



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE HEXOCINASA DE EMBRIONES DE MAÍZ  
EN RESPUESTA A ABA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
GIOVANNA PAULINA AGUILERA ALVARADO**

**DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DR. MARIO ROCHA SOSA  
INSITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**MÉXICO, D. F. Abril, 2013**



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.

## **ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE HEXOCINASA DE EMBRIONES DE MAÍZ EN RESPUESTA A ABA.**

### **RECONOCIMIENTOS**

Esta tesis de maestría se realizó 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 Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
Dr. Mario Rocha Sosa	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por PAPIIT (IN220511) y PAIP (4290-12). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular
VOCAL	Dra. Bronwyn Barkla	Instituto de Biotecnología, UNAM
VOCAL	Dr. Alejandro Garcíarrubio Granados	Instituto de Biotecnología, UNAM
SECRETARIO	Dra. Marina Gavilanes Ruíz	Facultad de Química, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó 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 Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo se realizó con apoyos de:

PAPIIT IN220511, DGAPA, UNAM

PAIP 4290-12, Facultad de Química, UNAM

Beca para la realización de tesis de maestría otorgada por CONACYT.

Se reconoce al Dr. Guillermo Mendoza Hernández<sup>†</sup> del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por su apoyo para la identificación de las proteínas mediante la técnica de espectrometría de masas.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS.</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>4</b>
Estructura de la semilla de maíz.	4
Importancia del maíz.	5
<b>ABA.</b>	<b>7</b>
Funciones de ABA.	7
Estructura, síntesis y frecuencia en plantas superiores.	7
Percepción del ABA.	9
<b>ABA, estrés y carbohidratos.</b>	<b>11</b>
<b>H XK.</b>	<b>13</b>
Propiedades cinéticas.	13
Localización de las HXKs.	15
Estructura de la enzima.	16
Funciones de HXK en plantas.	17
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS DEL TRABAJO.</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>26</b>
Objetivo general.	26
Objetivos particulares.	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>27</b>
<b>Material Biológico.</b>	<b>29</b>
Obtención y Desinfección de embriones.	29
Germinación.	29
Porcentaje de germinación.	29
<b>Cuantificación de ABA endógeno.</b>	<b>29</b>
Extracción de ABA.	29
Fundamento de la cuantificación de ABA mediante el Kit Phytodetek™ ABA.	30
Preparación del estándar.	30
Detección de ABA.	30
Cálculos.	31
<b>Cuantificación de G6P.</b>	<b>31</b>
Extracción.	31
Cuantificación.	32
<b>Ensayo Histoquímico Enzimático.</b>	<b>32</b>
Fijación de tejido embrionario.	32
Ensayo histoquímico enzimático.	33
<b>Obtención de fracciones citosólicas y mitocondriales de embriones de maíz.</b>	<b>34</b>
Extracción.	34
Determinación de proteínas por el método de Bradford.	35
<b>Determinación de la actividad de G6PDH en la fracción citosólica.</b>	<b>35</b>
Fundamento.	35

<b>Determinación de la actividad de GAPDH.</b>	<b>36</b>
<i>Fundamento.</i>	36
<b>Determinación de la actividad de la PK.</b>	<b>38</b>
<i>Fundamento.</i>	38
<b>Determinación de la actividad de HXK.</b>	<b>39</b>
<i>Fundamento.</i>	39
<i>Actividad de HXK.</i>	40
<b>Determinación de actividad de HXK en gel de poliacrilamida nativo.</b>	<b>41</b>
<i>Control de cargado del gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).</i>	41
<i>Preparación de las muestras.</i>	42
<i>Corrimiento electroforético gel de SDS-PAGE.</i>	42
<i>Preparación y corrimiento de geles nativos.</i>	42
<i>Corrimiento electroforético de geles nativos.</i>	43
<i>Actividad de HXK en gel.</i>	43
<b>Cálculo de Rf.</b>	<b>44</b>
<b>Elución, concentración e identificación.</b>	<b>44</b>
<i>Elución y concentración.</i>	44
<i>Identificación.</i>	45
<b>RESULTADOS.</b>	<b>46</b>
Una isoforma de HXK de la fracción citosólica aumenta y es mayoritaria durante la germinación.	46
El ABA disminuye la actividad de la isoforma de HXK que incrementa más su actividad durante la germinación.	56
Consecuencias de la disminución de la actividad de HXK en presencia de ABA.	72
<i>La localización de la actividad de HXK en los embriones embebidos en ABA no es radicular.</i>	72
ABA no afecta la poza de G6P.	74
Efecto de ABA sobre la actividad de G6PDH.	74
Efecto de ABA sobre la actividad de GAPDH y la PK.	78
Los efectos de los carbohidratos y del ABA sobre la HXK y el metabolismo son distintos.	81
Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la concentración de G6P.	87
Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de G6PDH.	87
Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de GAPDH.	90
Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de PK.	92
Comparación de los patrones de isoformas de HXKs citosólicas y mitocondriales generados por la adición exógena a los embriones de ABA y Glucosa.	92
Identificación de las isoformas de HXK.	94
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>102</b>
La actividad de HXK y la vía glucolítica en la germinación.	102
Actividad de HXK en la zona radicular.	104
El destino de la G6P en presencia de ABA.	109
HXK y carbohidratos.	111
Identificación de las HXKs de maíz.	114

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>116</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>116</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>122</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES.

Figura 1. Esquema de la semilla de maíz. ....	5
Figura 2. Metabolismo del ABA. ....	8
Figura 3. Modelo simplificado de la generación, transporte y percepción de ABA en plantas. ....	9
Figura 4. Perspectiva general sobre la percepción, señalización y transporte del ABA. ....	11
Figura 5. Modelo estructural de la HXK de <i>S. cerevisiae</i> . ....	17
Figura 6. Mecanismo propuesto para la acción de la HXK en la mitocondria. ....	19
Figura 7. Señalización de <i>AtHXK1</i> . ....	21
Figura 8. Esquema general del diseño experimental seguido en este trabajo. ....	27
Figura 9. Reacción de reducción del NBT. ....	28
Figura 10. Vías metabólicas de <i>A. thaliana</i> involucradas en el uso de la G6P y enzimas que se determinaron en esta tesis. .	33
Figura 11. Perfil temporal de la actividad de HXK de las fracciones mitocondriales de embriones de maíz. ....	47
Figura 12. Perfil de la actividad de HXK de la fracción mitocondrial durante el proceso de germinación. ....	48
Figura 13. Efecto del ADP en la actividad de HXK de las fracciones citosólica y mitocondrial. ....	49
Figura 14. Efecto del ADP en el perfil de actividad de HXK de la fracción mitocondrial de embriones de maíz. ....	50
Figura 15. Actividad de HXK citosólica durante la germinación de embriones de maíz. ....	51
Figura 16. Perfil de la actividad de HXK de la fracción citosólica durante el proceso de germinación. ....	52
Figura 17. Efecto del ADP en el perfil de actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones de maíz. ....	53
Figura 18. Detección <i>in situ</i> de la actividad de HXK durante el proceso de germinación. ....	55
Figura 19. Efecto de GA <sub>3</sub> sobre el porcentaje de germinación. ....	56
Figura 20. Efecto de ABA sobre el porcentaje de germinación. ....	57
Figura 21. Efecto de GA <sub>3</sub> sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial y citosólica. ....	58
Figura 22. Efecto de GA <sub>3</sub> en el perfil de la actividad de HXK de la fracción mitocondrial y citosólica de embriones de maíz germinados 24 h con diferentes concentraciones de fitohormona. ....	59
Figura 23. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial y citosólica. ....	60
Figura 24. Efecto de ABA sobre las bandas de actividad de HXK de la fracción mitocondrial. ....	61
Figura 25. Efecto de ABA sobre las bandas de actividad de HXK de la fracción citosólica. ....	62
Figura 26. Niveles endógenos de ABA. ....	64
Figura 27. Efecto de ABA en el porcentaje de germinación de embriones. ....	65
Figura 28. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial de embriones embebidos de 0 a 24 h. ....	66
Figura 29. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial. ....	67
Figura 30. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones embebidos de 0 a 24 h. ....	68
Figura 31. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica. ....	71
Figura 32. Efecto de ABA en la localización y actividad de HXK. ....	73
Figura 33. Cuantificación de G6P. ....	74
Figura 34. Enzimas de la vía glucolítica y de la vía de las pentosas fosfato involucradas en el metabolismo de la Glucosa o G6P. ....	75
Figura 35. Efecto de ABA sobre la actividad de la G6PDH. ....	76
Figura 36. Efecto de ABA en la localización y actividad de la G6PDH. ....	77
Figura 37. Efecto de ABA sobre la actividad de la GAPDH. ....	78
Figura 38. Efecto de ABA en la localización y actividad de la GAPDH. ....	79
Figura 39. Efecto de ABA sobre la actividad de la PK. ....	80
Figura 40. Efecto de los carbohidratos sobre el porcentaje de germinación y la elongación radicular. ....	82
Figura 41. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial. ....	83
Figura 42. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones. ....	84
Figura 43. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica. ....	85
Figura 44. Efecto de Glucosa y Sorbitol en la localización y actividad de la HXK. ....	86
Figura 45. Cuantificación de G6P. ....	87
Figura 46. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de G6PDH. ....	88
Figura 47. Efecto de Glucosa y Sorbitol en la localización y actividad de la G6PDH. ....	89
Figura 48. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de GAPDH. ....	90



Figura 49. Efecto de Glucosa y Sorbitol en la localización y actividad de la GAPDH.....	91
Figura 50. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de PK.....	92
Figura 51. Comparación del corrimiento electroforético de las HXKs de las fracciones citosólicas y mitocondriales de embriones secos y embebidos en ABA y Glucosa (Glc).....	93
Figura 52. SDS-PAGE de la banda B4 de la fracción citosólica.....	95
Figura 53. Corrimiento electroforético de las proteínas citosólicas y mitocondriales de embriones de maíz.....	96
Figura 54. Corrimiento electroforético de las proteínas citosólicas y mitocondriales de plantas de maíz de 2 meses de edad.....	98
Figura 55. Corrimiento electroforético de las proteínas citosólicas de embriones de maíz.....	99
Figura 56. Corrimiento electroforético de las proteínas mitocondriales de embriones de maíz.....	100
Figura 57. Efecto de ABA y Glucosa sobre el metabolismo de los embriones de maíz.....	114
Tabla 1. Sustratos de la HXK y su respectivas $K_m$ .....	14
Tabla 2. Inhibidores de la HXK y su respectivas $K_i$ o porcentajes de inhibición.....	14
Tabla 3. HXKs de maíz.....	22
Tabla 4. Reactivos y volúmenes para preparar el medio de reacción para determinar la actividad de la G6PDH.....	35
Tabla 5. Reactivos y volúmenes para preparar el medio de reacción para determinar la actividad de GAPDH.....	37
Tabla 6. Reactivos y volúmenes para preparar el medio de reacción para determinar la actividad de la PK.....	38
Tabla 7. Reactivo de ensayo de Glucosa.....	40
Tabla 8. Reactivos para la preparación del gel de poliacrilamida en condiciones nativas.....	42
Tabla 9. Reactivos para la preparación de un gel de poliacrilamida nativo.....	43
Tabla 10. Mezcla amortiguadora de reacción.....	43
Tabla 11. Concentración y tipos de sustratos añadidos a la mezcla de reacción.....	44
Tabla 12. $R_f$ de las isoformas de HXK de las fracciones citosólicas y mitocondriales. Se muestran los $R_f$ de las bandas que se detectaban en el mayor número de los tratamientos o sustratos de la enzima.....	94
Tabla 13. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en extractos crudos de embriones germinados de maíz.....	96
Tabla 14. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en extractos crudos de plantas de maíz de 2 meses de edad.....	99
Tabla 15. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en extractos crudos de embriones germinados de maíz.....	101
Tabla 16. Principales proteínas encontradas por espectrometría de masas en fracciones citosólicas de embriones de maíz embebidos durante 24 h en agar al 1%.....	122
Tabla 17. Principales proteínas encontradas por espectrometría de masas en fracciones mitocondriales de embriones de maíz embebidos durante 24 h en agar al 1%.....	123
Tabla 18. Principales proteínas encontradas por espectrometría de masas en fracciones citosólicas de plantas de maíz de dos meses de edad.....	124
Ecuación 1. Reacción catalizada por la HXK.....	14
Ecuación 2. Concentración de ABA endógeno en embriones de maíz (picomoles ABA/g <sub>Tejido fresco</sub> ).....	31
Ecuación 3. Concentración de G6P en embriones de maíz (mg/g <sub>Tejido</sub> ).....	32
Ecuación 4. Reacción catalizada por la G6PDH.....	35
Ecuación 5. Actividad de G6PDH en embriones de maíz (nmol/min/mg).....	36
Ecuación 6. Reacción catalizada por la GAPDH.....	36
Ecuación 7. Actividad de GAPDH en embriones de maíz (nmol/min/mg).....	37
Ecuación 8. Reacciones catalizadas por A) la PK y B) la Lactato deshidrogenasa (LDH).....	38
Ecuación 9. Actividad de PK en embriones de maíz (nmol/min/mg).....	39
Ecuación 10. Reacciones catalizadas por la A) HXK y B) la G6PDH.....	39
Ecuación 11. Actividad de HXK en embriones de maíz (nmol/min/mg).....	41
Ecuación 12. Obtención de $R_f$ de las isoformas de HXK reveladas en los geles de actividad.....	44

## ABREVIATURAS.

ABA: Ácido abscísico	NADP <sup>+</sup> : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
ABAR: Receptor de ABA	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
ABRE: Elemento de respuesta a ABA	NBT: Cloruro de nitroazul tetrazolio
Abs: Absorbencia	OPPP: Fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato
ADP: Adenosín difosfato	PEP: Fosfoenolpiruvato
AMP: Adenosín monofosfato	PGI: Fosfoglucosa isomerasa
ANT: Translocador de adenin nucleótidos	P <sub>i</sub> : Fosfato inorgánico
AtHXK1: Hexocinasa 1 de <i>A. thaliana</i>	PK: Piruvato cinasa
ATP: Adenosín trifosfato	PM: Peso molecular
BTP: Bis Tris Propano	PMS: Fenazina metasulfato
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DTT: Ditiotreititol	PVP: Polivinilpirrolidona
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	RNA: Ácido ribonucleico
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	REG: Reactivo de ensayo de Glucosa
G6P: Glucosa-6-fosfato	Rf: Factor de retención
G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	ROS: Especies reactivas de oxígeno
GA: Giberelinas	SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
GA <sub>3</sub> : Ácido giberélico	SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	SDS: Dodecilsulfato de sodio
HXK: Hexocinasa	SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
HXKL: Hexocinasa-like	VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje.
kDa: kilodalton	
K <sub>i</sub> : Constante de inhibición	
K <sub>m</sub> : Constante de Michaelis-Menten	
LDH: Lactato deshidrogenasa	
mRNA: RNA mensajero	
N-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas	
NAD <sup>+</sup> : Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada	
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida	

**RESUMEN.**

Una fitohormona que juega un papel crítico en las respuestas adaptativas de las plantas al estrés es el ácido abscísico (ABA) a través de diferentes rutas de transducción de señales. Se sabe que éstas mantienen una estrecha relación con la señalización por carbohidratos en la regulación de la expresión de genes que afectan la fisiología de la planta, aunque no se conoce por completo cómo interactúan ambas señales. Se ha propuesto que una enzima clave que podría participar en esta interacción es la hexocinasa (HXK). En *A. thaliana*, la HXK1 participa como proteína señalizadora modificando la expresión de genes en respuesta a la concentración de Glucosa dentro de la célula.

Pese a la relevancia de esta proteína, en el caso del maíz existen pocos estudios. Un trabajo previo en el laboratorio determinó que el mayor número isoformas de HXK se encuentra en los embriones germinados y que elevadas concentraciones de carbohidratos reducen la actividad de 1 isoforma en la fracción citosólica. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar si el ABA también modificaba la expresión de HXK. Para alcanzar el objetivo, se sometieron los embriones de maíz a tratamientos con diferentes concentraciones de ABA, ácido giberélico (GA<sub>3</sub>, fitohormona antagónica de ABA), Glucosa y Sorbitol. Posteriormente se extrajeron las fracciones mitocondrial y citosólica de los embriones y se midió la actividad de HXK mediante un ensayo acoplado a la reducción del NADP<sup>+</sup>. Para la obtención del perfil de expresión de las diferentes isoformas se corrieron geles nativos, la actividad se reveló mediante un ensayo acoplado a la reducción de un colorante (NBT), al igual que cuando se localizó la actividad de HXK en tejido embrionario.

Se observó que conforme transcurría el tiempo de imbibición, la actividad de HXK citosólica aumentó, y que la isoforma que denominamos banda 4 (B4) fue la que presentó la mayor actividad y mostró la misma tendencia de aumento que mostró la actividad de la fracción citosólica determinada *in vitro*. Lo anterior coincide con la necesidad de los tejidos de aumentar su metabolismo glucolítico para abastecer los metabolitos necesarios para su crecimiento, elongación celular y la posterior división celular. Se corroboró que enzimas glucolíticas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la piruvato cinasa

(PK) estaban activas y que la vía de las pentosas fosfato se activaba durante la germinación, esto a través de la medición de la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Se corroboró que el perfil de reducción del contenido de ABA ocurría durante la germinación y se investigó si esta fitohormona y su antagonista, GA<sub>3</sub>, tenían un efecto sobre la actividad de la HXK. Se encontró que ABA redujo la actividad de HXK y que GA<sub>3</sub> no modificó su actividad, por lo que es probable que la reducción de ABA durante la germinación sea el responsable de la activación de la isoforma B4 de HXK en la fracción citosólica.

El impacto de ABA y la Glucosa en la vía glucolítica fue distinto, ya que ABA redujo 10 veces la actividad de la PK mientras que, en presencia de carbohidratos, la actividad de dicha enzima disminuyó ligeramente. Sin embargo, altas concentraciones de carbohidratos podrían inducir la síntesis de ABA y llevar a que la HXK disminuya por un mecanismo similar.

Por otra parte, la actividad de HXK de la fracción mitocondrial no presentó cambios, aunque el número de isoformas fue mayor en los embriones secos. El factor de retención (Rf) de las HXKs de la fracción mitocondrial sugiere que puede encontrarse formando un oligómero de alto peso molecular durante la germinación y que en el embrión seco hay más formas de alto peso molecular. De manera interesante, al localizar a la HXK en los tejidos, se encontró que la mayor actividad se encuentra en la radícula y que los tratamientos con ABA y carbohidratos a pesar de llevar a una reducción de la actividad de la enzima, no lo hacen en la misma región.

Estos resultados describen un nuevo componente celular que afecta la actividad de la HXK, y a una isoforma de la enzima que sería interesante estudiar en el contexto del establecimiento de la plántula de maíz.

## INTRODUCCIÓN.

### Estructura de la semilla de maíz.

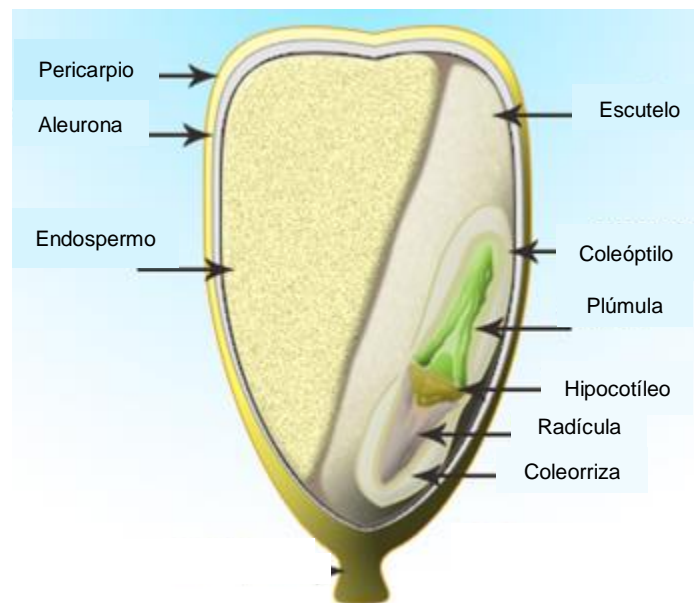
El maíz, *Zea mays*, es una especie monocotiledónea de la familia de las poáceas. La planta adulta de maíz se compone principalmente de hojas, aunque tiene otras partes importantes. El tallo es un cilindro segmentado parecido al bambú, del cual emergen las hojas foliares, éstas se encuentran dispuestas a lo largo del tallo de manera opuesta y alternada. En la parte superior de la planta se encuentra la inflorescencia masculina o espiga y está compuesta de muchas pequeñas flores. Mientras, la inflorescencia femenina o mazorca se encuentra en la parte media de la planta envuelta por un tipo especial de hoja. Cada mazorca consiste de una especie de tronco denominado olote, el cual se encuentra cubierto de filas de granos, que dependiendo de la variedad oscila entre 4 y 32 (Vincent, 2001).

El grano es el término que se utiliza cuando se usa para la alimentación humana animal o como para materia prima en la industria, pero cuando se utiliza para indicar su uso en la siembra, reproducción o multiplicación de la especie o variedad se le denomina semilla (Hernández-Guzmán y Carballo-Carballo, 2012). En este trabajo se le llamará semilla.

La semilla de maíz está constituida por 3 partes esenciales, el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 1). El pericarpio, una capa de origen ovárico que cubre a la semilla y actúa como un sistema de protección para el embrión y el endospermo. El endospermo ocupa aproximadamente 2/3 partes de la semilla y está localizado en la parte más amplia del grano del maíz. Éste contiene una capa continua de grandes células cúbicas a la que se le conoce como capa de aleurona. Esta capa contiene gránulos de proteína. El resto del endospermo está constituido por células que almacenan almidón y algunos lípidos. Siendo almidón el 80% del peso total del endospermo.

El embrión se encuentra por debajo del endospermo, separado del mismo por una capa de células epiteliales. En el embrión hay dos tejidos claramente separados, el eje embrionario o embrionario y el escutelo o cotiledón modificado. El primero es el que propiamente formara a la nueva plántula y está constituido por una radícula y una plúmula. La plúmula está

parcialmente cubierta y protegida por un tejido llamado coleóptilo y la radícula por la coleorriza. Todos estos componentes se encuentran completamente encerrados o rodeados por el escutelo o cotiledón. Dicho escutelo contiene una capa de células epiteliales (mencionada anteriormente), las cuales se encargan de segregar enzimas hidrolíticas (estearasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas y ribonucleasas) durante la germinación, para digerir los nutrientes presentes en el escutelo (lípidos, proteínas y carbohidratos) con el fin de que estos puedan ser absorbidos por los tejidos en crecimiento del eje embrionario, para continuar su desarrollo (MASISH, 2012; TRANSAUTORS, 2012).



**Figura 1. Esquema de la semilla de maíz.**

Se muestran los tejidos que la conforman. El embrión de maíz está constituido por el escutelo y el eje embrionario (plúmula y radícula), este último alberga los tejidos que constituirán a la nueva plántula y en el cual se pueden observar las zonas de formación del sistema vascular. Tomado y adaptado de GeoChemBio (GeoChemBio, 2012).

### Importancia del maíz.

El maíz es un cultivo que presenta fotosíntesis tipo C4, lo que le permite evitar el fenómeno de fotorespiración llevándolo a una muy eficiente actividad fotosintética. El maíz se reproduce por polinización cruzada, lo que contribuye a su variabilidad morfológica y adaptabilidad geográfica. Dependiendo de la latitud y el clima en el que se cultiva, el maíz se clasifica en tres diferentes tipos: tropical, templado y subtropical. También puede clasificarse con base en la composición del endospermo y de la semilla, su color, madurez y uso (Xu *et al.*, 2009).

En el aspecto económico, los tipos de maíz más importantes en el mundo son los cultivados para la producción de forraje y ensilaje. Particularmente en Asia, la demanda de maíz como forraje es mayor que la demanda para su uso como alimento. En contraste, en las zonas tropicales, los granos de maíz son utilizados principalmente para consumo humano (Xu *et al.*, 2009).

En el mundo se cultiva un estimado de 6.3 millones de hectáreas de maíz, la mayoría en los países en desarrollo, siendo México el que ocupa la mitad de esa superficie cultivada superando a países del centro y sur de América, así como el este y sur de África y Asia (Bellon *et al.*, 2011). En México es el cultivo agrícola más importante, a los niveles alimentario, industrial, económico y social.

Durante el periodo 1996-2006 se produjo en México un promedio anual de 19.3 millones de toneladas de maíz, mostrando una tasa media anual de crecimiento de 2.0% (SAGARPA, 2012). A pesar de que el cultivo del maíz es intenso, la producción anual en México es insuficiente. Se importan alrededor de 5 millones de toneladas/anuales de maíz amarillo (usado como forraje) y 7 millones de toneladas /anuales de maíz blanco (consumo humano) (SIAP, 2012).

La mayor parte de los cultivos en México dependen de las condiciones climáticas, ya que se crece bajo el denominado riego por temporal, por lo que las lluvias son uno de los factores más importantes de riesgo para la agricultura. El cambio climático global exacerbará estos riesgos de manera sustancial (Bellon *et al.*, 2011). De manera global, se estima que dentro de 35 años la producción de alimentos deberá duplicarse para satisfacer las necesidades, reto que debe lograrse de cara al actual cambio climático. En lo que toca al maíz, los pronósticos no son favorables: para el 2055, habrá un decremento del 10% en su producción (Jones y Thornton, 2003).

Se prevé que el cambio climático incremente la severidad de los tipos de estrés a lo cuáles los cultivos están expuestos: malezas, enfermedades, frío, calor, estrés osmótico. La capacidad de la planta para tolerar el ataque de patógenos y el estrés de tipo abiótico es un factor clave

y determinante en la calidad y el rendimiento de los cultivos (Hey *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, en años recientes los estudios de cómo las plantas contienden con el estrés se han incrementado (Cramer *et al.*, 2011), para dar respuesta a la necesidad de optimizar la producción de biomasa por los cultivos a pesar de las sequías, el incremento en el contenido de CO<sub>2</sub> atmosférico y el aumento de los patógenos de plantas y el crecimiento de las malezas.

## **ABA.**

### *Funciones de ABA.*

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que regula muchos aspectos agronómicos importantes sobre el desarrollo de las plantas como la síntesis de compuestos de almacenamiento en las semillas (proteínas y lípidos), la promoción de la tolerancia a la desecación y la latencia en las semillas, la inhibición de la transición de la fase embrionaria al crecimiento germinativo, así como durante la fase vegetativa hacia el crecimiento reproductivo (Brocard *et al.*, 2002).

Aunque el papel más conocido de ABA es la generación de respuestas al estrés ambiental, como la sequía, el estrés salino y el frío (Zhu *et al.*, 2007). Numerosos estudios demuestran que la acumulación de ABA es un factor clave para controlar las respuestas esenciales para la adaptación a los cambios en respuesta al estrés; disminuye la conductancia estomatal al promover el cierre de estomas, lo que reduce la pérdida de agua por transpiración, induce la expresión de un gran número de genes relacionados con el estrés y tiene un papel importante en la acumulación de osmolitos, esto como parte de los ajustes metabólicos que deben ocurrir para contender con el estrés (Suzuki *et al.*, 2004).

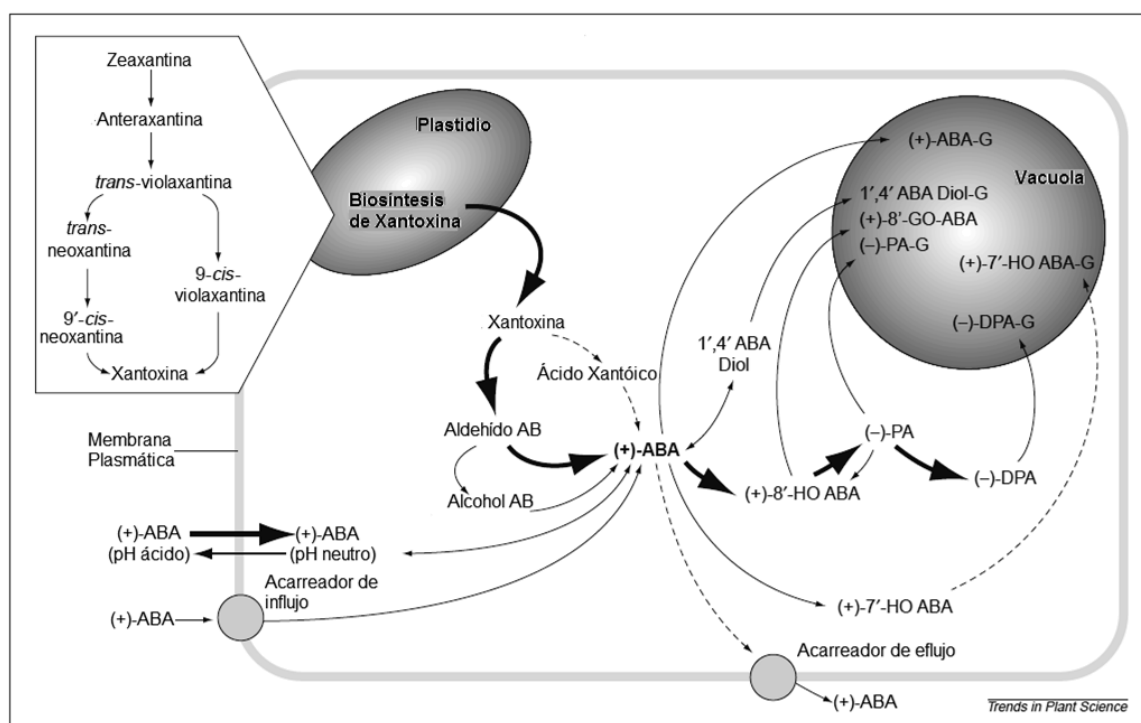
### *Estructura, síntesis y frecuencia en plantas superiores.*

El ABA es un sesquiterpenoide (terpenoide C<sub>5</sub>) conformado por un anillo y una cadena lateral. Presenta asimetría en el C-1' el cuál puede presentarse de las siguientes formas: (+) y (-) o (R) y (S). Sólo el enantiómero S-(+) se encuentra de manera natural en las plantas (Srivastava, 2002).



Es un ácido débil que en solución a pH neutro se encuentra en su estado disociado; mientras que a pH ácido predomina la forma protonada. La forma protonada difunde libremente a través de las membranas, la forma aniónica requiere de un transporte de tipo activo vía acarreadores.

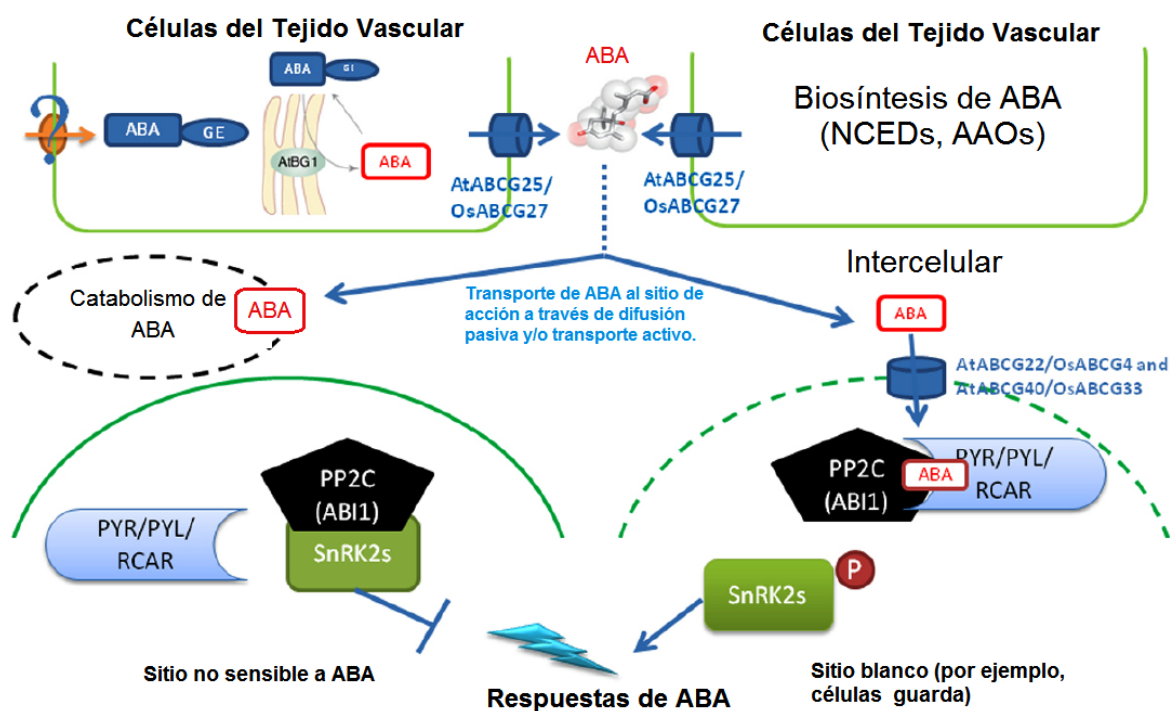
El ABA es sintetizado en hojas maduras, tallos, semillas y frutos en desarrollo, raíces y en muchas otras partes de la planta (Srivastava, 2002). Se forma por la ruptura de carotenoides en los plastidios, que da lugar a la generación de xantoxina, principalmente. Posteriormente, esta xantoxina, deja el plastidio y se traslada al citosol donde sufre una ruptura originando ácido xantóico y aldehído abscísico. El aldehído abscísico puede ser reducido a alcohol, pero principalmente ser oxidado a ácido abscísico (Figura 2) (Cutler y Krochko, 1999).



**Figura 2. Metabolismo del ABA.**

La biosíntesis del ABA en plantas superiores, ocurre en el plastidio (ruptura de carotenoides para producir xantoxina) y en el citosol. La ruta principal en el citosol [xantoxina a aldehído abscísico (aldehído AB) a ABA] se muestra con flechas remarcadas; las vías menos comunes [aldehído AB a alcohol abscísico (alcohol AB) a ABA] se muestran con flechas tenues y las especulativas con flechas discontinuas. La vía catabólica más importante es de la hidroxilación-8'; aunque también hay rutas alternas de degradación mediante la formación de conjugados como ésteres de Glucosa, glucósidos y otros (G). Otros procesos incluyen la hidroxilación en la posición 7' y la reducción en la posición 4'. DPA, ácido dihidrofaséico; PA, ácido faséico. (Tomado y modificado de Cutler y Krochko, 1999).

El ABA puede circular a través de la planta de forma libre o conjugada con Glucosa, mediante la formación de un enlace éster; y puede liberarse de esta estructura conjugada por acción de  $\beta$ -glucosidasas del retículo endoplasmático y del apoplasto (Figura 3). Esto implica que la señalización por ABA en el sitio de acción, no necesariamente está relacionado con la cantidad total de fitohormona, sino que está regida por la eficiencia de las modificaciones enzimáticas y la liberación o transporte (Wasilewska *et al.*, 2008).



**Figura 3. Modelo simplificado de la generación, transporte y percepción de ABA en plantas.**

La síntesis de ABA inducida por los cambios ambientales en los tejidos vasculares induce a los genes que regulan su síntesis NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa, enzima reguladora de la vía) y AAOs (ABA aldehído oxidasa), por otro lado se promueve la liberación de ABA del RE de su forma ABA-glucosilada (ABA-GE) y transportada hacia el apoplasto. En el espacio intercelular aumenta la concentración de ABA, y las células blanco (sitio blanco), toman al ABA ya que contienen a los transportadores de ABA (transportadores tipo ABC o los transportadores difusivos). Una vez en el sitio blanco, el ABA es percibido por el complejo PYR/PYL/RCAR-PP2C para producir la respuesta a ABA mediada por SnRK2. Tomado de Ye *et al.* (2012).

### Percepción del ABA.

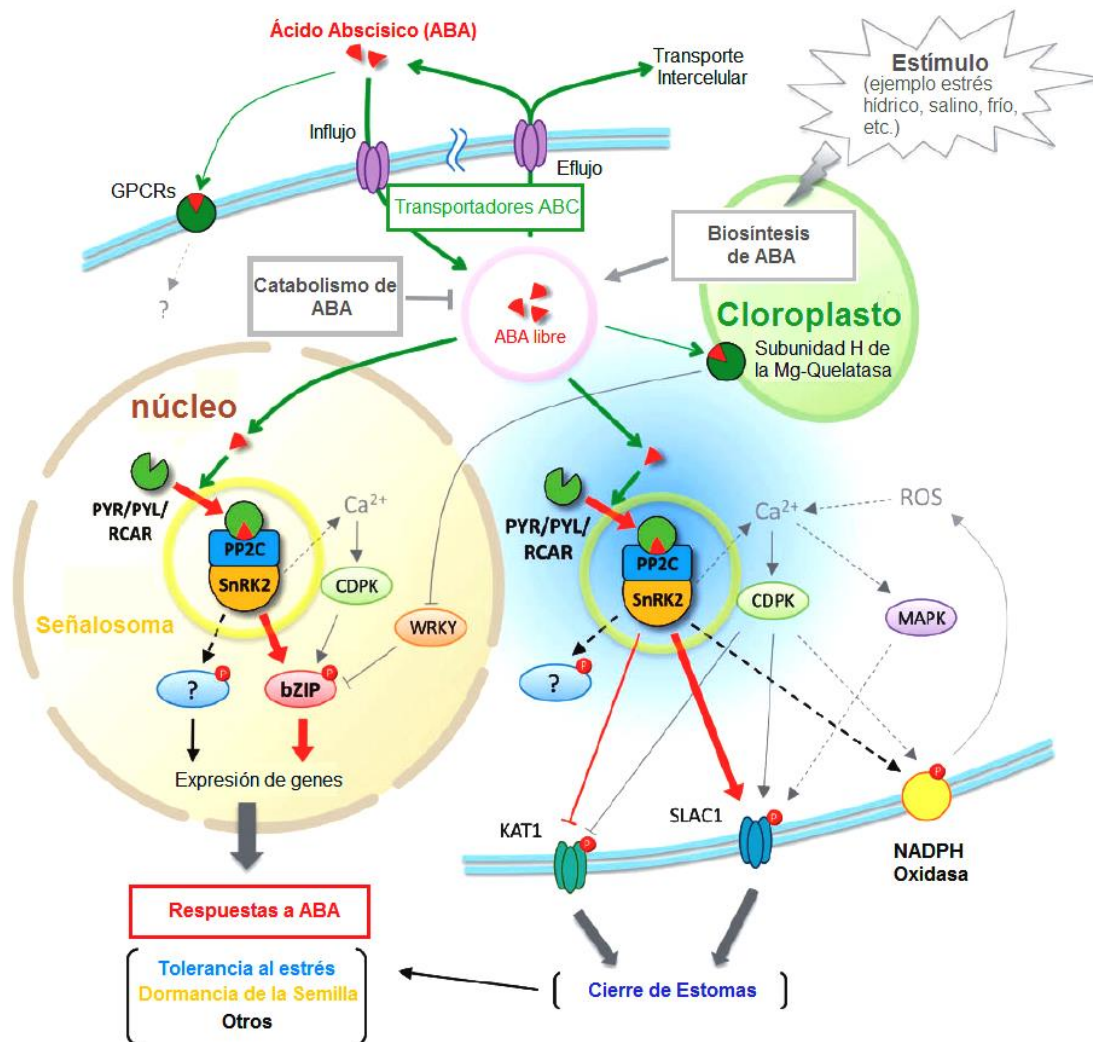
La mayor parte de la vía de señalización por ABA se ha resuelto recientemente, así como el descubrimiento del sistema de transporte, hechos que proveen evidencias sobre como las plantas responden a los niveles intra y extracelulares de ABA. Los modelos anteriores al 2009 sobre la percepción y la vía de señalización de ABA, mostraban a cada receptor y proteína de unión distribuidos de diferentes formas a lo largo de toda la planta y en distintos

compartimientos celulares. Previamente, se reportaron receptores de ABA como por ejemplo, los receptores acoplados a proteínas G (GCR2, GTG1/2) y las proteínas quelantes de  $Mg^{2+}$  (ABAR); sin embargo se sabía poco de cómo estos receptores regulaban la respuesta a ABA en las plantas (Raghavendra *et al.*, 2010).

Las investigaciones más recientes han revelado la existencia de un nuevo receptor denominado PYR/PYL/RCAR, el cual interactúa con proteínas fosfatasa del tipo PP2C (como ABI1, ABI2 y HAB1) y SnRK2 (quinasas relacionadas a SNF1 “Sucrose Non Fermenting”), a este complejo se le ha denominado el “señaloma de ABA” (Raghavendra *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2010).

En plantas silvestres, la concentración de ABA aumenta (hasta 10 veces) debido a señales ambientales o del desarrollo, esto ocasiona que ABA se una al receptor PYR/PYL/RCAR, lo que inactiva a las fosfatasas PP2C cuyo blanco natural es SnRK2. Al inactivarse PP2C por ABA, SNRK2 permanece fosforilada, y de esta manera, la SnRK2 puede fosforilar factores de transcripción o proteínas de membrana (Figura 4). En contraste, en las mutantes *abi1-1* cuya proteína carece del sitio de unión a PYR/PYL/RCAR, se presenta una inhibición constitutiva de SnRK2, aún en presencia de ABA (Wasilewska *et al.*, 2008; Umezawa *et al.*, 2010).

Como se observa en la Figura 4, la vía de señalización por ABA es muy compleja. Tiene un sistema de transporte difusivo y activo que está funcionando para transportar al ABA al sitio de acción, luego el ABA es percibido por sus receptores y se desencadena una cascada de fosforilación diferente dependiendo si la percepción ocurre en el núcleo o en el citoplasma. Todo lo anterior lleva a una respuesta rápida, eficiente, complicada y que se modula por diferentes tipos de estrés.



**Figura 4. Perspectiva general sobre la percepción, señalización y transporte del ABA.**

ABA se une al receptor PYR/PYL/RCAR, lo que inactiva a las fosfatasas PP2C cuyo blanco natural es SnRK2. Al inactivarse PP2C por ABA, SNRK2 permanece fosforilada, de esta manera, la SnRK2 puede fosforilar factores de transcripción o proteínas de membrana. Los componentes relacionados con ABA como PYR/PYL/RCAR, PP2C y SnRK2 forman el "señalosoma" (círculo amarillo), el cual funciona al menos en dos sitios. En el núcleo, el señalosoma directamente regula la expresión de genes que responden al ABA por fosforilación de los factores de transcripción tipo AREB/ABF. En el citoplasma el señalosoma puede acceder a la membrana plasmática y fosforilar a los canales aniónicos (SLAC1) o a los canales de potasio (KAT1) e inducir el cierre de los estomas en respuesta al ABA. Otros sustratos de SnRK2 aún no han sido identificados. Tomado de Umezawa *et al.* (2010).

### ABA, estrés y carbohidratos.

Existe una estrecha relación entre el metabolismo de ABA, el estrés y la señalización por carbohidratos (Hey *et al.*, 2010). Por ejemplo, ABA inhibe el proceso de germinación de las semillas efecto que es contrarrestado por la adición exógena de Glucosa (en baja concentración) (Srivastava, 2002). Además, gracias a la obtención de mutantes de *A. thaliana* de respuesta modificada a carbohidratos; se ha demostrado que las mutantes *abi4* ("ABA insensitive 4"), *gin5* ("glucose insensitive"), *sun6* ("sucrose-uncoupled 6") y *sis5* ("sugar

insensitive 5”) son alélicas a *aba3*; y que *gin1* es alélica a *aba2*. Estas mutantes son capaces de crecer y desarrollarse en medios conteniendo Glucosa 6% o Sacarosa 300 mM, contrario a lo que sucede en las plantas silvestres en las que el crecimiento es pobre (Rook *et al.*, 2006).

La identificación de las mutantes alélicas insensibles a carbohidratos y ABA establece una relación entre la vía de señalización por ABA y la respuesta a carbohidratos, aunque no se han identificado los nodos en los cuales convergen éstas señales. Actualmente, existen dos modelos que plantean cómo ocurre esta relación entre carbohidratos y ABA (Rook *et al.*, 2006). El primer modelo plantea que la respuesta a Glucosa, es mediada a través de la inducción de la biosíntesis de ABA y una subsecuente señalización de ABA a través de la proteína ABI4, ésta última reconocida como un factor de transcripción, pero también como un efector dual. ABI4 tiene efectos positivos para la expresión de varios genes como ABI5 (factor de transcripción del tipo zipper básico de leucina) y SBE2.2 (por sus siglas en inglés “starch branching enzyme 2.2”) y negativo para otros genes regulados por azúcares (Bossi *et al.*, 2009).

El segundo modelo, propone que ABA y los carbohidratos actúan de forma sinérgica (Rook *et al.*, 2006). Esta propuesta se basa en los hallazgos del grupo de Smeekens, el cual para investigar la regulación de una proteína cloroplástica, la plastocianina; obtuvieron transformantes con una construcción que contenía una fusión entre el promotor del gen la plastocianina y la secuencia codificante de la luciferasa. Encontraron que la expresión del gen de la plastocianina se reprimía en presencia de sacarosa. Posteriormente, obtuvieron 17 mutantes a las que denominaron *sucrose uncoupled (sun)*. La línea *sun6* fue alélica a la línea *abi4* (Dijkwel *et al.*, 1997), es decir que ninguna de las mutantes era capaz de producir a la proteína ABI4, y en dichas líneas estaba disminuida la represión del gen de plastocianina en presencia de sacarosa. El experimento que sugiere el sinergismo, fue en el cual las mutantes *sun6* se crecieron en presencia del análogo de la glucosa, 2-deoxi-glucosa (el cual es fosforilable, pero cuyo producto es pobremente metabolizado), y observaron un efecto más acentuado sobre la reducción de la represión del gen de la plastocianina (Dijkwel *et al.*, 1997).

Por otra parte, en las mutantes *abi4* hay otros genes que han mostrado tener alterada su expresión, incluidos genes de respuesta a ABA (*Em6* y otros genes de la embriogénesis tardía) y genes modulados por azúcares (*ApL3* y *ADH*, genes que codifican para una subunidad de la ADP-Glucosa pirofosforilasa y para la aldehído deshidrogenasa que cataliza el paso de xantoína a ABA-aldehído, respectivamente; Rook *et al.*, 2006). Adicionales a los estudios ya descritos, existen otros estudios semejantes que comprueban que existe una estrecha interacción entre el ABA y los carbohidratos; el reto ahora, es encontrar las bases moleculares de dicha interacción.

Recientemente se demostró que mutantes deficientes en una enzima glucolítica, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa cloroplástica (GAPDH), son insensibles a ABA. A pesar de que el gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) es sustrato de la enzima y precursor para la vía de síntesis de ABA, la deficiencia en la enzima no modifica los niveles de ABA en la planta pero sí su sensibilidad (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2011), evidencia de la conexión entre el metabolismo primario y la transducción de señales por ABA. Por otra parte, la participación de otras enzimas glucolíticas como la enolasa y la aldolasa en la respuesta a tolerancia a sal (Barkla *et al.*, 2009), postula que la función de las enzimas glucolíticas es importante en la aclimatación frente a varias condiciones de estrés.

Otra enzima glucolítica que presenta una función distinta a la clásica es la HXK. La caracterización de las mutantes de *A. thaliana gin2*, ha identificado claramente a la Hxk1 (AtHXK1) como un componente clave en la percepción y señalización de carbohidratos.

Esta enzima es quizá, la proteína señalizadora de Glucosa mejor caracterizada (Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006). A continuación se describe a la HXK y su papel en la señalización por carbohidratos

## **HXK.**

### *Propiedades cinéticas.*

La HXK, HXK (EC 2.7.1.1), es una enzima glucolítica reguladora, que cataliza la reacción irreversible de fosforilación de hexosas, a partir de ATP:



Ecuación 1. Reacción catalizada por la HXK.

En plantas, esta enzima puede fosforilar a varias hexosas, incluyendo D-Glucosa (Glc), D-Fructosa (Fru), D-manosa (Man) y D-galactosa (Gal). La HXK es distinta de Glucocinasa (GK), Fructocinasa (FK), Manocinasa (MK), Galactocinasa (GalK), las cuales pueden ser altamente específicas para sus sustratos Glc, Fru, Man y Gal, respectivamente (Tabla 1) (Claeyssen y Rivoal, 2007).

**Tabla 1. Sustratos de la HXK y su respectivas  $K_m$ .**

Tomado y modificado de Claeyssen y Rivoal (2007).

Sustrato	$K_m$ (mM)
D-Glucosa	0.02-0.13
D-Fructosa	1.50-3.00
D-Manosa	0.02-0.50
ATP	0.05-0.59
UTP	1.30-4.50
GTP	0.75-2.20
CTP	1.00-3.20
TTP	0.23

El principal producto de la HXK, Glucosa-6-fosfato (G6P), no solo alimenta la vía glucolítica citosólica o plasmática, sino que también es sustrato precursor en las vías de oxidación de las pentosas fosfato y de ácidos grasos; en la biosíntesis de almidón y polisacáridos de la pared celular y para la glicosilación de proteínas (Claeyssen y Rivoal, 2007).

El ADP es un inhibidor no competitivo de las HXK denominadas no citosólicas<sup>1</sup>. Aunque la manohexulosa y la Glucosamina son sus mejores inhibidores (Tabla 2). Estos efectos pueden ser interpretados como que las HXKs particuladas están involucradas en la percepción de hexosas y de los cambios en la carga energética, mientras que las citosólicas podrían solo acarrear una función catalítica (Claeyssen y Rivoal, 2007).

**Tabla 2. Inhibidores de la HXK y su respectivas  $K_i$  o porcentajes de inhibición.**

Tomado y modificado de Claeyssen y Rivoal (2007).

Efactor	Especie, tejido, isoforma de HXK	$K_i$ o % de inhibición con D-Glc como sustrato
---------	----------------------------------	-------------------------------------------------

<sup>1</sup> Aunque a las HXK se les conocía como enzimas de existencia solo citosólica ah se reconoce que puede estar en algunos organelos, denominada entonces HXK particulada.

<b>ADP</b>	<i>T. aestivum</i> , gérmen de trigo, HXK	$K_f = 1.00$ mM
	<i>P. sativum</i> , semilla, HXK 1 y 2	50% a $\approx 1.00$ mM
	<i>Z. mays</i> , grano, HXK1 y HXK2	45% a 1.00 mM
	<i>Z. mays</i> , raíz, HXK particulada HXK citosólica	$K_f = 0.03$ mM Sin efecto
<b>G6P</b>	<i>P. sativum</i> , semilla, HXK 1	Sin efecto
	<i>Z. mays</i> , grano, HXK1 y HXK2	Inhibición débil
	<i>Z. mays</i> , raíz, HXK particulada	Sin efecto
	HXK citosólica	Sin efecto
<b>Glucosamina o N-acetilglucosamina</b>	<i>Z. mays</i> , raíz, HXK particulada	$K_f = 0.80$ mM
	HXK citosólica	$K_f = 80.00$ mM
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk2	20% a 50.00 mM
	LeHxk3 y	20% a 15.00 mM
	LeHxk4 recombinantes	$K_f = 50.00$ mM
<b>Manoheptulosa</b>	<i>S. oleracea</i> , hoja, SoHxk1	
	<i>Z. mays</i> , raíz, HXK particulada	$K_f = 0.50$ mM
	HXK citosólica	$K_f = 20.00$ mM
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk2 recombinante	20% a 50.00 mM
<b>D-Trealosa-6-fosfato</b>	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk1 y	Sin efecto
	LeHxk4 recombinantes	
	<i>S. chacoense</i> , ScHxk2 recombinante	Sin efecto
	<i>S. oleracea</i> , hoja, SoHxk1	Sin efecto
	<i>A. thaliana</i> , hoja, AtHXK1 y AtHXK2	Sin efecto

### Localización de las HXKs.

Pueden clasificarse con base en su localización subcelular. Por ejemplo, en *A. thaliana* se distinguen las HXK Tipo A, que contienen un péptido señal de transporte al cloroplasto; y las HXK Tipo B con dominio de anclaje a la membrana mitocondrial. Del análisis de secuencias de HXKs en maíz, se predice que no hay isoformas de localización cloroplástica, pero que sí existen citosólicas, al menos ZmHXK8 y mitocondriales (Karve *et al.*, 2010). Recientemente, en *P. patens*, se han identificado dos nuevos tipos de HXK: las Tipo C, que carecen de péptido de anclaje o péptido señal y son solubles; y las Tipo D, que tienen un péptido de anclaje a la mitocondria, el cual es diferente al presente en las HXK Tipo B. Además, se sabe que las HXK Tipo B y Tipo C son capaces de migrar al núcleo (Nilsson *et al.*, 2011).

Diversos estudios han demostrado que un tejido dado puede contener isoformas de HXK localizadas en diferentes compartimientos celulares. Por ejemplo, en arroz se ha encontrado que de las 10 HXKs aisladas, las OsHXK5 y OsHXK6 poseen la capacidad de tener dos ubicaciones: la mitocondria y el núcleo si se suprime el péptido de anclaje a la mitocondria, las



proteínas se dirigen al núcleo sin acumularse en el citoplasma (Cho *et al.*, 2009). Para el caso de *A. thaliana*, existen 6 genes que codifican para proteínas relacionadas a HXK, 3 de las cuales tienen actividad de cinasa sobre las hexosas (denominadas HXK) y otras tres que carecen de actividad catalítica (denominadas HXKL). Todas estas diferentes HXK presentan un patrón de expresión en diferentes tejidos y organelos: HXK1, HXK2, HXK11, HXK12 y HXK13 en mitocondria, mientras que HXK3 está presente en cloroplastos (Karve *et al.*, 2008). Aún se desconoce si esta heterogeneidad en localización está relacionada con su papel fisiológico.

#### *Estructura de la enzima.*

Las HXKs de plantas tienen asignadas masas moleculares que van de 38 a 68 kDa y su estructura terciaria no ha sido estudiada. La HXK de *S. cerevisiae*, contiene 2 dominios (Figura 5). El dominio de unión a carbohidrato está localizado en el dominio pequeño, con 4 segmentos adicionales de péptidos pequeños, denominadas asas [L1 (<sup>87</sup>LGGGTN<sup>92</sup>), L2 (<sup>115</sup>PDAMRTTQNP<sup>124</sup>), L3 (<sup>158</sup>SFPAQQ<sup>163</sup>), L4 (<sup>174</sup>WTKGF<sup>178</sup>)] que sufren un cambio conformacional al unirse al carbohidrato. Estas asas, completan el sitio de unión a carbohidrato y preforman el sitio de unión al nucleótido (Kuser *et al.*, 2000).

La unión transitoria de la Glucosa induce el cierre de la estructura de dos lóbulos o dominios de la HXK y la lleva a una forma compacta, en donde la rotación del dominio es de aproximadamente 12°, rotación que excluye al agua del sitio catalítico y favorece la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a la hexosa en lugar de donarlo al agua (Karve *et al.*, 2010).



**Figura 5. Modelo estructural de la HXK de *S. cerevisiae*.**

Modelo que representa una conformación abierta en la que el sitio catalítico se encuentra entre los dos dominios. El ión  $\text{SO}_4^{2-}$  se une en la entrada del sitio activo (Tomado de Kusser *et al.*, 2000).

### *Funciones de HXK en plantas.*

Se pueden distinguir principalmente tres funciones generales de las HXKs relacionadas con su actividad catalítica, su localización celular o su participación como molécula señalizadora.

### *Función catalítica en el metabolismo de hexosas.*

La HXK tiene un papel crucial en la regulación del metabolismo primario ya que actúa como enzima reguladora de la glucólisis y suministra de sustratos (hexosas fosforiladas) a otras vías distintas de la glucólisis y de gran relevancia como la vía de oxidación de las pentosas fosfato o para la síntesis de almidón.

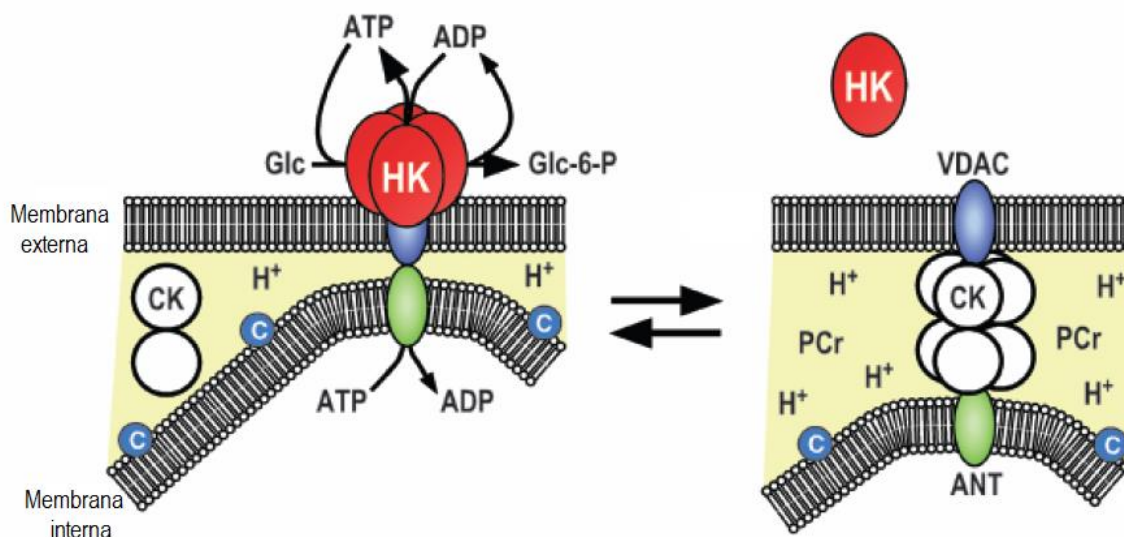
### *Integración con su localización celular.*

La localización celular de las HXK podría estar relacionada con su eficiencia, pues facilita el importe de hexosas y mantiene un gradiente de concentración a través de la membrana. En las plantas, aquellas que están asociadas al cloroplasto están involucradas en la rápida fosforilación de la Glucosa generada de la degradación del almidón para que sea metabolizada inmediatamente (Claeysen y Rivoal, 2007). Cabe destacar que en maíz no se

ha identificado una HXK de localización cloroplástica, al igual que en sorgo, lo que sugiere que se debe a que ambas son plantas C<sub>4</sub>, las cuales no tienden a acumular mucho almidón (Karve *et al.*, 2010).

La función propuesta para la HXK mitocondrial es la de acoplar la producción de ATP con el metabolismo. El mecanismo de interacción de la HXK con la mitocondria se ha propuesto de la información encontrada en mamíferos, en donde se conoce que la enzima se une al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC por sus siglas en inglés), el cual a su vez está unido al translocador de adenin nucleótidos, (ANT por sus siglas en inglés) por lo que al unirse la HXK a la VDAC se favorece la salida de ATP de la mitocondria que enseguida es usado por la HXK, mientras que el ADP formado regresa a la mitocondria (Figura 6). Si la HXK no se encuentra unida a la VDAC, el intercambio de ATP por ADP no ocurre, el potencial de la membrana interna aumenta y esto puede llevar a la ruptura osmótica de la mitocondria, y a la inducción de apoptosis (Robey y Hay, 2005). Si bien, se conoce que hay otro mecanismo para producir apoptosis en el que la creatin cinasa (CK) y bax o bak producen el cambio en la permeabilidad membranal debido a la ausencia de la unión de la HXK a la VDAC (Pastorino y Hoek, 2008).

Adicionalmente, las HXKs con función regulatoria se han encontrado en organelos, la HXK1 de *A. thaliana* tiene una región amino terminal de 24 aminoácidos que se predice que funciona para el envío de la proteína a la mitocondria (Olsson *et al.*, 2003; Damari-Weissler *et al.*, 2007), la sobreexpresión de la proteína en tabaco demostró su localización mitocondrial (Damari-Weissler *et al.*, 2007). Sin embargo, esta misma enzima se ha encontrado en el núcleo (Cho *et al.*, 2006).



**Figura 6. Mecanismo propuesto para la acción de la HXK en la mitocondria.**

La HXK en forma de tetrámero interacciona con la VDAC, esta a su vez con el translocador de adenin nucleótidos (ANT), conectando dos compartimentos, la matriz mitocondrial y el citosol. El ATP mitocondrial es sustrato de la HXK la cual produce ADP que regresa a la mitocondria y G6P. Al acumularse la G6P, la enzima regresa a su forma monomérica y se separa de VDAC, se cierra la mitocondria al intercambio de ATP/ADP y esto favorece la acidificación del espacio intermembranal, y que la creatina cinasa (CK) se una a VDAC y ANT, para la formación de fosfocreatina (metabolito con enlace de alta energía). (Tomado y adaptado de Robey y Hay, 2005).

### Función como sensor y señalizador de hexosas.

El mecanismo de percepción de azúcares es un área de intensa investigación. Fenómeno regulatorio que no solo desencadena la regulación alostérica de la actividad enzimática de varias enzimas en las distintas vías metabólicas, sino que produce la señalización que controla la expresión genética. Hay abundantes evidencias que colocan a la HXK como un sensor de azúcares en plantas (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2009) y que es una enzima que también funciona como sensor en animales y levaduras (Rolland *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de HXK1 en tomate y *A. thaliana* lleva a una reducción en la fotosíntesis, inhibición del crecimiento y a la inducción de senescencia (Dai *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2012), lo que sugiere un papel regulatorio de la HXK en la fotosíntesis. Se ha encontrado en relación a esto que la HXK puede percibir elevadas concentraciones de Glucosa y regular la expresión de varios genes fotosintéticos como la piruvato fosfato dicinasa (*PPDK*), la proteína de unión a clorofila *a/b*, (*CAB1*) y a la subunidad pequeña de la rubisco, *RBCS* (Dai *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2012). Así como también inhibe la expresión del translocador

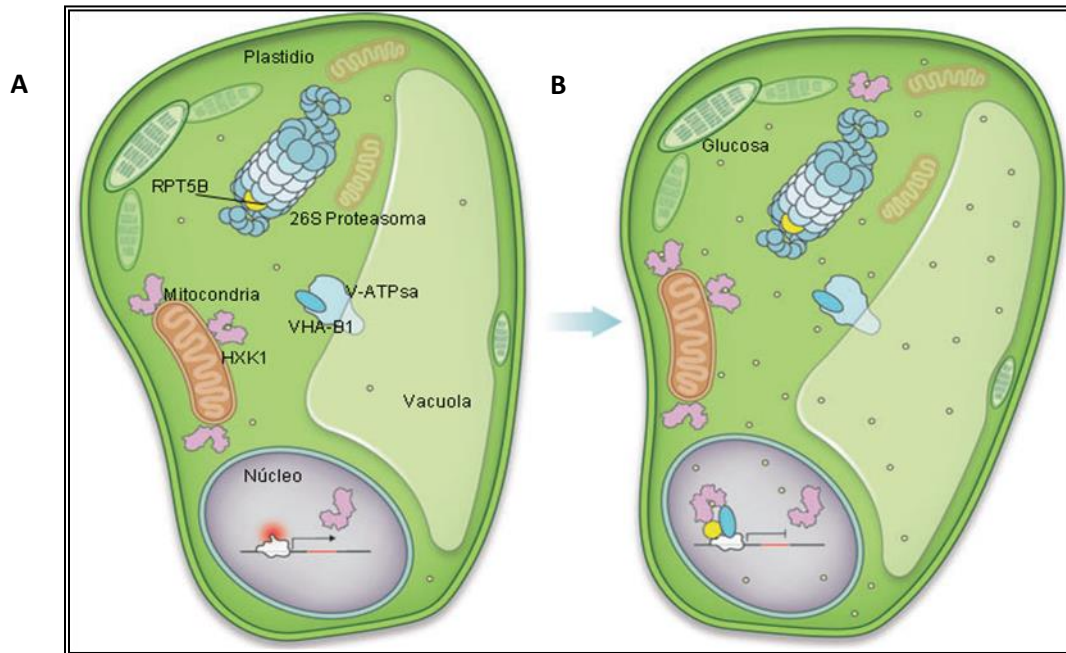
de triosas fosfato en cloroplasto (Sun *et al.*, 2006) e induce la expresión de la sacarosa sintasa a concentraciones elevadas de Glucosa, 100 mM (Ciereszko y Kleczkowski, 2002).

De las HXKs que se conoce que tienen función sensora, la más estudiada es la de *A. thaliana*, AtHXK1. Usando técnicas de bioquímica y genética se comprobó que la función de señalización está separada de la función enzimática de la HXK, confirmando la hipótesis de que es un sensor de Glucosa (Moore *et al.*, 2003).

Moore y colaboradores (2003) mostraron que la HXK de plantas cumple esta función sensora. Para hacerlo describieron el efecto de 2 mutaciones independientes de una HXK (mutantes *gin2-1* y *gin2-2*) sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas de *A. thaliana*. La mutante *gin2-1* mostró defectos en el crecimiento tanto a nivel reproductivo como vegetativo. Los defectos fueron más pronunciados al incrementar la intensidad de la luz. A nivel molecular, la capacidad de fosforilar a la Glucosa se redujo aproximadamente 50%, lo que es resultado de la actividad de otras isoenzimas de HXK presentes en la planta. Aún con la disminución en actividad los contenidos de hexosas-6-fosfato no disminuyeron. Para confirmar que se había separado la función catalítica de la señalizadora, produjeron mutaciones puntuales en el sitio catalítico de la AtHXK1, anulando su capacidad de fosforilar a las hexosas, con esta construcción se hicieron ensayos de complementación en las plantas *gin2-1*. Así, estas plantas carentes de la HXK silvestre expresaron a la HXK no catalítica y fisiológicamente se observó el restablecimiento del fenotipo silvestre y la sensibilidad al crecimiento en respuesta a Glucosa.

Cabe señalar que la AtHXK1 se encuentra en las mitocondrias, pero también se ha demostrado su presencia en el núcleo (Figura 7). AtHXK1 se une a una subunidad de la ATPasa vacuolar (VHA-B1) y a la subunidad 26S de la partícula reguladora del proteosoma (RPT5B), con el fin de formar un complejo represor de la transcripción de genes fotosintéticos, en respuesta a los cambios en la concentración de Glucosa (Cho *et al.*, 2006; Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010). Cuando las concentraciones de Glucosa son bajas, se lleva a cabo de manera activa la expresión de algunos genes fotosintéticos por acción de un factor de transcripción específico. Pero al elevarse las concentraciones de Glucosa, ésta difunde

libremente hacia el núcleo donde se une a AtHXK1. Ésta unión provoca un cambio conformacional en AtHXK1, que le permite interactuar con VHA-B1y RPT5B para formar un complejo represor de la transcripción.



**Figura 7. Señalización de AtHXK1.**

La expresión de genes fotosintéticos es dirigida por AtHXK1 en un proceso dependiente de la concentración de Glucosa. A). (Tomado y modificado de Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010).

## ANTECEDENTES DIRECTOS DEL TRABAJO.

Dada la importancia de la HXK como una de las principales enzimas reguladoras del metabolismo central del carbono, como proteína señalizadora y como partícipe en muchos procesos del desarrollo y crecimiento de la planta el estudio de su regulación resulta de gran importancia para el entendimiento de los procesos en los cuales está involucrada.

En *A. thaliana* y *O. satyva* se han identificado 6 y 10 genes, respectivamente, que codifican para las HXKs, reconociendo a las proteínas AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5 y OsHXK6 como las formas participantes en la transducción de señales mediada por carbohidratos (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2009). En maíz se desconoce el número total de genes que codifican para HXK y aún más, cuál es la HXK involucrada en la percepción de azúcares y transducción de señales. En una búsqueda en la base de datos de UniProtKB, se encontraron 11 probables proteínas HXKs, es decir que se infiere que son HXKs con base en su secuencia nucleotídica (Tabla 3).

La masa molecular de la enzima según estas secuencias está de alrededor de los 49.0 a los 54.7 kDa con pI muy similares, 5.14 a 6.49. Debido al cercano valor de pI que las proteínas tendrían se dificulta un poco el realizar el análisis de su actividad por medio de su separación por pI en geles, análisis que sí se realizó para el caso de las isoenzimas de arroz, y que permitió establecer la presencia de seis isoformas de HXK, tres GK (GK1, GK2 y GK3), una FK (FK1) y dos HXKs con baja especificidad por el carbohidrato (HXK1 y HXK2) (Guglielminetti *et al.*, 2000).

**Tabla 3. HXKs de maíz.**

La evidencia de estas probables proteínas es solo a nivel de transcrito, es decir, que con base en la secuencia nucleotídica se infiere que puede tratarse de HXKs. Tomado de <http://www.uniprot.org/>.

Número de acceso	Longitud (aa's)	Masa (Da)	pI
<u>B3GQB5</u>	507	54668.7	6.49
<u>B6UBW9</u>	503	54242.0	5.58
<u>Q8L5G8</u>	509	54816.9	6.06
<u>B6TL75</u>	459	49312.1	5.14
<u>B6U4K6</u>	507	54704.7	6.38

<u>B6JER0</u>	503	54334.5	5.12
<u>B6U2X9</u>	503	54373.6	5.17
<u>C0P9R0</u>	490	54166.2	5.18
<u>B7ZYX4</u>	504	54982.2	5.93
<u>B4FB85</u>	503	54374.6	5.13
<u>C0PIU9</u>	439	47569.5	5.82
<u>C0HF79</u>	459	49326.1	5.14
<u>C0P8K7</u>	482	52857.6	5.69

A pesar de que en maíz no se conocen con certeza cuáles son los genes que codifican para HXK y en que tejidos se expresan; sí se ha determinado la actividad total y su sensibilidad a inhibidores tanto en la fracción citosólica como en la fracción mitocondrial. La actividad de la HXK citosólica no se inhibe por ADP y G6P, aunque se inhibe poco con manoheptulosa ( $K_i = 20$  mM). Por su parte la actividad de la HXK1 mitocondrial, se inhibe por ADP ( $K_i = 34$   $\mu$ M), *N*-acetilglucosamina ( $K_i = 800$   $\mu$ M) y manoheptulosa ( $K_i = 500$   $\mu$ M), de manera similar a como se ha demostrado que se regula la HXK en tejidos animales (Galina *et al.*, 1995; da-Silva *et al.*, 2001; Rezende *et al.*, 2006; Claeysen y Rivoal, 2007).

La fracción mitocondrial ha sido sujeta a una posterior purificación encontrándose que, en las raíces hay al menos 2 isoenzimas de HXK mitocondrial (Rezende *et al.*, 2006). La HXK mitocondrial de raíces de plántulas de maíz se sometió a una digestión suave con quimiotripsina y se observó que permanecía unida a la mitocondria, ensayo que sí libera a la HXK de rata de la mitocondria (Kurokawa *et al.*, 1983). El gráfico de hidropatía de la secuencia amino terminal de las HXK de maíz, de arroz y de espinaca mostró que la secuencia es más larga y extremadamente más hidrofóbica que la secuencia de rata, por lo que es probable que la interacción de la HXK de plantas con la mitocondria sea diferente. Al momento no hay estudios que revelen si la enzima se une a VDAC como lo hace la de rata (Pastorino y Hoek, 2008).

En nuestro grupo de trabajo hemos analizado la actividad de HXK en la fracción citosólica obtenida de embriones de maíz germinados en presencia y ausencia de carbohidratos. Encontrando que la HXK de embriones es más activa (3-7 veces) cuando los embriones son embebidos en Glucosa y Fructosa que cuando se embeben en Sorbitol o Sacarosa (Castañeda-Rico, 2008). Además, el perfil de isoenzimas de HXK en geles nativos no es el



mismo si el extracto es de tejido embrionario (Castañeda-Rico, 2008) o si se toman otros tejidos de la planta (Estrada-Antolín, 2011). Buscando si las isoenzimas de HXK se regulaban por carbohidratos, se embebieron tanto ejes embrionarios de maíz como embriones en 5 mM Glucosa, encontrando que en cada uno de los tejidos se inducía la actividad de una isoforma de HXK, pero esta isoforma no es la misma (Castañeda-Rico, 2008). Esto resulta interesante, pues muestra que las isoenzimas de HXKs citosólicas pueden regularse y más importante, indica que no presentan la misma actividad en presencia de carbohidratos y que es factible que haya otras formas de regular su actividad y cantidad en los tejidos.

Durante la germinación se producen diferencias en la concentración de carbohidratos en los diferentes tejidos, además de que ocurren cambios en los contenidos de fitohormonas, como el incremento en el contenido de GA<sub>3</sub>, la reducción del ABA, y la aparición de las auxinas y el etileno (Srivastava, 2002; Weitbrecht *et al.*, 2011), por lo que tanto el contenido de carbohidratos como el de fitohormonas podrían también favorecer el cambio en la actividad la HXK, la que podría estar jugando un papel muy importante en modular la expresión de genes que responden a carbohidratos y fitohormonas en este estadio del desarrollo.

En cuanto a la relación cruzada entre el papel de la HXK y las fitohormonas se tienen varias evidencias. La sobreexpresión de la AtHXK1 reduce la expresión de genes que responden a auxinas como *TIR1* (Transport Inhibitor Response1, receptor de auxinas), *PIN1* (PIN-Formed1, Transportador de auxinas), e *IAA5* (Indole-3 Acetic Acid inducible5), llevando a las plantas a perder la dominancia apical (Kelly *et al.*, 2012).

Mutantes insensibles a etileno (*etr* y *ein2*) tienen fenotipos similares a las mutantes hipersensibles a Glucosa y, de manera interesante, la mutante que presenta constitutivamente encendida la señalización por etileno (*crt1*) es alélica a *gin4*. La Glucosa desestabiliza al factor de transcripción EIN3 (Ethylene-insensitive3, regulador en la señalización por etileno) en un proceso post-traducciona que depende de la actividad señalizadora de AtHXK1 (Yanagisawa *et al.*, 2003).

En plantas de jitomate, se demostró que la AtHXK1 acelera la senescencia de las hojas posiblemente por la inducción de las invertasas. En el apoplasto, las invertasas inducidas por citocininas provocan un incremento en las concentraciones de hexosas, esto significa una señal de transición de tejido fuente de nutrimentos (tejido fotosintético) a tejido demandante (tejido heterotrófico como raíces, flores, frutos entre otros), lo que inhibe la senescencia. En cambio, en el interior de la célula, los aumentos en la concentración de hexosas, por acción de las invertasas, pueden ser interpretados como un signo de senescencia, señal que es percibida por la AtHXK1 (Swartzberg *et al.*, 2011).

En relación a ABA, plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan a la HXK1, acumularon clorofila y se redujo la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis como *CAB1* (proteína de unión a clorofila a/b), *PC* (plastocianina), *CAA* (anhidrasa carbónica), y *SBPase* (sedoheptulosa bifosfatasa). En contraste, en dichas sobreexpresantes se incrementaron los niveles de *RAB18* (gen de respuesta a ABA) y *ABI5* (factor de transcripción inducido por ABA), además se observó una disminución de la conductancia estomatal, de la velocidad de transpiración y un incremento en la temperatura de la hoja. Por lo que esta consecuencia fisiológica sugiere que la AtHXK1 puede tener un efecto global en el balance de agua en la planta (Kelly *et al.*, 2012).

Con el objetivo de encontrar si las isoformas de HXK de embriones maíz modificaban su actividad diferencialmente por las fitohormonas ABA y GA<sub>3</sub>, se analizó el perfil de isoenzimas de HXK en geles nativos tanto de las fracciones citosólicas como mitocondriales obtenidas de los embriones de maíz germinados con la adición exógena de fitohormonas.

## **HIPÓTESIS.**

Las isoenzimas de las HXKs de maíz cambian en número y actividad dependiendo del tejido y debido a la presencia diferencial de carbohidratos, ABA y GA<sub>3</sub> durante el proceso de germinación.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

Determinar e identificar a las isoenzimas de HXK citosólicas y mitocondriales que se regulan por ABA y GA<sub>3</sub> durante la germinación de embriones de maíz.

### **Objetivos particulares.**

1. Identificar el perfil de isoenzimas que se encuentran presentes en las fracciones citosólicas y mitocondriales durante la germinación de embriones de maíz.
2. Determinar si el perfil de isoenzimas a las 24 h de germinación se modifica con la adición de ABA, GA<sub>3</sub> y carbohidratos.
3. Identificación de las isoenzimas encontradas y comparación con las secuencias anotadas en la base de datos de UniProtKB.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Para responder a los objetivos de este trabajo se realizó la estrategia experimental que se detalla en la Figura 8.

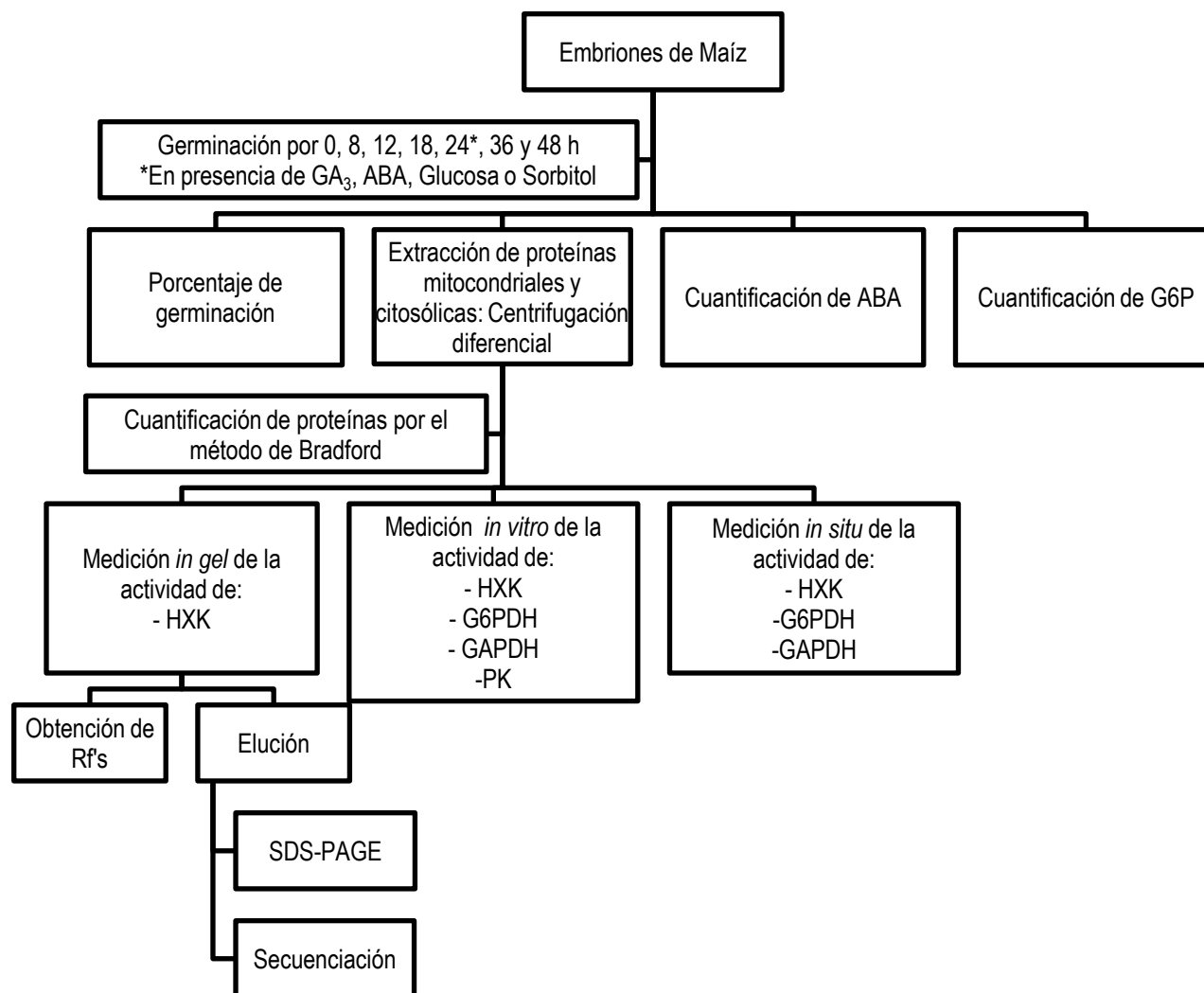


Figura 8. Esquema general del diseño experimental seguido en este trabajo.

El trabajo experimental incluyó la extracción de las HXKs de embriones aislados de maíz sometidos a diferentes tratamientos, entre los que estuvieron la incubación por 24 h con GA<sub>3</sub>, ABA, Glucosa o Sorbitol, y también se realizó el análisis a diferentes tiempos de la germinación de embriones aislados de maíz en agar al 1%. Las HXKs se obtuvieron por

centrifugación diferencial y se midieron tanto en la fracción citosólica como mitocondrial. Se determinó la actividad de HXK (*in vitro*), su localización en los embriones (*in situ*) y se identificaron las isoenzimas mediante la separación de los extractos en electroforesis de poliacrilamida en condiciones nativas y la posterior detección con un ensayo acoplado a la producción de la forma reducida del nitroazul de tetrazolio (NBT por sus siglas en inglés, Figura 9).

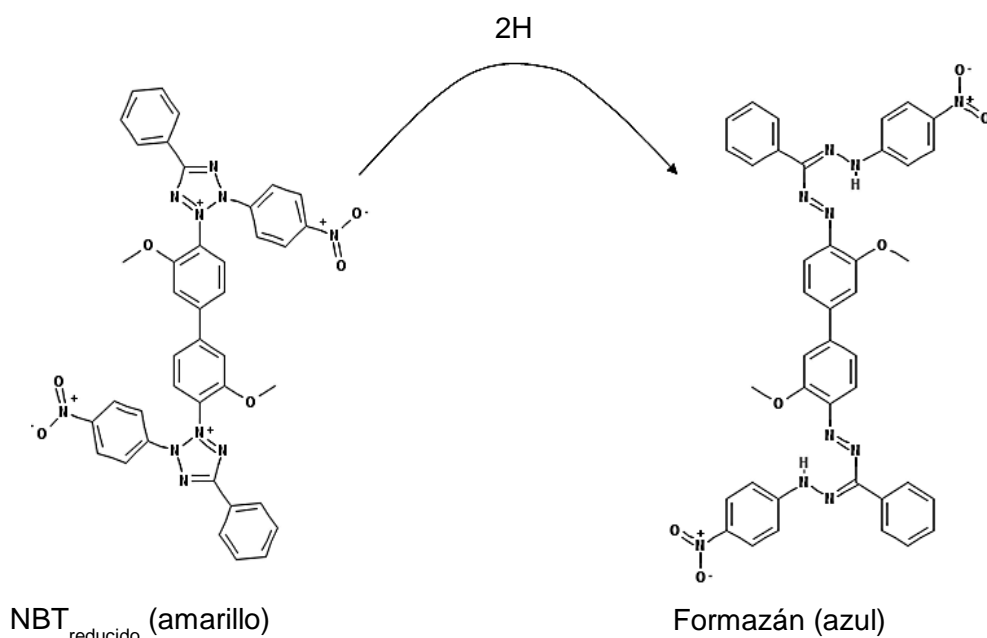


Figura 9. Reacción de reducción del NBT.

Además, para determinar el destino de la Glucosa-6-fosfato (G6P), el producto de la reacción catalizada por la HXK, se realizaron las determinaciones de algunas enzimas que usan a esta molécula como sustrato, usando como fuente de enzima el extracto citosólico. Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron utilizando ensayos enzimáticos acoplados a la producción de NAD(P)H y en el caso de las determinaciones *in situ*, se añadió NBT para detectar la actividad de la enzima como la aparición de un color azul en el tejido según se muestra en la Figura 10.

A continuación, se describen detalladamente el material biológico y las técnicas utilizadas.

**Material Biológico.***Obtención y Desinfección de embriones.*

Se obtuvieron embriones de maíz (*Zea mays*, var Chalqueño) mediante extracción manual con navaja. Se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% agitando vigorosamente durante 2 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua estéril hasta que el olor a cloro ya no fue percibido.

*Germinación.*

Se embebieron 2 g de embriones de maíz en cajas Petri estériles conteniendo agar al 1%. Antes de que el agar solidificara, se adicionó ( $\pm$ ) – ABA (SIGMA A1049) para una concentración final de 2.5, 5, 15, 25 y 50  $\mu$ M, GA<sub>3</sub> (SIGMA G7645) para obtener una concentración de 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M, Sorbitol o Glucosa para llegar a concentraciones de 50 y 380 mM. Los embriones se incubaron durante 24 h a 29°C; en el caso del tratamiento con GA<sub>3</sub>, se incubaron primero durante 1 h en presencia de la fitohormona y posteriormente se transfirieron a cajas Petri con agar al 1% para continuar con la germinación.

*Porcentaje de germinación.*

Al concluir el tiempo de germinación se determinó el porcentaje de germinación, considerando como embrión germinado aquel que presentaba al menos 2 mm de radícula emergida. Posterior a estas determinaciones, los tejidos se congelaron a -80°C.

**Cuantificación de ABA endógeno.***Extracción de ABA.*

Se tomó 1 g de embriones de maíz se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se pulverizó con la ayuda de un mortero y pistilo. El polvo se suspendió en 15 mL de CH<sub>3</sub>OH al 80%. Se dejó toda la noche en la solución a 4°C, para posteriormente centrifugar a 4 000 rpm (2 000 x g) durante 20 min (Centrífuga Universal 320 R, marca Hettich Zentrifugen), el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y seco. El procedimiento se repitió con el botón obtenido, los extractos alcohólicos se juntaron y se secaron al vacío. El residuo seco se disolvió en 1 mL de buffer (Tris/HCl 45 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 90  $\mu$ M, NaCl 135 mM y CH<sub>3</sub>OH al 10%) y se centrifugó a 10 000 rpm en tubos (9 500 x g) de microfuga por 10 min (Oliver *et al.*, 2007). El sobrenadante se pasó por

un filtro estéril de 0.45  $\mu\text{m}$  y la concentración de ABA se determinó por medio de una prueba de ELISA del kit Phytodetek™ ABA (AGDIA PDK 09347/0096).

*Fundamento de la cuantificación de ABA mediante el Kit Phytodetek™ ABA.*

La detección y cuantificación de ABA se realiza mediante anticuerpos monoclonales anti-ABA, los cuales se encuentran unidos a los pozos de una microplaca de ELISA. Se añaden las muestras a los pozos y también una solución que contiene el complejo ABA-fosfatasa alcalina (para rastrear la unión). Los anticuerpos unirán tanto al ABA de las muestras como al complejo ABA-fosfatasa alcalina, así entre más ABA libre haya en las muestras menos ABA-fosfatasa alcalina se une a la placa con los anticuerpos. Posterior al lavado se realiza la reacción de detección de la actividad de fosfatasa alcalina, usando al *p*-nitrofenol como sustrato. Por lo que entre mayor sea la intensidad del color amarillo (más ABA-fosfatasa alcalina unido al anticuerpo en el pozo) menor es la cantidad de ABA en la muestra.

*Preparación del estándar.*

Se siguió el protocolo del proveedor del kit. Brevemente, se preparó un estándar de ABA a una concentración de 5.286 mg/mL en  $\text{CH}_3\text{OH}$  absoluto. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de esta solución y se añadieron a 9.9 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$  para obtener una solución de 0.1 micromoles ABA /mL. A partir de este estándar se hicieron diluciones para producir concentraciones de 1000, 100, 20, 4, 0.8, 0.16 y 0.032 picomoles ABA /mL.

*Detección de ABA.*

Brevemente, a cada pozo de la placa de ELISA se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del estándar o de la muestra y 100  $\mu\text{L}$  de trazas del complejo ABA-fosfatasa alcalina, se mezcló suavemente y se incubó a 4°C durante 3 h. Transcurrido este tiempo, se vació el contenido de la placa y se realizaron 3 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de solución de lavado. Se removieron los restos de la solución y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de sustrato (*p*-nitrofenol). Se incubó a 37°C durante 90 min y la reacción se detuvo con 50  $\mu\text{L}$  de solución terminadora (NaOH 1 M). La actividad de fosfatasa alcalina se determinó mediante la hidrólisis del *p*-nitrofenol y su detección espectrofotométrica a 405 nm.

*Cálculos.*

Se calculó el Logaritmo natural (Ln) de cada una de las concentraciones (C) utilizadas para la curva estándar y se graficó  $Abs_{405nm}$  vs Ln C. Se obtuvo la ecuación de la recta y la concentración de ABA presente en las muestras se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[ABA] = \left[ e^{\left( \frac{Abs_{405nm} - b}{m} \right)} \right] * \left[ \frac{Vol_{Extracto}}{Peso_{Tejido}} \right]$$

Ecuación 2. Concentración de ABA endógeno en embriones de maíz (picomoles ABA/g<sub>Tejido fresco</sub>).

Dónde:

**[ABA]**= Concentración en picomoles ABA/g<sub>Tejido</sub>.

**Abs<sub>405nm</sub>**= Absorbencia de la muestra a 405 nm.

**b**= Ordenada al origen (adimensional), obtenida de la ecuación de la recta de la curva estándar.

**m**= Pendiente (unidades de Absorbencia a 405 nm), obtenida de la ecuación de la recta de la curva estándar.

**Vol<sub>Extracto</sub>**= Volumen de resuspensión del extracto obtenido (en mL), en este caso fue de 1 mL.

**Peso<sub>Tejido</sub>**= Peso de tejido utilizado (en g) para la extracción de la fitohormona, en este caso fue de 1 g.

**Cuantificación de G6P.***Extracción.*

Se pesaron 0.2 g del tejido germinado y congelado a -80°C, y se molieron con N<sub>2</sub> líquido hasta su pulverización. El polvo obtenido se transfirió a un tubo de microfuga de 2 mL y se le adicionó 1 mL de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O al 80%. Se mezcló perfectamente con ayuda de un agitador rotatorio y posteriormente se colocó en un bloque de calentamiento a 80°C durante 5 min, la mezcla obtenida se centrifugó a 2 500 rpm (800 x g) por 10 min, el sobrenadante se separó y se colocó en tubo de ensaye. Éste tubo se calentó a 70°C en un bloque de calentamiento para evaporar el C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O. La pastilla obtenida se resuspendió en 200 µL de H<sub>2</sub>O destilada y se almacenó a -20°C.



*Cuantificación.*

Se colocaron 5  $\mu\text{L}$  del extracto de G6P o bien, de  $\text{H}_2\text{O}$  (blanco), con 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción [Hepes/KOH 50 mM, pH 7.8, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 1U,  $\text{NADP}^+$  1,5 mM] en un pozo de una placa de ELISA. La placa se agitó y se realizó la lectura de las muestras a 340 nm. Para el cálculo de concentración de G6P se utilizó la siguiente ecuación:

$$[\text{G6P}] = \frac{(\text{Abs}_{\text{Muestra}} - \text{Abs}_{\text{Blanco}}) * (\text{Vol}_{\text{Ensayo}}) * (\text{PM G6P}) * (\text{Vol}_{\text{Suspensión}})}{\epsilon * (\text{Vol}_{\text{Muestra}}) * (b) * (\text{Peso}_{\text{Tejido}})}$$

Ecuación 3. Concentración de G6P en embriones de maíz ( $\text{mg/g}_{\text{Tejido}}$ ).

Dónde:

**[G6P]**= Concentración de G6P en  $\text{mg/g}_{\text{Tejido}}$ .

**Abs<sub>Muestra</sub>**= Absorbencia de la muestra (adimensional) a 340 nm.

**Abs<sub>Blanco</sub>**= Absorbencia del blanco (adimensional) a 340 nm.

**Vol<sub>Ensayo</sub>**= Volumen total del ensayo de cuantificación (en  $\mu\text{L}$ ), en este caso 205  $\mu\text{L}$ .

**PM G6P**= Peso molecular de la G6P correspondiente a 260.14  $\text{mg/mmol}$ .

**Vol<sub>Suspensión</sub>**= Volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  en el que se resuspendió el extracto de G6P (en  $\mu\text{L}$ ), en este caso 200  $\mu\text{L}$ .

**$\epsilon$** = Coeficiente de extinción molar del NADPH  $6.22 \times 10^3 \text{ mL/mmol/cm}$ .

**b**= Distancia del paso de luz de la celda (cm), en este caso 1 cm.

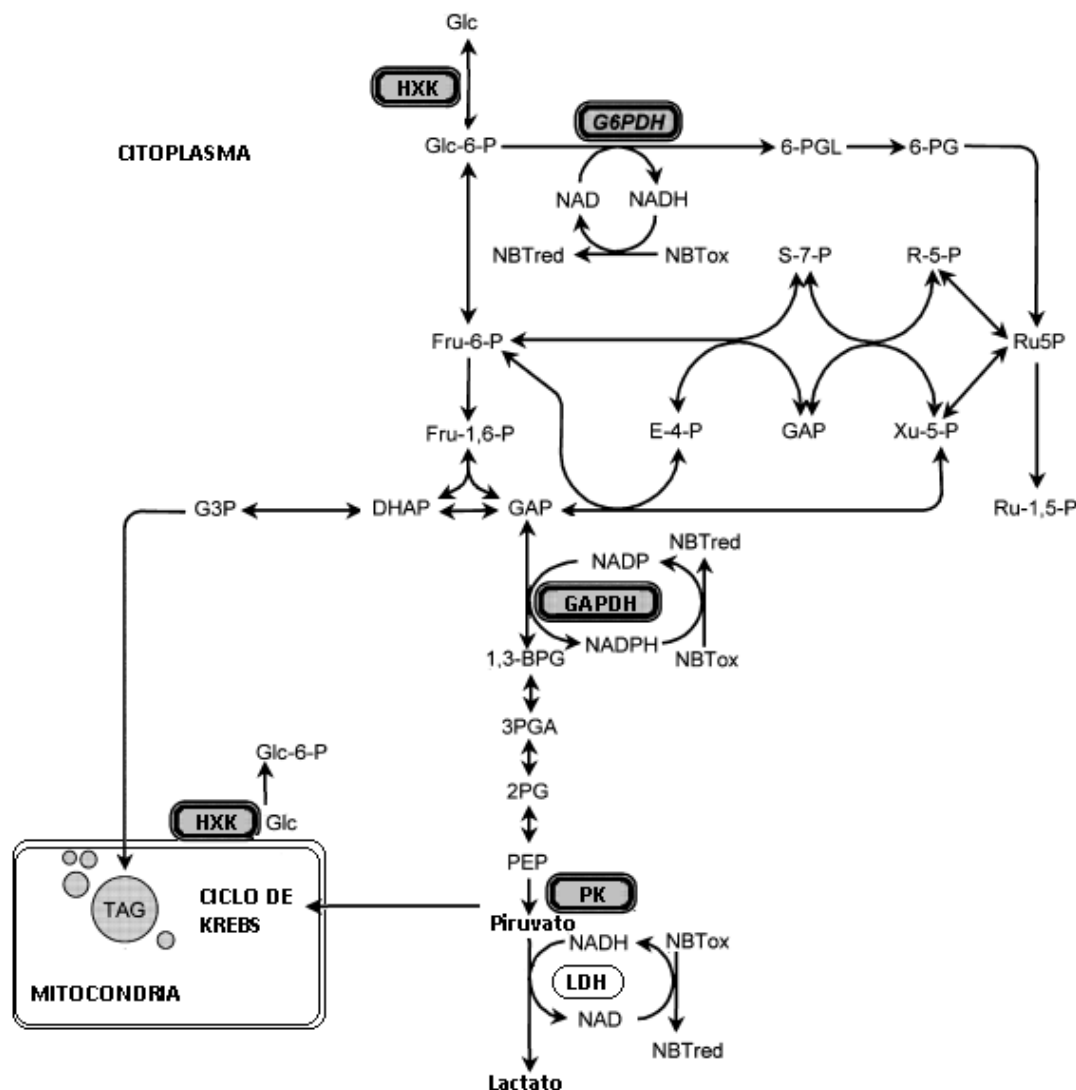
**Peso<sub>Tejido</sub>**= Peso de tejido utilizado (en g) para la extracción G6P, en este caso fue de 0.200 g.

**Ensayo Histoquímico Enzimático.***Fijación de tejido embrionario.*

Para la determinación de las actividades *in situ*, se fijaron los embriones según la metodología descrita por Baud y Graham (2006). Cada uno de los embriones de maíz se colocó en un tubo de microfuga conteniendo 1 mL de solución fijadora (paraformaldehído al 2%, PVP 40 al 2% y DTT 1 mM) y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 h. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 12 000 rpm ( $13\,600 \times g$ ), durante 5 min. El sobrenadante se descartó y los embriones se lavaron 5 veces con 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Finalmente, el tejido se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 h.

### Ensayo histoquímico enzimático.

Las actividades enzimáticas se determinaron a través de ensayos enzimáticos acoplados a la producción de NAD(P)H y la posterior reducción del NBT. En la Figura 10, se muestran las vías metabólicas de la planta modelo *A. thaliana*, en donde se encuentran actuando las enzimas que se determinaron en el presente trabajo.



**Figura 10. Vías metabólicas de *A. thaliana* involucradas en el uso de la G6P y enzimas que se determinaron en esta tesis.**

La síntesis de G6P debida a la HXK se midió al acoplar esta reacción a la actividad de la G6PDH de *S. cerevisiae* y la producción de NADPH, el cual redujo al NBT. La actividad de la G6PDH de del tejido embrionario se determinó al medir la reducción del NAD<sup>+</sup> y la posterior reducción del NBT. La GAPDH se midió usando como sustratos Gliceraldehído-3-fosfato, fosfato y NADP<sup>+</sup> y la posterior reducción del NBT. Tomado y modificado de Baud y Graham (2006).

Los embriones ya fijados se añadieron a 1 tubo de microfuga que contenía 1 mL de mezcla de reacción y se incubó de 30 a 60 min a 30°C dependiendo de la actividad enzimática que se buscaba revelar. El medio de reacción fue distinto dependiendo de la actividad enzimática por determinar según se detalla a continuación.

#### HXK.

Hepes/KOH 50 mM, pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 1 mM, KCl 15 mM, ATP/BTP 1 mM pH 7.0; Glucosa 2 mM, Fructosa 30 mM, fosfoglucosa isomerasa (PGI por sus siglas en inglés) 1U, G6PDH 1U, NADP<sup>+</sup> 1 mM y NBT 0.25 mM. La reacción se monitoreó cada 5 min durante 30 min.

#### GAPDH.

Hepes/KOH 100 mM, pH 7.8, G3P 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, PMS 0.4 mM, NADP<sup>+</sup> 0.5 mM y NBT 0.4 mM (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2011). La reacción se monitoreó cada 15 min durante 60 min.

#### G6PDH.

Hepes/KOH 100 mM, pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, G6P 1 mM, PMS 0.4 mM, NAD<sup>+</sup> 0.5 mM y NBT 0.4 mM. La reacción se monitoreó cada 15 min durante 60 min.

### **Obtención de fracciones citosólicas y mitocondriales de embriones de maíz.**

#### *Extracción.*

El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se molió en un mortero hasta la obtención de un polvo fino. Posteriormente, se homogenizó con amortiguador de homogeneización (Hepes/KOH 50 mM, pH 7.8, Sacarosa 0.3 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, DTT 2 mM) y se filtró a través de 4 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 3 000 rpm (1 150 x g) durante 5 min. El botón se descartó, mientras que el sobrenadante se centrifugó a 12 000 rpm (13 600 x g) durante 10 min. El botón se resuspendió en 1 mL de amortiguador de homogeneización suplementado con glicerol hasta una concentración final de 10%, esta es la que denominamos **fracción mitocondrial**. El sobrenadante se centrifugó a 45 000 rpm (100 000 x g) durante 45 min (Ultracentrífuga TL-100, marca Beckman), el botón obtenido se desechó y al

sobrenadante o **fracción citosólica** se le agregó glicerol hasta una concentración del 10% y se almacenó a -80°C hasta su uso.

*Determinación de proteínas por el método de Bradford.*

Se realizó una curva estándar con albúmina de suero bovino (0, 3, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 µg de proteína) y para las muestras se tomaron 2, 5 y 10 µL de extracto crudo. Se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford (BIORAD) y se leyeron las absorbencias a 595 nm. Se graficó la absorbencia en función de la cantidad de proteína y se realizó una regresión lineal, para obtener la concentración de las muestras.

**Determinación de la actividad de G6PDH en la fracción citosólica.**

*Fundamento.*

El ensayo de actividad de la G6PDH se basa en la reducción del NAD<sup>+</sup> por acción de esta enzima, registrándose la formación de NADH mediante la medición de la absorbencia a 340 nm, de acuerdo a la siguiente reacción:



Ecuación 4. Reacción catalizada por la G6PDH.

Se siguió el procedimiento reportado por Baud y Graham (2006). Para realizar la determinación se mezclaron las soluciones que se indican en la Tabla 4. El medio de reacción se preparó de manera individual en celdas para espectrofotómetro de 1 cm de longitud para un volumen final del 1 mL. La G6P y el NAD<sup>+</sup> se adicionaron después de añadir 120 µg de proteína de la fracción citosólica. La reacción se condujo a temperatura ambiente y se registró la absorbencia a 340 nm, cada min durante 5 min. Cada determinación se realizó por triplicado en dos preparaciones independientes.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes para preparar el medio de reacción para determinar la actividad de la G6PDH.

Reactivo	Volumen agregado por celda (µL)	[Final]
Tris/HCl 2 M, pH 8.8	25	50 mM
MgCl <sub>2</sub> 246 mM	203.2	50 mM

* NAD <sup>+</sup> 8 mM	125	1 mM
** G6P 1 M	30	30 mM
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 1000	---

\*Reactivo que se prepara al momento de utilizarse y se agrega justo antes de realizar la lectura.

\*\* Se agregó justo antes de realizar la lectura.

c.b.p.: Cuanto baste para.

Se realizó una curva de absorbencia contra tiempo y de ella se obtuvo la pendiente que se usó para la determinación de la actividad según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad (nmol/min/mg)} = \left[ \frac{(m)(\text{Vol}_{\text{Ensayo}})}{(\epsilon)(b)(\text{Cant}_{\text{Proteína}})} \right] [1 \times 10^6]$$

Ecuación 5. Actividad de G6PDH en embriones de maíz (nmol/min/mg).

Dónde:

**m**= Pendiente obtenida de la curva temporal de cada muestra (unidades de Abs<sub>340 nm</sub>/min).

**Vol<sub>Ensayo</sub>**= Volumen total del ensayo de actividad (en mL), en este caso 1 mL.

**ε**= Coeficiente de extinción molar del NADH 6.22x10<sup>3</sup> mL/mmol/cm.

**b**= Distancia del paso de luz en la celda (cm), en este caso 1 cm.

**Cant<sub>Proteína</sub>**= Cantidad de proteína total (en mg) utilizada para la determinación de la actividad, en este caso 0.120 mg.

Se multiplicó por 1x10<sup>6</sup> para obtener unidades de nmol/min/mg.

### Determinación de la actividad de GAPDH.

*Fundamento.*

El ensayo de actividad de la GAPDH se basa en la reducción del NADP<sup>+</sup> por acción de esta enzima, registrándose la formación de NADPH mediante la medición de la absorbencia a 340 nm, de acuerdo a la siguiente reacción:



Ecuación 6. Reacción catalizada por la GAPDH.

Se utilizó el protocolo reportado por Muñoz-Bertomeu (2011). Para realizar la determinación se mezclaron las soluciones que se indican en la Tabla 5. El medio de reacción se preparó de manera individual en celdas de 1 cm de longitud para un volumen final de 1 mL. Después de la adición de 120 µg de proteína de la fracción citosólica se adicionaron el G3P y el NADP<sup>+</sup>. Se registró la absorbencia a 340 nm, cada min durante 5 min a temperatura ambiente. Cada determinación se realizó por triplicado en dos preparaciones independientes.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes para preparar el medio de reacción para determinar la actividad de GAPDH.

Reactivo	Volumen agregado por celda (µL)	[Final]
Hepes/KOH 500 mM, pH 7.8	100	50 mM
MgCl <sub>2</sub> 246 mM	20	5 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM	40	2 mM
DTT 1 M	1	1 mM
* NADP <sup>+</sup> 8 mM	250	2 mM
**G3P 275.8 mM	7.25	2 mM
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 1000	---

\*Reactivo que se prepara al momento de utilizarse y se agrega justo antes de realizar la lectura.

\*\* Se agregó justo antes de realizar la lectura.

c.b.p.: Cuanto baste para.

Se realizó una curva de absorbencia contra tiempo y de ella se obtuvo la pendiente que se usó para la determinación de la actividad de acuerdo a la ecuación 7. La actividad se expresó en unidades de nmol/min/mg.

$$\text{Actividad (nmol/min/mg.)} = \left[ \frac{(m)(\text{Vol}_{\text{Ensayo}})}{(\epsilon)(b)(\text{Cant}_{\text{Proteína}})} \right] [1 \times 10^6]$$

Ecuación 7. Actividad de GAPDH en embriones de maíz (nmol/min/mg).

Dónde:

**m**= Pendiente obtenida de la curva temporal de cada muestra (unidades de Abs<sub>340 nm</sub>/min).

**Vol<sub>Ensayo</sub>**= Volumen total del ensayo de actividad (en mL), en este caso 1 mL.

**ε**= Coeficiente de extinción molar del NADPH 6.22x10<sup>3</sup> mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> mL.

**b**= Distancia del paso de luz en la celda (cm), en este caso 1 cm.

**Cant<sub>Proteína</sub>**= Cantidad de proteína total (en mg) utilizada para la determinación de la actividad, en este caso 0.120 mg.

Se multiplicó por  $1 \times 10^6$  para obtener unidades de nmol/min/mg.

### Determinación de la actividad de la PK.

#### Fundamento.

El ensayo de actividad de la PK es un ensayo acoplado que se basa en la oxidación del NADH de acuerdo a las siguientes reacciones:



**Ecuación 8. Reacciones catalizadas por A) la PK y B) la Lactato deshidrogenasa (LDH).**

El piruvato generado de la reacción catalizada por la PK, sirve como sustrato para la LDH.

Se siguió el procedimiento reportado por Baud (2007). La mezcla se preparó de manera individual en celdas de 1 cm de longitud para un volumen final del 1 mL, adicionando las soluciones que se indican en la Tabla 6. Después de añadir los 120 µg de proteína de la fracción citosólica, se inició la reacción con la adición del NADH. Una vez adicionado el NADH se registró la absorbencia a 340 nm, cada min durante 5 min a temperatura ambiente. Cada determinación se realizó por triplicado en dos preparaciones independientes.

**Tabla 6. Reactivos y volúmenes para preparar el medio de reacción para determinar la actividad de la PK.**

Reactivo	Volumen agregado por celda (µL)	[Final]
Tris/HCl 500 mM, pH 6.8	200	100 mM
MgCl <sub>2</sub> 246 mM	40.65	10 mM
KCl 500 mM	100	50 mM
DTT 1 M	19.53	1 mM
PEP 102.4 mM	1	2 mM
ADP 300 mM	8.3	2.5 mM
LDH 1000 U/mL	10	10 U

* NADH 4 mM	75	0.3 mM
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 1000	---

\*Reactivo que se prepara al momento de utilizarse y se agrega justo antes de realizar la lectura.

c.b.p.: Cuanto baste para.

Se realizó una curva de absorbencia contra tiempo y de ella se obtuvo el valor absoluto de la pendiente que se usó para calcular la actividad de la enzima de acuerdo a la ecuación 9 y se expresó en nmol/min/mg.

$$\text{Actividad (nmol/min/mg)} = \left[ \frac{(m)(\text{Vol}_{\text{Ensayo}})}{(\epsilon)(b)(\text{Cant}_{\text{Proteína}})} \right] [1 \times 10^6]$$

Ecuación 9. Actividad de PK en embriones de maíz (nmol/min/mg).

Dónde:

**m**= Pendiente obtenida de la curva temporal de cada muestra (unidades de Abs<sub>340 nm</sub>/min).

**Vol<sub>Ensayo</sub>**= Volumen total del ensayo de actividad (en mL), en este caso 1 mL.

**ε**= Coeficiente de extinción molar del NADH 6.22x10<sup>3</sup> mL/mmol/cm.

**b**= Distancia del paso de luz en la celda (cm), en este caso 1 cm.

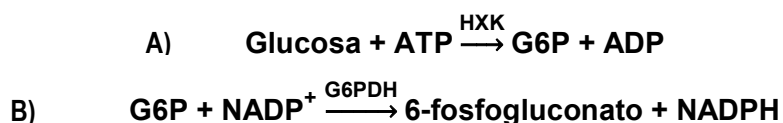
**Cant<sub>Proteína</sub>**= Cantidad de proteína total (en mg) utilizada para la determinación de la actividad, en este caso 0.120 mg.

Se multiplicó por 1x10<sup>6</sup> para obtener unidades de nmol/min/mg.

### Determinación de la actividad de HXK.

*Fundamento.*

El ensayo de fosforilación por acción de la HXK es un ensayo acoplado en donde se registra la formación de NADPH según la siguiente reacción:



Ecuación 10. Reacciones catalizadas por la A) HXK y B) la G6PDH.

La G6P generada de la reacción catalizada por la HXK, sirve como sustrato para la G6PDH.



En el caso de medir la actividad en presencia de Fructosa, se adicionó al ensayo la enzima PGI, que cataliza la reacción de conversión de Fructosa-6-fosfato (F6P) a G6P.

#### *Actividad de HXK.*

Se siguió el procedimiento reportado por Dai (1999). Para realizar la determinación se mezclaron las soluciones que se indican en la Tabla 4; a dicha mezcla la llamamos reactivo de ensayo de Glucosa (REG), ya que el primer sustrato que vería la enzima sería la hexosa. La mezcla se preparó a escala de acuerdo a la cantidad necesaria para poder realizar tanto las determinaciones requeridas como sus repeticiones. Cada determinación se realizó por triplicado en tres preparaciones independientes. El orden en que se añadieron los reactivos en la placa de ELISA para medir la actividad de HXK y fue el siguiente:

Agua → Sustrato (Glucosa o Fructosa) → Proteína → Mezcla de reacción (cuando se usó Fructosa se adicionó PGI) → NADP<sup>+</sup>

**Tabla 7. Reactivo de ensayo de Glucosa.**

Cantidades indicadas para medir la actividad en un pozo de placa de ELISA (volumen final de 250  $\mu$ L).

Reactivo	Volumen agregado por pozo ( $\mu$ L)	[Final]
Hepes/KOH 500 mM, pH 7.8	25	50 mM
MgCl <sub>2</sub> 246 mM	2	2 mM
EDTA 500 mM	0.5	1 mM
KCl 500 mM	7.5	15 mM
ATP 300 mM	1.67	1 mM
PEP 102.4 mM	4.88	2 mM
Glucosa 50 mM	10	3 mM
G6PDH 3500 U/mg	2.85	2 U
PEPK 11.712 U/mL	0.60	7 U
**PGI 434 U/mL	2	3.5 U
* NADP <sup>+</sup> 8 mM	25	0.8 mM
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 250	---

\*Reactivo que se prepara al momento de utilizarse y se agrega justo antes de realizar la lectura.

\*\* Se añadió solo cuando la determinación de actividad se hizo con Fructosa.

c.b.p.: Cuanto baste para.

La cantidad de proteína añadida fue de 40 µg independientemente de si se usó la fracción citosólica o mitocondrial. Sin embargo, cuando se midió la actividad de HXK en la fracción mitocondrial se utilizó adicionalmente ácido aminocaproico (inhibidor de proteasas) a una concentración final de 0.2 M y n-Dodecil-β-D-maltósido (detergente no iónico) a una concentración final de 4%.

Una vez adicionado el REG, la placa se montó sobre el lector de ELISA y se registró la absorbencia a 340 nm, cada min durante 10 min. La reacción se condujo a temperatura ambiente. Se realizó una curva de absorbencia contra tiempo y de ella se obtuvo la pendiente, para determinar la actividad de la enzima se usó la ecuación 11 y se expresó en nmol/min/mg.

$$\text{Actividad (nmol/min/mg)} = \left[ \frac{(m)(\text{Vol}_{\text{Ensayo}})}{(\epsilon)(b)(\text{Cant}_{\text{Proteína}})} \right] [1 \times 10^6]$$

Ecuación 11. Actividad de HXK en embriones de maíz (nmol/min/mg).

Dónde:

**m**= Pendiente obtenida de la curva temporal de cada muestra (unidades de Abs<sub>340 nm</sub>/min).

**Vol<sub>Ensayo</sub>**= Volumen total del ensayo de actividad (en mL), en este caso 0.250 mL.

**ε**= Coeficiente de extinción molar del NADPH 6.22x10<sup>3</sup> mL/mmol/cm.

**b**= Distancia del paso de luz en la celda (cm), en este caso 1 cm.

**Cant<sub>Proteína</sub>**= Cantidad de proteína total (en mg) utilizada para la determinación de la actividad, en este caso 0.04 mg.

Se multiplicó por 1x10<sup>6</sup> para obtener unidades de nmol/min/mg.

### **Determinación de actividad de HXK en gel de poliacrilamida nativo.**

*Control de cargado del gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).*

Para corroborar que la cantidad de proteína cargada en los geles nativos era igual para todas las muestras, se realizó primero un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Tabla 8).

Tabla 8. Reactivos para la preparación del gel de poliacrilamida en condiciones nativas.

Solución Stock	Gel Separador (12%)	Gel Concentrador (4%)
Acrilamida/ Bisacrilamida 30:0.8 (p/p)	4 mL	0.66 mL
Tris/HCl 2 M pH 8.8	2 mL	0,60 mL
SDS 20%	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3.89 mL	3.67 mL
*Persulfato de amonio 10%	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L
*TEMED	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

\*Reactivos que se añaden justo antes de usarse.

### *Preparación de las muestras.*

Se utilizaron 60  $\mu$ g de proteína para las muestras citosólicas (volúmenes entre 6.0 y 8.0  $\mu$ L) las cuales se mezclaron con 5  $\mu$ L de **amortiguador de carga para SDS-PAGE** (Tris/HCl 0.175 M, pH 6.8; SDS al 5%, DTT 0.16 M; Glicerol al 7.5% y Azul de Bromofenol al 0.4%). Para las muestras mitocondriales se usaron 25  $\mu$ g de proteína (volúmenes entre 3.0 y 5.0  $\mu$ L) con 5  $\mu$ L de amortiguador de carga, se mezclaron y se cargaron en el gel.

### *Corrimiento electroforético gel de SDS-PAGE.*

El gel se corrió a 15 mA, hasta que las muestras llegaron al gel separador y después se cambió el amperaje a 25 mA. El corrimiento se realizó a temperatura ambiente, durante 45 min aproximadamente. Al final el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (Azul del Coomassie R-250 al 0.125%; CH<sub>3</sub>OH al 50% y CH<sub>3</sub>COOH al 10%).

### *Preparación y corrimiento de geles nativos.*

Se preparó un gel de poliacrilamida con la composición que se indica en la Tabla 9. Las muestras de proteína se prepararon de la siguiente manera; para las muestras citosólicas se utilizaron 60  $\mu$ g de proteína (volúmenes entre 6.0 y 8.0  $\mu$ L) los cuales se mezclaron con 5  $\mu$ L de **amortiguador de carga para geles nativos** (Tris/HCl 0.156 M, pH 6.8; Glicerol al 50% y Azul de Bromofenol al 0.5%). Para las muestras mitocondriales se usaron 25  $\mu$ g de proteína (volúmenes entre 3.0 y 5.0  $\mu$ L) y además se agregaron ácido aminocaproico (a una concentración final de 0.2 M) y n-Dodecil- $\beta$ -D-maltósido (a una concentración final de 7%), a

esta mezcla se le adicionaron con 5  $\mu$ L de amortiguador de carga, se mezclaron, evitando la formación de burbujas y se cargaron en el gel.

Cabe señalar que cada una de las muestras se corrió por cuadruplicado ya que se determinó la actividad de la enzima en gel en presencia de Glucosa 2 mM, Fructosa 2 mM, Glucosa 2mM + Fructosa 30 mM y Fructosa 150 mM para determinar si la banda de actividad prefería uno u otro sustrato.

Tabla 9. Reactivos para la preparación de un gel de poliacrilamida nativo.

Solución Stock	Gel Separador (12%)	Gel Concentrador (4%)
Acrilamida/ Bisacrilamida 30:0.8 (p/p)	2 mL	0.265 mL
Tris/HCl 2 M, pH 8.8	1.25 mL	0.5 mL
Glicerol	1 mL	0.2 mL
H <sub>2</sub> O	0.75 mL	1.035 mL
*Persulfato de amonio 10%	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L
*TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

\*Reactivos que se añaden justo antes de usarse.

#### *Corrimiento electroforético de geles nativos.*

El gel se corrió a 150 V a temperatura ambiente durante 15 min, después de esto, se cambió el voltaje a 100 V y se corrió a 4°C durante 20 h.

#### *Actividad de HXK en gel.*

Una vez que terminó la corrida, se colocó el gel en un recipiente con la mezcla amortiguadora de reacción que no lleva sustratos (Tabla 10) y se agitó por 20 min.

Tabla 10. Mezcla amortiguadora de reacción.

Reactivo	Volumen	[Final]
Hepes/ KOH 500 mM, pH 7.8	1.2 mL	50 mM
MgCl <sub>2</sub> 246 mM	976 $\mu$ L	2 mM
EDTA 500 mM	24 $\mu$ L	1 mM
KCl 500 mM	360 $\mu$ L	15 mM

ATP 300 mM	40 $\mu$ L	2 mM
H <sub>2</sub> O*	10.366	---

\*Para la preparación de la mezcla amortiguadora de reacción con sustrato, los volúmenes de los reactivos añadidos fueron la mitad de los indicados en esta tabla. El volumen de H<sub>2</sub>O cambió según el sustrato que se adicionó.

Después, se desechó la solución y se agregaron 6 mL nuevamente de la mezcla amortiguadora de reacción pero esta vez suplementada con el sustrato según se indica en la Tabla 11. Después de la adición del sustrato al gel este se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Sin desechar la mezcla, se agregaron 2 mL de REG (SIGMA G3293) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Para desarrollar el color, se agregó sobre la mezcla anterior 0.25 mg de NBT por cada mL de reactivo y se incubó durante 1 h a 37°C sin agitación.

**Tabla 11. Concentración y tipos de sustratos añadidos a la mezcla de reacción.**

Para determinar la presencia de GK se añadió Glucosa, Fructosa para determinar la actividad de FK y una mezcla de Glucosa y Fructosa para actividad de HXK. Los volúmenes de cada carbohidrato están indicados para un volumen final de mezcla de reacción con sustrato de 6 mL.

Sustrato	Stock	Volumen ( $\mu$ L)	[Final]
Glucosa	1 M	12	2 mM
Fructosa	1 M	12	2 mM
		900	150 mM
Glucosa +	1 M	12	2 mM
Fructosa	1 M	180	30 mM

### Cálculo de R<sub>f</sub>.

El valor de R<sub>f</sub> de las bandas reveladas con el ensayo de HXK, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Migración de la banda (cm)}}{\text{Longitud del gel (cm)}}$$

Ecuación 12. Obtención de R<sub>f</sub> de las isoformas de HXK reveladas en los geles de actividad.

### Elución, concentración e identificación.

#### *Elución y concentración.*

Para obtener las bandas del gel de poliacrilamida se realizó el procedimiento descrito por Burgess y Deutscher (2009). A partir de los patrones de isoformas obtenidos en los geles

nativos, se localizaron las bandas de interés, se cortaron con ayuda de un bisturí estéril y se colocaron en tubos de microfuga de 600  $\mu$ L estériles (éstos tubos contaban con 3 orificios en la base hechos con una aguja estéril). Posteriormente, se colocaron sobre un tubo estéril de 2 mL y se centrifugaron a 13 000 rpm (16 000  $\times g$ ) durante 2 min (proceso de extrusión). Al material extruído se le agregó buffer de elución (Tris/ HCl 50 mM, pH 7.9; EDTA 0.1 mM; DTT 1 mM, NaCl 0.15 mM y SDS 0.1%), en cantidad suficiente para que se cubriera. Se incubó en un agitador rotatorio (modelo 400110, marca Barnstead Thermolyne) durante 24 h a 4°C. La mezcla obtenida se centrifugó a 13 000 rpm (16 000  $\times g$ ) durante 2 min. El botón se descartó (gel) y el sobrenadante (proteína eluída) se transfirió a un tubo estéril de 2 mL. Para concentrar la proteína eluída, se agregaron 4 volúmenes de  $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$  a -20°C. Se incubó durante 2 h a -70°C y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm (16 000  $\times g$ ) durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en buffer de carga para SDS-PAGE. Posteriormente, se realizó un SDS-PAGE y las muestras se enviaron a identificar mediante la técnica de espectrometría de masas al centro de proteómica del Centro Médico de la Universidad de Texas en Galveston (UTMB por sus siglas en inglés); y al departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández.

#### *Identificación.*

Las proteínas aisladas del SDS-PAGE fueron identificadas por espectrometría de masas en tándem usando el equipo 3200 QTRAP (Applied Biosystems, USA) equipado con una fuente de ionización por nanoelectrospray (NanoSpray II) y con un MicroIonSpray II. Los perfiles obtenidos se compararon con los perfiles de fragmentación de otros péptidos reportados previamente (MS/MS). Mediante el uso del programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido) se realizó la búsqueda (restringida a plantas verdes) en la base de datos no redundante de NCBI.

## RESULTADOS.

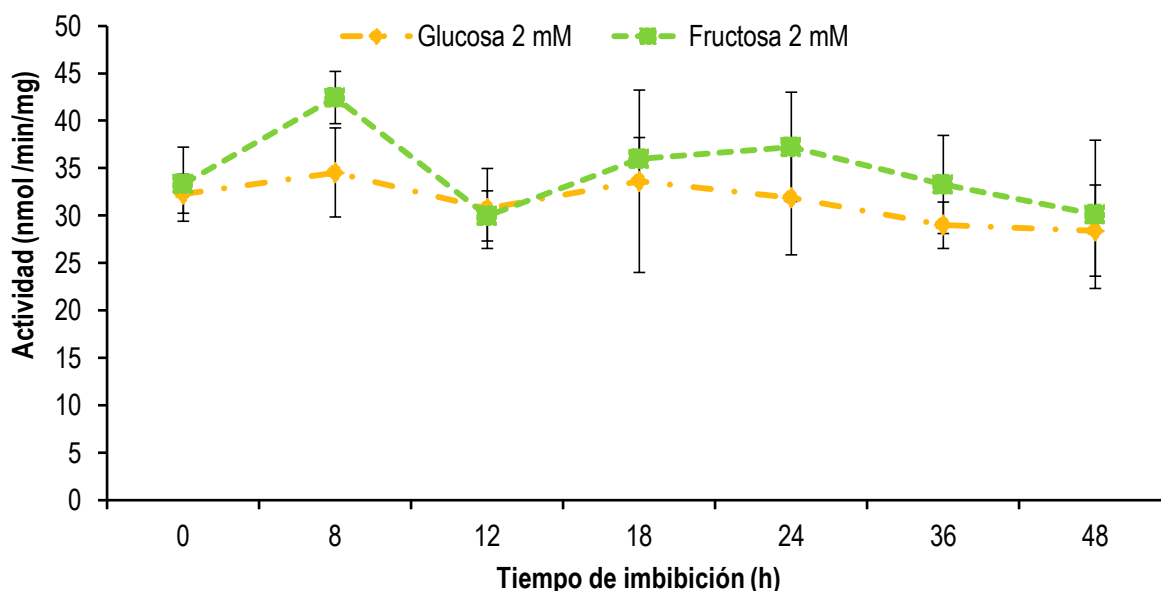
### **Una isoforma de HXK de la fracción citosólica aumenta y es mayoritaria durante la germinación.**

Durante el proceso de germinación de las semillas, ocurre una serie de eventos que involucra la restructuración de las membranas, el aumento en el metabolismo, la movilización de reservas, cambios en los niveles de fitohormonas, entre otros, para llevar a la salida de la radícula, expresión última de la germinación (Srivastava, 2002; Bentsink y Koornneef, 2008).

El paso del estado seco al hidratado aumenta la actividad metabólica para la reparación y síntesis de los componentes celulares que llevarán a la semilla a convertirse en plántula (Smiri *et al.*, 2009). Varias moléculas son utilizadas por la semilla como fuente de carbono y energía, y provienen tanto de los tejidos embrionarios como extraembrionarios. En el inicio de la etapa germinativa los aminoácidos están disponibles como fuente de energía (Waterworth *et al.*, 2000; Stacey *et al.*, 2006), mientras que en los tiempos más tardíos o postgerminativos, la movilización de reservas provenientes del endospermo aportará Glucosa, la cual funcionará como fuente de C (Nonogaki, 2006; Sanchez-Linares *et al.*, 2012).

Para determinar cuál era el perfil de isoenzimas de HXK durante el proceso germinativo se obtuvieron tanto las fracciones mitocondriales como las citosólicas de embriones de maíz (mediante centrifugación diferencial) embebidos durante diferentes tiempos.

La actividad total de HXK se midió en presencia de Glucosa o Fructosa, con la finalidad de identificar la preferencia de la enzima por alguno de los dos sustratos. En cuanto a la fracción mitocondrial, se encontró que desde el tiempo cero hubo actividad de HXK con cualquiera de las dos hexosas probadas, sin embargo la actividad no cambió al transcurrir la germinación (Figura 11).



**Figura 11. Perfil temporal de la actividad de HXK de las fracciones mitocondriales de embriones de maíz.**

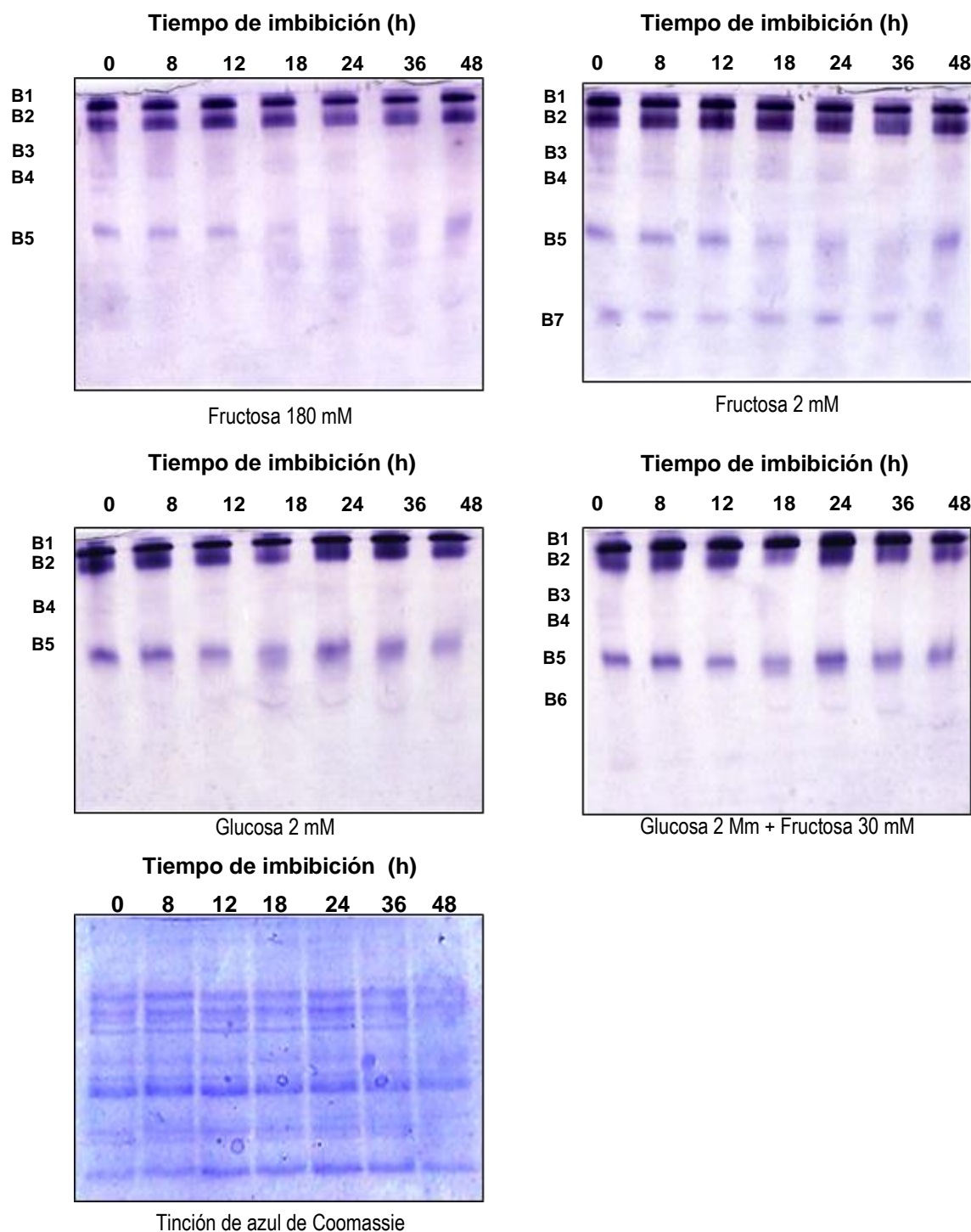
Actividad determinada *in vitro* con 40  $\mu$ g de proteína en un medio que contuvo Glucosa 2 mM o Fructosa 2 mM. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes (n=3) con tres repeticiones cada uno.

Al analizar el perfil de actividad de HXK de las fracciones mitocondriales en geles nativos, se observaron 6 bandas (Figura 12). Las bandas que menos avanzaron en el gel (B1 y B2) fueron las que tuvieron la mayor intensidad y no cambiaron conforme transcurrió la germinación. Estas bandas se detectaron independientemente del sustrato añadido al gel. Las bandas B3 y B4 fueron las más tenues y aparecieron cuando el gel se incubó con Fructosa, por lo que podrían ser FKs. Estas bandas no estaban muy definidas y su actividad fue mayor a tiempos cortos de germinación. La banda B5 se detectó en todas las concentraciones y combinaciones de sustrato utilizadas, con una actividad intermedia. Cuando se reveló la actividad usando Fructosa como sustrato, la banda B5 disminuyó gradualmente conforme avanzó la germinación, aunque a las 48 h volvió a presentar una actividad alta. Con un Rf mayor se observó la banda B6 muy tenue, delgada y apareció a partir de las 18 h de germinación. Por último, la banda B7 sólo se detectó cuando se midió la actividad en presencia de Fructosa 2 mM (actividad de FK) y no presentó cambios en la actividad a lo largo de la germinación.

Aunque en la actividad de HXK de la fracción mitocondrial no se observaron cambios durante la germinación de maíz, sí se observó una variación en el número de isoformas presentes (Figura 12). Lo anterior se debe probablemente a que las isoformas que migraron poco en el



gel contribuyeron a la mayor actividad de HXK y su nivel fue similar durante los tiempos explorados.

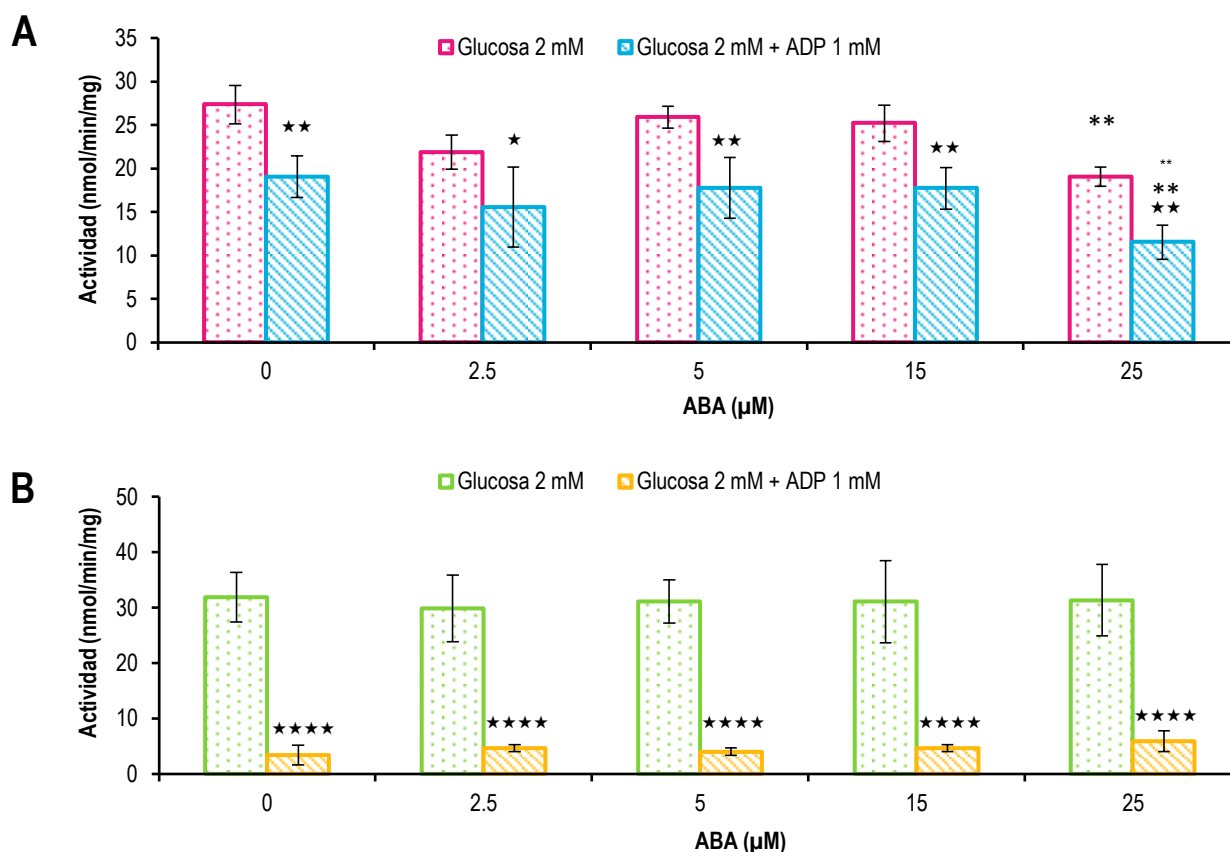


**Figura 12. Perfil de la actividad de HXK de la fracción mitocondrial durante el proceso de germinación.**

Actividad de HXK determinada en gel de poliacrilamida nativo al 12% usando los sustratos que se indican. Para el control de cargado se corrió un gel de poliacrilamida con SDS al 12% teñido con azul de Coomassie; se utilizaron 25  $\mu$ g de proteína por cada muestra. B1, B2, B3, B4, B5 y B6 se refieren al número de bandas o isoformas de HXK detectadas.

Las bandas tenues (B4 y B6) podrían ser HXKs no mitocondriales que quedaron contaminando la fracción mitocondrial; aunque el experimento fue repetido varias veces y siempre se presentaron las bandas de Rf menor a tiempos cortos de germinación. Para evaluar si en la fracción citosólica había contaminación de la HXK mitocondrial, se realizó el experimento de determinación de la actividad de HXK en presencia de ADP, inhibidor no competitivo de la actividad de la HXK mitocondrial ( $K_i = 34 \mu\text{M}$ ; Galina *et al.*, 1995). A una concentración de ADP de 1 mM, se ha observado que la actividad de la HXK mitocondrial es abatida casi por completo, mientras que para la HXK de la fracción citosólica, esta concentración de ADP no tiene efecto inhibitorio sobre la actividad (Galina *et al.*, 1995).

Lo que se detectó en nuestro experimento de inhibición, fue que en promedio el 85 % de la actividad de la HXK de la fracción mitocondrial se redujo, lo cual indicó que la mayor parte de la enzima probablemente provenía de la mitocondria. Mientras que, la fracción citosólica contenía una proporción de contaminación mitocondrial cercana al 30% (Figura 13).

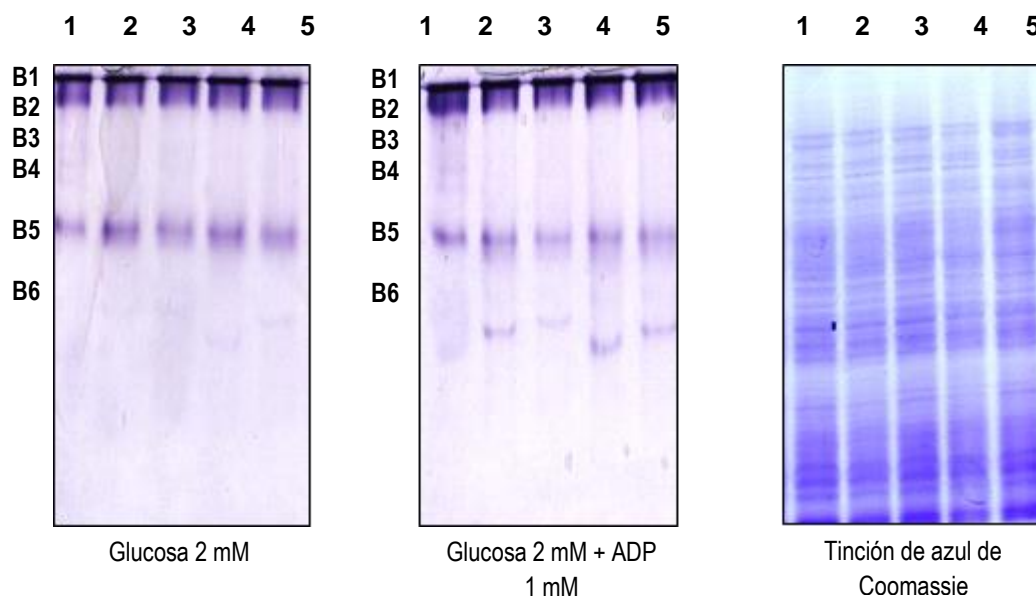


**Figura 13. Efecto del ADP en la actividad de HXK de las fracciones citosólica y mitocondrial.**

Se obtuvieron por centrifugación diferencial las fracciones **A)** citosólica y **B)** mitocondrial de embriones embebidos 24 h en agar y presencia de ABA a 29°C. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de

NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno. \*\* Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.01$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1% (ABA 0  $\mu$ M). \* Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ) con respecto a la actividad determinada en ausencia de ADP.

Además, se detectó la actividad de HXK en el gel en presencia de ADP y se observó que la actividad disminuía, sin embargo al prolongar el tiempo de exposición con el NBT se revelaron las mismas bandas de actividad (B1-B6, Figura 14); tenuemente las bandas B3 y B4, contrario a la banda B6 que se ve más definida y que probablemente se produzca de la disociación de la enzima, y por su persistencia sí sería una proteína mitocondrial.



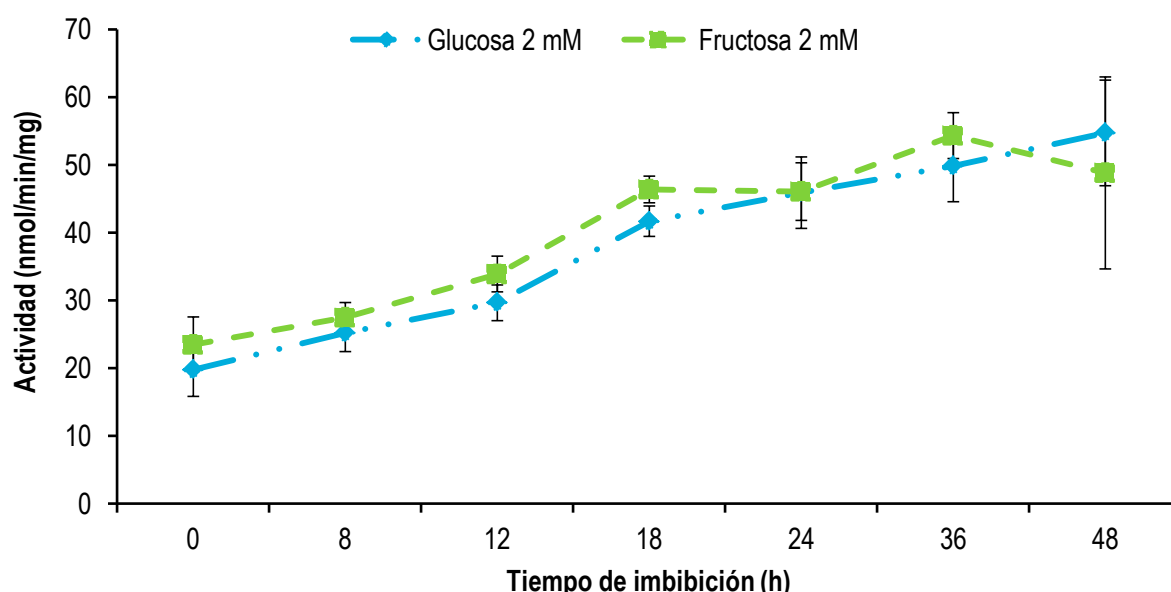
**Figura 14. Efecto del ADP en el perfil de actividad de HXK de la fracción mitocondrial de embriones de maíz.**

Se cargaron en el gel diferentes fracciones mitocondriales provenientes de 1. Embriones secos, y de embriones embebidos 24 h en: 2. Agar al 1%, 3. ABA 50  $\mu$ M, 4. Glucosa 50 mM y 5. Sorbitol 50 mM. La actividad de HXK se midió en presencia de los sustratos indicados. Para control de cargado se corrió un gel de poliácridamida con SDS al 12% teñido con azul de Coomassie; se utilizaron 25  $\mu$ g de proteína por cada muestra.

Las HXKs mitocondriales de mamífero pueden formar homo- y heteroligómeros, estos últimos con VDAC y ANT (Pastorino y Hoek, 2008). Los rearrreglos multiméricos se han asociado a un aumento en la eficiencia del uso del ATP y a un aumento en la velocidad del flujo glucolítico (Frommer *et al.*, 2003). Es probable que las bandas tenues en actividad de HXK sean producto de un rearrreglo diferente de las HXKs, ya que desaparecen conforme la germinación avanza. En el estado de baja hidratación (tiempos cortos de la germinación) y desorganización de los componentes membranales podrían encontrarse más monómeros de la HXK unidos a mitocondria y en su transición hacia el estado hidratado y de alta organización y actividad metabólica a tiempos germinativos, se promovería la

oligomerización de la HXK en la mitocondria. Por lo anterior, sería importante determinar si existen los oligómeros y cuántos son en el embrión de maíz, ya que estos podrían contribuir al funcionamiento óptimo de la actividad glucolítica.

En cuanto a las fracciones citosólicas se encontró que la actividad total se incrementó conforme transcurrió el tiempo de imbibición de los embriones, teniéndose el pico máximo de actividad a las 48 h (Figura 15). El perfil de actividad durante la germinación fue similar independientemente del sustrato utilizado.

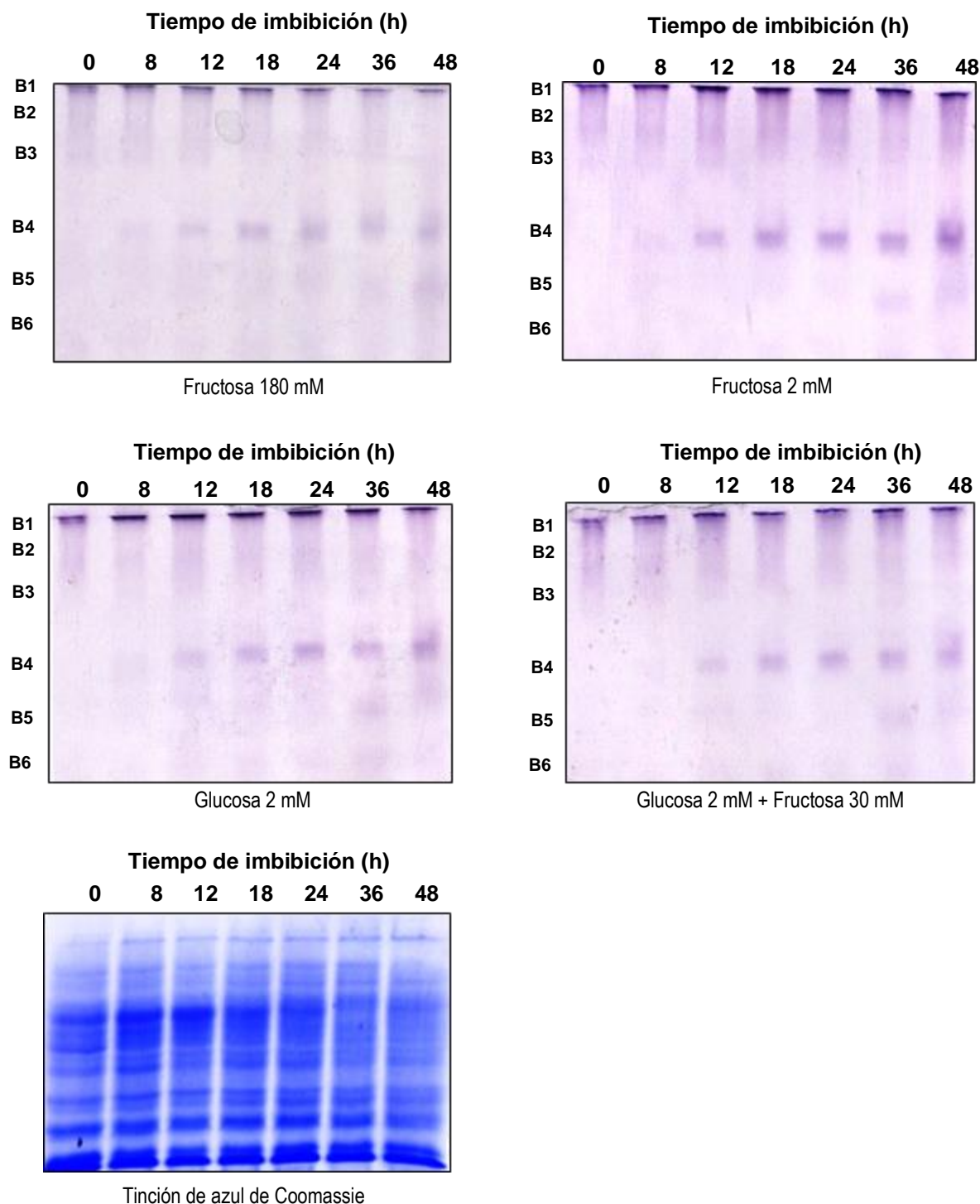


**Figura 15. Actividad de HXK citosólica durante la germinación de embriones de maíz.**

La actividad de HXK se determinó en presencia de Glucosa 2 mM o Fructosa 2 mM. El producto de la reacción se detectó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno.

El perfil de la actividad de HXK de la fracción citosólica en geles nativos fue diferente conforme transcurrió la germinación. Hubo un aumento en el número de bandas, sobre todo a Rfs más bajos y particularmente se incrementó la intensidad de una banda (Banda B4, Figura 17). Se encontraron 6 bandas de actividad en los geles, que fueron denominadas B1 a B6. La banda B1 muy cercana al inicio del gel presentó una actividad alta y similar en todos los tiempos de germinación. Las bandas B2 y B3 fueron tenues y poco definidas y se encontraron a todos los tiempos de imbibición medidos. Las bandas B5 y B6 comenzaron a aparecer a partir de las 24 h y su actividad fue baja. La banda B4 no se detectó en los embriones secos (0 h de imbibición) y fue aumentando su intensidad conforme transcurrió el

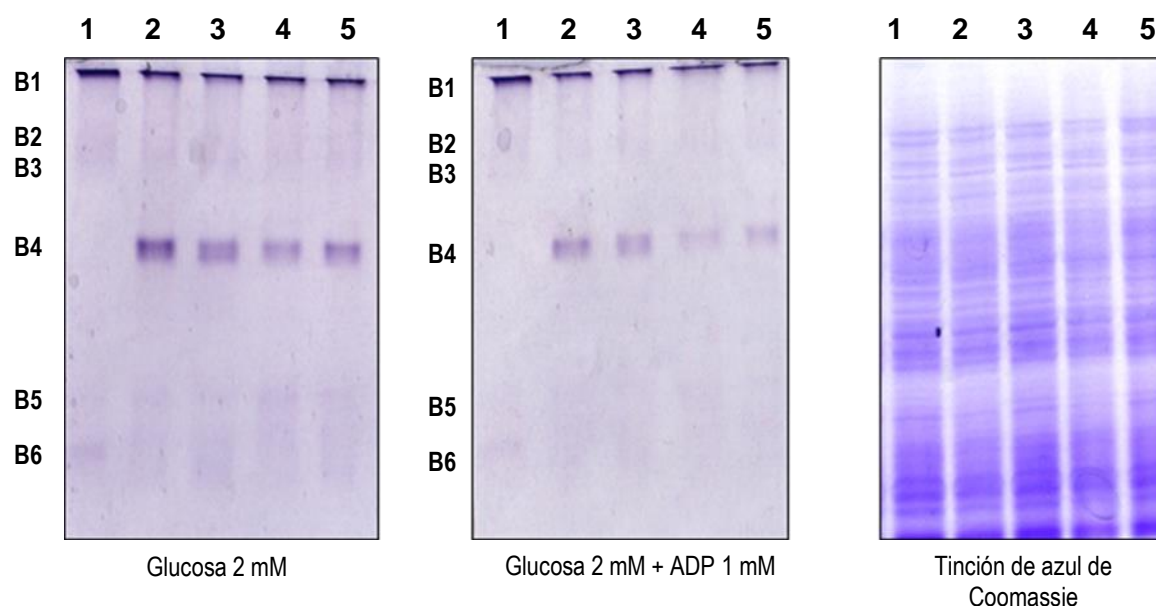
tiempo de imbibición. La banda B4 fue la isoforma que presentó el comportamiento más interesante, pues su tendencia fue similar a la actividad determinada *in vitro* (Figura 15).



**Figura 16. Perfil de la actividad de HXK de la fracción citosólica durante el proceso de germinación.**

Actividad de HXK determinada en gel de poliacrilamida nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el control de cargado se corrió un gel de poliacrilamida con SDS al 12% teñido con azul de Coomassie; se utilizaron 60  $\mu$ g de proteína por cada muestra. B1, B2, B3, B4, B5 y B6 se refieren al número de bandas o isoformas de HXK detectadas.

Como se mencionó anteriormente la fracción citosólica está contaminada con actividad de HXK de la fracción mitocondrial o sensible a ADP. Por lo anterior, se analizó el perfil de actividad de diferentes fracciones citosólicas en presencia de ADP (Figura 17). Observándose que la banda B4, aún presentó actividad en presencia de ADP, lo que indica que esta actividad no fue de una HXK de la fracción mitocondrial. Contrario a las bandas B5 y B6 que disminuyeron en presencia de ADP.



**Figura 17. Efecto del ADP en el perfil de actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones de maíz.**

Se cargaron en el gel diferentes fracciones citosólicas provenientes de 1. Embrión seco, y de embriones embebido 24 h en: 2. AgaMr 1%, 3. ABA 50  $\mu$ M, 4. Glucosa 50 mM y 5. Sorbitol 50 mM. La actividad de HXK se midió en presencia de los sustratos indicados. Para el control de cargado se corrió un gel de poliacrilamida con SDS al 12% teñido con azul de Coomassie; se utilizaron 60  $\mu$ g de proteína por cada muestra.

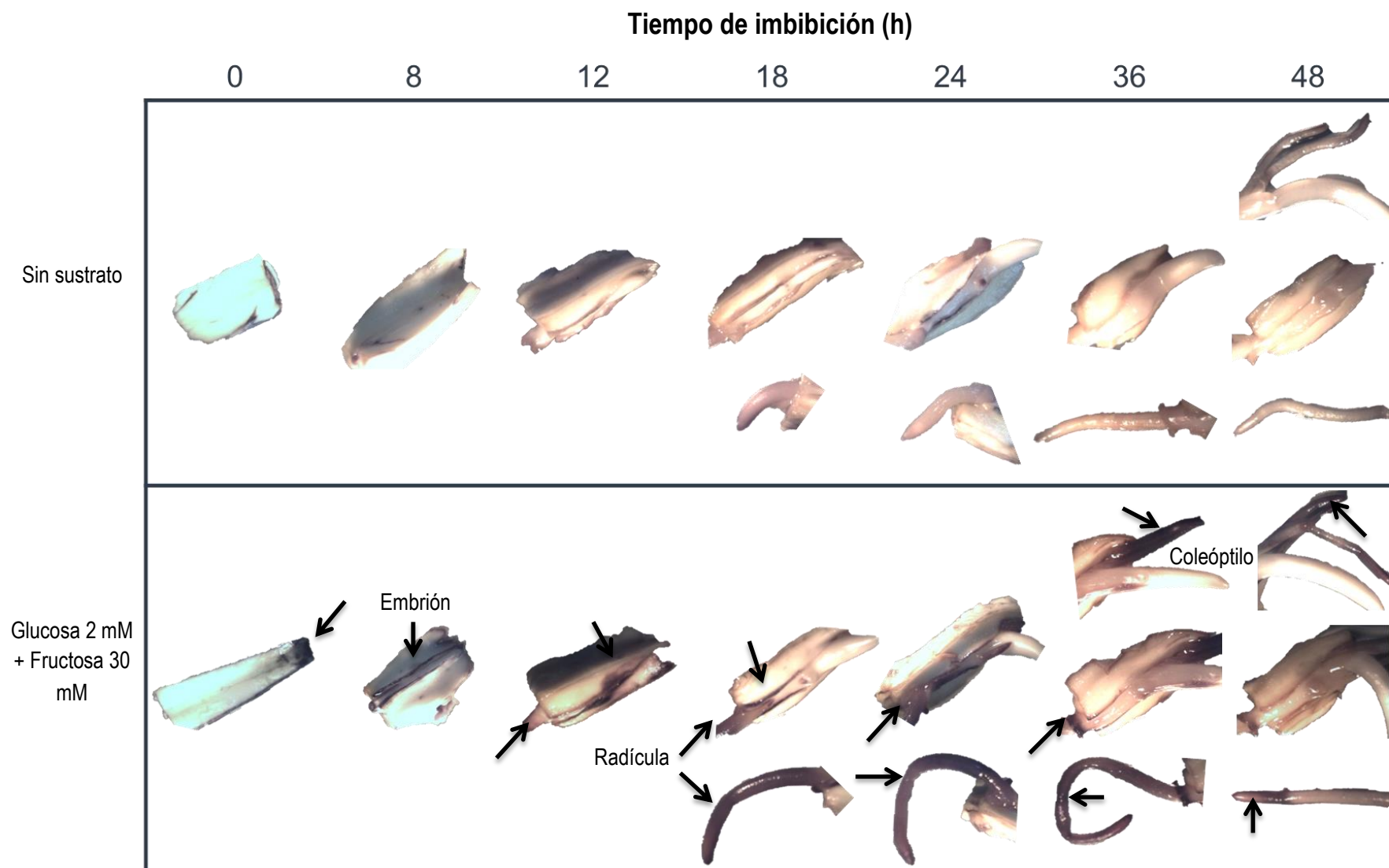
Durante el proceso de germinación de las semillas, la movilización de reservas como Sacarosa, Glucosa, Fructosa, péptidos, lípidos (Smiri *et al.*, 2009; Weitbrecht *et al.*, 2011; Sanchez-Linares *et al.*, 2012) probablemente conduce a un incremento de la actividad de HXK de la fracción citosólica, enzima que tiene que responder para suministrar de hexosas fosforiladas a diferentes vías metabólicas que se activan durante la germinación proveyendo así de esqueletos carbonados y energía a la célula (Srivastava, 2002; Claeysen y Rivoal, 2007). Si bien, falta por conocer si lo anterior es solo un efecto principal del paso del estado seco al hidratado el que lleva a la activación de la enzima, o la síntesis de la proteína o una mezcla de ambos procesos.

Con el objetivo de conocer en que tejido se encontraba localizada la actividad de HXK, se realizó la detección *in situ* de la actividad durante la germinación de embriones de maíz

(Figura 18). Se detectó que a tiempos tempranos (8 y 12 h), la mayor actividad se encontró alrededor del eje embrionario, y a tiempos posteriores la actividad se intensificó y se localizó principalmente en la radícula.

Es posible, que el aumento en la actividad de HXK en las fracciones citosólicas después de las 18 h de imbibición, se deba a la síntesis de una HXK de localización radicular. Por lo anterior, se propone que en un trabajo posterior se realicen extracciones de la HXK de la radícula de los embriones y se analice su corrimiento en geles de poliacrilamida nativos, para determinar si la B4 se encuentra en este tejido y si es la isoforma de HXK mayoritaria. Lo anterior facilitaría su purificación y la obtención de sus propiedades cinéticas, de inhibición y a tener una cantidad adecuada para enviar a identificar y con esta información determinar mediante ensayos de PCR si los transcritos para esta proteína en particular están aumentando.





**Figura 18. Detección *in situ* de la actividad de HXK durante el proceso de germinación.**

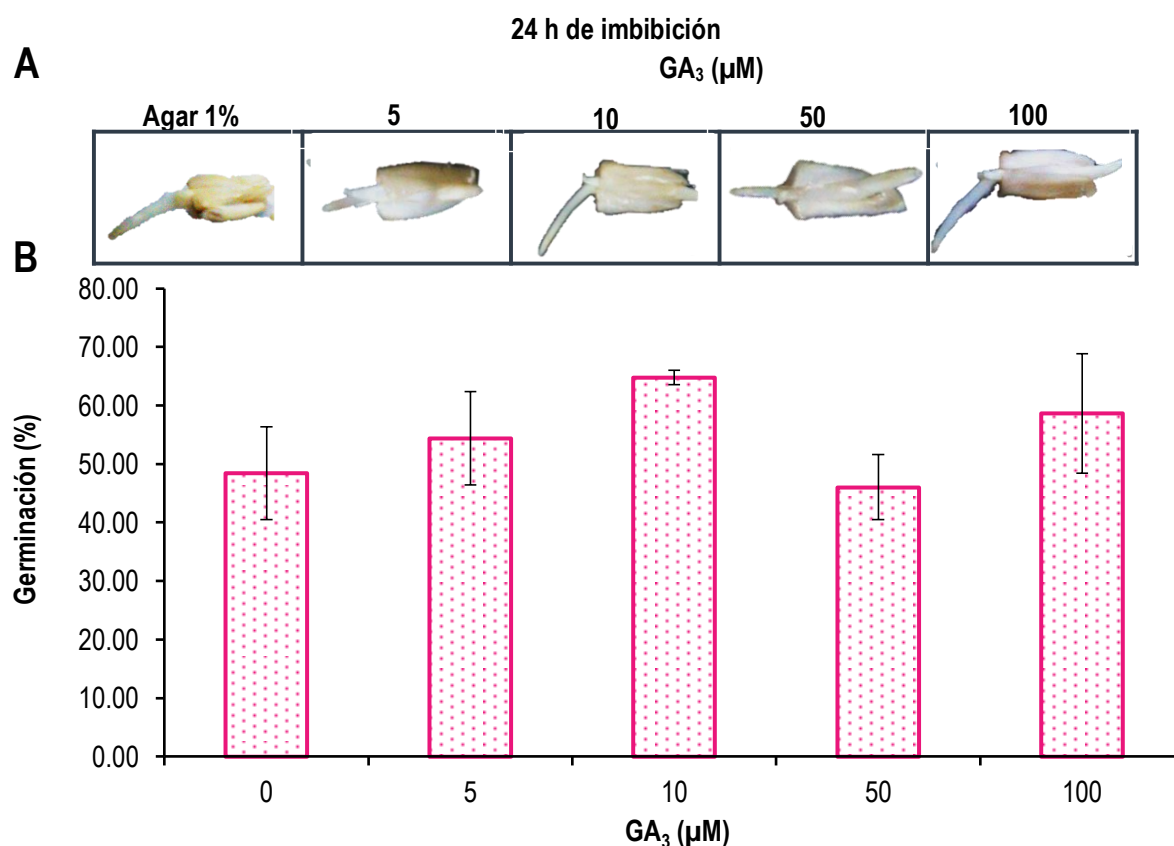
Los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de sustrato. La actividad se determinó mediante un ensayo acoplado a la reducción del NBT, las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de HXK (Flechas). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio estereoscópico por lo que desde las 18 h el embrión ya no cabía completo en el campo y entonces se tomaron imágenes parciales de tres zonas, el coleóptilo, el escutelo y la radícula. La zona de mayor actividad se localizó en la radícula.



### El ABA disminuye la actividad de la isoforma de HXK que incrementa más su actividad durante la germinación.

Debido a que se encontró que la actividad de HXK de la fracción citosólica cambiaba respecto al tiempo de la germinación de los embriones, se evaluó si las fitohormonas que principalmente controlan el proceso germinativo, ABA y GA<sub>3</sub> modificaban esta actividad. La actividad de HXK de la fracción citosólica es mayor a tiempos en los que ya emergió la radícula, por lo que se midió el efecto de la incubación de los embriones con diferentes concentraciones de ABA y GA<sub>3</sub> en las fracciones citosólicas y también las mitocondriales a las 24 h de imbibición.

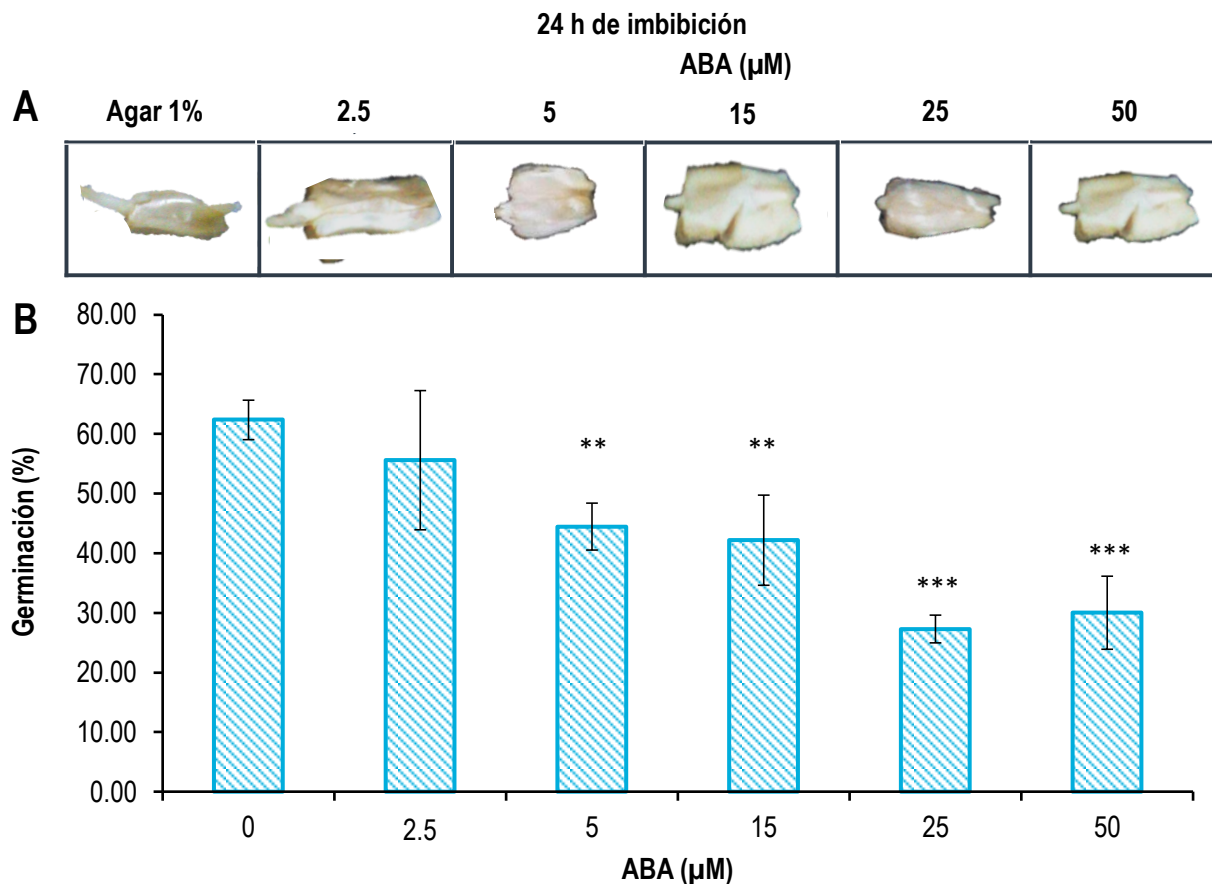
La germinación en presencia de GA<sub>3</sub> no aumentó a pesar de que se incubó el tejido desde concentraciones de 5 hasta 100  $\mu$ M de GA<sub>3</sub> (Figura 19B). Sin embargo, sí se observó un aumento en la elongación radicular (Figura 19A). Opuesto al efecto de ABA, que redujo el porcentaje de germinación de los embriones a partir de la concentración de 5  $\mu$ M (Figura 20), tal como se esperaba.



**Figura 19. Efecto de GA<sub>3</sub> sobre el porcentaje de germinación.**

Embriones embebidos durante 24 h en concentraciones crecientes de GA<sub>3</sub> **A)** Fotografías de embriones embebidos en presencia de GA<sub>3</sub> y **B)** Porcentaje de germinación de embriones embebidos en presencia de GA<sub>3</sub>. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$

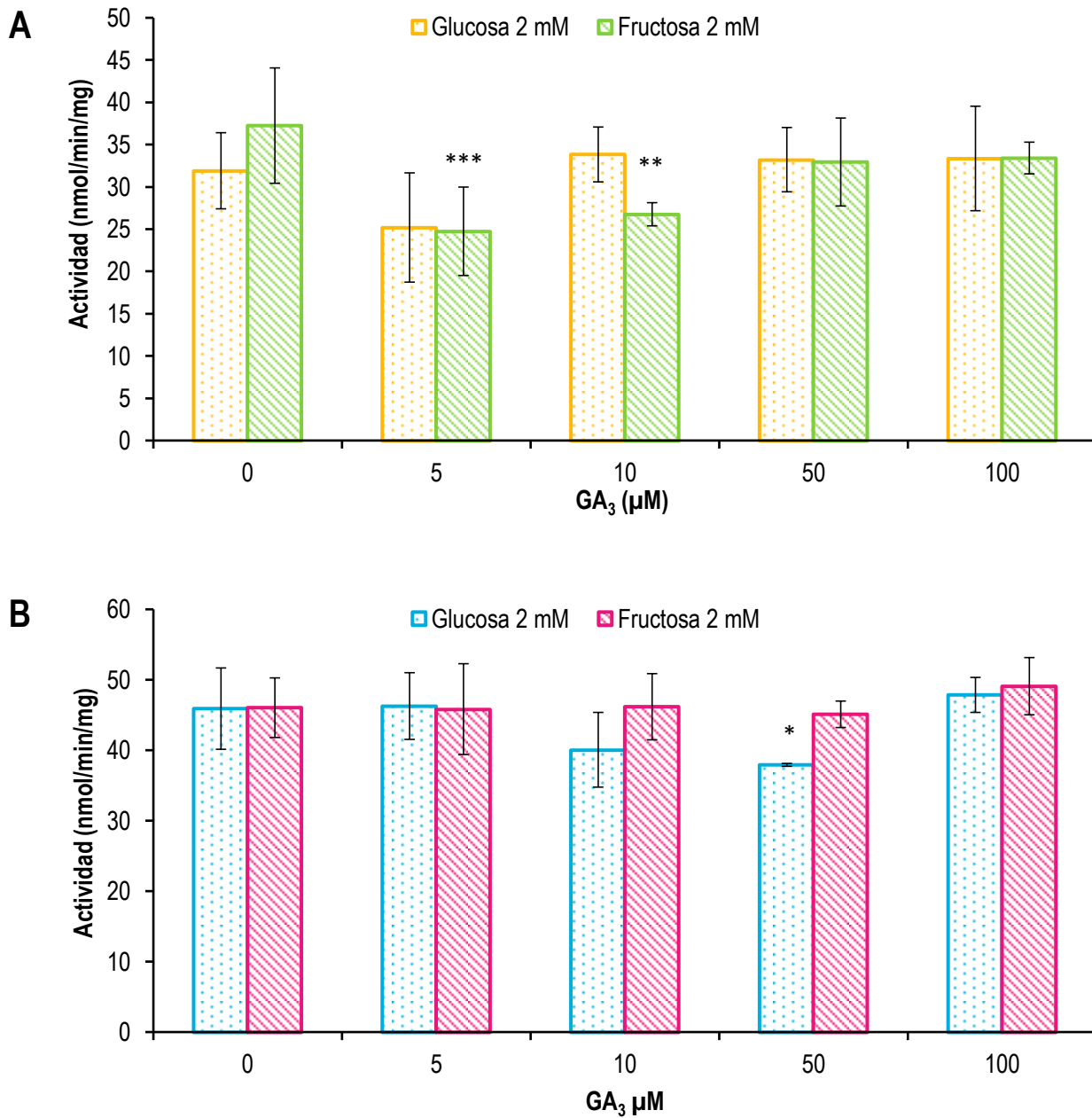
DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ). No se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1% ( $GA_3$  0  $\mu M$ ).



**Figura 20. Efecto de ABA sobre el porcentaje de germinación.**

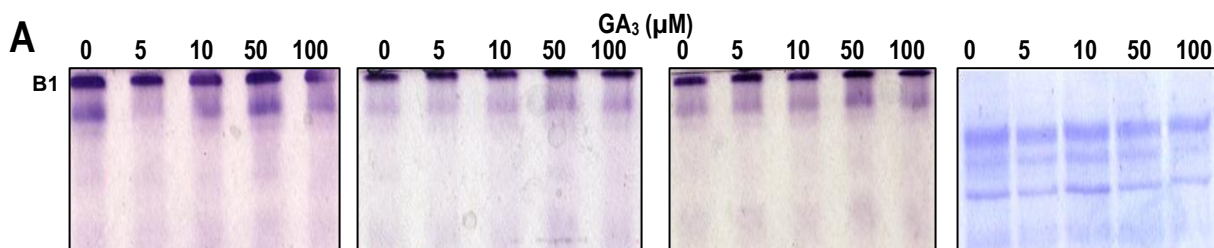
Embriones embebidos durante 24 h en concentraciones crecientes de ABA. **A)** Fotografías de embriones embebidos en presencia de ABA. **B)** Porcentaje de germinación de embriones embebidos en presencia de ABA. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ). \*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1% (ABA 0  $\mu M$ ).

Al medir la actividad tanto de las fracciones mitocondriales como citosólicas provenientes de embriones incubados con  $GA_3$  encontró disminución en la actividad de HXK a las concentraciones de 5 y 10  $\mu M$ , cuando el sustrato fue Fructosa para las fracciones mitocondriales; y a la concentración de 50  $\mu M$  teniendo como sustrato Glucosa, en la fracción citosólica (Figura 21); aunque no hubo diferencias en el perfil de bandas en el gel nativo (Figura 22). Si bien, la banda B4 de la fracción citosólica se incrementó ligeramente.



**Figura 21. Efecto de GA<sub>3</sub> sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial y citosólica.**

Los embriones de maíz fueron incubados con diferentes concentraciones de ABA por 24 h y posteriormente se obtuvieron las fracciones mitocondriales y citosólicas. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. La actividad se determinó con 25 y 40 μg de proteína para la fracción mitocondrial y citosólica, respectivamente. **A)** Actividad de la fracción mitocondrial y **B)** actividad de la fracción citosólica. En la gráfica se muestran los valores de las medias ± DE en tres experimentos independientes (n=3) con tres repeticiones cada uno. \* Diferencia significativa (ANOVA de una vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1% (GA<sub>3</sub> 0 μM).



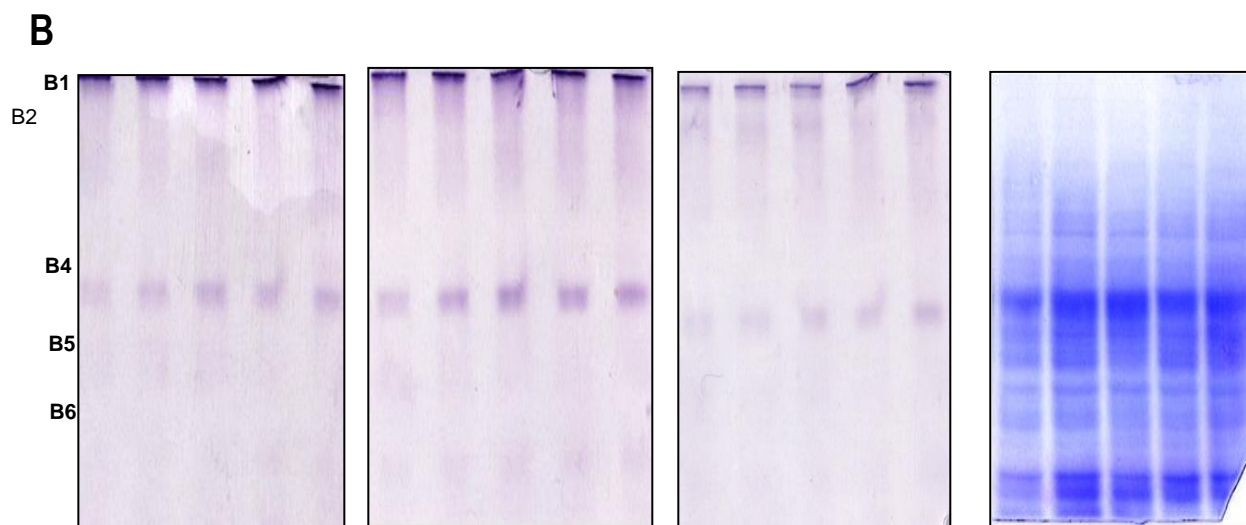
B2

B4

B5

B5

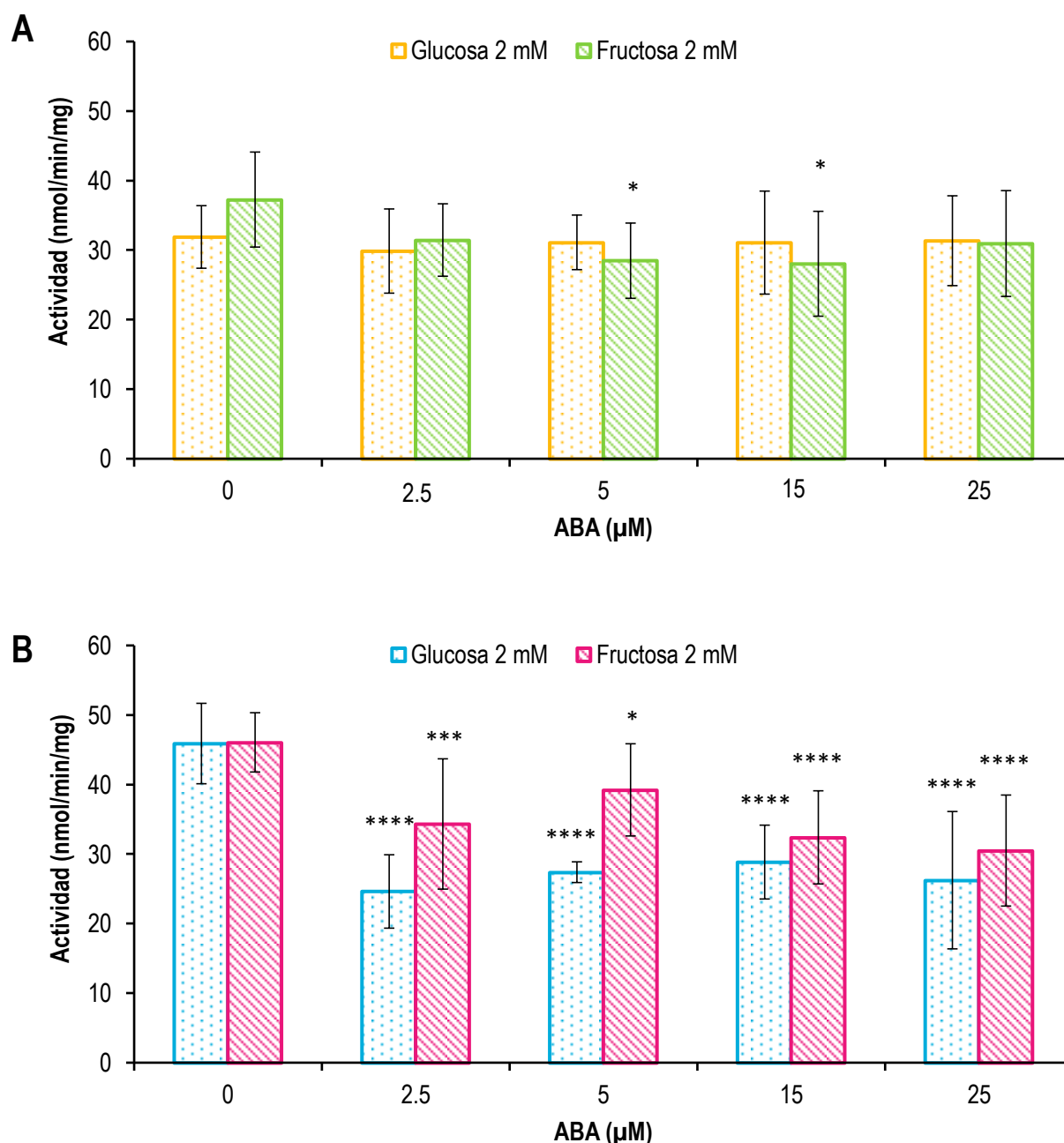
B7



**Figura 22. Efecto de GA<sub>3</sub> en el perfil de la actividad de HXK de la fracción mitocondrial y citosólica de embriones de maíz germinados 24 h con diferentes concentraciones de fitohormona.**

Actividad de HXK determinada en gel de poliacrilamida nativo al 12% usando los sustratos que se indican. Para el control de carga se corrieron en un gel de poliacrilamida con SDS al 12%; se utilizaron 25 y 60 µg de proteína de la fracción mitocondrial y citosólica, respectivamente, obtenida de embriones embebidos en diferentes concentraciones de la fitohormona, de manera independiente se realizó un gel SDS-PAGE y su respectiva tinción con Coomassie, como control de carga. **A)** Actividad de la fracción mitocondrial y **B)** actividad de la fracción citosólica.

Al determinar el efecto de ABA sobre la actividad total de HXK, encontramos que hubo una disminución muy ligera en la actividad de las fracciones mitocondriales pero solo a las concentraciones de 5 y 15 µM, con fructosa como sustrato (Figura 23A). En cambio, en las fracciones citosólicas, todos los tratamientos provocaron una disminución en la actividad de alrededor de un 35%, sobre todo cuando se midió con Glucosa como sustrato y a concentraciones elevadas de ABA (Figura 23B).

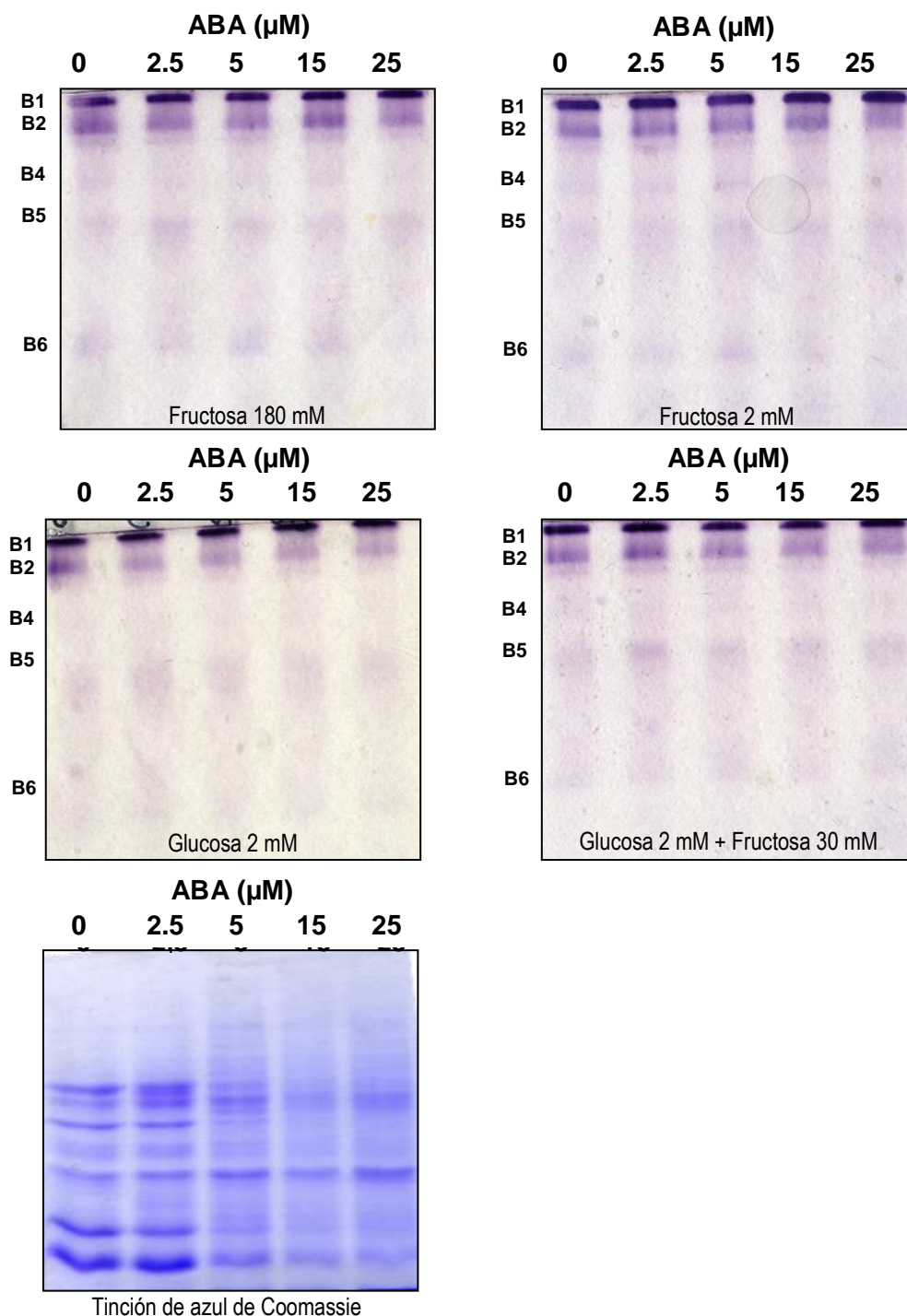


**Figura 23. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial y citosólica.**

Los embriones de maíz fueron incubados con diferentes concentraciones de ABA por 24 h y posteriormente se obtuvieron las fracciones mitocondriales y citosólicas. La actividad se determinó con 25 y 40  $\mu\text{g}$  de proteína para la fracción mitocondrial y citosólica, respectivamente. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. **A)** Actividad de la fracción mitocondrial y **B)** actividad de la fracción citosólica. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno. \* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1% (ABA 0  $\mu\text{M}$ ).

Para determinar si hubo algún efecto en el número de bandas de actividad que se encontraban en ambas fracciones se corrieron geles nativos. Las bandas de actividad de HXK de las fracciones mitocondriales no cambiaron en número o intensidad al provenir de tejido que fue incubado con ABA (Figura 24), aunque el perfil proteico de las fracciones

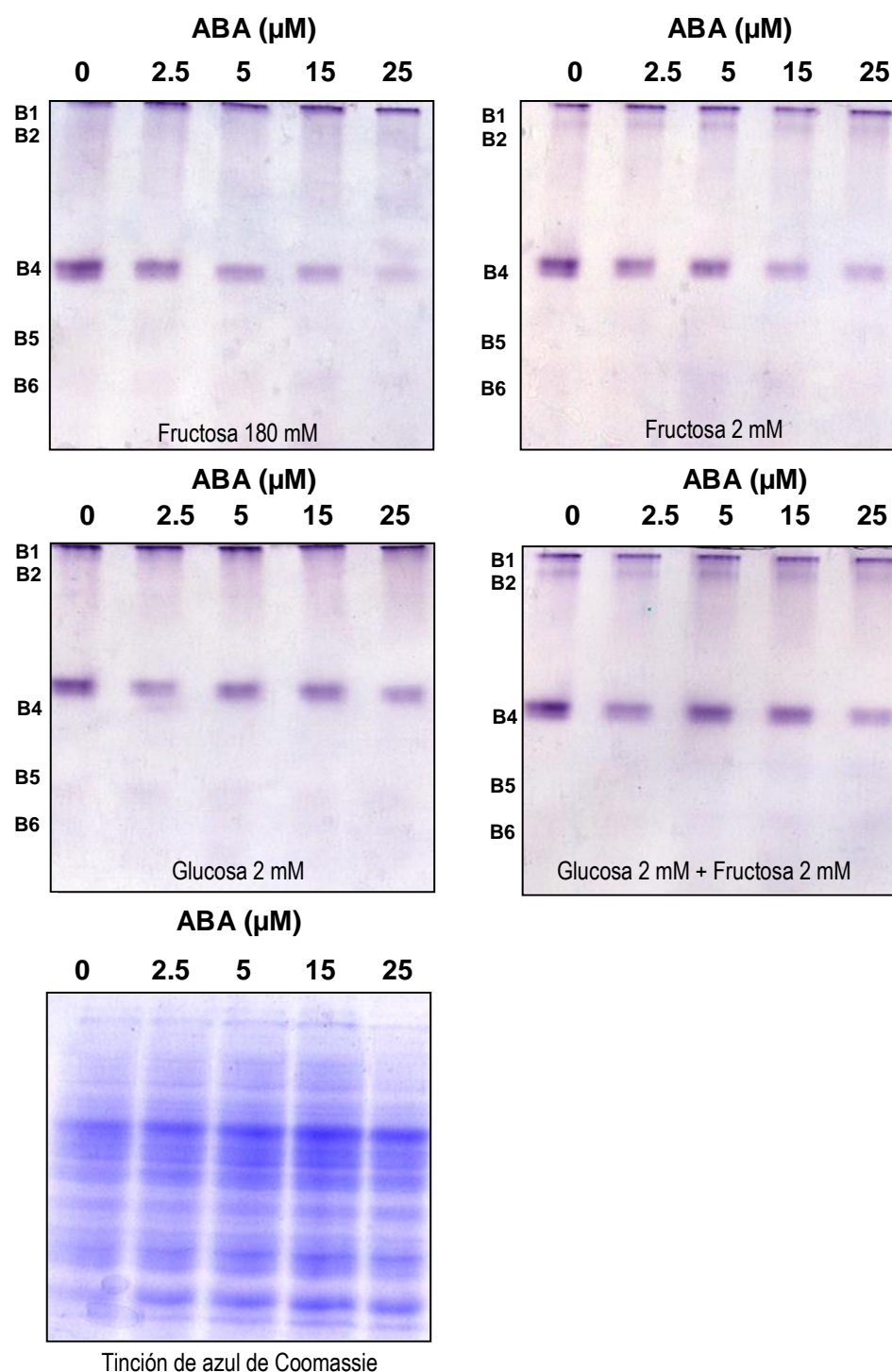
mitocondriales sí se ve afectado, ya que hay disminución en varias de las bandas de proteína (Figura 24).



**Figura 24. Efecto de ABA sobre las bandas de actividad de HXK de la fracción mitocondrial.**

Actividad de HXK determinada en gel de poliacrilamida nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el control de carga se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS 25  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción mitocondrial, posterior al corrimiento, el gel fue teñido con azul de Coomassie.





**Figura 25. Efecto de ABA sobre las bandas de actividad de HXK de la fracción citosólica.**

Actividad de HXK determinada en gel de poliacrilamida nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el control de carga se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS 60  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción citosólica, posterior al corrimiento, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

El perfil de bandas de actividad de HXK de la fracción citosólica sí fue distinto en presencia de ABA (Figura 25). Disminuyó la intensidad de la banda B4, siendo más visible la reducción

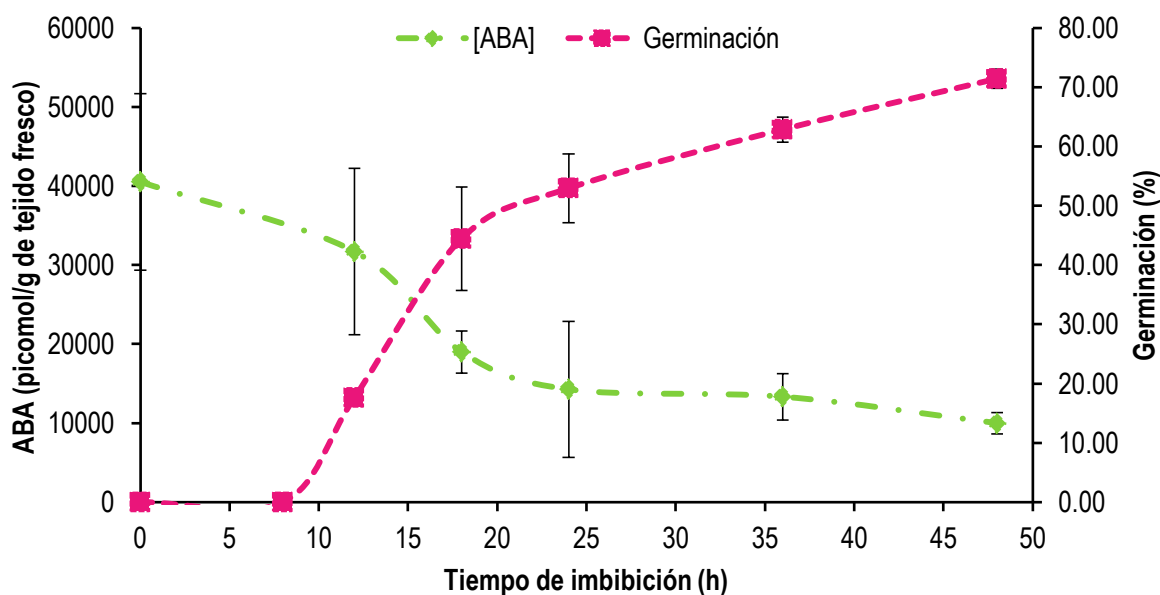
cuando la actividad se reveló en presencia de Fructosa 2 ó 180 mM. Aunque también se observó que la isoforma B4 disminuyó con Glucosa.

Se conoce que durante la germinación los niveles de ABA y GA<sub>3</sub> cambian, y que estos cambios controlan la expresión y actividad de varias enzimas (Srivastava, 2002; Weitbrecht *et al.*, 2011). En este trabajo, se sugiere que GA<sub>3</sub> no es el responsable de la mayor actividad de la HXK, sino que más bien, ABA reduce su actividad. Se ha reportado que los niveles fisiológicos de ABA son altos en las semillas secas y posteriormente se reducen conforme avanza la germinación (Price *et al.*, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2005; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009), por lo que es posible que su disminución fisiológica sea lo que promueve que la actividad de HXK aumente.

En este trabajo se corroboró el perfil del contenido de ABA durante la germinación (Figura 26). Los niveles de ABA disminuyeron al transcurrir el tiempo de germinación de los embriones, el máximo contenido se encontró al tiempo 0 y el mínimo a las 48 h; aunque a partir de las 24 h el contenido ya era bajo (Figura 26). Además, se encontró que el contenido de ABA presentó una relación inversa con el porcentaje de germinación. En relación al contenido de GA<sub>3</sub>, en un trabajo de investigación en el laboratorio paralelo al que aquí se presenta, se encontró que dicha fitohormona aumentó conforme la germinación avanzó (Arciniega-Ruíz, 2012). Estos niveles de GA<sub>3</sub> coinciden con lo reportado en la literatura (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009).

Entonces, durante la germinación se observó que mientras los niveles de ABA disminuyeron, los de GA<sub>3</sub> aumentaron para promover la germinación de la semilla (Srivastava, 2002), por lo que es posible que estos cambios fisiológicos regulen la actividad de las HXKs, y que en particular la disminución de ABA ejerza algún tipo de regulación sobre la isoforma B4.



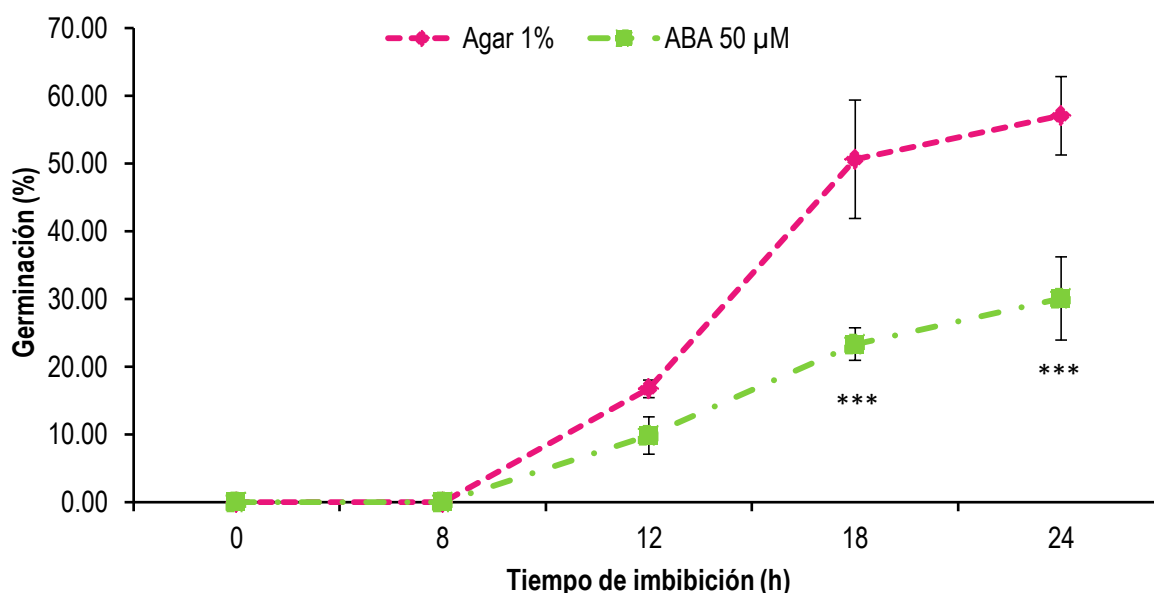


**Figura 26. Niveles endógenos de ABA.**

Relación entre el porcentaje de germinación y los niveles endógenos de ABA. El contenido de ABA se determinó por un ensayo de ELISA competitivo. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno.

Para determinar desde que tiempo de germinación se producían los cambios en el nivel y número de isoformas de HXK debidos a ABA, se embebieron embriones desde 8 hasta 24 h en ABA 50  $\mu$ M y se obtuvieron de ellos las fracciones citosólicas y mitocondriales.

La adición de ABA 50  $\mu$ M a los embriones disminuyó el porcentaje de germinación desde las 12 h de imbibición, alcanzando un 27% menos en los embriones embebidos a las 18 y 24 h (Figura 27).

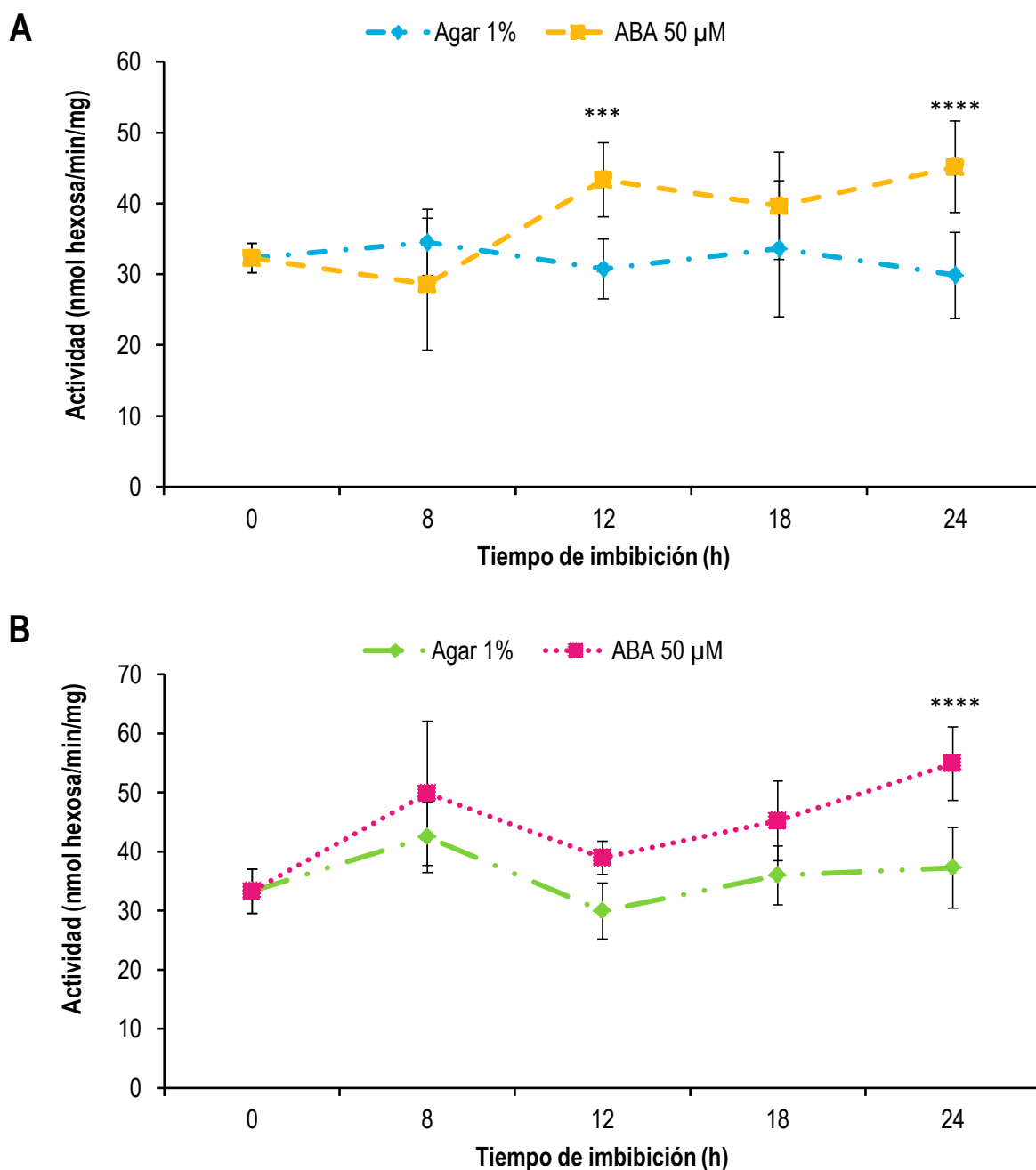


**Figura 27. Efecto de ABA en el porcentaje de germinación de embriones.**

Embriones embebidos en presencia o ausencia de ABA 50  $\mu$ M. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes (n=3). \*\*\* Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

En cuanto a las HXKs de la fracción mitocondrial, se observó que las actividades (teniendo como sustratos Glucosa o Fructosa) se modificaron ligeramente por la presencia de ABA (Figura 28). Con Fructosa, la actividad aumentó a las 24 h de imbibición (Figura 28B). Mientras que con Glucosa, la actividad subió ligeramente a las 12 y 24 h (Figura 28A).

La actividad de HXK de las fracciones mitocondriales en geles nativos, mostró que las bandas B2, B3 y B4 disminuyeron cuando los embriones se embebieron en ABA 50  $\mu$ M (Figura 29). Las bandas B1 y B5 no disminuyeron, por el contrario parece que se hicieron más intensas. Probablemente, son estas bandas de actividad las responsables del aumento en la actividad determinada *in vitro* de las HXKs de la fracción mitocondrial (Figura 28).



**Figura 28. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial de embriones embebidos de 0 a 24 h.**

Los embriones de maíz fueron embebidos desde el inicio en presencia o ausencia de ABA 50  $\mu$ M. Se obtuvieron las fracciones mitocondriales de estos embriones y la actividad se determinó utilizando 40  $\mu$ g de proteína, usando como sustrato **A)** Glucosa 2 mM y **B)** Fructosa 2 mM. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno. \*\*\* Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

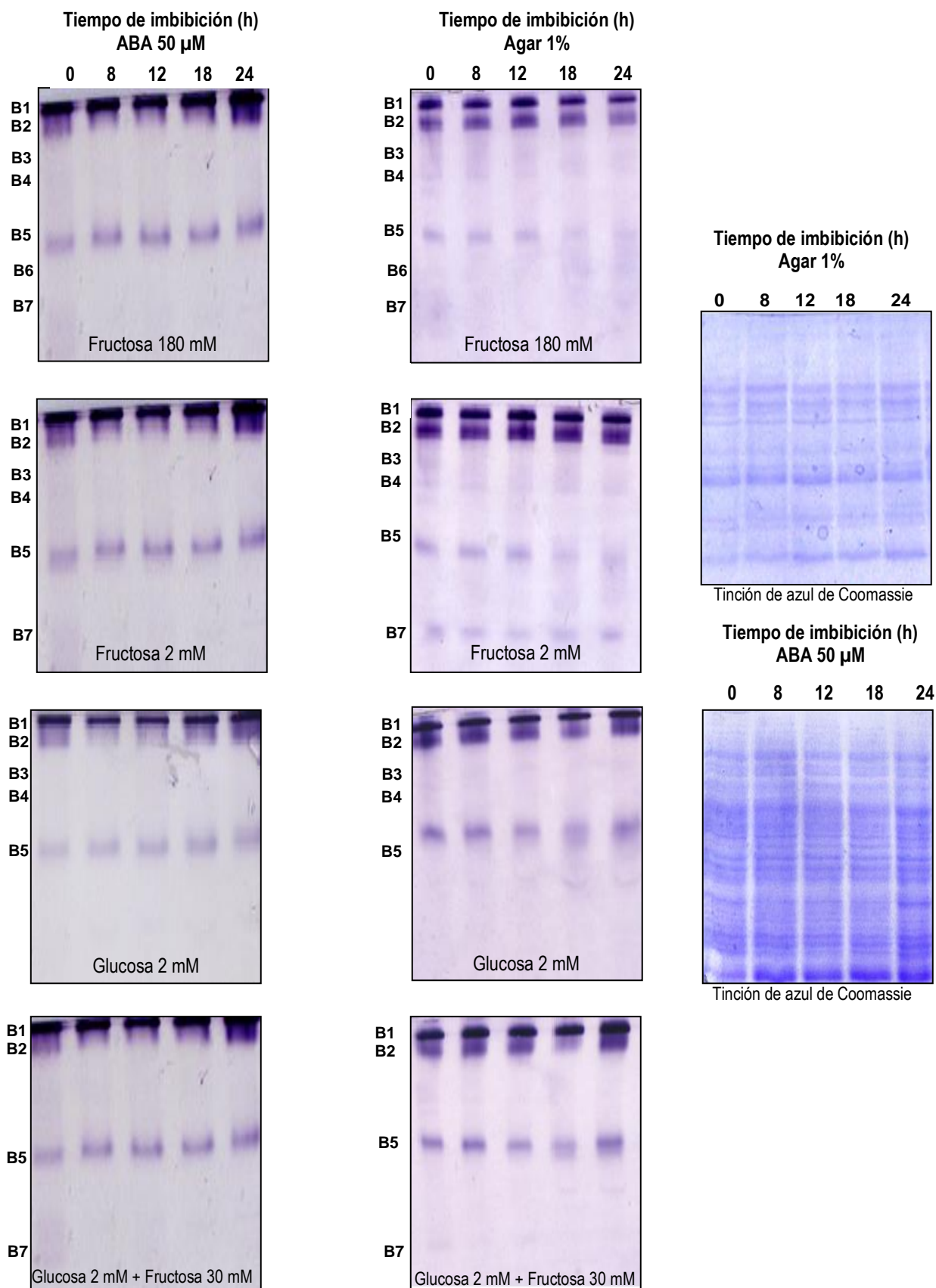
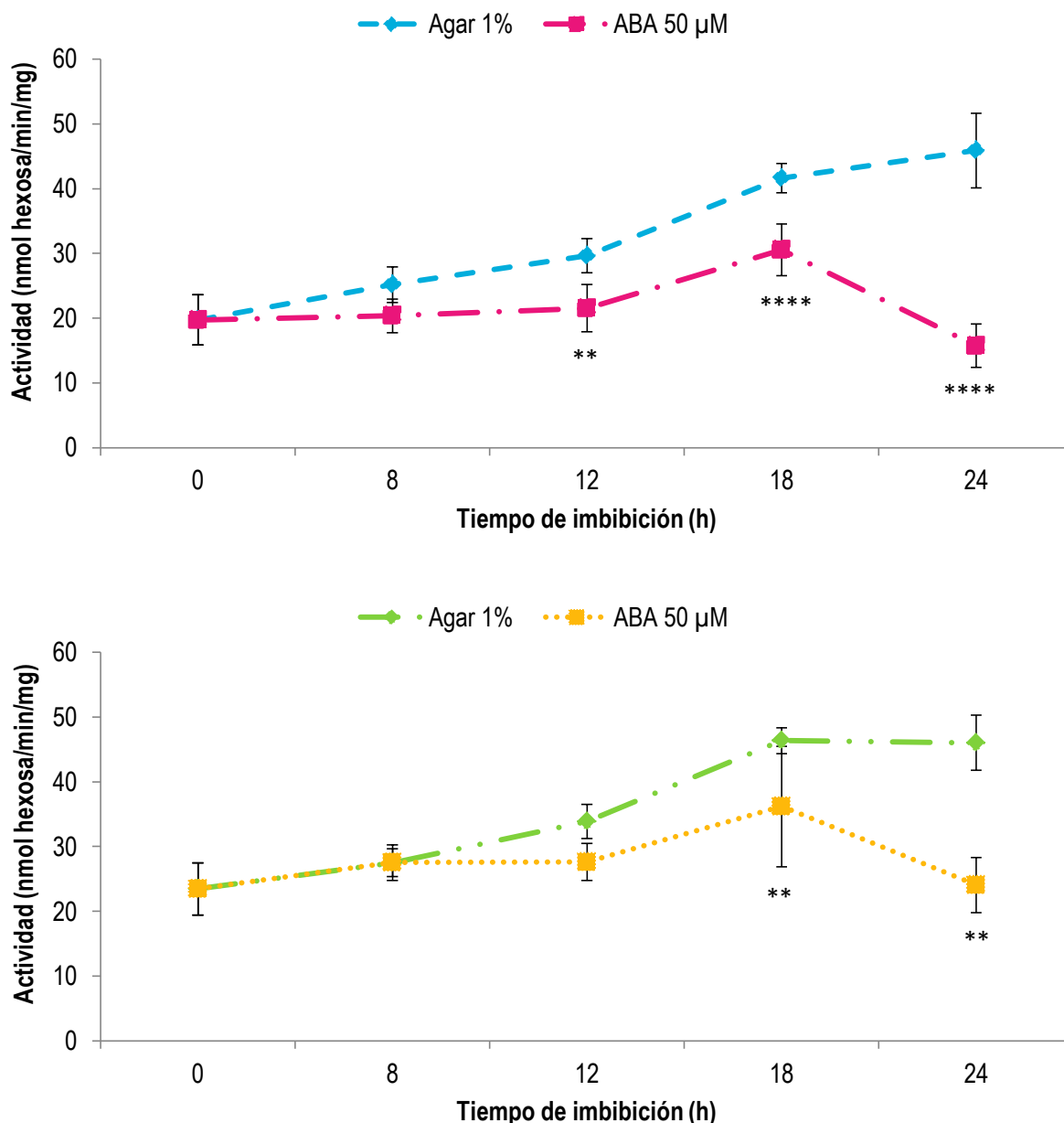


Figura 29. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial.

Embriones embebidos en presencia o ausencia de ABA 50  $\mu$ M. Actividad determinada en gel nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el control de carga se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS 25  $\mu$ g de proteína de la fracción mitocondrial, posterior al corrimiento, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

Por otra parte, ABA redujo la actividad de HXK de las fracciones citosólicas, tanto la actividad medida con Glucosa como la medida con Fructosa, a partir de las 12 h, aunque fue más evidente el decremento en actividad a las 18 y 24 h de imbibición (Figura 30).



**Figura 30. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones embebidos de 0 a 24 h.**

Los embriones de maíz fueron embebidos desde el inicio en presencia o ausencia de ABA 50  $\mu$ M. Se obtuvieron las fracciones mitocondriales de estos embriones y la actividad se determinó utilizando 60  $\mu$ g de proteína, usando como sustrato **A)** Glucosa 2 mM y **B)** Fructosa 2 mM. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes (n=3) con tres repeticiones cada uno. \*\*

Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

Las fracciones citosólicas de los embriones con ABA presentaron diferente número e intensidad de las bandas reveladas por actividad de HXK en los geles nativos comparadas con las fracciones de embriones embebidos solo en agar. La banda B2 fue más nítida en presencia de ABA al medirla con Fructosa 150 mM (Figura 31), al igual que la banda B3, pero se hizo más evidente al medirla con Glucosa (Figura 31). También se encontró que aparecieron bandas muy cercanas al fin del gel, visualizadas al usar juntos Glucosa y Fructosa como sustratos (Figura 31).

En cuanto a la banda B4 se observó la misma tendencia a incrementar su intensidad conforme transcurrió el tiempo de imbibición tanto en los embriones que fueron embebidos en presencia de ABA, como en los que se embebieron en agar al 1%. Sin embargo, el incremento en actividad no fue tan pronunciado en los embriones que fueron embebidos con ABA y revelados en presencia de 2 o 150 mM Fructosa (Figura 31). Aunque, la banda B4 de la fracción citosólica de embriones embebidos en ABA se detectó desde las 8 h al ser revelada su actividad con Glucosa o Glucosa y Fructosa. Lo anterior sugiere que la enzima B4 proveniente de embriones embebidos en ABA tiene una preferencia mayor por Glucosa como sustrato que la enzima que proviene de embriones embebidos en agar al 1% o bien, que se sintetizó antes.



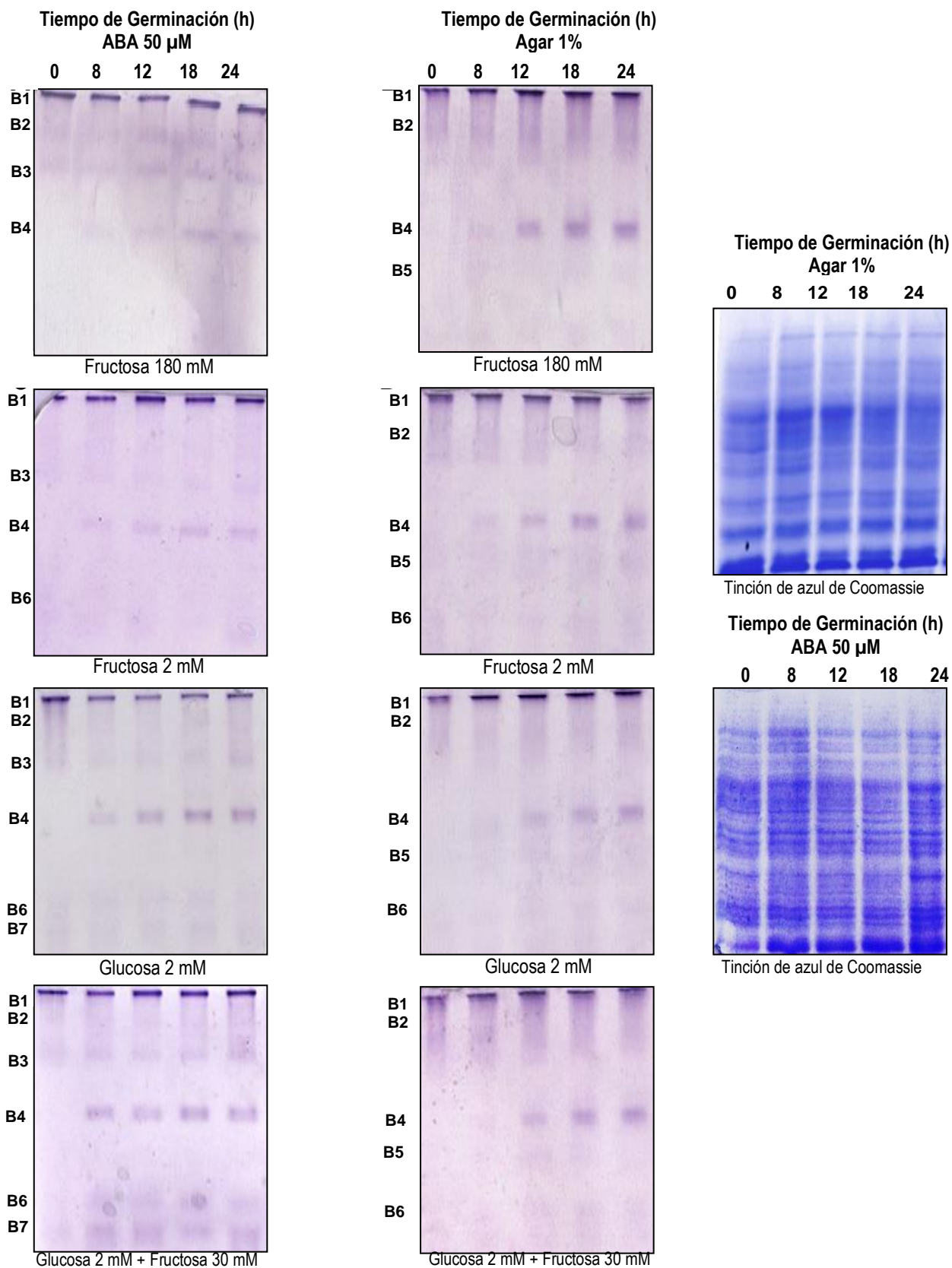


Figura 31. Efecto de ABA sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica.



Embriones embebidos en presencia o ausencia de ABA 50  $\mu$ M. Actividad determinada en gel nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el control de carga se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS 60  $\mu$ g de proteína de la fracción citosólica, posterior al corrimiento, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

### **Consecuencias de la disminución de la actividad de HXK en presencia de ABA.**

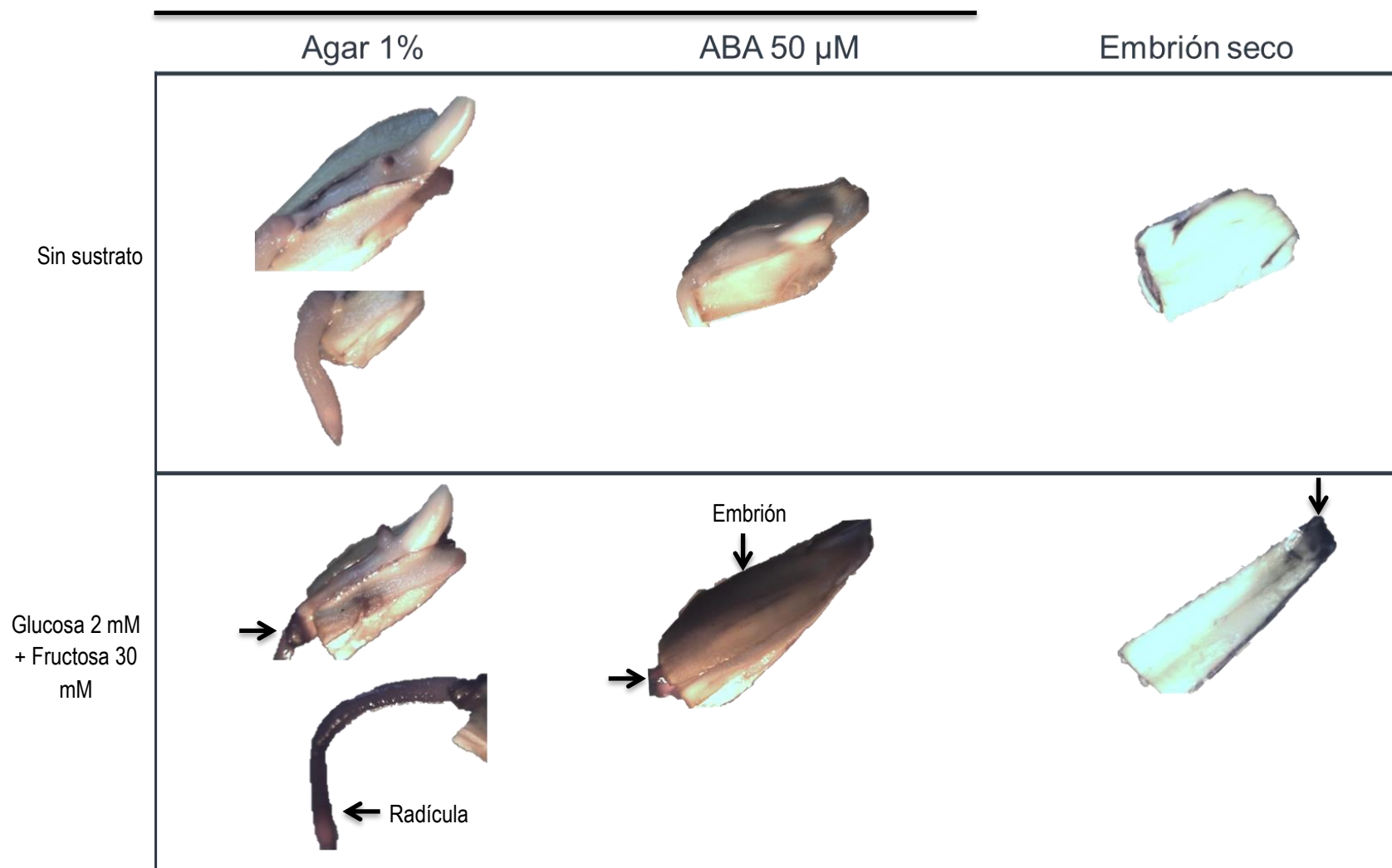
*La localización de la actividad de HXK en los embriones embebidos en ABA no es radicular.*

Se ha descrito que ABA tiene la función de mantener la latencia, pero una vez que esta se ha roto, como en este caso por haber iniciado el proceso de hidratación, el ABA retrasa la ruptura de las capas externas a la radícula, ya que reprime la expresión de enzimas como las glucanasas, en particular las de la denominada clase I, como la  $\beta$ -1,3-glucanasa ( $\beta$ Glu I); enzimas que hidrolizan la pared celular de las células adyacentes a la radícula (Kucera *et al.*, 2005), lo anterior explica porque la elongación de la radícula no ocurrió.

Otra explicación podría ser que la capacidad de uso de los carbohidratos estuviera afectada, y como se describió anteriormente, ABA redujo la actividad citosólica de la HXK. Por lo que, se investigó si la actividad de la HXK estaba disminuida en alguna región en particular del embrión.

El efecto de ABA sobre la distribución de la HXK en embriones de maíz se determinó al incubar los embriones embebidos en ABA 50  $\mu$ M en un medio de reacción en el que se acopló la fosforilación de la Glucosa o Fructosa a la reducción del NBT. Se encontró que la localización de la actividad de HXK en los embriones secos fue igual a la de los embriones incubados 24 h con ABA, es decir alrededor del eje, a pesar de que los embriones tratados con ABA ya habían pasado por un proceso de hidratación (Figura 32). Mientras que, los embriones embebidos en agar, tuvieron localizada preferentemente la actividad de HXK en la zona de la radícula. Cabe destacar que en los embriones tratados con ABA, la radícula no emergió o emergió muy poco.

## 24 h de imbibición

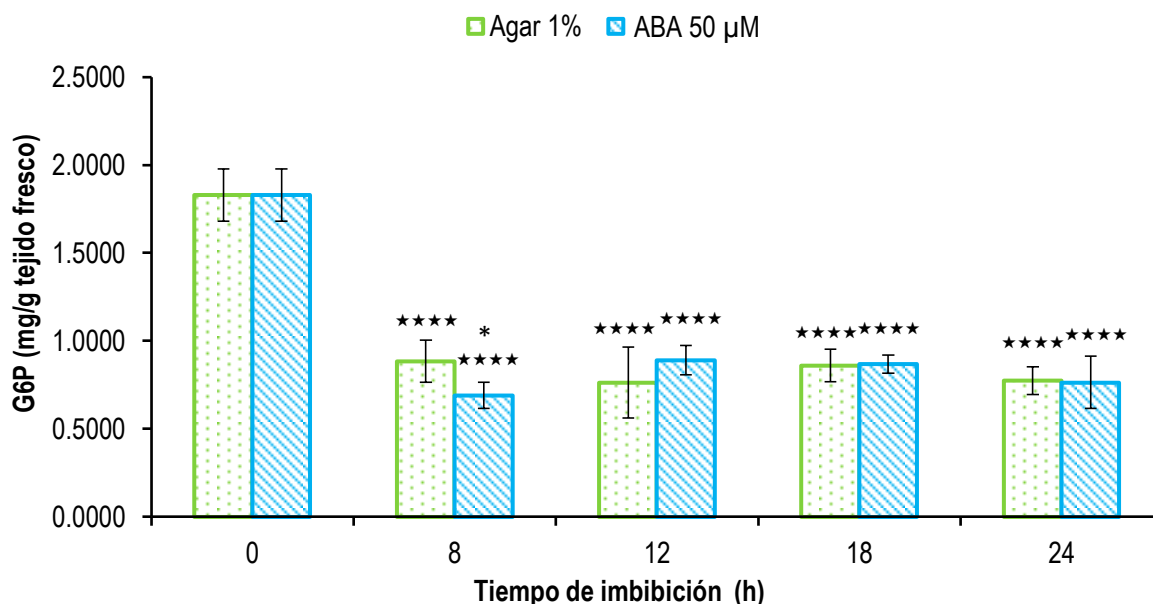


**Figura 32. Efecto de ABA en la localización y actividad de HXK.**

Las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de HXK (Flechas). Para cada reacción, los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de sustrato (sin sustrato y Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM, respectivamente).

### ABA no afecta la poza de G6P.

Dado que el tratamiento con ABA disminuyó la actividad total de HXK, se decidió cuantificar el producto de la reacción catalizada por esta enzima para examinar si también se reducía. En la semilla seca, la cantidad de G6P fue elevada, disminuyó aproximadamente en un 50% a las 8 h de imbibición y a partir de ahí permaneció prácticamente constante hasta las 24 h, sin importar si estuviera o no presente ABA (Figura 33). Esto es interesante, ya que a pesar de que ABA disminuyó la actividad de HXK, la cantidad de producto generado no se modificó. Esto puede deberse a que la G6P producida en ausencia de ABA este dirigiéndose a diferentes vías metabólicas y dependiendo que tan eficaces o rápidas sean estas vías, el producto se acumula, desaparece o mantiene una poza constante del metabolito. En ausencia de ABA exógeno la germinación procedió por lo que se esperaba que la poza de G6P se movería rápidamente, para proveer de los esqueletos carbonados no solo para la glucólisis, sino también para producir las ribosas para síntesis de coenzimas y ácidos nucleicos, o para la síntesis de más pared celular.



**Figura 33. Cuantificación de G6P.**

Se extrajeron los carbohidratos de embriones embebidos en presencia o ausencia de ABA 50  $\mu$ M, cuantificándose la G6P presente mediante un método acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes (n=3) con tres repeticiones cada uno. \* Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%. \*\*\*\* Diferencia significativa (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones secos (0 h de imbibición).

### Efecto de ABA sobre la actividad de G6PDH.

En vista de que la poza de G6P no se modificaba con el tratamiento con ABA, entonces se decidió estudiar si ABA tenía un efecto sobre 2 de las vías que utilizan este sustrato (Figura 34).

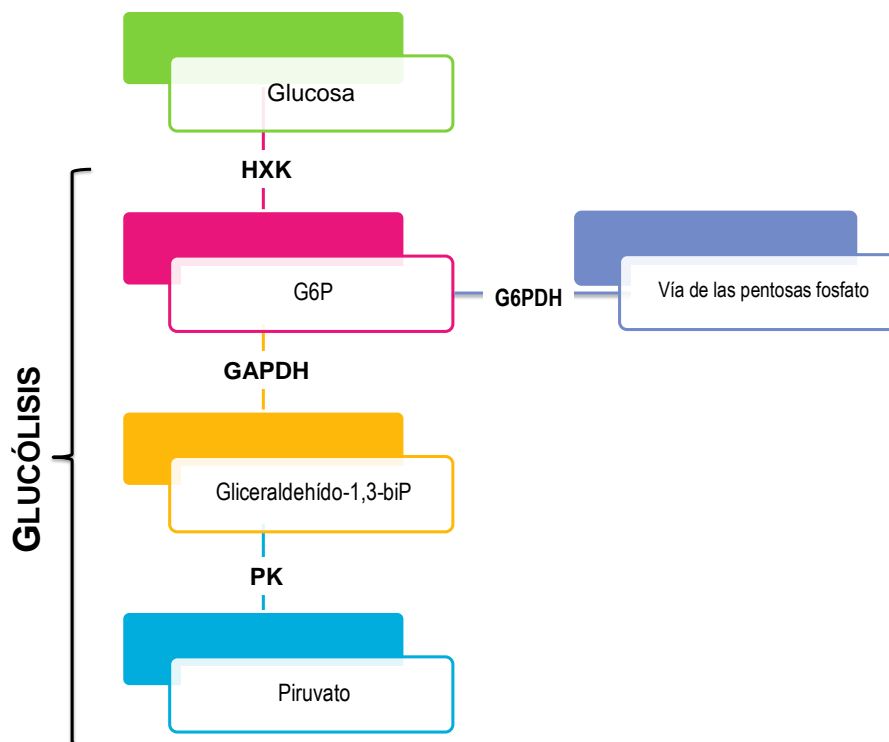
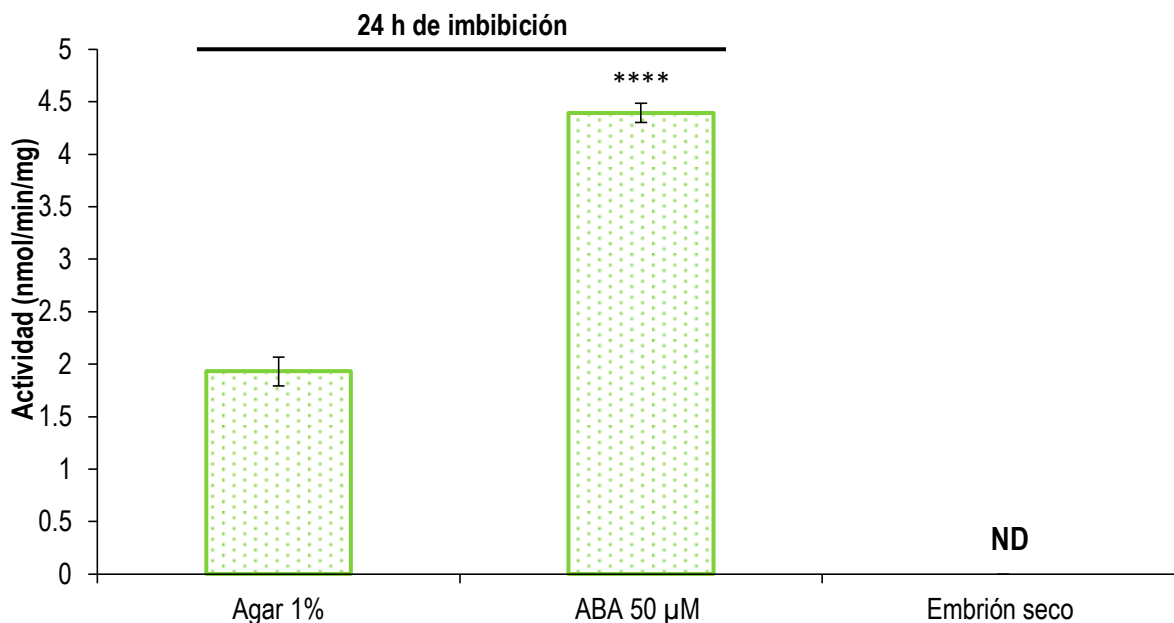


Figura 34. Enzimas de la vía glucolítica y de la vía de las pentosas fosfato involucradas en el metabolismo de la Glucosa o G6P.

Unas de las vías que utiliza la G6P como sustrato es la vía de las pentosas fosfato, cuya primera enzima regulatoria es la G6PDH. Se determinó la actividad en la fracción citosólica de embriones secos y embebidos por 24 h en presencia y ausencia de ABA 50  $\mu$ M.

En los embriones secos no se logró detectar la actividad de G6PDH, y se observó que a las 24 h de imbibición ya había actividad, y que se duplicó cuando los embriones fueron tratados con ABA 50  $\mu$ M (Figura 35). Por lo que es probable que la vía de las pentosas fuera activada por ABA.

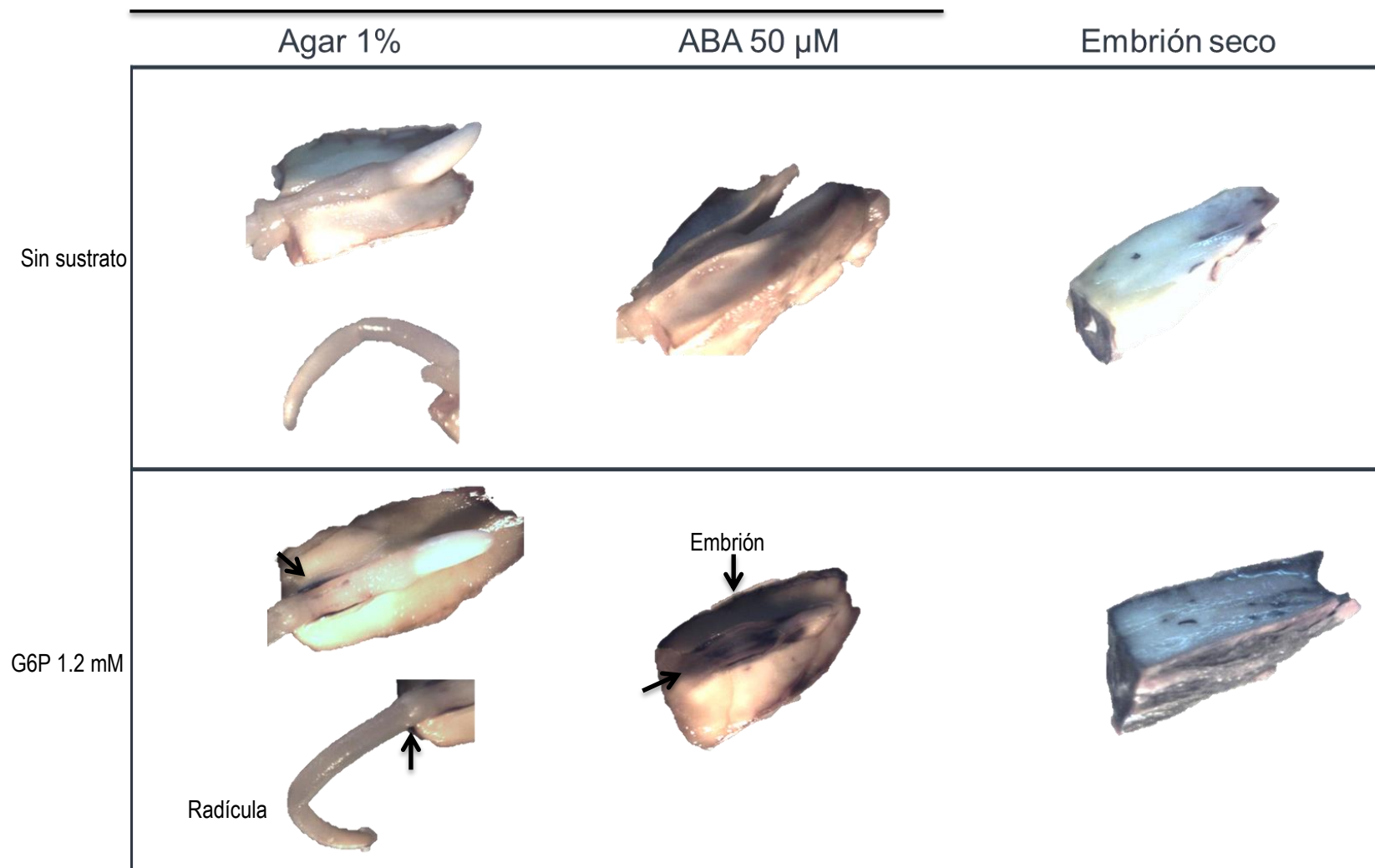


**Figura 35. Efecto de ABA sobre la actividad de la G6PDH.**

Actividad determinada en embriones secos y embriones embebidos durante 24 h en agar al 1% o ABA 50 µM. Para los embriones secos, la actividad de G6PDH no pudo ser detectada (ND= No Detectada). El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en dos experimentos independientes ( $n=2$ ) con tres repeticiones cada uno. \*\*\*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

Al realizar la determinación de la actividad de la enzima en los embriones completos, se encontró que la actividad se encontraba preferentemente alrededor del eje embrionario (Figura 36). Cabe destacar que la actividad *in situ* de la G6PDH fue similar a la detectada *in vitro*, mayor actividad en los embriones embebidos por 24 h y aún más cuando fueron tratados con ABA. Por otra parte, a diferencia de la actividad de HXK, la actividad de G6PDH no se localizó en la radícula. Aunque cabe destacar que esto no significa que no esté presente esta enzima en la radícula, probablemente el método de detección no fue tan sensible.

## 24 h de imbibición



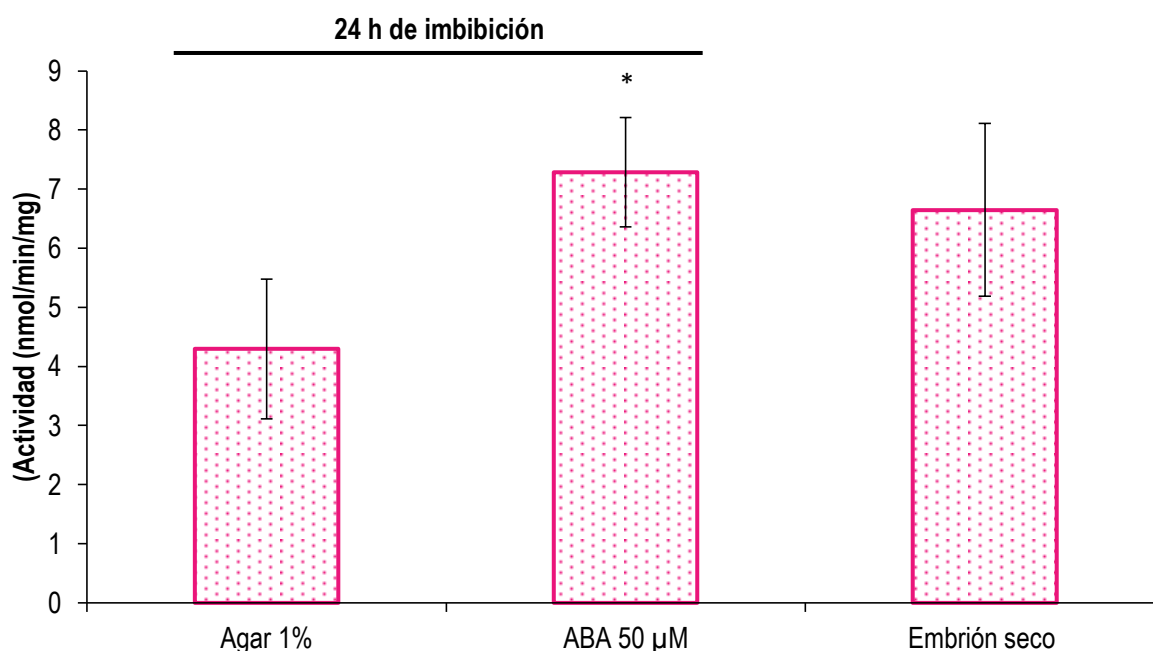
**Figura 36. Efecto de ABA en la localización y actividad de la G6PDH.**

Las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de G6PDH (Flechas). Para cada reacción, los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de sustrato (sin sustrato y G6P 1.2 mM, respectivamente).

### Efecto de ABA sobre la actividad de GAPDH y la PK.

La glucólisis es una de las vías más importantes del metabolismo de carbohidratos y destino de la G6P. Para determinar cuál era el efecto de la disminución de la actividad de la HXK en la vía glucolítica se estudió la actividad de dos enzimas de la vía, la GAPDH y la PK. La primera produce una triosa difosforilada y NADPH, mientras que la segunda produce ATP y piruvato. Ambas se midieron en las fracciones citosólicas de embriones secos y embebidos durante 24 h en agar al 1% y en ABA 50  $\mu$ M.

Respecto a la GAPDH se encontró que la actividad de la enzima era similar tanto en embriones secos como los tratados 24 h en ABA, y en estos últimos, significativamente mayor (69%) a la actividad de los embriones embebidos en agar (Figura 37).

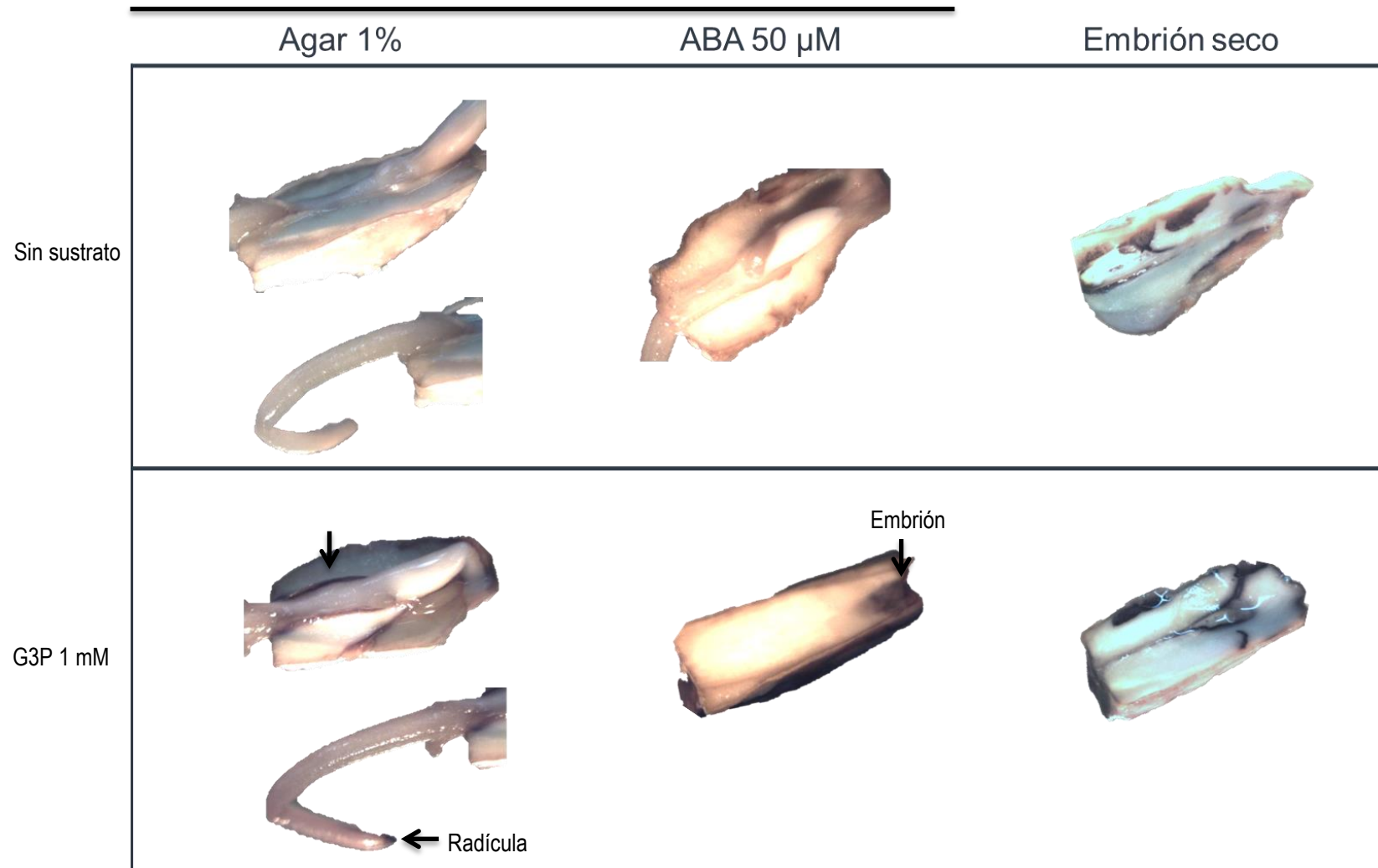


**Figura 37. Efecto de ABA sobre la actividad de la GAPDH.**

Actividad determinada en la fracción citosólica de embriones secos y embriones embebidos durante 24 h en agar al 1% ó ABA 50  $\mu$ M. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en dos experimentos independientes (n=2) con tres repeticiones cada uno. \* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

Respecto a la localización de la GAPDH en los embriones secos y los embebidos con ABA, la mayor actividad se encontró preferencialmente en la periferia del embrión, en la región que colinda con el endospermo; mientras que en los embriones ya germinados, se localizó principalmente alrededor del eje y en el ápice radicular (Figura 38).

24 h de imbibición

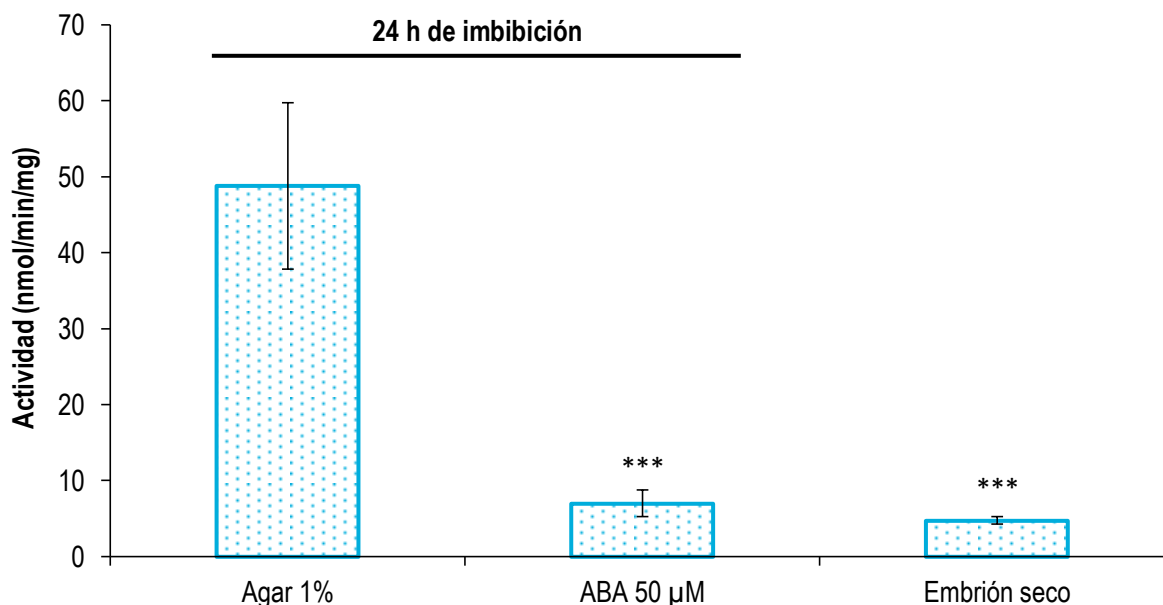


**Figura 38. Efecto de ABA en la localización y actividad de la GAPDH.**

Las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de GAPDH (Flechas). Para cada reacción, los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de sustrato (sin sustrato y G3P 1 mM, respectivamente).



La actividad de la PK del extracto citosólico del embrión seco fue baja y similar a la que se encontró en los embriones incubados con ABA 50  $\mu$ M (Figura 39). Ambas actividades fueron 8.5 veces menores a la de los embriones incubados durante 24 h en agar.



**Figura 39. Efecto de ABA sobre la actividad de la PK.**

Actividad determinada en embriones secos y embriones embebidos durante 24 h en agar al 1% o ABA 50  $\mu$ M. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la disminución de NADH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en dos experimentos independientes (n=2) con tres repeticiones cada uno. \*\*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

En resumen, a pesar de que la actividad total de HXK citosólica disminuyó un 35% con ABA, la poza de G6P no se modificó, se esperaba una disminución de la poza, pero el nivel sostenido y similar de este metabolito al de los embriones embebidos en ausencia de la fitohormona, puede deberse a la reducción en su consumo, por ejemplo mediante una disminución de la actividad de la vía glucolítica. La GAPDH aumentó su actividad, sin embargo, la actividad de la última enzima de la vía, la PK, fue 8.5 veces menor, por lo que es muy probable que la vía glucolítica sí se encontrara afectada, aunque con los datos presentados no es posible plantear si la vía se afecta por ABA debido a una influencia directa sobre la HXK, sobre la PK o sobre ambas.

Por otra parte, la vía de las pentosas fosfato es probable que se encontrara aumentada ya que la actividad de la G6PDH fue 2 veces mayor en los embriones embebidos en ABA. Así que si la G6P no se está utilizando activamente en la glucólisis, la vía de las pentosas puede

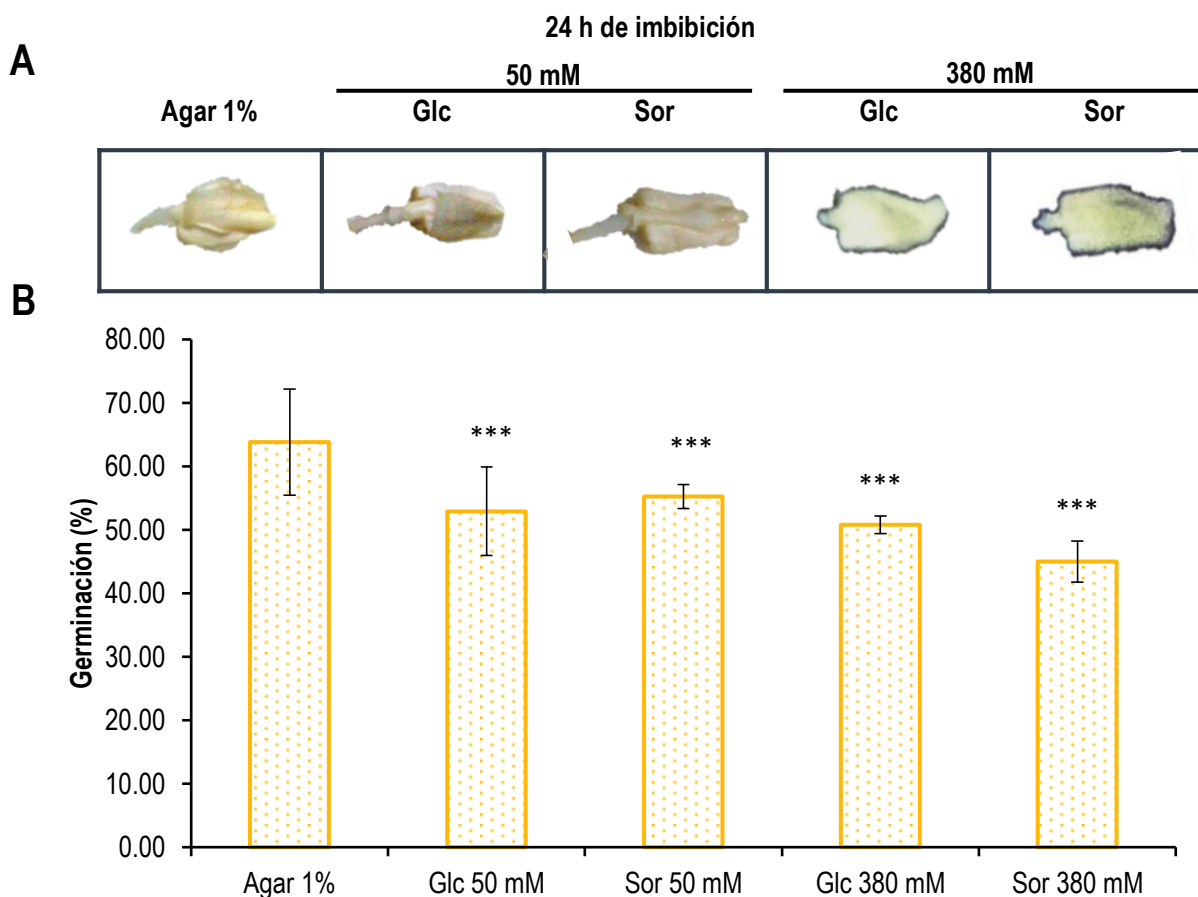
estar tomando este sustrato y por tanto no hay cambio en el balance neto de G6P, a pesar de que se esté produciendo menos por las HXKs citosólicas.

**Los efectos de los carbohidratos y del ABA sobre la HXK y el metabolismo son distintos.**

En el laboratorio ya se había observado que la adición exógena de Glucosa a concentraciones de 50 mM durante la germinación de embriones de maíz era capaz de modular negativamente la actividad de HXK (Castañeda-Rico, 2008; Estrada-Antolín, 2011). Al parecer la misma isoforma que se regula por ABA se modula por carbohidratos.

Lo anterior era de esperarse, ya que se ha propuesto que tanto la señalización por ABA como la de carbohidratos pueden interactuar (Dijkwel *et al.*, 1997; Rook *et al.*, 2006). Para corroborar que efectivamente la isoforma B4 de la fracción citosólica es una HXK que responde a carbohidratos y ABA, se embebieron embriones por 24 h en dos concentraciones de carbohidratos: Glucosa 50 mM, concentración que ya habíamos observado que altera la actividad de HXK citosólica total, y Glucosa 380 mM, ya que es la concentración en la que se ha reportado que en *A. thaliana* define el fenotipo de insensibilidad a carbohidratos. Como controles de osmolaridad se incluyeron embriones incubados en Sorbitol 50 mM y 380 mM. Finalmente como control sin carbohidratos y en donde además la concentración de ABA es baja, embriones incubados en agar al 1%.

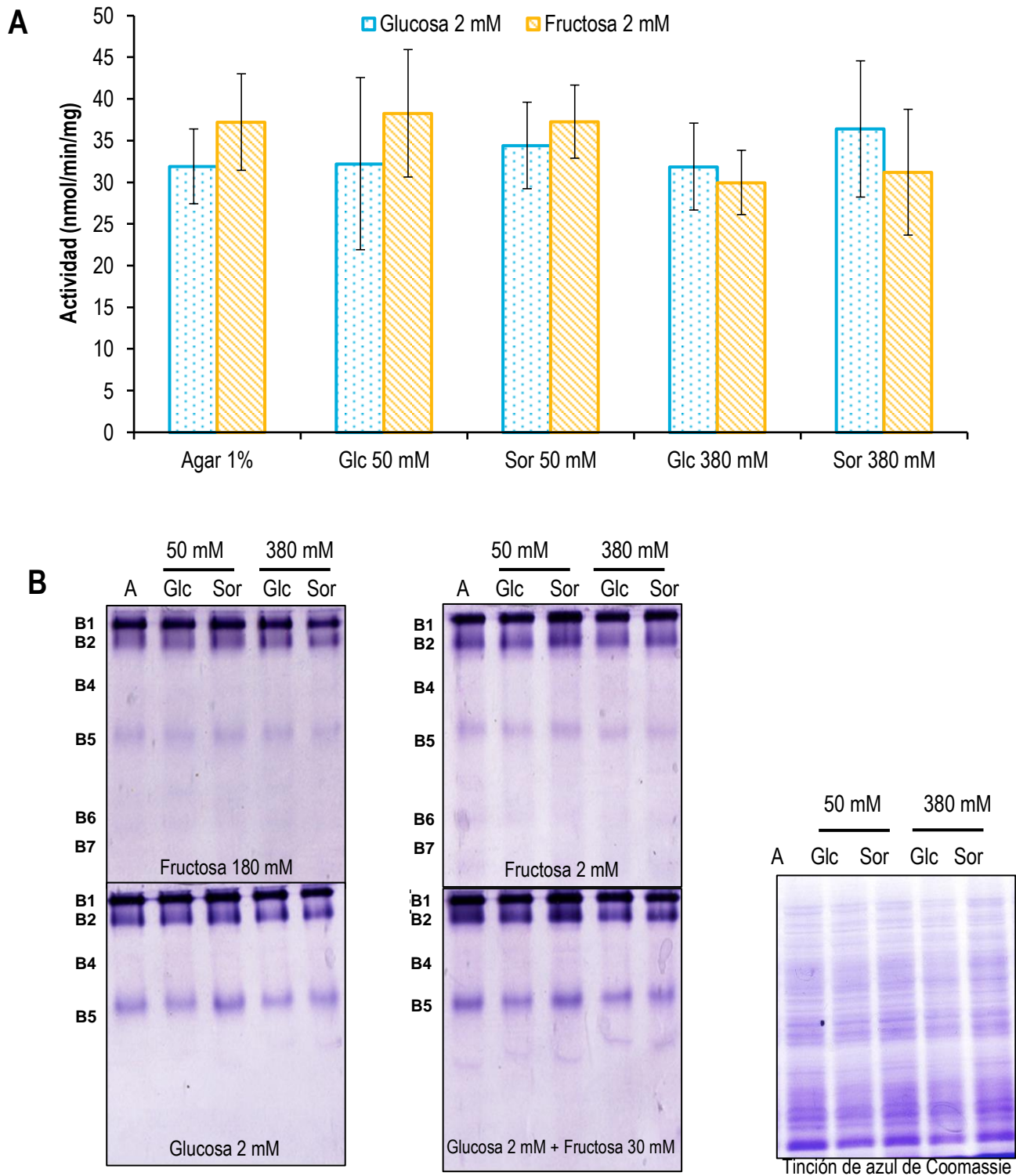
Fenotípicamente, los tratamientos no modificaron la aparición de la radícula y el porcentaje de germinación (Figura 40A), excepto cuando los embriones fueron embebidos en 380 mM de Glucosa o Sorbitol, ya que estos hubo una disminución en el porcentaje de germinación y en la elongación de la radícula (Figura 40).



**Figura 40. Efecto de los carbohidratos sobre el porcentaje de germinación y la elongación radicular.**

**A)** Embriones embebidos durante 24 h en dos concentraciones de Glucosa (Glc) o Sorbitol (Sor). **B)** Porcentaje de germinación de los embriones sometidos a los diferentes tratamientos. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ). \*\*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

En cuanto a la actividad de las HXK de la fracción mitocondrial, no se encontró efecto de los carbohidratos ni en la actividad determinada *in vitro*, ni en los perfiles de actividad en los geles nativos (Figura 41).

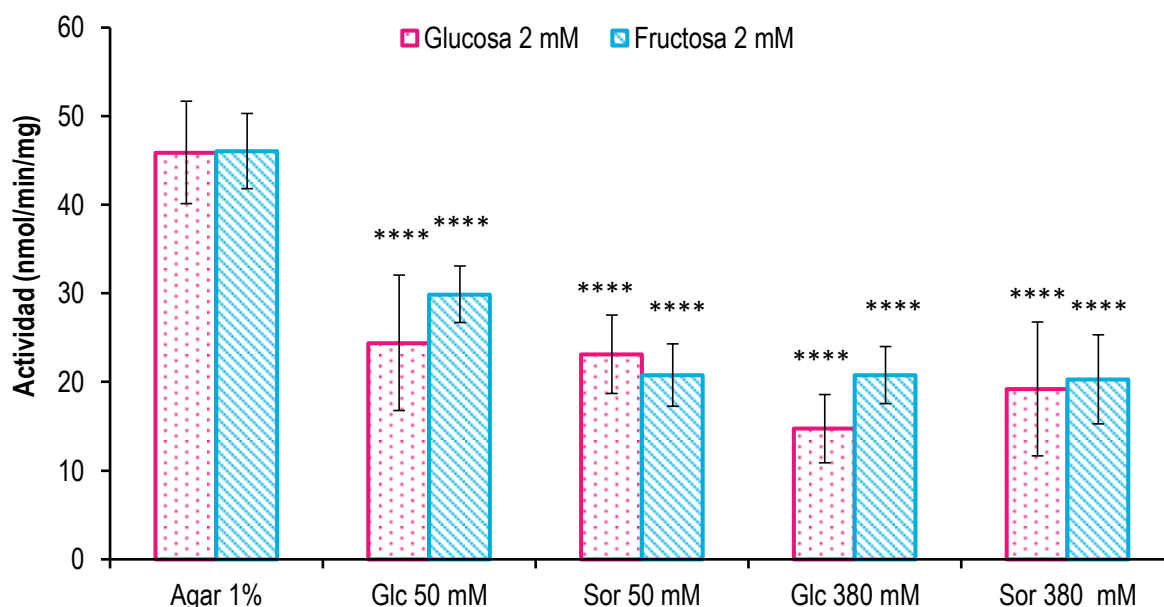


**Figura 41. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de HXK de la fracción mitocondrial.**

Los embriones fueron embebidos durante 24 h en ausencia (A= Agar 1%) o presencia de Glucosa (Glc) y Sorbitol (Sor) a concentraciones de 50 y 380 mM. **A)** Actividad determinada *in vitro* de HXK de la fracción mitocondrial, para la reacción enzimática se utilizaron 40 µg de proteína. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. **B)** Actividad de HXK detectada en gel nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el control de carga se corrieron en un gel de poliácridamida-SDS 25 µg de proteína de la fracción mitocondrial, posterior al corrimiento, el gel fue teñido con azul de Coomassie. En la gráfica **A)** se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes (n=3) con tres

repeticiones cada uno. No se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

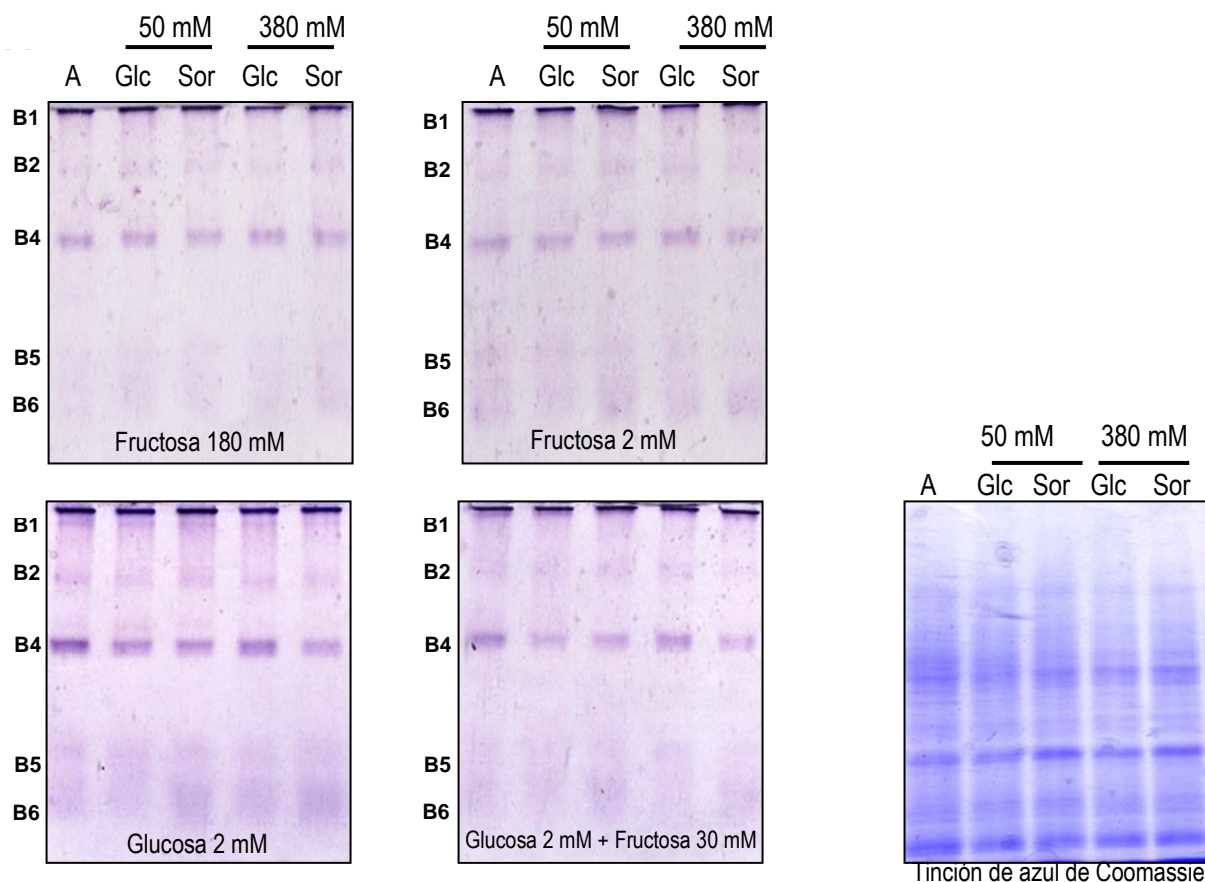
En la fracción citosólica, la actividad de HXK disminuyó entre un 45 y 55% tanto con Glucosa como con Sorbitol, a las dos concentraciones probadas. Debido a que el Sorbitol también redujo la actividad se sugiere que el efecto observado fue de tipo osmótico (Figura 42).



**Figura 42. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones.**

Se obtuvieron las fracciones citosólicas de embriones de maíz embebidos por 24 h en Glucosa o Sorbitol a dos distintas concentraciones. El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno. \*\*\*\*Diferencias significativas (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

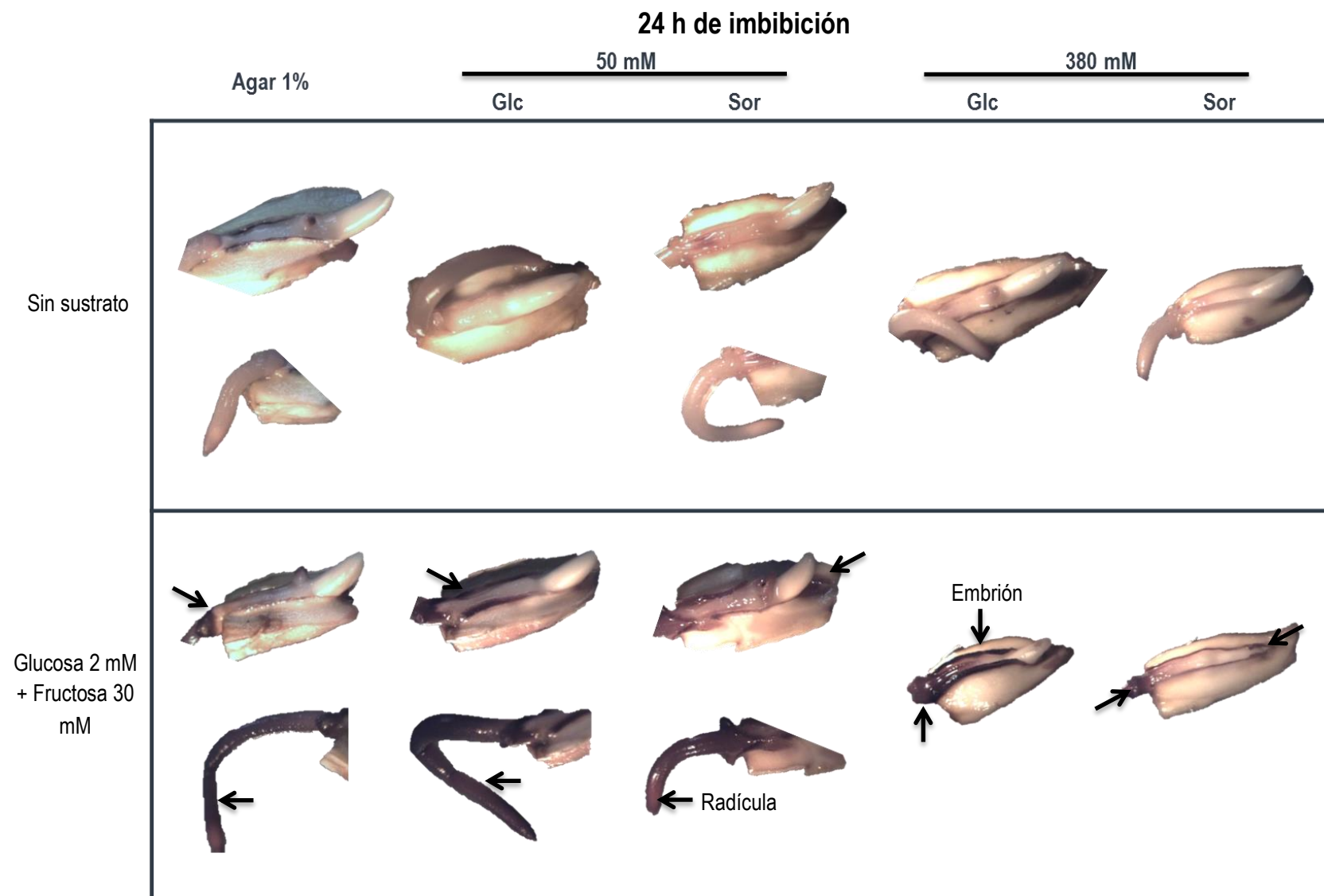
En los geles nativos, se observó que la actividad de HXK de la banda B4 revelada con Glucosa fue la que presentó un comportamiento similar al encontrado en la actividad de HXK determinada *in vitro*, mayor actividad en agar que con carbohidratos (Figura 43), aunque la disminución no fue tan pronunciada. Con los otros sustratos, no se logró distinguir la diferencia entre la intensidad de las bandas de las fracciones obtenidas de embriones embebidos con carbohidratos comparadas con las de los que fueron embebidos solamente en agar (Figura 43).



**Figura 43. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de HXK de la fracción citosólica.**

Los embriones fueron embebidos durante 24 h en ausencia (A= Agar 1%) o presencia de Glucosa (Glc) y Sorbitol (Sor) a concentraciones de 50 y 380 mM. Actividad de HXK detectada en gel nativo al 12% usando los sustratos indicados. Para el de cargado de proteína en SDS-PAGE al 12%, se corrieron 60 µg de proteína de la fracción citosólica y posterior al corrimiento electroforético se tiñó el gel con azul de Coomassie.

En cuanto a la localización de la HXK en el embrión, se encontró que tanto en los embriones embebidos en agar como en bajas concentraciones de carbohidratos, la actividad de HXK fue alta en la radícula; mientras que en los embriones incubados en 380 mM de Glucosa o Sorbitol, la actividad se encontró principalmente alrededor del eje. Contrario al efecto de ABA, sí se detectó actividad de HXK en la radícula, pese a que la longitud de la radícula es pequeña (Figura 44).

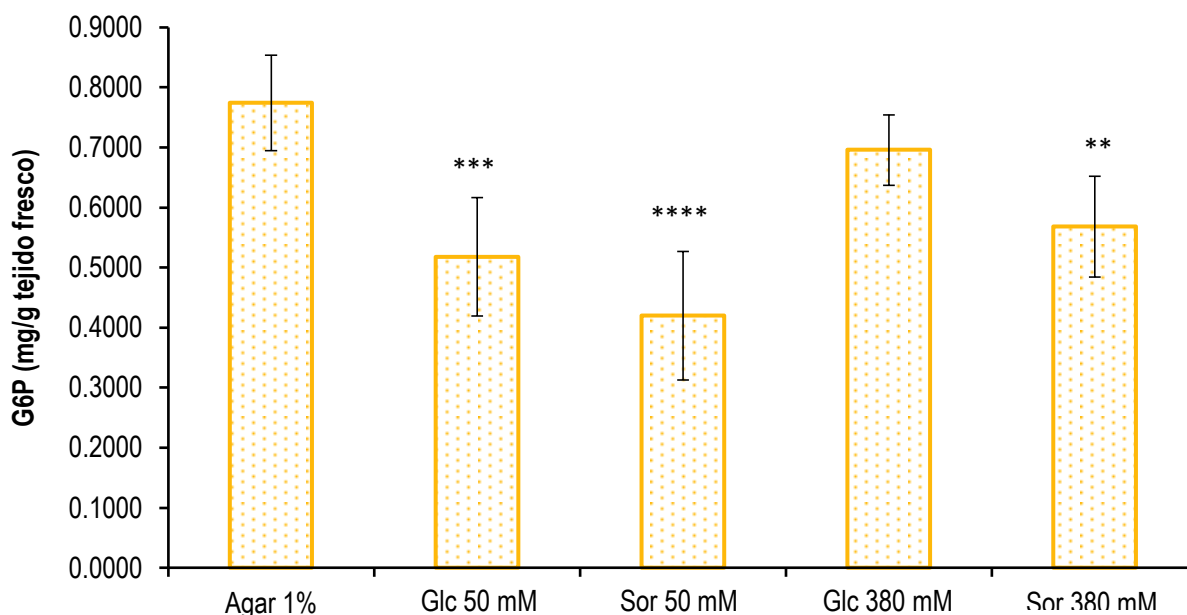


**Figura 44. Efecto de Glucosa y Sorbitol en la localización y actividad de la HXK.**

Las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de HXK (Flechas). Para cada reacción, los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM. La zona de mayor actividad se localizó en la radícula.

### Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la concentración de G6P.

En vista de que el tratamiento de Sorbitol y Glucosa reducen más la actividad de la HXK de la fracción citosólica que lo que hace ABA, se cuantificó si este efecto también modificaba la cantidad de G6P. Se encontró la cantidad de este metabolito se redujo, un 45% para las concentraciones bajas de Glucosa y Sorbitol; y un 27 % para la concentración más alta de Sorbitol (Figura 45). Estos resultados indican que en presencia de carbohidratos sí alteró el metabolismo de la célula embrionaria y lo hizo de manera diferente que ABA en la germinación.



**Figura 45. Cuantificación de G6P.**

Embriones embebidos durante 24 h en presencia de diferentes concentraciones de Glucosa (Glc) ó Sorbitol (Sor). La cuantificación de G6P se realizó mediante un ensayo acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en tres experimentos independientes ( $n=3$ ) con tres repeticiones cada uno. \*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

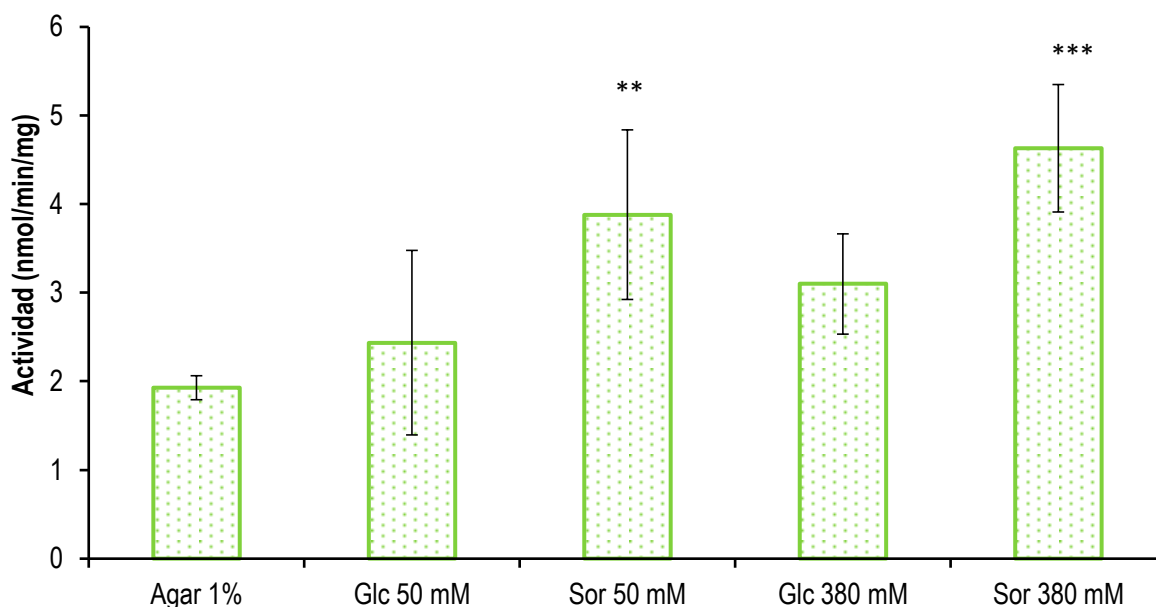
### Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de G6PDH.

Para determinar porqué la poza de G6P estaba disminuida, se midieron las actividades de las enzimas G6PDH, GAPDH y PK en las fracciones citosólicas de los embriones embebidos en Glucosa y Sorbitol. La primera enzima directamente usa a la G6P, mientras que las otras dos son parte de la vía glucolítica y que determinarían si se afectó la vía o no.

En el caso de la G6PDH, se encontró que los tratamientos de Glucosa 50 y 380 mM no modificaron la actividad de la enzima, sin embargo los tratamientos con Sorbitol (50 y 380



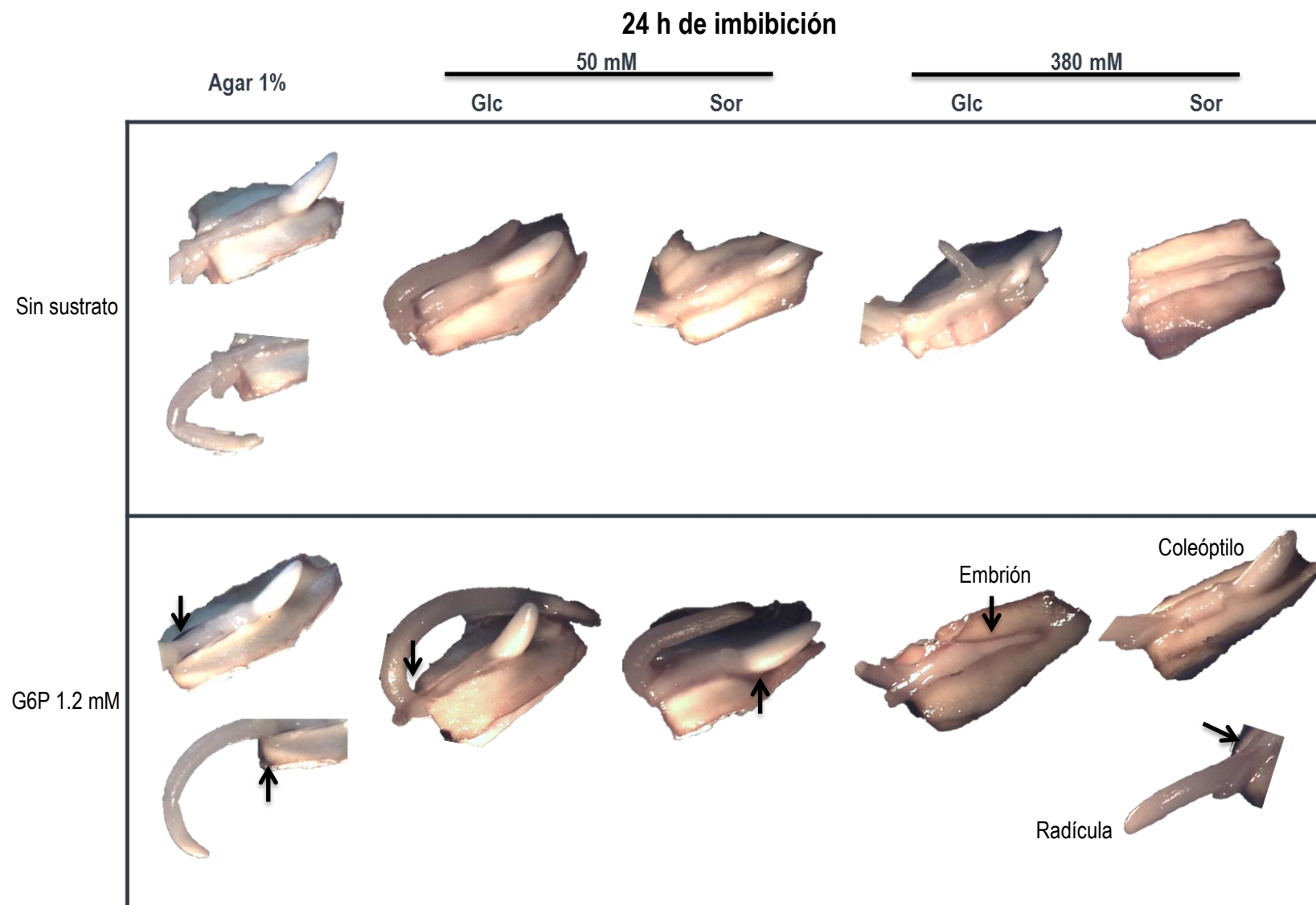
mM), incrementaron al doble la actividad de la G6PDH (Figura 46). Efecto similar al que ABA produjo en la enzima (Figura 35).



**Figura 46. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de G6PDH.**

Actividad determinada en embriones embebidos durante 24 h en presencia de diferentes concentraciones de Glucosa (Glc) ó Sorbitol (Sor). El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en dos experimentos independientes ( $n=2$ ) con tres repeticiones cada uno. \*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

A pesar del aumento en la actividad de la enzima con Sorbitol, no se logró detectar mediante la reacción *in situ* una diferencia en la intensidad o localización en el embrión bajo ninguno de los tratamientos probados (Figura 47).

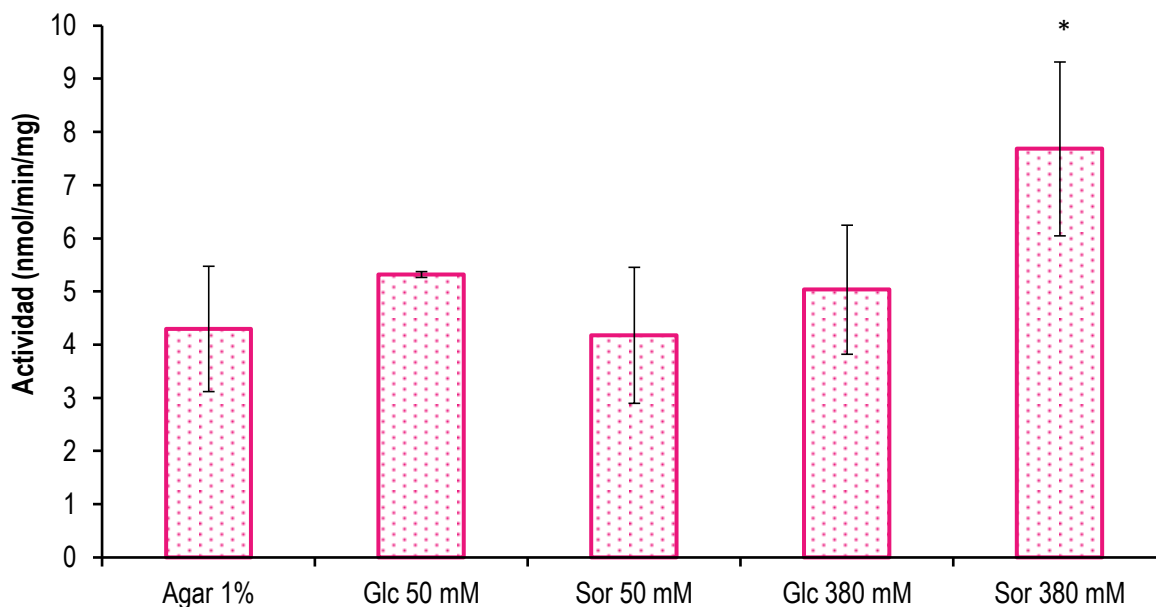


**Figura 47. Efecto de Glucosa y Sorbitol en la localización y actividad de la G6PDH.**

Las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de G6PDH (Flechas). Para cada reacción, los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de sustrato (sin sustrato y G6P 1.2 mM, respectivamente).

### Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de GAPDH.

Para el caso de la actividad de GAPDH, se encontró que no hubo diferencias entre los embriones tratados con Glucosa o con Sorbitol a cualquiera de las concentraciones probadas, excepto para el caso de 380 mM Sorbitol, donde se duplicó la actividad (Figura 48) alcanzando un valor similar a lo que se obtuvo cuando los embriones fueron embebidos en presencia de ABA 50  $\mu$ M (Figura 37).

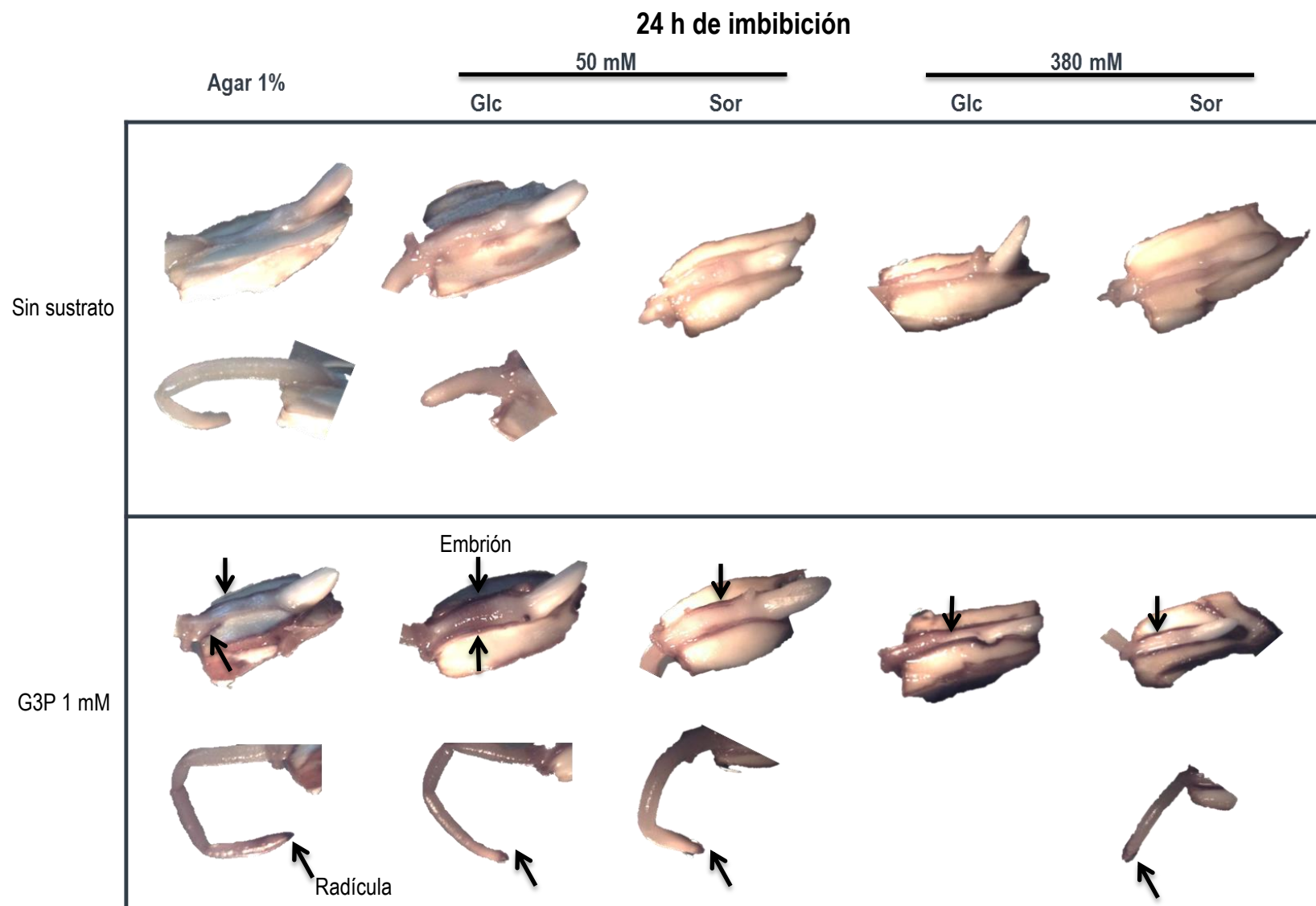


**Figura 48. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de GAPDH.**

Actividad determinada en embriones embebidos durante 24 h en presencia de diferentes concentraciones de Glucosa (Glc) o Sorbitol (Sor). El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADPH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en dos experimentos independientes ( $n=2$ ) con tres repeticiones cada uno.\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.05$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

Por otra parte, se encontró que aquellos embriones tratados con 50 mM de carbohidrato, presentaron la misma localización que los embriones embebidos en agar al 1%: alrededor del eje embrionario y en el ápice de la radícula (Figura 49).

Sin embargo, para los embriones incubados con 380 mM de carbohidrato, se observó que la actividad se intensificó, y se encontró distribuida en la zona del escutelo colindante con el endospermo y alrededor del eje embrionario (Figura 49), muy similar a lo que se observó en el tratamiento con ABA 50  $\mu$ M (Figura 38).



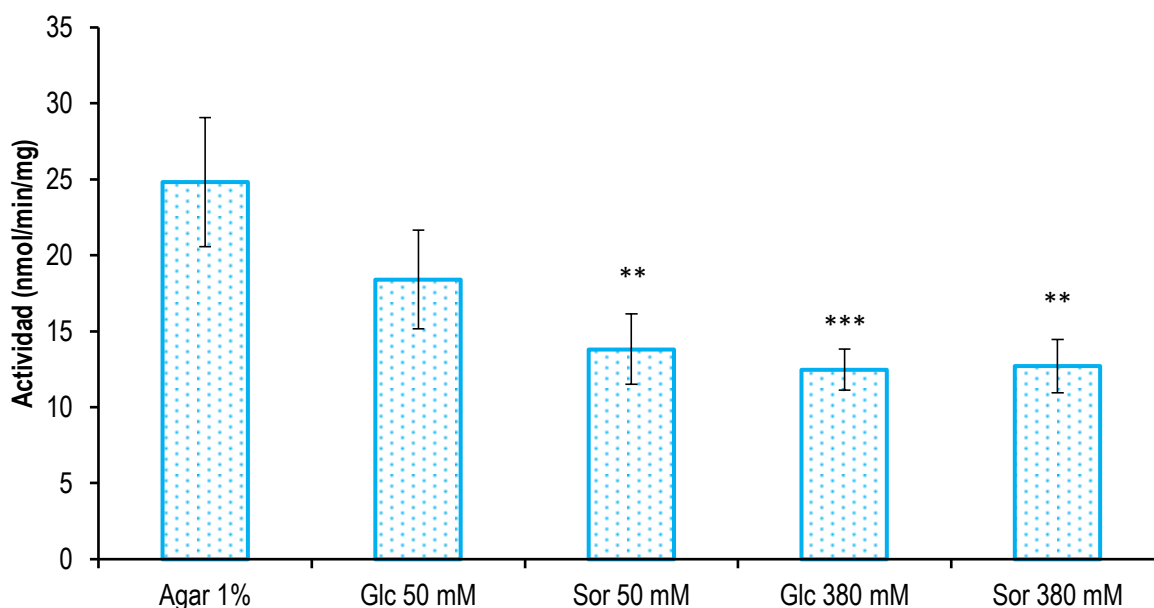
**Figura 49. Efecto de Glucosa y Sorbitol en la localización y actividad de la GAPDH.**

Las regiones teñidas de azul corresponden a la actividad de GAPDH (Flechas). Para cada reacción, los embriones fueron incubados en ausencia o presencia de sustrato (sin sustrato y G3P 1 mM, respectivamente).

### Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de PK.

En este caso, se obtuvo que todos los tratamientos probados indujeron una disminución en la actividad de PK, siendo Sorbitol a cualquiera de las concentraciones y Glucosa a la concentración de 380 mM las que produjeron una reducción más pronunciada (cerca del 50% en la actividad determinada *in vitro*) (Figura 50). Sin embargo, la disminución en la actividad de la PK no fue tan pronunciada a la que el ABA produjo en los embriones (Figura 39).

Por lo anterior, es probable que la reducción en la G6P observada cuando los embriones se embebieron en carbohidratos, se debiera a que tanto la vía de las pentosas como la glucolítica estuvieran más activas; lo cual constituye un efecto distinto al que ocasionó el ABA.



**Figura 50. Efecto de Glucosa y Sorbitol sobre la actividad de PK.**

Actividad determinada en la fracción citosólica de embriones embebidos durante 24 h en diferentes concentraciones de Glucosa (Glc) ó Sorbitol (Sor). El producto de la reacción se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la disminución de NADH. En la gráfica se muestran los valores de las medias  $\pm$  DE en dos experimentos independientes (n=2) con tres repeticiones cada uno. \*\* Diferencia significativa (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett,  $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ) con respecto a los embriones embebidos en agar al 1%.

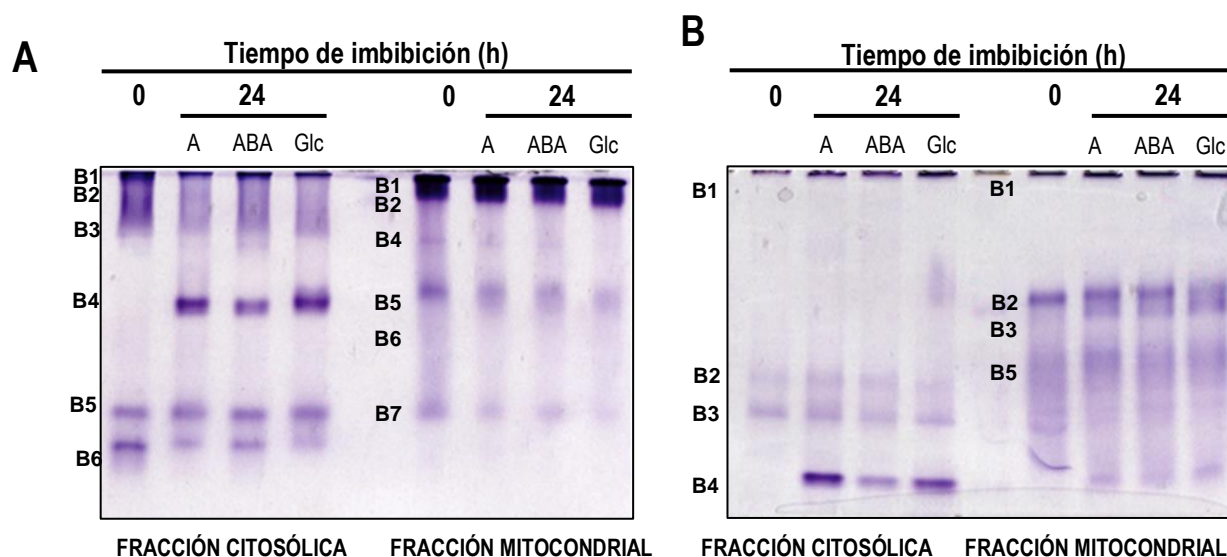
### Comparación de los patrones de isoformas de HXKs citosólicas y mitocondriales generados por la adición exógena a los embriones de ABA y Glucosa.

Finalmente, se decidió realizar una comparación entre las isoformas de HXKs que se observaban tanto en los dos diferentes tratamientos, Glucosa 50 mM y ABA 50  $\mu$ M, como en

los diferentes tiempos de germinación (0 y 24 h) y en los 2 compartimientos celulares examinados, citosol y mitocondria. Para ello se corrieron tanto geles nativos al 12% (Figura 51), similares a los mostrados a lo largo de esta sección y también se corrieron geles en gradiente de 4-20%, para separar más las bandas de actividad.

Se encontró que la isoforma citosólica de los embriones que hemos denominado banda B4 y que presentó una actividad reducida cuando los embriones fueron embebidos en ABA, tuvo el mismo Rf que la isoforma que disminuyó cuando los embriones se embebieron en carbohidratos (Tabla 12 y Figura 51). Además, esta fue la misma isoforma que no se detectó en el embrión seco y que incrementó su actividad durante el proceso de germinación (Figuras 16 y 51).

Se sospechaba que la banda B4 de la fracción citosólica pudiera ser la misma que la banda B5 de la fracción mitocondrial, sin embargo no fue así, ya que esta última isoforma tuvo un Rf menor (Tabla 12) y además se presentó en forma de barrido y no como una banda nítida, tanto en el gel al 12% como en el de gradiente (Figura 51).



**Figura 51. Comparación del corrimiento electroforético de las HXKs de las fracciones citosólicas y mitocondriales de embriones secos y embebidos en ABA y Glucosa (Glc).**

**A)** Gel nativo de poliacrilamida al 12% y **B)** gel nativo de poliacrilamida 4-20%. Ambos geles se revelaron por actividad usando como sustratos Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM.

**Tabla 12. Rf de las isoformas de HXK de las fracciones citosólicas y mitocondriales.** Se muestran los Rf de las bandas que se detectaban en el mayor número de los tratamientos o sustratos de la enzima.

	0 h	24 h Germinación				0 h	24 h Germinación		
Citosol		Agar 1%	50 $\mu$ M ABA	50 mM Glucosa	Mitocondria		Agar 1%	50 $\mu$ M ABA	50 mM Glucosa
B1	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	B1	0.01667	0.01667	0.01667	0.01667
B2	ND*	0.0833	0.0833	0.0833	B2	0.05000	0.05000	0.05000	0.05000
B3	0.1667	0.1667	0.1667	0.0000	B4	0.15000	0.15000	0.15000	0.15000
B4	ND*	0.3167	0.3167	0.3167	B5	0.26667	0.28333	0.28333	0.28333
B5	0.5667	0.5667	0.5667	0.5667	B6	0.58333	0.58333	0.58333	0.58333
B6	0.6500	0.6500	0.6500	0.6500					

\*ND significa no detectada.

En el gel en gradiente, se obtuvo un patrón de isoformas diferente, comparado con el gel al 12%, probablemente debido a una mayor y mejor separación de las bandas, ya que en el gel al 12% se empacaban las bandas cercanas al gel concentrador. Así, la disminución de la actividad en la banda que se había denominado banda B4 anteriormente (embriones tratados con ABA), fue más evidente; al igual que el efecto ocasionado por la adición exógena de carbohidratos. Una manera de confirmar que se trataba de la banda B4, fue que esta no se observó en el embrión seco pero sí en los otros tratamientos (Figura 51).

En la fracción mitocondrial fue evidente que el número de isoformas arriba de la banda B4, fue mayor en el gel en gradiente que en el gel al 12% de poliacrilamida, ya que en éste último se observó un barrido intenso cercano al gel concentrador. Claramente las bandas arriba de la banda B4 fueron más en las fracciones mitocondriales que las encontradas en las fracciones citosólicas, sin embargo a pesar de observarse más bandas, parece que los tratamientos que no modificaron dicho patrón ni en intensidad, ni en número.

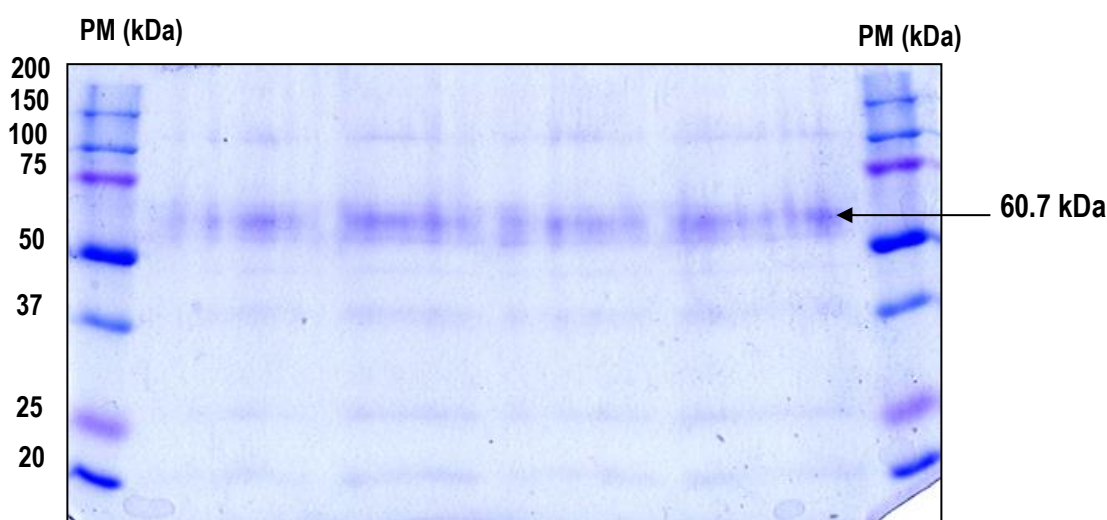
En resumen, las bandas de actividad de HXK detectadas en el gel, fueron diferentes en ambas fracciones subcelulares y la banda B4 de la fracción citosólica fue la que más cambió con los tratamientos realizados a los embriones.

### Identificación de las isoformas de HXK.

Debido a que en ese momento se desconocía cual era la diferencia entre las proteínas de las diferentes bandas de actividad reveladas en nuestro ensayo en gel para HXK, y a que se

desconoce el número de HXKs activas en maíz, se decidió realizar la identificación de las bandas que se revelaban en el gel de actividad.

Debido a que la banda B4 de la fracción citosólica mostró modulación tanto por ABA como por carbohidratos, se decidió que era una isoforma importante para aislar e identificar. Por ello, la banda se cortó del gel nativo, se mezcló con amortiguador de mezcla y se corrió en un gel desnaturalizante (Figura 52), y de éste gel se cortó la banda con un peso molecular de 60 kDa (esperado para la HXK) y se envió a identificar al centro de proteómica del Centro Médico de la Universidad de Texas en Galveston, UTMB por sus siglas en inglés.



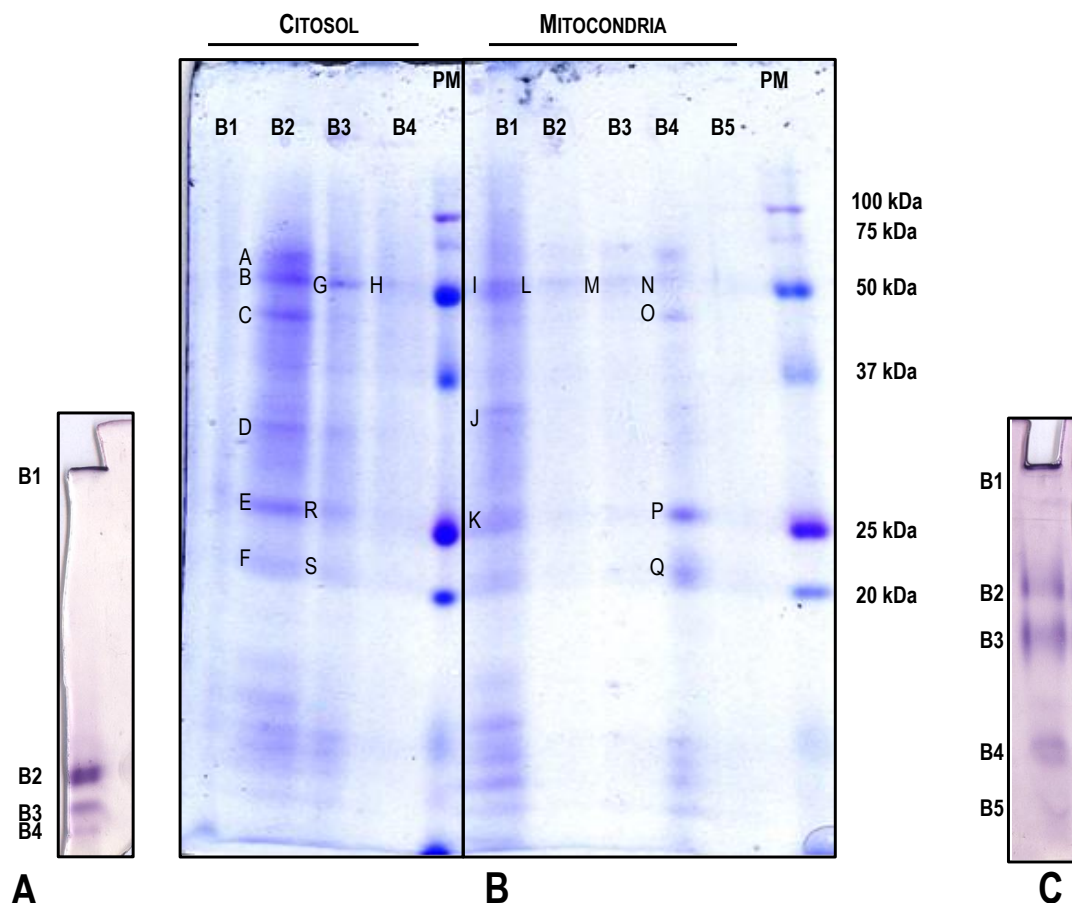
**Figura 52. SDS-PAGE de la banda B4 de la fracción citosólica.**  
La banda que se envió a identificar tenía un PM aproximado de 60 kDa.

El reporte del análisis por espectrometría de masas de la banda enviada, indicó que en la banda enviada se encontraba la vicilina, una proteína de almacenamiento de maíz. El alineamiento de los péptidos identificados arrojó el mismo resultado.

Puesto que solo se envió una banda, se decidió realizar nuevamente el aislamiento pero ahora de las bandas B1, B2, B3 y B4 de la fracción citosólica y las bandas B1, B2, B3, B4 y B5 de la fracción mitocondrial. Además, dado que se había observado que en los geles de gradiente se obtenía una mejor separación de las isoformas (Figura 51), en esta ocasión, las bandas se aislaron de este tipo de geles (Figura 53 A y C). Se cortaron las bandas de interés y se sometieron a un proceso de elución para eliminar la acrilamida y posteriormente se concentraron y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 15% (Figura 53). Se enviaron a



identificar las muestras indicadas con letras en la Figura 53C, al centro de proteómica de la UTMB.



**Figura 53. Corrimiento electroforético de las proteínas citosólicas y mitocondriales de embriones de maíz.**

Geles de gradiente de poliácridamida del 4 al 20% en los cuales se corrieron las fracciones **A)** citosólicas y **C)** mitocondriales, la banda de actividad se reveló en presencia de Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM como sustratos y en solo uno de los carriles del gel y el resto del gel se guardó para posteriormente cortar a la distancia en la que se revelaran las bandas que se indican en los geles. Las bandas de acrilamida cortadas se sometieron a un proceso de elución para eliminar la acrilamida y posteriormente se corrieron en un gel de poliácridamida-SDS. Las proteínas en el gel en **B)** fueron teñidas con azul de Coomassie. PM es el estándar de peso molecular

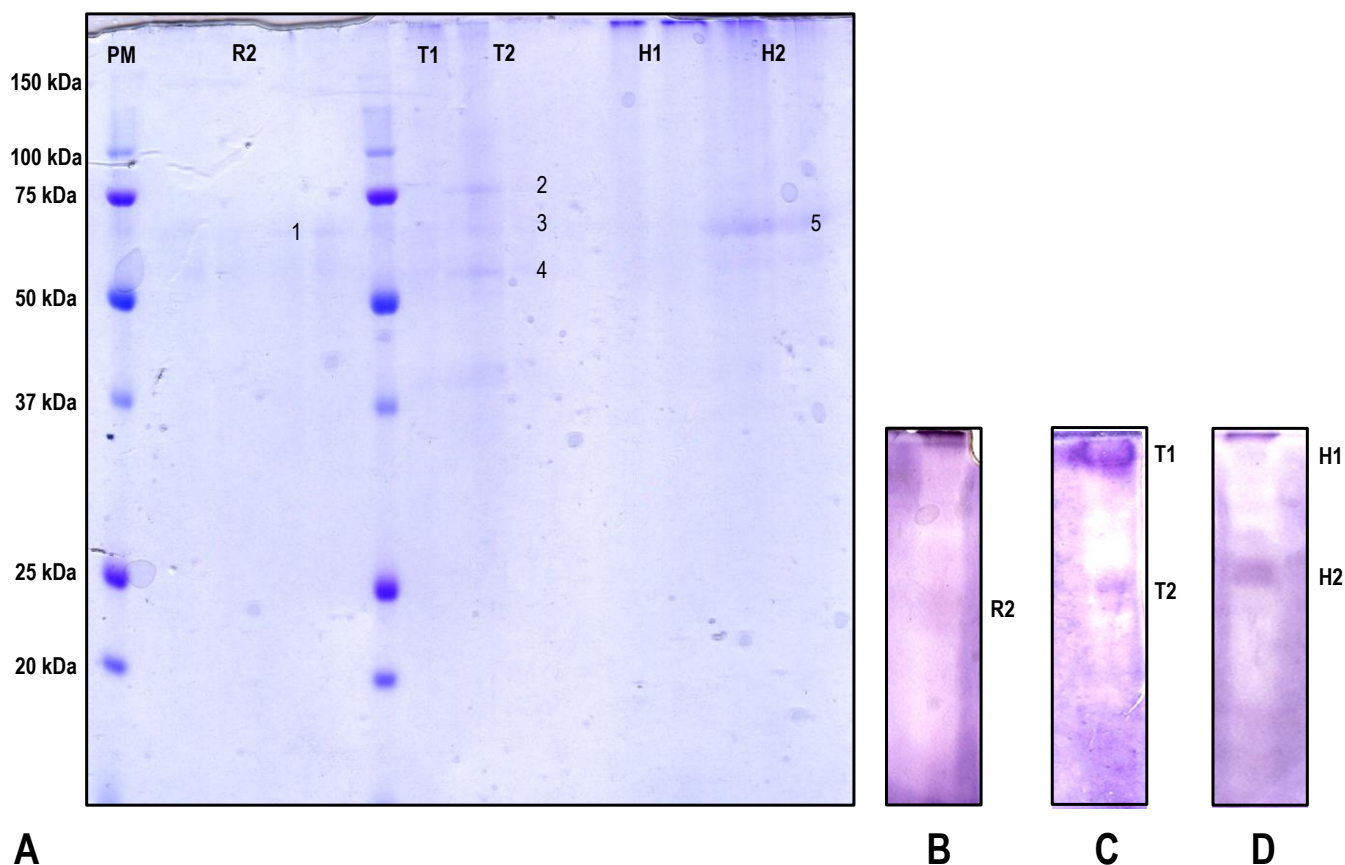
Los resultados obtenidos no indicaron la presencia de alguna HXK (Tabla 13). La proteína más abundante fue nuevamente una proteína de reserva, en este caso la globulina-1. Esta proteína, al ser de ser reserva, se encuentra en gran cantidad en las semillas; por ello, se decidió utilizar otro tipo de tejido para extraer la fracción citosólica, se usaron raíces, tallos y hojas de una planta de 2 meses de edad. De esta manera, se pretendía eliminar la interferencia por la globulina en el proceso de identificación.

**Tabla 13. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en extractos crudos de embriones germinados de maíz.**

Los nombres de las muestras corresponden a las bandas indicadas en la Figura 53. En esta ocasión, no se pudieron analizar los péptidos obtenidos por tripsinización, ya que solo se nos proporcionó el nombre de las proteínas identificadas.

Compartimento celular	Muestra		No. de acceso	PM (Da)	Proteína
Citosol	B2	A	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		B	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		C	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		D	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		E	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		F	P08735	36500	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica OS=Zea mays GN=GAPC1 PE=2 SV=2
	B3	G	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		R	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		S	Q09054	36519	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica OS=Zea mays GN=GAPC1 PE=2 SV=2
	B4	H	Q9SY12	35345	Proteína At4g02870 con dominio B3 OS=A. thaliana GN=ARF42 PE=2 SV=1
Mitocondria	B1	I	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		J	Q9LRQ1	9603	Proteína Putativa At3g29740 con dominio BTB/POZ OS=A. thaliana GN=At3g29740 PE=3 SV=1
		K	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
	B2	L	Q9LRL9	30258	Proteína putativa secretora rica en cisteína OS=A. thaliana GN=CRRSP20 PE=5 SV=2
	B3	M	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
	B4	N	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		O	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		P	P15590	64990	Globulina-1 alelo S OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
		Q	A8SEG5	225072	Proteína putativa de membrana ycf1 OS=Ceratophyllum demersum GN=ycf1 PE=3 SV=1

Nuevamente se corrieron geles de acrilamida en condiciones nativas con las fracciones citosólicas pero ahora de raíces, tallos y hojas (Figura 54). Se aislaron las bandas de interés y se sometieron a un proceso de elución. Posteriormente, se realizó un SDS-PAGE y las muestras se enviaron a identificar al departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández.



**Figura 54. Corrimiento electroforético de las proteínas citosólicas y mitocondriales de plantas de maíz de 2 meses de edad.**  
**A)** Gel de poliacrilamida-SDS de las bandas obtenidas de las fracciones citosólicas de **B) Raíces C) Tallos y D) Hojas**. Las proteínas en el gel en A fueron teñidas con azul de Coomassie, mientras que en B, C y D se reveló la actividad de HXK en los geles de poliacrilamida nativos al 12% en presencia de Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM como sustratos.

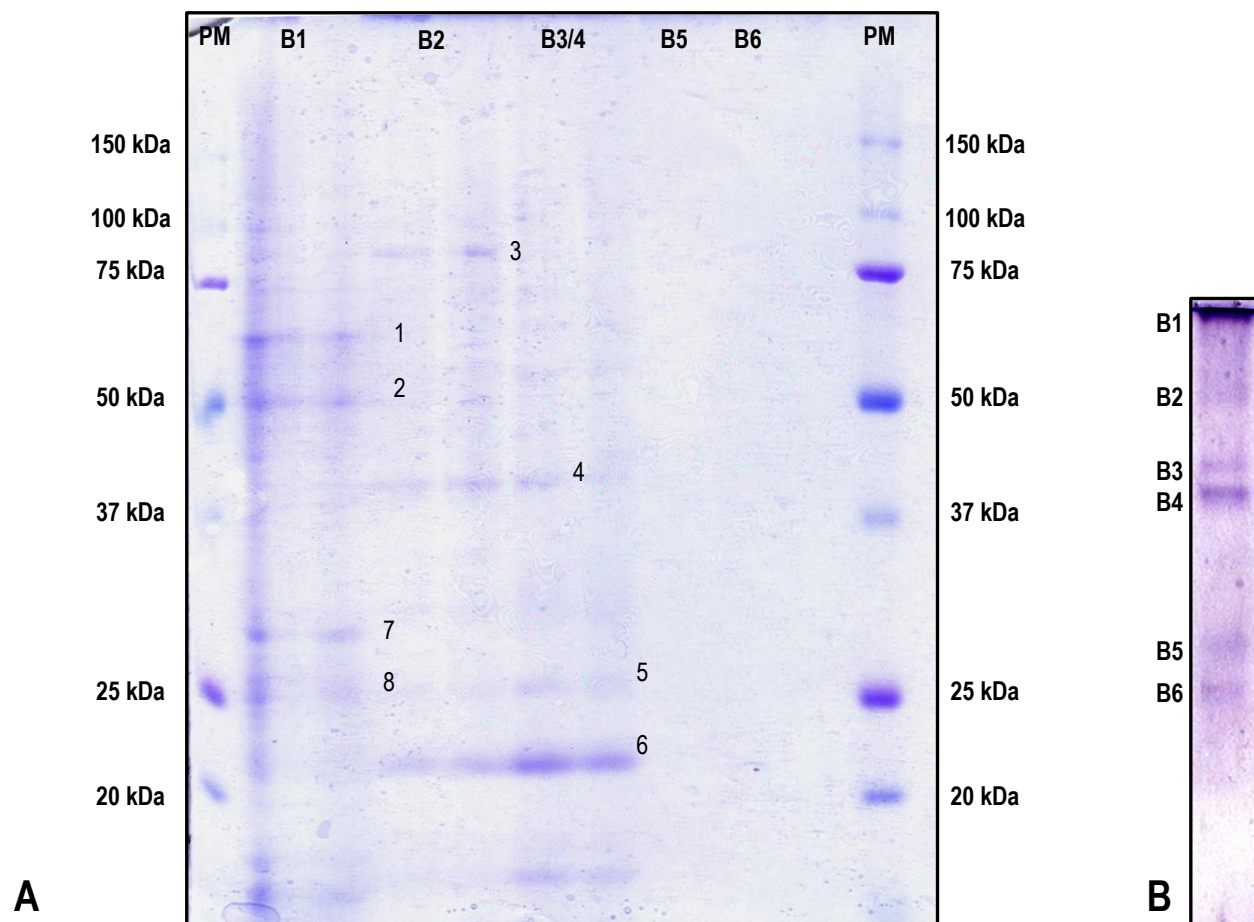
En el caso de las muestras provenientes de la planta, se logró eliminar la contaminación por vicilina, sin embargo, la cantidad de proteína obtenida fue muy baja e incluso hubo contaminación con queratina (únicamente en el caso de las raíces) y no se encontró ninguna HXK (Tabla 14).

**Tabla 14. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en extractos crudos de plantas de maíz de 2 meses de edad.**

Los nombres de las muestras corresponden a las bandas indicadas en la figura 17. Los péptidos obtenidos por tripsinización no correspondieron a ninguna HXK.

Compartimento celular	Muestra		No. De acceso	PM (Da)	Proteína	Cobertura (%)
Citosol	R2	1	gi 375314771	66013	Queratina [Homo sapiens]	31
	T2	2	gi 363543167	75463	Fenilalanina amonio-liasa [Zea mays]	42
		3	gi 363543167	75463	Fenilalanina amonio-liasa [Zea mays]	23
		4	gi 363543167	75463	Fenilalanina amonio-liasa [Zea mays]	25
	H2	5	gi 194688810	69775	Desconocida [Zea mays]	58

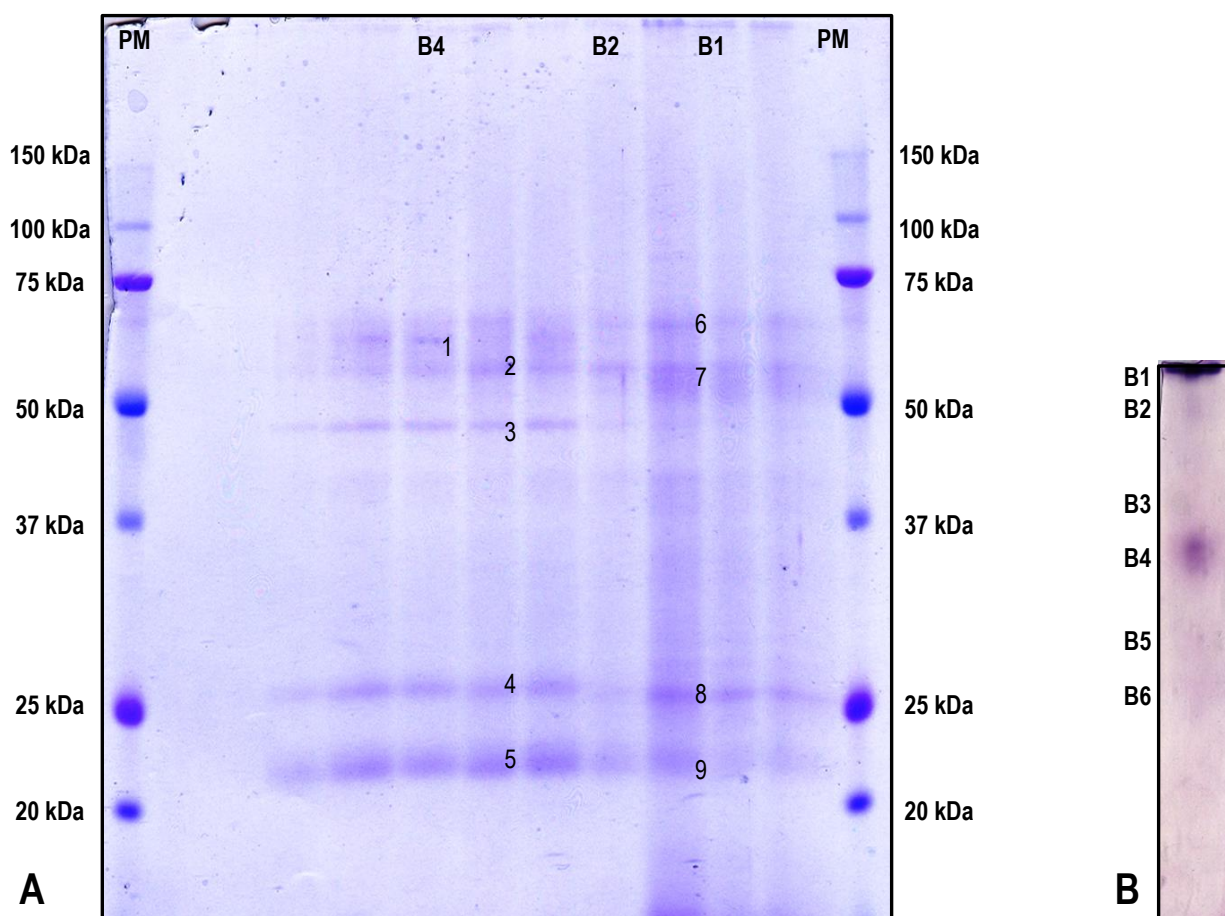
De manera paralela a lo anterior se corrieron nuevamente las bandas de la fracción citosólica (Figura 55) y de la fracción mitocondrial de embriones de maíz (Figura 56).



**Figura 55. Corrimiento electroforético de las proteínas citosólicas de embriones de maíz.**



A) Gel de poliácridamida-SDS de las bandas de actividad de las fracciones citosólicas detectadas en un gel nativo B). Las proteínas en el gel en A fueron teñidas con azul de Coomassie, mientras que en B se reveló la actividad de HXK en los geles nativos al 12% en presencia de Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM como sustratos.



**Figura 56. Corrimiento electroforético de las proteínas mitocondriales de embriones de maíz.**

A) Gel de poliácridamida-SDS de las bandas obtenidas de las fracciones mitocondriales. B) Las proteínas en el gel en A fueron teñidas con azul de Coomassie, mientras que en B se reveló la actividad de HXK en los geles nativos al 12% en presencia de Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM como sustratos.

Nuevamente, tanto en las muestras de las fracciones mitocondriales como citosólicas no se logró identificar a alguna HXK. En el caso de las muestras mitocondriales se encontró que la globulina era la proteína más abundante. Aunque en las muestras citosólicas no se encontró a la HXK, sí se encontró una enzima glucolítica (Tabla 15).

Por lo anterior, se propone que en experimentos posteriores se lleve a cabo la purificación de la HXK proveniente de radículas de embrión, para obtener una cantidad suficiente para enviarla a identificar.

**Tabla 15. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en extractos crudos de embriones germinados de maíz.**

Los nombres de las muestras corresponden a las bandas indicadas en las figura 18 y 19. Los péptidos obtenidos por tripsinización no correspondieron a ninguna HXK.

Compartimento celular	Muestra		No. De acceso	PM (Da)	Proteína	Cobertura (%)
Mitocondria	B4	1	gi 162463479	64990	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	67
		2	gi 162463479	64990	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	12
		3	gi 228310	49892	Globulina 2 [Zea mays]	30
		4	gi 228310	49892	Globulina 2 [Zea mays]	40
		5	gi 228310	49892	Globulina 2 [Zea mays]	45
	B1	6	gi 162463479	64990	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	21
		7	gi 162463479	64990	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	21
		8	gi 228310	49892	Globulina 2 [Zea mays]	35
		9	gi 228310	49892	Globulina 2 [Zea mays]	33
Citosol	B1	1	gi 162461243	61598	Malato sintasa, glioxisoma [Zea mays]	67
		2	gi 195620072	49192	Factor de elongación 1-alfa [Zea mays]	40
		7	gi 2345154	30152	Proteína ribosomal S4 [Zea mays]	65
		8	gi 195658011	49933	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	29
	B2	3	gi 16797785	90396	Sacarosa sintasa [Zea mays]	29
	B3/4	4	gi 194690156	38566	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, citosólica [Zea mays]	41
		5	gi 195658011	49933	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	41
		6	gi 195658011	49933	Precursor de Globulina 1 alelo S [Zea mays]	46

## DISCUSIÓN.

### **La actividad de HXK y la vía glucolítica en la germinación.**

La reacción catalizada por la HXK, representa el primer paso para la incorporación de las hexosas en la respiración o bien, en vías que generen cofactores o precursores biosintéticos tanto en plantas como en animales (Claeyssen y Rivoal, 2007). En este trabajo, se encontró que la actividad de HXK citosólica se incrementó conforme transcurrió la germinación (Figura 15), y que fue coincidente con el perfil de aumento de la banda de actividad B4 de HXK detectada en los geles nativos (Figura 16). El incremento en la actividad de HXK podría explicarse ya que, durante la germinación ocurre la movilización de los nutrientes almacenados en el propio embrión, entre los que se encuentran la Sacarosa, la Glucosa, la Fructosa, los péptidos y aminoácidos (Nonogaki, 2006; Sanchez-Linares *et al.*, 2012), todos ellos, sustratos respirables o bien esqueletos para la biosíntesis de macromoléculas. Así, durante la germinación se requiere de una gran actividad de la HXK con el fin de suministrar de hexosas fosforiladas a las diferentes vías metabólicas que se activan durante la germinación, como por ejemplo, la vía de las pentosas-fosfato que genera NADPH para su uso en las reacciones biosintéticas y que además provee de carbohidratos componentes de la pared celular y Ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos (Claeyssen y Rivoal, 2007).

Aunque los péptidos y aminoácidos son una reserva de nutrimentos que puede inmediatamente usarse en la mitocondria a través del ciclo de Krebs y así prescindir de la vía glucolítica, estos son esencialmente utilizados para la síntesis de proteínas, lo anterior se debe a que la poza de nitrógeno se recambia entre aminoácidos a proteínas y/o nucleótidos, además de que los péptidos y aminoácidos son una reserva que se encuentra localizada principalmente en los endospermos y cotiledones o escutelos, por lo que para ser usados por el tejido en crecimiento (el eje embrionario), deben transportarse a expensas del gradiente electroquímico de protones, proceso dependiente de ATP y de transportadores que se expresan conforme avanza la germinación (Waterworth *et al.*, 2000; Stacey *et al.*, 2006).

Otra reserva importante en las semillas son los lípidos, que en los embriones de maíz son abundantes (47% de su peso), éstos pueden ser una fuente importante de carbono respirable al inicio de la germinación. Conforme la germinación avanza, el carbono de los lípidos ya no

es solo usado en el ciclo de Krebs, sino que es convertido en carbohidratos en los escutelos del maíz. Se ha observado que la biogénesis de los glioxisomas en los escutelos del maíz comienza a partir del primer día de ser embebidos, con el máximo de las actividades de las enzimas del ciclo a los 4 días de germinación (Oaks y Beevers, 1964; Longo y Longo, 1970), por lo que estos esqueletos de carbono provenientes de los lípidos y convertidos a carbohidratos son utilizados durante la fase post-germinativa. En *A. thaliana* se ha encontrado que la deficiencia en varias lipasas o en las dos enzimas clave del ciclo del glioxilato, la malato sintasa o la isocitrato liasa, no son indispensables para que la germinación ocurra, aunque sí son importantes para el establecimiento de la planta (Eastmond y Graham, 2001; Kelly *et al.*, 2011).

Por lo anterior, la energía disponible para la biosíntesis de macromoléculas a tiempos cortos de hidratación puede provenir tanto del acetil-CoA proveniente de la  $\beta$ -oxidación de los lípidos o bien del metabolismo de los carbohidratos a través de la glucólisis.

Una evidencia, que soporta que la glucólisis tendría que proceder, es el que la cantidad de G6P en los embriones secos fue alta (Figura 33), molécula que estaría disponible para el metabolismo una vez que la semilla se hidrata; posteriormente, la cantidad de G6P disminuyó, un 50% a partir de las 8 h permaneciendo constante en dicho nivel hasta las 24 h de imbibición. Algunas de las vías que podrían usar la G6P incluyen a la glucólisis, la vía de las pentosas, la síntesis de componentes de la pared celular, entre otras. Se midieron dos enzimas de la vía glucolítica además de la HXK, esta última aumentó 2 veces su actividad del estado seco o tiempo 0 a las 24 h de imbibición (Figura 15). La GAPDH tuvo una actividad de 6.65 y 4.30 nmol G3P/min/mg; a las 0 y 24 h de imbibición respectivamente (Figura 37); y por último, la PK que presentó una actividad de 4.76 y 40.80 nmol fosfoenolpiruvato/min/mg; a las 0 y 24 h de imbibición (Figura 39), concretamente un aumento aproximado de 10 veces. Lo anterior indica que el paso del estado seco al hidratado promueve el catabolismo de las hexosas a través de la vía glucolítica. Aunque también encontramos que la actividad de la G6PDH no fue detectable al tiempo cero de imbibición, pero llegó a 4.39 nmol G6P/min/mg a las 24 h (Figura 35); esto último sugiere que la vía de las pentosas fosfato también se encuentra funcional y comienza después de que el embrión ha sido hidratado.



### Actividad de HXK en la zona radicular.

Por otra parte, la mayor actividad de HXK se localizó en la radícula (Figura 18), primer tejido en emerger del embrión. En *A. thaliana*, la inhibición del crecimiento radicular debido a Glucosa es mediado por la capacidad sensora de carbohidratos de la HXK, sugeriendo de que la enzima está implicada en la regulación de la salida de la radícula (Moore *et al.*, 2003; Cho y Yoo, 2011). Adicionalmente, durante la germinación, ocurre el fenómeno de expansión celular en la denominada “zona de transición” y la replicación del material genético (Sliwinska *et al.*, 2009). Dichos procesos requieren de una gran cantidad de sustratos y energía para poder llevarse a cabo, haciendo necesaria la activación de la HXK debido a que (a) la producción de NDP-azúcares, necesarios para la síntesis de pared celular, depende de la actividad de la HXK, pues el uso de inhibidores específicos de esta enzima en maíz (ADP y mannoheptulosa) provoca una disminución su tasa de producción (Galina y da Silva, 2000), (b) es necesario iniciar la activación de la glucólisis, ruta en la cual esta enzima es regulatoria, y subsecuentemente estimular el Ciclo de Krebs con el fin de suministrar el ATP necesario para que se lleven a cabo los eventos germinativos. Se ha demostrado que dichas rutas metabólicas son indispensables para la germinación de ejes embrionarios de chícharo (Smiri *et al.*, 2009; Weitbrecht *et al.*, 2011). Y (c) en las inmediaciones del sitio de la salida de la radícula, el tejido envejece y muere, fenómeno de senescencia que es acelerado por la actividad señalizadora de la HXK localizada en esa zona (Swartzberg *et al.*, 2011).

Es de interés el estudio de la HXK radicular, no solo porqué hay evidencia de su importancia en el crecimiento radicular (Moore *et al.*, 2003; Cho y Yoo, 2011; Swartzberg *et al.*, 2011), sino porque al parecer su asociación a la mitocondria es un requisito para ser una HXK señalizadora del status de carbohidratos de la planta. En maíz se ha identificado que las fracciones mitocondriales de radículas de maíz presentan una HXK que se inhibe por ADP ( $K_i = 34 \mu\text{M}$ ) y que además tiene gran afinidad por Glucosa ( $K_m = 129 \mu\text{M}$ ) (Galina *et al.*, 1995); por lo que es altamente probable que alguna de las isoformas radiculares de HXK tenga un papel señalizador como es el caso de la HXK1 de *A. thaliana* (Moore *et al.*, 2003). En este trabajo encontramos que la actividad de HXK de las fracciones mitocondriales se inhibieron por ADP, tanto *in vitro* como en el gel de actividad (Figuras 13B y 14),

particularmente las bandas B4 y B5, que por dichas razón, son candidatas de ser HXKs mitocondriales y señalizadoras.

Si bien, se ha mencionado que la HXK mitocondrial es importante por su actividad señalizadora, en este trabajo no encontramos que durante la germinación hubiera un cambio en la actividad total de HXK mitocondrial (Figura 11), siendo que era de esperarse un incremento similar a lo ocurrido en la fracción citosólica, pues a lo largo del proceso germinativo se incrementa la activación de la fosforilación oxidativa, al menos en los ejes de chícharo (Smiri *et al.*, 2009). En mamíferos se ha encontrado que la capacidad de unirse a la mitocondria y la actividad de fosforilación de hexosas, son necesarias para que las enzimas HXK I y II ejerzan su papel protector en la muerte celular mediada por  $H_2O_2$  (Sun *et al.*, 2008). Para el caso de plantas, en *Nicotiana benthamiana*, se ha observado que la actividad elevada de la HXK mitocondrial previene de la muerte celular inducida por estrés oxidante (Kim *et al.*, 2006). Estas evidencias son indicativo de la importancia de la HXK mitocondrial en el proceso de muerte celular, y probablemente es por esta razón que no se observó algún cambio significativo en la actividad. Aunque sí se detectó que a 0 y 8 h de imbibición hubo un número mayor de isoformas de HXK con Rf bajos (Figura 12).

La integridad y funcionalidad de los componentes membranales está comprometida durante la transición del estado seco al hidratado de la semilla, ya que sus componente no presentan la conformación óptima para su funcionamiento y en ocasiones se encuentran dañados (Logan *et al.*, 2001). Es probable que la HXK mitocondrial esté pasando por cambios conformaciones y/o de oligomerización durante la transición en la hidratación del embrión y por ello observamos más formas de HXK de bajo corrimiento electroforético en el gel a tiempos cortos de la germinación; o bien, que los puntos isoeléctricos de algunas isoformas de HXK sean básicos y por lo tanto no migraran durante la electroforesis en condiciones nativas. Aunque a pesar de esto, la actividad total de HXK mitocondrial fue similar entre las 0 y las 24 h de germinación, sugere de un control estricto de esta actividad.

En un trabajo previo, se tomó la banda de actividad de HXK mitocondrial, se eluyó y se colocó sobre un gel de poliacrilamida-SDS, encontrándose 2 bandas, una de 250 kDa de peso molecular y otra de 120 kDa, a pesar de que el gel se realizó en presencia de SDS

(Estrada-Antolín, 2011). Lo anterior indica que probablemente, la HXK mitocondrial se encuentre formando complejos muy estables en la mitocondria, ya que la HXKs de plantas presentan pesos moleculares entre 38 y 68 kDa (Claeyssen y Rivoal, 2007). En el laboratorio de Galina se secuenció la región amino de una HXK mitocondrial de maíz y la compararon con la de espinaca y rata encontrando que la región hidrofóbica es más extensa que la que se encuentra en rata (Rezende *et al.*, 2006). Tratamientos con clotrimazol y G6P que son usados para la separación de la HXK mitocondrial de mamíferos (Pastorino y Hoek, 2008) no separan a la HXK de planta, lo que supone que la HXK de plantas se une a la mitocondria pero de una manera distinta a lo que ocurre en mamíferos (Rezende *et al.*, 2006).

Respecto al número de isoformas presentes, existen varias posibilidades:

1) Que las isoformas detectadas a tiempos cortos de imbibición fueran HXKs que se almacenaron durante la embriogénesis, con diferentes masas y/o puntos isoeléctricos; y que durante la germinación sufrieran modificaciones post traduccionales. Un ejemplo de modificaciones post traduccionales, es la fosforilación; en *S. cerevisiae*, la fosforilación afecta el estado de oligomerización de la HXK2, sólo la forma monomérica se encuentra fosforilada, mientras que el dímero no (Randez-Gil *et al.*, 1998); aunque cabe mencionar que en plantas no se ha descrito que la HXK sufra fosforilación. Otro tipo de modificación pudiera ser la ubiquitinación, en humanos se ha observado que la isoforma 1 de la GK hepática sufre poliubiquitinación *in vitro* que provoca que exista una variación en el tamaño de la GK y en el caso de una pentaubiquitinación induce un incremento en la actividad (Bjørkhaug *et al.*, 2007). Finalmente otra modificación probable es la sumoilación, igualmente en humano se tiene conocimiento de que la GK pancreática sufre esta modificación y como consecuencia incrementa su actividad y estabilidad (Aukrust *et al.*, 2013). Si en el embrión ocurriera algo similar, entonces cualquiera de estas tres modificaciones provocaría un cambio en el tamaño y forma de las HXKs y por lo tanto, en el corrimiento electroforético en condiciones nativas; y para el caso de la ubiquitinación podría llevar a su degradación que también provocaría una variación en el número de isoformas.

2) Que puedan ser producto de un rearreglo entre las diferentes HXKs mitocondriales, consigo mismas o con las proteínas que se prevé estén asociadas. Por ejemplo, se conoce que en mamífero la HXK puede asirse a la mitocondria a través de su asociación con dos canales muy importantes: el canal aniónico de voltaje (VDAC) y el translocador de adenin

nucleótidos (ANT) (Pastorino y Hoek, 2008); entonces la variación de arreglos multiméricos podría deberse principalmente, a que no se ha llevado a cabo el rearreglo completo de los componentes proteicos y membranales de la mitocondria (Logan *et al.*, 2001). Propuesta que sería interesante de verificar, ya que a la fecha a pesar de que se ha encontrado que la HXK de *N. benthamiana* se encuentra en mitocondria y que tiene relación con la apoptosis (Kim *et al.*, 2006); en *A. thaliana*, mediante ensayos de pull-down se ha determinado que la HXK1 mitocondrial se asocia a VDAC y actina (Balasubramanian *et al.*, 2007); pero se desconoce bajo qué situaciones fisiológicas se mantiene allí o se disocia.

3) Que algunas de las isoformas observadas en el embrión seco fueran péptidos truncos de la proteína o bien productos de proteólisis parcial, que aún conservaran la estructura necesaria para seguir detectándose por actividad.

4) Que algunas bandas no correspondan como tal a HXKs, sino más bien a otras enzimas contaminantes, con actividad de deshidrogenasas capaces de generar NADPH y por lo tanto, de reducir al NBT.

### **ABA reduce la actividad de HXK de embriones de maíz.**

Durante la germinación además de la movilización de reservas, disminuye el contenido de ABA y aumenta el nivel de GA<sub>3</sub> (Nambara *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011; Barba-Espin *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012a). Ambas concentraciones de fitohormonas cambiaron (Figura 26; Arciniega-Ruíz, 2012) pero pareciera que la disminución en el contenido de ABA y no así el incremento en GA<sub>3</sub>, está más relacionado con el incremento en la actividad de HXK de la fracción citosólica de los embriones de maíz; ya que la adición exógena de GA<sub>3</sub> no modificó la actividad determinada *in vitro* (Figura 21) o el número e intensidad de la actividad de las bandas de HXK reveladas en el gel nativo (Figura 22), mientras que la adición exógena de ABA y su incubación por 24 h sí llevó a una disminución de la actividad de HXK citosólica determinada *in vitro* (Figura 23), y en la intensidad de la banda B4 (Figura 25), forma de HXK que aumentó en actividad conforme transcurrió el proceso de germinación.

Aunque con base en los resultados obtenidos, no se puede descartar por completo que GA<sub>3</sub> esté involucrado en el incremento de la actividad de HXK. Posiblemente el rango de concentraciones de GA<sub>3</sub> exógeno que se utilizó no fue suficiente para provocar un efecto opuesto al del ABA endógeno, pues como se ha observado en *A. thaliana*, el GA<sub>3</sub> puede

revertir el efecto inhibitorio de la germinación provocado por ABA, cuando este se encuentra en bajas cantidades; pero por sí solo el GA<sub>3</sub> es incapaz de revertir la inhibición de la germinación cuando el contenido de ABA es elevado (Liu *et al.*, 2010), como en el caso del embrión seco (Figura 26).

Cabe señalar que, a pesar de que ABA disminuyó drásticamente el porcentaje de germinación (Figura 20B), el patrón de isoformas y la intensidad de las bandas de HXKs citosólicas en los geles nativos (Figuras 24 y 25), no llegaron a ser similares a lo que ocurrió en el embrión seco, sino más bien fueron similares al patrón de bandas que se observó a las 24 h de imbibición en ausencia de ABA (Figura 51). Para determinar a qué tiempo de germinación ABA ya tenía un efecto sobre el perfil de actividad de HXK, se incubaron embriones por diferentes tiempos con ABA. Se encontró que la actividad total de HXK disminuyó hasta las 18 h de la incubación con ABA, y de manera interesante la banda B4 apareció antes que en los embriones control, y prácticamente mantuvo su actividad constante. Esta observación explica por qué el perfil de bandas de HXKs citosólicas de los embriones embebidos con ABA por 24 h fue muy similar a los embriones embebidos por 24 h en agar al 1%.

Además, en *A. thaliana* se ha demostrado que si bien ABA mantiene el estado de dormancia de la semilla, una vez que este se añade a las semillas y se colocan a germinar, el ABA no logra afectar las fases I y II de la germinación, sino más bien la fase III (Weitbrecht *et al.*, 2011), esto se debe a que un contenido bajo de ABA previo a la fase III es determinante para el establecimiento de la plántula pues ABA inhibe la síntesis y el efecto de las giberelinas a través de ABI4, que actúa como activador de la transcripción de los genes inducidos por ABA y represor de los genes inducidos por GA<sub>3</sub> (Nambara *et al.*, 2010).

Como era de esperarse la incubación de los embriones con ABA, redujo la elongación radicular, pues se sabe que ABA inhibe la ruptura del endospermo y la elongación de la radícula (Srivastava, 2002; Weitbrecht *et al.*, 2011). Además se observó que la actividad de HXK en la zona radicular disminuyó en comparación con los embriones control embebidos durante 24 h en agar. Estos fenómenos pueden deberse a diferentes razones que a continuación se detallan.

Durante el proceso de maduración de la semilla, la actividad transcripcional es elevada y se almacenan numerosos mRNA (Zhang *et al.*, 2012). Se sabe que el ABA disminuye la cantidad total de polisomas presentes en la semilla, al inhibir la descondensación de la cromatina adyacente al DNA ribosomal (Zhang *et al.*, 2012), pero favorece la generación de polisomas unidos al citoesqueleto, éstos polisomas son mucho más estables y la traducción de los mRNA unidos a ellos es mucho más eficiente (Weidner *et al.*, 2006). Es probable que uno de los muchos mensajeros que se almacenan durante el desarrollo de la semilla, sea el correspondiente a la HXK, por lo que ABA favorece su traducción al inicio de la germinación explicando la aparición adelantada de la banda B4 cuando se germina en presencia de ABA. Esto implicaría que a tiempos prolongados de hidratación, ABA inhibiera la transcripción de HXK, puesto que a las 24 h de germinación, la actividad e intensidad de las bandas observadas en los geles nativos es menor cuando se tratan con ABA.

Plantas de maíz sometidas a estrés hídrico presentan mazorcas con ovarios con un mayor contenido de ABA, este aumento coincide con el cambio en el nivel de varios transcritos, uno de estos es la disminución en los transcritos para HXK (Kakumanu *et al.*, 2012). Mientras que, en hojas de chícharo en las cuáles se ha inactivado el ABA endógeno, el nivel del mRNA de HXK está disminuido (Radchuk *et al.*, 2010). Ambas evidencias concuerdan con los resultados obtenidos, esto es la actividad de HXK y la concentración efectiva de ABA tienen una relación inversa. Para comprobar que ABA tiene un efecto directo en la transcripción de mensajeros residuales o nuevos o en la traducción de la HXK se necesitan más experimentos como por ejemplo germinar en presencia de cicloheximida (inhibidor de síntesis de proteínas) o  $\alpha$ -amanitina (inhibidor de la RNA polimerasa).

### **El destino de la G6P en presencia de ABA.**

Debido a que la actividad de HXK especialmente la de la fracción citosólica, estaba disminuida por efecto de ABA, se decidió cuantificar la cantidad de G6P, producto de la actividad de HXK e intermediario de numerosas vías metabólicas (Bolouri-Moghaddam *et al.*, pda Silva, 2000) y disminuyó a partir de las 8 h de imbibición, permaneciendo sin cambios hasta las 24 h de imbibición, esté o no presente ABA en el medio de germinación (Figura 33). A pesar de que ABA disminuye la actividad de HXK, la cantidad de su producto se mantiene

constante. Esto puede deberse a que la glucólisis esté activamente utilizando este metabolito o bien que la G6P se esté dirigiendo a otras vías metabólicas. Para determinar hacia donde se dirigía el metabolito, se midieron la actividad de otras dos enzimas glucolíticas, la GAPDH y la PK; y de la primera enzima regulatoria de la OPPP, la G6PDH a las 0 y 24 h de germinación en presencia y ausencia de ABA (Figuras 35-39).

Para el caso de la GAPDH, se encontró un incremento del doble en la actividad de la fracción citosólica de aquellos embriones que fueron embebidos en presencia de ABA con respecto a los que fueron embebidos en agar al 1%; en *A. thaliana* se ha reportado que la formación de Gliceraldehído-3-P (final de la fase preparativa de la glucólisis) y por lo tanto la actividad catalítica de GAPDH es necesaria para poder responder a ABA. Lo anterior se sugiere, ya que la actividad de la GAPDH en los cloroplastos de *A. thaliana* afecta la transcripción de genes y la regulación de la homeostasis del metabolismo primario, además de que se ha planteado que la actividad de la enzima es importante para suplir con el primer precursor en la vía de síntesis del ABA, el metil-eritritol fosfato en el cloroplasto (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2011). Aunque como bien se ha demostrado con otras enzimas, por ejemplo la HXK, la función que tienen en un compartimento no está relacionada con la función que tienen en otro compartimento (Cho *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2009; Yanagisawa *et al.*, 2003).

Una diferencia importante entre los embriones embebidos en agar y ABA fue que la actividad de PK fue muy elevada en los primeros, mientras que los embebidos en ABA tuvieron actividad de PK baja y similar a la detectada en el embrión seco (Figura 39). Lo anterior sugiere que la G6P generada en los embriones tratados con ABA y en los embriones secos no se dirige hacia la formación de piruvato. Este hecho implica que hay poca síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa; en semillas secas se ha reportado que el contenido de ATP es bajo (Weitbrecht *et al.*, 2011), al igual que la actividad de enzimas del Ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria (Smiri *et al.*, 2009). Para los embriones tratados con ABA, esto podría relacionarse con el efecto inhibitorio del crecimiento radicular, pues si hay poca formación de piruvato, hay poca generación de ATP y por lo tanto poca energía para la expansión celular, concordante con la hipótesis de que el ABA inhibe el proceso de germinación de la semilla limitando la disponibilidad de energía y nutrientes (Garcíarrubio *et al.*, 1997). Aunque hay que recordar que no sólo se tienen carbohidratos en las células

embrionarias sino también lípidos, cuya oxidación podría estar proporcionando una parte del ATP para el metabolismo celular.

Otra posibilidad es que la G6P se desvíe hacia la formación de fructanos, fenilpropanoides o flavonoides que actúen como antioxidantes (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010) y que esta sea una forma de respuesta a la presencia de ABA, puesto que se sabe que durante la germinación es necesaria la producción de ROS (Barba-Espin *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012b), para inducir el catabolismo de ABA y la síntesis de GA<sub>3</sub> (Liu *et al.*, 2010). Probablemente una de las maneras en que ABA inhibe la germinación es mediante la disminución de ROS, particularmente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 57).

En ese mismo contexto para el caso de los embriones tratados con ABA, se encontró que la actividad total de G6PDH se incrementó (Figura 35), y es probable que ese incremento en la actividad de G6PDH contribuya a la detoxificación de ROS, pues se conoce que el NADPH generado es necesario para la activación del ciclo glutatión-ascorbato y la actividad de catalasa (Valderrama *et al.*, 2006); además de que existe evidencia en cebada (Cardi *et al.*, 2011) de que ABA incrementa la transcripción y traducción de G6PDH, por la presencia de un elemento ABRE en su promotor; previniendo también de esta manera la germinación de la semilla.

Las detecciones *in situ* tanto de la GAPDH y la G6PDH coincidieron con lo determinado *in vitro*, y a diferencia de la HXK, la actividad de estas enzimas no logró detectarse en la radícula (Figuras 36 y 38), indicando nuevamente la importancia de la HXK en la zona radicular.

### **HXK y carbohidratos.**

En vista de que la actividad de HXK de la fracción citosólica de embriones se redujo por ABA (Figura 23), era interesante encontrar si la Glucosa producía un efecto similar, sobre todo en la banda B4 de HXK, ya que haría a esta enzima interesante de purificar o seguir en otros estudios.



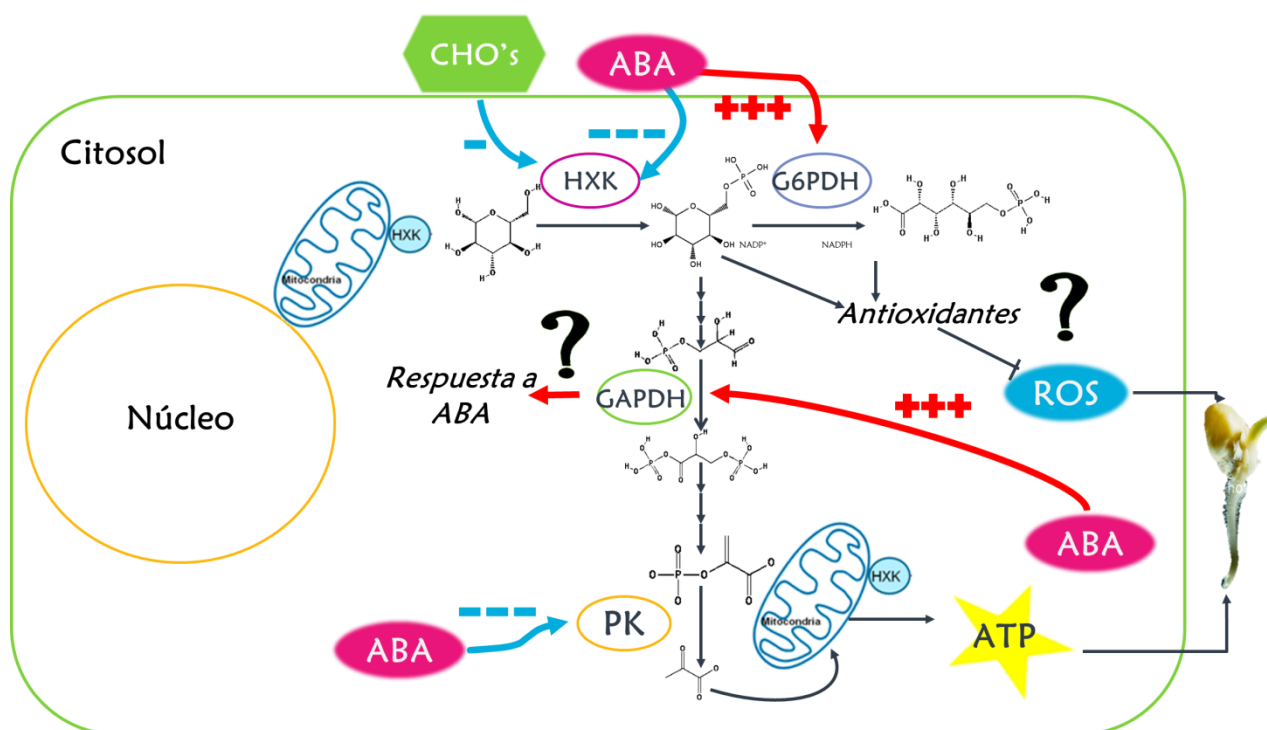
Se ha descrito ampliamente que hay diferentes HXKs, aquellas que tienen la propiedad catalítica y que como parte de la vía glucolítica proveen los sustratos para que la vía continúe, hay otras que además tienen una propiedad sensora que les permite percibir al carbohidrato, en donde no necesita llevar a cabo la fosforilación de las hexosas para comunicarle a la célula que debe cambiar su metabolismo (Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2009). Se sugiere que la enzima al entrar en contacto con las hexosas presenta un movimiento conformacional que es percibido como una señal de abundancia de carbohidratos, con lo cual controla el crecimiento celular y la expresión de genes (Harrington y Bush, 2003; Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006). Sin embargo no se ha descrito si la propia enzima es regulada por metabolitos o condiciones fisiológicas distintas. En este trabajo se presentó evidencia de que ABA redujo la actividad de una forma de enzima y que parece ser responsable del incremento en actividad durante la germinación del embrión del maíz.

Al igual que con el tratamiento con ABA, la HXK de la fracción mitocondrial no cambió con el tratamiento de Glucosa (50 y 380 mM) y Sorbitol (50 y 380 mM) (Figura 41), pero sí lo hizo la HXK de la fracción citosólica. Todos los tratamientos disminuyeron la actividad determinada *in vitro* de la HXK de la fracción citosólica (Figura 42). Se conoce que en *A. thaliana* una concentración de Glucosa igual o superior al 7% (389 mM) incrementa los niveles endógenos de ABA (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Avonce *et al.*, 2004), y también los polioles como el manitol, son capaces de inducir la síntesis de ABA (Matiolli *et al.*, 2011), lo que podría explicar por qué se tuvo la disminución de la actividad de HXK de la fracción citosólica con Sorbitol, aun cuando no se esperaba.

Sin embargo, se hace necesario cuantificar el contenido de ABA en los embriones tratados con carbohidratos y determinar si efectivamente se acumuló ABA. Con los resultados que tenemos hasta el momento no podemos decir que efectivamente son vías similares o independientes las que llevan a que la actividad de HXK citosólica se modifique por ABA y carbohidratos, aunque la literatura sugiere que las vías de señalización de carbohidratos y ABA están conectadas (Rook y Bevan, 2003), ya que a la fecha no se conoce por completo cómo se conectan.

Al evaluar el efecto de los carbohidratos y ABA en la localización y distribución de la HXK en los embriones germinados encontramos que al incubar los embriones en 50 mM de Glucosa o Sorbitol, la actividad de HXK se mantuvo intensa en la zona de la radícula, similar a la de los embriones embebidos en agar, pero a concentraciones de 380 mM de ambos carbohidratos, donde es más probable que esté ocurriendo la síntesis de ABA, la actividad se encontró principalmente alrededor del eje y contrario al efecto de ABA, sí se detectó actividad de HXK en la radícula, pese a que la longitud de la radícula fue pequeña (Figura 44). Lo anterior sugiere que los mecanismos que llevan a la reducción de la actividad de la HXK de la fracción citosólica podrían ser distintos.

Era probable entonces que la actividad metabólica en los embriones embebidos con carbohidratos fuera diferente a la que se produjo cuando se incubó con ABA. Por lo anterior, se evaluó el efecto de los carbohidratos sobre el contenido G6P y la actividad de la GAPDH, PK y G6PDH, tal como se realizó para evaluar el efecto de ABA. En todos los tratamientos con carbohidratos la concentración de G6P, fue menor en comparación con los controles (excepto con Glucosa 380 mM donde no hubo diferencia significativa, Figura 45). Sin embargo, para el caso de las 3 enzimas estudiadas no se encontró un fenómeno similar a lo ocurrido en presencia de ABA, salvo para el tratamiento con Sorbitol 380 mM donde sí hubo un incremento en la actividad de G6PDH y de GAPDH (Figuras 46 y 48). Para el caso de la actividad de PK, hubo disminución con los tratamientos probados, salvo con Glucosa 50 mM (Figura 50), aunque la disminución en la actividad no fue tan pronunciada como en el caso de los embriones tratados con ABA (Figura 39). Es probable que en los embriones tratados con Sorbitol 380 mM se induzca la síntesis de pequeñas cantidades de ABA, sin embargo hace falta determinar el contenido de esta fitohormona cuando los embriones se incuban en presencia de Sorbitol 380 mM.



**Figura 57. Efecto de ABA y Glucosa sobre el metabolismo de los embriones de maíz.**

ABA a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  disminuye las actividades de HXK y PK citosólicas, mientras que incrementa las actividades de la GAPDH y G6PDH. Estos efectos podrían ser algunos de los mecanismos que tiene ABA para inhibir el proceso de germinación: a) Disminuir las actividades de HXK y PK conlleva a la disminución del flujo glucolítico y la subsecuente producción de ATP necesario para completar el proceso de germinación; b) Un incremento en la actividad de GAPDH puede requerirse para montar la respuesta a ABA pues se sabe que la actividad catalítica de esta enzima es esencial para responder a ABA (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2011); c) El aumento en la actividad de G6PDH, que se sabe participa como antioxidante, pudiera ser necesaria para disminuir la cantidad de ROS que se conoce son esenciales en un periodo de tiempo para llevar a cabo el proceso de germinación (Ye *et al.*, 2012b); es decir ABA podría redirigir el flujo de la Glucosa para inhibir el proceso de germinación. Para el caso de los carbohidratos (CHOs), Glucosa y Sorbitol, solo se observó disminución en la actividad de HXK de la fracción citosólica; el efecto sobre la actividad de las otras enzimas probadas no fue claro.

### Identificación de las HXKs de maíz.

A pesar de los intentos realizados no se logró identificar a la enzima, lo que puede deberse a diversas razones. Por ejemplo, en un reporte en el cual se estudió el perfil de proteínas durante el desarrollo del endospermo de maíz; en donde el tratamiento que hacen de las muestras es similar al que se realizó en este trabajo (escisión, elución, indentificación), se encontró que para proteínas que están en un rango entre 40 y 70 kDa, se encuentran a proteínas asociadas a citoesqueleto, a la zeína (proteína de reserva), Factor de elongación 1-alfa, Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa y Sacarosa sintasa (Azama *et al.*, 2003). Todas ellas proteínas que también se encontraron en nuestras muestras (Tabla 15). Es probable que estas proteínas sean muy abundantes en el citosol y que enmascaren la presencia de HXK. Otro motivo, es que el proceso de elución sea poco eficiente para la HXK, y que finalmente ésta no se extraiga de la acrilamida.

Sin embargo, cabe destacar que aunque en las fracciones mitocondriales, principalmente se encontró vicilina; también logró aislarse la subunidad B de la ATP sintasa vacuolar (anexo 1, Tabla 17), homóloga de la proteína VHA-B1 de *A. thaliana* que se sabe interactúa con AtHXK1 para reprimir la expresión de genes (Cho *et al.*, 2006), lo que indica que es posible que la HXK mitocondrial también se encontrara presente en dicha fracción, pero no fue posible detectarla; aun cuando esta interacción solo se ha comprobado en el núcleo, no se sabe en qué compartimento celular se forma el complejo.

Por lo anterior, sería más adecuado realizar un proceso de purificación mayor y a partir de una cantidad abundante de tejido para tener muestras enriquecidas en HXK y lograr identificarla, particularmente de la isoforma que presentó el comportamiento más interesante, la banda B4.

## CONCLUSIONES.

Se encontró que durante la germinación de embriones de maíz, el patrón de isoformas de HXK, tanto en la fracción mitocondrial y citósolica se modificó; y que en esta última la actividad determinada *in vitro*, aumentó. Sugerimos que este cambio se debe a la reducción en el contenido de ABA endógeno, ya que la adición exógena de ABA también redujo la actividad de HXK; particularmente, la de la isoforma que denominamos B4, la cual incrementó su actividad conforme progresó la germinación.

En resumen, estos resultados describen al menos, un nuevo componente celular, el ABA, que afecta la actividad de la HXK, y a una isoforma de la enzima (B4) que sería interesante estudiar en el contexto de la fisiología de la planta de maíz. Aunque con los datos aquí mostrados, no puede descartarse que los cambios en la actividad de la enzima, se deban más bien a un cambio en el balance de ABA/GA<sub>3</sub>.

## PERSPECTIVAS.

- Encontrar el mecanismo por el cuál ABA reduce la actividad de HXK.
- Purificar a la isoforma de HXK que denominamos B4, de las radículas de embriones de maíz para analizar sus propiedades e identificar en que procesos de regulación está involucrada. Además, compararla con las secuencias de HXKs de otras especies y determinar si es homóloga a las que se han propuesto como HXKs sensoras.
- Clonar las HXKs que son homólogas a las sensoras de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* y determinar si alguna de estas clonas corresponde a la isoforma B4.
- Determinar si la presencia de carbohidratos (Sorbitol 380 mM) en el embrión inducen la síntesis de ABA.
- Estudiar el efecto de ABA sobre (a) el flujo de la vía glucolítica, para aportar evidencia de que una de las maneras en que ABA inhibe la germinación, es efectivamente a través de la reducción del metabolismo energético; y (b) sobre el contenido de ROS.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Arciniega-Ruiz, J. M. 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.
- Arenas-Huerta, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., & Leon, P. 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development*, 14: 2085-2096.
- Aukrust, I., Bjørkhaug, L., Negahdar, M., Molnes, J., Johansson, B. B., Müller, Y., Haas, W., Gygi, S. P., Søvik, O., Flatmark, T., Kulkarni, R. N., Njølstad, P. R., 2013. SUMOylation of pancreatic glucokinase regulates its cellular stability and activity. *Journal of Biological Chemistry*. 288:5951-5962
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Iturriaga, G. 2004. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology*, 136: 3649-3659.
- Azama, K., Abe, S., Sugimoto, H., & Davies, E. 2003. Lysine-containing proteins in maize endosperm: a major contribution from cytoskeleton-associated carbohydrate-metabolizing enzymes. *Planta*, 217: 628-638.
- Balasubramanian, R., Karve, A., Kandasamy, M., Meagher, R. B., Moore, B. 2007. A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling *Plant Physiology*, 145: 1423-1434.
- Barba-Espin, G., Nicolas, E., Almansa, M. S., Cantero-Navarro, E., Albacete, A., Hernandez, J. A., & Diaz-Vivancos, P. 2012. Role of thioproline on seed germination: interaction ROS-ABA and effects on antioxidative metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59: 30-36.
- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Hernández-Coronado, M., & Pantoja, O. 2009. Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. *The Plant Cell*, 21: 4044-4058.
- Baud, S., & Graham, I. A. 2006. A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using *in situ* histochemistry. *The Plant Journal*, 46: 155-169.
- Baud, S., Wuijle, S., Dubreucq, B., de Almeida, A., Vuagnat, C., Lepiniec, L., Miquel, M., & Rochat, C. 2007. Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 52: 405-419.
- Bellon, M. R., Hodson, D., & Hellin, J. 2011. Assessing the vulnerability of traditional maize seed systems in Mexico to climate change. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 108: 13432-13437.
- Bentsink, L., & Koornneef, M. 2008. Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book*, 6: e0119.
- Bjørkhaug, L., Molnes, J., Søvik, O., Njølstad, P. R. & Flatmark, T. 2007. Allosteric activation of human glucokinase by free polyubiquitin chains and its ubiquitin-dependent cotranslational proteasomal degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 22757-22764.
- Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., & Van den Ende, W. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal*, 277: 2022-2037.
- Bossi, F., Cordoba, E., Dupre, P., Mendoza, M. S., Roman, C. S., & Leon, P. 2009. The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *The Plant Journal*, 59: 359-374.
- Brocard, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. 2002. Regulation and role of the *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiology*, 129: 1533-1543.
- Burgess, R., & Deutscher, M. P. 2009. Guide to protein purification. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Cardi, M., Chibani, K., Cafasso, D., Rouhier, N., Jacquot, J. P., & Esposito, S. 2011. Absciscic acid effects on activity and expression of barley (*Hordeum vulgare*) plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany*, 62: 4013-4023.
- Castañeda-Rico, A. 2008. Modulación de la actividad de HXKs por sacarosa y Glucosa en la germinación de tejido embrionario de maíz. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Ciereszko, I., & Kleczkowski, L. A. 2002. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of *rab18* in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1579: 43-49.
- Claeys, E., & Rivoal, J. 2007. Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemistry*, 68: 709-731.

- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11: 163.
- Cutler, A. J., & Krochko, J. E. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4: 472-478.
- Cho, J. I., Ryoo, N., Eom, J. S., Lee, D. W., Kim, H. B., Jeong, S. W., Lee, Y. H., Kwon, Y. K., Cho, M. H., Bhoo, S. H., Hahn, T. R., Park, Y. I., Hwang, I., Sheen, J., & Jeon, J. S. 2009. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiology*, 149: 745-759.
- Cho, Y. H., & Yoo, S. D. 2011. Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, 7: e1001263.
- Cho, Y. H., Yoo, S. D., & Sheen, J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127: 579-589.
- Da-Silva, W. S., Rezende, G. L., & Galina, A. 2001. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1191-1201.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A., & Granot, D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell*, 11: 1253-1266.
- Damari-Weissler, H., Ginzburg, A., Gidoni, D., Mett, A., Krassovskaya, I., Weber, A. P., Belausov, E., & Granot, D. 2007. Spinach SoHXK1 is a mitochondria-associated hexokinase. *Planta*, 226: 1053-1058.
- Dijkwel, P. P., Huijser, C., Weisbeek, P. J., Chua, N. H., & Smeekeens, S. C. 1997. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 9: 583-595.
- Eastmond, P. J., & Graham, I. A. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science*, 6: 72-78.
- Estrada-Antolín, S. A. 2011. Las isoenzimas de las HXKs de maíz en citosol y mitocondria: características de su actividad y su regulación. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Frommer, W. B., Schulze, W. X., & Lalonde, S. 2003. Hexokinase, jack-of-all-trades. *Science*, 300: 261-263.
- Galina, A., & da Silva, W. S. 2000. Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochemistry*, 53: 29-37.
- Galina, A., Reis, M., Albuquerque, M. C., Puyou, A. G., Puyou, M. T., & de Meis, L. 1995. Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *The Biochemical Journal*, 309: 105-112.
- Garcarrubio, A., Legaria, J. P., & Covarrubias, A. A. 1997. Absciscic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta*, 203: 182-187.
- GeoChemBio. 2012. *Zea mays*, corn, maize, mealie. <http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/>. Consultado el día 15 de enero de 2013.
- Guglielminetti, L., Perata, P., Morita, A., Loreti, E., Yamaguchi, J., & Alpi, A. 2000. Characterization of isoforms of hexose kinases in rice embryo. *Phytochemistry*, 53: 195-200.
- Harrington, G. N., & Bush, D. R. 2003. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *The Plant Cell*, 15(11): 2493-2496.
- Hernández-Guzmán, J. A., & Carballo-Carballo, A. 2012. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Almacenamiento%20de%20semillas.pdf>. Consultado el día 15 de enero de 2013.
- Hey, S. J., Byrne, E., & Halford, N. G. 2010. The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany*, 105: 197-203.
- Jang, J. C., Leon, P., Zhou, L., & Sheen, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell*, 9: 5-19.
- Jones, P. G., & Thornton, P. K. 2003. The potential impacts of climate change on maize production in Africa and Latin America in 2055. *Global Environmental Change*, 13: 51-59.
- Kakumanu, A., Ambavaram, M. M., Klumas, C., Krishnan, A., Batlang, U., Myers, E., Grene, R., & Pereira, A. 2012. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq. *Plant Physiology*, 160: 846-867.
- Karve, A., Rauh, B. L., Xia, X., Kandasamy, M., Meagher, R. B., Sheen, J., & Moore, B. D. 2008. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. *Planta*, 228: 411-425.

- Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, X., Rauh, B. L., & Moore, B. 2010. Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases. *Molecular Plant*, 3: 334-346.
- Kelly, A. A., Quettier, A. L., Shaw, E., & Eastmond, P. J. 2011. Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 157(2): 866-875.
- Kelly, G., David-Schwartz, R., Sade, N., Moshelion, M., Levi, A., Alchanatis, V., & Granot, D. 2012. The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiology*, 159: 47-51.
- Kim, M., Lim, J. H., Ahn, C. S., Park, K., Kim, G. T., Kim, W. T., & Pai, H. S. 2006. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 18(9): 2341-2355.
- Kucera, B., Cohn, M. A., & Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15: 281-307.
- Kurokawa, M., Yokoyama, K., Kaneko, M., & Ishibashi, S. 1983. Difference in hydrophobicity between mitochondria-bindable and non-bindable forms of hexokinase purified from rat brain. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 115: 1101-1107.
- Kuser, P. R., Krauchenco, S., Antunes, O. A., & Polikarpov, I. 2000. The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 20814-20821.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M. & Zhang, J. 2010. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2979-2990.
- Logan, D. C., Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Hill, S. A., & Leaver, C. J. 2001. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology*, 125: 662-672.
- Longo, C. P., & Longo, G. P. 1970. The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. *Plant Physiology*, 45: 249-254.
- MASISH. 2012. The Maize Seed. <http://masish.uab.cat/masish/images/maizeseedanatomy2.pdf>. Consultado el día 15 de enero de 2013.
- Mاتيoli, C. C., Tomaz, J. P., Duarte, G. T., Prado, F. M., Del Bem, L. E., Silveira, A. B., Gauer, L., Correa, L. G., Drumond, R. D., Viana, A. J., Di Mascio, P., Meyer, C., & Vincentz, M. 2011. The *Arabidopsis* bZIP gene *AtbZIP63* is a sensitive integrator of transient abscisic acid and glucose signals. *Plant Physiology*, 157: 692-705.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Hwang, I., Jones, T., & Sheen, J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300: 332-336.
- Muñoz-Bertomeu, J., Anoman, A. D., Toujani, W., Cascales-Miñana, B., Flores-Tornero, M., & Ros, R. 2011. Interactions between abscisic acid and plastidial glycolysis in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 157-159.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 165-185.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., & Kamiya, Y. 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20: 55-67.
- Nilsson, A., Olsson, T., Ulfstedt, M., Thelander, M., & Ronne, H. 2011. Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, 11: 32-47.
- Nonogaki, H. 2006. Seed germination: The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science*, 56: 93-105.
- Oaks, A., & Beevers, H. 1964. The glyoxylate cycle in maize scutellum. *Plant Physiology*, 39: 431-434.
- Oliver, S. N., Dennis, E. S., & Dolferus, R. 2007. ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant & cell physiology*, 48: 1319-1330.
- Olsson, T., Thelander, M., & Ronne, H. 2003. A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 44439-44447.
- Pastorino, J. G., & Hoek, J. B. 2008. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 40: 171-182.
- Price, J., Li, T. C., Kang, S. G., Na, J. K., & Jang, J. C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132: 1424-1438.
- Radchuk, R., Conrad, U., Saalbach, I., Giersberg, M., Emery, R. J., Kuster, H., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., Weschke, W., & Weber, H. 2010. Abscisic acid deficiency of developing pea embryos achieved by immunomodulation attenuates developmental phase transition and storage metabolism. *The Plant Journal*, 64: 715-730.



- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15: 395-401.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K. D., & Prieto, J. A. 1998. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Molecular & Cellular Biology*, 18: 2940-2948.
- Rezende, G. L., Logullo, C., Meyer, L., Machado, L. B., Oliveira-Carvalho, A. L., Zingali, R. B., Cifuentes, D., & Galina, A. 2006. Partial purification of tightly bound mitochondrial hexokinase from maize (*Zea mays* L.) root membranes. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, 39: 1159-1169.
- Robey, R. B., & Hay, N. 2005. Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria. *Cell Cycle*, 4: 654-658.
- Rodríguez-Gacio M. C., Matilla-Vazquez, M. A., & Matilla, A. J. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behavior*, 4: 1035 - 1049.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675-709.
- Rook, F., & Bevan, M. W. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *Journal of Experimental Botany*, 54: 495-501.
- Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y., & Bevan, M. W. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell & Environment*, 29: 426-434.
- SAGARPA. 2012. Maíz: Evolución de la Producción Nacional 1996-2006. [http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP\\_AG/Maiz/Descripci%C3%B3n.pdf](http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Maiz/Descripci%C3%B3n.pdf). Consultado el día 15 de enero de 2013.
- Sanchez-Linares, L., Gavilanes-Ruiz, M., Diaz-Pontones, D., Guzman-Chavez, F., Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sanchez, R., Bernal-Lugo, I., & Sanchez-Nieto, S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany*, 63: 4513-4526.
- SIAP. 2012. Maíz grano: *Zea mays*. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=202&Itemid=86](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=202&Itemid=86). Consultado el día 15 de enero de 2013.
- Sliwinski, E., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. 2009. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3587-3594.
- Smiri, M., Chaoui, A., & El Ferjani, E. 2009. Respiratory metabolism in the embryonic axis of germinating pea seed exposed to cadmium. *Journal of Plant Physiology*, 166: 259-269.
- Srivastava, L. M. 2002. *Srivastava, L. M. Plant growth and development. Hormones and the environment.* London, U. K.: Academic Press.
- Stacey, M. G., Osawa, H., Patel, A., Gassmann, W., & Stacey, G. 2006. Expression analyses of *Arabidopsis* oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. *Planta*, 223: 291-305.
- Sun, J. Y., Chen, Y. M., Wang, Q. M., Chen, J., & Wang, X. C. 2006. Glucose inhibits the expression of triose phosphate/phosphate translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 1102-1113.
- Sun, L., Shukair, S., Naik, T. J., Moazed, F., & Ardehali, H. Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II. 2008. *Molecular & Cellular Biology*, 28: 1007-1017.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K.-i., Uchiumi, T., Higashi, S., Han, S.-Y., Yoshida, S., Asami, T., & Abe, M. 2004. Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant & Cell Physiology*, 45: 914-922.
- Swartzberg, D., Hanael, R., & Granot, D. 2011. Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biology*, 13: 439-444.
- TRANSAUTORS. 2012. Structure of Maize Seed. <http://www.transtutors.com/homework-help/biology/organs-of-typical-flowering-plant/structure-of-maize-seed.aspx>. Consultado el día 15 de enero de 2013.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2010. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant & Cell Physiology*, 51: 1821-1839.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M. V., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Fernández-Ocaña, A. N. A., Del Río, L. A., & Barroso, J. B. 2006. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment*, 29: 1449-1459.

- Vincent, P. L. D. 2001. *Zea Mays* (Maize, Corn), eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., Frei dit Frey, N., & Leung, J. 2008. An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*, 1: 198-217.
- Waterworth, W. M., West, C. E., Daws, M. I., & Bray, C. M. 2000. The barley scutellar peptide transporter: Relationship to germination and loss of seed viability. In: Black, M.; Bradford, K. J.; Vazquez-Ramos, J.; eds, *Seed Biology? Advances & Applications*. Wallingford, UK: CABI: 297-307.
- Weidner, S., Kaźarnowicz, M., Frączek, E., Amarowicz, R., & Karamać, M. 2006. Exogenous abscisic acid increases stability of polysomes in embryos of triticale caryopses during germination. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 627-634.
- Weitbrecht, K., Muller, K., & Leubner-Metzger, G. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal Of Experimental Botany*, 62: 3289-3309.
- Xu, Y., Skinner, D. J., Wu, H., Palacios-Rojas, N., Araus, J. L., Yan, J., Gao, S., Warburton, M. L., & Crouch, J. H. 2009. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. *International Journal of Plant Genomics*, 2009: 957602.
- Yanagisawa, S., Yoo, S. D., & Sheen, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425: 521-525.
- Ye, N., Jia, L., & Zhang, J. 2012a. ABA signal in rice under stress conditions. *Rice*, 5: 1-9.
- Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Zhang, A., Li, Y., Liu, R., Shi, L., Jia, L., & Zhang, J. 2012b. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1809-1822.
- Zhang, L., Hu, Y., Yan, S., Li, H., He, S., Huang, M., & Li, L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Molecular Biology*, 79: 285-293.
- Zhu, S. Y., Yu, X. C., Wang, X. J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R. C., Shang, Y., Du, S. Y., Wang, X. F., Wu, F. Q., Xu, Y. H., Zhang, X. Y., & Zhang, D. P. 2007. Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19: 3019-3036.

## ANEXOS.

Tabla 16. Principales proteínas encontradas por espectrometría de masas en fracciones citosólicas de embriones de maíz embebidos durante 24 h en agar al 1%.

Muestra		No. De acceso	Proteína	Cobertura (%)
B1	1	<a href="#">gil162461243</a>	malate synthase, glyoxysomal [ <i>Zea mays</i> ]	67
		<a href="#">gil162458253</a>	chaperonin CPN60-1, mitochondrial precursor [ <i>Zea mays</i> ]	33
		<a href="#">gil242076294</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g020720 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	44
		<a href="#">gil309557</a>	chaperonin 60 [ <i>Zea mays</i> ]	33
		<a href="#">gil226500186</a>	LOC100285961 [ <i>Zea mays</i> ]	23
	2	<a href="#">gil194705850</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]	40
		<a href="#">gil3122071</a>	RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha	37
		<a href="#">gil1169476</a>	RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha	42
		<a href="#">gil195628630</a>	elongation factor 1-gamma 3 [ <i>Zea mays</i> ]	34
		<a href="#">gil162460570</a>	elongation factor alpha3 [ <i>Zea mays</i> ]	39
	7	<a href="#">gil2345154</a>	ribosomal protein S4 [ <i>Zea mays</i> ]	65
		<a href="#">gil195658011</a>	globulin-1 S allele precursor [ <i>Zea mays</i> ]	29
		<a href="#">gil195624456</a>	40S ribosomal protein S3a [ <i>Zea mays</i> ]	40
		<a href="#">gil212275610</a>	uncharacterized protein LOC100191224 [ <i>Zea mays</i> ]	38
		<a href="#">gil162458131</a>	LOC100037815 [ <i>Zea mays</i> ]	38
	8	<a href="#">gil195658011</a>	globulin-1 S allele precursor [ <i>Zea mays</i> ]	29
		<a href="#">gil226509468</a>	LOC100280650 precursor [ <i>Zea mays</i> ]	18
		<a href="#">gil212275456</a>	uncharacterized protein LOC100191154 [ <i>Zea mays</i> ]	37
		<a href="#">gil226499840</a>	proteasome subunit alpha type 5 [ <i>Zea mays</i> ]	48
		<a href="#">gil226495937</a>	LOC100282772 [ <i>Zea mays</i> ]	30
B2	3	<a href="#">gil16797785</a>	sucrose synthase [ <i>Zea mays</i> ]	29
		<a href="#">gil459895</a>	sus1 [ <i>Zea mays</i> ]	18
		<a href="#">gil55741123</a>	sucrose synthase [ <i>Bambusa oldhamii</i> ]	8
		<a href="#">gil22284</a>	vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	13
		<a href="#">gil2982291</a>	heat shock protein [ <i>Picea mariana</i> ]	5
B3/4	4	<a href="#">gil194690156</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]	41
		<a href="#">gil226492743</a>	fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme [ <i>Zea mays</i> ]	34
		<a href="#">gil162463755</a>	glutamine synthetase root isozyme 3 [ <i>Zea mays</i> ]	38
		<a href="#">gil228310</a>	globulin 2	10
		<a href="#">gil357449945</a>	hypothetical protein MTR_2g040130 [ <i>Medicago truncatula</i> ]	2
	5	<a href="#">gil228310</a>	globulin 2	41
		<a href="#">gil22284</a>	vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	1
	6	<a href="#">gil228310</a>	globulin 2	46
		<a href="#">gil195658011</a>	globulin-1 S allele precursor [ <i>Zea mays</i> ]	46

	<a href="#">gil242037831</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g005440 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	22
	<a href="#">gil22284</a>	vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	9

Tabla 17. Principales proteínas encontradas por espectrometría de masas en fracciones mitocondriales de embriones de maíz embebidos durante 24 h en agar al 1%.

Muestra	No. De acceso	Proteína	Cobertura (%)
B4	1	<a href="#">gil162463479</a> globulin-1 S allele precursor [ <i>Zea mays</i> ]	30
		<a href="#">gil172046675</a> RecName: Full=Unknown protein 3	100
	2	<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	12
		<a href="#">gil94502565</a> ATPase subunit 1 [ <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> ]	6
	3	<a href="#">gil228310</a> globulin 2	30
		<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	13
		<a href="#">gil159462486</a> predicted protein [ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ]	2
		<a href="#">gil255585509</a> hypothetical protein RCOM_0656430 [ <i>Ricinus communis</i> ]	5
		<a href="#">gil255599290</a> conserved hypothetical protein [ <i>Ricinus communis</i> ]	13
	4	<a href="#">gil228310</a> globulin 2	40
		<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	14
		<a href="#">gil226509468</a> LOC100280650 precursor [ <i>Zea mays</i> ]	14
		<a href="#">gil242041881</a> hypothetical protein SORBIDRAFT_01g043980 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	4
		<a href="#">gil147822732</a> hypothetical protein VITISV_040070 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1
	5	<a href="#">gil228310</a> globulin 2	45
		<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	7
		<a href="#">gil226509468</a> LOC100280650 precursor [ <i>Zea mays</i> ]	12
		<a href="#">gil357115102</a> PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: allergen Ara h 1, clone P17-like [ <i>Brachypodium distachyon</i> ]	8
		<a href="#">gil147833016</a> hypothetical protein VITISV_002804 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1
B1	6	<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	21
		<a href="#">gil162461243</a> malate synthase, glyoxysomal [ <i>Zea mays</i> ]	25
		<a href="#">gil309557</a> chaperonin 60 [ <i>Zea mays</i> ]	10
		<a href="#">gil242076294</a> hypothetical protein SORBIDRAFT_06g020720 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	9
		<a href="#">gil195658011</a> globulin-1 S allele precursor [ <i>Zea mays</i> ]	16
	7	<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	21
		<a href="#">gil226492645</a> vacuolar ATP synthase subunit B [ <i>Zea mays</i> ]	12
		<a href="#">gil6715512</a> vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase B subunit [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	15
		<a href="#">gil255547796</a> NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	9
		<a href="#">gil228310</a> globulin 2	9
	8	<a href="#">gil226509468</a> LOC100280650 precursor [ <i>Zea mays</i> ]	35
		<a href="#">gil22284</a> vicilin-like embryo storage protein [ <i>Zea mays</i> ]	22
		<a href="#">gil242041881</a> hypothetical protein SORBIDRAFT_01g043980 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]	10

	<a href="#">gil270314460</a>	globulin 1 [ <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> ]	15
	<a href="#">gil226499536</a>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit [ <i>Zea mays</i> ]	21
9	<a href="#">gil228310</a>	globulin 2	33
	<a href="#">gil226509468</a>	LOC100280650 precursor [ <i>Zea mays</i> ]	34
	<a href="#">gil195658011</a>	globulin-1 S allele precursor [ <i>Zea mays</i> ]	33

Tabla 18. Principales proteínas encontradas por espectrometría de masas en fracciones citosólicas de plantas de maíz de dos meses de edad.

Muestra	No. De acceso	Proteína	Cobertura (%)
R2	1	<a href="#">gil375314771</a>	keratin 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
		<a href="#">gil375314779</a>	keratin 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
		<a href="#">gil435476</a>	cytokeratin 9 [ <i>Homo sapiens</i> ]
		<a href="#">gil146741296</a>	keratin 1 [ <i>Sus scrofa</i> ]
		<a href="#">gil181402</a>	epidermal cytokeratin 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
T2	2	<a href="#">gil363543167</a>	phenylalanine ammonia-lyase [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil219886341</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil242065818</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g026510 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]
		<a href="#">gil242076514</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g022740 [ <i>Sorghum bicolor</i> ]
		<a href="#">gil293335807</a>	uncharacterized protein LOC100384215 [ <i>Zea mays</i> ]
	3	<a href="#">gil363543167</a>	phenylalanine ammonia-lyase [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil226510109</a>	NADP-dependent malic enzyme [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil357165528</a>	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: DNA2-like helicase-like [ <i>Brachypodium distachyon</i> ]
		<a href="#">gil162459265</a>	NADP-dependent malic enzyme, chloroplastic precursor [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil172046675</a>	RecName: Full=Unknown protein 3
	4	<a href="#">gil363543167</a>	phenylalanine ammonia-lyase [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil224031309</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil194700982</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil19850241</a>	cytosolic aldehyde dehydrogenase RF2C [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil226502306</a>	uncharacterized protein LOC100274311 [ <i>Zea mays</i> ]
H2	5	<a href="#">gil194688810</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil320449082</a>	NADP-dependent malic enzyme [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil27764449</a>	phosphoenolpyruvate carboxylase [ <i>Zea mays</i> ]
		<a href="#">gil145423911</a>	NADP-malic enzyme [ <i>Eriobotrya japonica</i> ]
		<a href="#">gil219886341</a>	unknown [ <i>Zea mays</i> ]