putativo de hexosas, ZmHT.
- Obtención del perfil de expresión de un transportador de sacarosa, ZmSUT1.
- Obtención del perfil de expresión de proteínas relacionadas con la defensa contra patógenos, PR y PAL (respuesta a SA), AOS y PDF (respuesta a MeJA).

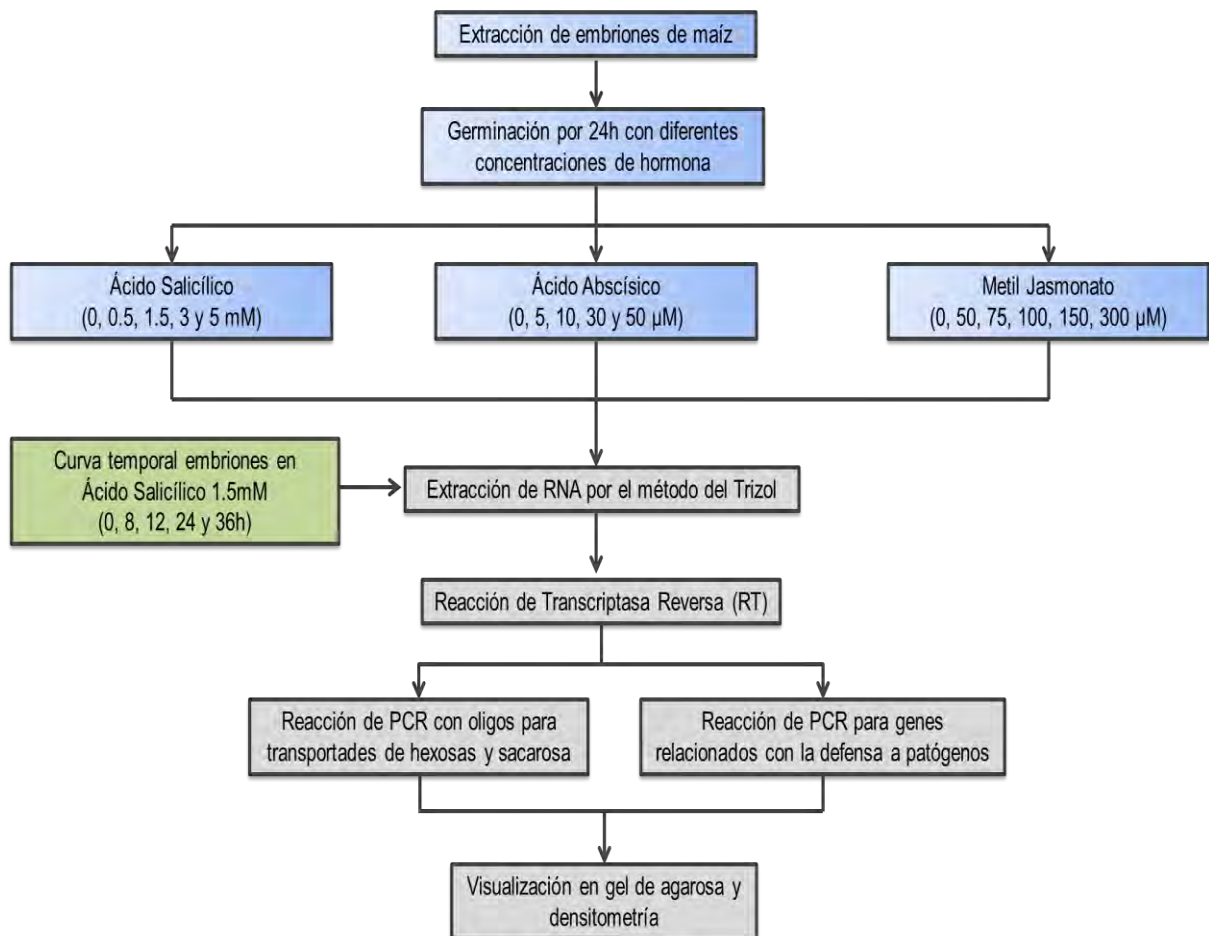




## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 Estrategia experimental de trabajo.

Para responder a los objetivos de este trabajo se realizó la estrategia experimental que se detalla en la Figura 14. La detección de la expresión de los transportadores de carbohidratos de embriones de maíz sometidos a tratamiento con ABA, SA y MeJA, se realizó mediante la técnica de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los métodos utilizados se describen con detalle a continuación.



**Figura 14.- Diseño general de la estrategia experimental.** La estrategia general de trabajo se muestra en el esquema y los métodos detallados con los que se llevaron a cabo se describen en el texto.



## VII.2 Extracción y germinación de embriones de maíz.

La extracción de los embriones se realizó por disección manual de la semilla con navaja. Los embriones se lavaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 2% y se enjuagaron con agua estéril desionizada hasta que desapareció el olor a cloro. Posteriormente se realizó la germinación de los embriones en Agar 1%, al cual se agregaron hormonas en 5 tratamientos diferentes para cada una. Adicionalmente se realizó una curva temporal con ácido salicílico 1.5 mM a 5 diferentes tiempos (Tabla 2). En cada tratamiento se obtuvo el porcentaje de germinación y las determinaciones se hicieron por duplicado o triplicado.

**Tabla 2.- Tratamientos y condiciones empleadas para cada hormona**

Tratamiento	Concentración de hormona por tratamiento	Tiempo y temperatura de incubación
SA	0, 0.5, 1.5, 3 y 5 mM	24 h/29°C
ABA	0, 5, 10, 30, 50 µM	24 h/29°C
MeJA	50, 75, 100, 150, 300 µM	24 h/29°C
<b>Curva temporal</b>		
Control	0	0, 8, 12, 24, 36 h/29°C
SA	1.5 mM	0, 8, 12, 24, 36 h/29°C

## VII.3 Extracción de RNA por el método del Trizol.

**Fundamento.-** El reactivo de Trizol está constituido por una solución de fenol e isotiocianato de guanidina, en la cual los tejidos se rompen debido a la homogeneización, liberando el RNA e inactivando ribonucleasas. El RNA total es entonces purificado selectivamente eliminando las proteínas, mientras que el DNA y otros contaminantes son extraídos por ácidos orgánicos. El fenol; cloroformo: alcohol isoamílico, que también es empleado durante la extracción de RNA, remueve contaminantes por extracción ácida con el fenol, donde el DNA y una



porción de las proteínas quedan en la fase orgánica, mientras que el RNA permanece en la fase acuosa y es concentrado por precipitación con isopropanol, para posteriormente lavarse con etanol (Barrón, 1997).

**Técnica de extracción de RNA.-** La extracción se realizó bajo el método del Trizol (Barrón, 1997). Se colocó 1g de embriones en un mortero libre de RNAsas, pulverizándolo con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente se agregaron 3 mL de Trizol y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Al concluir este tiempo, las muestras fueron transferidas a un tubo de microfuga y centrifugadas a 13000 rpm por 15 min/4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 200 µL de FCI (Fenol: cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1). Después de agitar se centrifugó a 13000 rpm por 10 min/4°C y se separó la fase acuosa, a esta fase se le agregaron 400 µL de CHCl<sub>3</sub> y nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min/4 °C. Al sobrenadante se le agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló en vórtex e incubó a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min/4°C y se decantó para lavar el botón con 1 mL de etanol al 70%. La muestra se centrifugó a 13000 rpm por 5 min/4°C, se decantó y se secó a temperatura ambiente. El botón fue disuelto en 500 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y se le agregaron 167 µL de LiCl 8 M frío. La muestra se incubó por una noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 13000 rpm por 15 min/4 °C y el botón se disolvió en 250 µL de H<sub>2</sub>O DEPC, 500 µL de etanol absoluto frío y 25 µL de acetato de sodio 3M. La muestra se incubó por una noche a -70°C.

Transcurrida la incubación, se centrifugó a 13000 rpm por 20 min/4°C y se realizaron dos lavados al botón con 1 mL de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto/4°C, se eliminó el etanol residual y el botón se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente el botón fue resuspendido en 40 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y diluida (1:50) para cuantificar el RNA total.



#### VII.4 Cuantificación y calibración del RNA extraído.

El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 ThermoScientific. Para verificar la integridad del RNA y obtener los perfiles de expresión del transportador de sacarosa ZmSUT1 y del transportador putativo de hexosas ZmHT, se cargaron geles con 1 µg de RNA de todos los ensayos realizados, ajustando los volúmenes cuando fuera necesario para que el contenido de RNA utilizado para la reacción RT-PCR fuera el mismo en todos los casos. Al volumen de RNA calculado para 1 µg, se le añadieron 2 µL de buffer de carga y H<sub>2</sub>O-DEPC c.b.p. 10 µL. El RNA se separó en geles de agarosa al 2%, al cual se le agregó buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X y bromuro de etidio (0.5 µL/mL). El gel se corrió en una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT con TAE 1X frío a 85 mV por 43 min y se visualizó en un transiluminador de UV. Posteriormente la imagen fue capturada en el equipo ImageStation KODAK.

#### VII.5 Reacción RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa).

En el presente trabajo se obtuvo el perfil de transcritos bajo la técnica RT-PCR de los transportadores de sacarosa (ZmSUT1) y hexosas (ZmHT) para cada uno de los tratamientos efectuados, así mismo, se obtuvo el perfil de expresión de los genes PR y PAL en el caso de tratamientos incubados con SA, por otro lado PDF y AOS para muestras tratadas con MeJA y, PR y PDF en el caso de los embriones incubados con ABA.

**Fundamento RT-PCR.-** La transcriptasa reversa es una enzima que tiene como función sintetizar una molécula de doble cadena (DNA) a partir de una molécula de cadena sencilla (RNA). El cDNA obtenido se utilizó en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción de PCR es un método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al



ser delimitado por un par de cebadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de ciclos repetidos en presencia de una enzima DNA polimerasa termoestable (Rodríguez y Barrera, 2004).

**Técnica para la reacción RT.-** Para esta reacción se agregó a un tubo de microfuga, 1  $\mu$ L de OligodT (62  $\mu$ M), el volumen de RNA ajustado a la misma concentración para todas las muestras y se completo con H<sub>2</sub>O a 10  $\mu$ L. Este tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar el tiempo, se colocó en hielo por 5 min y se le agregaron 10  $\mu$ L de la mezcla de reacción preparada previamente (Tabla 3), entonces se calentó a 25 °C por 5 min para realizar el alineamiento, a 42 °C por una hora y por último a 70 °C por 15 minutos para inactivar la enzima. Esto se realizó en un termociclador 2720 ThermalCyclerAppliedBiosystems. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

**Tabla 3.- Mezcla de reacción para la reacción de Transcriptasa Reversa**

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer ImProm-II 5X (Promega)	4.0
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.4
dNTP's 10 mM	1.0
RT (Transcriptasa reversa)	1.0
H <sub>2</sub> O-DEPC	1.6 (c.b.p. 10 $\mu$ L)

**Técnica para la reacción de PCR.-** La reacción de PCR se realizó para evaluar los niveles de transcritos de los genes antes citados: un transportador putativo de hexosas (ZmHT), el transportador de sacarosa (ZmSUT1) que contribuye con el mayor aporte de sacarosa en el maíz, así como PRM, PDF, AOS y PAL; de acuerdo a la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla 4. Se utilizaron los oligonucleótidos empleados en trabajos previos en el laboratorio (Greaves-Fernández, 2001 y Gómez-Calderas, 2008) y cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 5.



**Tabla 4.- Mezcla de reacción para PCR de cada gen de interés**

Reactivo	Hexosas ( $\mu\text{L}$ )	Sacarosa ( $\mu\text{L}$ )	PRM ( $\mu\text{L}$ )	PDF ( $\mu\text{L}$ )	PAL ( $\mu\text{L}$ )	AOS ( $\mu\text{L}$ )
PCR Buffer Master Mix 2X	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Oligonucleótido sentido	0.25	0.1	0.25	0.25	0.125	0.375
Oligonucleótido antisentido	0.25	0.1	0.25	0.25	0.125	0.375
cDNA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H <sub>2</sub> O libre de DNAsas (c.b.p. 25 $\mu\text{L}$ )	11.0	11.3	11.0	11.0	11.25	10.75

**Tabla 5.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los transcritos de los transportadores de sacarosa, hexosas y PRM, PDF, PAL y AOS.**

Transportador	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud (pb)
<b>Hexosas</b>	Sentido	5'-CTTCTACGCGCCGGTCC-3'	17
	Antisentido	5'-GCGATGACGAAGGTGAAGAG-3'	20
<b>Sacarosa</b>	Sentido	5'-TCCTCTGGTTCCACAAACAAC-3'	21
	Antisentido	5'-ACGAGCTGAATCCTAGAACGA-3'	21
<b>PRM</b>	Sentido	5'-AGAGAAGTAGCCGCACAGA-3'	20
	Antisentido	5'-GTATGGCACACACCTTGC-3'	20
<b>PDF</b>	Sentido	5'-GCTTCAAGGGACCTTGCTC-3'	20
	Antisentido	5'-AAACGCGCCATAGAGTTCAT-3'	20
<b>PAL</b>	Sentido	5'-GAGGAGTGCAACAAGGTGTTC-3'	21
	Antisentido	5'-CAGGGCACAGCTACACAAAA-3'	20
<b>AOS</b>	Sentido	5'-AGCTCCAGTCCTTCTTCGTA-3'	20
	Antisentido	5'-ACTCGAAGTACTTGTCTGC-3'	20

La reacción se efectuó en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems bajo las condiciones mostradas en Tabla 6.



Tabla 6.-Condiciones empleadas para la reacción de PCR, para los transportadores de sacarosa, hexosa y PR, PDF, PAL y AOS.

Transcrito (número de ciclos de amplificación)	Pre-desnaturalización	Amplificación PCR	Extensión final
<b>Transportadores de hexosa y sacarosa (38 ciclos)</b>	94°C/3 min	Desnaturalización, 94°C/30seg Templado, 60 °C/1 min Extensión, 72 °C/2 min	72 °C/10 min
<b>PRM's (26 ciclos)</b>	94°C/5 min	Desnaturalización, 94°C/40 seg Templado, 57 °C/40 seg Extensión, 72 °C/40 seg	72 °C/10 min
<b>PDF (34 ciclos)</b>	94°C/5 min	Desnaturalización, 94°C/40 seg Templado, 58 °C/40 seg Extensión, 72 °C/40 seg	72°C/7 min
<b>PAL (33 ciclos)</b>	94°C/5 min	Desnaturalización, 94°C/40 seg Templado, 57 °C/40 seg Extensión, 72 °C/40 seg	72°C/7 min
<b>AOS (26 ciclos)</b>	94°C/5 min	Desnaturalización, 94°C/40 seg Templado, 55 °C/40 seg Extensión, 72 °C/40 seg	72°C/7 min

Cada reacción de PCR contuvo 25 µL, a los cuales se les agregó 2.0 µL de buffer de carga Blue/Orange 6X y posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X y bromuro de etidio (0.5 µL/mL).

Las bandas resultantes fueron observadas en UV con un transiluminador y captadas en el equipo ImageStation KODAK para analizar las densitometrías. Los controles de cada uno de los tratamientos fueron considerados como el 100% de expresión.



## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VIII.1 Efecto de ABA, MeJA y SA sobre la germinación de embriones de maíz.

Durante la interacción planta-patógeno se modifican los niveles de hormonas para encender las respuestas de defensa de la planta. Dentro de las hormonas que cambian se encuentran MeJA, SA, ABA, etileno entre otras. Se conoce ampliamente que ABA inhibe la germinación y mantiene la latencia de la semilla (Weitbrecht *et al.*, 2011), pero durante la patogénesis no se ha determinado claramente su papel aunque se ha detectado que su concentración cambia (Bari y Jones, 2009). Mientras que MeJA se presenta generalmente cuando hay herida, ya sea por abrasión o debida a insectos y SA se sintetiza ante el ataque por patógenos microbianos (Smith *et al.*, 2009). Debido a que ABA, MeJA y SA son parte del circuito que lleva a la defensa de la planta al modificar la expresión de genes, se determinó su efecto en la germinación de los embriones de maíz.

Los embriones se colocaron en cajas con agar suplementado con hormonas a diferentes concentraciones y se incubaron 24 horas a 29 °C, como control se incubaron embriones en agar sin hormonas. Al final de la incubación se evaluó el porcentaje de germinación, considerando que la expresión final de la germinación es la salida de la radícula (Bewley y Black, 1994), tomándose como embrión germinado aquel en donde la radícula emergía al menos 2 mm del embrión.

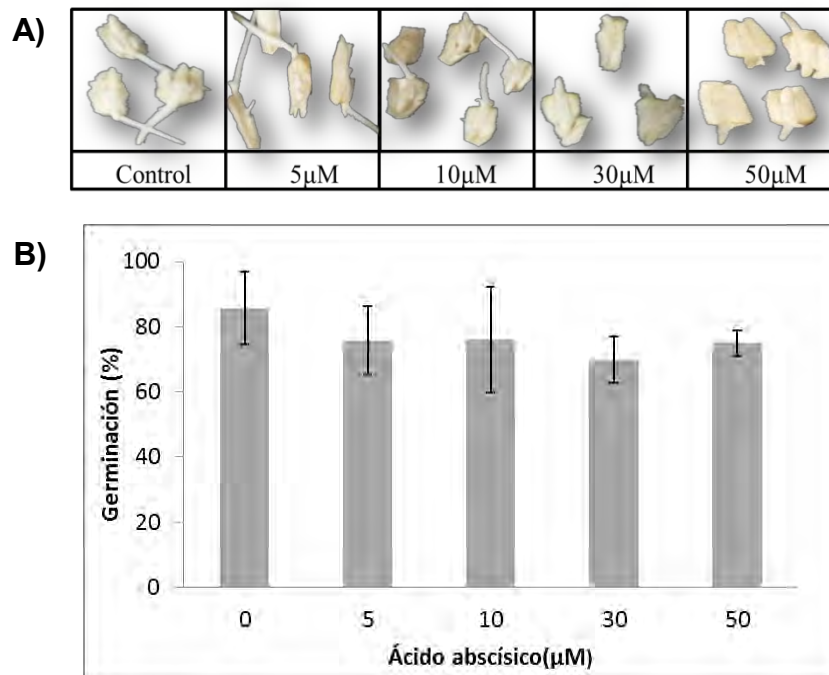
#### VIII.1.1 Ácido abscísico.

La incubación de los embriones con ABA modificó la longitud de la radícula a medida que aumentó la concentración de la hormona (Figura 15A). No obstante lo anterior, se obtuvo un valor promedio de germinación del 70% a todas las concentraciones de hormona probadas, valor sin diferencia significativa del



promedio de germinación que alcanzaron los embriones en el control, 85.76% (Figura 15B).

La escasa reducción en el porcentaje de germinación, puede explicarse debido a que el embrión está desprovisto de la cubierta del endospermo y de la capa delgada del pericarpio, lo que probablemente permitió la entrada de agua y el tejido se hinchó, hecho que podría interpretarse como un exitoso proceso germinativo, pero el retardo en la elongación de la radícula, sobre todo a las concentraciones de 30 y 50  $\mu\text{M}$  de ABA, sugiere que ABA si se encuentra entorpeciendo al menos los eventos postgerminativos.



**Figura 15.- Efecto de la incubación de los embriones en ABA.** A) Embriones incubados por 24 horas en diferentes concentraciones de ABA. El control fue germinado en ausencia de la hormona. B) Porcentajes de germinación de embriones incubados en presencia de ABA. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . No se encontró diferencia significativa en los porcentajes de germinación entre los diferentes tratamientos.

Se ha demostrado que ABA inhibe la ruptura del endospermo y la elongación de la radícula (Weitbrecht *et al.*, 2011). Se ha planteado que ABA inhibe la elongación



de la radícula al inhibir la acumulación de varias enzimas que degradan la pared celular como la oxalato oxidasa, la endo- $\beta$ -mananasa, las pectin-metilesterasas, la  $\beta$ -galactosidasa y la manohidroxilasa, todas ellas enzimas que permiten el ablandamiento y remodelación de la pared celular en algunas semillas. En condiciones óptimas la acumulación de éstas sucede en la radícula y tejidos cercanos y ocurre previo a la emergencia de la radícula (Kermode, 2005). Otro mecanismo propuesto en la inhibición del crecimiento radicular por ABA, es la afectación en la disponibilidad de carbono para proveer de energía a la célula, ya que ABA también inhibe la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa tanto de tejidos embrionarios como extraembrionarios (Finkelstein y Gibson, 2002).

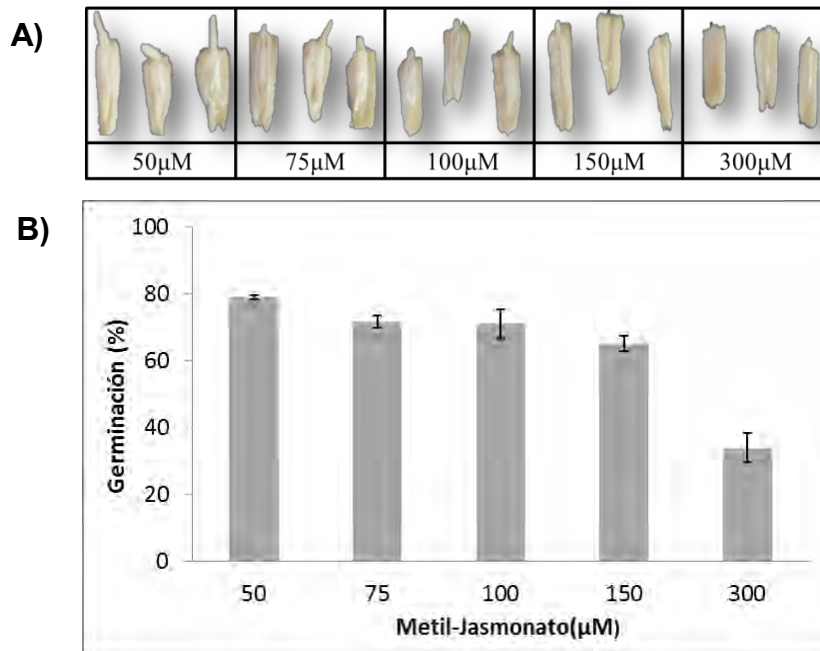
Por lo anterior, pese a que no hubo cambios en el porcentaje final de germinación, sí es probable que ABA afectara no solo los eventos post-germinativos sino también los previos y que son importantes para el aporte de carbono usado como bloques estructurales o bien para la producción de energía en la célula, que son necesarios para mantener el crecimiento radicular y el metabolismo celular.

### VIII.1.2 Metil-jasmonato.

Se observó que la incubación de los embriones con MeJA reduce ligeramente su germinación 5 y 10% a 50  $\mu$ M y 70  $\mu$ M (Figura 16A, 16B). A 300  $\mu$ M MeJA ocurrió la mayor reducción en el porcentaje de germinación alcanzando sólo el 33.9% (Figura 16B).

El efecto de reducción en la germinación debida a MeJA ya ha sido documentada para maíz (Norastehnia *et al.*, 2005), Arabidopsis (Staswick *et al.*, 1992), amaranto (Kepczynski y Bialecka, 1994) y cacahuate (Kumari y Sudhakar, 2003) entre otros. Una de las explicaciones que se propone en maíz es que el MeJA interfiere con la producción de etileno (Norashtenia *et al.*, 2005). A pesar de que se ha cuestionado si el etileno es un promotor de la germinación o un producto de está, se conoce

que el etileno y su precursor ACC (ácido 1 carboxílico 1-aminociclopropano) afectan la elongación radicular (Alarcón *et al.*, 2009). Por otra parte, MeJA inhibe la actividad de la  $\alpha$ -amilasa similar al efecto de la adición de ABA, y con la inhibición de la enzima existe la posibilidad de reducción del carbono disponible para la producción de ATP (Alarcón *et al.*, 2009).



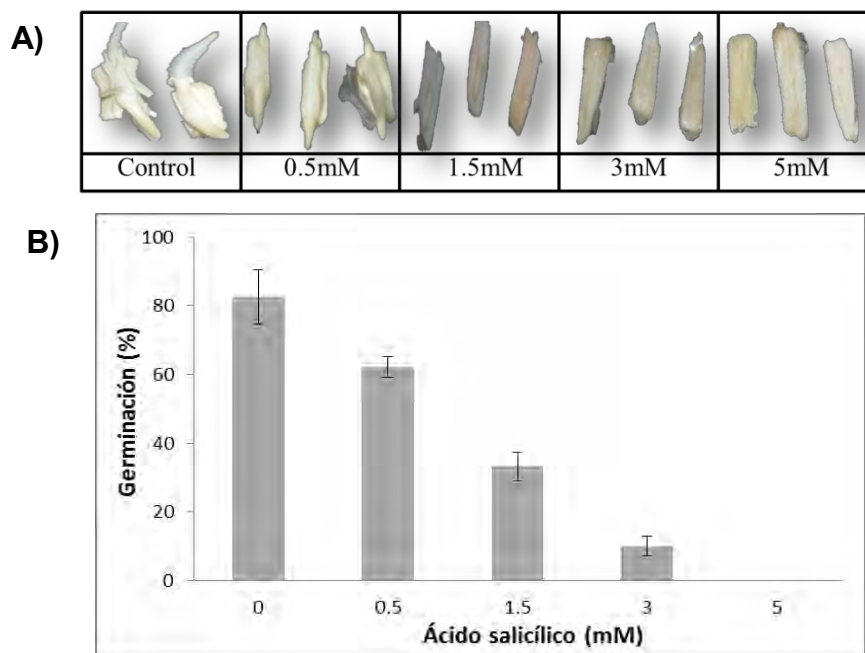
**Figura 16.- Efecto del MeJA en la germinación de embriones de maíz.** A) Embriones germinados por 24 horas en diferentes concentraciones de metiljasmonato. El control fue germinado en ausencia de la hormona. B) Porcentajes de germinación de embriones incubados en presencia de metiljasmonato. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los valores porcentuales de germinación son estadísticamente distintos entre los diferentes tratamientos.

Era importante contar con el efecto de MeJA tanto sobre la germinación como en la transcripción de los genes en estudio, ya que para obtener los embriones se realiza una extracción con navaja, esto ocasiona un daño en el tejido y probablemente ocurre la síntesis de MeJA, si bien en el grupo de trabajo, se ha observado que la germinación de los embriones es similar a la de la semilla completa. Así que si se produce MeJA durante la extracción de embriones de la semilla es probable que no alcance valores mayores de 70 µM ya que no observamos una reducción en la germinación.

### VIII.1.3 Ácido salicílico.

#### VIII.1.3.1 Efecto de diferentes concentraciones de SA sobre la germinación de embriones.

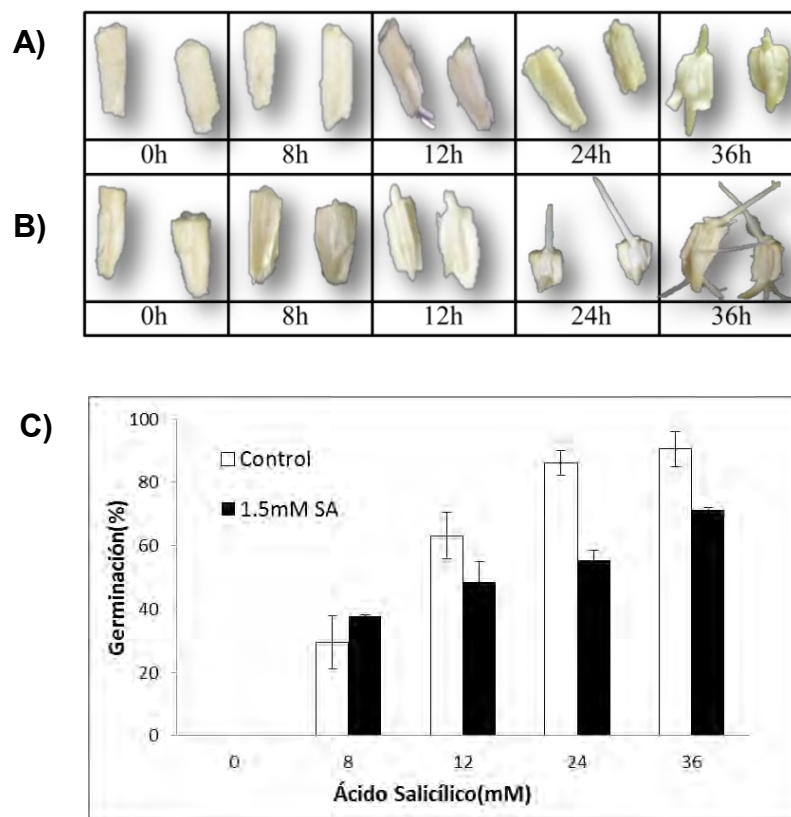
Como se puede apreciar en la Figura 17A, el SA llevo a la reducción de la germinación de los embriones de maíz. Desde 0.5 mM se observo la disminución en la germinación (20% reducción) e inhibiendo al 100% la germinación del embrión a 5 mM de SA (Figura 17B).



**Figura 17.- Efecto del ácido salicílico en la germinación de embriones de maíz.** A) Embriones incubados por 24 horas en diferentes concentraciones de ácido salicílico. El control fue germinado en ausencia de ácido salicílico. B) Porcentajes de germinación de los embriones incubados por 24 h. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los valores porcentuales de germinación son estadísticamente distintos entre los diferentes tratamientos.

### VIII.1.3.2 Efecto de 1.5 mM de SA en la germinación de embriones de maíz.

En vista de que el objetivo del trabajo era analizar si SA afectaba la transcripción de los transportadores de carbohidratos durante el proceso de germinación, entonces incubamos a los embriones a una concentración de hormona en la que se observan los efectos inhibitorios en la germinación pero que está no se reducía a 0. Así elegimos la concentración de 1.5 mM de SA (Figura 17). La incubación de los embriones de maíz con 1.5 mM de SA retrasó la salida de la radícula (Figura 18A, 18B). Los embriones incubados por 36 h con SA alcanzaron un valor de porcentaje de germinación similar al obtenido por los embriones control a las 12 h (Figura 18C).



**Figura 18.- Curva temporal de germinación de embriones a 1.5 mM de SA.** A) Curva temporal de germinación con ácido salicílico 1.5 mM. B) Curva temporal control. C) Porcentajes de germinación por cada tiempo de germinación con 1.5 mM de ácido salicílico y control. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los valores porcentuales de germinación son estadísticamente distintos entre los diferentes tratamientos.



Se ha documentado que el SA tiene efectos de inhibición de la germinación de diferentes semillas, en *A. thaliana* a concentraciones de SA >1 mM (Rajjou *et al.*, 2006), en avena, a dosis >0.250 mM SA (Xie *et al.*, 2007), mientras que en embriones en desarrollo de maíz llega a inhibir a dosis que van de 3 a 5 mM (Guan y Scandalios, 1995). En maíz se ha observado una activación en la transcripción de las catalasas que lleva a una mejora en la germinación, pero al tener concentraciones muy altas de SA la reducción en la transcripción de las catalasas se relaciona con la disminución en la germinación. Por lo cual el efecto de reducción de la germinación se presume se debe al aumento en el estrés oxidativo inducido por SA al inhibir los transcritos de enzimas degradadoras de peróxidos (Guan y Scandalios, 1995). Por lo anterior, nuestros resultados concuerdan con lo que la literatura muestra sobre el efecto del SA en la germinación.

### **VIII.2 Niveles de expresión de los transportadores de carbohidratos ZmHT y ZmSUT1 en embriones germinados en ABA, MeJA y SA.**

Está ampliamente documentado que la transcripción de los transportadores de carbohidratos se modifica por carbohidratos, aunque su efecto es contradictorio ya que se ha planteado que podría ser específico al tipo y concentración de azúcar o bien que su regulación es el resultado de la disponibilidad del azúcar (Gibson 2000; Ransom-Hodgkins *et al.*, 2003; Vaughn *et al.*, 2002; Lecourieux *et al.*, 2010). Asimismo se tienen evidencias de que los transportadores de carbohidratos responden al menos a la hormona, ABA. Efecto de ABA que se ha propuesto en algunos casos específico o bien coincidente con el aumento de ABA en el tejido (Hoth *et al.*, 2002 y 2010; Hayes *et al.*, 2010; Lecourieux *et al.*, 2010). En cuanto al SA se tiene evidencia de que afecta la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, si bien los autores sugieren que el efecto podría deberse a una modificación en la membrana debido a los cambios en los niveles de especies



reactivas que se producen y al aumento en la peroxidación de la membrana (Ladyzhenskaya y Korablyova, 2011).

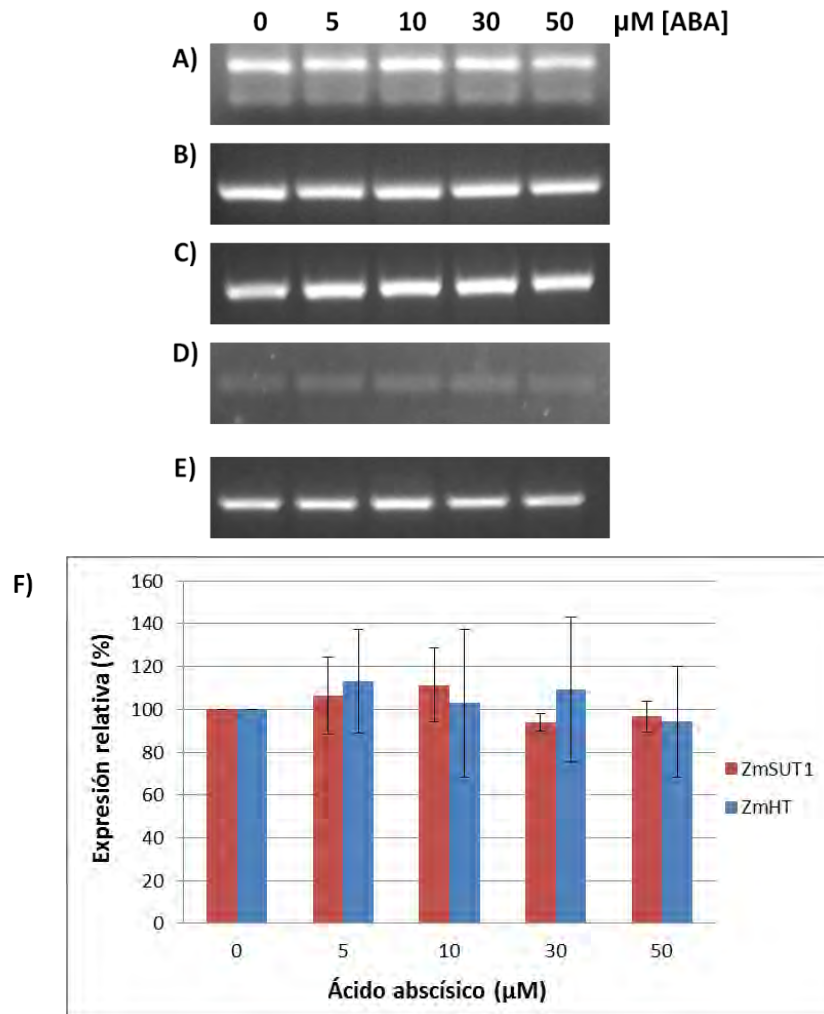
Si bien se conoce que durante la infección por patógenos fúngicos se induce una modificación en el metabolismo y en el transporte de carbohidratos, el cual está comprometido en contender con el patógeno y reducir el crecimiento de éste, no se ha determinado si los cambios hormonales debidos al estrés biótico llevan a una expresión diferencial de los transportadores de carbohidratos. Y sabiendo que ABA se mantiene inusualmente alto durante la germinación de embriones de maíz en presencia de *Fusarium* (Arciniega-Ruiz, 2012) y que también SA aumenta después de las 24 h de germinación (De la Torre-Hernández *et al.*, 2010), era factible que al menos estas hormonas estuvieran regulando la expresión de los transportadores de carbohidratos.

Para determinar si las hormonas ABA, SA y MeJA están involucradas en las variaciones encontradas en los transcritos de los transportadores de carbohidratos durante la interacción *Fusarium*-maíz se colocaron a germinar embriones en ABA, MeJA o SA y se analizaron los perfiles de los transcritos para el transportador de sacarosa ZmSUT1 y el transportador de hexosas, ZmHT. Adicionalmente se evaluó el efecto de las hormonas en la transcripción de los genes relacionados con la defensa de la planta PRM y PDF; así como de los genes PAL y AOS, los cuales están relacionados con la biosíntesis de SA y MeJA respectivamente.

#### **VIII.2.1 Efecto del ABA sobre la expresión de ZmSUT1, ZmHT, PRM y PDF.**

Los niveles de transcritos para los transportadores de sacarosa y el putativo de hexosas en los embriones embebidos en ABA fueron similares a los embriones embebidos en Agar (Figura 19B y 19C). Al obtener las densitometrías para cada uno de los transportadores de carbohidratos se comprobó este efecto, pues a

pesar de que se observan ligeros cambios en el porcentaje de expresión, estos son muy pequeños como para considerarlos diferentes (Figura 19F).



**Figura 19.- Perfil de expresión del transcrito del transportador putativo de hexosas ZmHT, del transportador de sacarosa ZmSUT1 y de los genes que codifican para PRM y PDF. A)** Control de cargado de RNA. **B)** Perfil de expresión de ZmSUT1, **C)** ZmHT, **D)** PRM y **E)** PDF. **F)** Niveles expresión de los transcritos ZmSUT1 y ZmHT, datos obtenidos de la densitometría de geles como el mostrado en B) y C), la expresión relativa se obtuvo tomando como 100% la densidad de la banda de transcrito para cada transportador de los embriones control (en ausencia de hormonas).

Estos resultados muestran que la expresión de ZmHT y ZmSUT no son afectados por los niveles de ABA, contrario a lo encontrado en el transportador de sacarosa AtSUC1 en Arabidopsis. Donde Hoth y colaboradores (2002) encontraron que su transcripción es inhibida por ABA e inducida por sacarosa. Recientemente en el





laboratorio del Dr. Norbert Sauer se demostró que el transportador AtSUC1 contiene un elemento de regulación denominado ABRE (“ABA Responsive Element”) y mediante experimentos de doble híbrido su grupo sugiere que las proteínas ABI5 y AREB3 interaccionan con este elemento, regulando la expresión de AtSUC1 (Hoth *et al.*, 2010), elemento ABRE que probablemente no se encuentra en el gen para el transportador de sacarosa de maíz.

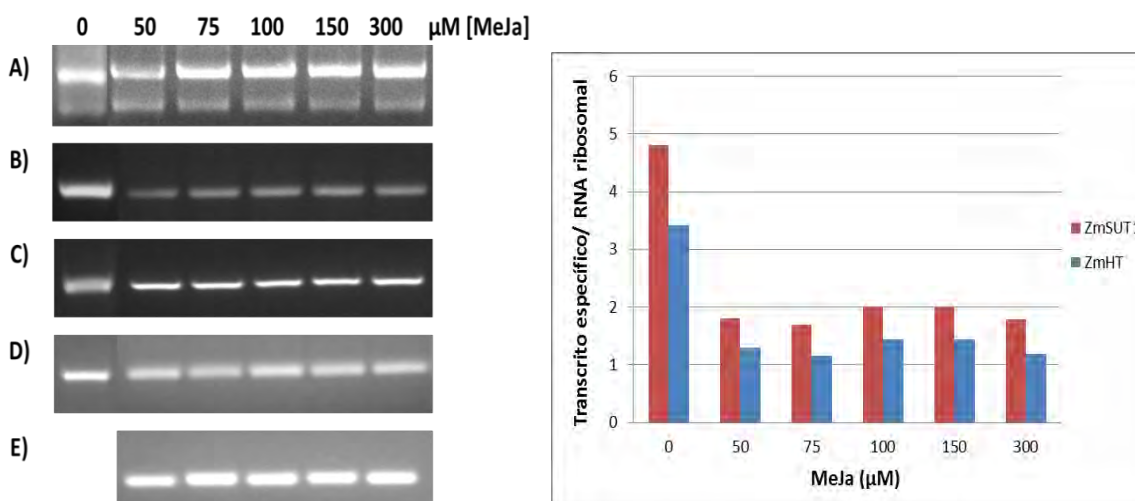
En uva se ha demostrado que el transportador VvHT5 aumenta su transcripción durante la interacción de la planta con un patógeno, y coincide con el incremento en el contenido de ABA, sin embargo no se descarta que la modificación en la expresión del transportador de hexosas de uva podría deberse a causas diferentes a la presencia de ABA, como un ajuste metabólico debido a los cambios en los contenidos de carbohidratos durante el ataque del patógeno (Hayes *et al.*, 2010).

La permanencia de niveles altos de ABA durante la infección de *Fusarium* (Arciniega-Ruiz, 2012) no explican los cambios en el nivel de transcritos para los transportadores de carbohidratos.

En relación a los niveles de PDF y PRM estos no cambiaron cuando los embriones se incubaron con ABA (Figura 19), siendo PRM el transcrito con el menor nivel de expresión en comparación con ZmSUT, ZmHT y PDF. Tanto PRM como PDF son marcadores de que se ha encendido la respuesta de defensa contra patógenos biotrófos y necrotrofos respectivamente, aunque también PDF se enciende ante un daño mecánico (Thomma *et al.*, 2001; Koornneef *et al.*, 2008; Halim *et al.*, 2006), por lo que la presencia del transcrito para PDF si se esperaba en vista de que los embriones fueron obtenidos del corte con navaja. Por otra parte, los resultados indican que ABA no está asociado a la expresión de proteínas de defensa, al menos PRM en los embriones de maíz.

### VIII.2.2 Efecto del MeJA sobre la expresión de ZmSUT1, ZmHT, PDF y AOS.

Los niveles de transcritos para los transportadores de carbohidratos en embriones embebidos a diferentes concentraciones de MeJA mostraron una reducción de 3 y 2.5 veces para el transportador de sacarosa y el de hexosas, respectivamente, en comparación con el tejido en el que estuvo ausente la hormona. La reducción se observó desde 50  $\mu\text{M}$  de MeJA y se mantuvo constante hasta los 300  $\mu\text{M}$  (Figura 20B y 20C).



**Figura 20.- Perfil de expresión del transcrito del transportador putativo de hexosas ZmHT, del transportador de sacarosa ZmSUT1 y de los genes que codifican para PDF y AOS en embriones incubados por 24 h con MeJA. A) Control de cargado de RNA. B) Perfil de expresión de ZmSUT1. C) Perfil de expresión de ZmHT. D) Perfil de expresión de PDF. E) Perfil de expresión de AOS.**

Por otra parte, al comparar el efecto de MeJA en los transcritos de los transportadores con los del porcentaje de germinación (Figura 16), encontramos que el efecto de reducción fue mayor para los transcritos, es posible que a pesar de que los transcritos fueran menos cuando el tejido se incubó en MeJA los niveles de proteína aún no cambiarán lo suficiente como para producir una disminución importante en la cantidad de proteína transportadora en la membrana plasmática y por tanto influyera negativamente en la germinación. Para corroborar



lo anterior se hace necesario detectar con anticuerpos específicos a las proteínas transportadoras de sacarosa y hexosas en los embriones tratados con MeJA.

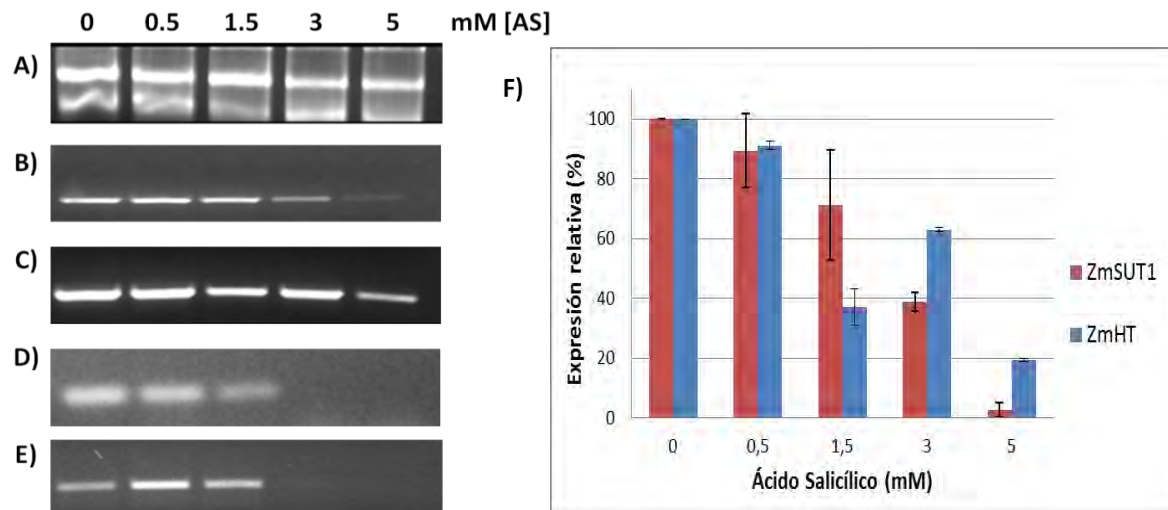
MeJA se sintetiza en respuesta al ataque por un patógeno necrótrofo o bien por herbívoros, una señal de daño físico a la célula. Este tipo de daño se sabe que al final ocasiona un aumento en la defensa de la planta, sin embargo dentro de esta respuesta no observamos que se encuentre involucrado el transportador de hexosas ni el de sacarosa, aunque si la expresión de la PDF y de AOS (Figura 20D y E).

PDF como se ha mencionado, es una proteína que se induce durante el ataque por patógenos o por una invasión microbiana, sin embargo también puede expresarse de manera normal en diferentes estadios de la planta. Existen diferentes PDF en plantas y algunas de ellas son inhibidores enzimáticos de enzimas como la  $\alpha$ -amilasa, las proteinasas, 1,3- $\beta$  glucanasas y quitinasas. Aunque su mayor característica es la de ser agentes antimicrobianos y antifúngicos (Lay y Anderson, 2005). Por lo que no es sorprendente haber encontrado que se expresa al incubar a los embriones en MeJA.

### **VIII.2.3 Efecto del SA sobre la expresión de ZmSUT1, ZmHT, PRM y PAL.**

En cuanto al efecto de SA en el perfil de transcritos para ZmSUT1 y ZmHT se encontró que produce una disminución gradual de ZmSUT1 a medida que se incrementa la concentración de SA, mostrando una mayor reducción en su expresión a partir de la concentración de 1.5 mM (Figura 21B, 21C y 21F). ZmHT fue menos sensible a la adición de SA, ya que el nivel de transcrito es menor pero aún es detectable a la concentración de 5 mM SA. Por otra parte, un efecto similar de reducción se observó en los transcritos para PRM y PAL pero a 3 y 5 mM (Figura 21D y 21E), a estas concentraciones prácticamente ya no hay transcripción.

En relación a la reducción de transcritos a concentraciones mayores a 1.5 mM de ácido salicílico, es posible que se haya incrementado su degradación ya que De la Torre-Hernández y colaboradores (2010) encontraron que aumenta la actividad de las nucleasas, ZmNUC39 y ZmNUC30 en los embriones de maíz germinados por 36 h con 5 mM de SA. Por otro lado, Guan y Scandalios (1995) reportaron una disminución en el nivel de transcritos de las catalasas (*Cat1*, *Cat2* y *Cat3*) de maíz a concentraciones superiores a 2 mM de SA. Por lo tanto, este ensayo podría estar sugiriendo un aumento en la degradación de los mensajeros debida al SA siempre y cuando las concentraciones sean mayores a 1.5 mM aunque no se descarta un efecto global de inhibición en la transcripción genética.



**Figura 21.- Perfil de expresión del transcrito del transportador putativo de hexosas ZmHT, del transportador de sacarosa ZmSUT1 y de los genes que codifican para PRM y PAL. A) Control de cargado de RNA. B) Perfil de expresión de ZmSUT1. C) Perfil de expresión de ZmHT. D) Perfil de expresión de PRM. E) Perfil de expresión de PAL. F) Gráfica que representa la densitometría de las bandas B) y C), la expresión relativa se obtuvo tomando como 100% la densidad de la banda a concentración 0 mM para cada transportador.**



### VIII.2.3.1 Curva temporal de expresión de los transcritos para ZmSUT1, ZmHT, PRM y PAL de los embriones incubados con 1.5 mM SA.

Con la finalidad de observar el efecto del SA a concentraciones en las que no encontraran muy activas las nucleasas y evaluar su efecto durante la germinación, se germinaron embriones durante 36 h en ausencia o presencia de 1.5 mM de ácido salicílico y se compararon los niveles de transcritos para los genes ya descritos anteriormente.

Se redujo la cantidad de transcrito para ZmSUT1 en los embriones incubados con SA a todos los tiempos de germinación analizados, siendo las 8 h de germinación donde ocurre la mayor reducción (3 veces menor). Por su parte, ZmHT también se redujo aunque no presentó un patrón similar al de ZmSUT1, es decir el transcrito para ZmHT se mantuvo en un nivel similar al de los transcritos encontrados al tiempo 0, como si no hubiera habido transcripción del gen conforme avanzaba la germinación (Figura 22).

Si comparamos el patrón de germinación de los embriones en ausencia y presencia de 1.5 mM de SA y la curva de transcritos de ZmSUT1 encontramos que presentan una tendencia de reducción similar, sin embargo no es posible establecer si la reducción en germinación se debe a que hay menos cantidad de transportador de sacarosa en el tejido. Nuevamente se hace necesario determinar el perfil de la proteína durante la germinación de embriones y determinar si SA afecta el nivel de sus transportadores de carbohidratos en la membrana.

Otra proteína transportadora localizada en la membrana plasmática también es afectada por SA y correlaciona con el efecto de SA en la germinación. Los autores proponen que la actividad de la ATPasa de protones se ve afectada ya que el salicílico aumenta la producción de ROS y esto lleva a un aumento en la peroxidación de los componentes membranales llevando entonces a modificar la actividad de la ATPasa (Ladyzhenskaya y Korablyoba, 2011). Por lo que la disminución de la germinación también podría deberse a este efecto de cambiar la



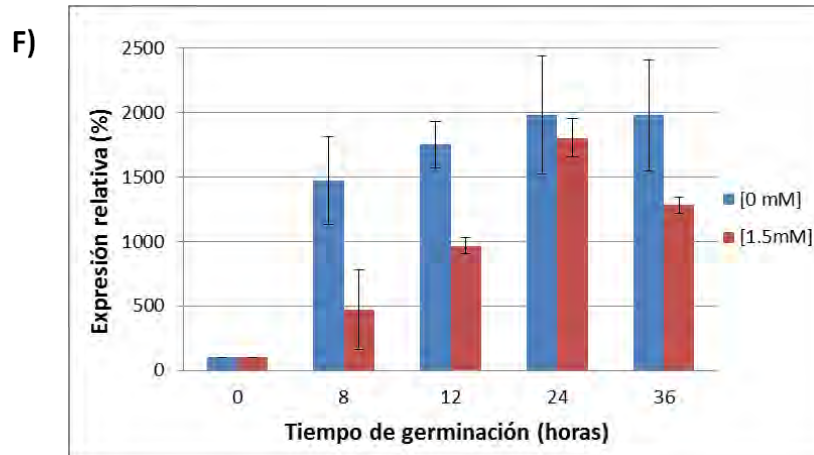
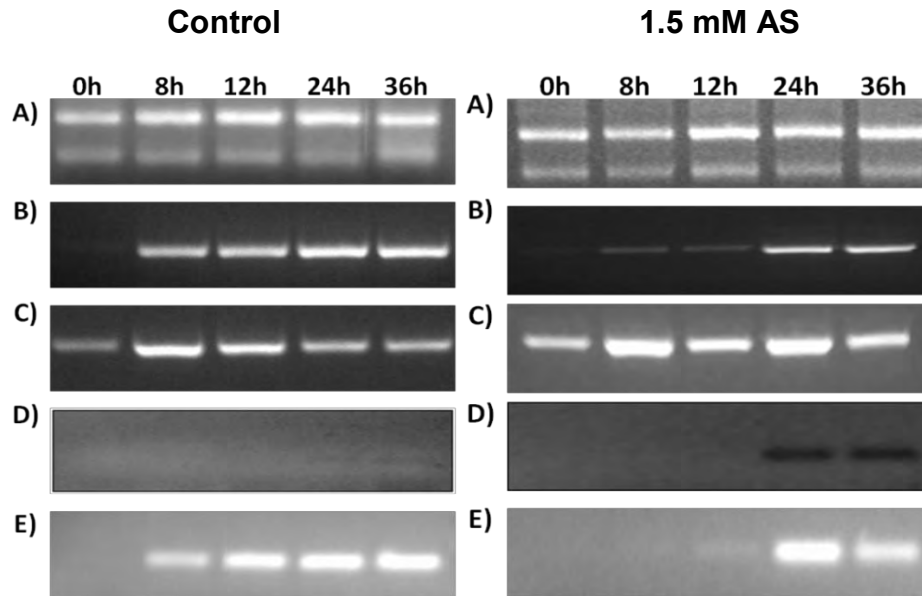
estructuración y composición de la membrana, efecto de des-estructuración que en el laboratorio se ha medido como un aumento en la conductancia membranal cuando el patógeno *Fusarium verticillioides* se encuentra infectando a los embriones, sin embargo el aumento en la salida de solutos de la célula ocurre posterior a las 24 h de germinación (Calzada-Alejo, 2011).

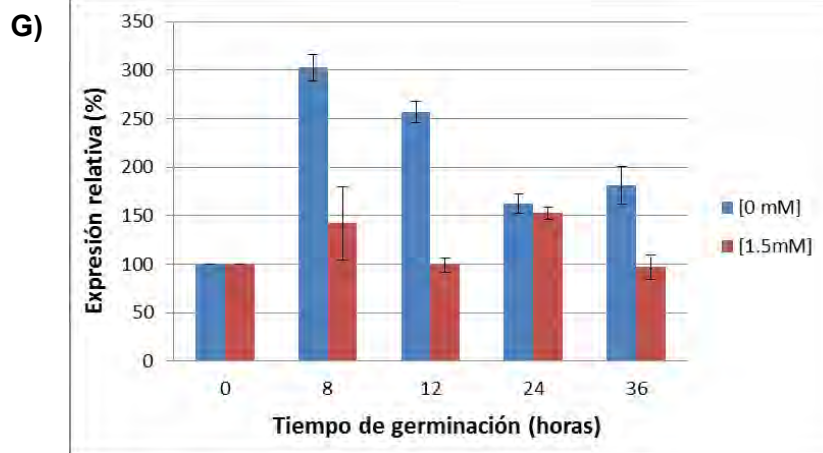
En cuanto a los genes de defensa se encontró que los transcritos para PRM se expresan poco en ausencia de SA y con SA tienen mayor expresión a partir de las 24 h de ser incubados con 1.5 mM de SA, efecto esperado ya que PRM es un gen que se activa para la defensa de la planta. Contrario a la expresión de PAL que está más expresado en los embriones control que con la adición exógena de SA, excepto a las 24 y 36 h en donde su expresión es alta en los embriones embebidos con SA.

Se conoce que la adición de SA activa los mecanismos de defensa incluyendo la inducción del reforzamiento de la pared celular y la activación de enzimas de defensa y ha sido documentado que tratamientos de adición exógena de SA inducen la acumulación de HcPAL (*Hibiscus cannabinus*) en hojas, de LrPAL (*Lycoris radiat*) y SmPAL en cultivos de *Saussurea medussa* (Jeong *et al.*, 2012). Sin embargo, además de actuar en la defensa también se conoce que PAL es una enzima que es activa durante diferentes estadios del desarrollo y la reproducción. En tabaco se encontró que los 4 transcritos para la PAL se encuentran presentes en todos los tejidos a niveles muy similares a excepción de las hojas maduras y en el centro del tallo (médula) donde es menor (Reichert *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior se sabe que al inicio de la germinación ocurre el aumento de las especies reactivas de oxígeno ya que al entrar el agua comienza la respiración mitocondrial y por tanto la oxidación enzimática y la respuesta de defensa ante el estrés oxidante (Bewley y Black, 1994; Bove *et al.*, 2001; Bazin *et al.*, 2011). Lo anterior podría explicar la presencia de PAL en los embriones de maíz sin SA. Y la disminución de PAL cuando se añade SA podría deberse a un estallido oxidativo adicional, que se sabe SA promueve y que podría afectar la transcripción de PAL,



ya que se ha observado en semillas de girasol que el aumento en ROS oxida de manera específica a ciertos RNAs, aumentando su degradación y llevando a la pérdida de la proteína y la función (Bazin *et al.*, 2011).





**Figura 22.- Comparación entre el perfil de expresión temporal sin AS y el perfil de expresión temporal con 1.5 mM de AS, para los transcritos del transportador putativo de hexosas ZmHT, del transportador de sacarosa ZmSUT1 y de los genes que codifican para PRM y PAL. A) Control de cargado de RNA. B) Perfil de expresión de ZmSUT1. C) Perfil de expresión de ZmHT. D) Perfil de expresión de PRM. E) Perfil de expresión de PAL. F) Gráfica que representa la densitometría de las bandas B que codifican para ZmSUT1, la expresión relativa se obtuvo tomando como 100% la densidad de la banda en el tiempo 0h de cada tratamiento. G) Gráfica que representa la densitometría de las bandas C que codifican para ZmHT, la expresión relativa se obtuvo tomando como 100% la densidad de la banda en el tiempo 0 h de cada tratamiento.**

### VIII.3 Efecto de ABA, MeJA y SA sobre la transcripción de los transportadores de sacarosa y hexosas.

En este trabajo se investigó si la presencia de ABA, SA y MeJA, lograba mimetizar el efecto sobre la transcripción de los transportadores de carbohidratos ocasionado por *Fusarium verticillioides* durante la germinación de los embriones de maíz.

Durante la primera fase de infección del hongo sobre los embriones (previó a las 24 h) se detectó un aumento en los transcritos para ambos transportadores (Guzmán-Chávez, 2010) y un nivel alto de ABA (Arciniega-Ruíz, 2012). Sin embargo la adición de ABA a los embriones y su incubación por 24 h no cambió la transcripción de ambos genes, aunque si redujo su germinación.





Aunque se tienen efectos contradictorios de ABA en relación a su papel en la patogénesis, hay estudios que indican que ABA aumenta la resistencia a la enfermedad, por lo que el aumento en el tejido podría indicar que el embrión está intentando defenderse, no obstante esto, no observamos un aumento en las PRM, aunque el aumento de ABA por la célula vegetal podría ser otra estrategia para defenderse. Ya que se ha propuesto que el efecto diferencial de ABA en las interacciones planta-patógeno sugiere que los niveles de ABA podrían ser la clave para modular de manera más fina las defensas de la planta (Adie *et al.*, 2007). Las dos estrategias propuestas del papel de ABA durante la interacción de la planta con un patógeno son: 1) ABA tiene una influencia positiva en la síntesis de jasmónico y 2) participa activando la síntesis de callosa para reforzar la pared celular de la célula vegetal y evitar la entrada de más patógeno. Esto último podría explicar porqué el embrión embebido con ABA no sigue elongando la radícula.

Por otra parte, la adición de MeJA reduce la transcripción de los transportadores en los embriones al igual que la hormona antagónica, el SA. Sin embargo, es posible que la reducción en los transcritos sea un efecto distinto dependiendo de la hormona. SA a concentraciones altas reduce todos los transcritos, probablemente debido a la inducción de las nucleasas (De la Torre-Hernández *et al.*, 2010) o bien al aumento en los RNA oxidados (Bazin *et al.*, 2011) o bien al aumento del estrés oxidativo que modifica la integridad membranal (Calzada-Alejo, 2011). A concentraciones bajas de SA y tiempos cortos de exposición a esta molécula es posible que también conduzca a algunos de estos efectos y por tanto la reducción en la transcripción de los transportadores de carbohidratos es una consecuencia secundaria y no específica del SA. Mientras que el MeJA generalmente aumenta ante un daño o bien ante patógenos de tipo necrótrofo, los cuales provocan la muerte del tejido para nutrirse de éste, por lo que la disminución en la transcripción probablemente se debe a una respuesta por una alteración en la poza de carbono disponible para el catabolismo, ya que se estaría usando este carbono para la síntesis y reforzamiento de la pared celular o bien



para la síntesis de más lípidos de membrana. Ya que la biosíntesis de jasmonato depende de los lípidos membranales (Jordan y Casaretto, 2006).

Por lo anterior ninguna de las hormonas probadas (ABA, MeJA y SA) es responsable del incremento en los transcritos para ambos transportadores de carbohidratos en la infección temprana del embrión por *Fusarium*. Probablemente SA y/o MeJA estén involucrados en la reducción de los transcritos a tiempos tardíos de la infección de *Fusarium*, respuesta general y no específica para los transcritos de los transportadores de carbohidratos.

#### **VIII.4 Efecto de ABA, MeJA y SA sobre la transcripción de genes de defensa.**

Como se ha descrito anteriormente, cuando las plantas son atacadas por patógenos necrótrofos e insectos herbívoros, así como cuando experimentan estrés mecánico, la vía de señalización por JA y ET se enciende y combate el ataque mediante la acumulación de metabolitos antimicrobianos, como la defensina de planta o PDF. El paso limitante durante la producción de JA es catalizado por la enzima AOS, la cual participa en la conversión metabólica de ácidos grasos de la membrana celular a JA. Esta enzima está sujeta a activación por retroalimentación por productos de la vía, tales como JA y OPDA (Laudert y Weiler, 1998). Esto apoya lo observado, ya que la adición de MeJA favoreció la transcripción de AOS y PDF, sin embargo este efecto también se puede atribuir al daño que se hizo al extraer los embriones de la semilla de maíz.

Por su parte, la vía de señalización para ácido salicílico es encendida en presencia de patógenos biótrosos. En esta vía se ha observado la inducción de la expresión de genes de defensa en donde las PR's son las principales proteínas producidas, las que se conoce tienen efecto antimicrobiano. Asimismo, se induce la producción de ROS y en consecuencia un cambio redox que conduciría a una respuesta hipersensible, así como a una respuesta sistémica inducida. En la biosíntesis de



SA, la enzima principal de la vía es la PAL, la cual cataliza la primera reacción de la ruta al convertir la fenilalanina en ácido transcinámico. En este trabajo observamos que al incubar embriones en presencia de SA 1.5 mM, hubo un aumento en la producción de PRM a las 24 h, el efecto esperado. Sin embargo, al aumentar la concentración de SA se redujeron los transcritos tanto para PRM y PAL como ZmSUT y ZmHT. Este último efecto lo atribuimos a un aumento en la producción de nucleasas y que estaría llevando a la muerte del tejido.

El papel de ABA en la defensa no es claro, ya que se han descrito efectos positivos y negativos ante patógenos biótrosos y necrótrofos, por lo cual podría estar participando con un efecto sinérgico o antagonista para ambas vías de señalización (Bari y Jones, 2009). Durante el análisis de la expresión para los transcritos de defensa para cada vía, se observó que PRM y PDF no se modificaron a las concentraciones probadas, sin embargo PRM fue el transcrito con el menor nivel de expresión. Bajo estas circunstancias, no es posible destacar el papel de ABA en algún estrés de tipo biótico específico.

### **VIII.5 Modelo propuesto.**

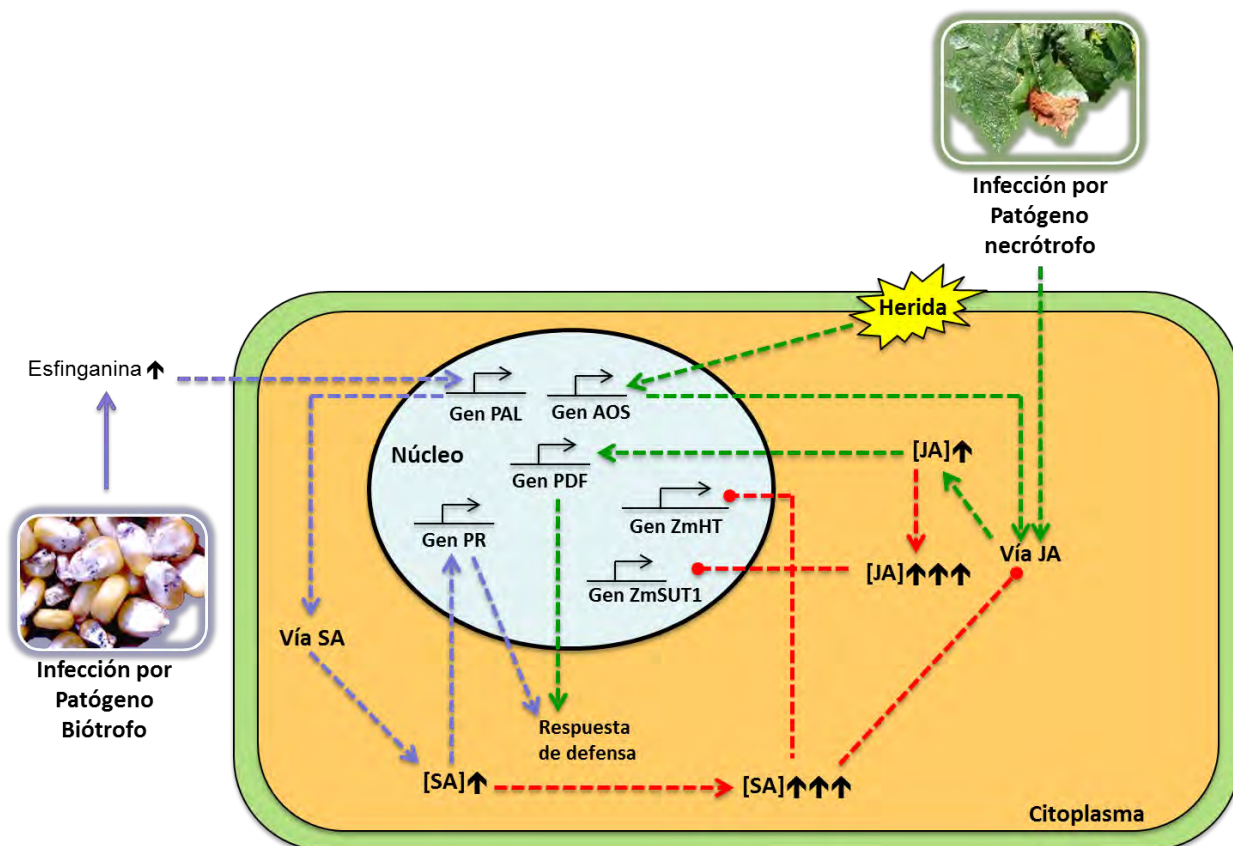
A continuación se propone un modelo de los efectos observados a lo largo de este trabajo y de otros trabajos relacionados con la infección por *Fusarium* embriones de maíz (Figura 23).

Ante el ataque de *Fusarium* aumenta el contenido de esfinganina (De la Torre-Hernández et al., 2010), lo cual conduce a una inducción de la transcripción del gen para la enzima PAL, y en consecuencia se lleva a la síntesis de SA (este trabajo). De esta manera se promueve la transcripción de proteínas relacionadas con la patogénesis (como PRM), las cuales tendrán efecto antimicrobiano y pueden conducir a respuesta hipersensible y respuesta sistémica adquirida (línea morada).



Por su parte, el ataque de un microorganismo necrótrofo, un insecto o incluso una herida en la planta, llevaría al encendido de la vía de los jasmonatos, mediante la activación de la enzima AOS. Una vez sintetizados los jasmonatos, estos son capaces de inducir la transcripción de la defensina PDF para intentar detener el ataque (línea verde).

En el presente trabajo se observó que un aumento en la concentración de SA y MeJA reducen el nivel de transcritos de los transportadores de carbohidratos ZmHT y ZmSUT1 en embriones de maíz (línea roja), lo cual contribuiría con la reducción en la germinación también observada con ambas hormonas.



**Figura 23.- Modelo del efecto de SA y MeJA sobre los transportadores ZmHT y ZmSUT1.** En morado se indica la vía de defensa ante el ataque por patógenos necrótrofos. El ataque por patógenos necrótrofos y heridas se indica en verde. Un aumento en la concentración de SA y MeJA inhibe los transcritos de ZmHT y ZmSUT1 (en rojo).



## IX. CONCLUSIONES

- La germinación se inhibe en presencia de MeJA (30%, >150  $\mu\text{M}$ ), SA (1,5 mM 20%, > 3 mM 100%) y ABA (15%, 5 a 50  $\mu\text{M}$ ).
- La expresión de los transcritos ZmHT y ZmSUT1 no cambian en presencia de ABA.
- Se reduce la transcripción de ambos transcritos ZmHT y ZmSUT1 con MeJA (2.5 y 3 veces, 50 a 300  $\mu\text{M}$ ).
- SA reduce la transcripción de ambos transcritos para los transportadores de carbohidratos, aunque la transcripción de ZmHT se reduce más desde las 8 h de germinación.
- SA y MeJA podrían ser los responsables de la reducción en los niveles de transcritos posterior a las 24 h de germinación de los embriones de maíz con Fusarium. Sin embargo, no se encontró que con alguna de las hormonas aumentará el nivel de transcritos para los transportadores de carbohidratos, por lo que aún queda por encontrar que ocasiona el aumento en el nivel de ambos transcritos al inicio de la infección de los embriones con Fusarium.



## X. PERSPECTIVAS

1. Determinar si la expresión reducida de los transportadores de carbohidratos inducida por MeJA o SA se debe a un cambio en la poza de sus sustratos. Para ello se tendrían que medir los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa en los embriones germinados con MeJA y SA.
2. Evaluar si el nivel de transcritos impacta en un cambio en el nivel de transportadores de carbohidratos o en su actividad. Para lograrlo se realizarían inmunoréplicas tipo Western usando anticuerpos específicos para ambos transportadores y midiendo la actividad de transporte de sacarosa o glucosa mediante un método radiactivo y usando ya sea el tejido completo o bien vesículas de membrana plasmática.
3. Evaluar si el aumento en la transcripción de ZmHT y ZMSUT en la infección por *Fusarium* se debe a un efecto por el contenido de carbohidratos, o a una molécula que el hongo haya secretado. Se medirían los contenidos de carbohidratos como en el punto 1, pero con los embriones embebidos con *Fusarium*. Determinar el nivel de transcritos de los embriones embebidos en apoplastos de un cultivo de hongo o en el lisado del hongo.



---

## XI. REFERENCIAS

- Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez M, Godoy M, Sánchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solan R. 2007. ABA Is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 1665-1681.
- Alarcón MV, Lloret-Salamanca A, Lloret PG, Iglesias DJ, Talón M, Salguero J. 2009. Effects of antagonists and inhibitors of ethylene biosynthesis on maize root elongation. *Plant Signal and Behavior* 4, 1154–1156.
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 3460-3479.
- Arciniega-Ruiz JM. 2012. Cambios en los niveles hormonales de embriones de maíz inducidos durante su interacción con *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Asselbergh, B, De Vleeschauwer D, Höfte M. 2008. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21, 709–719.
- Ayre BG. 2011. Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Molecular Plant* 4, 377-394.
- Bartolini R. 1990. El maíz. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 11-25 pp.



- Bari R, Jones JDG. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69, 473-488.
- Barron D. 1997. RNAgents total RNA isolation system. *Promega Notes Magazine*. 61,33.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58, 4019-4026.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9, 1055-1066.
- Bewley D, Black M. 1994. Seeds Physiology of Development and Germination. 2<sup>nd</sup> Edition, Plenum Press. N. Y. USA. 1-2 pp.
- Bove J, Jullien M, Grapin G. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3, 1002.1-1002.5.
- Büttner M. 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581, 2318-2324.
- Calzada-Alejo V. 2011. Cambios en el patrón de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas por la presencia de *Fusarium verticillioides* durante la germinación de embriones de maíz. Detección de las proteínas por anticuerpos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- De la Torre-Hernández ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernandez N, Cruz-Ortega R, Plasencia J. 2010. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74, 337-345.





- Delrot S, Atanassova R, Gomès E, Coutos-Thévenot P. 2001. Plasma membrane transporters: A machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science* 161, 391-404.
- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* 17, 413-422.
- Esteva G, Merielle C. 2007. Sin maíz no hay país. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México. 25-31 pp.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1992. El maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents>
- Finkelstein RR, Gibson SI. 2002. ABA and sugar interactions regulating development cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* 5, 26-32.
- Gibson SI. 2000. Planta sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* 124, 1532-1539.
- 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.
- Greaves-Fernández N. 2001. Estudio de la expresión del transportador de sacarosa/H<sup>+</sup> en la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.



- Guan L, Scandalios JG. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 5930-5934.
- Guzmán-Chávez F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defense. *Plant Biology* 8, 307-313
- Harms K, Ramírez I, Peña-Cortés H. 1998. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiology* 118, 57–1065.
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153, 211-221.
- Hey SJ, Byrne E, Halford NG. 2010. The interface between metabolic and stress signaling. *Annals of Botany* 105, 197-203.
- Hoth S, Nierdermeir M, Feuerstein A, Horning J, Sauer N. 2010. An ABA-responsive element in the *AtSUC1* promoter is involved in the regulation of *AtSUC1* expression. *Planta* 232, 911-923.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV, Chua NH. 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* 115, 4891-4900.



- Jeong MJ, Choi B-S, Bae DW, Sung CS, Sang UP, Hyung-Sub L, Jonkee K, Joon BK, Byoung-Kwan C, Hanhong B. 2012. Differential expression of kenaf phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) ortholog during developmental stages and in response to abiotic stresses. *Plant Omics Journal* 5, 392-399.
- Jordan M, Casaretto J. 2006. Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena. Chile. 1-28 pp.
- Kato TA, Mapes C, Mera LM, Serratos JA, Bye RA. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 19-29 pp.
- Kepeczynski J, Bialecka B. 1994. Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin  $A_3$  and  $A_{4+7}$  on germination of methyl jasmonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Plant Growth Regulation* 14, 211-216.
- Kermode AR. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 319–344.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter F, Van Loon L, Pieterse C. 2008. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveals a role for redox modulation. *Plant Physiology* 147, 1358-1368.
- Kumari GJ, Sudhakar C. 2004. Effect of jasmonic acid on groundnut during early seedling growth. *Biologia Plantarum* 47, 453-456.
- Ladyzhenskaya EP, Korablyova NP. 2011. Effect of salicylic acid on the proton translocation activity of plasmalemma of potato tuber cells. *Applied Biochemistry and Microbiology* 47, 435–439.



- Laudert D, Weiler EW. 1998. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal* 15, 675–684.
- Lay FT, Anderson MA. 2005. Defensins -components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science* 6, 85-101.
- 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 Physiology* 152, 1096-1106.
- Li Z, Huang R. 2011. The reciprocal regulation of abscisic acid and ethylene biosyntheses. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1647-1650.
- Luna-Loaiza V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Mohr PG, Cahill DM. 2006. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional and Integrative Genomics* 7, 181-191.
- Munkvol GP, Desjardins AE. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81, 556-565.
- Norastehnia A, Sajedi RH, Nojavan-Asghari M. 2007. Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in maize (*Zea mays*): Effect on  $\alpha$ -amylase activity and ethylene production. *General and Applied Plant Physiology* 33, 13-23.



- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser, HMO, Bowles DJ. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 274, 1914–1917.
- Pessarakli M. 2002. Handbook of Plant and crop physiology. Marcel Dekker, Inc. 2<sup>nd</sup> Edition. New York, USA.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308-316.
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology* 141, 910-923.
- Ranson-Hodgkins WD, Vaughn MW, Bush DR. 2003. Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter. *Planta* 217, 483-489.
- Rangel-Sánchez G, Castro-Mercado E, Beltrán-Peña E, Reyes de la Cruz H, García-Pineda E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12, 90-95.
- Reichert AI, Xian-Zhi HE, Dixon RA. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): Characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochemical Journal* 424, 233–242.



- Rivas-San Vicente M, Plasencia J. 2011. Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62, 3321-3338.
- Rodríguez IP, Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7, 323-335.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruiz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany* 63, 4513-4526.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA. 2012. El maíz: alimento de nuestras vidas.  
<http://www.siap.gob.mx/publicaciones/siaprendes/010.html>
- Smith JL, De Moraes CM, Mescher MC. 2009. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science* 65, 497–503.
- Spoel SH, Koorneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* 15, 760-770.
- Staswick PE, Su W, Howell SH. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 6837-6840.



- Talbot NJ. 2010. Living the sweet life: How does a plant pathogenic fungus acquire sugar from Plants? *PLoS Biology* 8, 1-3.
- Thoma BJ, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BA. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13, 63-68.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* 14, 310-317.
- Tuteja N. 2007. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior* 2, 135-138.
- Tuteja N, Sopory SK. 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior* 3, 525-536.
- Van Loon LC, Van Strein EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 85-97.
- Vaugh MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 10876-10880.
- Vargas WA, Sanz JM, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno SA. 2012. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotricum graminicola* in maize. *Plant Physiology* 158, 1342-1358.
- White CN, Proebsting WM, Hedden P, Rivin CJ. 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance



- governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiology* 122, 1081-1088.
- Xie Z, Zhang ZL, Hanzlik S, Cook E, Shen QJ. 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible *WRKY* gene. *Plant Molecular Biology* 64, 293-303.
- Yang DL, Li Q, Deng YW, Lou YG, Wang MY, Zhou GX, Zhang YY, He ZH. 2008. Altered disease development in the *eui* mutants and *eui* overexpressors indicates that gibberellins negatively regulate rice basal disease resistance. *Molecular Plant* 1, 528-537.
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, Nakashita H. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 1678-1692.
- Wahl R, Wippel K, Goos S, Kämper J, Sauer N. 2010. A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* 8, 1-11.
- Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* 62, 3289-309.
- Zurita-Villegas. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* en el transporte de carbohidratos en la germinación de tejido embrionario de maíz. Tesis de Licenciatura Facultad de Química. UNAM.