



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE AZÚCARES Y HORMONAS EN LA EXPRESIÓN DE LOS
TRANSPORTADORES DE AZÚCARES TIPO SWEET EN TEJIDO
EMBRIONARIO DE MAÍZ**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

TOMÁS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS

VOCAL: Profesor: SOBEIDA SANCHEZ NIETO

SECRETARIO: Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO

1er. SUPLENTE: Profesor: VERONICA GARROCHO VILLEGAS

2° SUPLENTE: Profesor: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102, DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, CONJUNTO E DE LA FACULAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. MONTSERRAT LÓPEZ CORIA

SUSTENTANTE:

TOMÁS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de tesis “Efecto de azúcares y hormonas en la expresión de los transportadores de azúcares tipo SWEET en tejido embrionario de maíz” realizado por **Tomás Sánchez Sánchez** fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la M. en C. Beatriz King Díaz se agradece su apoyo técnico en el mantenimiento de las condiciones adecuadas de funcionamiento del laboratorio, como equipos y material de laboratorio, todo aquello que se usó en la realización de la tesis.

El trabajo de tesis recibió financiamiento a través de:

- DGAPA-PAPIIT proyectos PAPIIT IN220217
- Beca para realizar tesis de licenciatura por PAPIIT IN217217
- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125
- Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
El maíz	1
Semilla de maíz	2
Germinación de la semilla	3
Función fisiológica de las Giberelinas	7
Función fisiológica del Ácido abscísico	9
Movilización de azúcares en la germinación.....	13
Transporte de azúcares a través de los SWEETS	16
Papel de los SWEET en la embriogénesis de las semillas	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Material vegetal.....	26
Obtención del RNA	27
Cuantificación y evaluación de la integridad del RNA	28
Síntesis de cDNA.....	29
Determinación de la expresión mediante PCR tiempo real (qPCR).....	29
• Ejemplo de cálculo de la expresión relativa	32
Cuantificación de carbohidratos solubles.....	33
• Obtención de carbohidratos solubles.....	33
• Cuantificación de glucosa.....	33

• Cuantificación de fructosa	34
• Cuantificación sacarosa.....	35
Análisis estadístico	35
RESULTADOS	36
Integridad de los transcritos utilizados para la detección de la expresión de genes mediante RT-qPCR en los ejes embrionarios de maíz.....	36
Efecto de ABA y GA ₃ en la expresión de los ZmSWEET's de ejes embrionarios	37
Efecto de Glu y Sac sobre el perfil de expresión de los SWEETs de maíz en los ejes embrionario	39
Contenido de carbohidratos solubles en los ejes embrionarios de maíz germinados en presencia de hormonas y carbohidratos	43
Integridad de los transcritos utilizados para la detección de la expresión de genes mediante RT-qPCR en escutelos de maíz.....	45
Efecto de ABA y GA ₃ en la expresión de los ZmSWEET's en escutelos	45
Efecto de Glu y Sac sobre el perfil de expresión de los SWEETs de maíz en los escutelos	47
Contenido de carbohidratos solubles en los escutelos de maíz germinados en presencia de hormonas y carbohidratos	50
DISCUSIÓN.....	52
Inducción transcripcional de SWEETs por GA ₃ y ABA en los tejidos embrionarios del maíz germinado	53
Cambios transcripcionales de los SWEETs por Glu y Sac en los tejidos embrionarios del maíz germinado	58
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65
ANEXOS.....	73
Anexo 1. Ejemplo de gráfica de perfil de expresión de los SWEETs	73

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.	3
Figura 2. Proceso de germinación.	5
Figura 3. Estructura de las giberelinas de C ₂₀ y C ₁₉ .	7
Figura 4. Corte sagital de una semilla germinada donde se muestra el movimiento de GAs y su efecto en la movilización de las reservas	8
Figura 5. Estructura de ABA.	10
Figura 6. Crecimiento de las plantas “wild-type” Ler-0 y deficientes en ABA (aba1-1) en tratamientos con o sin ABA.	12
Figura 7. Translocación de sacarosa y otros nutrientes del tejido fuente (endospermo y escutelo) al tejido demanda (eje embrionario, brote y raíces).	14
Figura 8. Estructura del transportador OsSWEET2b.	17
Figura 9. Modelo del transporte secuencial mediado por los SWEET que transportan sacarosa durante el desarrollo de la semilla de Arabidopsis y corte sagital de la semilla silvestre de maíz y la mutante zmsweet4c.	20
Figura 10. Modelo propuesto del transporte de azúcares en los tejidos embrionarios del maíz.	22
Figura 11. Diseño experimental para la cuantificación de la expresión de SWEET y contenido de carbohidratos en tejido germinado de maíz.	26
Figura 12. Integridad de las bandas de la subunidad ribosomal 28S y 18S de los ejes embrionarios en los diferentes tratamientos.	37
Figura 13. Efecto de GA ₃ y ABA en la expresión relativa de los ZmSWEETs en el eje embrionario de maíz.	38
Figura 14. Efecto de dos concentraciones de Glu y Sac sobre la expresión relativa de los SWEET's en ejes embrionarios.	40-43
Figura 15. Contenido de Sacarosa, Glucosa y Fructosa en el eje embrionario de maíz.	44-45

Figura 16. Integridad de las bandas de la subunidad ribosomal 28S y 18S del escutelo en los diferentes tratamientos.	45
Figura 17. Efecto de GA ₃ y ABA en la expresión relativa de los ZmSWEETs en el escutelo de maíz.	46
Figura 18. Efecto de dos concentraciones de Glu y Sac sobre la expresión relativa de los SWEET's en escutelos.	47-50
Figura 19. Contenido de Sacarosa, Glucosa y Fructosa en el escutelo de maíz.	51-52
Figura 20. Curva de fusión (Del inglés "Melt Curve") o Curva de disociación del oligonucleótido <i>ZmSWEET13a</i> con la muestra control.	73

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de los SWEET y del gen endógeno utilizadas para la qPCR.	30
Tabla 2. Datos de las curvas estándar para la amplificación por qPCR de los SWEET's y 18s (control).	31
Tabla 3. Comparación del efecto de ABA y GA ₃ sobre la transcripción de los SWEETs y el contenido de azúcares en ejes embrionarios y escutelos de maíz.	55
Tabla 4. Número de elementos de respuesta a diferentes factores ambientales, hormonas o efectores en los ZmSWEETs analizados en este trabajo. El análisis lo llevo a cabo Giovanna Paulina Aguilera-Alvarado con los programas PlantPan 2,0 y Plant Care Cis acting regulatory elements.	58
Tabla 5. Comparación del efecto de Glu y Sac sobre la transcripción de los SWEETs y el contenido de azúcares en ejes embrionarios y escutelos de maíz.	60

ABREVIATURAS

ABA.....	Ácido abscísico
ADP.....	Adenosín difosfato
ATP.....	Adenosín trifosfato
cDNA.....	DNA de cadena complementaria
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
G6PDH.....	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GA ₃	Ácido giberélico
GAs.....	Giberelinas
Glu.....	Glucosa
HK.....	Hexocinasa
Man.....	Manitol
mRNA.....	RNA mensajero
NAD.....	Nicotinamida adenina dinucleótico (forma oxidada)
NADH.....	Nicotinamida adenina dinucleótico (forma reducida)
PCC.....	Solución fenol saturado con buffer de citratos
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
PGI.....	Fosfoglucosa isomerasa
qPCR.....	PCR cuantitativo
RNA.....	Ácido ribonucleico
RT.....	Transcriptasa reversa
Sac.....	Sacarosa
SDS.....	Duodecil sulfato de sodio
SWEET.....	Transportador difusional de azúcares
TAE.....	Tris Acetato EDTA
ZmSWEET.....	SWEET de maíz (Zea mays)

RESUMEN

En la semilla de maíz existen dos tejidos fuente de nutrientes, el endospermo y el escutelo. En la germinación, el movimiento de azúcares ocurre desde el escutelo hacia el eje embrionario, tejido que propiamente formará a la planta. Los azúcares se pueden mover a favor del gradiente de concentración mediante los transportadores difusionales SWEETs. En nuestro laboratorio se identificó que los SWEET4c, 6b, 11, 13a, 13b y 14b son los que más se expresan a largo de la germinación. Sin embargo, desconocemos si su expresión depende de la disponibilidad de carbohidratos o de las hormonas que son importantes para que la germinación progrese. Es por ello que se evaluó la expresión de los SWEETs al embeber semillas de maíz por 24 h en agar 1 % (control) o suplementado con diferentes hormonas (GA_3 y ABA) y a dos concentraciones de azúcares (glucosa y sacarosa). Se extrajo el escutelo y eje embrionario de la semilla del maíz y se obtuvo el RNA. Después se produjo el cDNA mediante la transcriptasa reversa para determinar por PCR en tiempo real la expresión de los transportadores SWEET4c, 6b, 11, 13a, 13b y 14b. Se encontró que en el eje embrionario la expresión de los seis SWEETs analizados aumentó entre 50 a 300 veces debido a la presencia de GA_3 y ABA, mientras que en el escutelo solo aumentó la expresión del ZmSWEET6b. En presencia de ambas hormonas el contenido de hexosas y sacarosa solubles disminuyó en ambos tejidos. Mientras que a 5 mM de azúcares la expresión de los SWEETs se redujo. Los mayores cambios en la expresión de los SWEETs fueron a 50 mM de azúcares. El escutelo fue menos sensible a la presencia de altas concentraciones de carbohidratos en comparación con el eje embrionario. Éstas diferencias probablemente se deben a que el escutelo es un tejido que experimentará la muerte celular programada mientras que el eje embrionario continuará su desarrollo a planta, lo que puede explicar porqué el contenido de azúcares solubles varía más en los ejes embrionarios. Se deben realizar más experimentos para determinar si los cambios en la expresión en los SWEETs conducen a una mayor toma de azúcares por los tejidos embrionarios.

INTRODUCCIÓN

El maíz

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas, es una planta anual dotada de un amplio sistema radicular fibroso y que produce un número alto de granos (FAO, 1993). Su cultivo se originó mediante el proceso de domesticación que llevaron los antiguos habitantes de Mesoamérica, a partir de los teocintles, gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica (CONABIO, 2012). La proximidad biológica entre el teocintle y el maíz se basa en que ambos tienen 10 cromosomas y son homólogos o parcialmente homólogos (FAO, 1993).

El proceso de domesticación del maíz inició hace aproximadamente 10,000 años, estuvo asociado a la invención y el desarrollo independiente de la agricultura en Mesoamérica (CONABIO, 2012). La evolución del maíz se dió gracias a la intervención de los antiguos agricultores mesoamericanos, al conservar las semillas de sus mejores mazorcas para sembrarlas en el siguiente ciclo, lo cual ha hecho que el maíz sea una especie llena de diversidad genética después de generaciones de mejoramiento y una de las plantas más eficientes en la acumulación de carbono (O'Leary, 2016). Por ejemplo, en la espiga del teocintle el número de semillas es de 6 a 12, mientras que una planta de maíz puede producir hasta 6 mazorcas, dando lugar a aproximadamente 1000 semillas por planta (du Plessis, 2003).

El maíz es considerado uno de los más grandes logros agronómicos de la humanidad y es el cultivo que más se siembra en el mundo (O'Leary, 2016). En México, el maíz es el cultivo de mayor presencia en el país, forma parte de la alimentación diaria del mexicano, además de constituir un insumo para la ganadería e industria, es fuente de almidón, aceite, alcohol entre otros productos (CONABIO, 2012; FAO, 1993).

Semilla de maíz

Las semillas de maíz se desarrollan a partir de la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina, la espiga (FAO, 1993).

La semilla de maíz (Figura 1), es botánicamente una carióspside¹ y está formada principalmente por: la testa, el pericarpio, el endospermo y el embrión (Nemose, 2008). La testa es la cubierta más externa que recubre a la semilla, seguida del pericarpio que actúa como una segunda cubierta externa (Lopez-Coria, 2015). El endospermo, representa el 83 % del peso del grano y contiene un alto contenido de almidón (Nemose, 2008), está formado por tres tipos de células: la capa de transferencia basal, la capa aleurona y las células que contienen el almidón (Olsen, 2011). La aleurona es una monocapa de células, que durante la germinación, se encarga de la síntesis de enzimas hidrolíticas para la movilización de las reservas almacenadas en el endospermo (Rosental, *et al*, 2014).

El embrión está formado por varios tejidos: escutelo, plúmula, coleóptilo, eje embrionario, radícula y la coleorriza. El escutelo es un cotiledón modificado, el cual rodea al eje embrionario, cerca del 40 % de su peso son lípidos. Este tejido tiene la capacidad de síntesis de azúcares mediante la β -oxidación de los triglicéridos y el ciclo de glioxilato. Además, el escutelo es un tejido con alta capacidad de toma de los nutrientes que provienen del endospermo, mismos que puede donar al eje embrionario en crecimiento (Sánchez-Linares, *et al*, 2012; Rosental, *et al*, 2014).

En el eje embrionario se pueden diferenciar claramente dos zonas, la superior de la cual emerge la plúmula y que contiene a las hojas embrionarias cubiertas por una funda protectora denominada coleóptilo. Mientras, que en la parte inferior del eje embrionario se encuentra la raíz embrionaria o radícula y que es protegida por un tejido denominado coleorriza (Nemose, 2008).

¹ **Carióspside:** Fruto seco e indehisciente (no permite que salgan las semillas) en el que el pericarpio está firmemente unido a la semilla (<https://www.eweb.unex.es/eweb/botanica/frutos/cariopsi.html>).

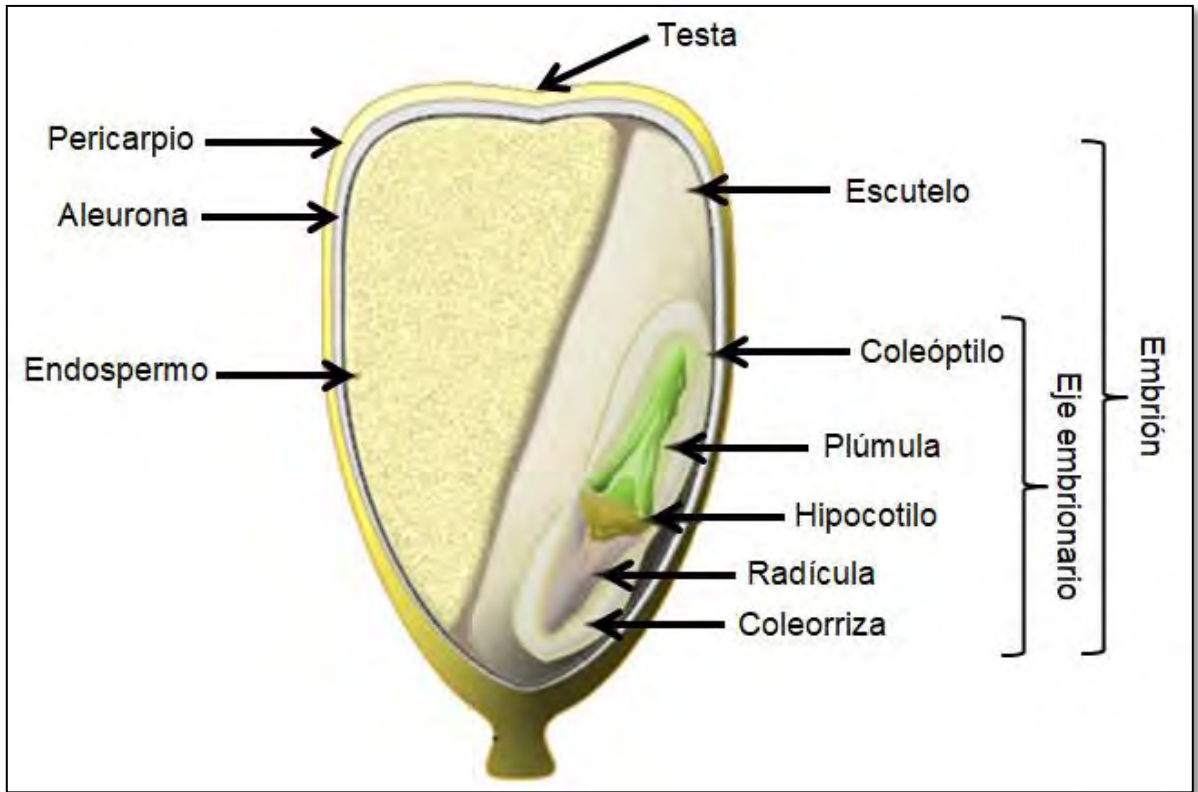


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz. Tomado y modificado de GeoChemBio (2008).

Germinación de la semilla

La germinación es el proceso que inicia con la toma de agua por semilla (imbibición) y culmina con el brote de la radícula del eje embrionario (Bove, *et al*, 2001; Srivastava, 2002). En este periodo hay una actividad metabólica intensa, que involucra cambios en la estructura subcelular, respiración, síntesis de macromoléculas y finalmente, la elongación celular (Bewley, 2001).

La geminación es el resultado de la combinación de muchos eventos celulares y metabólicos, coordinados por una compleja red regulatoria que incluye la

dormancia² de la semilla, y la habilidad intrínseca de bloquear temporalmente la elongación de la radícula (Bove, *et al*, 2001).

Para que la germinación ocurra, la semilla quiescente necesita ser hidratada en condiciones ambientales de temperatura y oxígeno favorables. Sin embargo, estos mismos factores además de la luz y la disponibilidad de agua afectan la germinación. Por otra parte hay factores intrínsecos a la semilla que impiden la germinación, entre ellos se encuentran la dormancia, la permeabilidad que tiene la testa por el agua y el oxígeno, además de la obstrucción del brote de la radícula por el endospermo (Bove, *et al*, 2001).

² **Dormancia:** Condición de una semilla viable intacta que le impide completar la germinación en condiciones desfavorables (Bewley, 1997; Rodríguez-Gacio, *et al*, 2009).

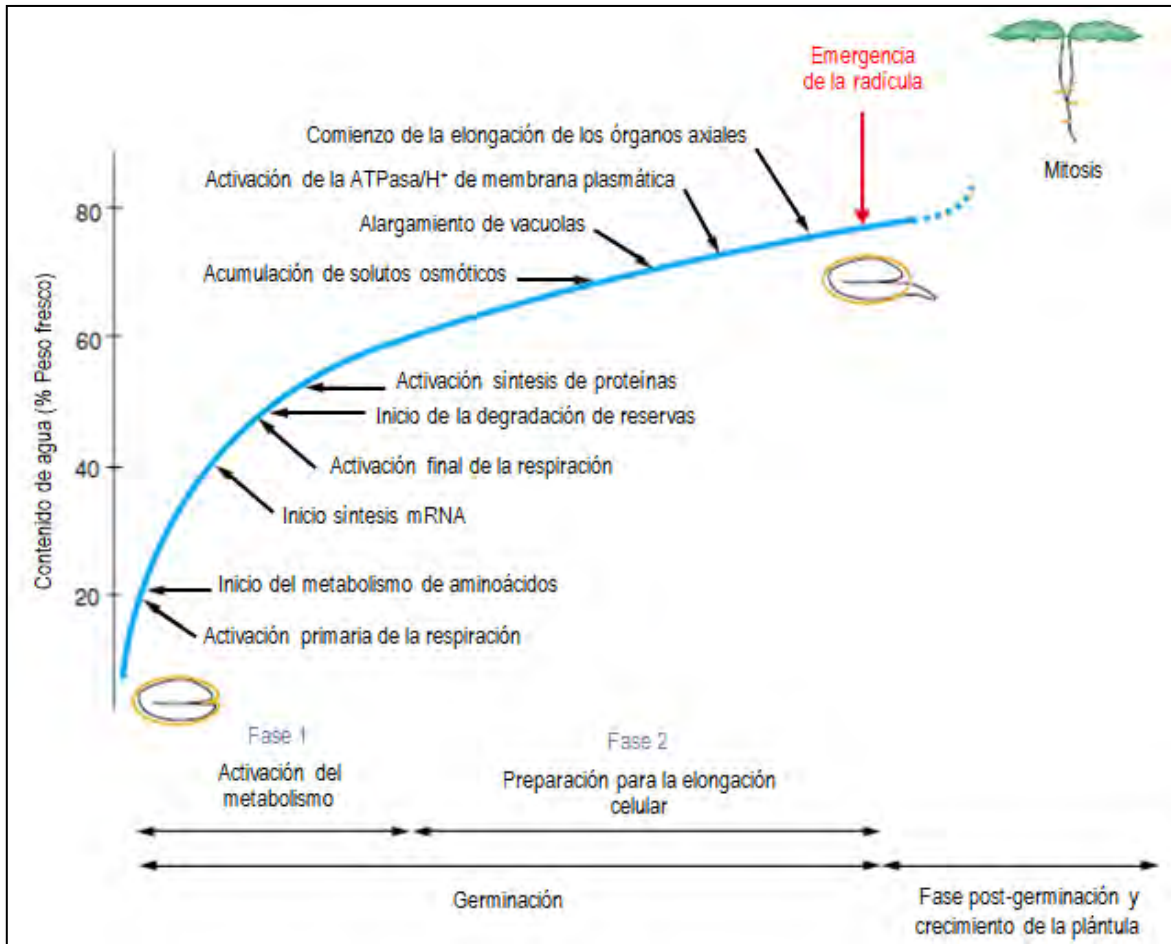


Figura 2. Proceso de germinación. Tomado y modificado de Bove, *et al* (2001).

El proceso germinativo se ha dividido de manera clásica en tres fases de acuerdo a la curva de toma de agua de la semilla, siendo las dos primeras las que cubren la germinación *sensu stricto* (Figura 2). La fase 1, comienza con la hidratación de la semilla y es una fase de imbibición rápida en donde se reanuda la actividad metabólica. Durante esta fase, conocida como imbibición “física”, la activación paso por paso de las rutas metabólicas son resultado del incremento gradual de la hidratación. Cuando el nivel de hidratación excede el 60 %, se llega a la fase 2 de la germinación, entonces la tasa de hidratación se vuelve más lenta y se prepara a las células para su expansión, inician con la elongación celular y concluye con la emergencia de la radícula. Sustancias osmóticamente activas como azúcares,

aminoácidos y también los iones potasio son acumuladas en esta fase. La pared celular es acidificada, lo cual lleva a la pérdida de los enlaces entre los polímeros de la pared celular. Estos eventos coinciden con la activación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, lo cual promueve el debilitamiento del tejido, sobre todo del endospermo en la zona que rodea al eje embrionario, para permitir su alargamiento y emergencia de la semilla, signo de que la germinación concluyó (Bove, *et al*, 2001).

El progreso de la geminación de la semilla puede ser bloqueada temporalmente por la dormancia, que está relacionada con el antagonismo entre dos hormonas endógenas de la planta, el ácido abscísico (ABA), que es un inhibidor de la germinación, y las giberelinas (GAs), las cuales favorecen la germinación (Bove, *et al*, 2001).

En semillas mutantes para la síntesis de GAs, por ejemplo, *gib1* en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y *ga1* en *Arabidopsis thaliana* (Srivastava, 2002), las cuales tienen defectuosa la ciclasa *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS, del inglés “*ent*-copalyl diphosphate synthase), enzima encargada de la conversión del GGPP (*trans*-geranylgeranyl diphosphate) a CPP (*ent*-Copalyl diphosphate), moléculas que forman parte de la biosíntesis de las GAs (Davies, 2010; Carvalho, *et al*, 2011), estas semillas requieren de GAs exógenas para poder completar su germinación. Mientras que las semillas mutantes deficientes en la síntesis de ABA, germinaron fácilmente en presencia de agua o requieren una concentración baja de GAs. Por otra parte, mutantes insensibles a ABA germinaron fácilmente sin la presencia de GAs exógenas o con una concentración baja de las GAs, sin embargo, requirieron una alta concentración de ABA para inhibir la germinación en comparación de semillas silvestres. En contraste, mutantes insensibles a las GAs (por ejemplo, *gai*, *spy* en *A. thaliana*) requirieron de una cantidad mucho menor de ABA para suprimir la germinación de la semilla (Srivastava, 2002).

Función fisiológica de las Giberelinas

Las GAs, comúnmente conocidas como giberelinas (Gupta, *et al*, 2013), son definidas por su estructura más que por su actividad biológica. Todas tienen la estructura de diterpenoide tetracíclico. Dos tipos de GAs son reconocidas principalmente (Figura 3), las que tienen 20 átomos de carbono (C₂₀-GAs), y las que tiene 19 átomos de carbonos (C₁₉-GAs). Las GAs biológicamente activas en plantas superiores son las compuestas por C₁₉.

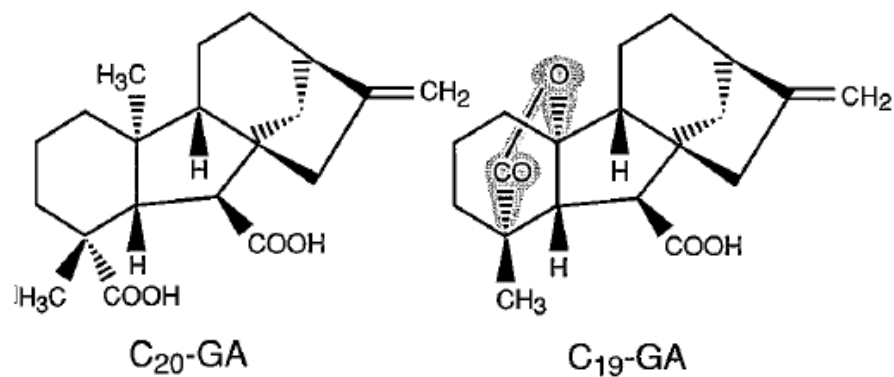


Figura 3. Estructura de las giberelinas de C₂₀ y C₁₉. Tomado de Srivastava, 2002.

El número de GAs conocidas hasta ahora son 125-136. Pero la cantidad de GAs biológicamente activas es pequeña, por ejemplo, GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ y algunos otros más. Otras GAs son intermediarias en la ruta biosintética o son formas inactivas (Srivastava, 2002; Davies, 2010).

Las GAs están involucradas en varios procesos bioquímicos y en respuestas morfológicas importantes. Una respuesta muy común es la promoción de la elongación de órganos axiales, tales como los tallos, pecíolo, y pedicelos de flores (Srivastava, 2002). Además, las GAs estimulan la germinación de las semillas, desencadenan la transición del meristemo al crecimiento del brote, determina la expresión del sexo y el desarrollo de la semilla a lo largo de su interacción con los diferentes factores ambientales: luz, temperatura y agua.

En bioensayos realizados en plantas enanas, se reveló mediante análisis cuantitativos la presencia de GAs en tejidos activos en crecimiento como los ápices de los brotes, hojas jóvenes y flores (Gupta, *et al*, 2013).

El papel más conocido de las GAs es en la germinación de las semillas. Las semillas de muchas plantas, almacenan grandes cantidades de nutrientes de reserva como almidón, proteínas y lípidos, los cuales son hidrolizados durante la germinación para proveer de energía y esqueletos de carbono, bloques necesarios para el crecimiento de la plántula. En semillas de cereales, como el trigo, la cebada y el arroz, las GAs inducen la síntesis de *novo* y/o activación de diferentes enzimas para la hidrólisis de los productos de almacenamiento (Srivastava, 2002).

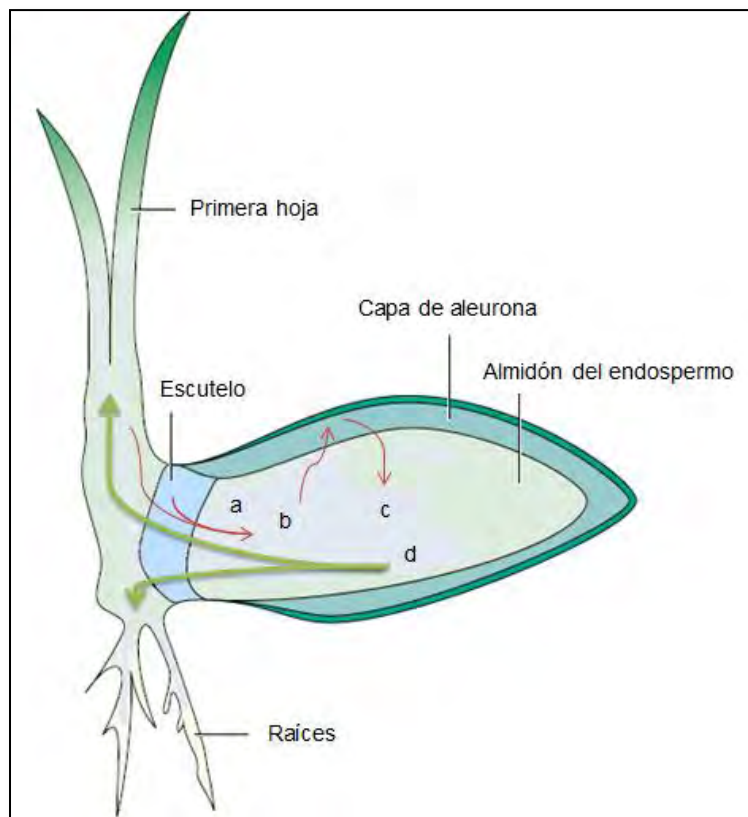


Figura 4. Corte sagital de una semilla germinada donde se muestra el movimiento de GAs y su efecto en la movilización de las reservas. Las GAs se mueven del embrión a la capa de aleurona (a y b) donde diferentes hidrolasas son activadas/sintetizadas, la movilización de las enzimas desde

la aleurona hacia el endospermo almidonoso (c) y la hidrólisis de los nutrientes de reserva y el transporte de los productos de la hidrólisis (aminoácidos y azúcares) del endospermo al embrión (d). Tomado y modificado de Bewley, 2001 y Srivastava, 2002.

En maíz, las GAs son importantes para regular la organización temporal de la fase de maduración de la semilla, así en la embriogénesis temprana del maíz se acumulan más GAs bioactivas, pero su concentración disminuye a medida que los niveles de ABA aumentan durante el proceso de maduración de la semilla (Gupta, *et al*, 2013). Durante la germinación las GAs son producidas en el embrión (Figura 4), algunas son producidas en el eje embrionario y son liberadas al escutelo, desde allí se difunden a las células vivas de la capa de aleurona, donde se induce la producción de varias enzimas hidrolíticas (Bewley, 2001). Las enzimas se secretan dentro del endospermo en donde el almidón es hidrolizado, y los productos de la hidrólisis son transportados al embrión para promover su crecimiento (Srivastava, 2002).

Función fisiológica del Ácido abscísico

ABA es un sesquiterpenoide de C₁₅, con un anillo y una cadena lateral. En el C-1' hay una asimetría así hay las formas (+) y (-) o (S) y (R). Solo el enantiómero S-(+) se encuentra naturalmente en las plantas (Figura 5; Srivastava, 2002).

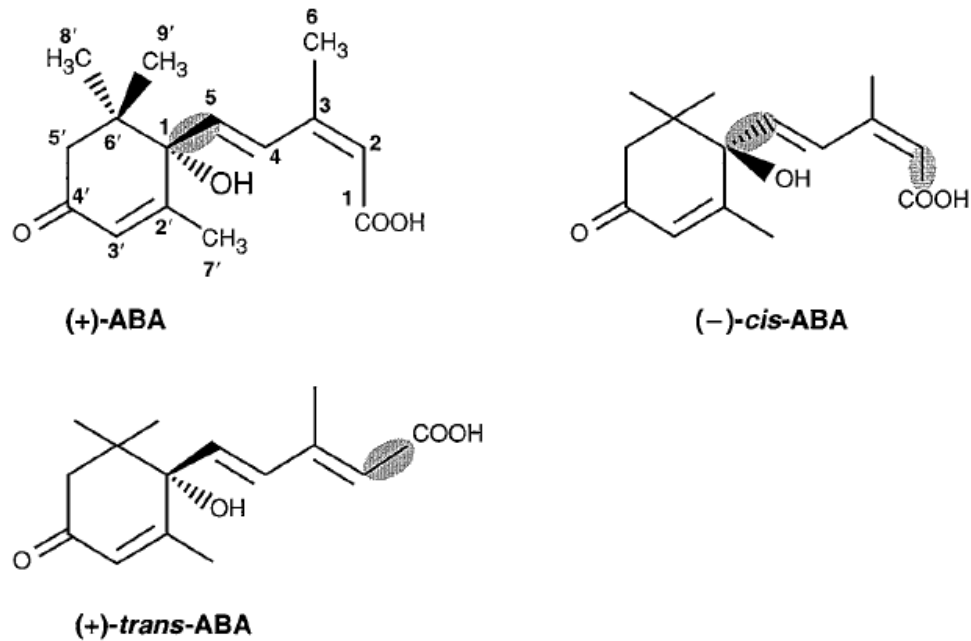


Figura 5. Estructura de ABA. Estructura de (+)-ABA y sus enantiómeros. Tomado de Srivastava, 2002.

ABA es un ácido débil y tiene un pH neutro en solución. A pH ácido, está en su forma protonada, la cual se puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares, pero la forma aniónica no difunde. Por ello se pensaba que se necesitaba de una “trampa de aniones” para que el ABA se acumulara en compartimentos alcalinos (por ejemplo, cloroplastos iluminados), sin embargo, ya se han identificado múltiples transportadores de membrana plasmática para ABA, como los dos miembros de la familia de transportadores ABC, “ATP-Binding Cassette” y varios miembros de la familia de transportadores de nitrato NRT/PTR. Por lo que, dependiendo del pH de los compartimentos celulares, el ABA puede encontrarse en cantidades diferentes y encontrarse en vacuola, citoplasma y cloroplastos. La acumulación de ABA en cloroplastos podría deberse a su alto pH en comparación con el del citoplasma (Srivastava, 2002; Finkelstein, 2013).

ABA regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas incluyendo la maduración del embrión, dormancia de la semillas, germinación,

elongación y división celular, inducción floral y respuestas a estrés ambiental tal como la sequía, salinidad, frío, ataque de patógenos y radiación UV (Finkelstein, 2013). Muchas de estas respuestas a estrés, como la síntesis de osmolitos compatibles (por ejemplo, prolina), proteínas relacionadas con la defensa (por ejemplo, superóxido dismutasa) y las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés), involucran la regulación de la expresión de genes. Otras respuestas relacionadas al estrés como el cierre de los estomas durante el déficit de agua, involucra solamente cambios en el volumen celular y no la regulación de actividad de los genes (Srivastava, 2002).

Aunque ABA es necesario para generar efectos de tolerancia en las plantas hacia el estrés ambiental, también es requerido para el crecimiento y desarrollo de las plantas en ausencia de estrés (Sah, *et al*, 2016). A pesar de que ABA ha sido considerado históricamente como un inhibidor del crecimiento, tejidos jóvenes tienen altos niveles de ABA, mutantes deficientes de ABA se encuentran severamente atrofiadas (Figura 6), en parte porque su habilidad de reducir la transpiración y establecer la turgencia se ve afectada. Mutantes tratadas con ABA exógeno restauran la expansión y crecimiento celular normal (Finkelstein, 2013).

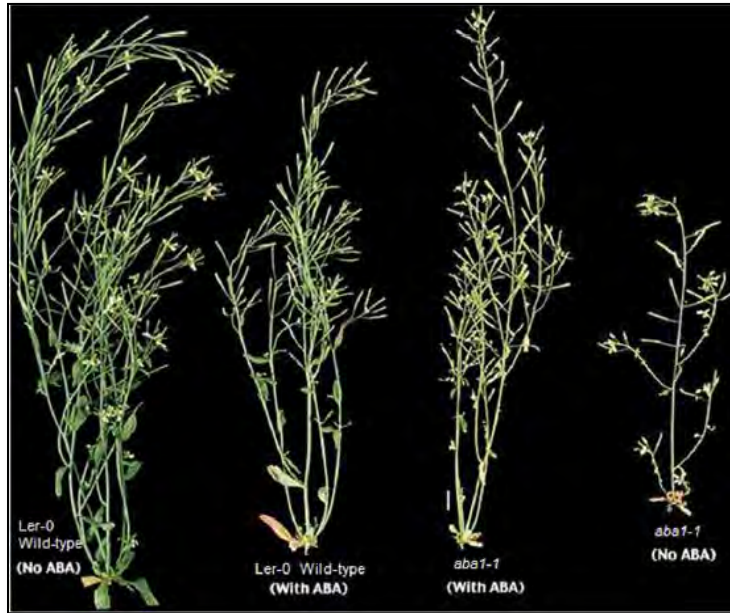


Figura 6. Crecimiento de las plantas “wild-type” Ler-0 y deficientes en ABA (*aba1-1*) en tratamientos con o sin ABA. Para el tratamiento con ABA, las plantas fueron rociadas semanalmente con 5 mM ABA, comenzando en la etapa de roseta y se continuó hasta que las silicuas comenzaron a dorarse. Las plantas *aba1-1* son deficientes en el contenido de ABA debido a la deficiencia en la enzima zeaxantina epoxidasa, primera enzima en la síntesis de la hormona, por lo que la adición de ABA mejora el crecimiento de la planta. Tomado de Finkelstein, 2013.

ABA desempeña un papel central en el desarrollo y maduración de las semillas, permitiendo que las semillas resistan la desecación y lleguen a la dormancia. Las mutantes insensibles a ABA, *abi1*, *abi2* y *abi3* son capaces de germinar aún en presencia de 10 μ M de ABA. La habilidad de germinar de las mutantes ha mostrado que ABA es requerido para evitar la germinación precoz de las semillas en la planta (Finkelstein y Somerville, 1990).

Contrario a lo que sucede en la etapa embriogénica, el ABA disminuye durante la germinación, permitiendo que la germinación proceda. En el proceso de germinación de muchas semillas y el crecimiento de sus embriones, son inhibidos por ABA (Srivastava, 2002).

Uno de los efectos de ABA sobre la movilización de las reservas durante la germinación es el bloqueo de la inducción de la α -amilasa en la aleurona de avena, maíz y fríjol (Van Onckelen, *et al*, 1980; Higgins, *et al*, 1982; Oishi and Bewley, 1990). Resultado opuesto al que ocasionan las GAs.

En órganos sin crecimiento, ha sido reportado que la aplicación de ABA inhibe la síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleicos, afectando las membranas y los niveles de otras fitohormonas, induciendo así la abscisión y senescencia (Srivastava, 2002). Por lo que es probable que durante la germinación, éstos procesos también sean afectados por ABA.

Adicionalmente, ABA puede inhibir el crecimiento de las raíces durante la germinación de las semillas, esto debido probablemente a la alteración del balance de agua, aunque también puede deberse a cambios en la expresión de genes (Finkelstein y Somerville, 1990; Srivastava, 2002).

Movilización de azúcares en la germinación

Durante el crecimiento y desarrollo vegetativo activo, la planta depende de la energía obtenida de la fijación de CO₂. Los carbohidratos sintetizados en los tejidos fuente como las hojas maduras, órganos de almacenamiento y en algunos casos las raíces maduras, son exportados hacia los sitios menos activos o inactivos fotosintéticamente, denominados tejidos demanda, como las raíces en desarrollo, hojas inmaduras, frutos o semillas (Roitsch, 1999; Yu, *et al*, 2015).

La relación dinámica entre los tejidos fuente y demanda tiene cambios marcados durante el ciclo de vida de la planta. Las hojas comienzan su ciclo de vida como tejido demanda, y cuando maduran pasan a ser fuente de nutrientes, mientras que la semilla en un inicio es un tejido fuertemente demandante de nutrimentos y ya madura llega a ser fuente de nutrientes durante la germinación (Jameson, *et al*, 2016).

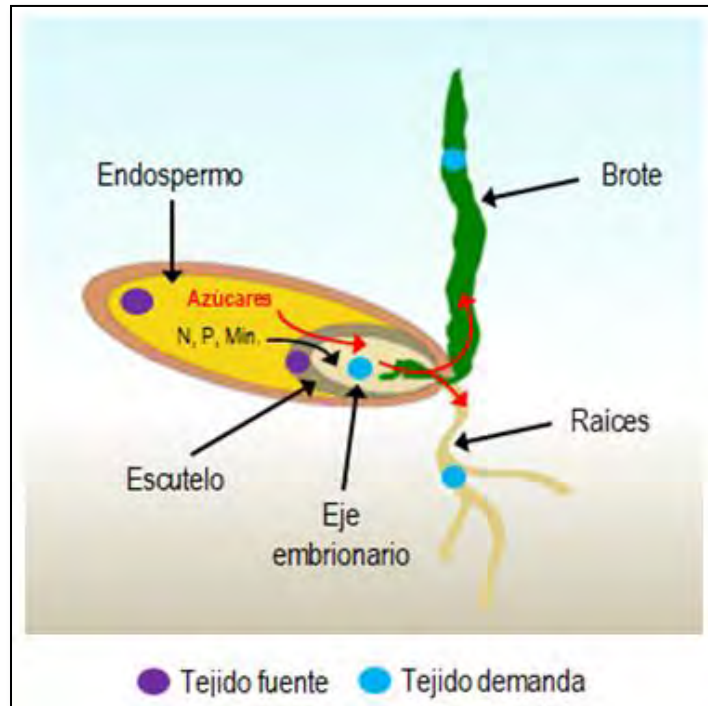


Figura 7. Translocación de sacarosa y otros nutrientes del tejido fuente (endospermo y escutelo) al tejido demanda (eje embrionario, brote y raíces). En la germinación, los azúcares, péptidos, aminoácidos, fósforo (P), y minerales (Min) producidos de la hidrólisis de los compuestos de reserva localizados en el endospermo y en el escutelo son transportados al eje embrionario para sustentar su desarrollo a plántula (Yu, *et al*, 2015). Tomado y modificado de Griffiths, *et al*, 2016.

En las semillas del maíz existen dos tejidos fuente, el endospermo y el escutelo, mientras que el eje embrionario es un tejido demanda (Figura 7). El endospermo contiene una proporción alta de almidón, cerca del 80 % de su peso, aunque también es rico en proteínas de reserva, entre otros nutrientes. La movilización del almidón y la degradación de las proteínas de reserva durante el proceso de germinación comienza ya que el metabolismo de la semilla está totalmente recuperado, es decir en la fase 2 de la hidratación de la semilla, debido a que en esa fase se han alcanzado los niveles adecuados de las coenzimas $NAD^+/NADH$ y el estado redox promueve la reducción de los puentes disulfuro a través de la actividad de las tioredoxinas, haciendo más susceptible a los inhibidores de proteasas y amilasas a la proteólisis, lo que finalmente contribuye a mejorar la

actividad de degradación de proteínas y almidón (Rosental, *et al*, 2014), contribución adicional al conocido aumento en la transcripción de las α -amilasas inducido por la reducción de ABA y el incremento en las GAs (Srivastava, 2002).

Adicionalmente, durante la fase II y III se producen enzimas que degradan las paredes celulares ricas en manano, polisacáridos de unidades de manosa. Los endospermos de tomate son ricos en manano, cerca del 60 % de sus paredes celulares lo contienen. Durante la germinación se inducen diferentes tipos de endo- β -mananasas, en tomate el gen *LeMAN2*, el cual codifica para una proteína mananasa y se expresa principalmente en la tapa del endospermo durante germinación, se ha asociado con el ablandamiento del endospermo en la zona de la emergencia de la radícula y es inducida por GAs, mientras que el gen *LeMAN1*, que codifica para una proteína mananasa durante la post-germinación, moviliza galactomananos en la parte lateral del endospermo después de la emergencia de la radícula (Nonogaki, *et al*, 2000).

El escutelo, es otro tejido fuente de nutrientes que presenta un contenido alto de lípidos, cerca del 40 %, solo comparable con las cantidades encontradas en leguminosas. Su capacidad de tejido fuente se debe al menos tres actividades esenciales para la semilla:

- a) Su capacidad de absorber los nutrientes que provienen del endospermo, lo que probablemente se debe a que expresa una buena cantidad de transportadores en sus membranas. Se han encontrado transportadores de sacarosa (Sac) de tipo activo, los SUT, en las células del parénquima del escutelo, en las células acompañantes del floema en arroz, ricino y trigo, los mismos que se han encontrado en la capa de aleurona en arroz y trigo (Bick, *et al*, 1998; Matsukura, *et al*, 2000; Aoki, *et al*, 2006, Sánchez-Linares, *et al*, 2012). Se ha sugerido que los SUT pueden contribuir a la acumulación de sacarosa en el escutelo durante la movilización de almidón, ya que la glucosa (Glu) producida por la hidrólisis del almidón es convertida a Sac (Aoki, *et al*, 2006).

- b) El potencial de sintetizar azúcares a partir de lípidos debido a la activación de la degradación de lípidos, la activación de la transcripción de las enzimas clave en la vía del ciclo del glioxilato y la síntesis de azúcares (Bewley y Black, 2004; Rosental, *et al*, 2014).
- c) El eflujo de nutrientes para sustentar el crecimiento del eje embrionario, éste último un tejido demanda durante la germinación (Yu, *et al*, 2015), aunque no se han descrito a los transportadores que de manera específica realizan esa función.

Transporte de azúcares a través de los SWEETs

El transporte de azúcares desde los tejidos fuente a los tejidos demanda es uno de las mayores determinantes para el crecimiento de las plantas (Lemoine, *et al*, 2013). Los transportadores implicados en la movilización difusional de azúcares en plantas son los SWEETs (del inglés “Sugar Will Eventually be Exported Transporters”).

Los SWEETs son proteínas de aproximadamente 30 kDa, son los únicos transportadores de azúcares con siete cruces transmembranales y están divididos en dos dominios de triple hélice, TBH, del inglés “Triple-Helix Bundle” (Chen, *et al*, 2010; Tao, *et al*, 2015). Los SWEETs de los eucariontes consisten en duplicaciones de las variantes de SWEET de procariontes, los cuales tienen tres cruces transmembranales y son llamados semiSWEETs. Además, en los SWEETs de los eucariontes, los dos dominios THB se unen por un cruce transmembranal adicional (Cruce transmembranal número 4 de la figura 8; Chen, *et al*, 2015).

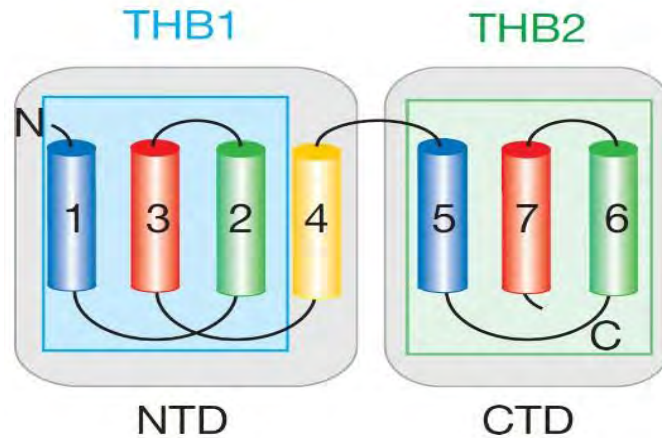


Figura 8. Estructura del transportador OsSWEET2b. Diagrama de la topología de membrana de OsSWEET2b. El cruce transmembranal 4 y el primer paquete de triple hélice o THB1 constituyen el dominio amino terminal (NTD, N-terminal domain), mientras que el THB2 forma el dominio carboxilo terminal (CTD, C-terminal domain). Tomada de Tao, *et al*, 2015.

Los SWEETs están conservados desde arqueobacterias hasta plantas y humanos (Cheng, *et al*, 2015). Estas proteínas de membrana fueron identificadas en *A. thaliana* utilizando la base de datos de proteínas de membrana para plantas, Aramemnon. Los genes candidatos fueron co-expresados con un sensor de Glu o Sac de alta sensibilidad en células embrionarias de riñón humano, HEK293T, las cuales se caracterizan por tener baja actividad de consumo de Glu y muestran un consumo insignificante de Sac (Chen, *et al*, 2010; Chen, *et al*, 2012; Eom, *et al*, 2015).

Todos los SWEETs que han sido caracterizados tienen la capacidad de transportar varios monosacáridos y disacáridos, pero su afinidad por estos es baja, alrededor de 11 a 30 mM. La baja afinidad puede ser interpretada como un transporte especializado con alta tasa de recambio, en lugar de un movimiento eficiente a bajos niveles de sustrato.

El transporte de azúcares mediado por SWEETs es bidireccional, lo que fue confirmado con un radiotrazador en ovocitos de *Xenopus*, y su actividad es

independiente del pH, lo cual corresponde a un mecanismo uniporte. Transporte que le permite llevar a cabo el influjo o eflujo de los azúcares en las células vegetales (Chen, *et al*, 2015)

Los SWEETs de plantas han sido clasificados en 4 clados de acuerdo a su homología en secuencia de nucleótidos, que coincide con una agrupación relativa al sustrato que prefieren transportar. El clado I y II contienen miembros que prefieren transportar hexosas, mientras que los miembros del clado III transportan Sac eficientemente y los miembros del clado IV transportan fructosa (Fru). Sin embargo, esta clasificación de los SWEETs en clados, no predice el proceso fisiológico en el cual la proteína está involucrada, por ejemplo, AtSWEET5, AtSWEET8 y AtSWEET13 son vitales para la nutrición polen, y estos se encuentran dentro del clado II o III (Eom, *et al*, 2015).

Papel de los SWEET en la embriogénesis de las semillas

Durante la embriogénesis de la semilla, los tejidos maternos le proporcionan los nutrientes para su desarrollo y maduración. La Sac, principal forma en que se transporta el carbono a larga distancia, es liberada del floema a la cubierta de la semilla materna y de ahí es transportada a la cubierta al embrión.

En *A. thaliana* tres transportadores SWEET son importantes en el movimiento de la Sac desde los integumentos cercanos a la cubierta de la semilla hacia el endospermo y el embrión. Lo anterior se propuso después de haber producido una mutante en *A. thaliana* *sweet11:12:15* en donde se observa un pobre desarrollo del embrión y el endospermo, con una acumulación alta de almidón en la cubierta de la semilla (Chen, *et al*, 2015b).

De acuerdo a la localización subcelular de SWEET11, 13 y 15 a lo largo del desarrollo de la semilla de *A. thaliana* y los efectos de su ausencia en la semilla, Chen y colaboradores (2015b) propusieron un modelo secuencial de eventos que permiten que al final llegue la Sac al endospermo y también al embrión (Figura

9A). La Sac entra al floema del funículo³, se dirige hacia el integumento externo probablemente a través de plasmodesmata⁴ lo que permite el paso simplástico de nutrientes hacia el tegumento exterior. Aunque, ya que no todo el integumento está conectado simplásticamente, los azúcares también pueden ser transportados desde el integumento exterior hacia el apoplasto del tegumento interno por los transportadores SWEET15. Después el integumento interior toma la Sac y a través del SWEET11 la libera hacia el apoplasto cercano al endospermo y al embrión. En la zona micropilar del embrión se encuentra expresado SWEET12 y podría liberar el azúcar en esa zona, debido a que en estadios tardíos se rompen las conexiones simplásticas cuando se degenera el suspensor, tejido que une al embrión con la planta madre. El SWEET12 podría ser importante para mantener el crecimiento del embrión. Mientras SWEET11 y 15 al encontrarse abundantemente expresados en la zona micropilar del endospermo, podrían abastecer de Sac al embrión.

En maíz se ha descrito el ZmSWEET4c, el cual podría ser el SWEET más importante durante la embriogénesis de la semilla. ZmSWEET4c transporta hexosas a través de la capa de transferencia basal del endotelio o BETL (del inglés “Basal Endosperm Transfer Layer”), permitiendo la entrada de nutrientes hacia el endospermo de la semilla. Mutantes *zmsweet4c*, son defectuosas en el llenado de la semilla (Figura 9B), indicando que la pérdida de transporte de hexosas en el BETL perjudica la transferencia de azúcares importados del tejido materno (floema), lo cual afecta drásticamente el tamaño del endospermo y en menor medida el del eje embrionario (Sosso, *et al*, 2015).

³ El **funículo** une la semilla (*ex ovulo*) en desarrollo a la placenta y también proporciona la única ruta de transporte de nutrientes durante el desarrollo de la semilla (Tan, *et al*, 2016).

⁴ El **simplasto** es una red continua de citoplasmas de diferentes células interconectados por unas estructuras llamadas plasmodesmata, que son poros revestidos de membrana plasmática que atraviesan las paredes celulares de las células adyacentes conectando así sus citoplasmas (Palacios Vargas, 2016; Sevilem, *et al*, 2013).

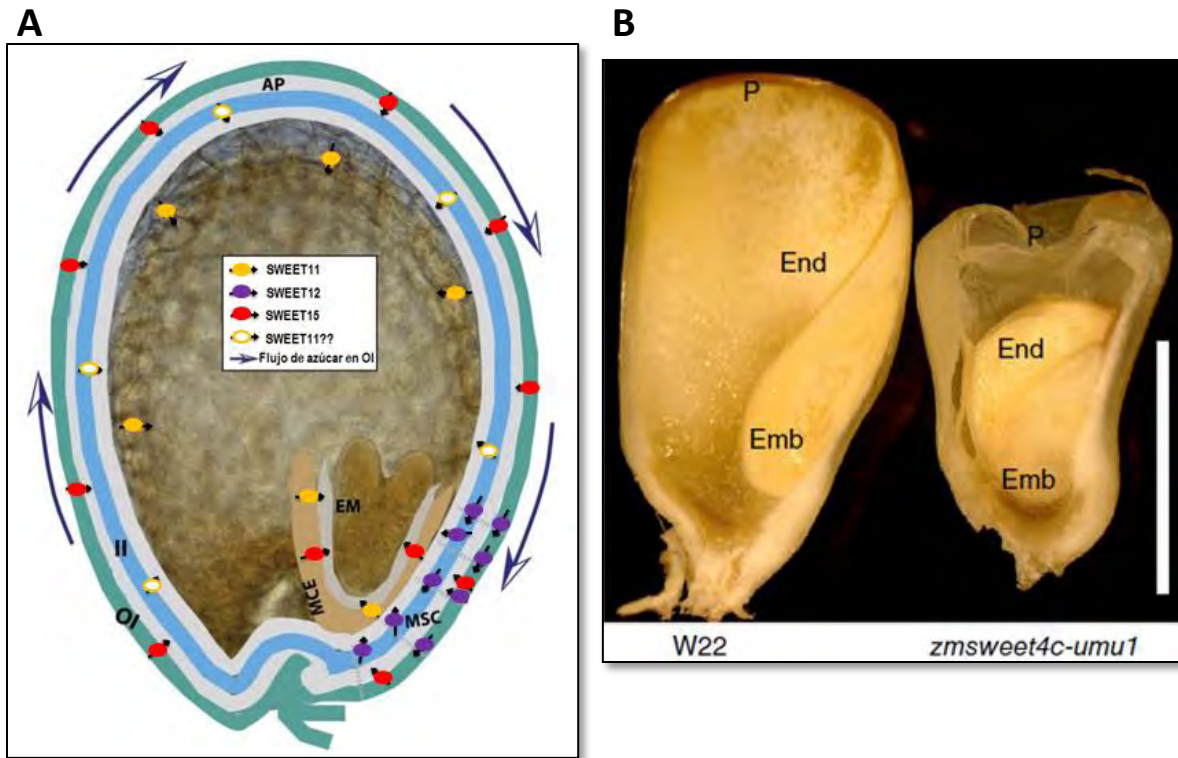


Figura 9. Modelo del transporte secuencial mediado por los SWEET que transportan sacarosa durante el desarrollo de la semilla de *A. thaliana* y corte sagital de la semilla silvestre de maíz y la mutante *zmsweet4c*. A. Los SWEET fueron colocados en la zona en la que fueron encontrados en las fusiones de la proteína con GUS. OI, integumento externo; AP, apoplasto; II, integumento interno; MSC, Zona micropilar final de la cubierta de la semilla; MCE, Zona micropilar del endospermo; EM, embrión. Tomada y modificado de Chen, *et al*, 2015b. B. La semilla silvestre o W22 (izquierda) y de la mutante *zmsweet4c-umu1* (derecha) a los 15 días después de la polinización. P, pericarpio; End, endospermo; Emb, eje embrionario. Tomada de Sosso, *et al*, 2015.

JUSTIFICACIÓN

Otro proceso en el que la participación de los SWEETs puede ser clave es la germinación de la semilla. En un estudio previo se observó que el simportador Sac/H⁺ solo se encuentra expresado en el escutelo de la semilla de maíz y no en el eje embrionario (Sánchez-Linares, *et al*, 2012). El SUT podría ser necesario para la acumulación de Sac en el escutelo, sin embargo, ya que el eje embrionario carece de simportadores de Sac es posible que su nutrición dependa del transporte difusional, ya sea través de plasmodesmata, o bien de transportadores membranales (Figura 10). El movimiento de azúcares para nutrir al eje embrionario desde el apoplasto sería a favor del gradiente de concentración, en donde los transportadores difusionales SWEET podrían participar de manera importante en la nutrición del eje embrionario en crecimiento.

Debido a que el tejido embrionario tiene invertasas activas, es posible que la Sac sea hidrolizada en el citoplasma de los escutelos o en los apoplastos, por lo que las hexosas producidas por estas enzimas podrían provocar la expresión de transportadores de Sac como de hexosas en las membranas de los escutelos o bien en los ejes embrionarios.

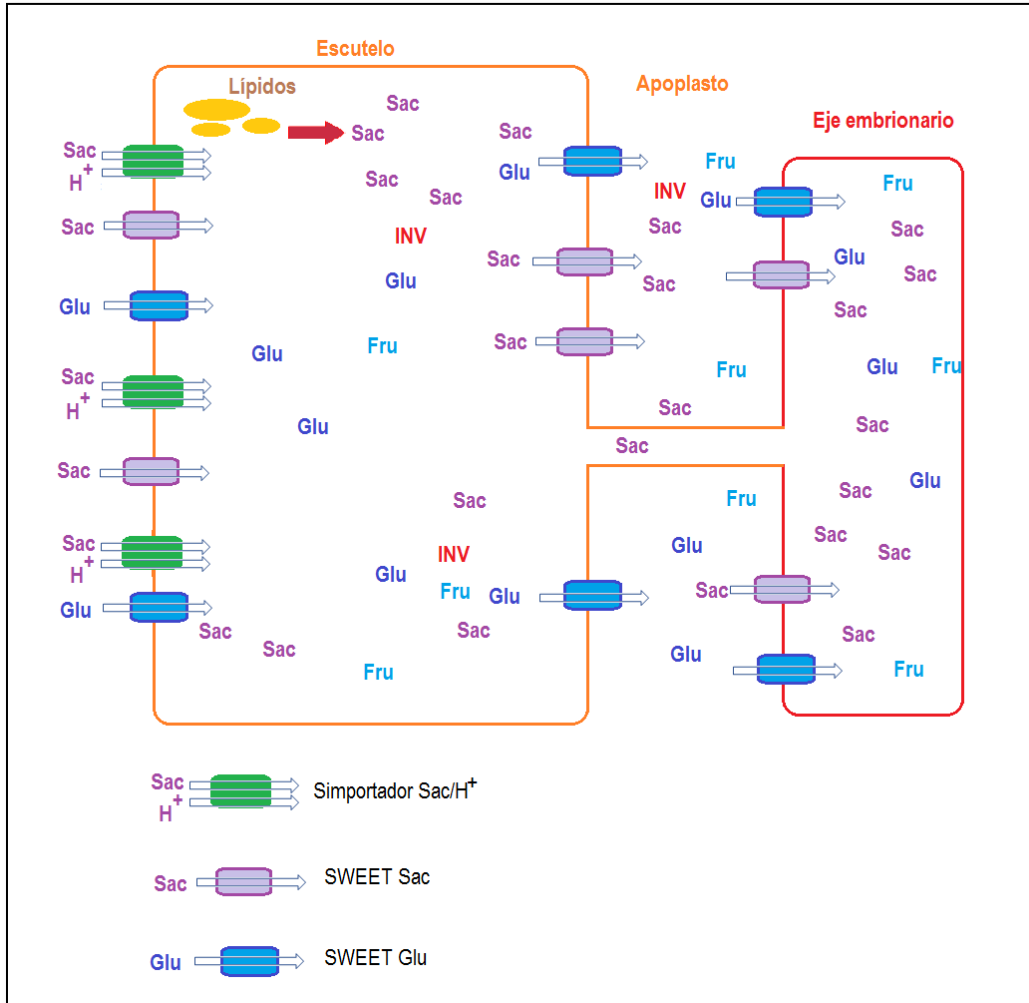


Figura 10. Modelo propuesto del transporte de azúcares en los tejidos embrionarios del maíz.

Los escutelos tienen la capacidad de acumular Sac, ya que tienen la capacidad de sintetizar Sac a partir de los lípidos de reserva y a que expresan un simportador Sac/H⁺ que permite la acumulación de Sac a expensas del gradiente de protones. Sin embargo, los escutelos proporcionan nutrientes al eje embrionario en crecimiento, por lo que también podría contener transportadores difusionales, los SWEET. En vista de que las células contienen a las invertasas (INV) estas podrían hidrolizar a la Sac, por lo que el escutelo podría exportar hexosas y Sac. El eje embrionario carece del simportador Sac/H⁺ así que podría introducir los azúcares a través de dos mecanismos, 1) mediante los plasmodesmata, que son conductos que conectan célula a célula, o 2) a través de SWEETs específicos para Sac o Hexosas.

En nuestro laboratorio se identificó mediante PCR punto final que *ZmSWEET4c*, *13a*, *13b* y *14b* se expresan a largo de la germinación (Flores-Barrera, 2017). Ensayos posteriores mediante qPCR demostraron que además de esos también *ZmSWEET6b* y *11* se expresan de manera abundante durante la germinación, y que se presentan algunas variaciones en la expresión dependiendo del tejido embrionario que se examine (López-Coria, comunicación personal). Por lo que es posible que se encuentren participando en la nutrición del eje embrionario durante la germinación. Al momento, se está realizando la clonación y la expresión de las proteínas en sistemas heterólogos para determinar su actividad de transporte, su especificidad por solutos y su localización subcelular, sin embargo desconocemos como se regula su expresión.

La comunicación entre los diferentes tejidos embrionarios es regulada por la presencia de hormonas que impactan en la movilización de azúcares, por lo que es factible que las hormonas y las variaciones en los contenidos de azúcares afecten la expresión de los transportadores SWEETs.

Respecto a la regulación por la disponibilidad de azúcares, Sosso y colaboradores (2015) encontraron que glucosa y sacarosa aumentan la transcripción de *ZmSWEET4c* durante la embriogénesis, por lo que es probable que otros SWEETs también respondan a ese tipo de regulación. Por lo anterior se decidió determinar el efecto de embeber semillas en Glu, Sac, GA₃ y ABA sobre la expresión de los transportadores SWEET en tejido embrionario de maíz.

HIPÓTESIS

La germinación es regulada por los contenidos de las hormonas GA₃ y ABA, y durante esta se producen cambios importantes en los niveles de carbohidratos, por lo que, la expresión de los transportadores SWEETs se afectará al germinar la semilla con GA₃, ABA, Glu y Sac.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de los azúcares y hormonas en la expresión de los transportadores de azúcares tipo SWEET en tejido embrionario de maíz germinado.

Objetivos particulares

1. Germinar semillas de maíz VS-535 en diferentes tipos y concentraciones de Glu y Sac, así como en presencia de GA₃ y ABA.
2. Obtener los ejes embrionarios y escutelos de las semillas de maíz germinadas con carbohidratos y hormonas.
3. Extraer el RNA y obtener cDNA de los tejidos embrionarios de semillas de maíz.
4. Obtener los perfiles de expresión de los SWEETs 4c, 6b, 11, 13a, 13b y 14b en presencia de carbohidratos u hormonas en tejido embrionario mediante RT-qPCR.
5. Determinar el efecto de los tratamientos de carbohidratos y hormonas sobre los niveles de carbohidratos solubles.

6. Comparar el efecto de los tratamientos de carbohidratos y hormonas en los niveles de los transportadores de azúcares SWEETs y el nivel de carbohidratos en los ejes y embriones de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a que en el transcurso de la germinación hay cambios en los contenidos de azúcares y hormonas se incubaron semillas durante 24 h con los azúcares solubles, Sac y Glu, así como de las hormonas GA₃ y ABA y a partir de estas semillas se extrajeron los ejes embrionarios y los escutelos para determinar la expresión de los transportadores SWEETs y su contenido de carbohidratos, según se observa en el diseño experimental de la Figura 11.

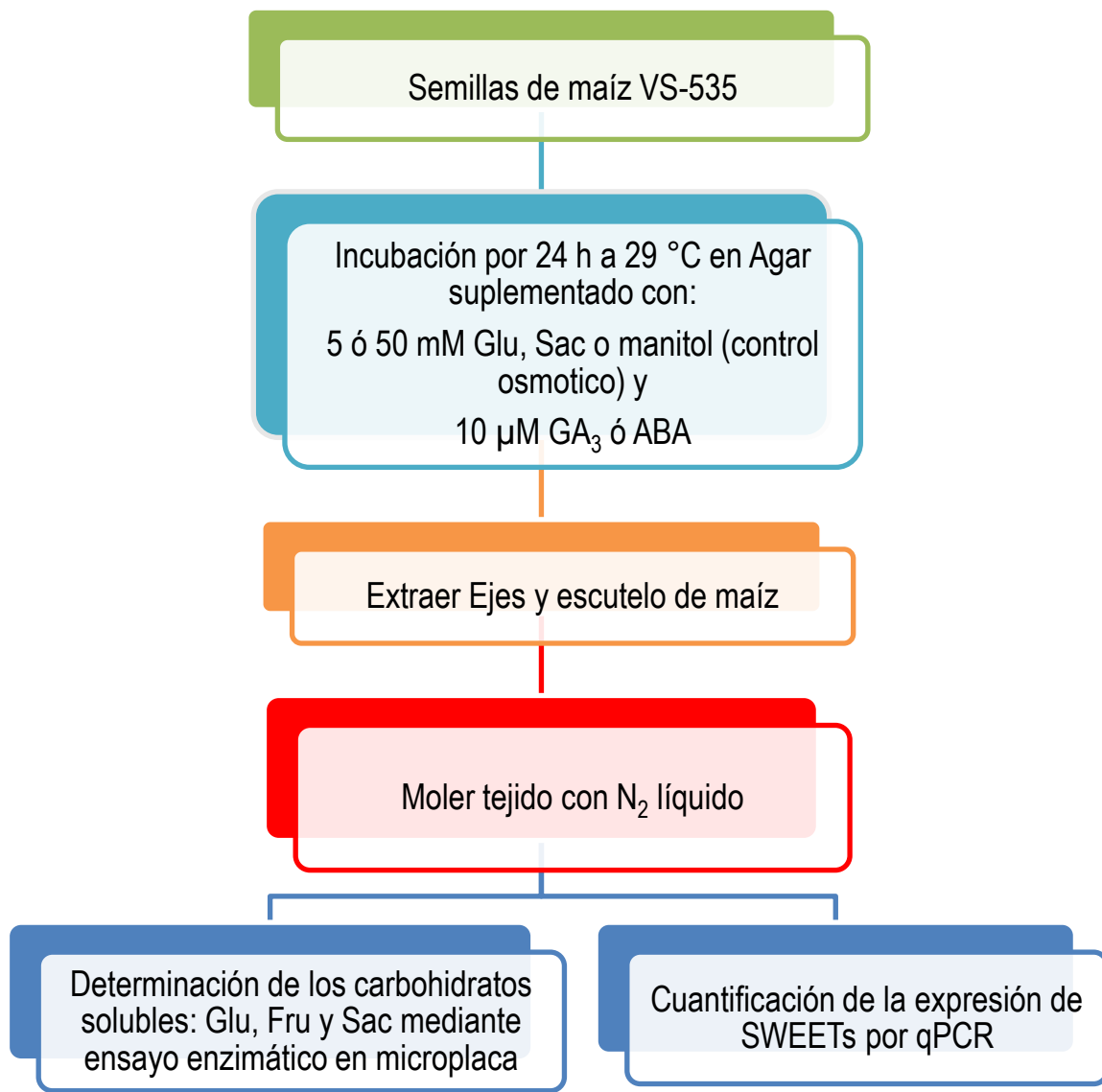


Figura 11. Diseño experimental para la cuantificación de la expresión de SWEET y contenido de carbohidratos en tejido germinado de maíz.

Material vegetal

Se utilizaron lotes de 40 semillas de maíz VS-535 (Variedad Sintetica-535) para cada tratamiento. Las semillas se desinfectaron durante 2 min en agitación con una disolución de Cloralex 2 % y se lavaron con agua destilada estéril hasta que dejó de percibirse el olor al desinfectante. Después, las semillas se embebieron en

agar al 1 % (control) o bien, en medio suplementado con 5 mM o 50 mM de los azúcares Glu, Sac o manitol (Man), éste último se usó como control osmótico. Las concentraciones de azúcares se eligieron de acuerdo a lo reportado por Ramírez-Verdejo (2009), quién realizó estudios sobre la expresión de los transportadores de hexosas en la germinación del maíz a diferentes concentraciones de hexosas, encontrando que a 50 mM es donde se observan los mayores efectos, además, concentraciones mayores de carbohidratos como 167 mM, llevan a incrementar la concentración de ABA e inhibir la germinación (Prince, *et al*, 2003). Adicionalmente, otros lotes de semillas se embebieron con 10 μ M de las GA₃ o ABA, las concentraciones se eligieron debido a que en éstas se observaron los efectos de progresión o paro de la germinación, respectivamente, de acuerdo a lo reportado por Aguilera-Alvarado (2010). Todas las semillas se germinaron a 29°C durante 24 h en oscuridad. Los tejidos embrionarios, escutelo y eje embrionario, se aislaron manualmente con la ayuda de una navaja de un solo filo. Por último, los tejidos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Obtención del RNA

Para la obtención del RNA se siguió el método reportado por Carvente-García, 2014. Los tejidos se congelaron con N₂ líquido y se pulverizaron en un mortero estéril frío, previamente lavado con SDS al 5 %. Para la obtención del RNA se tomaron aproximadamente entre 500 mg a 1 g del polvo y se colocaron en un microtubo limpio y estéril, se agregó 1 mL de Trizol (Thermo Fisher Scientific), después se agitó en un vórtex hasta resuspender la muestra y se incubó por 5 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 200 μ L de cloroformo y se agitó manualmente de manera vigorosa por 15 s, después se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. En seguida se centrifugó durante 15 min, 12,000 g a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo microtubo estéril y para precipitar el RNA, se le añadieron 500 μ L de isopropanol.

El tubo se mezcló por inversión 5 veces y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a 4°C.

El RNA formó un precipitado de color blanco a transparente, el cual se disolvió en 400 µL de agua estéril. Lo anterior (precipitado banco) se debió a que el tejido embrionario de maíz tiene gran cantidad de almidón y otros azúcares, por lo que fue necesario hacer un mayor número precipitaciones del RNA para eliminar la mayor parte de los azúcares contaminantes. Para ello se adicionaron 400 µL de fenol saturado con amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.3 (0.1 M citrato de sodio, 0.1 M ácido cítrico):cloroformo, 1:1 (v/v), se agitó en un vórtex y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un microtubo estéril y se añadieron nuevamente 400 µL de cloroformo, se mezcló en un vórtex y se centrifugó por 10 min a 12,000 g a 4°C. La fase acuosa se colocó en un nuevo microtubo estéril y se adicionaron 50 µL de 3 M acetato de sodio y 100 µL de etanol absoluto, se mezcló por inversión 5 a 8 veces. La mezcla se incubó a -80°C por 30 min para permitir que el RNA precipitara. Después se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y se agregó 1 mL de 70 % etanol, se mezcló con vórtex durante 15 s y se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C, el lavado se repitió dos veces.

El sobrenadante se retiró cuidadosamente del tubo y el precipitado se dejó secar al aire por no más de 5 min. El precipitado se disolvió en 40 µL de agua estéril y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Cuantificación y evaluación de la integridad del RNA

Se determinó la cantidad de RNA de cada muestra en un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para la evaluación de la integridad del RNA, se mezcló el volumen necesario para obtener 1 µg de RNA, 2 µL de amortiguador de carga 6X DNA loading (Thermo Scientific) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para un volumen final de 10 µL. Las muestras se

resolvieron en un gel de agarosa al 2 % (0.7 g agarosa, 700 µL amortiguador TAE 50X, 35 µL de 0.5 mg/mL bromuro de etidio, 34.3 mL agua estéril) a 75 V por 45 min. Se usó TAE 1X como amortiguador de corrida. La integridad de las bandas de las subunidades ribosomales 18S y 28S se evaluaron en un transiluminador ChemiDoc MP System, BioRad.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se empleó la transcriptasa reversa (RT). Se utilizó el volumen necesario para tener 1 µg de RNA, éste se mezcló con 1 µl de Oligo dT 20 µM (SIGMA) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 10 µL. Se incubó a 80°C por 5 min y después 5 min en hielo.

A la mezcla anterior se le agregaron 10 µL de la siguiente mezcla de reacción: 4 µL de buffer ImProm 5X (Promega), 2.4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de RT (Promega) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para un volumen final de 10 µL. Las condiciones que se utilizaron para la RT fueron: alineación 5 min a 25°C, extensión 1 h a 42°C y desnaturalización 15 min a 70°C. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

Determinación de la expresión mediante PCR tiempo real (qPCR)

Para determinar la expresión de los *ZmSWEETs* en los tejidos embrionarios embebidos en los diferentes azúcares u hormonas, se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 1 que fueron diseñados y evaluados previamente en otro trabajo en el laboratorio. La amplificación de un fragmento de cada uno de los SWEET fue específica, ya que los perfiles de amplificación sólo mostraron un pico (Anexo 1).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de los SWEET y del gen endógeno utilizadas para la qPCR.

Gen	Secuencia
SWEET4c	F 5' – CCAGACAAAGAGCGTGGAAAT R 3' – CATCATGGTTGACTGCTGGT
SWEET6b	F 5' – GTCGTCCACCCTAACAGCAT R 3' – ATCATCGAGCCGAAAATGAC
SWEET11a	F 5' – AGGCATCGTCGTCTGCTAGT R 3' – GTTGACACGGCGTACGTAGA
SWEET13a	F 5' – CGTGGAGTACATGCCCTTCT R 3' – CACGTAGAGCACCATCTGGA
SWEET13b	F 5' – GACCTTCCTAGCCCCGATAC R 3' – GAACAGCTTGGCTTTCTTGG
SWEET14b	F 5' – AAATGGCTGGCCTGTCTCTA R 3' – TGATGAGCAGGAAGTCTGTTG
Zm18S	F 5'-CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT R 5'-CCTGTCTGGCCAAGGCTATATAC

Para determinar la expresión relativa de los genes evaluados, incluyendo el gen endógeno *Zm18S*, se realizaron las curvas estándar de amplificación por triplicado, la curva se hizo con el Threshold cycle (Ct) vs Cantidad de DNA. El cDNA utilizado fue de la muestra control (cDNA de semillas embebidas en agar 1X) en diluciones seriadas con agua libre de nucleasas (v/v): 1:10, 1:100, 1: 1,000 y 1:10,000.

La mezcla de reacción contuvo 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.15 µL de oligonucleótido sentido 20 µM, 0.15 µL de oligonucleótido antisentido 20 µM, 2 µL de cDNA y 7.7 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de la reacción fueron: alineación, 2 min a 50°C, desnaturalización, 10

min a 95°C; y elongación, 1 min a 60°C; por 40 ciclos. La cuantificación se hizo por triplicado en el equipo 7500 Real-time PCR System, Applied Biosystems.

Sólo se aceptaron las curvas estándar con una pendiente entre -2.8 y -3.32, ya que este último valor corresponde al 100% de eficiencia y -2.8 al 128 % (Tabla 2).

La eficiencia se determina por la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = 10^{\left(\frac{-1}{pendiente}\right)}$$

Tabla 2. Datos de las curvas estándar para la amplificación por qPCR de los *ZmSWEET's* y *Zm18s* (control).

Curva estándar			
SWEET	% Eficiencia	Pendiente	Umbral*
4c	127.3905	-2.80291	0.0430033
6b	122.8164	-2.874	0.113123
11a	65.28952	-4.582	0.116084
13a	127.458	-2.082	0.045987
13b	110.925	-3.085	0.1125
14b	119.207	-2.934	0.093474
18S	117.251	-2.968	0.290518

*Threshold (umbral) es el nivel de señal que se refleja como un aumento estadísticamente significativo sobre la señal calculada de la línea base (nivel de señal durante los primeros ciclos, 3 a 15, de PCR).

Para calcular la cuantificación relativa de cada SWEET en el eje embrionario y escutelo con los diferentes tratamientos, se utilizó la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$Expresión\ relativa = \frac{(E_{blanco})^{\Delta Ct\ blanco(control-muestra)}}{(E_{referencia})^{\Delta Ct\ referencia(control-muestra)}}$$

Donde:

E_{blanco} = Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos.

$\Delta\text{Ct blanco}$ = Diferencia de Ct de *ZmSWEET* determinado en la muestra control y muestra problema.

$E_{\text{referencia}}$ = Eficiencia de amplificación para *Zm18S*.

$\Delta\text{Ct referencia}$ = Diferencia de Ct del gen de referencia determinado en la muestra control y la muestra problema.

- **Ejemplo de cálculo de la expresión relativa**

Se tomaron los datos de expresión de *ZmSWEET13a* con 50 mM Glu en eje embrionario y también los del control osmótico Man 50 mM.

- ❖ Eficiencia referencia (*Zm18s*) = 2.17251
- ❖ Eficiencia muestra (*ZmSWEET13a*) = 2.27458
- ❖ Para calcular el ΔCt referencia (*Zm18S*):

Ct Glu 50 mM réplica a = 14.4

Ct Man 50 mM réplica a = 9.17

Ct Glu 50 mM réplica b = 14.247

Ct Man 50 mM réplica b = 9.447

Ct Glu 50 mM réplica c = 14.289

Ct Man 50 mM réplica c = 9.495

ΔCt referencia réplica a = $9.17 - 14.4 = -5.230$

ΔCt referencia réplica b = $9.447 - 14.24 = -4.8$

ΔCt referencia réplica c = $9.495 - 14.289 = -4.794$

ΔCt referencia promedio = -4.941333333

- ❖ Para calcular el ΔCt muestra (*ZmSWEET13a*):

Ct Glu 50 mM réplica a = 23.754

Ct Man 50 mM réplica a = 22.567

Ct Glu 50 mM réplica b = 23.679

Ct Man 50 mM réplica b = 22.496

Ct Glu 50 mM réplica c = 23.66

Ct Man 50 mM réplica c = 22.602

ΔCt muestra réplica a= 22.567-23.754 = -1.187

ΔCt muestra réplica b= 22.496-23.679 = -1.183

ΔCt muestra réplica c= 22.602-23.66 = -1.058

❖ Para calcular la expresión relativa de *ZmSWEET13a* en eje embrionario con 50 mM Glu

$$\text{Expresión relativa replica a} = \frac{(2.27458)^{-1.187}}{(2.17251)^{-4.941333333}} = 17.43406868$$

$$\text{Expresión relativa replica b} = \frac{(2.27458)^{-1.183}}{(2.17251)^{-4.941333333}} = 17.49147193$$

$$\text{Expresión relativa replica c} = \frac{(2.27458)^{-1.058}}{(2.17251)^{-4.941333333}} = 19.38380399$$

Cuantificación de carbohidratos solubles

- **Obtención de carbohidratos solubles**

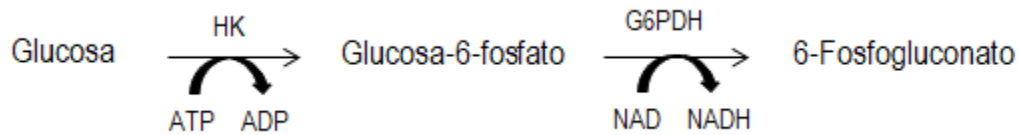
Se empleó el método descrito en Sánchez-Linares, 2012. En un mortero limpio y estéril, se molieron los ejes embrionarios o los escutelos con N₂ líquido y los tejidos molidos se transfirieron a un microtubo de 2 mL. Se adicionó 1 mL de etanol 80 % v/v a 70°C y 1 mL de agua en ebullición. Se centrifugo a 3,500 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Los carbohidratos se incubaron a 60°C hasta llevar a sequedad. La muestra seca se disolvió en 300 µL de agua estéril y se almacenó a -80°C hasta su uso.

- **Cuantificación de glucosa**

En una placa de ELISA de 96 pozos, se colocaron 10, 20 y 30 µL de muestra y se hicieron reaccionar con 200 µL de reactivo de ensayo de Glu (SIGMA), el cual contiene nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), adenosín trifosfato (ATP), hexocinasa (HK) y Glu-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Se incubo la reacción

a 25°C por 20 min y se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm con un MULTISKAN GO de Thermo Scientific.

En la reacción, la concentración de Glu es proporcional a la cantidad de NAD⁺ que es reducida a NADH, según la siguiente reacción:



La cantidad de Glu en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg glucosa}}{\text{g tejido}} = \frac{\text{ABS} * 0.00614 * \text{FD} * \text{Vol. sus}}{\text{Vol. muestra} * \text{g tejido}}$$

Donde:

ABS = absorbancia a 340 nm

FD = factor de dilución

Vol. sus = volumen con el que se reconstituyó la muestra (300 µL).

Vol. muestra = volumen de muestra empleado en la reacción (10, 20, 30 µL)

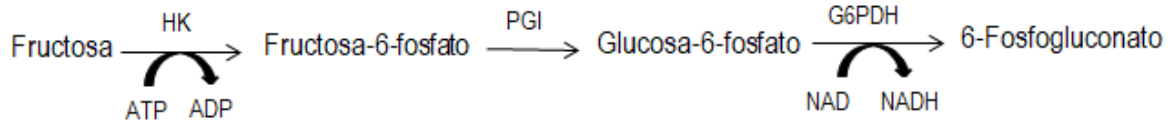
g tejido = gramos de tejido que se usaron en la extracción de los carbohidratos

0.00614= es el factor que considera la masa molecular de Glu, el coeficiente de extinción del NAD⁺ y el volumen total de ensayo.

- **Cuantificación de fructosa**

A cada pozo en el que previamente se realizó la reacción para la cuantificación de Glu, se le añadieron 2 µL de fosfogluco isomerasa (PGI, anteriormente llamada Glu-6-fosfato isomerasa) 1.2 U/mL (SIGMA). Se incubo por 5 min a 25°C y se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm en el equipo MULTISKAN GO (Thermo Scientific).

En la reacción, hay una producción de NADH que es directamente proporcional a la concentración de Fru a una absorbancia de 340 nm, según la siguiente reacción:

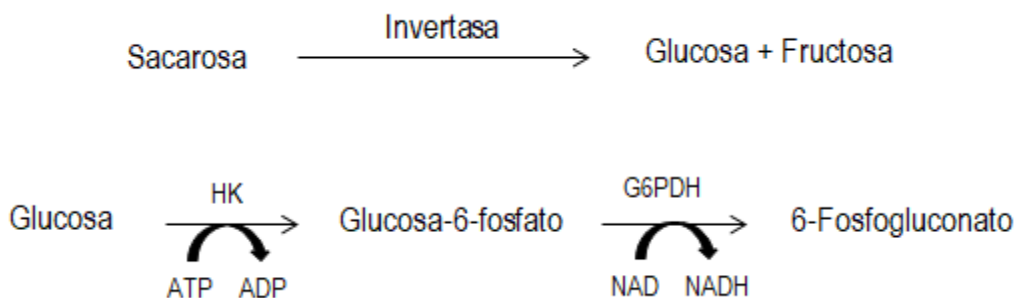


Para los cálculos se restó el NADH producido por la reacción que previamente ocurrió para la determinación de Glu.

- **Cuantificación sacarosa**

Para la cuantificación de Sac en los tejidos embrionarios del maíz, se utilizaron 10 y 20 µL de muestra y se hicieron reaccionar con 4 µL de invertasa de levadura SIGMA 80 mg/mL disuelta en acetato de magnesio 100 mM a pH 4.5. Se incubó 2 h a 37°C y se determinó el contenido de Glu como se indicó anteriormente.

En la reacción, la cantidad equimolar de NAD⁺ que es reducida a NADH es directamente proporcional a la concentración de Sac, como sigue:



Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado fue el de análisis de varianzas (ANOVA, por sus siglas en inglés) de dos sentidos con el modelo de comparaciones múltiples de

Tukey mediante el programa estadístico SigmaPlot. Se eligió el ANOVA de dos sentidos para evaluar diferencias en la expresión de los SWEETs en semilla de maíz y el efecto en esta expresión debido a la presencia de azúcares y hormonas; el método de Tukey se usó para saber si había diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos en la expresión de los diferentes SWEETs evaluados.

RESULTADOS

Se germinaron semillas de maíz en diferentes carbohidratos o en las hormonas ABA y GA₃ y después de 24 h de germinación se disecaron los ejes embrionarios y los escutelos para posteriormente molerlos y analizar la expresión de *ZmSWEET4c*, *6b*, *11*, *13a*, *13b* y *14b* y los niveles de los azúcares solubles, glucosa, fructosa y sacarosa. A continuación, se presentan primero los resultados obtenidos con los ejes embrionarios y después los de los escutelos del maíz.

Integridad de los transcritos utilizados para la detección de la expresión de genes mediante RT-qPCR en los ejes embrionarios de maíz

Se obtuvo RNA de los ejes embrionarios mediante el método del Trizol y se separó en un gel de agarosa al 1%. Como se puede observar en la Figura 12 la integridad de los RNAs obtenidos fue buena, ya que se observan bandas definidas de los dos RNA ribosomales, el 28S y el 18S. Si bien se muestra el gel representativo de las muestras de RNA, las tres réplicas coincidieron con los patrones de bandas mostrados.

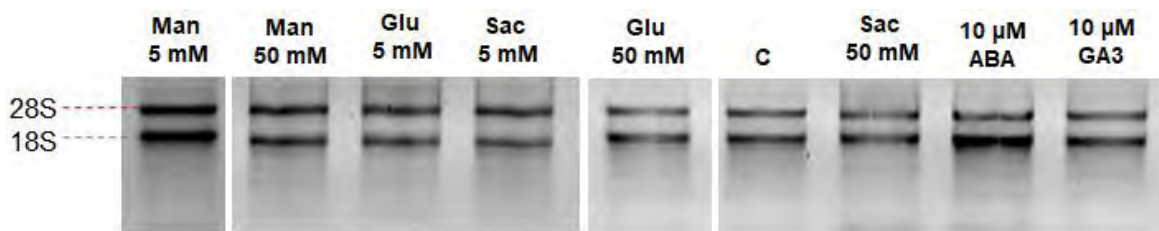


Figura 12. Integridad de las bandas de la subunidad ribosomal 28S y 18S de los ejes embrionarios en los diferentes tratamientos. Ejes embrionarios provenientes de semillas germinadas en agar 1%; C: control.

Efecto de ABA y GA₃ en la expresión de los ZmSWEET's de ejes embrionarios

La germinación de las semillas es un proceso que está regulado por la interacción de dos factores de crecimiento (Srivastava, 2002) el GA₃ que promueve la germinación y el ABA que la detiene, favoreciendo el estado de dormancia (Srivastava, 2002; Kanno, *et al*, 2016).

En este trabajo se propuso determinar el efecto de ambas hormonas en la expresión de los genes que codifican para transportadores de azúcares SWEET en la germinación.

Las plantas sintetizan diferentes GAs, una de las formas activas es GA₃ (Srivastava, 2002). La germinación de las semillas con 10 μM GA₃ produce en los ejes embrionarios el aumento en la expresión de los seis SWEETs analizados: *ZmSWEET4c*, *6b*, *11*, *13a*, *13b* y *14b* (Figura 13). Siendo *ZmSWEET4c*, *11* y *13b* los que se expresan más de 150 veces en relación a las semillas germinadas en ausencia de GA₃ (control).

Contrario a lo esperado, el efecto de la hormona antagonista a GA₃, el ABA, a concentración de 10 μM también incrementa la expresión de los seis SWEET analizados, el incremento es significativamente distinto al inducido por GA₃, al menos para *ZmSWEET4c* y *11*, pero en general el aumento en la expresión de los

ZmSWEETs fue muy similar entre ellos, alrededor de 100 a 300 veces más que el control, excepto para el *SWEET14b* que su expresión fue de 50 veces más que el control (Figura 13).

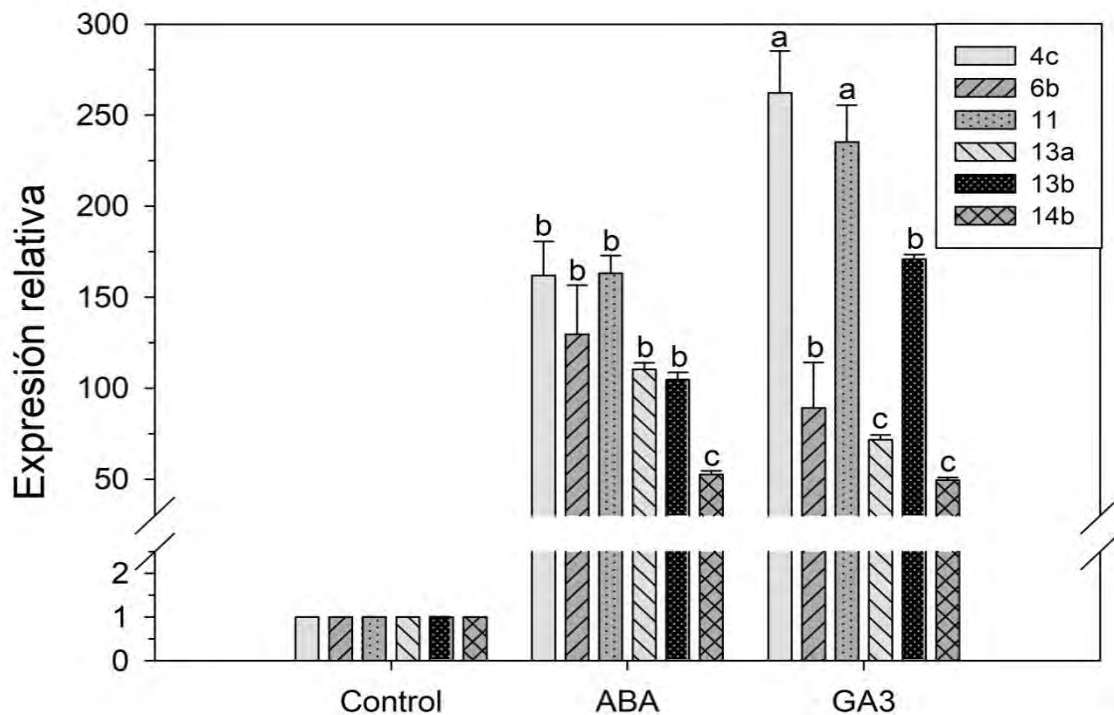


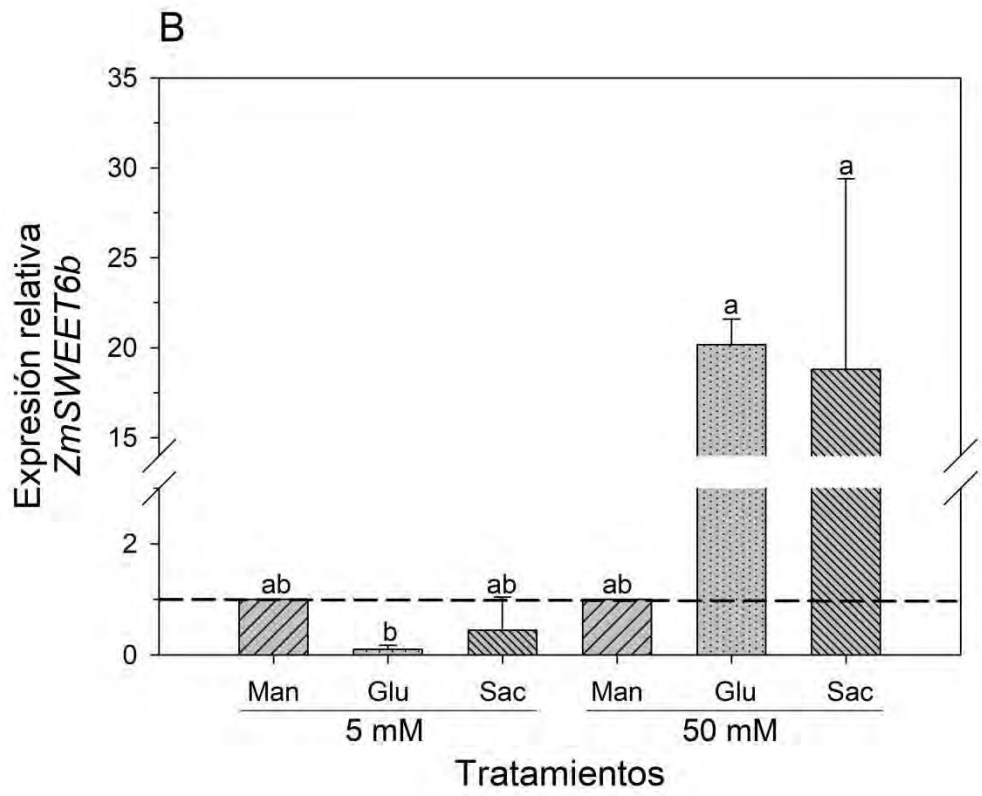
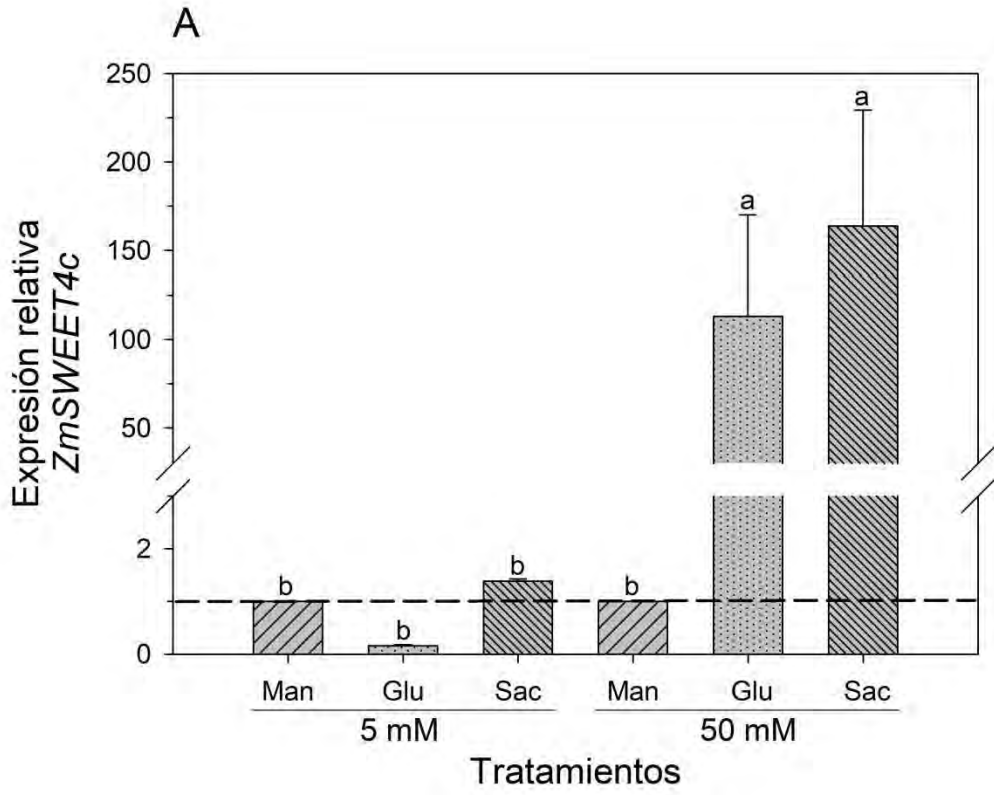
Figura 13. Efecto de GA₃ y ABA en la expresión relativa de los ZmSWEETs en el eje embrionario de maíz. El tratamiento control se refiere a que los ejes embrionarios provienen de semillas embebidas en agar 1 % sin la adición de hormonas. Los valores representan la media y las barras de error corresponden a la desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado. ND=No Detectado. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

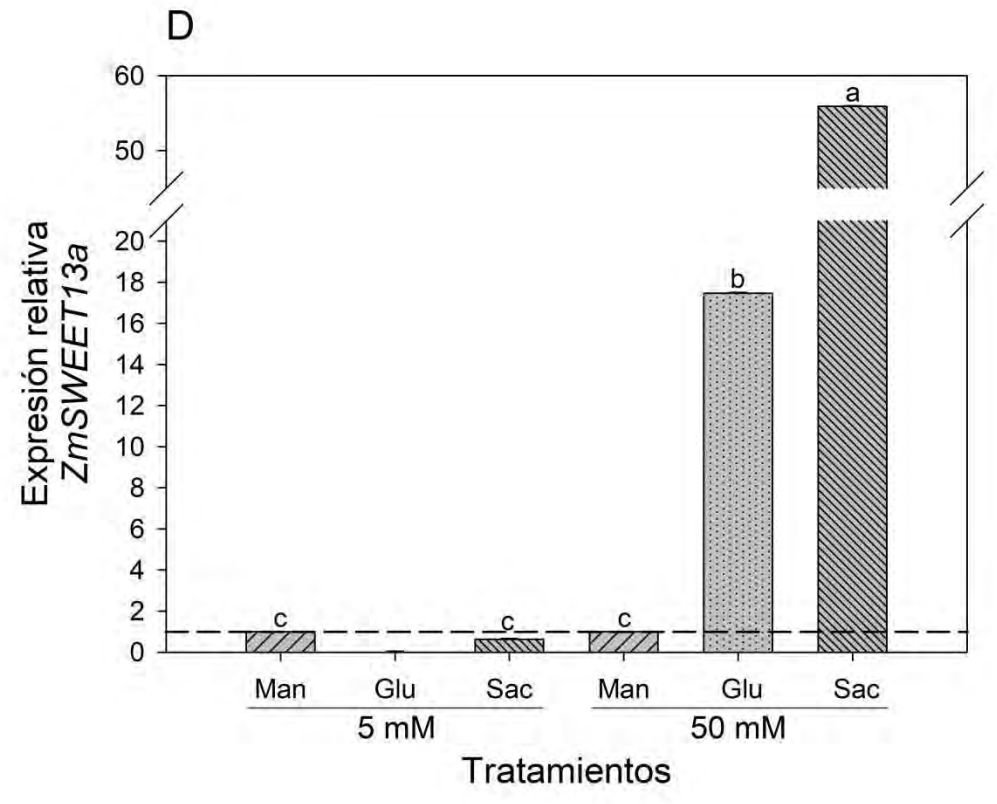
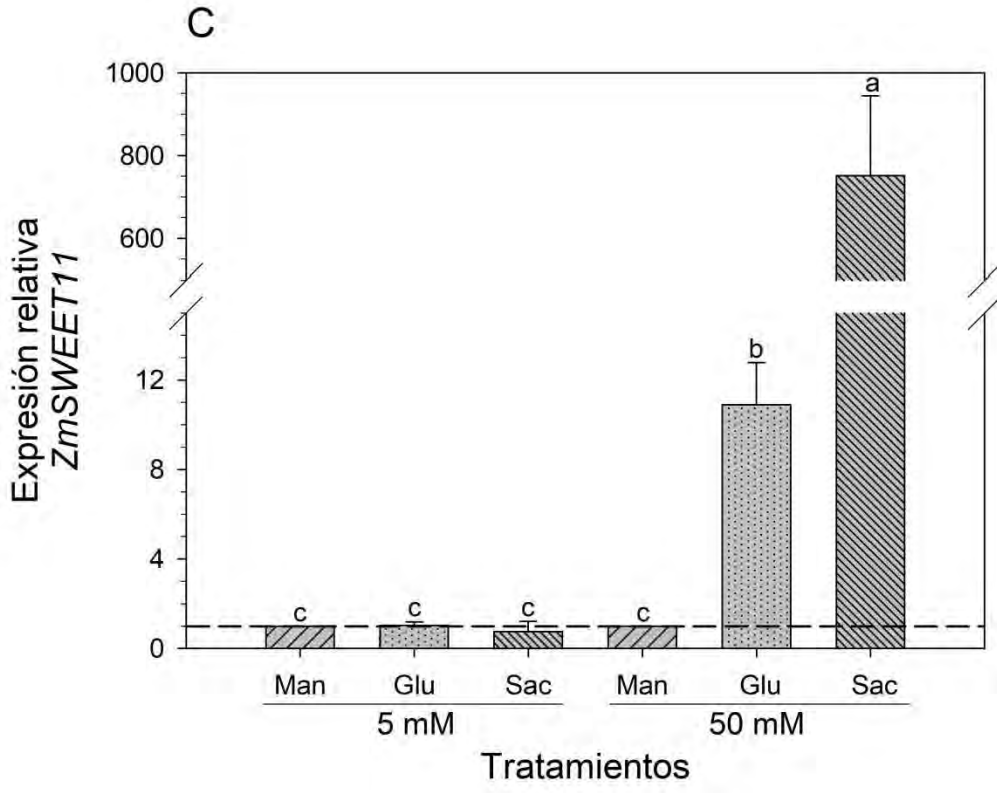
Efecto de Glu y Sac sobre el perfil de expresión de los SWEETs de maíz en los ejes embrionario

Durante el proceso de germinación la movilización de carbohidratos cambia no solo conforme avanza la germinación sino también dependiente del tejido, ya que la semilla tiene tejidos almacenadores como el escutelo y el endospermo y por tanto fuente de carbohidratos y otros que dependen de estos como el eje embrionario (Thomas, *et al*, 1994; Sánchez-Linares, *et al*, 2015). Adicionalmente, se ha demostrado que la Glu regula la expresión del transportador SWEET4c de maíz (Sosso, *et al*, 2015). Por lo anterior, se exploró si los SWEETs que se expresan en la germinación eran regulados por la disponibilidad de carbohidratos. Para lograr el objetivo se germinaron por 24 h semillas de maíz en presencia de dos concentraciones distintas de Glu y Sac, 5 y 50 mM, y adicionalmente como control de osmolaridad del medio se incubaron semillas en Manitol (Man) 5 y 50 mM. De tal forma que los valores de expresión se calcularon asignando como referencia el valor de uno al de la expresión de los ZmSWEETs de los tejidos obtenidos de las semillas germinadas con Man.

Los ejes embrionarios disecados de las semillas tratadas a baja concentración de Sac y Glu presentaron cambios significativos en la expresión de los seis ZmSWEETs analizados con respecto al control (Figura 14). La expresión de cinco SWEETs disminuyó con Glu y *ZmSWEET11* no fue afectado por 5 mM Glu. El tratamiento con 5 mM Sac solamente cambio la expresión de *ZmSWEET13b* que se redujo cerca de un 50 % en relación con el control con 5 mM Man (Figura 14E).

Por el contrario, la imbibición de las semillas en 50 mM de carbohidratos indujo un aumento en la transcripción de los seis SWEETs analizados, aunque con algunas diferencias: *ZmSWEET13b* y *14b* se inducen solo por Glu, mientras *ZmSWEET4c*, *6b*, *11* y *13a* se inducen tanto por Glu como por Sac. Las excepciones al efecto inductor de la transcripción por los azúcares fueron *ZmSWEET13b* que reduce su expresión con Sac y *SWEET14b* que no se afecta por Sac.





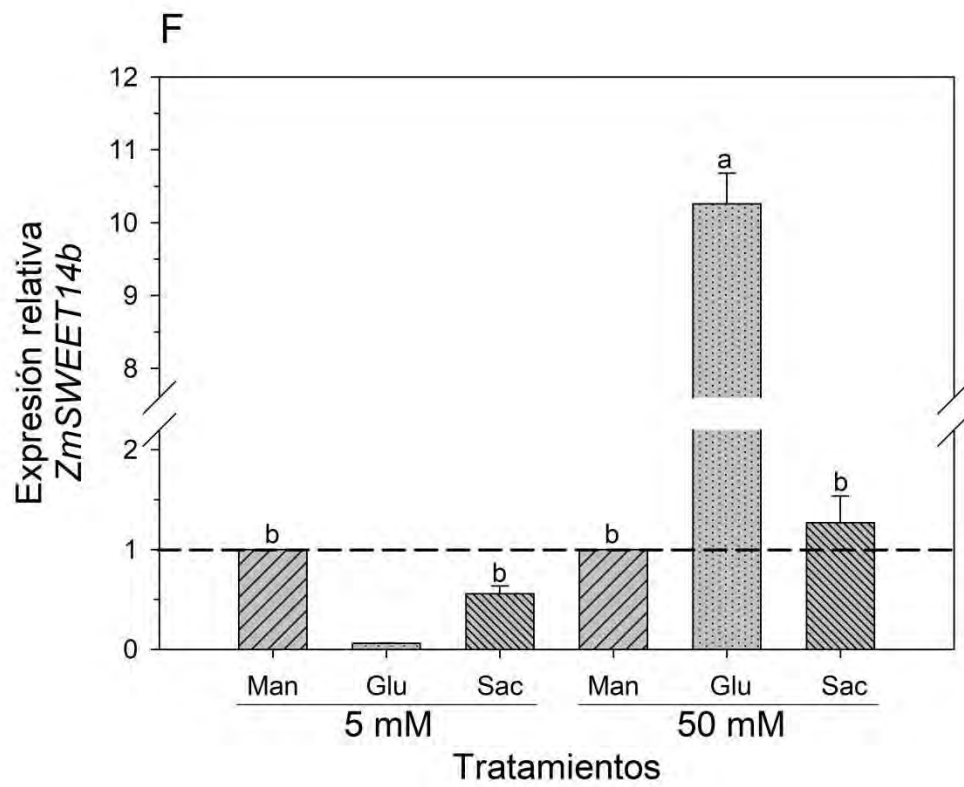
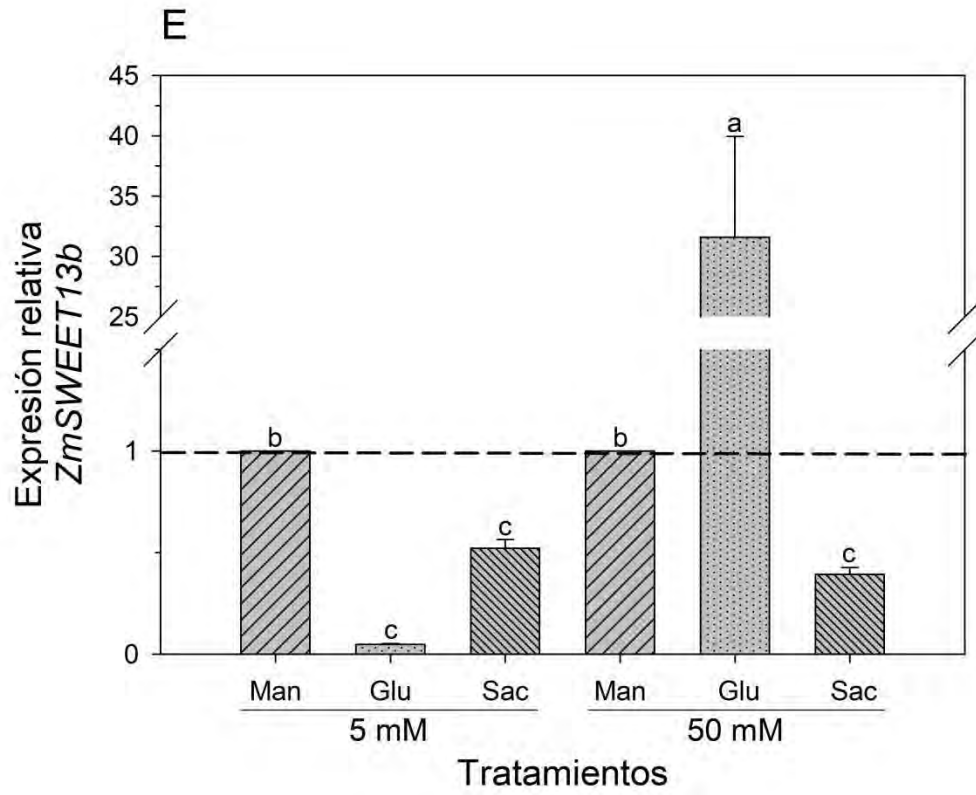


Figura 14. Efecto de dos concentraciones de Glu y Sac sobre la expresión relativa de los SWEET's en ejes embrionarios. A) *ZmSWEET4c*, B) *ZmSWEET6b*, C) *ZmSWEET11*, D) *ZmSWEET13a*, E) *ZmSWEET13b*, y F) *ZmSWEET14b*. El tratamiento de Man fue usado como control de osmolaridad. Los valores representan la media y las barras de error corresponden a la desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado. ND=No Detectado. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

Contenido de carbohidratos solubles en los ejes embrionarios de maíz germinados en presencia de hormonas y carbohidratos

En vista de que se encontraron diferencias en la expresión de los genes para los posibles transportadores de azúcares SWEET en presencia de hormonas y de carbohidratos en los ejes embrionarios, era posible que los contenidos de azúcares en los tejidos se modificaran, por lo que se determinó el contenido de Glu, Sac y Fru (Figura 15).

Para evidenciar los efectos de los tratamientos en los contenidos de azúcares, los resultados se muestran como un índice, cuando los tejidos fueron tratados con hormonas se dividió el contenido de azúcares en el tejido tratado entre el contenido de azúcares del tejido que fue embebido solo en agar 1 %. Mientras que cuando el tejido fue tratado con azúcares se tomó el índice del contenido de azúcares en el tejido tratado entre el contenido de azúcares del tejido que fue embebido en agar suplementado con Man ya sea 5 o 50 mM (Figura 15B).

Las dos hormonas producen efectos similares en el contenido de azúcares en los ejes embrionarios, disminuyen el contenido de hexosas y con poco efecto o ligeramente incrementan el de Sac.

En cuanto al efecto de los azúcares, a pesar de haber usado concentraciones 10 veces diferentes de estos, su impacto en el contenido de azúcares es muy similar. El contenido de Glu aumentó ligeramente en los tratamientos de 5 mM y 50 mM de Glu. Mientras que la Sac a 5 y 50 mM induce una reducción en el contenido de los tres azúcares (Figura 15B).

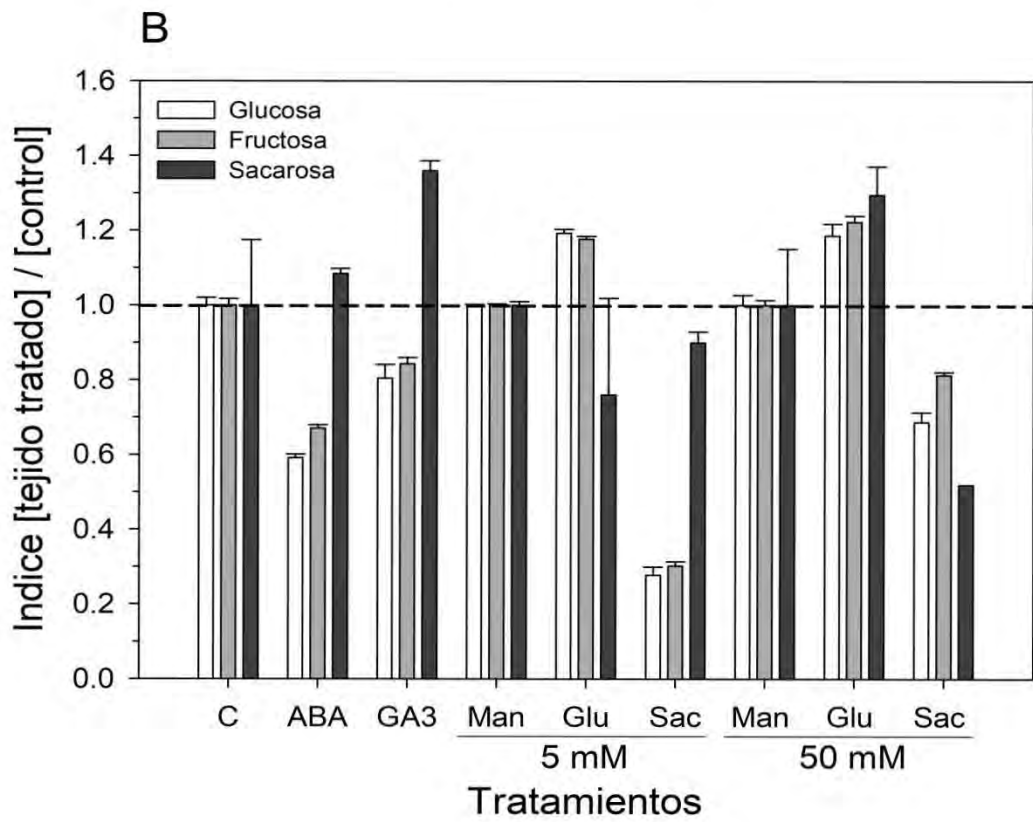
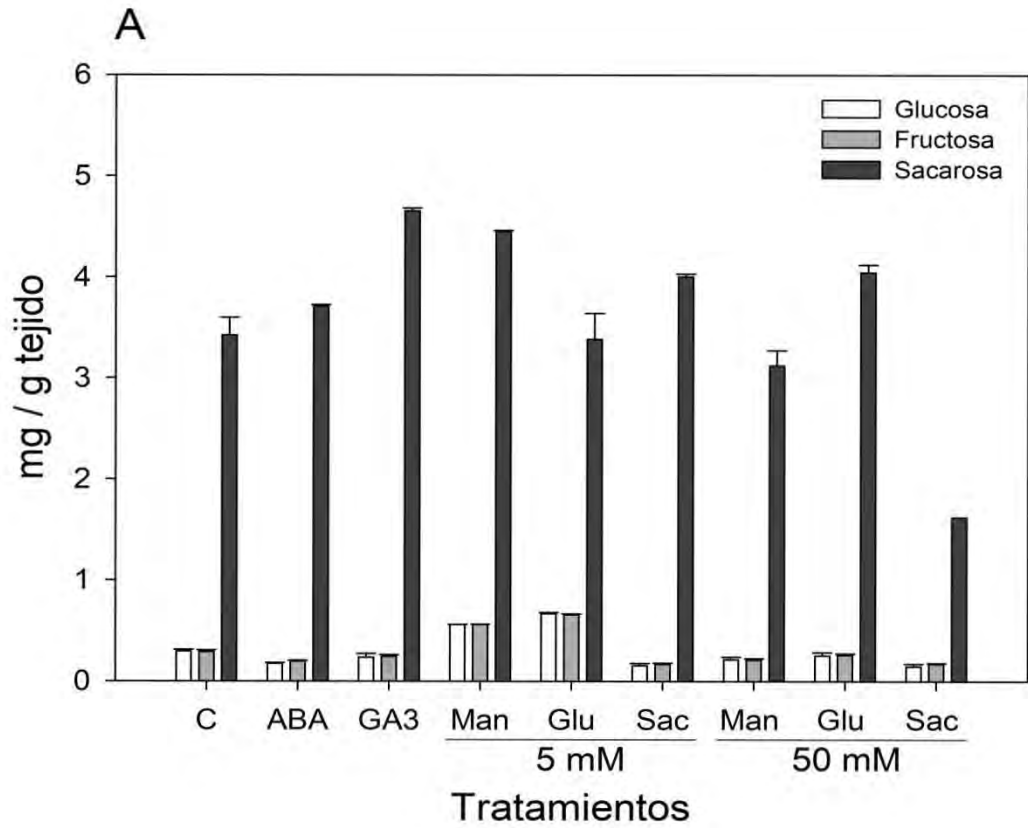


Figura 15. Contenido de Sacarosa, Glucosa y Fructosa en el eje embrionario de maíz. Contenido de carbohidratos solubles en A) mg / g tejido y en B) índice del contenido de carbohidratos; para el cálculo se tomó como control del efecto de las hormonas al contenido de azúcares de los ejes embrionarios provenientes de semillas embebidas en agar 1 %. Mientras que para el efecto de los Glu y Sac en los contenidos de azúcares se realizó un control en el que los ejes embrionarios provenían de semillas embebidas en agar suplementado con Man. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

Integridad de los transcritos utilizados para la detección de la expresión de genes mediante RT-qPCR en escutelos de maíz

En la Figura 16 se observa que la integridad de los RNAs obtenidos de los escutelos fue buena, ya que las bandas de los dos RNA ribosomales, el 28S y el 18S, fueron definidas. Se muestra el gel representativo de las muestras de RNA, las tres réplicas coincidieron con los patrones de bandas mostrados.

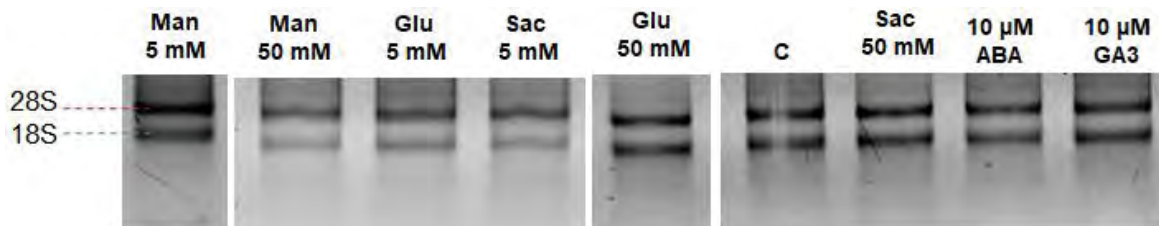


Figura 16. Integridad de las bandas de la subunidad ribosomal 28S y 18S del escutelo en los diferentes tratamientos. Escutelos provenientes de semillas germinadas en agar 1%; C: control.

Efecto de ABA y GA₃ en la expresión de los ZmSWEET's en escutelos

El efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de los SWEET en el escutelo, el tejido más cercano al endospermo, es muy diferente a la de los ejes embrionarios.

Ambas hormonas solo afectan a *ZmSWEET6b*, que se expresa cerca de 14 veces más que el control (Figura 17), a pesar de ser un valor alto, este valor es mucho más bajo, al menos 10 veces menos, que la inducción que producen ambas hormonas en los ejes embrionarios (Figura 13).

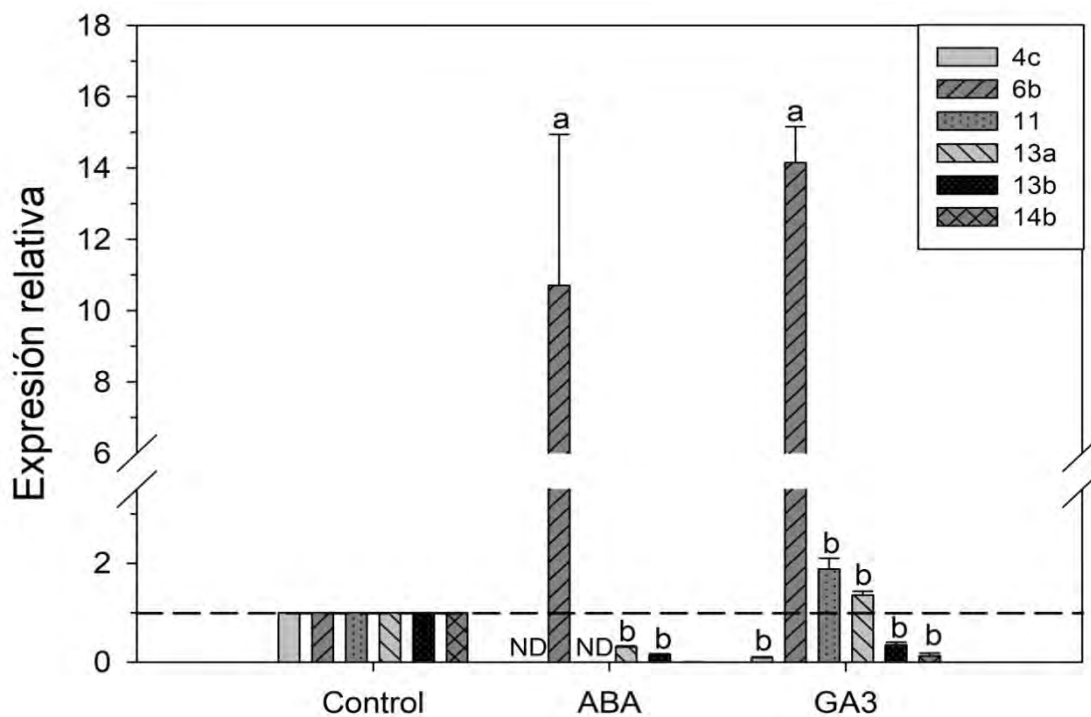
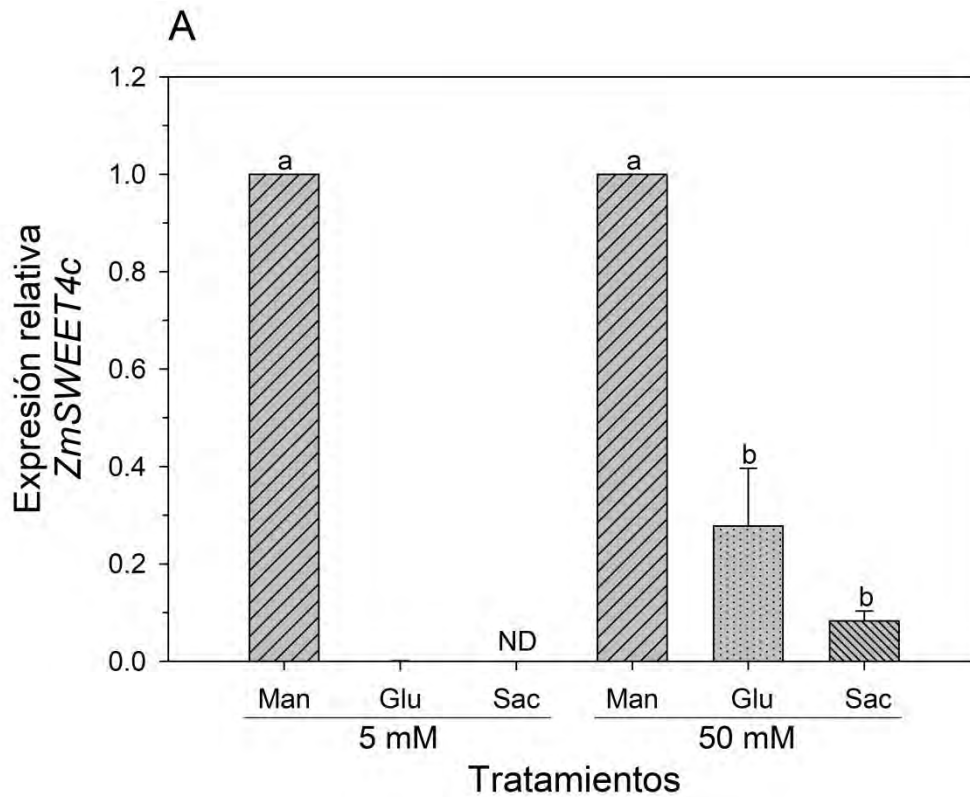
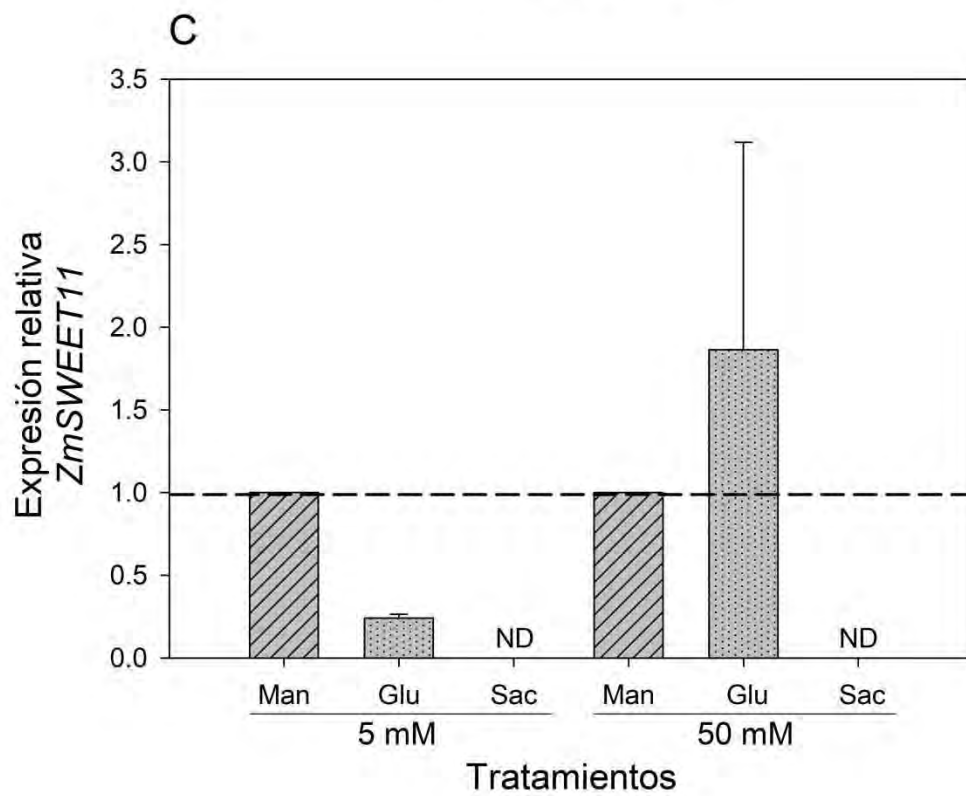
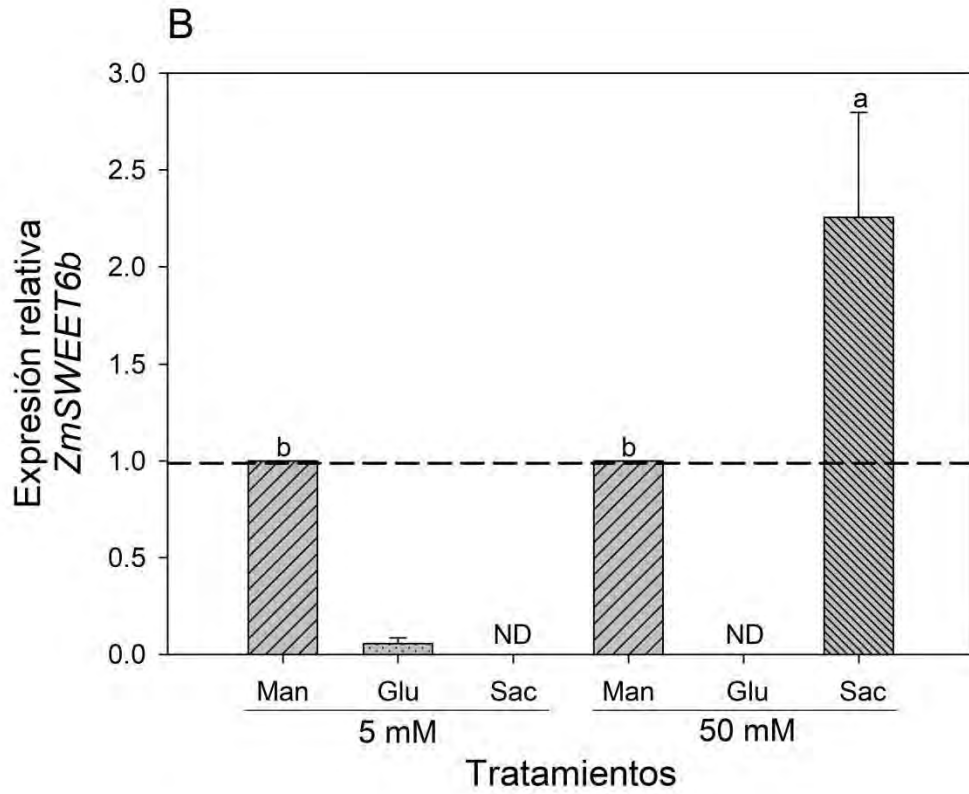


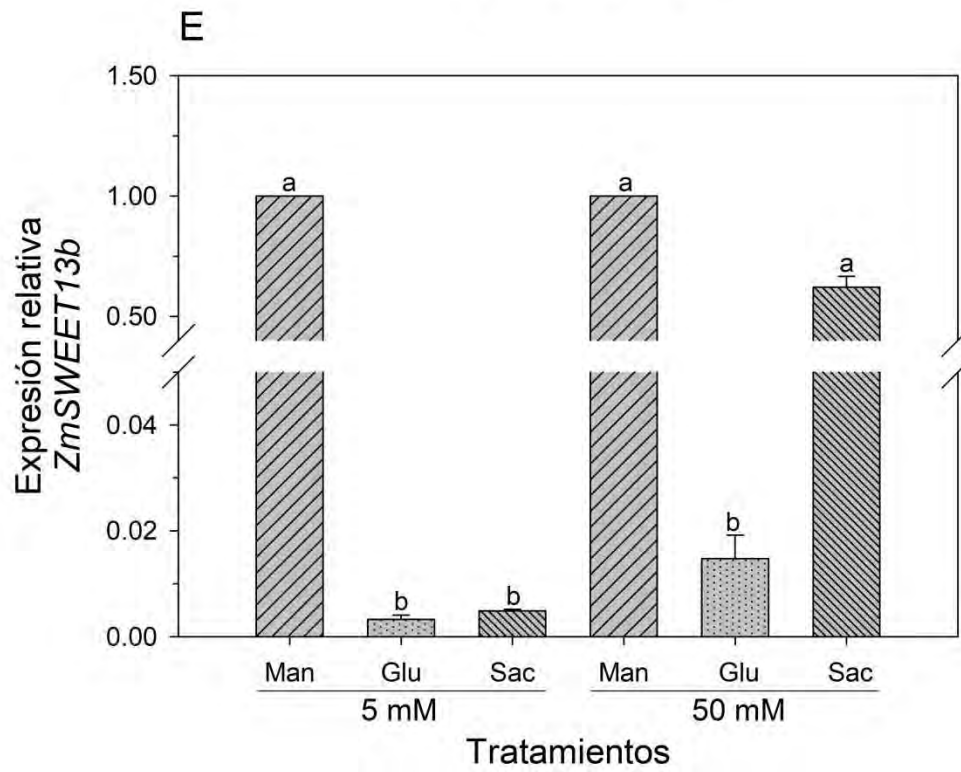
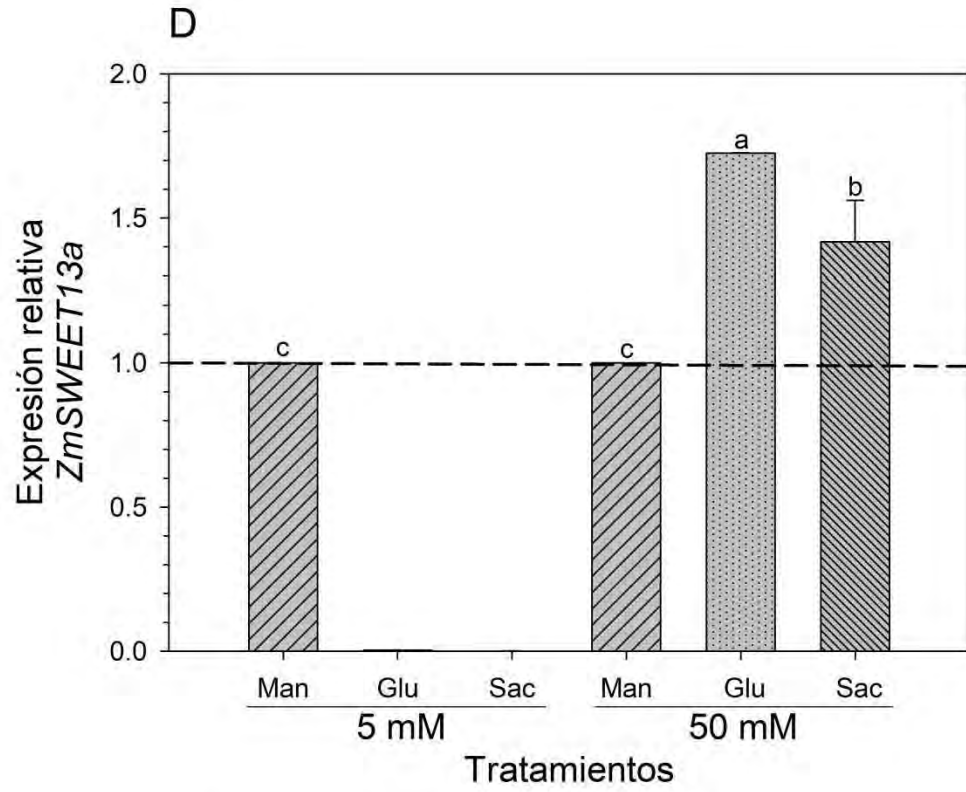
Figura 17. Efecto de GA₃ y ABA en la expresión relativa de los ZmSWEETs en el escutelo de maíz. El tratamiento control se refiere a los escutelos provienen de semillas que fueron embebidas en agar 1 % sin la adición de hormonas. Los valores representan la media y las barras de error corresponden a la desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado. ND=No Detectado. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con a prueba de Tukey.

Efecto de Glu y Sac sobre el perfil de expresión de los SWEETs de maíz en los escutelos

Tanto Glu como Sac a 5 mM reducen la expresión en el escutelo de los seis ZmSWEETs analizados. También a 50 mM la Glu reduce la expresión de *ZmSWEET4c*, *6b*, *13b*, y *14b*, el efecto contrario se produce en *ZmSWEET13a* ya que se induce. La Sac a 50 mM reduce la expresión de *ZmSWEET4c* y 11 pero *ZmSWEET13b* no se afecta, e induce la expresión de *ZmSWEET6b*, *13a* y *14b* (Figura 18).







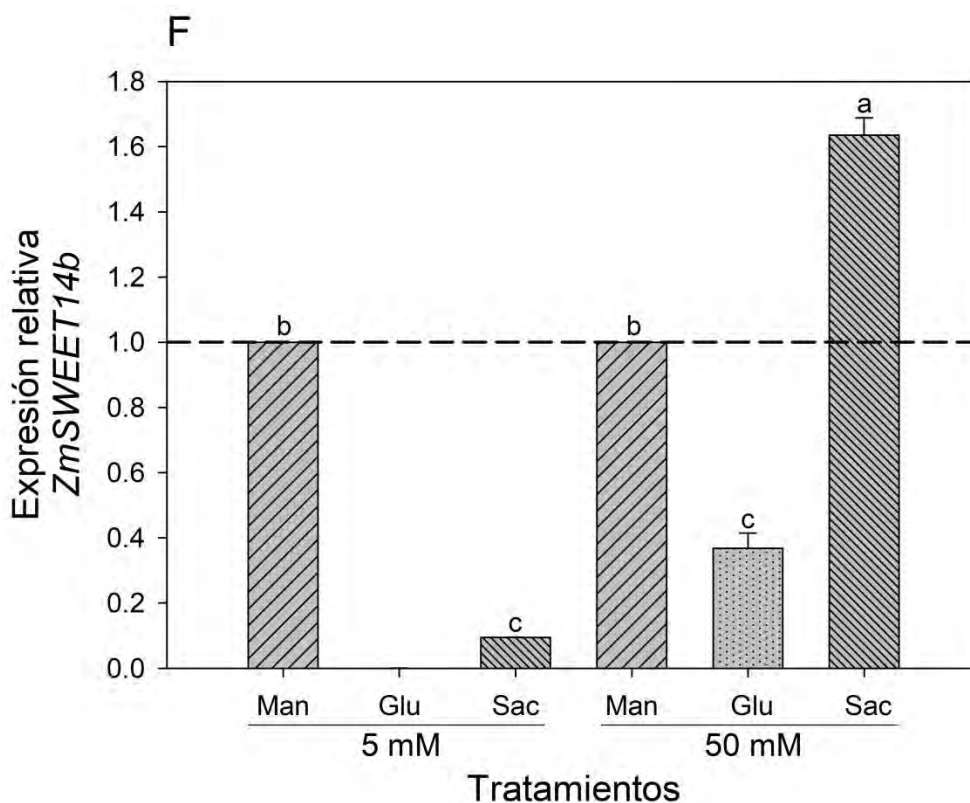


Figura 18. Efecto de dos concentraciones de Glu y Sac sobre la expresión relativa de los SWEET's en escutelos. A) *ZmSWEET4c*, B) *ZmSWEET6b*, C) *ZmSWEET11*, D) *ZmSWEET13a*, E) *ZmSWEET13b*, y F) *ZmSWEET14b*. Los valores representan la media y las barras de error corresponden a la desviación estándar. El experimento se realizó una por triplicado. ND=No Detectado. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

Contenido de carbohidratos solubles en los escutelos de maíz germinados en presencia de hormonas y carbohidratos

Los tratamientos de las semillas con hormonas y los diferentes azúcares produjeron más cambios en los contenidos de azúcares en los escutelos que en los ejes embrionarios. Se encontró que el contenido de Sac disminuyó en todos los tratamientos. También hubo cambios en el contenido de Glu y Fru. ABA y GA₃ redujeron el contenido de ambas hexosas, contrario a los tratamientos con los azúcares que los incrementan (Figura 19B).

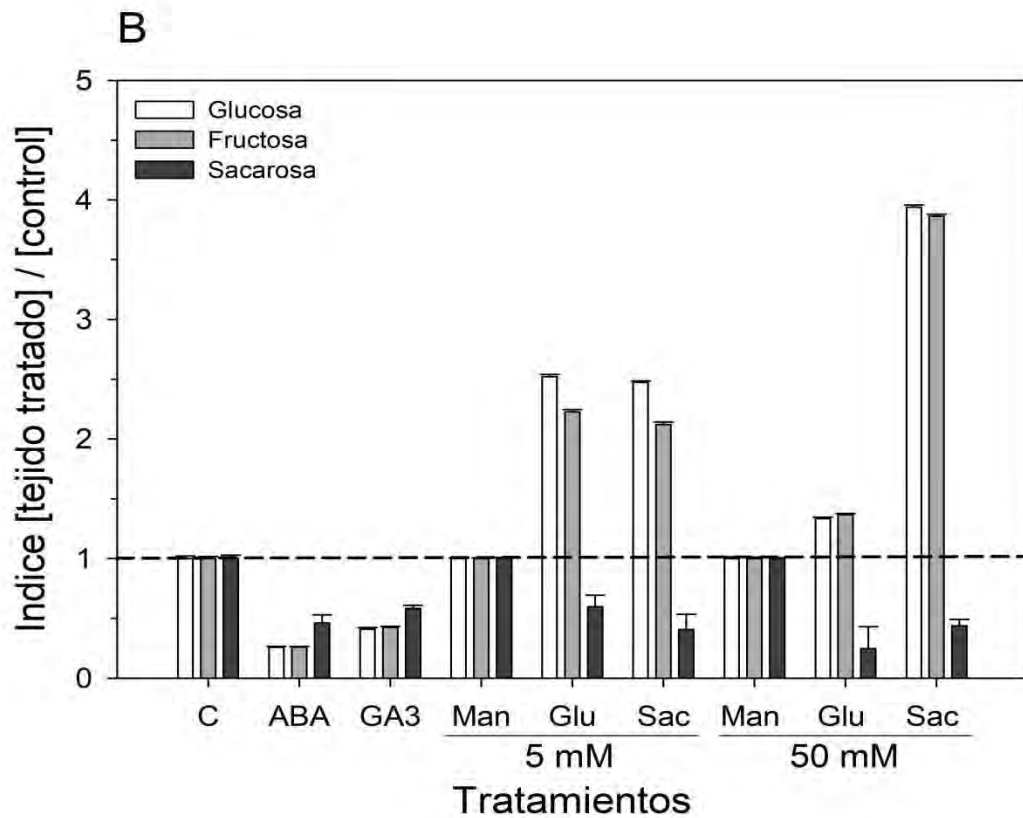
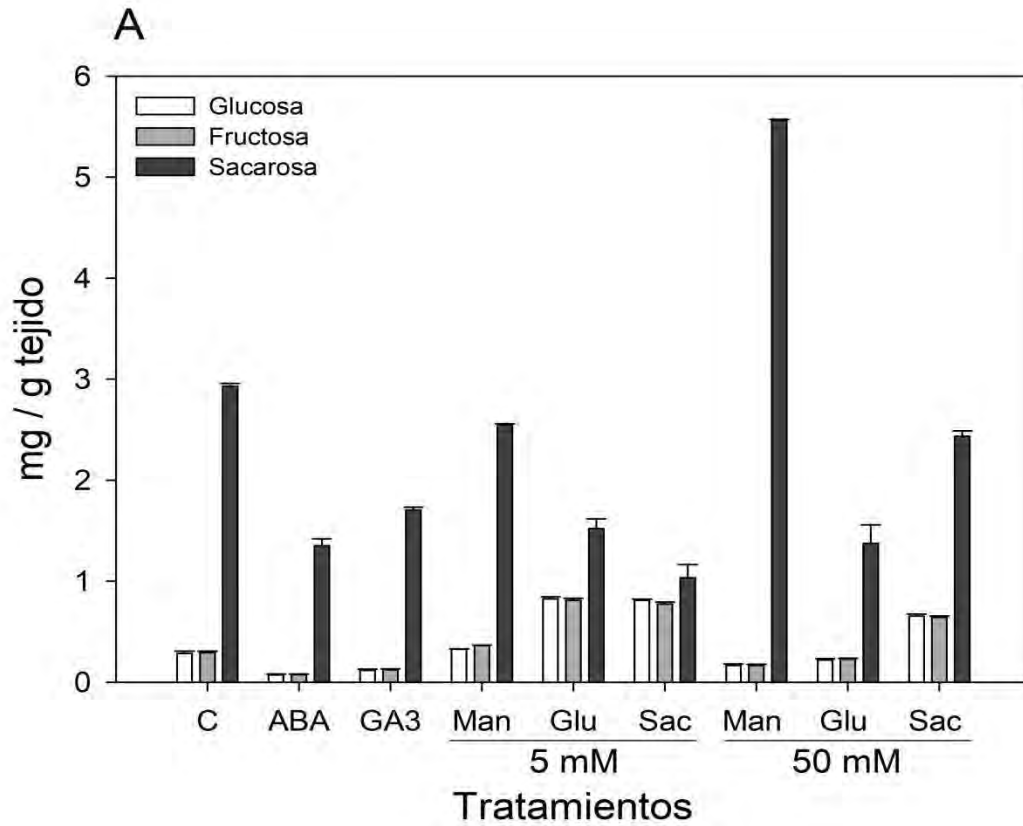


Figura 19. Contenido de Sacarosa, Glucosa y Fructosa en el escutelo de maíz. Contenido de carbohidratos solubles en A) mg / g tejido y en B) índice del contenido de carbohidratos; para el cálculo se tomó como control del efecto de las hormonas al contenido de azúcares en los escutelos provenientes de semillas embebidas en agar 1 %. Mientras que para el efecto de los Glu y Sac en los contenidos de azúcares se realizó un control en el que los escutelos provenían de semillas embebidas en agar suplementado con Man. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

DISCUSIÓN

Las plantas producen sus esqueletos de carbono en forma de azúcares a través del proceso fotosintético. Estos azúcares son movilizados desde los tejidos fotosintéticos (tejidos fuentes) a los tejidos demanda para su nutrición mediante plasmodesmata o por transportadores específicos de azúcares (Cordoba, *et al*, 2015). Una gran cantidad de genes que codifican para proteínas membranales son para transportadores de hexosas y sacarosa, por lo que su presencia es importante para la distribución del carbono a toda la planta (Eom, *et al*, 2015).

En este trabajo se estudió la regulación de la expresión de algunos transportadores difusionales SWEETs en la germinación del maíz. Los SWEETs han sido estudiados en muchas plantas pero en donde se ha producido mayor información es en *A. thaliana* y *O. sativa*, las cuales tienen 17 y 21-23 SWEETs respectivamente (Yuan y Wang, 2013; Aramemnon, 2017) y aún en estas plantas no se han descrito las funciones de todos sus SWEETs, los cuales podrían tener funciones importantes lo cual hace necesario seguir caracterizándolos.

Respecto al maíz, se han caracterizado cuatro, ZmSWEET4c y los parálogos a ZmSWEET13 (a, b y c). ZmSWEET4c pertenece al clado I, es un transportador localizado en membrana plasmática, transporta hexosas y su supresión ocasiona defectos en la embriogénesis de la semilla. El embrión de las semillas *zmsweet4c*

es pequeño y presenta importante disminución en la acumulación de reservas en el endospermo (Figura 9B) , lo que sugiere que ZmSWEET4c es el principal transportador de Glu a través de la placa de transferencia basal del endospermo (BETL, del inglés “Basal Endosperm Transfer Layer) hacia el endospermo (Sosso, *et al*, 2015). Por otra parte, plantas triple mutantes *zmsweet13a, b y c*, transportadores pertenecientes al clado III, reducen el crecimiento de la planta, su alta abundancia en la vasculatura de las hojas evidencia su importancia en el transporte de sacarosa de las hojas al floema (Bezruczyk, *et al*, 2017).

Un proceso crucial en el desarrollo de la planta y que impacta en su productividad es la germinación. Durante la germinación las reservas almacenadas en las semillas se movilizan para la nutrir el eje embrionario, tejido que dará lugar a la nueva planta. Sin embargo, no hay estudios sobre la función de los SWEETs en este proceso. En nuestro grupo, Flores-Barrera (2017) y López-Coria (comunicación personal), encontraron varios SWEETs que se expresan de manera abundante durante la germinación del embrión de maíz. Por lo que en este trabajo se investigó si la regulación transcripcional de los SWEETs involucra la participación de carbohidratos y hormonas.

Inducción transcripcional de SWEETs por GA₃ y ABA en los tejidos embrionarios del maíz germinado

Los cambios en la transcripción de genes pueden llevarse a cabo durante la germinación ya que hay grandes variaciones hormonales, como la disminución en la concentración de ABA acompañado por el simultáneo incremento de GA₃ conforme avanza la germinación (Srivastava, 2002). Sin embargo, no solo se consideró la abundancia de las hormonas en la germinación para determinar si estás regulaban a los SWEETs putativos de maíz, sino principalmente a que las GAs inducen la expresión de varias enzimas hidrolíticas, entre ellas las α -amilasas, enzimas que tienen como sustrato al almidón que se encuentra almacenado principalmente en el endospermo, lo que ocasiona una producción

alta de monosacáridos que sirven como fuente de carbono y energía para el tejido embrionario en crecimiento (Bewley y Black, 2004). Por lo que las GAs podrían tener un efecto sobre la abundancia de los transportadores que se encargaran de importar las hexosas al tejido que inmediatamente se encuentra en contacto con este o bien al tejido que se nutre de las hexosas. Por otra parte, el ABA al ser un antagonista de GA_3 (White, *et al*, 2000) esperábamos que tuviera un efecto diferente en la expresión de los SWEETs.

Pese a lo mencionado anteriormente, el efecto de la imbibición de las semillas en ABA y GA_3 fue similar sobre la expresión de los SWEETs, ambas hormonas indujeron su expresión (Tabla 3). En los ejes embrionarios, los seis SWEETs analizados se indujeron entre 100 y 250 veces, mientras que en los escutelos solo *ZmSWEET6b* se indujo cerca de 16 veces.

De acuerdo con sus similitudes en secuencia los SWEETs analizados se encontrarían distribuidos en tres de los cuatro clados de la familia de SWEETs. *ZmSWEET4c* se encuentra en el clado I, los miembros de este grupo que han sido caracterizados en maíz y otras especies transportan hexosas (Eom, *et al*, 2015; Sosso, *et al*, 2015), *ZmSWEET6b* pertenece al clado II y también transportaría hexosas (Eom, *et al*, 2015), mientras que *ZmSWEET11*, 13a, 13b, 14b pertenecen al clado III. Recientemente se demostró que *ZmSWEET13a* y 13b incluidos en este grupo, transportan sacarosa (Bezruczyk, *et al*, 2017). Por lo que en los ejes embrionarios se estarían expresando transportadores que movilizan hexosas y sacarosa, si es que estos transportadores se traducen a proteína. Contrario al escutelo en donde *ZmSWEET6b* es el único inducido por los tratamientos probados. Es posible que ambas hormonas produzcan un incremento en el transporte de hexosas, aunque se desconoce si la proteína codificada por este gen transporta hexosas. Por lo anterior sería interesante caracterizar la capacidad y especificidad de toma de azúcares de este transportador, así como su localización subcelular y tisular. Esto último debido a que el escutelo tiene varias capas de células que son diferentes y dependiendo de están sería su papel en la germinación. En el escutelo se encuentran células del parénquima, que son las

que son las más cercanas al endorpermo y es donde el transportador SUT es muy abundante (Sánchez-Linares, *et al*, 2012). También el escutelo tiene un tipo distintas de células que la conectan con el haz vascular y otras que están en cercanía con el eje embrionario.

Tabla 3. Comparación del efecto de ABA y GA₃ sobre la transcripción de los SWEETs y el contenido de azúcares en ejes embrionarios y escutelos de maíz.

Tratamiento con ABA		
Molécula	Eje embrionario	Escutelo
RNA	↑↑↑ <i>ZmSWEET4c, 6b, 11, 13a, 13b, 14b</i>	↑ <i>ZmSWEET6b</i>
Azúcares	↓↓↓[Glu y Fru]	↓↓↓ [Glu y Fru] y ↓↓↓[Sac]
Tratamiento con GA₃		
Molécula	Eje embrionario	Escutelo
RNA	↑↑↑ <i>ZmSWEET4c, 6b, 11, 13a, 13b, 14b</i>	↑ <i>ZmSWEET6b</i>
Azúcares	↓[Glu y Fru] y ↑↑↑[Sac]	↓↓↓[Glu y Fru] y ↓↓↓[Sac]

Es posible que las diferencias en función de los escutelos y ejes embrionarios sean los responsables de los efectos muy distintos en la expresión de los SWEETs, ya que el primero es un tejido encargado principalmente de la absorción de nutrientes, mientras que el segundo utiliza los nutrientes para desarrollarse como planta (Bewley, 2001; Scofield, *et al*, 2007). Así la mayor expresión de una variedad de SWEET le permitiría al eje embrionario captar con mayor eficiencia los azúcares para sustentar la gran demanda metabólica que implica su desarrollo. Sin embargo, sería necesario determinar si la toma de azúcares en los ejes embrionarios y los escutelos difiere tanto en presencia de ambas hormonas.

Lo que si conocemos es que a las 24 h de germinación cuando hay un contenido bajo de ABA y uno alto de GA, en los ejes embrionarios del maíz Chalqueño hay una toma alta de Glu y Sac, 17,000 y 3,200 pmol h⁻¹g tejido⁻¹, respectivamente, mientras que en los embriones completos es de 4,000 y 500 pmol h⁻¹g tejido⁻¹ de Glu y Sac transportada, respectivamente. Por el contrario, en el tejido embrionario a 0 h de germinación, el contenido de ABA es alto y el de GA bajo, y se encontró que los ejes embrionarios transportan 8,500 y 1,700 pmol h⁻¹g tejido⁻¹ de Glu y Sac, respectivamente, mientras que los embriones completos tienen un transporte muy bajo de ambos azúcares 1,500 y 700 pmol h⁻¹g tejido⁻¹ de Glu y Sac, respectivamente (Zurita-Villegas, 2011). Obviamente la capacidad de transporte de azúcares a las 24 h de germinación comparado con las 0 h es mayor, pero aún a 0 h los ejes embrionarios tienen una mayor capacidad de transporte, al menos 3 veces más que los embriones completos. Lo cual en parte es posible que se deba a una expresión diferencial de transportadores de azúcares y que podríamos sugerir que tiene que ver con el nivel de hormonas, aún a las 0 h de germinación ya que es en ese punto donde la concentración de ABA es la más alta y la de GA₃ es baja, resultado de los eventos que surgieron durante el proceso de la embriogénesis.

Respecto al efecto de ambas hormonas sobre los contenidos de carbohidratos de los tejidos embrionarios encontramos que llevan a una reducción en el contenido de hexosas aunque más discreta en los ejes embrionarios tratados con GA₃ y a una disminución de Sac exclusivamente en los escutelos con ambas hormonas.

El ABA se conoce que se acumula, o al menos el índice ABA/GA es alto al final de la fase de maduración de la semilla, lo que permite que la dormancia de la semilla se establezca. Para romper la dormancia y que la germinación proceda al menos debe reducirse el contenido de ABA (Rodríguez-Gacio, *et al*, 2009). Lo que se realizó en este trabajo fue incubar a las semillas con ABA, lo cual reduce el proceso germinativo, llevando a que el metabolismo se reduzca, al menos en los embriones del maíz Chalqueño un alto contenido de ABA reduce la actividad de dos enzimas glucolíticas la HXK y la piruvato cinasa (Aguilera-Alvarado, 2013), lo

que llevaría a disminuir los procesos germinativos, sin embargo aún observamos una reducción en el contenido de Glu, lo cual podría explicarse si se llevará a cabo la movilización de este azúcar no tanto para la glucólisis sino para almacenarlo en una forma de carbono distinta. Lo que se ha demostrado en maíz es que el ABA y la Sac actúan de manera sinergista induciendo la expresión de 15 genes implicados en la síntesis del almidón y varios genes que codifican para factores transcripcionales que podrían estar implicados en la regulación de la síntesis de almidón (Huang, *et al*, 2016). Lo anterior podría explicar porque la Glu se reduce. Los cambios en el contenido de Sac podrían ser explicados por una reducción en la expresión de los genes clave del ciclo del glioxilato como parte del metabolismo reducido en presencia de ABA, al menos en *Arabidopsis* y *Nicotiana* se conoce que el ABA inhibe el catabolismo de los lípidos durante la germinación (Manz, *et al*, 2005).

Respecto a porque se observa un resultado similar en el contenido de azúcares en presencia de GA₃, sugerimos que el metabolismo se está induciendo ya que se promueve la hidrólisis de las reservas tanto de proteínas como de almidón para sostener el crecimiento del eje embrionario (Srivastava, 2002; Scofield, *et al*, 2007; Shaik, *et al*, 2014). Un dato que sería necesario comprobar al medir por ejemplo la inducción de la hidrólisis del almidón.

Considerando los efectos de ambas hormonas en la expresión de los transportadores SWEET se buscaron los elementos o secuencias que se conoce son responsivos a la adición de ABA y GA, sin embargo, no se encontraron en los SWEETs analizados en este trabajo alguna secuencia que responda a ABA, aunque si los hay en respuesta a GA en ZmSWEET4c y ZmSWEET13a (Tabla 4), lo cual podría explicar su inducción. En cuanto a los otros SWEETs se puede observar que no tienen estos elementos de respuesta a hormonas, pero tienen otros elementos. También es probable que aun cuando no presenten las regiones ya conocidas se encuentren otras que produzcan el efecto que se observó sobre la expresión de los SWEETs

Tabla 4. Número de elementos de respuesta a diferentes factores ambientales, hormonas o efectores en los ZmSWEETs analizados en este trabajo. El análisis lo llevo a cabo Giovanna Paulina Aguilera-Alvarado con los programas PlantPan 2,0 y Plant Care Cis acting regulatory elements.

	Luz	Seqüía	Auxina	ABA	GA	Etileno	MeJA	SA	TALE	Elementos totales
ZmSWEET4c	3	1	0	0	1	4	2	0	1	12
ZmSWEET6b	2	0	2	0	0	0	0	0	0	4
ZmSWEET11	2	0	0	0	0	0	2	1	2	7
ZmSWEET13a	4	1	0	0	1	0	0	0	1	7
ZmSWEET13b	5	1	1	0	0	2	0	0	1	10
ZmSWEET14b	4	0	0	0	0	4	2	0	2	12

Cambios transcripcionales de los SWEETs por Glu y Sac en los tejidos embrionarios del maíz germinado

La redistribución de nutrientes es de gran importancia durante la germinación, en donde los tejidos fuente de nutrimentos experimentaran no solo la movilización de las reservas sino también la muerte del tejido para que el eje embrionario se desarrolle en una planta. El metabolismo y el transporte durante la germinación están perfectamente coordinados espacial y temporalmente como sigue: a) Un alto metabolismo de azúcares en los tejidos embrionarios al inicio de la germinación, llegando en las primeras 8 h a reducirse el contenido de sacarosa, en los embriones de maíz, cerca de 10 veces menos sacarosa que en el tejido seco (Sánchez-Linares, *et al*, 2012); b) Degradación de sacarosa y de los lípidos de reserva para la síntesis de azúcares en los escutelos (Oaks y Beevers, 1964; Sánchez-Linares, *et al*, 2012), los azúcares no solo son metabolizados en el

escutelo sino que son posteriormente exportados al tejido embrionario para su crecimiento, como sacarosa o hexosas; c) Degradación del almidón que hay en el escutelo y el endospermo a tiempos tardíos, se ha postulado que la reducción en los azúcares y/o un aumento en GA activas lleva al aumento en la degradación de almidón y proteínas con la consecuente elevación en el contenido de Glu, Sac y aminoácidos (Scofield, *et al*, 2007; Shaik, *et al*, 2014); d) Exportación de hexosas y sacarosa por parte del endospermo hacia el escutelo; e) Acumulación en escutelo de diferentes nutrientes entre ellos la Sac, probablemente debido a la presencia del transportador SUT en los escutelos (Sánchez-Linares, *et al*, 2012) y no solo por el incremento en su biosíntesis, f) el eflujo de Sac o hexosas desde el escutelo para nutrir al eje embrionario. De lo anterior es claro que el contenido y tipo de azúcares varía a lo largo de la germinación y se desconocen la mayor parte de los transportadores que están implicados en su movilización y mucho menos se sabe de su regulación. Por ello era importante determinar si los cambios en la disponibilidad de azúcares tendrían un impacto en la expresión de los transportadores SWEET.

Varios ZmSWEET cambiaron su expresión con Glu y Sac, aunque los efectos más profundos en expresión se encontraron en 50 mM de los azúcares y estos cambios son muy discretos en los escutelos (Tabla 4).

Bajas concentraciones de Glu y Sac reducen la expresión de los SWEETs, aunque 5 mM Glu reduce la expresión de 5 de los 6 SWEETs analizados tanto en ejes embrionarios como en escutelos. Por su parte 5 mM Sac lleva a la reducción en ejes embrionarios de únicamente *SWEET13b*, en el que se ha comprobado su capacidad para transportar Sac. Mientras que en los escutelos todos excepto *ZmSWEET11* tienen una expresión reducida. Lo anterior podría llevar a una reducción en el transporte de azúcares a bajas concentraciones de glucosa en ambos tejidos. Sin embargo, visualmente no observamos cambios ni en el porcentaje de germinación ni en la apariencia del tejido (datos no mostrados). En *Arabidopsis* se ha observado que la Glu tiene un efecto represor en la germinación (Rolland, *et al*, 2006). Sin embargo, esto no se ha aprecia en maíz, por lo que

sugerimos que 5 mM de los azúcares podrían estar cambiando ligeramente el metabolismo y por ello vemos una reducción en la transcripción de los transportadores de azúcares.

Tabla 5. Comparación del efecto de Glu y Sac sobre la transcripción de los SWEETs y el contenido de azúcares en ejes embrionarios y escutelos de maíz.

Efactor	EJE EMBRIONARIO		ESCUTELO	
	RNA	Azúcares	RNA	Azúcares
5 mM Glu	↓ <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>13a</i> , <i>13b</i> y <i>14b</i>	↑[Glu y Fru]	↓ <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>13a</i> , <i>13b</i> y <i>14b</i>	↑[Glu y Fru] ↓[Sac]
5 mM Sac	↓ <i>ZmSWEET13b</i>	↓[Glu y Fru]	↓ <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>13a</i> , <i>13b</i> y <i>14b</i>	↑[Glu y Fru] ↓[Sac]
50 mM Glu	↑↑↑ <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>13a</i> , <i>13b</i> y <i>14b</i>	↑[Glu y Fru] y ↑[Sac]	↓ <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>13b</i> y <i>14b</i> ↑ <i>ZmSWEET11</i> y <i>13a</i>	↑[Glu y Fru] ↓[Sac]
50 mM Sac	↑↑↑ <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>11</i> y <i>13a</i> ↓ <i>ZmSWEET13b</i>	↓[Glu y Fru] y ↓[Sac]	↓ <i>ZmSWEET4c</i> y <i>11</i> ↑ <i>ZmSWEET6b</i> , <i>13a</i> y <i>14b</i>	↑↑↑[Glu y Fru] ↓[Sac]

Contrariamente, 50 mM de Glu y Sac producen cambios grandes en la expresión de los SWEETs, tanto en los escutelos como en ejes embrionarios, pero de manera diferente o en SWEET distintos en cada tejido (Tabla 4). La Glu aumenta la expresión de los SWEETs en los ejes embrionarios entre 11 y 100 veces dependiendo del SWEET, mientras que reduce la expresión de 4 SWEETs en los escutelos. Lo anterior confirma el resultado que Sosso y colaboradores (2015), quienes encontraron que Glu induce la expresión de *ZmSWEET4c*.

Se conoce que una alta actividad de la invertasa de pared celular incrementa la concentración de hexosas y promueve el crecimiento del embrión debido al

incremento en la división celular y que se ha propuesto que se debe a la actividad regulada de la expresión de la ciclina D, participante importante en el ciclo celular (Rolland, *et al*, 2006). Por lo que la mayor expresión de los SWEETs podría ser respuesta a la alta disponibilidad de Glu en los tejidos embrionarios y a su mayor tasa de crecimiento.

En la germinación el aumento en Sac parece influenciar el metabolismo de lípidos, la incubación de cotiledones o de protoplastos de cotiledones de calabaza en la oscuridad o en presencia de 25 mM Sac produce una completa inhibición de las dos enzimas clave en el metabolismo del glioxilato, la malato sintasa y la isocitrato liasa (McLaughlin y Smith, 1994). Por lo que es probable que el metabolismo de lípidos en la germinación de los tejidos embrionarios de maíz este comprometido, en particular en los escutelos donde la inducción de *ZmSWEET13a* y *14b* podría explicarse como la necesidad de transportar la Sac que se está aportando en el medio de imbibición del tejido, y aunque también se expresa *ZmSWEET6b* un transportador putativo de hexosas, podría necesitarse ya que el tejido embrionario de maíz también presenta actividad de invertasas extracelulares o de pared celular (Sánchez-Linares, *et al*, 2012).

Por otra parte, en los ejes embrionarios la inducción de la expresión de transportadores a 50 mM Sac de 4 SWEET entre 18 y 800 veces dependiendo del SWEET, podría ser respuesta a un incremento en la diferenciación hacia planta. Se ha demostrado que un alto contenido de Sac al menos en la embriogénesis parece estar asociado a la regulación del almacenamiento de reservas y a la diferenciación del tejido, ya que induce la expresión de las subunidades grandes de la AGPasa, enzima encargada de la síntesis del almidón (Huang, *et al*, 2016).

En cuanto a los contenidos de azúcares solubles en todos los tratamientos los escutelos tuvieron un mayor contenido de hexosas y menor de Sac, lo cual podría sugerir que la imbibición de las semillas con azúcares afecta la distribución y el metabolismo de azúcares, aunque los cambios no fueron dramáticos. Mientras que en los ejes embrionarios los cambios son distintos dependiendo de si son concentraciones bajas o altas de azúcares. Al parecer 50 mM Sac induce el uso

de los azúcares ya que al final el contenido de hexosas y Sac disminuye. Mientras que 50 mM Glu induce en los ejes la síntesis de Sac y aún tiene un excedente de hexosas. Nuevamente es necesario determinar como el metabolismo se encuentra cambiando y determinar los cambios en el transporte de azúcares en los tejidos embrionarios para establecer el papel que tiene la regulación de los SWEET por azúcares.

En general, los cambios observados en la expresión de los SWEETs son más pronunciados en los ejes embrionarios que en los escutelos, lo cual puede deberse a que es el primero es el tejido que propiamente se está convirtiendo en planta por lo que contar con una buena batería de transportadores que responden o se ajusta su cantidad dependiendo de las condiciones de disponibilidad de azúcares u hormonales le permite sostener su crecimiento. Mientras que los escutelos, tienen la capacidad de toma de azúcares, pero también de eflujo el que le permite nutrir al eje embrionario y es posible que la llegada de una abundante concentración de azúcares del endospermo le permita ser menos sensible a los cambios externos en los azúcares, comparado con los ejes embrionarios.

Al analizar las regiones promotoras de los SWEETs no se encontraron elementos de respuesta a carbohidratos, aunque si los hay para el efecto de la luz, que se sabe puede influir en el contenido de azúcares, aunque en este trabajo el tejido fue germinado en ausencia de luz.

CONCLUSIONES

- ABA, GA₃, Glu y Sac si afectan la expresión de los SWEET en ejes y embriones de maíz germinados.
- ABA y GA₃ inducen la expresión de *ZmSWEET4c, 6b, 11, 13a, 13b, 14b* en los ejes embrionarios cerca de 50 a 300 veces. Mientras que en los escutelos ambas hormonas solo inducen a *ZmSWEET6b*, aunque solo 11 veces más.
- Los azúcares Glu y Sac cambian la expresión de los SWEETs pero de manera muy discreta en los escutelos pero en los ejes embrionarios los cambios van de 11 a 800 veces más expresión.
- Glu y Sac a 5 mM reducen la expresión de todos los SWEETs en ambos tejidos embrionarios. Mientras que 50 mM de ambos azúcares llevan a una expresión diferencial de los SWEETs en cada tejido, aunque en los ejes embrionarios la expresión es varios ordenes de magnitud mayor:

Ejes embrionarios

50 mM Glu ↑↑↑*ZmSWEET4c, 6b, 13a, 13b y 14b*

50 mM Sac ↑↑↑*ZmSWEET4c, 6b, 11 y 13a*; ↓*ZmSWEET13b*

Escutelos

50 mM Glu ↓*ZmSWEET4c, 6b, 13b y 14b*; ↑*ZmSWEET11 y 13a*

50 mM Sac ↓*ZmSWEET4c y 11*; ↑*ZmSWEET6b, 13a y 14b*

PERSPECTIVAS

1. Determinar la actividad de toma de azúcares de los tejidos embrionarios en los diferentes tratamientos, con la finalidad de relacionar los cambios observados en los niveles de transcripción de los SWEETs con la toma de azúcares.
2. Detectar mediante anticuerpos si cada uno de los transportadores aquí evaluados se encuentran en el tejido y cuál es su localización espacial y subcelular. Se tiene que comprobar que los transcritos se traducen a proteína y que efectivamente se lleva al aumento o reducción de la cantidad de proteína.
3. Determinar la actividad de transporte de los SWEETs analizados. Es necesario conocer la capacidad y especificidad por los solutos que transportan cada uno de los ZmSWEETs analizados, lo cual nos llevara a plantear cuál es la importancia de cada uno de ellos en la germinación del maíz.
4. Determinar por qPCR los niveles de expresión de los genes implicados en la movilización del almidón para asegurarnos que efectivamente los cambios observados con las hormonas y los carbohidratos se relacionan también con cambios ya medidos en el nivel de reservas del tejido.

REFERENCIAS

- Aguilera-Alvarado, Giovanna Paulina (2010) Regulación hormonal y osmótica de la expresión del transportador de sacarosa y de un transportador de hexosas putativo en embriones germinados de maíz. Tesis para obtener el título de licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga, UNAM, D. F., México, Págs. 88.
- Aguilera-Alvarado, Giovanna Paulina (2013) Actividad y expresión de isoformas de hexocinasas de embriones de maíz en respuesta de ABA. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias, UNAM, D. F., México, Págs. 124.
- Aramemnon. Plant membrane protein database. Consultado el día: 29 de Mayo del 2018, en: http://aramemnon.uni-koeln.de/seq_view.ep?search=SWEET+transporter&term=1&cat=0&x=15&y=18
- Aoki, N., Scofield, G. N., Wang, X.-D., Offler, C. E., Patrick, J. W., Furbank, R. T. (2006) Pathway of Sugar Transport in Germinating Wheat Seeds. *Plant Physiology* 141, 1255–1263.
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination (The Language of Science) 2nd Edition. Plenum Press, NY. ISBN-13:978-0306447488.
- Bewley, J. Derek. (1997) Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9, 1055-1 066. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Bewley, J. Derek. (2001) Seed Germination and Reserve Mobilization. *Encyclopedia Of Life Sciences*, Nature Publishing Group, www.els.net
- Betzruczyk, M., Hartwig, T., Horschman, M., Char, S. N., Yang, J., Yang, B., Frommer, W. B., Sosso, D. (2018) Impaired phloem loading in *zmsweet13a, b, c* sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*. *New Phytologist* 218(2), 594-603. doi: 10.1111/nph.15021.
- Betzruczyk, M., Yang, J., Eom, J.-S., Prior, M., Sosso, D, Hartwig, T., Szurek, B., Oliva, R., Vera-Cruz, C., White, F. F., Yang, B., Frommer, W. B. (2017) Sugar flux signaling in plant-microbe interactions. *Plant Journal* 93(4), 675-685. doi: 10.1111/tbj.13775.

- Bick, J.-A., Neelam, A., Smith, E., Nelson, S. J., Hall, J. L., Williams, L. E. (1998) Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. *Plant Molecular Biology* 38, 425–435.
- Bove, J., Jullien, M., Grappin, P. (2001) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3(1), reviews 1002.1-1002.5
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J. E., Benedito, V. A., Perez L. E. P. (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*. 7:18.
- Carvente-García, Roberto Dassaevt (2014) Clonación molecular y perfil de expresión del RNAm de un transportador de azúcares tipo SWEET durante la infección del maíz por los hongos *trichoderma asperellum* y *fusarium verticillioides*. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias, UNAM, CDMX, México, Págs. 105.
- Chen, Li-Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W., Frommer, W. B. (2015a) Transport of Sugars. *Annual Reviews in Biochemistry* 84, 865–94
- Chen, Li-Q., Hou, Bi-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Someville, S. C., Mudgett, M. B., Frommer, W. B. (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–532 doi:10.1038/nature09606
- Chen, Li-Q., Lin, I. W., Qu, x.-Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londoño, A., Samuels, A. L., Frommer, W. B. (2015b) A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the Arabidopsis Embryo. *The Plant Cell* 27, 607–619.
- Chen, Li-Q., Qu, X.-Q., Hou, Bi-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., Frommer, W. B. (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335 (6065), 207-211
- CONABIO (2012) Maíces. Consultado el día: 16 de Noviembre del 2017, en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/maiz.html>

- Cordoba, E., Aceves-Zamudio, D. L., Hernández-Bernal, A. F., Ramos-Vega, M., León, P. (2015) Sugar regulation of *SUGAR TRANSPORTES PROTEIN 1* (STP1) expression in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 66, No. 1, pp. 147 – 159, doi: 10.1093/jxb/eru394
- Davies, P. J. (2010) Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, Action!, 3th Edition. Springer Netherlands, USA, ISBN: 978-1-4020-2686-7
- du Plessis, J. (2003) Maize Production. Department of Agriculture, Directorate Agricultural Information Services Private Bag X144, Pretoria, 0001 South Africa, 38. https://www.pssurvival.com/PS/Crops/Maize_Production_2003.pdf
- Eom, J.-S., Chen, Li-Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, IW, Qu, X.-Q., Braun, D. M., Frommer, W. B. (2015) SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 53-62.
- FAO (1993) El maíz en la nutrición humana. Consultado el día: 16 de Noviembre del 2017, en: <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S02.htm#Tipos%20de%20maiz>
- Finkelstein, R. R., Somerville, C. R. (1990) Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiology* 94, 1172-1179.
- Finkelstein, Ruth (2013) Abscisic Acid, Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 11: e0166, doi: 10.1199/tab.0166
- Flores-Barrera, Mireya (2017) Análisis de la expresión de los transportadores SWEET en espiga, tejido embrionario seco y durante la germinación del maíz. Tesis para obtener el título de licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga, UNAM, CDMX, México, págs. 87.
- Griffiths, C. A., Paul, M. J., Foyer, C. H. (2016) Metabolite transport and associated sugar signaling systems underpinning source/sink interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857 (10) 1715-1725. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.07.007>
- Gupta, R., Chakrabarty, S. K. (2013) Gibberellic acid in plant. *Plant Signaling & Behavior* 8, 9, e25504, DOI: 10.4161/psb.25504

- Higgins, T. J. V., Jacobsen, J. V., Zwar, J. A. (1982) Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. *Plant Molecular Biology* 1, 191-205.
- Huang, H., Xie, S., Xiao, Q., Wei, B., Zheng, L., Wang, Y., Cao, Y., Zhang, X., Long, T., Li, Y., Hu, Y., Yu, G., Liu, H., Liu, Y., Huang, J., Zhang, J., Huang, Y. (2016) Sucrose and ABA regulate starch biosynthesis in maize through a novel transcription factor, *ZmEREB156*. *Scientific Reports* 6 (27590), doi:10.1038/srep27590
- Jameson, P. E., Dhandapani, P., Novak, O., Song, S. (2016) Cytokinins and Expression of SWEET, SUT, CWINV and APP Genes Increase as Pea Seeds Germinate. *International Journal of Molecular Sciences* 17, doi:10.3390/ijms17122013
- Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M., Seo, M. (2016) AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nature communications*, 7, 13245, DOI: 10.1038/ncomms13245 |www.nature.com/naturecommunications
- Lemoine, R., Camera, S. L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., Durand, M. (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci.*, 24;4:272. doi: 10.3389/fpls.2013.00272. eCollection 2013.
- Life Technologies Corporation (2012) Real-time PCR handbook.
- López-Coria, Montserrat (2015) *Trichoderma asperellum* induce el desarrollo de plántulas de maíz y aumenta la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias, UNAM, D. F., México, Págs. 96.
- Manz, B., Muller, K., Kucera, B., Volke, F., and Leubner-Metzger, G. (2005). Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol.* 138,1538–1551.

- McLaughlin, J. C., Smith, S. M. (1994) Metabolic regulation of glyoxylate-cycle enzyme synthesis in detached cucumber cotyledons and protoplasts. *Planta* 195 (1) 22–28, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00206287>
- Matsukura, C.-A., Saitoh, T., Hirose, T., Ohsugi, R., Perata, P., Yamaguchi, J. (2000) Sugar Uptake and Transport in Rice Embryo. Expression of Companion Cell-Specific Sucrose Transporter (OsSUT1) Induced by Sugar and Light. *Plant Physiology* 124, 86-93.
- Nemose (2008) Zea mays, corn, maize, mealie. GEOCHEMBIO. Consultado el día: 17 de Noviembre del 2017, en: <http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/>
- Nonogaki, H., Gee, O. H., Bradford, K. J. (2000) A Germination-Specific Endo- β -Mannanase Gene Is Expressed in the Micropylar Endosperm Cap of Tomato Seeds. *Plant Physiology* 123, 1235-1245.
- Oaks, A., Beevers, H. (1964) The Glyoxylate in Maize Scutellum. *Plant Physiology*, 39(3):431-4, doi: <https://doi.org/10.1104/pp.39.3.431>
- Olsen, Odd-Arne (2001) Endosperm Development: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 233–67
- O'Leary, Matthew (2016) Maíz: De México para el mundo. CIMMYT. Consultado el día: 16 de Noviembre del 2017, en: <http://www.cimmyt.org/es/maiz-de-mexico-para-el-mundo/>
- Oishi, M. Y., Bewley, J. D. (1990) Distinction between the responses of developing maize kernels to fluoridone and desiccation in relation to germinability, alpha-amylase activity, and abscisic acid content. *Plant Physiology* 94, 592-598.
- Palacios Vargas, Guadalupe Itzel (2016) Identificación de los transportadores SWEET de las raíces de plántulas de maíz y su regulación por las infección de *Trichoderma asperellum*. Tesis para obtener el título de licenciatura en Química en Alimentos, UNAM, CDMX, México, págs. 89.
- Pfaffl, Michael W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 1;29(9):e45.

- Prince, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K., Jang, J.-C. (2003) Mechanism of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiol* 132, 1424-1438.
- Ramírez-Verdejo Sonia Aley (2009) Detección in situ de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación por carbohidratos. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM, D. F., México, Págs. 71.
- Rodríguez-Gacio, Ma. del Carmen, Matilla-Vázquez, M. A., Matilla, A. J. (2009) Seed dormancy and ABA signaling. *Plant Signal and Behavior* 4(11), 1035–1048.
- Roitsch, T. (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (3), 198-206. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80036-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80036-3)
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Reviews of Plant Biology*, 57, 675-709, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
- Rosental, L., Nonogaki, H., Fait, A. (2014) Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research* 24, 1–15
- Sah, S. K, Reddy, K. R., Li, J. (2016) Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in crop Plants. *Frontiers in Plant Science* 7, 571. doi: 10.3389/fpls.2016.00571
- Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V., Zuriuta-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Bernal-Lugo, I., Sánchez-Nieto, S. (2012) Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/ers130.
- Scofield, G. N., Aoki, N., Hirose, T., Takano, M., Jenkins, C. L. D.m Furbank, R. T. (2007) The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of the rice plants. *Journal of Experimental Botany* 58 (3), 483–495. doi:10.1093/jxb/erl217
- Sevilem, I., Miyashima, S., Helariutta, Y. (2013) Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants. *Cell Adhesion and Migration*, 7(1), 27–32, doi: 10.4161/cam.22126

- Shaik, S. S., Carciofi, M., Martens, H. J., Hebelstrup, K. H., Blennow, A. (2014) Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. *Journal of Experimental Botany* 65 (9) 2257–2270, doi: 10.1093/jxb/eru107
- Sosso, D., Luo, D., Li, Q.-B., Sasse, J., Yang, J., Gendrot, G., Suzuki, M., Koch, K. E., McCarty, D. R., Chourey, P. S., Rogowsky, P. M., Ross-Ibarra, J., Yang, B., Frommer, W. B. (2015) Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics*. 47(12):1489-93. doi:10.1038/ng.3422
- Srivastava, Lalit M. (2002) Plant Growth and Development: Hormones and Environment. *Academic Press*.
- Suprasanna P., Nikalje G.C., Rai A.N. (2016) Osmolyte Accumulation and Implications in Plant Abiotic Stress Tolerance. In: Iqbal N., Nazar R., A. Khan N. (eds) *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. Springer, New Delhi. pp 1-12. doi: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_1
- Tan, H., Xiang, X., Tang, J., Wang, X. (2016) Nutritional functions of the funiculus in *Brassica napus* seed maturation revealed by transcriptome and dynamic metabolite profile analyses. *Plant Molecular Biology*, 92 (4–5), 539–553, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0530-3>
- Tao, Y., Cheung, L. S., Li, S., Eom, J.-S., Chen, Li-Q., Xu, Y., Perry, K., Frommer, W. B., Feng, L. (2015) Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature* 12; 527(7577), 259-263. doi: 10.1038/nature15391
- Thomas, B. R. Rodriguez, R. L. (1994) Metabolite Signals Regulate Gene Expression and Source/Sink Relations in Cereal Seedlings. *Plant Physiology* 106, 1235-1239
- White, C. N., Proebsting, W. M., Hedden, P., Rivin, C. J. (2000) Gibberellins and Seed Development in Maize, I. Evidence That Gibberellin/ Absciscic Acid Balance Governs Germination versus Maturation Pathways. *Plant Physiology*, 122, 1081–1088

- Van Onckelen, H., Caugergs, R., Horemans, S., De Greef, J. A. (1980) Metabolism of abscisic acid in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. bean and its correlation to germination and alpha-amylase activity. *Journal of Experimental Botany* 31, 913-920
- Yuan, W., Wang, S. (2013) Rice MtN3/Saliva/SWEET Family Genes and Their Homologs in Cellular Organisms. *Molecular Plant*, Vo 3, No. 3, 665-674. DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/sst035>
- Yu, Su-May, Lo, S.-F., David Ho, T.-Hua (2015) Source-Sink Communication: Regulated by Hormone, Nutrient, and Stress Cross-Signaling. *Trends in Plant Science* 20 (12), 844-857. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.009>
- Zurita-Villegas, Viridiana (2011) Efecto de *Fusarium verticillioides* en el transporte de carbohidratos en la germinación de tejido embrionario de maíz. Tesis para obtener el título de licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga, UNAM, D. F., México, págs. 91.

ANEXOS

Anexo 1. Ejemplo de gráfica de perfil de expresión de los SWEETs

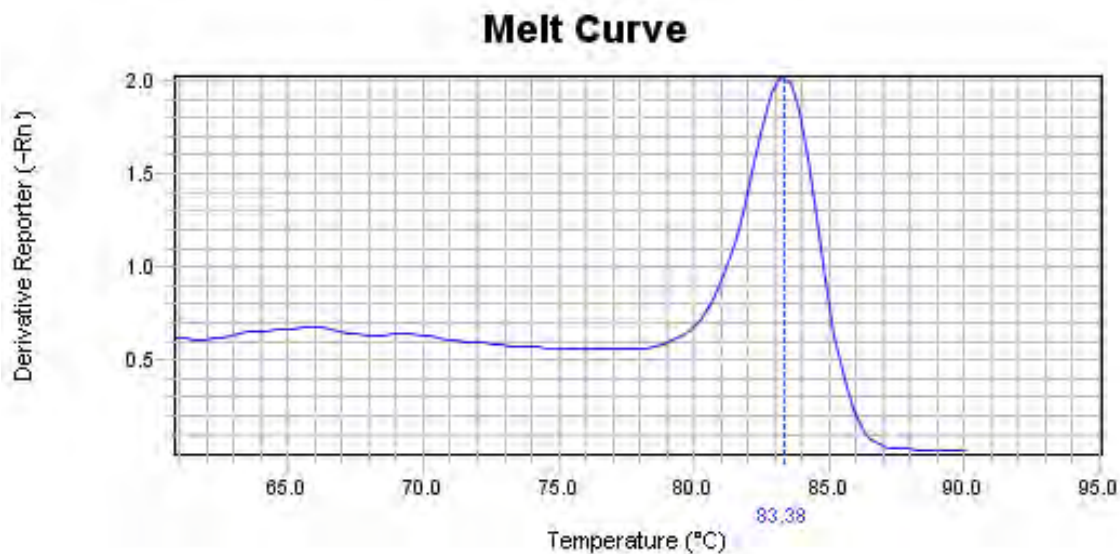


Figura 20. Curva de fusión (Del inglés “Melt Curve”) o Curva de disociación del oligonucleótido *ZmSWEET13a* con la muestra control. En la gráfica de la curva de fusión se observa el cambio en la fluorescencia cuando el DNA de doble cadena (dsDNA) con el colorante incorporado las moléculas de este último se disocian del dsDNA o se convierten en DNA de cadena sencilla (ssDNA) a medida que la temperatura de la reacción aumenta. En el eje de las abscisas se muestra la temperatura y en el de las ordenadas el cambio en la fluorescencia/cambio en la temperatura ($-\Delta F/\Delta T$) (Life Technologies Corporation, 2012).