



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL
TRANSPORTADOR DE AZÚCARES SWEET3b DE MAÍZ**

TESIS

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

PRESENTA

CARLOS FELIPE CENTENO PEÑA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2021



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:	DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ
VOCAL:	M. EN C. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
SECRETARIO:	DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
1er. SUPLENTE:	DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2do. SUPLENTE:	M. EN C. JAVIER AXOSCO MARÍN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 102 del Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Giovanna Paulina Aguilera Alvarado

SUSTENTANTE:

Carlos Felipe Centeno Peña

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis: **“Clonación y caracterización funcional del transportador de azúcares SWEET3b de maíz”**, fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** y la dirección técnica de la **Dra. Giovanna Paulina Aguilera Alvarado** en el Laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece también a la M. en C. Montserrat López Coria, a la M. en C. Beatriz King Díaz y al Dr. Fernando Guzmán Chávez por el apoyo técnico proporcionado durante la realización del trabajo experimental de esta tesis.

El trabajo de tesis recibió financiamiento a través de:

- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto A1-S-17269.
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, IN225220.

Además, la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, a través del Programa de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica brindó a Carlos Felipe Centeno Peña la Beca de Conclusión de Estudios de Licenciatura y la Beca de Titulación de Alumnos de Licenciatura, IN220217.

Se agradece también a los miembros del jurado la Dra. Marina Gavilanes Ruiz y la M. en C. Raquel Ortega Muñoz por sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

- ÍNDICE DE FIGURAS	v
- ÍNDICE DE TABLAS	vi
- ABREVIATURAS	vii
- RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1-20
1.1. Transporte de nutrientes en plantas	1
1.1.1. Transporte a larga distancia	1
1.2. Transporte a corta distancia	2
1.2.1 Transportadores de sacarosa	7
1.2.2 Transportadores de monosacáridos	8
1.3. Transportadores SWEET	9
1.3.1. Localización tejido específica y función de los SWEETs	13
1.3.2. Cambios en la expresión de los SWEETs durante la interacción planta-microorganismo	15
2. JUSTIFICACIÓN	21-23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25-39
5.1. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de los marcos de lectura abierta de SWEETs del clado I	26
5.2. Obtención del RNA a partir de raíces de maíz	27
5.3. Clonación de los ORFs SWEET	30
5.4. Subclonación de los ORFs SWEET por recombinación (Gateway) ..	32
5.5. Expresión heteróloga del ZmSWEET3b	34
6. RESULTADOS	40-57
6.1. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias SWEET de miembros del clado I	40
6.2. Clonación de las secuencias ORF de ZmSWEET3b y AtSWEET2 ..	41
6.3. Subclonación y transformación de levaduras	50
6.4. Localización subcelular del ZmSWEET3b	52

6.5. Determinación de la actividad de transporte mediante ensayos de complementación heteróloga.....	54
7. DISCUSIÓN.....	58
7.1. Transportadores SWEET durante la interacción planta-microorganismo.....	58-67
7.2. El ZmSWEET3b se localiza en la membrana plasmática al expresarse en levadura.....	60
7.3. El ZmSWEET3b no transporta hexosas.....	63
7.4. El ZmSWEET3b transporta sacarosa.....	64
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS.....	68
10. REFERENCIAS.....	69-78
11. ANEXOS.....	79-89
Anexo 2. Preparación de material estéril para el aislamiento de RNA.....	79
Anexo 2. Purificación de fragmentos de DNA.....	79
Anexo 3. Purificación de plásmidos.	80
Anexo 4. Alineamientos de los fragmentos secuenciados a partir de las construcciones pGEM T-Easy-SWEET y las secuencias reportadas.....	81
Anexo 5. Mapas de los vectores contruidos en este trabajo.....	84
Anexo 6. Scores de WoLF PSORT de los SWEETs analizados.....	89
Anexo 7. Predicción de la estructura transmembranal del ZmSWEET3b obtenida con el servidor THMM2.0.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de flujo de azúcares y estructuras celulares de algunos tejidos de maíz.....	3
Figura 2. Transportadores membranales de azúcares en plantas.....	6
Figura 3. Estructuras de algunos transportadores de azúcares.....	11
Figura 4. Efecto del hongo <i>T. asperellum</i> en el crecimiento de plantas de maíz.....	22
Figura 5. Efecto del biopriming con <i>T. asperellum</i> en la expresión de los SWEETs de raíces de maíz.....	23
Figura 6. Esquema de trabajo diseñado para la caracterización funcional de ZmSWEET3b.....	25
Figura 7. Electroforesis del RNA de raíces de <i>Zea mays</i> y de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
Figura 8. Electroforesis que corrobora la presencia de los fragmentos de ORF de ZmSWEET3b y AtSWEET2.....	43
Figura 9. Patrones de restricción de los vectores pGEM T-Easy-ZmSWEET3b y pGEM T-Easy-AtSWEET2.....	45
Figura 10. Comparación de la secuencia del ZmSWEET3b reportada y clonada en este trabajo.....	46
Figura 11. Confirmación de la presencia de la región de 24 pb en ZmSWEET3b.....	48
Figura 12. Comparación de las topologías predichas para las secuencias traducidas del gen reportado en NCBI y del clonado en este trabajo para ZmSWEET3b.....	49
Figura 13. Electroforesis de los productos del ensayo de restricción con MluI de los vectores pDONR221-ZmSWEET3b y pDONR221-AtSWEET2..	51
Figura 14. Localización de las fusiones SWEET-GFP en <i>S. cerevisiae</i> W303.....	53
Figura 15. Ensayo de complementación en <i>S. cerevisiae</i> EBY.VW4000....	55
Figura 16. Ensayo de complementación en <i>S. cerevisiae</i> SEY6210.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. SWEETs cuya expresión se modifica durante la interacción con microorganismos.....	20
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación por PCR de los SWEETs de interés.....	26
Tabla 3. Componentes añadidos a la mezcla de reacción de PCR punto final para clonación.....	29
Tabla 4. Oligonucleótidos para subclonar los genes de ambos SWEETs del pGEM T-Easy al vector pDONR-221.....	33
Tabla 5. Componentes del T-mix utilizado en la transformación de levaduras.	36
Tabla 6. Matriz de identidad de secuencias de nucleótidos.....	40
Tabla 7. Matriz de identidad de secuencias de aminoácidos.....	41
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para comprobar la presencia del fragmento no encontrado en la secuenciación.....	47

ABREVIATURAS

BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatos
FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
Fru	Fructosa
Gal	Galactosa
GFP	Proteína verde fluorescente
Glu	Glucosa
GLUT	Transportadores de glucosa
GUS	β -glucoronidasa
HXT	Transportadores de hexosas
INV	Invertasa
LB	Luria-Bertani
Mal	Maltosa
MFS	Superfamilia de facilitadores mayores
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácidos ribonucleicos de interferencia
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
Sac	Sacarosa
SLC50	Familia de acarreadores de solutos 50
SOC	Caldo súper óptimo con represor catabólico
STP	Proteínas transportadoras de azúcares
SUC	Acarreadores de sacarosa
SUF	Facilitadores de sacarosa
SuSy	Sacarosa sintasa
SUT	Transportadores de sacarosa
SWEET	Transportadores difusionales de azúcares
TAE	Tris base-ácido acético-EDTA
TAL	Parecido a activadores de la transcripción
THB	Dominios con tres α -hélices.
TM	Transmembranal
TMT	Transportador de monosacáridos de tonoplasto
TST	Transportadores de azúcares de tonoplasto
VGT	Transportadores vacuolares de glucosa
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>

RESUMEN

En las plantas, los azúcares son sintetizados en tejidos fuente y su transporte es necesario para permitir el metabolismo y desarrollo de los tejidos demanda, los cuales carecen de la capacidad de sintetizar azúcares. Una de las vías de transporte de azúcares es el transporte difusional, a través de los transportadores membranales tipo SWEET, los cuales pueden encontrarse en la membrana plasmática, del tonoplasto y la membrana del aparato de Golgi.

La expresión de los transportadores SWEETs es afectada por la interacción de las plantas con microorganismos. Durante la interacción del maíz con el hongo benéfico *Trichoderma asperellum* hay un aumento en la expresión del gen *ZmSWEET3b* en raíces de plantas de 1 mes de edad, sin embargo, hasta ahora se desconoce tanto la localización subcelular del ZmSWEET3b como la especificidad de transporte por azúcares, y su conocimiento ayudará a determinar su papel durante la interacción planta-hongo.

En este trabajo se encontró que al expresar a ZmSWEET3b en levaduras, este se localizaba en la membrana plasmática. Como control se utilizó a SWEET1 de *Arabidopsis thaliana*, el cual se ha reportado se encuentra en la membrana plasmática.

Por otro lado, para determinar si el ZmSWEET3b transporta hexosas o sacarosa, se realizaron ensayos de complementación funcional en levaduras carentes de otros transportadores de azúcares. El resultado del ensayo de complementación en la levadura EBY.VW4000 carente de transportadores de hexosas indicó la ausencia de crecimiento en presencia de glucosa o fructosa, lo que sugiere que ZmSWEET3b podría transportar sacarosa. Para determinar si la sacarosa podía ser transportada a través de ZmSWEET3b, se transformó a la levadura SEY6210, la cual carece de invertasas extracelulares y de transportadores de disacáridos. Las levaduras transformadas mostraron un crecimiento ligeramente mayor a las levaduras que no expresaron al ZmSWEET3b, lo que sugiere su capacidad de transportar sacarosa. En conclusión el aumento en la transcripción del transportador podría implicar un mayor número de ZmSWEET3b en la membrana plasmática, llevando a un mayor eflujo de sacarosa que podría contribuir a la nutrición de *T. asperellum*, puesto que un hongo del mismo género solo expresa a un transportador de sacarosa cuando interacciona con el maíz.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Transporte de nutrientes en plantas.

La sacarosa (Sac) es el principal azúcar sintetizado en las hojas. Es fuente de energía y esqueletos de carbono, necesarios para las reacciones metabólicas y el desarrollo de las plantas. Las hojas maduras solo utilizan una parte de los azúcares que sintetizan, la mayor parte es exportada a los tejidos que carecen de capacidad fotosintética. A los tejidos fotosintéticos capaces de sintetizar azúcares se les denomina tejidos fuente, y los que carecen de esa actividad son los tejidos demanda (Lemoine *et al.*, 2013).

En las plantas existe una relación dinámica entre los tejidos fuente y los demanda, ya que, dependiendo de su estadio de desarrollo, la proporción de tejidos fuente y demanda cambia. Algunos tejidos pueden pasar de requerir nutrientes a ser la fuente de ellos (Jameson *et al.*, 2016), por ejemplo, las semillas requieren de nutrientes durante la embriogénesis, para completar el desarrollo del embrión y para almacenar nutrientes, mientras que durante la germinación, los nutrientes almacenados en la semilla son usados para el desarrollo de la nueva planta. Las hojas inmaduras también necesitan de los azúcares durante su desarrollo, pero al madurar, se convierten en tejido fuente (Yu *et al.*, 2015).

Para llevar los azúcares a toda la planta, se requiere de un sistema de translocación o transporte de nutrientes, que puede ser de larga distancia (entre órganos) o de corta distancia (entre células). Las plantas superiores cuentan con haces vasculares, el floema y el xilema, formados por tejidos altamente especializados, que llevan a cabo el transporte a larga distancia (Myburg *et al.*, 2013). En el transporte a corta distancia, están involucrados los plasmodesmata y los transportadores membranales (Braun *et al.*, 2013).

1.1.1 Transporte a larga distancia.

En el xilema ocurre el transporte de agua, aniones (Cl^- , NO_3^- , PO_4^- , SO_3^-), cationes (NH_3^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), y metales (Fe, Cu, Ni), así como de algunas fitohormonas desde las raíces al tallo. El xilema está formado por

células muertas, alargadas y lignificadas¹, que pueden ser vasos, traqueidas o fibras, rodeadas de células parenquimáticas (Marschner, 2011). Esta estructura provee una vía de baja resistencia para el movimiento de agua y solutos, desde las raíces a las hojas (Taiz y Zeiger, 2002).

Por otro lado, la translocación de azúcares de los órganos fuente a los sitios de consumo o de almacenamiento se lleva a cabo a través del floema (De Schepper *et al.*, 2013). Este está formado por células conductoras llamadas elementos cribosos, nombre que deben a que tienen poros en la pared celular, conocidos como placas y áreas cribosas. A diferencia de las células que componen el xilema, los elementos cribosos maduros no se encuentran lignificados, permanecen vivos, y aunque carecen de algunos organelos como el núcleo, los ribosomas, el aparato de Golgi y la vacuola, mantienen su membrana celular, pocas mitocondrias modificadas y el retículo endoplásmico liso. Cada elemento criboso está asociado a una o más células acompañantes, que llevan a cabo las funciones metabólicas necesarias para el mantenimiento de los elementos cribosos (Figura1) (Taiz y Zeiger, 2002; Heldt y Piechulla, 2011).

1.2. Transporte a corta distancia.

El proceso de carga y descarga de solutos en el xilema y el floema es complejo debido a que involucran dos sistemas de transporte muy distintos: el transporte simplástico y el apoplástico (Liesche y Patrick, 2017). El simplasto es el continuo de citoplasmas que se forma entre dos o más células contiguas a través de conexiones especializadas denominadas plasmodesmata (plasmodesmo en singular), que son extensiones tubulares de la membrana plasmática de 40 a 50 nm de diámetro. Estas uniones permiten el intercambio de moléculas de hasta 1000 Da entre las células (Figura 1) (Taiz y Zeiger, 2002).

¹ *Lignificación. Reforzamiento de las paredes celulares debido a la formación de patrones complejos del polímero polifenólico conocido como lignina, que le confiere resistencia estructural al tejido vascular así como a la planta en general (Boyce et al., 2004).*

Por otra parte, cuando las células carecen o tienen muy pocas conexiones plasmodesmata, los solutos deben movilizarse a través de la membrana celular mediante transportadores específicos hacia el apoplasto, que es el espacio entre la membrana plasmática y la pared celular, para poder llegar a otras células. Dicha vía es denominada como transporte apoplástico (Figura 1) (Taiz y Zeiger, 2002).

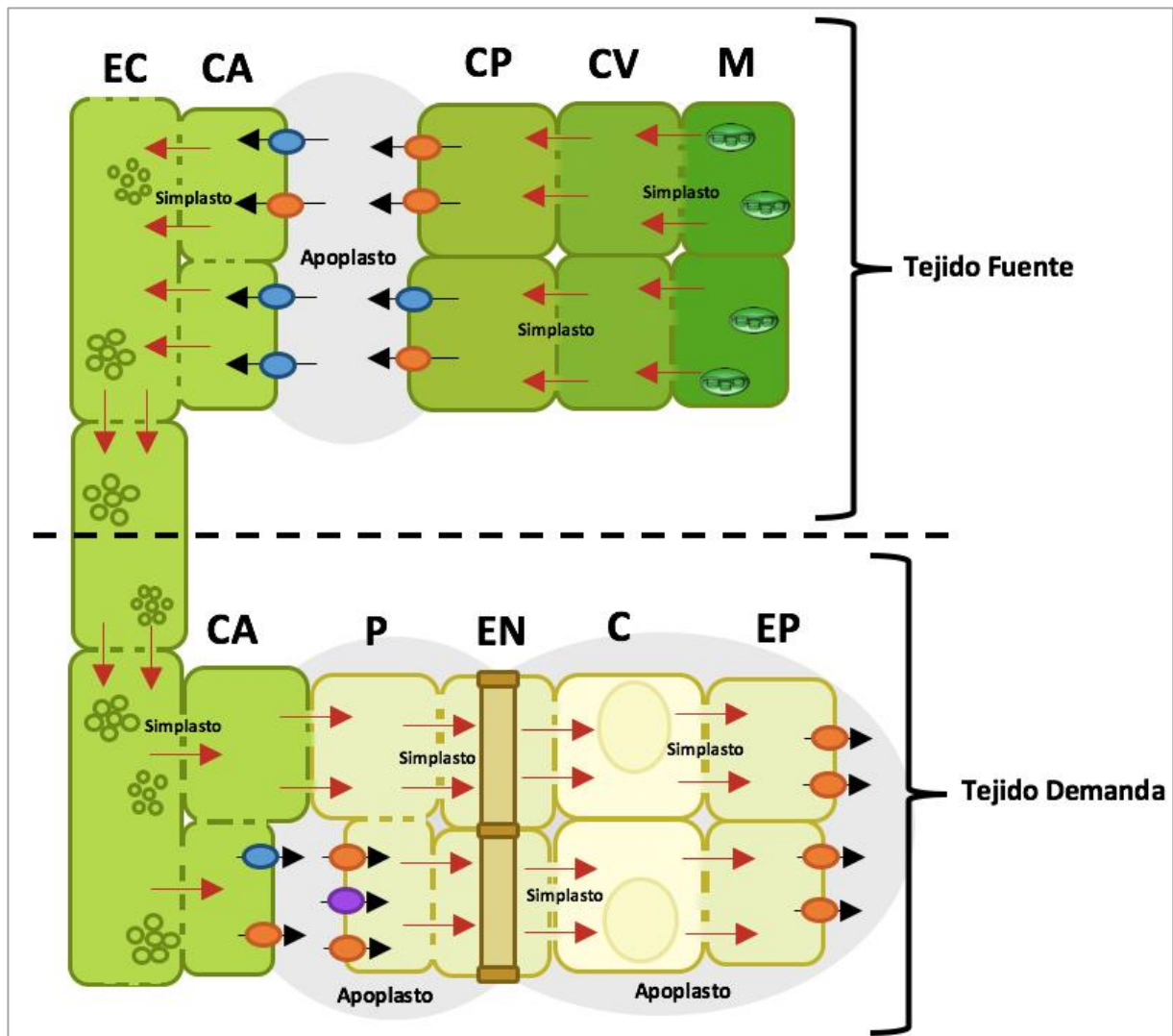


Figura 1. Ejemplos de flujo de azúcares y de estructuras celulares de algunos tejidos de maíz. En la parte superior se muestra como es el flujo de azúcares de las hojas (Tejido Fuente) al floema, formado por las células acompañantes (CA) y los elementos cribosos (EC). Comienza en las células del mesófilo (M) donde los azúcares son obtenidos por fotosíntesis en los cloroplastos, y pasan a la célula de la vaina (CV) a través de uniones plasmodesmáticas que generan un citoplasma continuo (Simplasto). El flujo de azúcares por esta vía está representado por flechas rojas. Los azúcares llegan por difusión hasta las células del parénquima (CP) y la vía simplástica es interrumpida. Para poder llegar al floema, los

azúcares deben de ser transportados por proteínas (representadas por flechas negras y óvalos de colores) al apoplasto (marcado con gris) e ingresar de la misma forma a las CA, para poder difundir a los EC (Delgado-Rubio, 2017). En las raíces (Tejido Demanda), la descarga del floema al periciclo (P) se lleva a cabo por ambas vías durante el desarrollo de la planta, pero en la raíz madura se lleva a cabo por la vía simplástica (López-Coria, 2019). Al llegar a P, las células de la endodermis (EN), corteza (C) y epidermis (EP) se encuentran unidas simplásticamente, por lo que los azúcares se mueven libremente por difusión hacia estas (Baker *et al.*, 2016). Los azúcares, además de ser utilizados como fuente de energía, pueden ser almacenados en EN o ser liberados a la rizósfera en EP (Jones *et al.*, 2009). Modificado de Méndez-Ramírez, 2018.

En una hoja, las células del mesófilo, que son las encargadas de sintetizar a los azúcares, usualmente están conectadas por vía simplástica a las células más externas del floema, mientras que éstas últimas no presentan conexiones plasmodesmata con las células cribosas, por lo que el transporte de los azúcares hacia las células cribosas es por vía apoplástica (Figura 1) (Taiz y Zeiger, 2002). Además de separaciones morfológicas entre células y la característica de hidrofiliidad de los azúcares, la diferencia de concentración entre tejidos puede ser tan grande que la única forma en la que pueden ser transportados entre ellos (de baja a alta concentración) es mediante proteínas membranales (Braun y Slewinski, 2009; De Schepper *et al.*, 2013).

Existe una gran variedad de proteínas que permiten el movimiento de moléculas a través de la membrana celular o de las membranas de compartimientos celulares, dichas proteínas pueden ser bombas dependientes de ATP, canales o acarreadores (Figura 2) (Berg *et al.*, 2002). Las bombas o ATPasas son enzimas que transportan mayormente iones en contra de un gradiente de concentración con alta estereoespecificidad a través de una membrana, utilizando la hidrólisis del ATP como fuente de energía para generar un cambio conformacional en la proteína que impulsa el movimiento del ión. A este tipo de transporte dependiente de ATP se le conoce como transporte activo primario (Lodish *et al.*, 2000).

Por otro lado, los canales proteicos facilitan la difusión de moléculas de agua y el flujo de iones a través de una membrana bajo el gradiente de concentración, por lo que se conoce como transporte pasivo o difusivo. Los canales permiten el movimiento en órdenes de magnitud mayores con respecto a los demás tipos de transportadores, y su transporte puede estar regulado por ligandos o por cambios de potencial (Lodish *et al.*, 2000).

Por otra parte, los acarreadores son proteínas transportadoras parecidas a los canales pero con mayor estereoespecificidad, que permiten el paso de una sola o unas cuantas moléculas mediante cambios conformacionales. De estos, existen tres tipos dependiendo de la dirección del transporte: los que realizan el transporte de un soluto en una dirección son denominados uniportadores y ya que el soluto es movilizado en la dirección del gradiente de concentración, se conocen como transportadores difusionales (Nelson *et al.*, 2008).

Los otros dos tipos de transportadores son los antiportadores y simportadores. Estos se conocen como cotransportadores, y al igual que las bombas dependientes de ATP, realizan el transporte activo de solutos, es decir, transportan al soluto en contra del gradiente de concentración, que es una reacción energéticamente desfavorecida, pero para lograrlo utilizan una reacción acoplada que es energéticamente favorecida, como el transporte simultáneo de otro soluto a favor de su gradiente de concentración. Cuando el transporte de estos dos solutos a través de la membrana es en direcciones opuestas, el transportador es un antiportador. Cuando ambos solutos se transportan hacia un mismo compartimento el transportador es un simportador. Este tipo de transporte es conocido como transporte activo secundario y no realiza la hidrólisis de ATP, pero utiliza el gradiente iónico generado por el transporte activo primario (Figura 2) (Lodish *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2008).

Pocos tipos de azúcares son transportados a larga distancia en la planta. De ellos, la Sac es la que principalmente es transportada en el floema, debido a su escasa reactividad y alta solubilidad (Lemoine *et al.*, 2013). A corta distancia también se requiere de la movilización de la Sac y de hexosas, principalmente

glucosa (Glu), fructosa (Fru) y de polioles como el manitol. La distribución correcta de estos azúcares es esencial para el crecimiento de las plantas, ya que además de ser recursos metabólicos y constituyentes estructurales, cumplen con funciones de señalización parecidas a las de las hormonas y modulan procesos fundamentales del ciclo de vida de la planta (Kühn y Grof, 2010; Lemoine *et al.*, 2013).

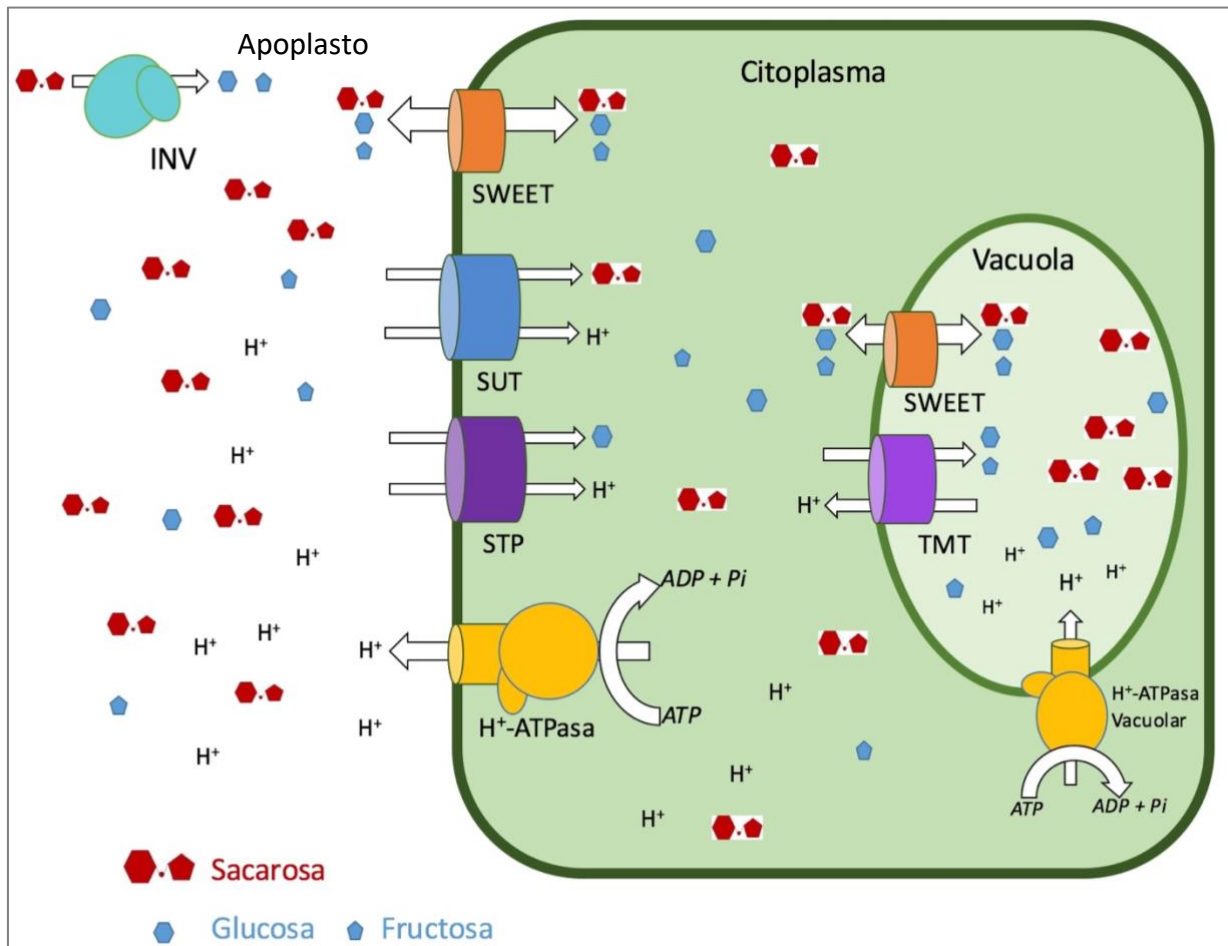


Figura 2. Transportadores membranales de azúcares en plantas. En ausencia de plasmodesmata, el transporte de azúcares se lleva a cabo únicamente por transportadores membranales. La sacarosa y las hexosas se pueden transportar por transporte activo secundario a través de los simportadores sugar transporter (SUT) y sugar transporter protein (STP) gracias al gradiente de protones (H^+) producido por las ATPasas de protones (H^+ -ATPasa), que llevan a cabo el transporte activo primario. Esto sucede de forma similar en la vacuola. Los antiportadores de monosacáridos del tonoplasto (TMT) llevan a cabo transporte secundario de hexosas en la vacuola. El transporte de los azúcares puede ser difusional a través de los SWEETs en ambas membranas. La sacarosa es hidrolizada en el apoplasto por las invertasas de pared celular (INV).

1.2.1. Transportadores de sacarosa.

Los SUTs (SUcrose Transporters por sus siglas en inglés) o SUCs (SUcrose Carriers) son simportadores de Sac y H^+ con una estequiometría 1:1, y presentan valores de K_m que van desde 0.07 a 20 mM (Lemoine, 2000; Kühn y Grof, 2010). Estos transportadores pertenecen a la superfamilia de facilitadores mayores (MFS), que incluye a los transportadores de Glu del humano (GLUTs), a los transportadores de hexosas de levaduras (HXTs) y a la galactósido permeasa de bacterias (Kühn y Grof, 2010).

Estructuralmente, los SUTs constan de 12 cruces transmembranales (TM) (Figura 3). Se encuentran en las membranas plasmáticas y el tonoplasto, tanto en tejidos fuente como en tejidos demanda. Pueden realizar la entrada de Sac, dependiendo del gradiente de H^+ del compartimiento en que se encuentre (Lemoine, 2000; Feng y Frommer, 2015).

Existen cinco clados² que agrupan a la familia de los SUTs, donde los miembros del clado 1 son exclusivos de dicotiledóneas y muestran valores de K_m aparentes (se denominan aparentes debido a que son determinadas a partir de la expresión heteróloga del transportador, en organismos como levaduras u ovocitos de *Xenopus*) de 0.07 a 2.0 mM de Sac. Los miembros de los clados 3 y 5 son exclusivos de monocotiledóneas y los pocos que han sido caracterizados muestran valores de K_m aparentes de 2 a 8 mM de Sac. Los miembros de los clados 2 y 4 se encuentran tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas y muestran valores de K_m aparentes de 4 a 20 mM de Sac. Los SUTs del clado 3 son principalmente vacuolares, así como algunos del clado 4, aunque algunos miembros de este grupo se han encontrado en fracciones cloroplásticas (Kühn y Grof, 2010).

Existen transportadores similares a los SUTs llamados SUFs (SUcrose Facilitators), que permiten la difusión facilitada de Sac de forma bidireccional e independiente del pH, aunque solo se han encontrado en semillas en desarrollo

²Clado. Grupo de organismos o genes emparentados que contiene a un ancestro común y a todas las especies o variaciones descendientes de este antepasado (Griffiths, 2006).

de chícharo y frijol, localizados en la vacuola, mostrando valores de K_m aparentes hasta cuatro veces mayores que sus homólogos SUTs (Zhou *et al.*, 2007).

Análisis realizados en mutantes de maíz, como la mutante *sdx1* (sucrose export defective 1) y la mutante knockout del SUT1 (*zmsut1*), muestran que las plantas carentes de estos transportadores tienden a acumular carbohidratos en las hojas, donde la mutante *zmsut1* además muestra deficiencias en el contenido de clorofila, reducción en el tamaño de la planta, menor cantidad de hojas y desarrollo más lento que las plantas silvestres. Esto puede ser debido a que no se logra movilizar Sac a las células del haz vascular, por lo que no llega la cantidad adecuada a los tejidos demanda (Braun y Slewinski, 2009).

1.2.2. Transportadores de monosacáridos.

También existen proteínas de 12 cruces TM involucradas en el transporte de azúcares distintos a la Sac, como los STPs (Sugar Transporter Proteins), PMTs (Polyol/Monosaccharide Transporters), TMTs (Tonoplast Monosaccharide Transporter), conocidos también como TSTs (Tonoplast Sugar Transporters), y VGTs (Vacuolar Glucose Transporters), que se encargan de modular el movimiento de monosacáridos y polioles, dentro y fuera de la célula, así como entre los compartimientos celulares (Slewinski, 2011). La mayoría de los transportadores de este tipo se localizan en la membrana plasmática de tejidos demanda, los cuales transportan las hexosas que se encuentran en el apoplasto al interior de la célula para posteriormente ser metabolizadas o almacenadas. Estas hexosas son generalmente el producto de la hidrólisis de la Sac mediada por por invertasas (INV) y sacarosa sintasas (SuSy) (Slewinski, 2011; Hedrich *et al.*, 2015).

Los transportadores de monosacáridos son dependientes del pH, pero a diferencia de los transportadores de Sac que son simportadores, algunos transportadores vacuolares llevan a cabo el antiporte del azúcar acoplado a H^+ (Schulz *et al.*, 2011). La mayoría de los transportadores de monosacáridos muestra afinidad por azúcares como la galactosa (Gal), manosa, xilosa,

además de Glu y Fru. Asimismo, algunos tienen la capacidad de transportar polioles. Su importancia se debe a que la acumulación de monosacáridos reductores en el citoplasma puede resultar en glicosilaciones no enzimáticas en residuos de proteínas críticas para el funcionamiento de la célula, por lo que la actividad de estos transportadores es necesaria para secuestrar azúcares, y así regular su concentración en el citoplasma y/o controlar su almacenamiento, además de ser parte de la respuesta a diferentes tipos de estrés (Slewinski, 2011; Hedrich *et al.*, 2015).

Las mutantes knockout de un solo gen de este tipo de transportadores no muestran fenotipos distintos a las plantas silvestres, lo que sugiere la expresión de transportadores similares que pueden compensar el transporte faltante, ya sean del mismo tipo de transportadores de azúcares hasta ahora mencionados, o transportadores diferentes, como los del tipo SWEET (Slewinski, 2011).

1.3. Transportadores SWEET.

Los SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporters) son una familia de transportadores membranales pertenecientes a la familia de genes *MtN3/saliva*. Están presentes en todos los reinos (Yuan y Wang, 2013). Los SWEETs fueron descritos en el 2010 en *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 2010). Estos transportadores modulan el flujo de azúcares a través de un transporte difusivo independiente del pH y de forma bidireccional.

Los SWEETs fueron identificados al coexpresar proteínas politópicas sin caracterizar de *Arabidopsis*, y proteínas sensoras que monitoreaban por FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente) la presencia de Glu en las células embrionarias de riñón humano HEK293T, las cuales de manera endógena, tienen una actividad baja de toma de glucosa (Chen *et al.*, 2010). Además, los SWEET han sido expresados en levaduras EBY.VW4000, carentes de transportadores de hexosas.

La confirmación de la actividad de transporte de azúcares de los SWEETs se hizo mediante ensayos con Glu marcada con ^{14}C en ovocitos de *Xenopus* que fueron transfectados con los genes *SWEET* (Chen *et al.*, 2010; Feng y Frommer, 2015). El primer SWEET en ser caracterizado fue llamado AtSWEET1, localizado en la membrana plasmática, y que en las células HEK293T y de levadura llevó a la acumulación de Glu. El AtSWEET1 es un transportador de baja afinidad por Glu con una K_m aparente de 8 a 10 mM (Chen *et al.*, 2010).

La estructura de los SWEETs es distinta a las de los transportadores de azúcares SUT y STP, ya que cuentan con 6-7 cruces TM en vez de 12 (Figura 3), además están formados por dos dominios de tres α -hélices (THB, triple helix bundle) donde los cruces 1 y 3 quedan cercanos entre sí (Feng y Frommer, 2016). Ambos dominios están unidos por una α -hélice (Feng y Frommer, 2015; Jia *et al.*, 2017). En bacterias se han encontrado homólogos de estos transportadores con una estructura similar al dominio THB, llamados semiSWEETs (Xu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Al ser cristalizados, los semiSWEETs se encuentran formando dímeros (Xuan *et al.*, 2013). Lo anterior sugiere que los SWEETs pudieron haber evolucionado a partir de la duplicación en tándem del gen de algún semiSWEET, o debido a la fusión de un semiSWEET bacteriano con un semiSWEET de arquea (Jia *et al.*, 2017).

El SWEET2b del arroz (*Oryza sativa*) fue el primer SWEET cristalizado y muestra una estructura de homotrímero, aunque también se han encontrado en forma de homo- y hetero-oligómeros (Tao *et al.*, 2015). También se obtuvo el meso cristal del AtSWEET13 (Han *et al.*, 2017), transportador del clado III que muestra actividad de transporte de Sac y Glu. En estos estudios se ha obtenido información valiosa sobre los residuos que podrían estar involucrados en la estructura y transporte de los SWEETs.

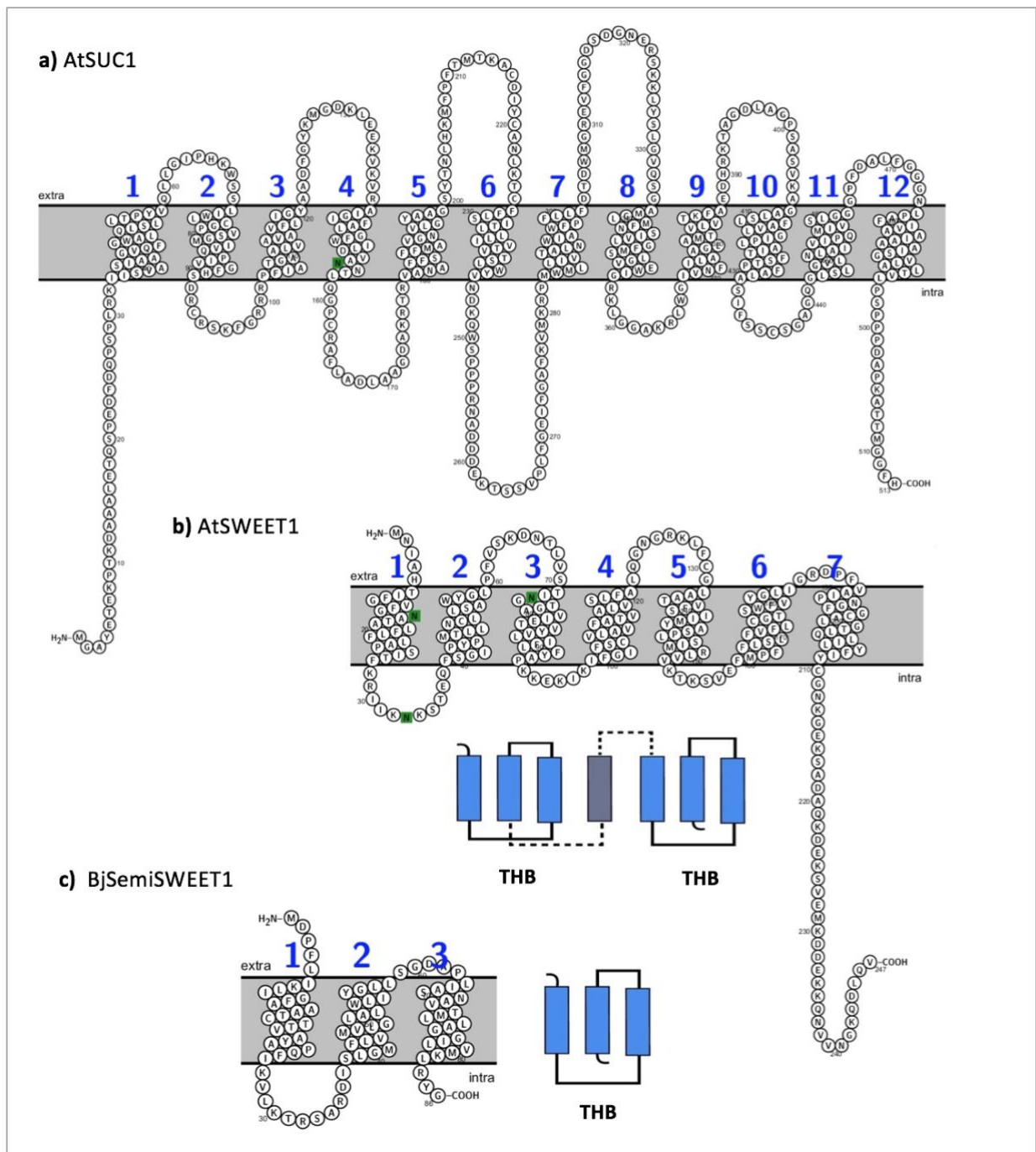


Figura 3. Estructuras de algunos transportadores de azúcares. Se presentan las predicciones de la topología en la membrana de transportadores de azúcares, AtSUC1 (a), AtSWEET1 (b), y un semiSWEET, el SWEET1 de la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* (BjSemiSWEET1; c), obtenidas al analizar sus secuencias reportadas con el programa Protter (Omasits et al., 2014). Se muestran los sitios de N-glicosilación en verde y cada 10 aminoácidos el número de la posición en la secuencia. Para el SWEET (b) y el semiSWEET (c), se muestra la topología de los THBs (Feng y Frommer, 2015), ya que en las predicciones no se puede apreciar este arreglo 1-3-2.

Los SWEETs también se encuentran en los genomas de animales, incluyendo al nemátodo *C. elegans*, que cuenta con siete genes SWEET (Chen *et al.*, 2010). El humano cuenta con solo un homólogo de estos transportadores HsSWEET1 y pertenece a la familia de uniportadores SLC50, cuya expresión es ubicua en tejidos pero mayor en oviducto, epidídimo e intestino, y su expresión en células HEK293T lo localiza en el aparato de Golgi (Chen *et al.*, 2010). En ratones, la expresión de MmSWEET1 es inducida durante la lactancia en glándulas mamarias, por lo que su localización en Golgi podría deberse al requerimiento de Glu para la síntesis de lactosa (Chen *et al.*, 2010; Wright, 2012).

En plantas el número de SWEETs va de 8 en *Amborella trichopoda*, hasta 47 en *Eucalyptus grandis* (Chen *et al.*, 2015; Eom *et al.*, 2015). Se han identificado 17 genes de SWEETs en la uva (*Vitis vinifera*) (Chong *et al.*, 2014), 23 en el sorgo (*Sorghum bicolor*) (Mizuno *et al.*, 2016), 18 en la pera blanca (*Pyrus bretschneideri*) (Li *et al.*, 2017a), 25 en el plátano (*Musa acuminata* L.) (Miao *et al.*, 2017), 33 en manzana (*Malus domestica*) (Wei *et al.*, 2014) y, según la base de datos EnsemblPlants, 24 en el maíz (*Zea mays*) (Kersey *et al.*, 2018).

Arabidopsis cuenta con 17 genes SWEET que se agrupan en cuatro clados (Eom *et al.*, 2015). Sin embargo, la pertenencia de los SWEETs a cierto clado no predice los procesos fisiológicos en los que el transportador podría estar involucrado, pero parece existir una relación entre el clado y el tipo de azúcar transportado. Los SWEETs del clado I (SWEET1-3) y II (SWEET4-8) principalmente transportan Glu, mientras que los de la mayoría del clado III (SWEET9-15) transportan Sac. Por otro lado, los dos SWEETs del clado IV (SWEET16-17) transportan Fru, donde cabe destacar que el SWEET16, también transporta Glu y Sac (Chen *et al.*, 2010; Klemens *et al.*, 2013).

La nomenclatura usada para nombrar a los SWEETs está relacionada filogenéticamente a los genes identificados como SWEETs en las familias de *Arabidopsis* y del arroz, donde en esta última se han identificado 21 SWEETs (Yuan y Wang, 2013).

Se pueden encontrar genes co-ortólogos a los SWEETs debido a la multiplicación de genes, por lo que varios SWEETs coinciden con el mismo miembro de la familia de *Arabidopsis*, por lo que se designan con una letra después del número. Por ejemplo, se han identificado 29 SWEETs en el tomate (*Solanum lycopersicum*) y 35 en la papa (*Solanum tuberosum*), en donde SISWEET1 y StSWEET1 tienen 5 y 7 co-ortólogos respectivamente, SISWEET1a-e y StSWEET1a-g (Eom *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015; Manck-Götzenberger y Requena, 2016).

1.3.1. Localización específica y función de los SWEETs.

Los SWEETs están involucrados en un amplio rango de procesos fisiológicos que dependen en gran medida de su localización específica de tejido y subcelular. En *Arabidopsis* estos transportadores, se han encontrado en la membrana plasmática (SWEET1, -4, -8, -9, -11, -12, -15), en el tonoplasto (SWEET2, -16 y -17), en el aparato de Golgi (SWEET5 y -9) y el retículo endoplásmico (SWEET6) (Chen *et al.*, 2015b; Feng y Frommer, 2015).

Por otra parte, el AtSWEET5, también conocido como *VGE1* (Vegetative Cell Expressed 1), se expresa especialmente en células vegetativas de los granos de polen, sugiriendo que influye en el suministro de Glu para el desarrollo del tejido (Chen, 2014). Su homólogo en arroz, OsSWEET5, que transporta Gal, al ser sobre-expresado provoca un retardo en el crecimiento, adelanta la senescencia y modifica la transcripción de genes relacionados con la señalización de auxinas en plántulas, lo que podría ser causado por la modificación del metabolismo de azúcares (Zhou *et al.*, 2014b).

Otro ejemplo es el SWEET8, también conocido como *RPG1* (Ruptured Pollen Grain 1), que se expresa en el tapetum del esporangio durante la formación del meiocito en plantas macho (Guan *et al.*, 2008). La mutante *atsweet8/rpg1* exhibe una reducción de la fertilidad en plantas macho, por lo que esta proteína puede estar relacionada con el flujo de Glu desde las células del tapetum para la formación de polen (Guan *et al.*, 2008). Efectos similares se observan en

arroz al silenciar el gen *Xa13/Os8N3* que codifica el OsSWEET11 (Chen, 2014).

El SWEET9 es altamente expresado en nectarios y su expresión aumenta conforme el tejido alcanza la madurez, facilitando la secreción de néctar (Lin *et al.*, 2014). Este mismo patrón de expresión se encontró en *Nicotiana attenuata*, donde líneas celulares silenciadas por RNAi mostraron que el NaSWEET9 es necesario para la producción de néctar (Lin *et al.*, 2014).

Los SWEET11 y -12 tienen una alta expresión en células parenquimáticas del floema de las hojas, donde están involucradas en la translocación de Sac a los complejos célula cribosa-célula acompañante. Lo anterior se comprobó con la doble mutante de *Arabidopsis* carente de estos transportadores, *sweet11;12*, que lleva a la acumulación de almidón, Sac y hexosas en los tejidos fuente, así como un menor tamaño de raíz y diámetro de la planta, señal de un reducido cargado del floema (Chen *et al.*, 2012).

Además, AtSWEET11, -12 y -15 son necesarios para el llenado de las semillas. La triple mutante *sweet11;12;15* muestra un fenotipo de semilla rugosa, con menor peso y retraso en el desarrollo del embrión, debido a la poca disponibilidad de azúcares causada por la acumulación en las hojas y a la pérdida del transporte de la cubierta seminal al embrión (Chen *et al.*, 2015c). Mutantes knockout de SWEET14 muestran rasgos similares, por lo que también este SWEET podría estar involucrado en el llenado de la semilla (Chen, 2014).

Por otro lado, en arroz y maíz se ha encontrado que el SWEET4 transporta Glu, se localiza en la membrana plasmática y se encarga de transportar Glu al endospermo durante la embriogénesis (Sosso *et al.*, 2015). Mientras que en arroz, mutantes knockout de OsSWEET11 también muestran un llenado defectuoso de la semilla (Ma *et al.*, 2017).

Cabe destacar que SWEET13 y -14 podrían ser capaces de importar ácido giberélico (GA), una fitohormona involucrada en la elongación y crecimiento celular. La doble mutante *sweet13;14* muestra defectos en la dehiscencia o apertura de las anteras, aunque este fenotipo puede ser revertido por medio de un tratamiento con GA exógeno. La actividad de transporte de GA en levaduras se realizó en condiciones de pH diferentes a las fisiológicas, por lo que es posible que *in vivo*, esta actividad podría no ser relevante (Kanno *et al.*, 2016).

En maíz, ZmSWEET13a, -b y -c muestran una alta expresión en la vasculatura de las hojas, se localizan en la membrana plasmática y transportan Sac. La triple mutante carente de estos tres genes, *zmsweet13abc*, muestra defectos de crecimiento severos, similares a los de las mutantes *zmsut1* y *atsweet11;12* mencionadas anteriormente, además de una alta acumulación de azúcares libres y de almidón en las hojas, lo que está relacionado con un cargado defectuoso del floema (Bezruczyk *et al.*, 2018).

SWEET16 y -17 han sido localizados en membranas vacuolares de células corticales de la raíz y en células parenquimáticas vasculares de hojas, donde modulan la entrada y salida de Fru del citosol a la vacuola. Mutantes knockout de estos transportadores muestran un aumento en la acumulación de Fru en hojas, así como una reducción en el tamaño de las raíces expuestas a un exceso de Fru. Plantas que sobreexpresan los genes de ambos SWEETs expuestas a estrés por frío o carencia de nitrógeno, condiciones bajo las cuales se observa acumulación de azúcares, muestran una reducción en la acumulación de Fru, una mayor eficiencia de germinación y mejor tolerancia al frío. Lo anterior sugiere que ambos SWEETs están involucrados con el reparto de azúcares, dependiendo de la demanda o presencia de Fru, ya que la presencia de este azúcar también modifica su expresión, además de que permite el desarrollo de la planta en condiciones desfavorables (Klemens *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Chardon *et al.*, 2015).

1.3.2. Cambios en la expresión de los SWEETs durante la interacción planta-microorganismo.

Por otro lado, se han encontrado cambios en la expresión de transportadores SWEET durante la interacción entre plantas y microorganismos, principalmente al ser infectadas por patógenos o colonizadas por simbioses presentes en la rizósfera, que es la zona del suelo que rodea a la raíz (Tabla 1) (Doidy *et al.*, 2012; Chen, 2014; Manck-Götzenberg y Requena, 2016). Por ejemplo, al realizar un análisis de los SWEETs expresados en *Arabidopsis* durante la infección con el oomiceto necrófito *Pythium irregulare*, el SWEET2 muestra un aumento en su nivel de expresión, mientras que las mutantes con pérdida de función de este transportador, *sweet2*, muestran mayor susceptibilidad a la infección por *P. irregulare* y menor crecimiento, lo que indica que el transportador podría estar involucrado en los mecanismos de defensa contra patógenos (Chen *et al.*, 2015a).

Plantas de *Arabidopsis* mutantes en *sweet2* muestran una reducción en el contenido de Glu en hojas. El SWEET2 se ha localizado en membranas vacuolares de células corticales y de la epidermis de las raíces de *Arabidopsis*, lo que permite la acumulación de Glu en las vacuolas (Chen *et al.*, 2015a), y en plántulas de la mutante nula *sweet2* previamente embebidas en Glu marcada con ^{14}C , se observó un aumento en la cantidad de Glu exportada por las raíces, debido a que disminuye la acumulación de Glu en la vacuola. Lo anterior, sugiere que la actividad de este transportador podría estar relacionada con la limitación de liberación de azúcares a la rizósfera como mecanismo de defensa contra patógenos (Chen *et al.*, 2015a).

De igual forma en *Arabidopsis*, durante la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato, se produce un aumento en los transcritos de los SWEETs -4, -5, -8, -10, -12 y -15, mientras que la infección con el hongo *Golovmyces chikoracearum* induce la expresión de otro conjunto de SWEETs, principalmente el -11 y -12 (Chen *et al.*, 2010).

La infección con el hongo necrófito *Botrytis cinerea* induce la expresión de los SWEET4, -15 y -17 (Chong *et al.*, 2014). En la uva, al infectar con el mismo patógeno se observa un aumento principalmente de VvSWEET4, que

transporta Glu y se localiza en la membrana plasmática. También aumenta su expresión durante la exposición a especies reactivas de oxígeno y por la presencia de factores de virulencia de *B. cinerea* o de *Phytophthora infestans*. Al obtener mutantes knockout de SWEET4 de *Arabidopsis*, que tiene un 72 % de identidad con el VvSWEET4, se observa una menor susceptibilidad a la infección por *B. cinerea* (Chen *et al.*, 2010; Chong *et al.*, 2014).

En arroz se demostró la activación de los genes que codifican para OsSWEET11, -12, -13, -14 y -15 durante la infección con *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo; Yang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Streubel *et al.*, 2013). La bacteria produce una enfermedad conocida como tizón bacteriano, que es una de las enfermedades más dañinas del arroz. Su virulencia depende de una mezcla de proteínas efectoras inyectadas a la célula por medio de un sistema de secreción tipo III, que pueden llegar a incluir hasta 19 distintas proteínas dependiendo la cepa de Xoo (Streubel *et al.*, 2013.).

Algunas de las proteínas secretadas por las bacterias son conocidas como efectores TAL (Transcription Activation-Like), proteínas similares a factores transcripcionales que se unen a las regiones promotoras para inducir la expresión de genes (Antony *et al.*, 2010; Streubel *et al.*, 2013). Un ejemplo es el efector PthXo1, secretado por la cepa PXO99^A de Xoo, que interacciona con el promotor del gen *Xa13/Os8N3* que codifica para OsSWEET11 induciendo su expresión (Yang *et al.*, 2006). Este SWEET es requerido para la nutrición del patógeno. Líneas celulares de arroz silenciadas para el gen *Xa13* con RNAi, mostraron resistencia a la infección por Xoo (Yang *et al.*, 2006). Asimismo, existen mutaciones naturales que interfieren con la inducción de estos genes, reduciendo la susceptibilidad ante ciertos efectores de Xoo (Chu *et al.*, 2006; Chen, 2014).

Se han reportado mutantes con promotores modificados para conferir resistencia a cepas que dependen de efectores específicos, así como la actividad de efectores TAL artificiales para inducir genes (Li *et al.*, 2013; Chen, 2014). Para el gen *OsSWEET12*, no se conocía algún efector TAL que regulara

su expresión de manera natural. Su expresión fue inducida tras la infección con una cepa de *Xoo* transformada con un TAL artificial, diseñado para unirse a la caja TATA putativa del gen. La inducción de la expresión del *SWEET* confirió susceptibilidad ante el patógeno (Li *et al.*, 2013).

En la yuca (*Manihot esculenta*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* se lleva a cabo un mecanismo similar al descrito en arroz. Al inducir la expresión del gen *MeSWEET10a*, aumenta la susceptibilidad durante la infección, lo que resulta en una enfermedad parecida a la causada por *Xoo* en arroz (Cohn *et al.*, 2014). Al infectar a la planta con una cepa de *X. axonopodis* pv. *manihotis* con importe deficiente de Sac, no se observó una disminución en su virulencia, lo que indica que la Sac podría ser hidrolizada en el apoplasto y el patógeno podría también nutrirse a base de hexosas (Cohn *et al.*, 2014). De forma similar, se ha observado que el efector Avr_{b6} de *X. citri* subsp. *malvacearum* induce la expresión de *GhSWEET10*, mostrando el mismo efecto ante el tizón en el algodón (*Gossypium hirsutum*) (Cox *et al.*, 2017).

El hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *batatas* provoca pudrición del tallo y marchitamiento en la planta del camote (*Ipomoea batatas*), característico de infecciones por *Fusarium*. IbSWEET10 es un transportador de Sac que se localiza en membrana plasmática de células vasculares de las hojas en plantas maduras y es inducido durante la infección con este patógeno. Líneas celulares con RNAi para el transportador mostraron síntomas graves de infección, al igual que un aumento en la concentración de azúcares extracelular (Li *et al.*, 2017b). Por lo tanto, en la planta silvestre este transportador podría disminuir la cantidad de Sac en el apoplasto de las hojas y el tallo, limitando la proliferación de *F. oxysporum*.

Por otra parte, también existen microorganismos que establecen interacciones simbióticas con las plantas, donde la expresión de proteínas SWEET de las plantas cambia (Chandran, 2015). La simbiosis con hongos que forman estructuras llamadas micorrizas arbusculares (AM) en las raíces, beneficia a las plantas mejorando su acceso a nutrientes minerales como el fósforo, mientras

que fortalecen el flujo de carbono hacia la raíz, imponiendo un reparto y relocalización de azúcares. De forma similar, las leguminosas al interactuar con microorganismos rizobios capaces de fijar N₂ atmosférico, forman órganos llamados nódulos en sus raíces, con los que se favorece el intercambio de nutrientes (Manck-Götzenberg y Requena, 2016; Sugiyama *et al.*, 2016).

En la papa, al ser colonizada por el hongo *Rhizophagus irregularis* que produce AM, se modifica la expresión de 22 de los 35 miembros SWEETs. También se observó la relocalización de StSWEET2c, -7a y -12a al coexpresarlos con GUS en plantas de *Medicago truncatula*, primero localizándose en células corticales y en las puntas de las raíces; y 5 semanas después de la infección se localizaron en las células que contenían micorrizas (Manck-Götzenberg y Requena, 2016). También en el mismo estudio por Manck-Götzenberg y Requena, al realizar un análisis de la expresión de SWEETs de *M. Truncatula*, se encontró la inducción de los SWEETs -1b, -6 y -9a durante la simbiosis con AM. Tiempo después, el papel del MtSWEET1b en la interacción fue estudiado por An y colaboradores (2019), mostrando que transporta Glu y podría localizarse en la membrana peri-arbuscular (formada alrededor de las AM), aunque su rol en la nutrición del simbiote podría ser redundante. Asimismo, en arroz, el OsSWEET3b es principalmente inducido durante la misma interacción (Fiorilli *et al.*, 2015).

En la leguminosa *Lotus japonicus*, se observó una alta expresión del LjSWEET3 en el sistema vascular de nódulos de plantas infectadas con el rizobio *Mesorhizobium loti*, así como en las raíces durante la interacción de AM con *R. irregularis*. El LjSWEET3 fue localizado en la membrana plasmática, y al expresarlo en células HEK293T, mostró actividad moderada de transporte de Sac, siendo el primer SWEET fuera del clado III con esta cualidad. Su expresión se redujo en las plantas crecidas en condiciones de suficiencia de nitrógeno. Plantas knockdown producidas por RNAi del LjSWEET3 no mostraron un fenotipo distinto al de la planta WT, por lo que podrían existir otras vías o transportadores de Sac que aseguren el suministro de nutrientes a los nódulos (Sugiyama *et al.*, 2016).

Tabla 1. SWEETs cuya expresión es modificada durante la interacción con microorganismos. Se muestran los SWEET de algunas especies de plantas donde se ha observado un cambio en la expresión de transcritos. Las localizaciones subcelulares marcadas con un asterisco (*) se refieren a las observadas en las del ortólogo de *Arabidopsis*, revisadas por Feng y Frommer (2015). MP, Membrana plasmática.

SWEET	Planta	Microorganismo	Localización Subcelular	Sustrato	Referencia
1	<i>M. truncatula</i>	<i>R. irregularis</i>	MP*	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
2	<i>A. thaliana</i>	<i>P. irregulare</i>	Vacuola	Glu	Chen <i>et al.</i> , 2015a
	<i>S. tuberosum</i>	<i>R. irregularis</i>	Vacuola*	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
3	<i>L. japonicus</i>	<i>M. loti</i> <i>R. irregularis</i>	MP	Sac	Sugiyama <i>et al.</i> , 2016
	<i>O. sativa</i>	<i>R. irregularis</i>	MP*	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
4	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> <i>B. cinerea</i>	MP*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
	<i>V. vinifera</i>	<i>B. cinerea</i> <i>P. infestans</i>	MP	Glu	Chong <i>et al.</i> , 2014
5	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i>	Golgi*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
6	<i>M. truncatula</i>	<i>R. irregularis</i>	-	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
7	<i>S. tuberosum</i>	<i>R. irregularis</i>	-	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
8	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i>	MP*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
9	<i>M. truncatula</i>	<i>R. irregularis</i>	Golgi*	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
10	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i>	-	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
	<i>M. esculenta</i>	<i>X. axonopodis</i>	-	Glu y Sac	Cohn <i>et al.</i> , 2014
	<i>G. hirsutum</i>	<i>X. citri</i>	-	-	Cox <i>et al.</i> , 2017
	<i>I. batatas</i>	<i>F. Oxysporum</i>	MP	Sac	Li <i>et al.</i> , 2017b
11	<i>A. thaliana</i>	<i>G. chiconacearum</i>	MP*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
	<i>O. sativa</i>	<i>X. oryzae</i>	MP*	-	Yang <i>et al.</i> , 2006
12	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> <i>G. chiconacearum</i>	MP*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010 Chen, 2014
	<i>O. sativa</i>	<i>X. oryzae</i>	MP*	-	Manck-Götzenberg y Requena, 2016
	<i>S. tuberosum</i>	<i>R. irregularis</i>	MP*	-	
13	<i>O. sativa</i>	<i>X. oryzae</i>	-	-	Streubel <i>et al.</i> , 2013
14	<i>O. sativa</i>	<i>X. oryzae</i>	-	-	Streubel <i>et al.</i> , 2013
15	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i>	MP*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
17	<i>A. thaliana</i>	<i>B. cinerea</i>	Vacuola*	-	Chen <i>et al.</i> , 2010

2. JUSTIFICACIÓN

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado el efecto de la infección del maíz con el hongo *Trichoderma asperellum*, el cual promueve el crecimiento de una amplia variedad de plantas, mejora la absorción de nutrientes y la respuesta ante estrés abiótico y biótico, aumentando la resistencia contra enfermedades e infecciones posteriores (Brotman *et al.*, 2009; Schuster y Schmoll, 2010). El tratamiento de las semillas de maíz con *T. asperellum* (bioprimer) modifica el crecimiento de la raíz, ya que aumenta la cantidad y longitud de los pelos radiculares, además mejora el desarrollo de la parte aérea (Figura 4) (Guzmán-Chávez, 2013; López-Coria *et al.*, 2016; Méndez-Ramírez, 2018). La mejoría en el crecimiento de la planta podría deberse a un cambio en la distribución de los azúcares, por lo que se determinó el efecto de la infección del maíz sobre los transportadores SWEET tanto en la parte aérea como en las raíces.

Se observó la inducción de la expresión del *ZmSWEET13a* en la parte aérea de las plántulas de maíz de 7 días en presencia de *T. asperellum*, mientras que la co-infección con el patógeno *F. verticillioides*, provoca una inducción adicional y transitoria del *SWEET* a los dos días post-infiltración (Carvente-García, 2014). *ZmSWEET13a* es un transportador que se localiza en las membranas plasmáticas y transporta Sac (Bezruczyk *et al.*, 2018). Por otro lado, en las raíces se modificó la expresión de los transcritos *ZmSWEET2*, *-3b*, *-12a* y *-14b* (Figura 5) (Palacios-Vargas, 2017).

ZmSWEET3b es uno de los SWEETs que más cambian su expresión en raíces embrionarias y post-embrionarias en presencia de *T. asperellum*, por lo que en este trabajo se buscó conocer la localización subcelular del transportador y su especificidad por azúcares, lo que podría relacionarlo con la respuesta a la infección por parte de la planta (Chen *et al.*, 2010; Palacios-Vargas, 2017).

En la literatura solo se han caracterizado dos ortólogos del *ZmSWEET3b* pertenecientes al clado I, *AtSWEET1*, *AtSWEET2* y *LjSWEET3b*, todos de plantas con metabolismo C3 y dicotiledóneas, mientras que el maíz tiene un

metabolismo C4 y es monocotiledónea. AtSWEET1 se localiza en la membrana plasmática, mientras que AtSWEET2 se localiza en la vacuola, ambos transportan Glu (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015^a). LjSWEET3 se localiza en membrana plasmática y transporta Sac (Sugiyama *et al.*, 2016). Ya que no existe una referencia clara para su localización o especificidad de transporte, se propuso en este proyecto la caracterización de ZmSWEET3 para determinar su papel en la respuesta a la infección por *T. asperellum*.

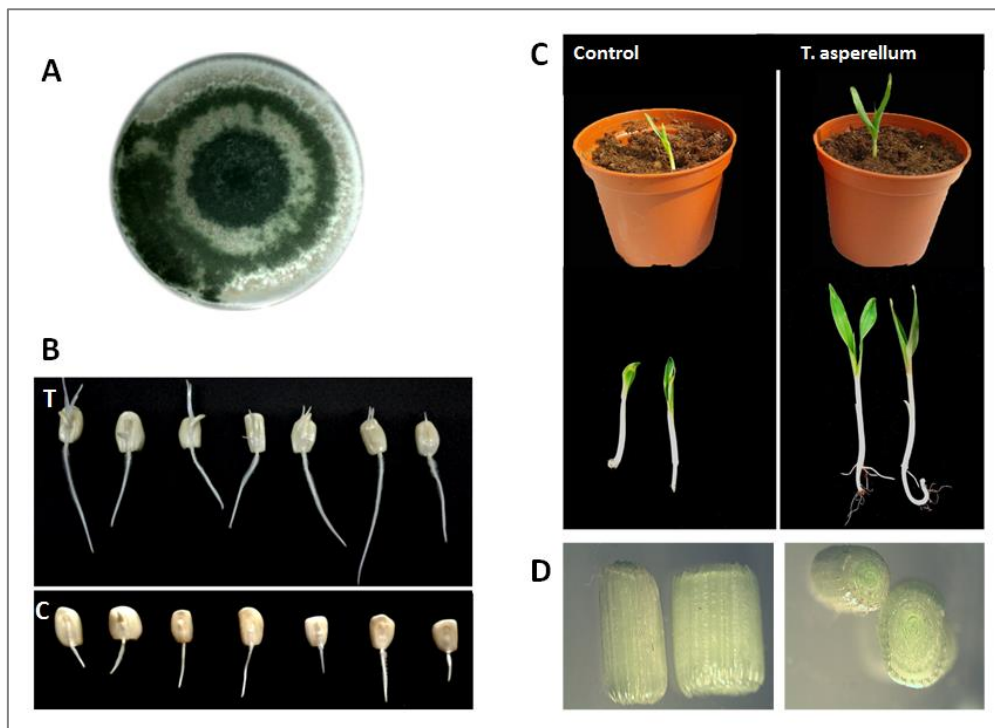


Figura 4. Efecto del hongo *T. asperellum* en el crecimiento de plantas de maíz. (A) Crecimiento macroscópico de *T. asperellum* por 14 días en medio papa dextrosa agar. (B) Plantas de maíz con 48 h de crecimiento, las semillas con el tratamiento de bioprimer (T) fueron remojadas y agitadas con 6000 conidios de *T. asperellum*/semilla/mL de agua por 1.5 h previo a ser germinadas en agar en oscuridad. Las semillas control (marcadas con C) fueron remojadas el mismo tiempo pero sin hongo. (C) Las plantas de 72 h fueron posteriormente trasplantadas a sustrato Sunshine y crecidas por 7 días más. (D) Se muestran fragmentos de los tallos de las plantas en C para observar las diferencias en el grosor. Tomado de Arciniega-Ruiz, 2012. (A) Tomado de Arciniega-Ruiz, 2012. (B) tomado de Palacios-Vargas, 2017. (C y D) proporcionados por el Dr. Guzmán-Chavez, Fernando.

Considerando que *T. virens* induce en la raíz la expresión de un transportador de Sac cuando se encuentra interactuando con la planta de maíz (Vargas *et al.*, 2011) y que la ausencia de Sac evita el establecimiento del hongo en la planta (Vargas *et al.*, 2009), se propone que ZmSWEET3b es un transportador de Sac, localizado en la membrana plasmática de las raíces del maíz. Con ello, la Sac exportada al apoplasto y transportada al hongo permite su nutrición, puesto que también se induce una invertasa intracelular en el hongo (Vargas *et al.*, 2019).

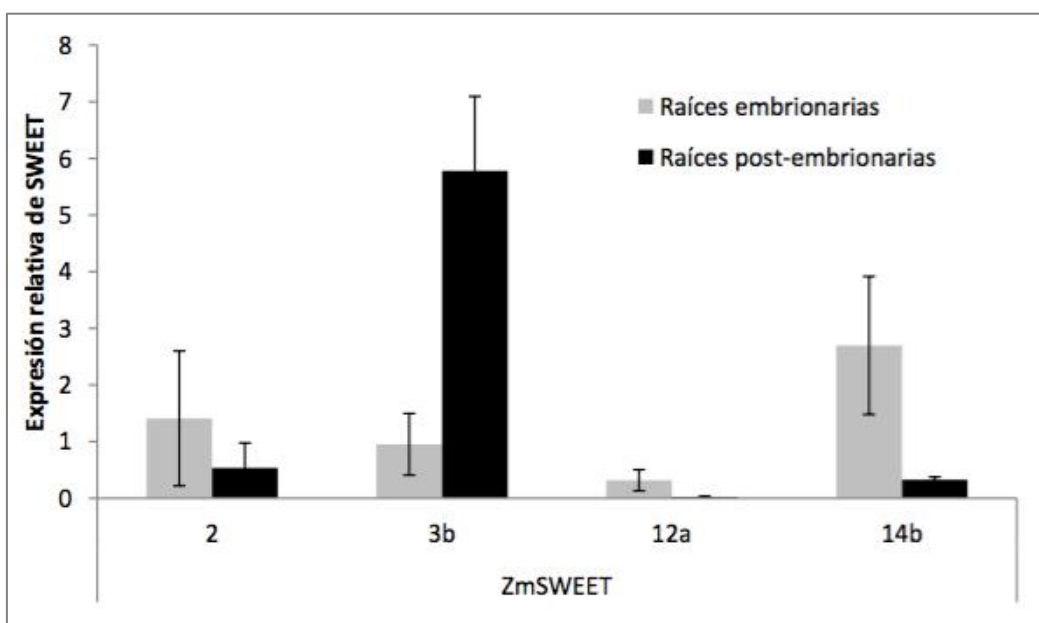


Figura 5. Efecto del biopriming con *T. asperellum* en la expresión de los SWEETs de raíces de maíz. La cuantificación de la expresión se realizó mediante qPCR en raíces de plantas de 72 h de germinación denominadas embrionarias, también se midieron en raíces de plantas de 30 días de crecimiento en condiciones hidropónicas, y estas raíces se denominaron post-embrionarias. Ambas expresiones fueron normalizadas a cero. Tomado de Palacios-Vargas, 2017.

3. HIPÓTESIS.

El transportador SWEET3b de las raíces de maíz transporta sacarosa y está en la membrana plasmática.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general

Determinar la localización subcelular y la especificidad de transporte del ZmSWEET3b.

4.2. Objetivos particulares

- 1.- Clonar a ZmSWEET3b a partir de raíces de maíz en diferentes vectores para realizar los ensayos funcionales.
- 2.- Determinar la localización celular de la quimera ZmSWEET3b-GFP mediante microscopía confocal en *S. cerevisiae*.
- 3.- Determinar la especificidad por azúcares del ZmSWEET3b mediante ensayos de complementación en *S. cerevisiae*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para cumplir con el objetivo del trabajo, se siguió el esquema experimental de la Figura 6. Para ello se planteó la obtención de la clona ZmSWEET3b, así como la de ATSWEET2 un control conocido que se localiza en la vacuola y es un transportador de glucosa (Chen *et al.*, 2015a). Ambas clonas se subclonaron en un vector con GFP para su expresión en levadura, para determinar su localización y otro vector para determinar la especificidad por azúcares. También se utilizaron como control en las clonas pDRF-1-AtSWEET1 y pDRF-1-AtSWEET12, previamente obtenidas por Hernández-Chávez y López-Coria (Datos no publicados), ya que son transportadores de membrana plasmática que transportan hexosas y Sac, respectivamente (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012).



Figura 6. Esquema de trabajo diseñado para la caracterización funcional de ZmSWEET3b.

ZmSWEET3b es el SWEET de maíz objeto de este trabajo. El AtSWEET2 se usó como control debido a que ya están caracterizadas su localización vacuolar y especificidad por Glu (Chen *et al.*, 2015a), así como el AtSWEET1, que podría localizarse en la membrana plasmática y que transporta Glu (Chen *et al.*, 2010).

5.1. Análisis *in silico* de las secuencias de los marcos de lectura abierta de SWEETs del clado I.

a- Obtención de las secuencias de los ORF: Los marcos de lectura abierto (ORF) de cada *SWEET* fueron obtenidos a partir de las secuencias reportadas en las bases de datos EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index.html>; Kersey *et al.*, 2018) y del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para el *SWEET2* de *Arabidopsis* (AtSWEET2; AT3G14770) y el *SWEET3b* del maíz (ZmSWEET3b; XM_008675300.3), respectivamente.

b- Diseño de oligonucleótidos: Se utilizaron las plataformas Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) para obtener los oligonucleótidos para la amplificación específica de toda la región codificante de los transportadores AtSWEET2 y ZmSWEET3b (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para las reacciones de amplificación por PCR de los SWEETs de interés. La última columna se refiere al tamaño del fragmento esperado en la amplificación.

Nombre	Dirección	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
ZmSWEET3b	Sentido	CATCGATCTATCGACACATTTCT	1125
	Antisentido	TGAAGTATAGAGTGACTTCATAA	
AtSWEET2	Sentido	ATGGATGTTTTTGCTTTCAATG	708
	Antisentido	GCGAACCTCACACGTAAGAA	

c- Análisis de las secuencias: Además de las secuencias del AtSWEET2 y ZmSWEET3b, se obtuvieron las de los ORFs del AtSWEET1 (AT1G21460), AtSWEET3 (AT5G53190), AtSWEET13 (AT5G50800) y OsSWEET2b (Os01g0700100) de EnsemblPlants, así como la del SWEET3 de *Lotus japonicus* (LjSWEET3; chr1.CM2121.80.r2.a), obtenida en la base de datos

Miyakogusa.jp 3.0 (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>; Sato *et al.*, 2008). Las secuencias SWEET fueron alineadas utilizando MUSCLE en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y se obtuvo la matriz de identidad de las estas en BioEdit (Hall, 1999). También se utilizó la herramienta WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>; Horton *et al.*, 2007) para la predicción de la localización subcelular.

5.2. Obtención de RNA a partir de raíces de maíz.

a- Obtención de las raíces de maíz: Se seleccionaron 25 semillas de maíz Chalqueño (*Zea mays* cv. Chalqueño), a las cuales se les cortó el pedicelo y fueron lavadas con 200 mL de una solución de NaClO al 0.12 % por 2 min. Después se enjuagaron con 200 mL de agua estéril hasta que el olor a NaClO desapareciera (3-4 veces). Las semillas desinfectadas se colocaron en cajas de plástico de 30 x 30 cm con agar al 1 %, y se incubaron en oscuridad durante 72 h a 29 °C. Las raíces de las plántulas de 72 h fueron cortadas con hoja estéril de bisturí, congeladas con nitrógeno líquido y molidas en morteros estériles libres de nucleasas (Anexo 1) hasta obtener un polvo fino, el cual fue almacenado a -70 °C.

b- Extracción de RNA mediante la técnica del TRIzol: Utilizando material desechable estéril (Anexo 1), se tomaron 100 mg del polvo de las raíces molidas utilizando una espátula metálica estéril enfriada con nitrógeno líquido. Se colocaron en un tubo de microfuga estéril de 1.5 mL, se le agregó 1 mL del reactivo TRIzol (Invitrogen) que fue mezclado en vortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries) hasta que se resuspendió. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, para después añadir 200 µL de cloroformo y ser agitado manualmente durante 15 s. Se incubó nuevamente por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 min a 13000 x g a 4 °C en una centrífuga Universal 320 de la marca Hettich. La fase acuosa fue separada de la orgánica, transfiriéndola a un nuevo tubo de microfuga de 1.5 mL evitando la interfase. Al tubo con la fase acuosa le fue añadido 0.5 mL de isopropanol y fue mezclado 5 veces por inversión para precipitar el RNA. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 13000 x g a 4 °C. El

RNA formó un botón blanco o transparente en el fondo del tubo y se mantuvo adherido a él, por lo que el sobrenadante fue descartado y posteriormente fue lavado añadiendo 1 mL de etanol al 70 %, mezclado en vortex por 15 s y se centrifugó durante 15 min a 13000 x g a 4 °C, repitiendo el lavado dos veces más. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el botón durante 5 min, para después resuspenderlo en 50 µL de agua libre de nucleasas tratada con DEPC (Anexo 1) y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

c- Cuantificación y análisis de la integridad del RNA: El RNA fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se calculó el volumen necesario para tener 1 µg de RNA. A este volumen se le añadieron 2 µL de amortiguador de carga DNA Loading Dye 6X, (Thermo Scientific) y lo necesario para completar un volumen de 10 µL con agua DEPC. La mezcla fue resuelta en un gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio (0.425 g de agarosa en 34.1 mL de agua DEPC, se calentó en microondas a intensidad media por 20 s y una vez tibio, se le adicionaron 700 µL de TAE 50X, Trizma base, ácido acético, EDTA, y 35 µL bromuro de Etidio 0.5 mg/mL) en una cámara de electroforesis (BioRad), aplicando 70 mV durante 40 min con una fuente de poder Hoefer EPS 2A200, usando como amortiguador de corrida TAE 1X. El RNA se visualizó en un transiluminador WiseUV WUV-L50 (PMI-Labortechnik) y posteriormente fue digitalizado en el Chemidoc MP (Bio Rad).

d- Obtención de cDNA por RT-PCR: En un tubo de microfuga de 0.6 mL se colocó 1 µg del RNA de las raíces de maíz o bien el RNA obtenido de hojas de plantas de *Arabidopsis*, que fue extraído por Esparza-Reynoso (datos no publicados), al que se le añadieron 1 µL de Oligo DT (20 mM) y el volumen necesario de agua DEPC para completar 10 µL. La mezcla fue incubada a 70 °C durante 5 min y después se colocó en hielo durante 5 min. Luego se le añadieron 4 µL de amortiguador ImProm II, 2.4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de enzima RT (Promega) y 1 µL de dNTPs 10 mM (Thermo Fisher). La mezcla fue introducida a un termociclador MaxiGene II (Axygen), bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 h y finalmente 70 °C por 15 min. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

e- Amplificación de genes por PCR: Para la amplificación de los SWEETs, se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 2, así como el cDNA de cada planta correspondiente al AtSWEET2 y al ZmSWEET3b. Se utilizó en ambos casos a la polimerasa HD Advantage (Clontech) y la mezcla de reacción que se describe en la Tabla 3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C por 2 min, 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 60 °C por 5 s y 72 °C por 2 min, y por último una extensión final a 72 °C por 10 min.

f- Electroforesis en gel de agarosa: Se añadieron 4 µL de DNA Loading Dye 6x (Thermo Fisher) a los productos de PCR y fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.7 % con bromuro de etidio, de igual forma que la descrita en el apartado 5.2.c, solo que utilizando un gel de agarosa al 0.7 % que fue resuelto a 90 V durante 40 min.

g- Purificación de fragmentos de DNA: Los amplicones se extrajeron con el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery de Zymo Research de acuerdo a las instrucciones del fabricante, la metodología se resume en el Anexo 2. Posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 3. Componentes añadidos a la mezcla de reacción de PCR punto final para clonación. Mezcla de reacción utilizada en todas las amplificaciones para la clonación de los ORF de SWEETs.

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador HD Advantage 5X	5.00
Polimerasa HD Advantage	0.25
cDNA (o templado)	2.00
Oligo Forward (10 µM)	1.00
Oligo Reverse (10 µM)	1.00
dNTPs (2.5 mM)	2.00
Agua DEPC	14.75

5.3. Clonación de los ORFs SWEET.

a- Reacción de adenilación del producto de PCR: Se tomaron 50 ng de los amplicones purificados de cada SWEET en tubos de microfuga de 0.5 mL, se les agregó 1 µL de amortiguador Taq+KCl 10X, 1 µL de Taq DNApol (5 U/µL), 0.4 µL de dATP 0.2 mM, 0.6 µL de MgCl₂ 1.5 mM (Thermo Fisher), y 7 µL agua DEPC. La mezcla se incubó a 70 °C durante 30 min. Finalmente, se almacenó a -20 °C hasta su uso, por no más de una semana.

b- Reacción de Ligación al vector pGEM T-Easy: Se tomaron 2 µL de los amplicones adenilados en tubos de microfuga de 0.5 mL, se les agregó 5 µL de Rapid Ligation amortiguador 2X, 1 µL (50 ng) de plásmido pGEM T-Easy, 1 µL de T4 DNA ligasa (3 U/µL) (Promega), y 5.5 µL agua DEPC. La mezcla fue agitada e incubada a 4 °C durante 14 h. Se almacenó a -20 °C hasta su uso, por no más de una semana.

c- Transformación de *E. coli* DH5α con el vector pGEM T-Easy ZmSWEET3b o AtSWEET2: Se utilizaron células Ca²⁺-competentes de *E. coli* DH5α y la transformación se llevó a cabo por choque térmico; ambas metodologías se describen a continuación:

c.1- Obtención de células competentes: Se inocularon 100 µL de un stock de *E. coli* DH5α en 5 mL de medio LB en un tubo de 16 x 150 mm. Se incubó a 37 °C durante toda la noche. De ese cultivo se tomó 1 mL y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio LB. Se incubó a 37 °C bajo agitación (200 RPM) durante 2 h 30 min. El cultivo se repartió en 4 tubos Falcon de 50 mL que se mantuvieron en hielo 10 min. Se centrifugaron a 3000 RPM a 4 °C por 7 min. Se descartó el sobrenadante en cada tubo y se resuspendieron los botones formados al fondo en 10 mL de CaCl₂ (60 mM) frío. Se juntaron todos los botones resuspendidos en un solo tubo Falcon y se dejaron reposar en hielo durante 30 min. Al finalizar, se centrifugó a 3000 RPM a 4 °C por 7 min, y se resuspendió en 2.5 mL de CaCl₂ (60 mM) frío. Se repartieron alícuotas de 100 µL en tubos de microfuga de 1.5 mL, para después congelarlas con nitrógeno líquido y almacenarlas a -70 °C.

c.2- Transformación: Se prepararon cajas de LB agar/0.1 mg/mL ampicilina, utilizando 35 mL de medio LB, 0.525 g de agar, 56 µL de X-Gal y 35 µL de ampicilina 100 mg/mL por caja. Las reacciones de ligación fueron centrifugadas y se tomaron 5 µL del fondo de los tubos, y se transfirieron cuidadosamente a uno de los tubos con células competentes (las que se debieron dejar en hielo hasta que se descongelaran, 5-10 min), se mezclaron suavemente los componentes del tubo y se incubó a 4 °C durante 30 min. Al finalizar, se aplicó choque térmico, colocando el tubo en un baño a 42 °C durante 45 s, e inmediatamente después fue colocado en hielo durante 2 min. Se agregaron 950 µL de medio SOC y se incubó a 37 °C con agitación (150 RPM) por 1.5 h. Al finalizar, se centrifugó a 13000 rpm por 1 min, y el botón formado al fondo se resuspendió con 100 µL del medio sobrenadante. Se sembraron 100 µL en las cajas preparadas previamente y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al finalizar, se seleccionaron dos de las colonias de color blanco y se incubaron en tubos de 16 x 150 mm con 6 mL de medio LB/0.1 mg/mL ampicilina a 37 °C por 14 h.

d- Purificación del plásmido con el inserto: Fue llevada a cabo con el Kit Zyppy Plasmid Miniprep de Zymo Research de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el protocolo seguido se encuentra en el Anexo 3. Posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

e- Envío a secuenciación y ensayo de restricción: Se enviaron 500 ng de cada plásmido en un volumen de 15 µL a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para ser secuenciados por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos, utilizando los oligonucleótidos T7 sentido (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y m13/ pUC antisentido (5'-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3'). Los resultados de las secuenciaciones fueron analizadas con SnapGene 1.1.3 (GSL Biotech), CLC Sequence Viewer 8 (QIAGEN) y la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineaciones Locales (BLAST) del NCBI. Para el ensayo de restricción del ZmSWEET3b se utilizaron 500 ng de plásmido purificado, 1 µL de la enzima de

restricción Sac1 Fast Digest y 2 μ L del amortiguador Fast Digest (Thermo Fisher), y lo necesario para 20 μ L de reacción con agua libre de nucleasas. Para el ensayo con el AtSWEET2, se utilizaron 500 ng de plásmido purificado, 1 μ L de la enzima de restricción NotI fast Digest y 2 μ L del amortiguador Fast Digest (Thermo Fisher), y lo que bastara para 20 μ L de reacción con agua libre de nucleasas. Ambas mezclas de reacción fueron incubadas a 37 °C durante 15 min, y después inactivadas a 65 °C por 5 s. Los plásmidos digeridos fueron resueltos en un gel de agarosa 0.7 % con bromuro de etidio como fue descrito en el apartado 5.1.d y fue digitalizado en el Chemidoc MP (Bio Rad).

5.4. Subclonación de los ORFs de los SWEETs por recombinación (Gateway).

La subclonación de ZmSWEET3b y AtSWEET2 se realizó para que cada uno de estos genes quedara insertado en el vector apropiado para su expresión en levaduras. El proceso consistió en la amplificación del gen de interés, utilizando como templado las construcciones pGEM T-Easy-SWEET, seguido por la recombinación del ORF al vector donador pDONR221 y finalmente la rebinación con los vectores de expresión en levaduras.

a- Primera ronda de PCR: Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las regiones codificantes de cada SWEET (Tabla 4), añadiendo la secuencia Shine-Dalgarno (GAA GGA GAT) que es el sitio de unión a los ribosomas procariotas, la secuencia Kozak (A AAC) que tiene la misma función en eucariotas, el codón de inicio ATG, así como una parte de la secuencia *attB* necesaria para la recombinación (Reece-Hoyes y Walhout, 2018). Para la amplificación se utilizaron como templados las construcciones pGEM T-Easy-ZmSWEET3b y pGEM T-Easy-AtSWEET2, utilizando la polimerasa HD Advantage (Clontech) y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C por 2 min, 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 60 °C por 5 s y 72 °C por 2 min, y por último una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.7 % con bromuro de etidio y los

fragmentos fueron extraídos con el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery de Zymo Research, como está descrito en el apartado 5.2.g.

b- Segunda ronda de PCR, con los oligonucleótidos attB: Se utilizaron los fragmentos obtenidos de la amplificación anterior y los oligonucleótidos attB de la Tabla 4, para obtener las regiones codificantes de cada SWEET, las regiones mencionadas en el paso anterior, pero ahora con la adición de las regiones attB completas. Se utilizó la polimerasa HD Advantage (Clontech) y la mezcla de reacción descrita en la Tabla 3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C por 2 min, 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 55 °C por 5 s y 72 °C por 2 min, y por último una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.7 % con bromuro de etidio y los fragmentos fueron extraídos con el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery de Zymo Research al igual que en el paso anterior.

Tabla 4. Oligonucleótidos para subclonar los ORFs de ambos SWEETs del pGEM T-Easy al vector pDONR-221. Se muestra el par de oligonucleótidos utilizado para flanquear ambos insertos con las secuencias attB. En negritas se muestra parte de la secuencia attB, azul la secuencia Shine-Dalgarno y rojo la secuencia Kozak.

Primera Ronda			
Producto	Dirección	Secuencia sola	Secuencia completa
ZmSWEET3b	Sentido	ATGGTTCCAGATAC AGTTCGTG	AAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGA AACC ATGGTTCCAGATACAGTTCGTG
	Antisentido	TTTATATTCCGACA CTCTGGCG	AGAAAGCTGGGTG TTTATA TTCCGACACTCTGGCG
AtSWEET2	Sentido	ATGGATGTTTTTGC TTTCAATG	AAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGA AACC ATGGATGTTTTTGCTTTCAATG
	Antisentido	CACGTAAGAAACAA TCAAAGG	AGAAAGCTGGGTG CACGTA AGAAACAATCAAAGG
Segunda Ronda			
attB	Sentido	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAACGAGGCTTC	
	Antisentido	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	

c- Introducción al vector pDONR-221 (Reacción BP): En tubos de microfuga de 0.5 mL, se tomaron 1.5 µL de los fragmentos flanqueados por las regiones attB, 300 ng del vector pDONR-221, 5 µL de amortiguador TE y 2 µL de Clonasa BP (Thermo Fisher). Fueron incubados a 25 °C durante 1 h. Al finalizar, se agregó 1 µL de Proteinasa K y se incubaron a 37 °C por 10 min para detener la reacción.

d- Transformación de *E. coli* DH5α: Se realizó de la misma manera y bajo las mismas condiciones que al transformarlas con el vector pGEM T-Easy en el apartado 5.3.c.2, con la única diferencia de que las bacterias transformantes fueron sembradas en LB/0.1 mg/mL kanamicina, tanto en medio sólido como líquido.

e- Purificación, secuenciación y ensayo de restricción: La purificación y la secuenciación se llevó a cabo de la misma forma que en el apartado 5.3. Para el ensayo de restricción se utilizaron 500 ng de plásmido purificado, a los que se añadieron 1 µL de la enzima de restricción Mlu1 Fast Digest y 2 µL del amortiguador Fast Digest (Thermo Fisher), y lo necesario para 20 µL de reacción con agua libre de nucleasas; después se incubó a 37 °C durante 5 min y la reacción fue inactivada a 65 °C por 5 s. El plásmido digerido se separó en un gel de agarosa 0.7 % con bromuro de etidio como en el apartado 5.2.d y fue digitalizado en el Chemidoc MP (Bio Rad).

5.5. Expresión heteróloga del ZmSWEET3b.

Para conocer la localización subcelular y la especificidad por azúcares del ZmSWEET3b, se llevó a cabo la recombinación de los vectores pDONR221-SWEET con vectores para expresión en levadura: a) el vector pDRF1-Gw, para realizar los ensayos de complementación, ya que permite la expresión constitutiva y sin tags del gen, para determinar la especificidad por azúcares del transportador; b) el vector pAG426GPD-ccdB-EGFP (que fue llamado p14204-eGFP para facilitar su identificación) que permite la expresión del gen

que codifica al SWEET fusionado a la proteína GFP en el C-terminal, lo que permite localizar a la proteína en la célula utilizando un microscopio confocal; y c) en donde a partir del vector pDRF1-Gw-ZmSWEET3 se generó una construcción junto con la SuSy de la papa, para favorecer la hidrólisis de la Sac y que la levadura pudiera desarrollarse en un medio con Sac como única fuente de carbono.

a- Introducción a los vectores pDRF1-GW y p14204-eGFP (Reacción LR): En tubos de microfuga de 0.5 mL, se tomaron 0.3 µL de cada SWEET en el vector pDONR-221, 0.5 µL del vector de expresión, 6.2 µL de amortiguador TE, 2 µL de amortiguador LR Clonasa 5X y 1 µL de Clonasa LR (Thermo Fisher). Fueron incubados a 25 °C durante 14 h. Al finalizar, se agregó 1 µL de Proteinasa K y se incubaron a 37 °C por 10 min para detener la reacción. Se almacenaron a -20 °C hasta su uso. En el anexo 4 se encuentran los diagramas que representan gráficamente a cada vector.

b- Transformación de *E. coli* DH5α: Se realizó de la misma manera y bajo las mismas condiciones que al transformarlas con el vector pGEM T-Easy en el apartado 5.3.c.2 para todos los plásmidos.

c- Purificación: La purificación se llevó a cabo de la misma forma que en el apartado 5.3.d.

d- Transformación de las cepas EBY.VW4000, SEY6210 y W303:

Se utilizaron levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* para la caracterización del ZmSWEET3b, siendo las cepas EBY.VW4000 (*MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^cSUC2 hxt17Δ hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP gal2Δ snf3Δ::loxP stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP ydl247wΔ::loxP yjr160cΔ::loxP*), SEY6210 (*MATα leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL*) y W303 (*MATα can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3 trp1-1 ura3-1*). Las primeras dos para conocer la especificidad por azúcares y la última para conocer la localización subcelular de la proteína.

Las cepas fueron inoculadas en 5.0 mL de medio líquido, YPM (0.66 g de Proteosa-Peptona, 0.33 g de Extracto de Levadura, 3 mL de maltosa [Mal] 20 % estéril) para la cepa EBY.VW4000, y YPD (0.66 g de Proteosa-Peptona, 0.33 g de Extracto de Levadura, 3 mL de Glu 20 % estéril) para las cepas SEY6210 y W303. Los cultivos fueron incubados toda la noche a 30°C en agitación (200 RPM). Después se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro Beckman DU-530 UV-Vis, considerando una suspensión de 1×10^6 células/mL da una absorbancia de 0.1 a 600 nm. Se añadieron 2.5×10^8 células de cada cepa a 50 mL de su medio respectivo, precalentado en un matraz Erlenmeyer, donde el título fue de 5×10^6 células/mL. Se incubaron bajo las mismas condiciones durante 4-5 h más hasta obtener un título de al menos 2×10^7 células/mL. Se colectaron las células de cada cepa por centrifugación a 3000 x g durante 5 min, los botones fueron lavados dos veces con 25 mL de agua estéril, y después resuspendidos con 1.0 mL de agua estéril. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos de centrifuga de 1.5 mL y fueron centrifugados a 3000 x g por 30 s; el sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron nuevamente en 1.0 mL de agua estéril.

Tabla 5. Componentes del T-mix para la transformación de levaduras. El ssDNA acarreador fue previamente desnaturalizado, incubándolo 10 min en agua hirviendo. El DNA plasmídico se refiere al vector de expresión disuelto en agua libre de nucleasas.

Reactivo	Volumen para 360 mL (μL)
PEG 3500 (50%)	240
CH ₃ COOLi (1 M)	36
ssDNA acarreador (2 mg/mL)	50
DNA plasmídico (750 ng)	34

Para la transformación, se añadieron 360 μL de T-mix (Tabla 5) a 100 μL de la suspensión anterior. La mezcla se incubó en un baño de agua a 42 °C durante 40 min. Después se centrifugó a 3000 x g durante 30 s, cada botón se resuspendió en 1 mL de agua estéril con ayuda de un vortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Se sembraron 100 μL de cada mezcla en el medio de

selección, SMal ura⁻ (0.036 g de medio sintético Drop-out sin uracilo, 0.201 g de Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos, 0.66 g de agar, 3 mL de Mal 20 % estéril y 30 mL de agua desionizada) para la cepa EBY.VW4000 y SDura⁻ (0.036 g de medio sintético Drop-out sin uracilo, 0.201 g de Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos, 0.66 g de agar, 3 mL de Glu 20 % estéril y 30 mL de agua desionizada) para las cepas SEY6210 y W303. Finalmente los cultivos fueron incubados a 30 °C de 3 a 5 días. Las células de las mutantes se obtuvieron inoculando en un tubo de 13 x 100 mm con 3 mL de medio líquido selectivo (0.036 g de medio sintético Drop-out sin uracilo, 0.201 g de Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos, 3 mL de Glu o Mal 20 % estéril y 30 mL de agua desionizada), fueron incubadas a 30°C durante toda la noche, y al finalizar se tomaron 500 µL del cultivo en un tubo de microfuga de 1.5 mL, se añadieron 500 µL de glicerol 50 % estéril y se almacenaron a -20°C. Para utilizar las cepas, se tomaron 100 µL del cultivo y fueron sembrados en cajas Petri con el medio selectivo correspondiente e incubados a 30 °C de 3 a 5 días.

e- Determinación de la localización celular de los SWEETs en levaduras: Se inocularon tubos de 13 x 100 mm con 2 mL de medio líquido SD ura⁻ con las levaduras W303 p14204-eGFP-SWEET y fueron incubados a 30 °C durante toda la noche. Se tomaron 100 µL de cada cultivo en tubos de microfuga de 1.5 mL, se añadieron 10 µL del marcador lipofílico de membrana plasmática FM4-64 (Invitrogen) a 164 µM, y se incubaron en oscuridad por 30 min, tiempo en el cual el marcador ya se encuentra en la vacuola (Vida y Emr, 1995). Después, los tubos fueron centrifugados 1 min a 13000 x g, se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de medio líquido SD ura⁻, se centrifugó de nuevo y se descartó el sobrenadante, y finalmente se añadieron 100 µL de medio para re-suspender las levaduras. Se tomaron 5 µL de la suspensión, que fueron colocados en un portaobjetos y fueron observados a 100X en el microscopio Olympus Fluoview FV1000 de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM (eGFP: λEx = 489 nm y λEm = 508 nm; FM4-64: λEx = 558 nm y λEm = 734

nm). Las imágenes fueron analizadas en el programa ImageJ v. 1.52 y el plugin OlympusViewer v. 2.2 (Schneider *et al.*, 2012).

f- Producción del vector pDRF1-Gw-SWEET-SuSy: EL plásmido pDRF1-Gw-ZmSWEET3b fueron digeridos con la enzima de restricción BamHI, tomando 3000 ng del plásmido en tubos de microfuga de 1.5 mL, se le añadieron 2.5 µL de enzima BamHI, 2.0 µL de amortiguador BamHI 10X (Fermentas) y lo necesario para tener 20 µL de reacción con agua libre de nucleasas. Después el plásmido se incubó a 37 °C durante toda la noche y fue inactivado a 65 °C por 5 s. Lo mismo fue realizado para un cassette conteniendo al ORF del gen de la sacarosa sintasa (SuSy) de *Solanum tuberosum*, junto con un promotor y un terminador para levaduras (*GAL1* y *ADH1*, respectivamente), tomando 2000 ng del cassette y sometiendo a las condiciones mencionadas para el plásmido. El plásmido digerido fue después tratado con fosfatasa, tomando 1000 ng del vector digerido, 1.0 µL de enzima Fast AP, 2.0 µL del amortiguador AP 10X (Thermo Fisher) y lo que bastara para 20 µL de reacción con agua libre de nucleasas, que después fue incubado a 37 °C por 20 min e inactivado a 75 °C por 2 min. Finalmente, el plásmido digerido y defosforilado fue ligado con el cassette SuSy digerido, en tubos de microfuga de 1.5 mL, tomando 50 ng del plásmido digerido y defosforilado, 300 ng de cassette SuSy digerido, 10 µL del Rapid Ligation Buffer 2X, 1.0 µL de T4 DNA ligasa (3 U/µL; Promega) y lo necesario para 20 µL de medio de reacción con agua libre de nucleasas. La reacción de ligación fue incubada a temperatura ambiente durante 30 min. En el anexo 4 se encuentra el diagrama que representa gráficamente a este vector.

g- Ensayos de complementación de levaduras para determinar la especificidad de los SWEETs por azúcares: Se inocularon tubos de 13 x 100 mm con 3 mL de medio líquido de selección, SMal ura⁻ para las levaduras EBY.VW4000 pDRF1-Gw-SWEET, y SD ura⁻ para las SEY6210 pDRF1-Gw-SWEET y pDRF1-Gw-SWEET-SuSy. Los tubos fueron incubados a 30 °C durante toda la noche. Después, se tomaron 500 µL de cada cultivo y fueron transferidos a tubos de las misma dimensiones con 2 mL del respectivo medio de selección,

que fueron incubados a 30 °C hasta obtener una absorbancia de 0.2 al medir a 600 nm en el espectrofotómetro (U-530 UV-Vis, Beckman).

Para los cultivos de las levaduras EBY.VW4000 pDRF1-Gw-SWEET, se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 con agua estéril. Se sembraron 5 µL del cultivo y de cada dilución en cajas Petri cuadradas con medio selectivo (0.042 g de medio sintético Drop-out sin uracilo, 0.235 g de Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos, 3.5 mL de Fru, Glu, o Mal 20 % estéril y 35 mL de agua desionizada. Para obtener la dilución de 1:10000, se colocaron 9 µL de agua destilada estéril y 1 µL de la dilución 1:1000 y se aplicaron directamente a la caja.

Para los cultivos de las levaduras SEY6210 pDRF1-Gw-SWEET y pDRF1-Gw-SWEET-SuSy, se tomaron 5 µL del cultivo y fueron estriados en cajas Petri con medio selectivo (0.036 g de medio sintético Drop-out sin uracilo, 0.201 g de Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos, 3.0 mL de Glu 20 % estéril y 30 mL de agua desionizada. Para los medios con 1 % y 0.5 % Sac, 1.5 mL y 0.75 mL de 20 % Sac estéril y 31.5 y 32.25 mL de agua estéril desionizada, respectivamente). Finalmente, las cajas Petri fueron incubadas a 30 °C durante 3 días.

6. RESULTADOS.

6.1. Análisis *in silico* de las secuencias SWEET de miembros del clado I.

La localización subcelular y la especificidad por azúcares de los transportadores SWEET que se han agrupado dentro del Clado I son variadas. Hay SWEETs de membrana plasmática (Chen *et al.*, 2010) y del tonoplasto (Chen *et al.*, 2015a), así como aquellos que transportan Sac y otros que transportan Glu (Chen *et al.*, 2010; Sugiyama *et al.*, 2016). Para determinar si existían similitudes entre los transportadores del clado I de *Arabidopsis* con el LjSWEET3 y el ZmSWEET3b que pudieran proporcionar información sobre las características funcionales o de localización de este último, se compararon las secuencias tanto a nivel de secuencia de nucleótidos (los ORFs) como de aminoácidos (Tablas 6 y 7).

A nivel de nucleótidos, la secuencia de ZmSWEET3b tiene un mayor porcentaje de identidad con la de AtSWEET3, seguido de la del LjSWEET3, y luego por la del AtSWEET1 y la del AtSWEET2 (Tabla 6). AtSWEET1 se ha localizado en membrana plasmática y AtSWEET2 en el tonoplasto, ambos llevando a cabo el transporte de Glu (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015a). Se desconoce qué transporta y dónde se localiza AtSWEET3, mientras que LjSWEET3 se encuentra en la membrana plasmática y transporta Sac (Sugiyama *et al.*, 2016).

Tabla 6. Matriz de identidad de secuencias de nucleótidos. Se muestran los porcentajes de identidad entre las secuencias de nucleótidos de cada transportador.

Secuencia	AtSWEET1	AtSWEET2	AtSWEET3	LjSWEET3	ZmSWEET3b
AtSWEET1	100.0 %	44.1 %	50.9 %	47.5 %	45.0 %
AtSWEET2		100.0 %	42.6 %	41.8 %	41.9 %
AtSWEET3			100.0 %	57.5 %	53.2 %
LjSWEET3				100.0 %	49.9 %
ZmSWEET3b					100.0 %

Las secuencias SWEET fueron alineadas utilizando MUSCLE en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y se obtuvo la matriz de identidad de estas en BioEdit (Hall, 1999). At, *Arabidopsis thaliana*. Zm, *Zea mays*. Lj, *Lotus japonicus*.

A nivel de aminoácidos, los porcentajes de identidad fueron menores (Tabla 7) que a nivel de nucleótidos (Tabla 6), aunque la similitud entre las secuencias SWEET se mantuvo, ya que ZmSWEET3b tuvo el mayor porcentaje de identidad con el ATSWEET3, seguido del LjSWEET3, luego del AtSWEET1 y finalmente con el AtSWEET2.

Tabla 7. Matriz de identidad de secuencias de aminoácidos. Se muestran los porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de cada transportador.

Secuencia	AtSWEET1	AtSWEET2	AtSWEET3	LjSWEET3	ZmSWEET3b
AtSWEET1	100.0 %	36.7 %	39.0 %	39.1 %	37.8 %
AtSWEET2		100.0 %	34.1 %	33.8 %	31.3 %
AtSWEET3			100.0 %	49.4 %	49.4 %
LjSWEET3				100.0 %	40.0 %
ZmSWEET3b					100.0 %

Las secuencias SWEET fueron alineadas utilizando MUSCLE en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y se obtuvo la matriz de identidad de estas en BioEdit (Hall, 1999).

Por otra parte, al analizar las secuencias de aminoácidos de los SWEETs con la herramienta WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007), la localización con mayor puntaje para el ZmSWEET3b fue la de membrana plasmática (Anexo 6), al igual que para los demás SWEETs analizados, a pesar de que el AtSWEET2 se ha reportado en el tonoplasto (Chen *et al.*, 2015a).

Los ortólogos SWEET del mismo clado muestran distintas localizaciones subcelulares y transportan diferentes azúcares, por lo que es necesario determinar tanto la localización como la especificidad por solutos de manera experimental.

6.2. Clonación de las secuencias ORF de ZmSWEET3b y AtSWEET2.

Para determinar la función de transporte y la localización subcelular del transportador se clonó ZmSWEET3b, así como AtSWEET2, este último para

usarlo como control, ya que su localización y especificidad han sido reportadas (Chen *et al.*, 2015a). Los controles con AtSWEET1 y AtSWEET12 fueron previamente clonados en nuestro grupo, el primero clonado por Hernández-Chávez y el segundo por López-Coria como parte de sus trabajos de tesis de licenciatura y doctorado, respectivamente (Datos no publicados).

Para clonar ZmSWEET3b se obtuvo el RNA total a partir de las raíces de plántulas de maíz Chalqueño de 72 h de crecimiento, y para el caso de AtSWEET2 se utilizó el RNA de plantas de 6 semanas de edad de *A. thaliana*, obtenido previamente en el laboratorio por Esparza-Reynoso (Datos no publicados). Ambos RNAs se encontraban íntegros al ser resueltos en gel de agarosa, ya que se observaron las dos bandas definidas de los RNA ribosomales e incluso una banda de bajo peso molecular de los RNAs de transferencia (Figura 7).

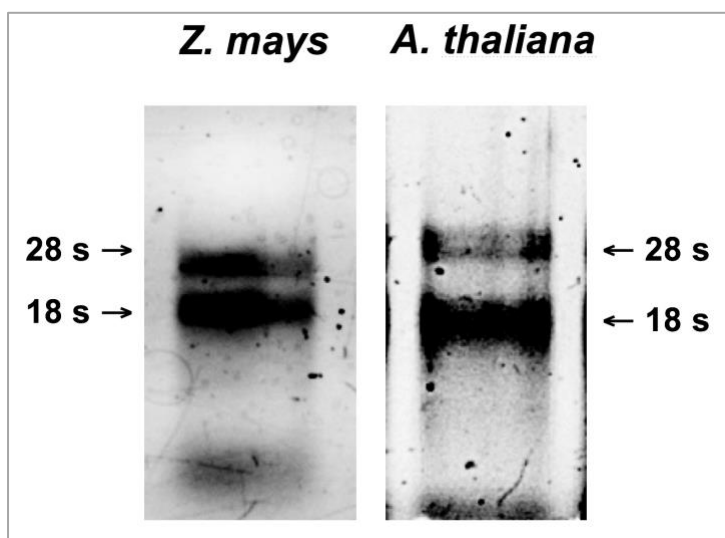


Figura 7. Electroforesis del RNA de raíces de *Zea mays* y de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los geles de agarosa al 1 % donde fueron resueltas las muestras de RNA extraídas de maíz y *Arabidopsis*, donde se observan las subunidades 28s y 18s, que mostraron estar íntegras, por lo que fueron utilizadas para la obtención de las secuencias codificantes del ZmSWEET3b y AtSWEET2.

A partir de las muestras de RNA, se obtuvo el cDNA mediante RT-PCR, y utilizando los oligonucleótidos específicos (Tabla 2), se amplificaron los ORF de los genes de cada transportador por PCR punto final, mostrando los tamaños

de banda esperados, de 1125 pb para el amplicón del ZmSWEET3b y de 708 pb para el del AtSWEET2 (Figura 8). Los amplicones fueron purificados y se les añadió una cola de adenina en el extremo 3' a cada gen, ya que a diferencia de otras polimerasas, la HD Advantage utilizada en la reacción de amplificación cuenta con actividad de exonucleasa 3'-5', realizando correcciones durante la amplificación, por lo que no genera las colas de adenina requeridas para la ligación con el vector pGEM T-Easy (3015 pb). Este cuenta con un excedente de timina en los sitios de inserción, lo que permite la ligación con los amplicones y evita la recircularización del plásmido. Los productos de la ligación fueron utilizados para transformar a la cepa de *E. coli* DH5 α , la que se utilizó para expresar cada plásmido y obtener una mayor cantidad de estos.

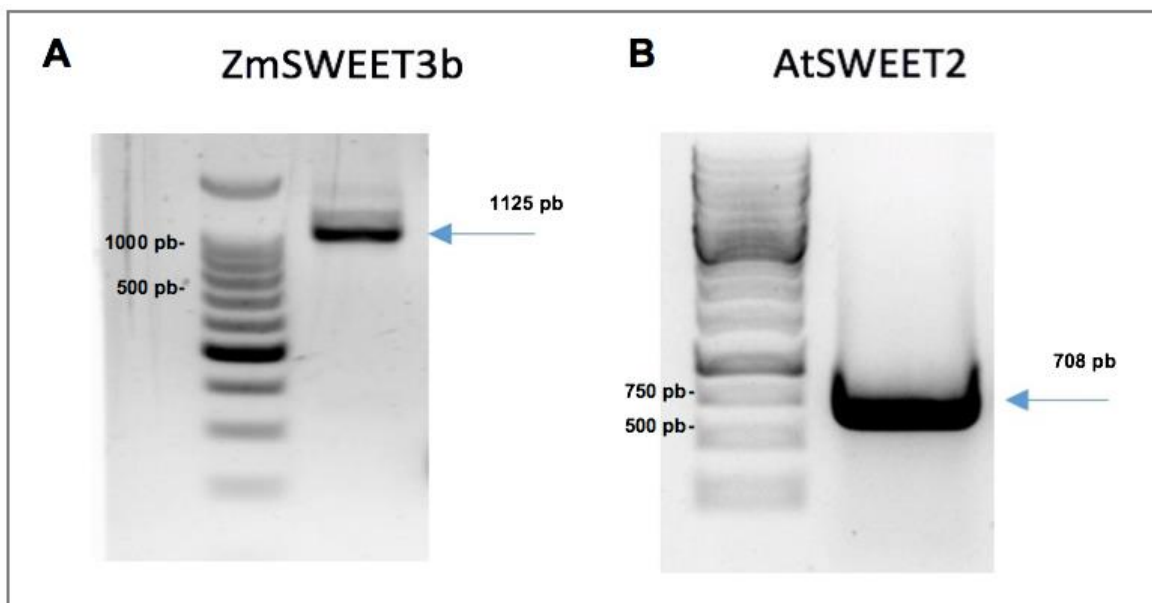


Figura 8. Electroforesis que corrobora la presencia de los fragmentos de ORF de ZmSWEET3b y AtSWEET2. Se muestran los geles de agarosa al 0.7 % donde fueron resueltos los fragmentos amplificados. En el gel (A) se observa una banda de aproximadamente 1100 pb que corresponde al ORF del gen que codifica para ZmSWEET3b, mientras que en (B) se observa una banda entre las marcas de 500 pb y 750 pb, que coinciden con los tamaños esperados para el ORF del AtSWEET2. El marcador de peso molecular en A es de 100 pb (Promega) y el de B es de 1000 pb (Thermo Scientific.).

Para corroborar la inserción de los genes, los vectores recombinantes fueron sometidos a un ensayo de corte por enzimas de restricción, en donde el vector

pGEM T-Easy-ZmSWEET3b (4062 pb) fue digerido con la enzima Sac1, que realiza dos cortes en el plásmido, mientras que el pGEM T-Easy-AtSWEET2 (3723 pb) fue digerido con NotI, que también realiza dos cortes (Figura 9). Se observaron varias bandas para el vector pGEM T-Easy-ZmSWEET3b sin digerir que podrían deberse a las diferentes conformaciones del vector en el gel es decir topoisómeros, siendo la banda de mayor peso aparente la del plásmido circular relajado, la banda en el peso esperado la conformación lineal, y la de la banda más intensa y de más bajo peso molecular la del plásmido superenrollado. Los plásmidos digeridos mostraron al vector vacío con un peso aproximado de 3200 pb y otra banda de aproximadamente 1000 pb que correspondería a ZmSWEET3b. El vector con el AtSWEET2 se observó en el peso esperado. Ambos vectores mostraron el patrón de bandas esperado tras ser digeridos y resueltos en un gel de agarosa.

Adicionalmente, se enviaron a secuenciar cada uno de los vectores con el supuesto inserto. La secuenciación mostró que ambos vectores contenían el inserto deseado. Sin embargo, al analizar la secuencia del pGEM T-Easy-ZmSWEET3b, había una porción de 24 pb de la secuencia reportada de referencia que no se encontraba en el inserto (Figura 10).

Para corroborar que el inserto en el vector estuviera íntegro, se realizó un análisis mediante PCR punto final, para ello se diseñó un oligonucleótido específico que se apareara con la región que parecía faltar, el oligonucleótido fue llamado Zm3bCheckF y se usó junto con uno de los oligonucleótidos diseñados por Palacios-Vargas (2017), llamado RZmSWEET3.1. El producto esperado era de 230 pb (Tabla 8).

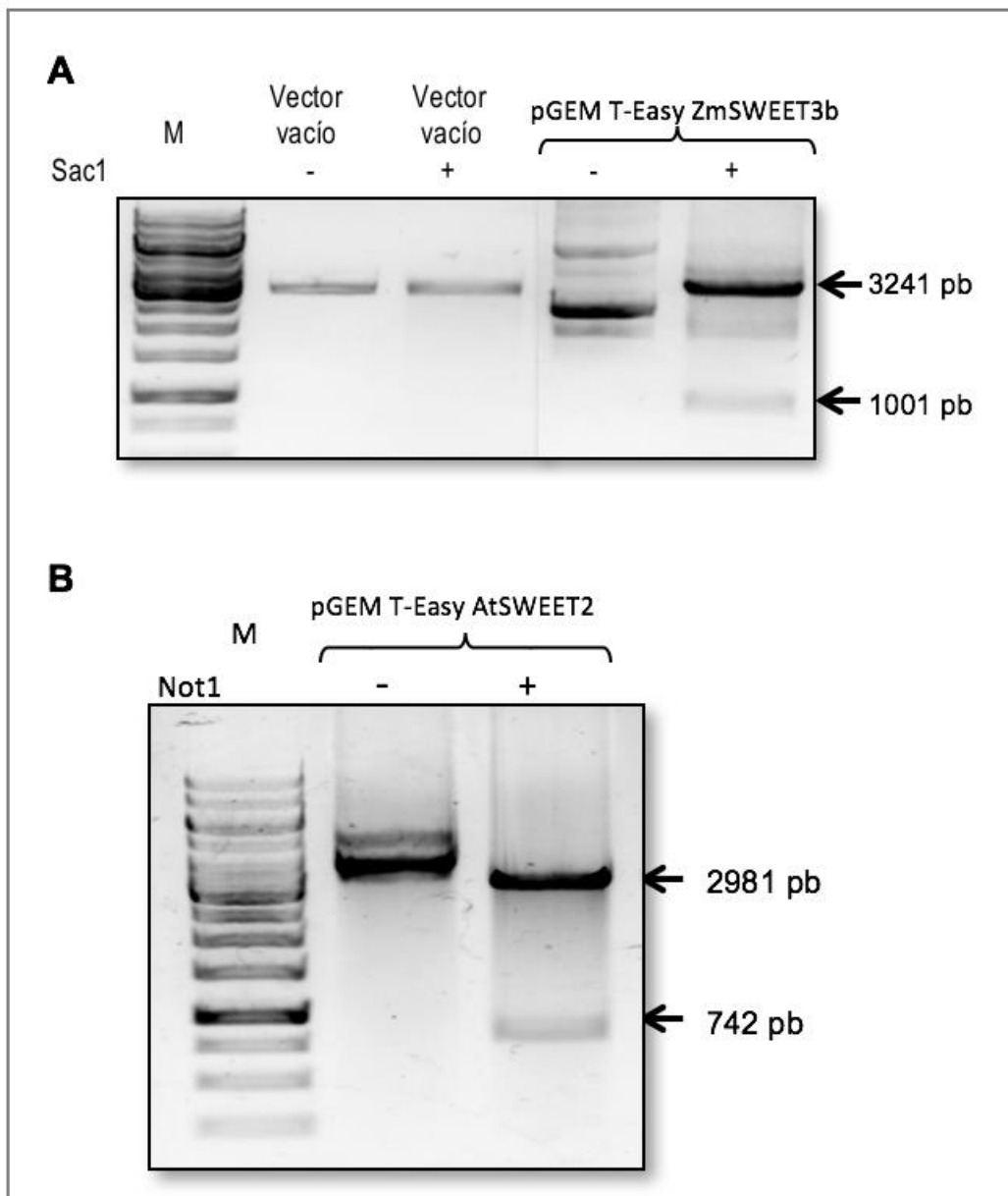


Figura 9. Patrones de restricción de los vectores pGEM T-Easy-ZmSWEET3b y pGEM T-Easy-AtSWEET2. Separación electroforética en geles de agarosa al 0.7 % de los vectores restringidos. **(A)** Ensayo de restricción con la enzima SacI para el vector vacío (3015 pb) y el vector pGEM T-Easy-ZmSWEET3b. El patrón de bandas observado coincide con lo esperado, una banda de 3162 pb y otra de 1001 pb. **(B)** Para el vector pGEM T-Easy-AtSWEET2 se utilizó la enzima NotI, obteniendo el patrón esperado, una banda de 2981 pb y otra de 742 pb. M = marcador de 1 Kb (Thermo Scientific).

Sequence ID: Query_235395 Length: 1047 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 1047 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1729 bits(936)	0.0	1014/1047(97%)	24/1047(2%)	Plus/Plus	
Query 1	ATGGTTCCAGATACAGTTCGTGTAGCAGTAGGAATCCTAGGAAATGCTGCTTCCATGCTC	60			
Sbjct 1	ATGGTTCCAGATACAGTTCGTGTAGCAGTAGGAATCCTAGGAAATGCTGCTTCCATGCTC	60			
Query 61	CTCTACACAACCCCTAT-----GAAGGGCAACGTGGAGGAA	96			
Sbjct 61	CTCTACACAACCCCTATCTGACGTTTCAGATGGGTGATAAGGAAGGGCAACGTGGAGGAA	120			
Query 97	TTCTCCTGCGTGCCATACATCCTAGCGCTGCTCAACTGCTGCTGTACACCTGGTACGGC	156			
Sbjct 121	TTCTCCTGCGTGCCATACATCCTAGCGCTGCTCAACTGCTGCTGTACACCTGGTACGGC	180			
Query 157	CTCCCGGTGGTGAGCTCCGGGTGGGAGAACCTGCCCGTGGCCACCATCAACGGCTGGGC	216			
Sbjct 181	CTCCCGGTGGTGAGCTCCGGGTGGGAGAACCTGCCCGTGGCCACCATCAACGGCTGGGC	240			
Query 217	ATCCTGCTCGAGGTCGCCTTCATCGCCATATACCTACGGTTCGCACCGGCGGAGAAGAAG	276			
Sbjct 241	ATCCTGCTCGAGGTCGCCTTCATCGCCATATACCTACGGTTCGCACCGGCGGAGAAGAAG	300			
Query 277	AGGTTTGCCCTTGACGCTGGTGCCTTCCTGCCCTGGCGCTGTTCCGGCTGACGGCGGCCTTG	336			
Sbjct 301	AGGTTTGCCCTTGACGCTGGTGCCTTCCTGCCCTGGCGCTGTTCCGGCTGACGGCGGCCTTG	360			
Query 337	TCGAGCTTCGCGGCGCACACGCACAGCGCGCAAGGCGTTCGTGGGCAGCGTCGGGCTG	396			
Sbjct 361	TCGAGCTTCGCGGCGCGCACACCGCTCGCGCAAGGCGTTCGTGGGCAGCGTCGGGCTG	420			
Query 397	GTGGCTTCCGTGTCCATGTACACCTCTCCAATGGTGGCCGCTAAGCGAGTCATCGCGACG	456			
Sbjct 421	GTGGCTTCCGTGTCCATGTACACCTCTCCAATGGTGGCCGCTAAGCGAGTCATCGCGACG	480			
Query 457	AAGAGCGTGGAGTTCATGCCGTTCTCCCTCTCGCTCTTCTCCTTCTGTCCAGCGCGCTC	516			
Sbjct 481	AAGAGCGTGGAGTTCATGCCGTTCTCCCTCTCGCTCTTCTCCTTCTGTCCAGCGCGCTC	540			
Query 517	TGGATGGCGTACGGGCTGCTCGGCAGGGACCTCTTCATCGCGTCGCCAACTTCATCGGC	576			
Sbjct 541	TGGATGGCGTACGGGCTGCTCGGCAGGGACCTCTTCATCGCGTCGCCAACTTCATCGGC	600			
Query 577	GTCCCGGTGGGCGTCTCTCAGCTGCTGCTGTAAGTGCATCTACAGGAGAGACCACGGGGCG	636			
Sbjct 601	GTCCCGGTGGGCGTCTCTCAGCTGCTGCTGTAAGTGCATCTACAGGAGAGACCACGGGGCG	660			
Query 637	GCAGCCGGTGCAGAGGCGCACGCGCATGGCCCTGCCCGCCCGCCGATCAGGAGAAGGGC	696			
Sbjct 661	GCAGCCGGTGCAGAGGCGCAAGCGCATGGCCCTGCCCGCCCGCCGATCAGGAGAAGGGC	720			
Query 697	ATGAAGGCAGCGCGCCGGTGGCCGTGCGAGCCGAGGAGGTAGCCGCCAGAGTGTGCGAA	756			
Sbjct 721	ATGAAGGCAGCGCGCCGGTGGCCGTGCGAGCCGAGGAGGTAGCCGCCAGAGTGTGCGAA	780			
Query 757	TATAAATGAGATAATATGTCTCTCTCTTTCTGAAATCGAATCAGAAATCCCTTGTGCGTT	816			
Sbjct 781	TATAAATGAGATAATATGTCTCTCTCTTTCTGAAATCGAATCAGAAATCCCTTGTGCGTT	840			
Query 817	GTGTCAGTCTGTGAAGTGAATGTTTCGTTATCTCCATCTGCGGCCCAAGCCCAACACCGA	876			
Sbjct 841	GTGTCAGTCTGTGAAGTGAATGTTTCGTTATCTCCATCTGCGGCCCAAGCCCAACACCGA	900			
Query 877	ACTGGACTCTCCAAGTCGAATGAAATTGAAGGCTTGGCTCCTGGGCTGTACGGCCACATA	936			
Sbjct 901	ACTGGACTCTCCAAGTCGAATGAAATTGAAGGCTTGGCTCCTGGGCTGTACGGCCACATA	960			
Query 937	GCAGCGACCCCTACTGTTGAGAACTACGTATACGGATCAGCAAATCCACTTATGTCGTGTT	996			
Sbjct 961	GCAGCGACCCCTACTGTTGAGAACTACGTATACGGATCAGCAAATCCACTTATGTCGTGTT	1020			
Query 997	TGGTTTATGAAGTCACTCTATACTTCA 1023				
Sbjct 1021	TGGTTTATGAAGTCACTCTATACTTCA 1047				

Figura 10. Comparación de la secuencia del ZmSWEET3b reportada y clonada en este trabajo. La secuencia consenso del ZmSWEET3b, obtenida a partir de las secuencias proporcionadas por la secuenciación, fue alineada mediante BLAST con la reportada en el NCBI (XM_008675300.3). La porción faltante, que se comprobó estar presente en la construcción mediante PCR, se encuentra resaltada en el recuadro.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para comprobar la presencia del fragmento no encontrado en la secuenciación. La última columna se refiere al tamaño del fragmento esperado en la amplificación.

Nombre	Dirección	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
Zm3bCheckF	Sentido	ACTGACGTTTCAGATGGGTGA	230
RZmSWEET3.1	Antisentido	AAACCTCTTCTTCTCCGCCG	

Se confirmó que la parte de la secuencia faltante se encontraba presente tanto en el cDNA como en el vector pGEM T-Easy-ZmSWEET3b (Figura 11). La secuencia que se obtuvo fue de 1125 pb y fue denominada secuencia consenso debido a que se obtuvo al combinar los resultados de la secuenciación en sentido y antisentido del inserto. La secuencia de nucleótidos mostró un 99.3 % de identidad con la secuencia reportada en el NCBI (5 nucleótidos de diferencia), mientras que la secuencia de aminoácidos mostró un porcentaje de identidad de 98.4 % (4 aminoácidos de diferencia) (Anexo 4). Las diferencias en la identidad de la secuencia reportada en el NCBI y la aquí reportada podrían deberse a que los maíces usados para la obtención de las clonas son distintos, en este trabajo se utilizó el cultivar Chalqueño y el transportador fue reportado a partir del cultivar B73. Por otro lado, el inserto del vector pGEM T-Easy-AtSWEET2 mostró tener un 100 % de identidad con la secuencia reportada en EnsemblPlants (Anexo 5).

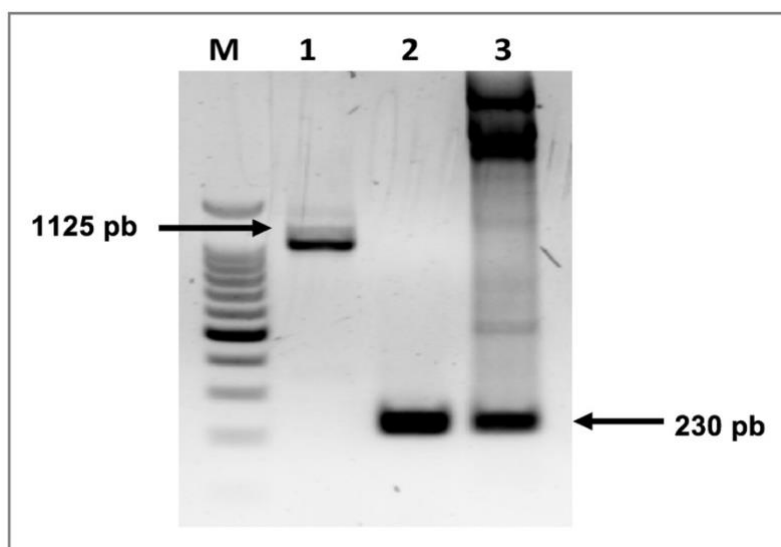


Figura 11. Confirmación de la presencia de la región de 24 pb en ZmSWEET3b. Separación electroforética de los productos de PCR en gel de agarosa al 2 %. **(1)** Producto amplificado de la secuencia del SWEET a partir del cDNA de raíces de plántulas de maíz de 72 h, utilizando los oligonucleótidos para amplificar la secuencia del ORF (Tabla 2). **(2)** Amplificación con los oligonucleótidos de la Tabla 8, utilizando como templado cDNA de raíces de plántulas de maíz de 72 h y **(3)** amplificación con los oligonucleótidos de la Tabla 8 pero usando como templado el vector pGEM T-Easy-ZmSWEET3b. Se observa el inserto por arriba de la banda de 1000 pb como se había mostrado anteriormente para la secuencia amplificada del transportador, mientras que, en el cDNA y el vector, el oligonucleótido Zm3bCheckF logró aparearse con la secuencia que parecía faltar en ambos templados, amplificando el fragmento esperado de 230 pb, confirmando que la secuencia de 24 pb sí se encuentra en el ORF clonado. M = marcador de 100 pb (Promega), la banda gruesa en el marcador corresponde a 500 pb. El análisis se llevó a cabo utilizando el PCR Master Mix de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y por último una extensión final a 72 °C por 10 min.

A) ZmSWEET3b reportada.

B) ZmSWEET3b clonado en este trabajo.

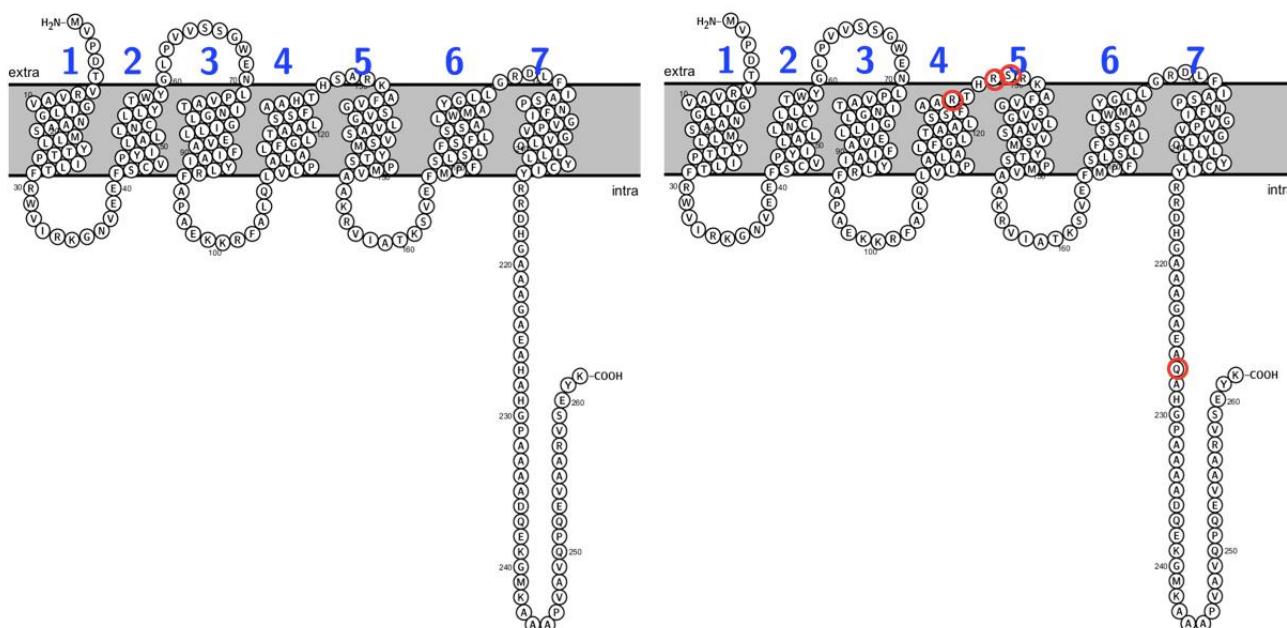


Figura 12. Comparación de las topologías predichas para las secuencias traducidas del gen reportado en NCBI y del clonado en este trabajo para ZmSWEET3b. Se muestra la predicción de los cruces TM de las secuencias de aminoácidos del ZmSWEET3b, en **A** para la secuencia reportada en el NCBI (XM_008675300.3) y en **B** la secuencia obtenida en este trabajo. Las predicciones fueron generadas con la herramienta en línea Protter (Omastis *et al.*, 2014). Se encuentran enumerados los 7 cruces TM. Hay 4 aminoácidos distintos entre ambas secuencias, marcados con rojo en las posiciones 126 (His por Arg), 129 (Arg por Ser), 130 (Ser por Ala) y 227 (His por Gln). Los tres aminoácidos que son distintos se encuentran al final del 4º cruce TM y en el asa que une al cruce TM 4 con el 5 y el otro aminoácido diferente se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

La secuencia traducida del ORF de ZmSWEET3b fue analizada utilizando el servidor TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) y la herramienta Protter (Omastis *et al.*, 2014), la proteína se predice que contiene los 7 cruces TM característicos de la estructura de los SWEETs (Anexo 6; Figura 12). Además, se encontraron conservados todos los residuos que se sugiere podrían estar involucrados con el transporte (Asn77, Trp176 y Asn197) y la estructura funcional (Pro27, Pro47, Tyr61, Pro150, Pro167 e Ile193) del OsSWEET2b, reportados por Tao *et al.* (2015).

Al comparar con la secuencia del AtSWEET13, los residuos que se cree podrían estar involucrados en la unión de la Sac (Asn76, Ser176 y Trp180) (Han *et al.*, 2017) se encontraron conservados en la secuencia del ZmSWEET3b. Los residuos implicados en el transporte del azúcar (Val23, Ser54, Val145) no se encontraron conservados, no solo en el ZmSWEET3b (Leu21, Asn52, Met146) sino en todos los SWEETs analizados, con excepción de la Ser176, conservada solo en el ZmSWEET3b (posición 177).

6.3. Subclonación y transformación de levaduras.

Tras corroborar que las construcciones pGEM T-Easy-SWEET eran las deseadas, se llevó a cabo el proceso de subclonación mediante un ensayo de recombinación con la tecnología Gateway. En este sistema primero se deben obtener las secuencias codificantes deseadas en un vector denominado donador y posteriormente transferirlas por recombinación a los vectores de expresión del sistema heterólogo que uno desee, en este caso para levadura.

Por lo que el primer paso que se llevó a cabo fue la amplificación de los ORFs de ZmSWEET3b y AtSWEET2 a partir de los vectores pGEM T-Easy y con oligonucleótidos diseñados para añadir las secuencias Shine-Delgarno, Kozak y *attB* (Tabla 4), las últimas siendo necesarias para la recombinación con el vector deseado.

Los productos amplificados fueron purificados e insertados en el vector pDONR-221 (4761 pb) mediante la reacción BP, obteniendo a los vectores pDONR-221-ZmSWEET3b y pDONR-221-AtSWEET2 (Anexo 5). Para confirmar la presencia de los SWEETs en los vectores, se realizó un ensayo de restricción con la enzima MluI en ambas construcciones, obteniendo el patrón de bandas esperado en ambos casos: para el pDONR-ZmSWEET3b una banda de 2382 pb y otra de 966 pb, y para el pDONR-AtSWEET2, una banda de 2126 pb y otra de 932 pb (Figura 13).

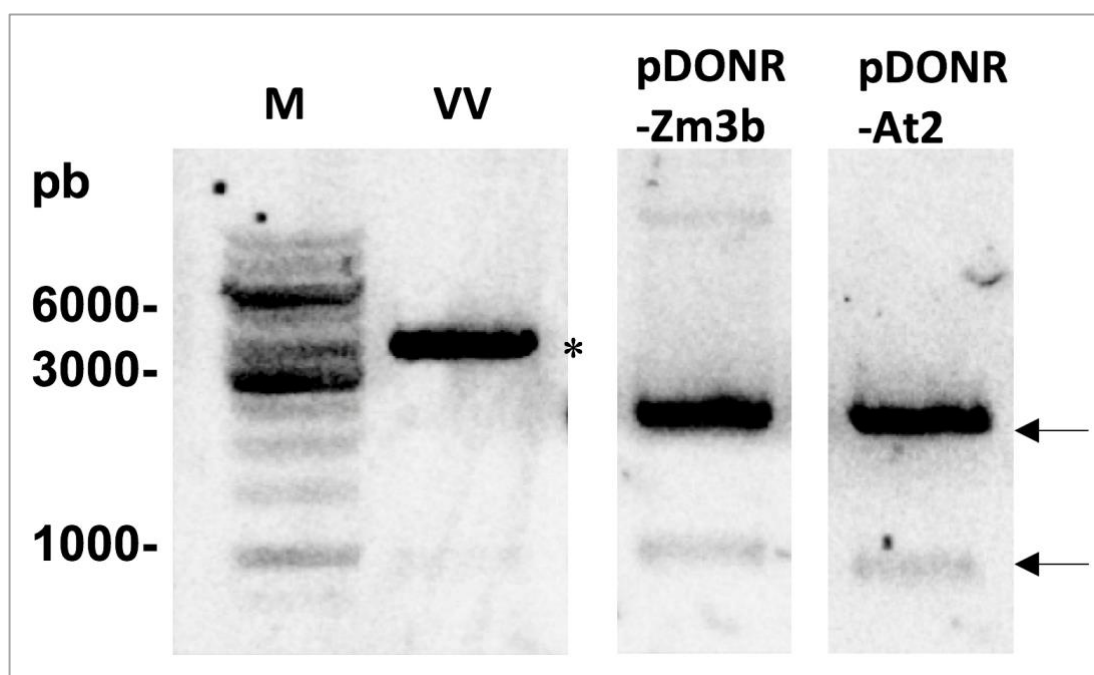


Figura 13. Electroforesis de los productos del ensayo de restricción con *Mlu*I de los vectores *pDONR221-ZmSWEET3b* y *pDONR221-AtSWEET2*. Se muestra el gel de agarosa al 0.7 % utilizado para resolver los productos del ensayo de restricción con *Mlu*I sobre los vectores *pDONR221-ZmSWEET3b* (indicado en la figura como *pDONR-Zm3b*) y *pDONR221-AtSWEET2* (indicado en la figura como *pDONR-At2*). En el vector vacío (VV) se encuentra una banda de 4 kb del vector no digerido (*), mientras que las digestiones producen una banda tenue sobre la marca de 2 kb y otra cerca de la de 1 kb (marcadas con flechas negras). Los patrones de bandas observados fueron los esperados, ya que para el *pDONR-Zm3b* se esperaba una banda de 2382 pb y otra de 966 pb, y para el *pDONR-At2* una banda de 2126 pb y otra de 932 pb.

El segundo paso, después de tener ambas secuencias en el vector *pDONR-221*, fue la subclonación a los vectores de expresión *pDRF1-Gw* y *p14204-eGFP* (*pAG426GPD-ccdB-EGFP*) mediante la reacción LR. El último vector fue llamado *p14204-eGFP* para facilitar su identificación, debido a que 14204 es el número de este plásmido en la página del proveedor Addgene. Por lo tanto, los vectores obtenidos fueron: *pDRF1-Gw-ZmSWEET3b*, *pDRF1-Gw-AtSWEET2*, *p14204-eGFP-ZmSWEET3b* y *p14204-eGFP-AtSWEET2* (Anexo 5). Los primeros dos vectores fueron usados para transformar las levaduras para los ensayos de transporte y los dos últimos para la transformación de las levaduras para determinar la localización de los SWEETs mediante microscopía confocal.

6.4. Localización subcelular del ZmSWEET3b.

El vector vacío p14204-eGFP (que contiene a la proteína reportera eGFP), los vectores p14204-eGFP-ZmSWEET3b y p14204-eGFP-AtSWEET2 producidos en este trabajo, así como el vector p14204-eGFP-AtSWEET1 obtenido por Hernández-Chávez (Datos no publicados; control de proteína de localización de membrana plasmática), fueron utilizados para transformar a la cepa W303 de *S. cerevisiae*, obteniendo las transformantes con las que se determinaría la localización subcelular de los SWEETs, debido a que a cada proteína se le añadió GFP por el extremo carboxilo. Adicionalmente, se utilizó como marcador vacuolar al colorante fluorescente FM4-64 (Vida y Emr, 1995). Los cultivos de las células transformadas fueron observados en un microscopio confocal (Figura 14).

El vector vacío mostró el patrón esperado, al estar la marca fluorescente difusa en el citoplasma (Conte *et al.*, 2009; Choudhary y Loewen, 2016), mientras que en la cepa transformada con el p14204-eGFP-AtSWEET1, la fluorescencia se observó en la membrana plasmática como se había reportado anteriormente (Chen *et al.*, 2010). La cepa que expresó al AtSWEET2 mostró la fluorescencia localizada en las vacuolas al igual que el marcador FM4-64, observando lo mismo que fue reportado por Chen *et al.* (2015a). Finalmente, las levaduras transformadas con el vector p14204-eGFP-ZmSWEET3b, muestran claramente que la proteína se encuentra en la membrana plasmática y no en la vacuola, puesto que la fluorescencia no colocalizaba con el marcador vacuolar, además de que el patrón de la fluorescencia observado es parecido al del control con AtSWEET1 (Figura 14).

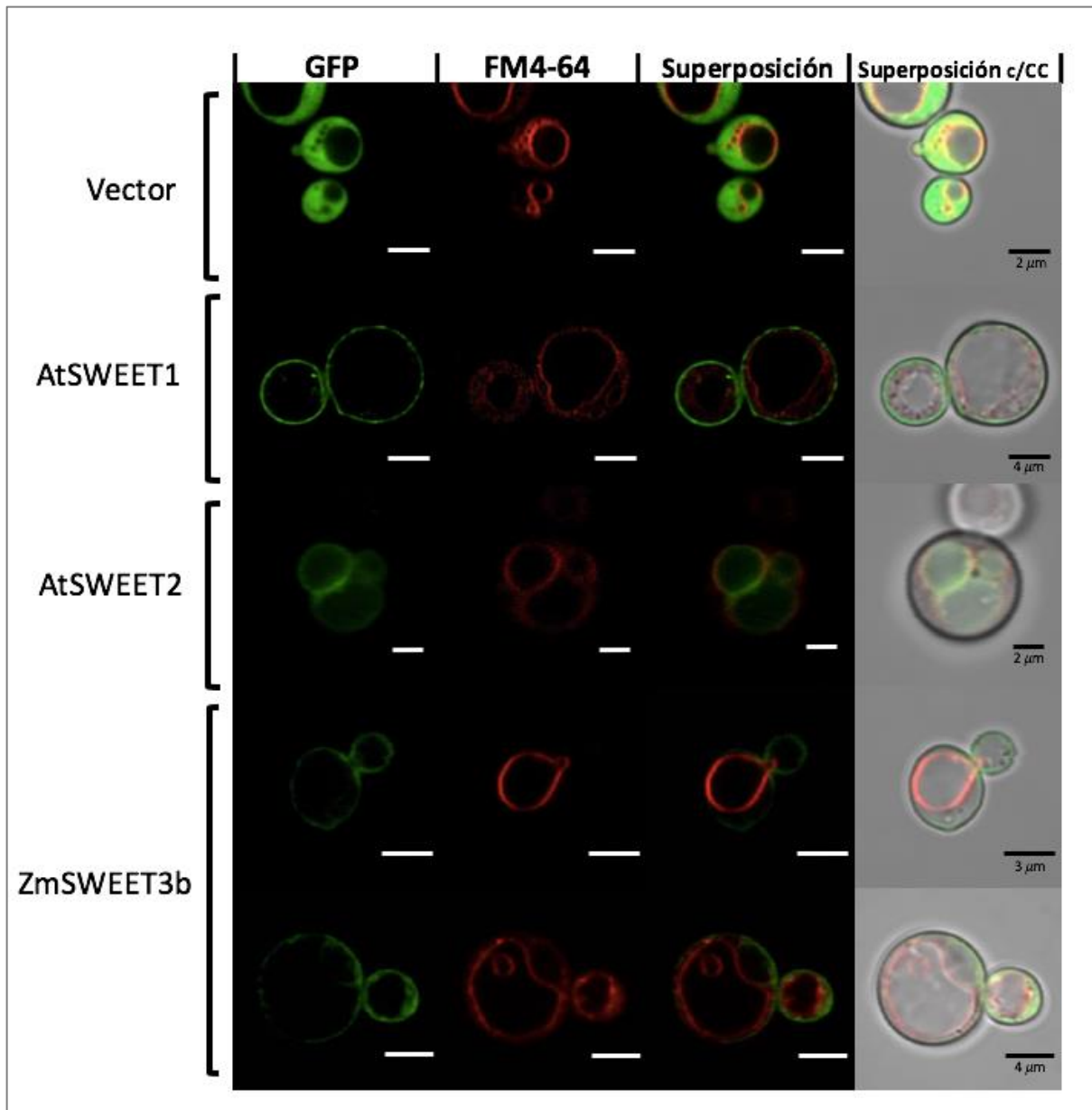


Figura 14. Localización de las fusiones SWEET-GFP en *S. cerevisiae* W303. Se muestran las micrografías de las diferentes transformantes observadas en el microscopio confocal. En color verde se observa la fluorescencia de GFP sola y de las fusiones SWEET-GFP, y en rojo el marcador FM4-64 tiñendo la membrana vacuolar. Fueron traslapados los campos verde y rojo (Superposición), y este junto con el campo claro (Superposición c/CC), y se muestra la escala de cada microscopía. Vector, Vector vacío p14204-eGFP. AtSWEET1, p14204-eGFP-AtSWEET1. AtSWEET2, p14204-eGFP-AtSWEET2. ZmSWEET3b, p14204-eGFP-ZmSWEET3b. Se muestran campos representativos de un ensayo realizado por duplicado.

6.5. Determinación de la actividad de transporte mediante ensayos de complementación heteróloga.

Uno de los ensayos que permite determinar la actividad de transporte de una proteína es el ensayo de complementación funcional. El ensayo consiste en contar con mutantes, en este caso de levaduras, que carezcan de la actividad que uno desea probar. La cepa de levadura EBY.VW4000 carece de transportadores de hexosas de membrana plasmática por lo que es incapaz de crecer en medios que solo contienen hexosas (Wieczorke *et al.*, 1999).

Se transformó a la levadura EBY.VW4000 para determinar si ZmSWEET3b era capaz de restituir su capacidad de crecimiento en un medio con hexosas, lo cual identificaría la función de transporte del SWEET. Adicionalmente, como controles se transformaron levaduras con el vector pDRF1-Gw-AtSWEET2 (producto de este trabajo) y el vector pDRF1-Gw-AtSWEET1 producido en el laboratorio por Hernández-Chávez (Datos no publicados), ya que se conoce que tanto el AtSWEET1 como el AtSWEET2 son transportadores de hexosas, aunque el primero es un transportador de la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2010) y el segundo es un transportador vacuolar (Chen *et al.*, 2015a).

Las cepas mutantes EBY.VW4000 pDRF1-Gw-SWEET fueron crecidas en dilución serial en medios sólidos con diferentes azúcares (SD ura⁻, SMal ura⁻ y SFru ura⁻) y fue registrado su crecimiento (Figura 15). En la caja de medio selectivo suplementado con Mal 2 % todas las mutantes lograron crecer, lo que concuerda con lo esperado, ya que este medio era el control de crecimiento, debido a que la cepa EBY.VW4000 cuenta con transportadores de disacáridos. Mientras que en la caja con Glu 2 % solo la cepa con el AtSWEET1 logró crecer y corrobora lo reportado por Chen y colaboradores (2010). Debido a que AtSWEET2 se encuentra en la vacuola, es incapaz de restaurar el crecimiento de la levadura (Chen *et al.*, 2015a). Por último, en la caja de SFru ura⁻ ninguna de las cepas logró crecer (Figura 15).

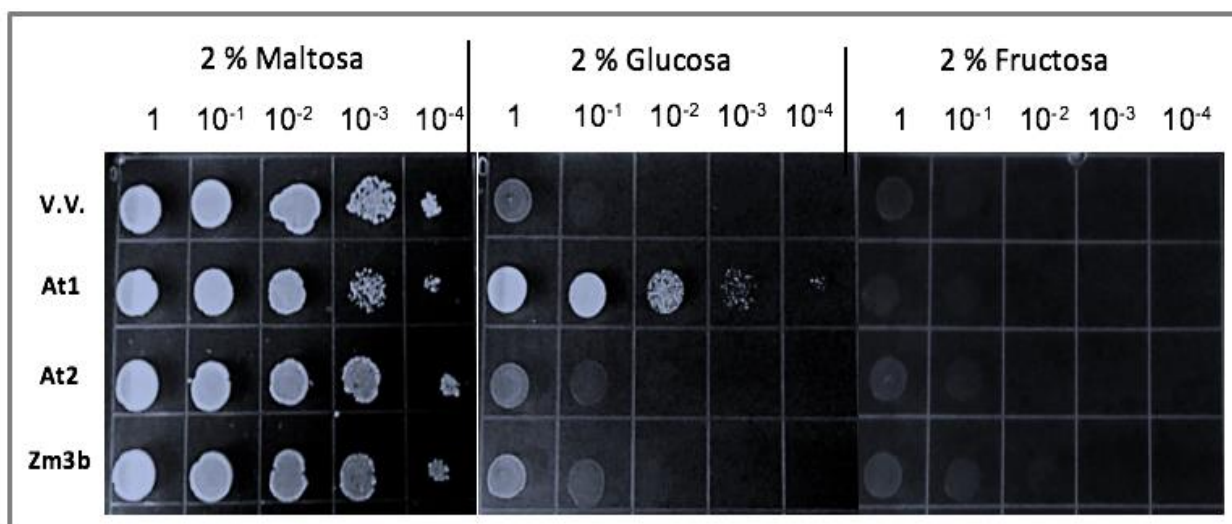


Figura 15. Ensayo de complementación en *S. cerevisiae* EBY.VW4000. Se muestran las fotografías de cada una de las cajas utilizadas en el ensayo, suplementada con Mal 2 % (izquierda), Glu 2 % (centro), o Fru 2 % (derecha). En cada fila se indica la cepa de levadura transformante utilizada, mientras que en las columnas se indica la dilución del cultivo. V.V., Vector vacío pDRF1-Gw. At1, pDRF1-Gw-AtSWEET1. At2, pDRF1-Gw-AtSWEET2. Zm3b, pDRF1-Gw-ZmSWEET3b.

Debido a que la cepa EBY.VW4000 es capaz de transportar disacáridos como Mal y Sac, no es un modelo idóneo para probar la complementación del ZmSWEET3b en el transporte de Sac. Es por esto que se eligió otra cepa de levadura que fuera incapaz de transportar disacáridos. La cepa SEY6210 no cuenta con transportadores de disacáridos de membrana plasmática, pero sí de monosacáridos, por lo que no crece en medios cuya única fuente de carbono es Sac, pero sí crece en Glu (Robinson *et al.*, 1988). Esta cepa proviene de un fondo genético que contiene una delección en el gen SUC2, por lo que además de carecer de transportadores de disacáridos, carece del gen que codifica para dos de las invertasas de levadura: una invertasa glicosilada extracelular y una invertasa citosólica (Emr *et al.*, 1983). Al clonar un transportador que complementa el transporte de Sac, la levadura SEY6210 logra desarrollarse en presencia de Sac como única fuente de carbono, a pesar de que no se ha identificado la enzima que lleva a cabo su hidrólisis. Así, SEY6210 se ha usado para obtener los parámetros cinéticos del SUC2 de *Arabidopsis* (De Moliner *et al.*, 2018), del SUT3 del caucho (*Hevea brasiliensis*) (Tang *et al.*, 2010), y del

Sut1p de *Schizosaccharomyces pombe* (Reinders y Ward, 2001), así como de la caracterización funcional de los 6 transportadores SUT del sorgo (Milne *et al.*, 2013).

Por lo tanto, para determinar si SWEET3b es un transportador de Sac se transformaron levaduras SEY6210 con el vector pDRF1-Gw-ZmSWEET3b (producto de este trabajo) y con el vector PDRF1-Gw-AtSWEET12 (control de transportador de Sac, obtenido por la Dra. Montserrat López-Coria). Además, se utilizó la construcción pDRF1-Gw-ZmSWEET3b-SuSy, obtenida por el Dr. Fernando Guzmán-Chávez, vector que contiene los genes para el transportador SWEET y a una enzima que es capaz de hidrolizar la Sac, la sacarosa sintasa de papa, denominada SuSy (SuSy fue obtenida por la Dra. Montserrat López-Coria), lo anterior como un intento de incrementar la capacidad de uso de Sac por parte de la levadura SEY6210.

Las levaduras SEY6210 transformadas con pDRF1-Gw, pDRF1-Gw-AtSWEET12, pDRF1-Gw-ZmSWEET3b y pDRF1-Gw-ZmSWEET3b-SuSy fueron inoculadas por estriado (ya que en dilución serial no se observó crecimiento en ninguna cepa) y crecidas en medios sólidos con diferentes azúcares (SD ura⁻ 2 %, SSac ura⁻ 1 % y SSac ura⁻ 0.5 %) y fue registrado su crecimiento (Figura 16). Las cuatro cepas mostraron un crecimiento abundante en glucosa (SD), puesto que todas presentan transportadores de hexosas (Figura 16A). En cuanto al crecimiento en Sac, se observó que fue menor al observado en Glu para las transformadas con los vectores pDRF1-Gw-SWEET, mientras que el vector vacío (pDRF1-Gw) y la cepa pDRF1-Gw-ZmSWEET3b-SuSy no lograron desarrollarse, siendo un resultado contrario al esperado para esta última cepa (Figura 16B y C). En 1 % de Sac, solo la cepa transformante pDRF1-Gw-ZmSWEET3b mostró desarrollo, mientras que en 0.5 % tanto pDRF1-Gw-ZmSWEET3b como pDRF1-Gw-AtSWEET12 lograron desarrollarse, lo cual sugiere que el ZmSWEET3b es un transportador de Sac.

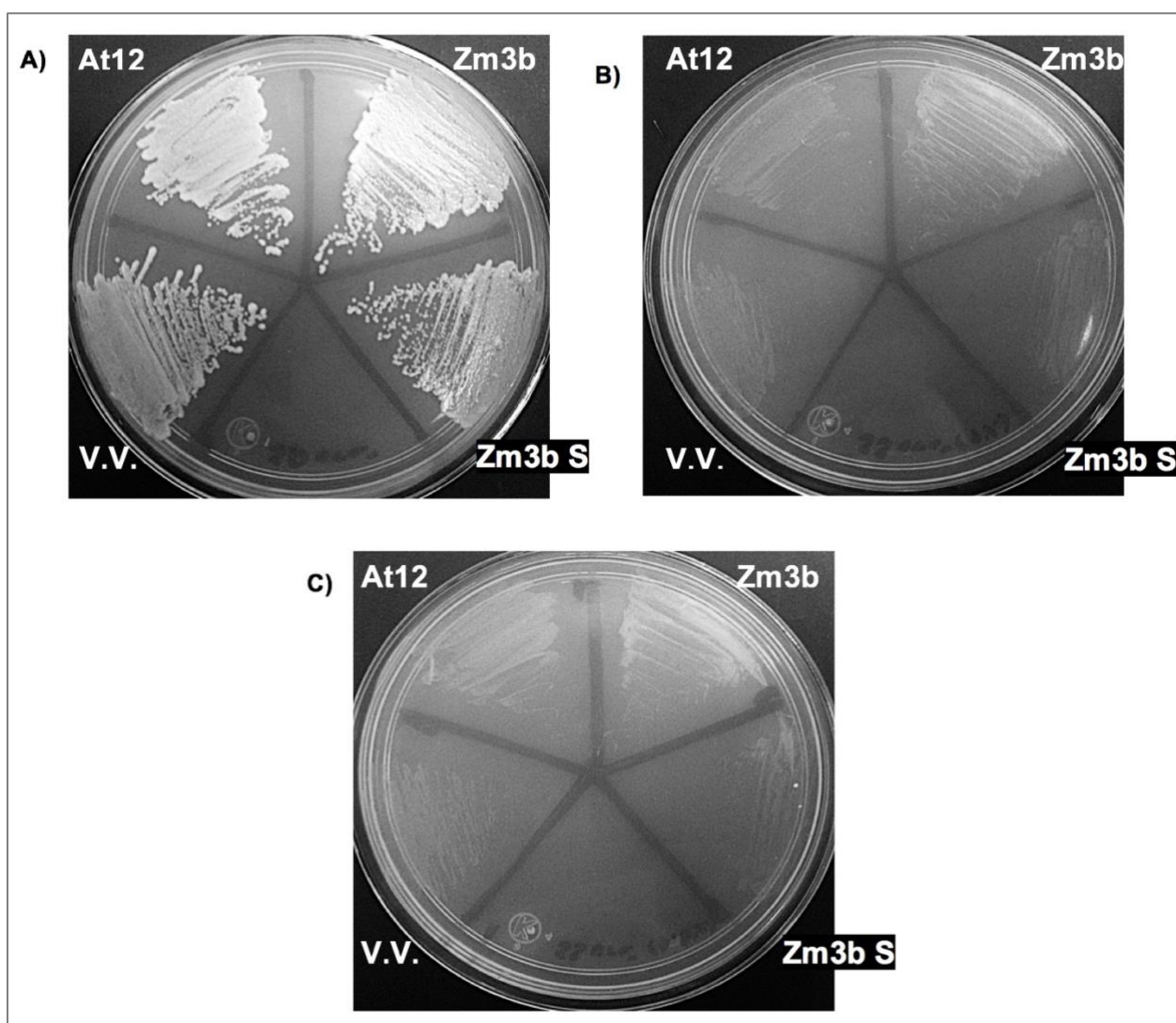


Figura 16. Ensayo de complementación en *S. cerevisiae* SEY6210. Crecimiento de las diferentes transformantes, obtenidas a la misma densidad óptica, en medios suplementados con Glu 2 % (A), Sac 1 % (B) y Sac 0.5 % (C). V.V., Vector vacío pDRF1-Gw. At12, pDRF1-Gw-AtSWEET12. Zm3b, pDRF1-Gw-ZmSWEET3b. Zm3b S, pDRF1-Gw-ZmSWEET3b-SuSy.

7. DISCUSIÓN.

7.1. Transportadores SWEET durante la interacción planta microorganismo

En las plantas, el transporte de azúcares entre tejidos fuente y tejidos demanda es fundamental para su desarrollo. La disponibilidad de azúcares en la célula permite que ocurran los procesos metabólicos, pero también determina que se cumplan con las funciones de señalización de los azúcares (Lemoine *et al.*, 2013). Para la distribución de los azúcares, la planta cuenta con diversos sistemas como el transporte difusional y activo. Los transportadores difusionales tipo SWEET han demostrado ser esenciales en diversos procesos fisiológicos como el llenado del floema, los nectarios y los granos, así como también en la respuesta de la planta durante la interacción con microorganismos (Chen, 2014).

Se ha demostrado que durante la interacción planta microorganismo, la expresión de los transcritos que codifican para algunos SWEET varía. Ésto se ha observado tanto en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* (Chen *et al.*, 2010; Sugiyama *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019), y en plantas de interés agronómico tales como el algodón, arroz, camote, jitomate, papa, maíz, uva y yuca (Yang *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2014; Cohn *et al.*, 2014; Manck-Götzenberg y Requena, 2016; Sugiyama *et al.*, 2016; Cox *et al.*, 2017; Palacios-Vargas, 2017; Li *et al.*, 2017b; Méndez-Ramírez, 2018; Zhao *et al.*, 2018).

Los patógenos que han producido cambios en la expresión de los SWEETs van desde oomicetos como *Pythium irregulare* y *Phytophthora infestans*, nemátodos como *Meloidogyne incognita*, hongos como *Golovmyces chichoracearum*, *Botritis cinerea* y del género *Fusarium*, hasta bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* principalmente (Chen *et al.*, 2010; Streubel *et al.*, 2013; Chong *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015a). Por otro lado, también se ha observado que microorganismos benéficos como la bacteria *Mesorhizobium loti*, el hongo formador de AM *Rhizophagus irregularis* y el hongo biocontrol *Trichoderma asperellum* generan cambios en la expresión de

esta familia de transportadores (Fiorilli *et al.*, 2015; Sugiyama *et al.*, 2016; Palacios-Vargas, 2017; Méndez-Ramírez, 2018).

El análisis de la expresión *in situ* de *AtSWEET2-GUS* y *LjSWEET3-GUS* permitió demostrar que estos se encuentran altamente expresados en sitios de infección (Chen *et al.*, 2015a; Sugiyama *et al.*, 2016), sugeriendo de que su actividad durante la infección podría modificar el flujo de azúcares. En algunos casos es posible que sea para disminuir el aporte de azúcares a los microorganismos, pero en otros lo favorece (Chandran, 2015).

En cuanto a la regulación de los transportadores SWEETs durante la interacción con microorganismos surgen varias preguntas, por ejemplo ¿Cómo se regula la expresión de los SWEETs para reducir la infección de la planta? El aumento en la expresión del *AtSWEET2* ha sido relacionado con la resistencia al patógeno *P. irregulare*, ya que al localizarse en el tonoplasto y transportar Glu, ayuda al transporte del azúcar hacia la vacuola, disminuyendo su disponibilidad en el citoplasma, lo que podría evitar la salida del azúcar para nutrir al patógeno (Chen *et al.*, 2015a). Sin embargo, se desconoce el mecanismo que lleva a cambiar la expresión del *SWEET2*.

Por otra parte, los microorganismos han evolucionado para su establecimiento exitoso en la planta utilizando los recursos nutrimentales del hospedero. Bacterias como *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* son capaces de introducir efectores proteicos, los TAL, algunos de estos factores de transcripción son altamente específicos para las zonas promotoras de los genes de los SWEETs (Antony *et al.*, 2010; Streubel *et al.*, 2013), aumentando la exportación de azúcares. La presencia de las TAL en otros tipos de microorganismos se desconoce y es un campo de estudio que permitirá establecer las bases moleculares de la regulación del efecto de los microorganismos sobre la productividad de las plantas. Al respecto, se han producido efectores TAL artificiales que llevan a inducir SWEETs que naturalmente no son inducidos, lo cual es prometedor como estrategia para aumentar la productividad de las plantas (Liu *et al.*, 2013). Profundizar en el estudio microorganismos diferentes

a las bacterias podría también llevar a encontrar otro tipo de mecanismos o proteínas que regulan la expresión de los SWEETs o procesos que favorecen o retardan la colonización.

En nuestro grupo se ha estudiado el efecto de la interacción del hongo benéfico *T. asperellum* con plantas de maíz sobre la expresión de los SWEETs. En particular, en las raíces se encontró la inducción de los transcritos para ZmSWEET3b (Palacios-Vargas, 2017), así como un aumento en el contenido de sacarosa y fructosa en los exudados de las raíces (López-Coria, comunicación personal). Es conocido que los hongos del género *Trichoderma* se instalan en las raíces de las plantas y que sobreviven con los nutrientes que les proporciona la planta (Vargas *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Doidy *et al.*, 2012). En *T. virens* se induce la expresión de un transportador de sacarosa y una invertasa intracelular solo cuando entra en contacto con el maíz (Vargas *et al.*, 2011), lo que supone que la planta le está donando sacarosa al hongo, o que la sacarosa se encuentra disponible para que el hongo sea capaz de nutrirse. Para determinar si ZmSWEET3b puede contribuir a la nutrición de *T. asperellum* al exportar Sac, se hizo necesario caracterizar al transportador.

7.2. El ZmSWEET3b se localiza en la membrana plasmática al expresarse en levadura.

La mayoría de los transportadores que son inducidos por los microorganismos se localizan en la membrana plasmática (Tabla 1) (Chong *et al.*, 2014; Sugiyama *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017), aunque también se ha encontrado el incremento en la expresión de un SWEET vacuolar (Chen *et al.*, 2015a).

Como se ha mencionado, en nuestro equipo de investigación se encontró que el hongo benéfico *T. asperellum* induce la expresión de *ZmSWEET3b* en las raíces infectadas por el hongo, sin embargo, la localización subcelular y actividad de transporte de ZmSWEET3b se desconocían. De acuerdo con su secuencia de nucleótidos, pertenece al Clado I de la familia de los SWEETs. Pocos miembros de ese clado han sido caracterizados, como el AtSWEET1,

AtSWEET2 y LjSWEET3b, el primero es de membrana plasmática y transporta Glu, el segundo es vacuolar y transporta Glu, mientras que el último es de membrana plasmática y transporta Sac (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015a; Sugiyama *et al.*, 2016).

Se clonó al *ZmSWEET3b* para determinar la especificidad por azúcares y la localización subcelular. Para ello se amplificó y se secuenció el ORF del *ZmSWEET3b* a partir de cDNA obtenido de las raíces de maíz. La secuencia coincidió en un 99.3 % con la secuencia de nucleótidos reportada en el NCBI para el *ZmSWEET3b* del maíz B73 (RefGen v4; NC_024461.2). Las dos secuencias fueron traducidas, encontrándose que a nivel de aminoácidos hay 4 residuos distintos entre ellas, y las diferencias podrían deberse a que los tipos de maíz utilizados para la obtención de las clonas son distintos; en este trabajo se utilizó el cultivar de maíz Chalqueño, que proviene de la cruce de cultivos regionales. Entre variedades del maíz existe una gran variabilidad genética, lo que podría explicar las diferencias en la secuencia de nucleótidos del ORF del *ZmSWEET3b* de ambas variedades (Russell, 1972; Peña-Asín, 2011).

Se obtuvo la posible topología membranar del transportador *ZmSWEET3b* encontrándose la estructura de 7 cruces TM característicos de la familia SWEET y además conserva los posibles residuos que participan en el transporte del azúcar del OsSWEET2b (Tao *et al.*, 2015), excepto por la Val193 que cambió por una Ile (Figura 12), ambos siendo residuos no polares, por lo que es posible que la proteína funcione como transportador.

Al comparar *ZmSWEET3b* con las secuencias de los SWEETs previamente caracterizados y que pertenecen al clado I, el mayor porcentaje de identidad tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos fue con LjSWEET3 seguido del AtSWEET1, ambas proteínas localizadas en la membrana plasmática (Tablas 6 y 7) (Chen *et al.*, 2010; Sugiyama *et al.*, 2016). Este resultado junto con la predicción de la localización mediante la herramienta Wolf PSORT (Horton *et al.*, 2007), sugieren que el *ZmSWEET3b* podría localizarse en la membrana plasmática (Anexo 6).

La localización subcelular de los transportadores difusionales SWEET está estrechamente relacionada con el papel que desempeñan en el flujo de carbono, por lo que era importante determinarla. ZmSWEET3b se localizó en la membrana plasmática al igual que el AtSWEET1 (Figura 14). Los transportadores localizados en la membrana plasmática pueden facilitar la salida de azúcares al apoplasto para que tejidos separados físicamente puedan tener acceso a estos, como el ZmSWEET4c que provee de Glu al endospermo durante el llenado de la semilla (Sosso *et al.*, 2015) o como los ZmSWEET13a, -b y -c que permiten la salida de Sac del parénquima hacia las células acompañantes de los conductos vasculares del floema (Bezruczyk *et al.*, 2018). *Lotus japonicus* puede interactuar con el simbionte *M. loti* en los nódulos de las raíces, donde probablemente este se establece en la planta, ya que induce la expresión del LjSWEET3, un transportador de Sac de membrana plasmática (Sugiyama *et al.*, 2016). En el caso de la interacción maíz-*T. asperellum*, el que el SWEET se encontró en la membrana plasmática de las raíces podría llevar a que permita la salida de los azúcares al apoplasto, lo anterior se sugiere debido a que se encontró que tanto Fru como Sac aumentaban en el líquido exudado de las raíces de maíz infectadas con *T. asperellum* (López-Coria, comunicación personal).

Para completar el estudio es necesario localizar a la proteína en las células vegetales, para ello sería necesario transformar protoplastos de *Arabidopsis*, que es el sistema biológico más utilizado, además de las levaduras, para determinar la localización de los SWEETs (Yoo *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015b). Aunque, también se propone utilizar protoplastos de maíz, puesto que sería el sistema homólogo. Otra estrategia experimental es expresar transitoriamente a la proteína en las hojas del maíz, y para ello se subclonaría al transportador en un vector de clonación binario, para primero transformar *Agrobacterium* y posteriormente agroinfiltrar las hojas del maíz (Kirienko *et al.*, 2012; Yadava *et al.*, 2017).

7.3. ZmSWEET3b no transporta hexosas.

La disponibilidad de Sac en la rizósfera es esencial para la colonización del maíz por parte de *T. virens* (Vargas *et al.*, 2009), ya que, durante su interacción simbiótica, el hongo expresa un transportador de Sac y a una invertasa intracelular (Vargas *et al.*, 2011). En las raíces de maíz infectadas con *Trichoderma* se encontró que hubo un aumento en el contenido de Sac (López-Coria, comunicación personal), además de un aumento de los transcritos para varios SWEETs incluido ZmSWEET3b, lo cual podría indicar que alguno de esos transportadores se encarga del eflujo de la Sac (Palacios-Vargas, 2017).

La información obtenida del análisis *in silico* indicaba que ZmSWEET3b es más parecido a LjSWEET3, un transportador de Sac de la membrana plasmática, sin embargo, la secuencia de aminoácidos tiene 37.8% de identidad con el AtSWEET1, éste último es un transportador de hexosas. Al comparar la secuencia del ZmSWEET3b con la del AtSWEET13 se encontraron conservados los residuos que se cree podrían estar involucrados con la unión de Sac (Han *et al.*, 2017). De los residuos implicados con el transporte solo uno se encontró conservado: la serina 176. A pesar de esto, Han y colaboradores (2017) encontraron que las mutantes de los demás residuos reducían el transporte de Sac, pero solo la mutación en la serina 176 por una alanina abolía la capacidad de transporte, por lo que su presencia en ZmSWEET3b también sugiere que podría transportar Sac.

Al realizar el ensayo de complementación utilizando la cepa EBY.VW4000, que carece de transportadores de hexosas, se encontró que el control con AtSWEET1 sí crece en este medio, lo cual concuerda con lo reportado por Chen y colaboradores (2010), pero las levaduras transformadas con el ZmSWEET3b fueron incapaces de crecer en Glu. Por otro lado, el AtSWEET2 no logra complementar la actividad de transporte de Glu debido a que se localiza en el tonoplasto (Figura 15) (Chen *et al.*, 2015a).

Ninguna de las cepas logró crecer en el medio con Fru, por lo que los SWEETs de membrana plasmática utilizados parecen no ser capaces de transportarlo. Pocos transportadores SWEET transportan Fru, principalmente los pertenecientes al Clado IV. Uno de ellos es el AtSWEET17, transportador que se ha involucrado en la resistencia de la planta a las condiciones de estrés por frío (Guo *et al.*, 2014).

7.4. ZmSWEET3b transporta sacarosa.

Para determinar la función de un transportador de Sac en una levadura, ésta debe de tener las siguientes características: a) carecer de transportadores de disacáridos, b) carecer de una invertasa extracelular y c) presentar una enzima en el citoplasma que metabolice a la Sac. SEY6210 carece de transportadores de disacáridos y tampoco presenta el gen SUC2, el cual codifica para dos invertasas, una extracelular y la otra citoplasmática (Emr *et al.*, 1983). A pesar de no haber identificado a la enzima que lleva a cabo la hidrólisis de la Sac, en la cepa SEY6210 se ha reportado que es capaz de desarrollarse al ser complementada con transportadores de Sac (Reinders y Ward, 2001; Tang *et al.*, 2010; Milne *et al.*, 2013; De Moliner *et al.*, 2018). Debido a que el crecimiento en Sac podría no ser tan abundante como el del control de crecimiento en Glu, se decidió seguir la estrategia de producir un vector que tuviera no solo al gen del transportador SWEET sino también al gen de una enzima que se conoce es eficaz en el uso de la Sac, la SuSy de papa (Salanoubat y Belliard, 1987; Baroja-Fernández *et al.*, 2009), por lo que se construyó un vector, pDRF1-Gw-ZmSWEET3b-Susy, que tuviera a ambos genes y que al utilizarlo solo se requeriría un marcador de selección.

El poco crecimiento de las cepas que fueron transformadas con AtSWEET12 y ZmSWEET3b observado en la figura 16, podría deberse a la acumulación de Sac en el citoplasma, que podría desestabilizar osmóticamente a las células, ya que la levadura silvestre hidroliza la Sac de forma extracelular y lleva a cabo el transporte de hexosas a su interior, por lo que las concentraciones intracelulares de Sac normalmente son bajas (Zhou *et al.*, 2014a). AtSWEET12

ha sido localizado en la membrana plasmática transportando Sac (Chen *et al.*, 2012), por lo que el patrón de desarrollo sugiere que ZmSWEET3b es un transportador de Sac (Figura 16).

Para producir cepas que fueran más eficientes en el uso de la Sac, se planteó el uso de la construcción ZmSWEET3b-SuSy, sin embargo, esta construcción no permitió el crecimiento de la levadura SEY6210 (Figura 16). Una de las explicaciones de porque no fue exitosa esta estrategia es que el promotor elegido para expresar a SuSy, GAL1, el cual al parecer no fue el más adecuado, ya que es reprimido en presencia de Glu (Flick y Johnston, 1990). Si el ZmSWEET3b facilita la entrada de Sac a la célula de levadura, SuSy aún podría expresarse, pero al ir hidrolizando la Sac y generando Glu y Fru, el promotor GAL1 podría reprimir su transcripción, por lo que la actividad de SuSy podría disminuir su propia expresión.

Otra razón que podría explicar este resultado es el tamaño del vector pDRF1-Gw- ZmSWEET3b-SuSy, el cual es de 10.947 kb, la expresión del vector no es facilitada debido a ese tamaño, lo que llevaría a que no se produzcan o se produzcan de manera muy baja las proteínas. Además, la replicación del vector puede representar un gasto metabólico alto, reduciendo la tasa de crecimiento de la levadura (Karim *et al.*, 2012). Otras posibilidad podría ser que el vector de expresión pDRF1-Gw sea eficiente en la expresión de un solo gen o que su expresión sea poco homogénea, lo que junto con la represión del promotor GAL1, dificultó la producción de la SuSY y evitó el desarrollo esperado de la levadura.

Existen otras metodologías que podrían ayudar a dilucidar el papel del ZmSWEET3b en el transporte de azúcares:

- 1) Utilizar una variación de la cepa SEY6210, la mutante SuPy (Zhou *et al.*, 2014a), que contiene dos genes clonados más, una sacarosa fosfato sintasa y una sacarosa fosfato fosfatasa, que catalizan la síntesis de Sac a partir de Glu y Fru, por lo que la cepa es capaz de producir Sac y exportarla al clonar genes de transportadores membranales de este azúcar (Zhou *et al.*, 2014a). Para

evaluar la capacidad de transporte del ZmSWEET3b, habría que clonar el gen en la mutante SuPy y medir la salida de Sac al medio.

- 2) Cruzar las cepas SEY6210 (MAT α) transformadas con los genes *SWEET* con levaduras de la cepa SEY6211 (MAT α), a la que habría que transformar con un vector conteniendo una SuSy intracelular, como la utilizada en la construcción ZMSWEET3b-SuSy proveniente de la papa, pero que además integre el gen en su cromosoma para asegurar que permanezca en la levadura, con lo que se obtendrían levaduras diploides que tuvieran tanto el gen del transportador *SWEET* como el de la invertasa, asegurando que el azúcar pueda ser integrado al metabolismo y que las levaduras se desarrollen (Soellick y Uhrig, 2001).
- 3) Realizar ensayos de acumulación de Sac marcada radioactivamente con las transformantes SEY6210-SWEET.
- 4) Llevar a cabo un ensayo añadiendo esculina, que es un β -glucósido de cumarina fluorescente, y observarlas utilizando un microscopio de fluorescencia, ya que otros transportadores de Sac (SUTs) tienen la capacidad de transportar este compuesto a través de la membrana, acumulando el compuesto fluorescente en el interior de las células (Gora *et al.*, 2012).
- 5) Utilizar el sistema que fue descrito para el AtSWEET1: la doble transformación de ovocitos de *Xenopus* con los genes *SWEET* y un sensor de sacarosa, midiendo el flujo de Sac a través de un sensor FRET que al entrar en contacto con este azúcar genera una señal fluorescente, con lo que se registra la entrada de Sac al ovocito (Chen *et al.*, 2010).

A pesar de lo anterior y el pobre crecimiento de la cepa SEY6210 transformada con ZmSWEET3b, podemos decir que la proteína membranal transporta Sac, si bien el crecimiento pudo haber sido mejor. Los resultados concuerdan con lo observado en los exudados de las raíces de plantas infectadas con *T. asperellum*, ya que se detectó un incremento del contenido de Sac, lo cual se debería a que ZmSWEET3b al encontrarse en la membrana plasmática favorecería la salida de Sac al medio. Faltaría por determinarse que es lo que

hace que se exprese más *ZmSWEET3b* durante la interacción con *T. asperellum*, puesto que hay muchas moléculas que el hongo exuda durante su interacción con la planta (Vinale *et al.*, 2012; López-Coria *et al.*, 2016; Zeilinger *et al.*, 2016). Además, habría que confirmar si se trata de un mecanismo general lo que lleva a la inducción de *ZmSWEET3b*, como es el encendido de diferentes vías metabólicas o bien un mecanismo específico de encendido de este transportador.

8. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos del análisis bioinformático, la observación en microscopio confocal y el crecimiento en medios selectivos, se demostró que el ZmSWEET3b es una proteína que se localiza en la membrana plasmática y que transporta sacarosa en ensayos de expresión heteróloga en levadura.

9. PERSPECTIVAS.

1. Determinar la actividad de transporte de sacarosa del ZmSWEET3b en plantas transformadas transitoriamente o sobreexpresoras, mediante el transporte de azúcares radiactivos.
2. Determinar la función fisiológica de ZmSWEET3b en plantas sobreexpresoras o con una delección de su gen, tanto en condiciones normales como durante la interacción con *Trichoderma*.
3. Realizar la co-transformación de levaduras con vectores para SUSy y los transportadores SWEET.
4. Determinar la localización de ZmSWEET3b en el sistema homólogo de expresión, protoplastos u hojas de maíz.

10. REFERENCIAS.

- An, J.**, Zeng, T., Ji, C., de Graff, S., Zheng, Z., Xiao, T. T., Deng, X., Xiao, S., Bisseling, T., Limpens, E. y Pan, Z. (2019) A *Medicago truncatula* SWEET transporter implicated in arbuscule maintaiment during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 224, 396-408. doi: 10.1111/nph.15975.
- Antony, G.**, Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F. y Yang, B. (2010) Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the diseases usceptibility gene *Os-11N3*. *The Plant Cell* 22, 3864–3876. doi/10.1105/tpc.110.078964.
- Baker, R. F.**, Leach, K. A., Boyer, N. R., Swyers, M. J., Benitez-Alfonso, Y., Skopelitis, T., Luo, A., Sylvester, A., Jackson, D. y Braun, D. M. (2016). Sucrose transporter *ZmSut1* expression and localization uncover new insights into sucrose phloem loading. *Plant Physiology*, 172, 1876–1898. doi:10.1104/pp.16.00884.
- Baroja-Fernández, E.**, Muñoz, F. J., Montero, M., Etxeberria, E., Sesma, M. T., Ovecka, M., Bahaji, A., Ezquer, I., Li, J., Prat, S. y Pozueta-Romero, J. (2009) Enhancing Sucrose Synthase Activity in Transgenic Potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant and Cell Physiology* 50, 1651–1662. doi:10.1093/pcp/pcp108.
- Berg, J. M.**, Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2002) Biochemistry. 5ª Ed. Nueva York: W. H. Freeman. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>.
- Bezruczyk, M.**, Hartwig, T., Horshman, M., Char, S. N., Yang, J., Yang, B., Frommer, W. B. y Sosso, D. (2018) Impared phloem loading in *zmsweet13a,b,c* sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*. *New Phytologist* 218, 594-603. doi: 10.1111/nph.15021.
- Boyce, C. K.**, Zwieniecki, M. A., Cody, G. D., Jacobsen, C., Wirick, S., Knoll, A. H. y Holbrook, N. M. (2004). Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17555–17558. doi: 10.1073/pnas.0408024101.
- Braun, D. M.** y Slewinski, T. L. (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: Roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology* 149, 71–81. doi: 10.1104/pp.108.129049.
- Brotman, Y.**, Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Tohge, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A. y Willmitzer, L. (2009) *Trichoderma*-plant root colonization: Escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens* 9: e1003221. doi: 10.1371/journal.ppat.1003221.
- Carvente-García, R. D.** (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 grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

- Chandran, D.** (2015) Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 67, 461-471. doi: 10.1002/iub.1394.
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P. A., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., L  ran, S., Ferrand, M., Lacombe, B., Loudet, O., Dinant, S., Bellini, C., Neuhaus, H. E., Daniel-Vedele, F. y Krapp, A.** (2013) Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology* 23, 697-702. doi: 10.1016/j.cub.2013.03.021.
- Chen, H. Y., Huh, J. H. Yu, Y. C., Ho, L.H., Chen, L. Q., Tholl, D., Frommer, W. B. y Guo, W. J.** (2015a) The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *The Plant Journal* 83(6), 1048-1058. doi: 10.1111/tpj.12948.
- Chen, L. Q.** (2014) Sugar transporters for phloem transport and pathogenic nutrition. *New Phytologist* 201, 1150-1155. doi: 10.1111/nph.12445.
- Chen, L. Q., Hou, B. 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., Somerville, S. C., Mudgett, M. B. y Frommer, W. B.** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527-534. doi: 10.1038/nature09606.
- Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R. y Frommer, W. B.** (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207-211. doi: 10.1126/science.1213351.
- Chen, L. Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W. y Frommer, W. B.** (2015b) Transport of sugars. *Annual Review of Biochemistry* 84, 865-894. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033904.
- Chen, L. Q., Lin, I. W., Qu, X. Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londo  o, A., Samuels, A. L. y Frommer, W. B.** (2015c) A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* 27, 607-619. doi: 10.1105/tpc.114.134585.
- Chong, J., Piron, M.C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C. y Mestre, P.** (2014) The SWEET family of sugar transporters in grapevine VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 65, 6589-6601. doi: 10.1093/jxb/eru375
- Choudhary, P. y Loewen, M. C.** (2016) Evidence of a role for *S. cerevisiae* α -arrestin Art1 (Ldb19) in mating projection and zygote formations. *Cell Biology International* 40, 83-90. doi: 10.1002/cbin.10541
- Chu, Z., Yuan, M., Yao, J., Ge, X., Yuan, B., Xu, C., Li, X., Fu, B., Li, Z., Bennetzen, J. L., Zang, Q. y Wang, S.** (2006). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes & Development* 20, 1250-1255. doi:10.1101/gad.1416306.
- Cohn, M., Bart, R. S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., Hou, H. B., Frommer, W. B., Lahaye, T. y Staskawicz, B. J.** (2014) *Xanthomonas*

- axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 1186-1198. doi: 10.1094/MPMI-06-14-0161-R.
- Conte**, S., Stevenson, D., Furner, I. y Lloyd A. (2009) Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiology* 15, 559-573. doi/10.1104/pp.109.143487.
- Cox**, K. L., Meng, F., Wilkings, K. E., Li, F., Wang, P., Booher, N. J., Carpenter, S. C. D., Chen, L. Q., Zheng, H., Gao, X., Zheng, Y., Fei, Z., Yu, J. Z., Isakeit, T., Wheeler, T., Frommer, W. B., He, P., Bogdanove, A. J. y Shan, L. (2017) TAL effector driven induction of a *SWEET* gene confers susceptibility to bacterial blight of cotton. *Nature Communications* 8, 15588. doi: 10.1038/ncomms15588.
- De Schepper**, V., De Swaef, T., Bauweraerts, I. y Steppe, K. (2013) Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* 64, 4839-4850. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert302>.
- Delgado-Rubio**, N. E. (2017) Perfil de expresión de seis transportadores de azúcares tipo SWEET en diferentes etapas del desarrollo de las hojas de maíz. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Doidy**, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L. y Wipf, D. (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* 17, 413–422. doi-10.1016/j.tplants.2012.03.009.
- Eom**, J. S., Chen, L. Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, W., Qu, X. Q., Braun, D. M. y Frommer, W. B. (2015) SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 53-62. doi: 10.1016/j.pbi.2015.04.005.
- Emr**, S. D., Schekman, R., Flessel, M. C. y Thoerner, J. (1983) An *MF α 1-SUC2* (α -factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expresion in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 7080-7084. doi : 10.1073/pnas.80.23.7080.
- Feng**, C. Y., Han, J. X., Han, X. X. y Jiang, J. (2015) Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the *SWEET* gene family in tomato. *Gene* 573, 261-272. doi: 10.1016/j.gene.2015.07.055.
- Feng**, L. y Frommer, W. B. (2015) Structure and function of semiSWEET and SWEET sugar transporters. *Cell Press* 40, 480-486. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.005.
- Feng**, L. y Frommer, W. B. (2016) Evolution of transporters: the relationship of SWEETs, PQ-loop, and PnuC transporters. *Trends in Biochemical Sciences*. 41, 118-119. doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.014.
- Fiorilli**, V., Vallino, M., Biselli, C., Faccio, A., Bagnaresi, P. y Bonfate, P. (2015) Host and non-host roots in rice: cellular and molecular approaches reveal differential responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Frontiers in Plant Science* 6:636. doi: 10.3389/fpls.2015.00636.

- Flick**, J. S. y **Johnston**, M. (1990) Two systems of glucose repression of the *GAL1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10, 4757-4769. doi:10.1128/mcb.10.9.4757.
- Gora**, P. J., **Reinders** A. y **Ward** J. M. (2012) A novel fluorescent assay for sucrose transporters. *Plant Methods* 8:13. doi: 10.1186/1746-4811-8-13.
- Gottwald**, J. R., **Krysan**, P. J., **Young**, J. C., **Evert**, R. F. y **Sussman**, M. R. (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13979-13984. doi: 10.1073/pnas.250473797.
- Griffiths**, P.E. (2006) Function, homology and character individuation. *Philosophy of Science* 73, 1-25. doi: 10.1086/510172
- Guo**, W. J., **Nagy**, R., **Chen**, H. Y., **Pfrunder**, S., **Yu**, Y. C., **Santelia**, D., **Frommer**, W. B. y **Martinoia**, E. (2014) SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology* 164, 777-789. doi: 10.1104/pp.113.232751.
- Guzmán-Chávez**, F. (2013) Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Hall**, T.A. (1999) BioEdit: a user friendly sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41, 95-98.
- Han**, L., **Zhu**, Y., **Min Liu**, **Zhou**, Y., **Lu**, G., **Lan**, L., **Wang**, X., **Zhao**, Y. y **Zhang**, X. C. (2017) Molecular mechanism of substrate recognition and transport by the AtSWEET13 sugar transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 10089-10094. doi: 10.1073/pnas.1709241114.
- Hedrich**, R., **Sauer**, N. y **Neuhaus**, H. E. (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 63-70. doi: 10.1016/j.pbi.2015.04.008.
- Heldt**, H. W. y **Piechulla**, B. (2011) Plant Biochemistry. 4^a Ed. Londres: Academic Press, 622.
- Horton**, P., **Park**, K. J., **Obayashi**, T., **Fujita**, N., **Harada**, H., **Adams-Collier**, C. J. y **Nakai**, K. (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acid Research* 35, 585-587. doi: 10.1093/nar/gkm259.
- Jameson**, P. E., **Dhandapani**, P., **Novak**, O. y **Song**, J. (2016) Cytokinins and expression of *SWEET*, *SUT*, *CWINV* and *AAP* genes increase as pea seeds germinate. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 2013. doi: 10.3390/ijms17122013
- Jia**, B., **Zhu**, X. F., **Pu**, Z. J., **Duan**, Y. X., **Hao**, L. J., **Zhang**, J., **Chen**, L. Q., **Jeon**, C. O. y **Xuan**, Y. H. (2017) Integrative view of the diversity and evolution of *SWEET* and semi*SWEET* sugar transporters. *Frontiers in Plant Science* 8:2178. doi: 10.3389/fpls.2017.02178.

- Jones**, D. L., Nguyen, C. N. y Finlay, R. D. (2009) Carbon flow in the rizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* 321, 5-33. doi: 10.1007/s11104-009-9925-0.
- Kanno**, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, T., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M. y Seo, M. (2016) AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nature Communications* 7:13245. doi: 10.1038/ncomms13245.
- Karim**, A. S., Curran, K. A. y Alper, H. S. (2012) Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Research* 13, 107-116. doi: 10.1111/1567-1364.12016.
- Kersey**, P. J., Allen, J. E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B. J., Carvalho-Silva, D., Christensen, M., Davis, P., Grabmueller, C., Kumar, N., Liu, Z., Maurel, T., Moore, B., McDowall, M. D., Maheswari, U., Naamati, G., Newman, V., Ong, C. K., Paulini, M., Pedro, H., Perry, E., Russell, M., Sparrow, H., Tapanari, E., Taylor, K., Vullo, A., Williams, G., Zadissia, A., Olson, A., Stein, J., Wei, S., Tello-Ruiz, M., Ware, D., Luciani, A., Potter, S., Finn R. D., Urban, M., Hammond-Kosack, K. E., Bolser, D. M., De Silva, N., Howe, K. L., Langridge, N., Maslen, G., Staines, D. M. y Yates, A (2018) Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acid Research* 46, D802-D808. doi: 10.1093/nar/gkx1011.
- Kirienko**, D. R., Luo, A. y Sylvester A. W. (2012) Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experimental study. *Plant Physiology* 159, 1309-1318. doi:10.1104/pp.112.199737.
- Klemens**, P. A., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le Hir, R., Bellini, C., Bedu, M., Chardon, F., Krapp, A. y Neuhaus, H. E. (2013) Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 163, 1338-1352. doi: 10.1104/pp.113.224972.
- Krogh**, A., Larsson, B., von Heijne, G. y Sonnhammer, E. L. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305, 567-580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kühn**, C. y Grof, C. P. (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 288-298. doi: 10.1016/j.pbi.2010.02.001.
- Kumar**, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lee**, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. y Kim, Y. H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62, e3923. doi: 10.3791/3923.

- Lemoine, R.** (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 246-262. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00142-5.
- Lemoine, R., La Camera, S., 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. *Frontiers in Plant Science* 4:272. doi: 10.3389/fpls.2013.00272.
- Li, J., Qin, M., Qiao, X., Cheng, Y., Li, X., Zhang, H. y Wu, J.** (2017a) A new insight into the evolution and functional divergence of SWEET transporters in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*). *Plant and Cell Physiology* 58, 839-850. doi: 10.1093/pcp/pcx025.
- Li, T., Huang, S., Zhou, J. y Yang, B.** (2013) Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Molecular Plant* 6, 781-789. doi: 10.1093/mp/sst034.
- Li, Y., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, Q., Zhai, H., Liu, Q. y He, S.** (2017b) The plasma membrane-localized sucrose transporter IbSWEET10 contributes to the resistance of sweet potato to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science* 8:197. doi: 10.3389/fpls.2017.00197.
- Liesche, J. y Patrick, J.** (2017) An update on phloem transport- a simple bulk flow under complex regulation. *F1000Research* 6(F1000 Faculty Rev):2096. doi.org/10.12688/f1000research.12577.1.
- Lin, I. W., Sosso, D., Chen, L. Q., Gase, K., Kim, S. G., Kessler, D., Klinkenberg, P. M., Gorder, M. K., Hou, B. H., Qu, X. Q., Carter, C. J., Baldwin, I. T., Frommer, W. B.** (2014) Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* 508, 546–549. doi: 10.1038/nature13082.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., et al.** (2000) *Molecular Cell Biology*. 4^a Ed. Nueva York: W. H. Freeman. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21592/>.
- López-Coria, M., Hernández-Mendoza, J.L. y Sánchez-Nieto, S.** (2016) *Trichoderma asperellum* induces maize seedling growth by activating the plasma membrane H⁺-ATPase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29, 797-806.
- López-Coria, M.; Sánchez-Sánchez, T.; Martínez-Marcelo, V. H.; Aguilera-Alvarado, G. P.; Flores-Barrera, M.; King-Díaz, B.; Sánchez-Nieto, S.** (2019) SWEET Transporters for the nourishment of embryonic tissues during maize germination. *Genes* 10, 780. doi.org/10.3390/genes10100780.
- Ma, L., Zhang, D., Miao, Q., Yang, J., Xuan, Y. y Hu, Y.** (2017) Essential role of sugar transporter OsSWEET11 during the early stage of rice grain filling. *Plant and Cell Physiology* 58, 863-873. doi: 10.1093/pcp/pcx040.
- Manck-Götzenberger, J. y Requena, N.** (2016) Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato

- SWEET sugar transporter family. *Frontiers in Plant Science* 7:487. doi: 10.3389/fpls.2016.00487.
- Marschner, P.** (2011) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd Ed., London: *Academic Press*, 651.
- Méndez-Ramírez, M.** (2018) Efecto del hongo *Trichoderma* sobre la expresión de los transportadores ZmSWEET en tejido aéreo. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Miao, H., Sun, P., Liu, Q., Miao, Y., Liu, J., Zhang, K., Hu, W., Zhang, J., Wang, J., Wang, Z., Jia, C., Xu, B., Jin, Z.** (2017) Genome-wide analyses of SWEET family proteins reveal involvement in fruit development and abiotic/biotic stress responses in banana. *Scientific Reports* 7:3536. doi: 10.1038/s41598-017-03872-w.
- Milne, R. J., Byrt, C. S., Patrick, J. W. y Grof, C. P.** (2013) Are sucrose transporter expression profiles linked with patterns of biomass partitioning in *Sorghum* phenotypes? *Frontiers in Plant Science* 4, 223. doi: 10.3389/fpls.2013.00223.
- Mizuno, H., Kasuga, S., y Kawahigashi, H.** (2016) The sorghum SWEET gene family: stem sucrose accumulation as revealed through transcriptome profiling. *Biotechnology for Biofuels* 9:127. doi: 10.1186/s13068-016-0546-6.
- Myburg, A. A., Lev-Yadun, S. y Sederoff, R. R.** (2013) Xylem Structure and Function. eLS. John Wiley & Sons, Ltd. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001302.pub2>
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. y Cox, M. M.** (2008) Lehninger Principles of Biochemistry. 5^a Ed. Nueva York: *W. H. Freeman*, 1158.
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S. y Wollscheid, B.** (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30, 884-886. doi: 10.1093/bioinformatics/btt607.
- Palacios-Vargas, I.** (2017) Identificación de los transportadores SWEET de las raíces de plántulas de maíz y su regulación por la infección de *Trichoderma asperellum*. Tesis para obtener el grado de Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Peña-Asín, D.J.** (2011) Evaluación de dos poblaciones sintéticas de maíz mediante técnicas agronómicas y moleculares. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ingeniería Agronómica, Departamento de. Agricultura y Economía Agraria, Universidad de Zaragoza.
- Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M. y Emr, S. D.** (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Molecular and Cellular Biology* 8, 4936-4948. doi: 10.1128/mcb.8.11.4936.
- Reece-Hoyes, J. S y Walhout, A.** (2018) Gateway recombination cloning. *Cold Spring Harbor protocols* 2018(1), pdb.top094912. doi:10.1101/pdb.top094912.

- Reinders, A. y Ward, J. M.** (2001) Functional characterization of the α -glucoside transporter Sut1p from *Schizosaccharomyces pombe*, the first fungal homologue of plant sucrose transporters. *Molecular Microbiology* 39, 445-454. doi : 10.1046/j.1365-2958.2001.02237.x.
- Russell, W. A.** (1972) Registration of B70 and B73 parental lines of maize (Reg. Nos. PL16 and PL17). *Crop Science* 15, 721.
- Salanoubat, M. y Belliard, G.** (1987) Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (*Solanum tuberosum* L.): preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. *Gene* 60, 47-56. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90212-5).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. y Eliceiri, K. W.** (2012) NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675. doi: 10.1038/nmeth.2089.
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N., Hedrich, R.** (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal* 68, 129-136. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04672.x.
- Schuster, A. y Schmoll, M.** (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 787-799. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1.
- Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U. I. y Kunze, R.** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* 131, 16-26. doi: 10.1104/pp.011577.
- Sekhon, R. S., Lin, H., Childs, K. L., Hansey, C. N., Buell, C. R., de Leon, N. y Kaeppler, S. M.** (2011) Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal* 66, 553-563. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04527.x.
- Slewiniski, T. L.** (2011) Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: A physiological perspective. *Molecular Plant* 4, 641-662. doi: 10.1093/mp/ssr051.
- Soellick, T. R. y Uhrig, F. J.** (2001) Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two hybrid analyses. *Genome Biology* 2, research0052.7.
- Sosso, D., Luo, D., Li, Q. B., Sasse, J., Yang, J., Gendrot, G., Suzuki, M., Kock, K. E., McCarty, D. R., Chourey, P. S., Rogowsky, P. M., Ross-Ibarra, J., Yang, B. y Frommer, W. B.** (2015) Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics* 47, 1489-1493. doi: 10.1038/ng.3422.
- Streubel, J., Pesce, C., Hutin, M., Koebnik, R., Boch, J. y Szurek, B.** (2013) Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* 200, 808-819. doi: 10.1111/nph.12411.

- Sugiyama**, A., Saida, Y., Yoshimizu, M., Takanashi, K., Sosso, D., Frommer, W. B. y Yazaki, K. (2016) Molecular characterization of LjSWEET3, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonica*. *Plant and Cell Physiology* 58, 298-306. doi: 10.1093/pcp/pcw190.
- Taiz**, L. y Zeiger, E. (2002) Plant Physiology. 3^a Ed., Sunderland: *Sinauer Associates*, 623.
- Tang**, C., Huang, D., Yang, J., Liu, S., Sakr, S., Li, H., Zhou, Y. y Qin, Y. (2010) The sucrose transporter HBSUT3 plays an active role in sucrose loading to lactifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant, Cell & Environment* 33, 1708-1720. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02175.x.
- Tao**, Y., Cheung, L. S., Eom, J. S., Chen, L. Q., Xu, Y., Perry, K., Frommer, W. B. y Feng, L. (2015) Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature* 527, 259-263. doi: 10.1038/nature15391.
- Vargas**, W. A., Crutcher, F. K. y Kenerley C. M. (2011) Functional characterization of plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytologist*, 189: 777-789. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03517.x.
- Vargas**, W. A., Mandawe, J. C. y Kenerley, C. M. (2009) Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology* 151, 792-808. doi: 10.1104/pp.109.141291.
- Vida**, T. A. y Emr, S. D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* 128, 779-792. doi:10.1083/jcb.128.5.779
- Vinale**, F., Sivasithamparam, K., Ghisalbert, E. L., Ruocco, M., Woo, S. y Lorito, M. (2012) *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications* 7, 1545-1550. doi: 10.1177/1934578x1200701133.
- Wang**, J., Yan, C., Li, Y., Hirata, K., Yamamoto, M., Yan, N. y Hu, Q. (2014) Crystal structure of a bacterial homologue of SWEET transporters. *Cell Research* 24, 1486-1489. doi: 10.1038/cr.2014.144.
- Wieczorke**, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P. y Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464, 123-128. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01698-1.
- Wei**, X., Liu, F., Chen, C., Ma, F. y Li, M. (2014) The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars. *Frontiers in Plant Science* 5: 569. doi: 10.3389/fpls.2014.00569.
- Wright**, E. M. (2012) Glucose transport families SLC5 and SLC50. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 183-196. doi: 10.1016/j.mam.2012.11.002.
- Xu**, Y., Tao, Y., Cheung, L. S., Fan, C., Chen, L. Q., Xu, S., Perry, K., Frommer, W. B. y Feng, L. (2014) Structures of bacterial homologues of SWEET

- transporters in two distinct conformations. *Nature* 515, 448-452. doi: 10.1038/nature13670.
- Xuan**, Y. H., Yi, B. H., Chen, L. Q., Sosso, D., Ducat, D. C., Hou, B. H. y Frommer, W. B. (2013) Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E3685–E3694. doi: 10.1073/pnas.1311244110.
- Yadava**, P., Abhishek, A., Singh, R., Singh, I., Kaul, T., Pattanayak, A. y Agrawal, P. K. (2017) Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize. *Frontiers in Plant Science* 7:1949. doi: 10.3389/fpls.2016.01949.
- Yang**, B., Sugio, A. y White, F. F. (2006) Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10503-10508. doi: 10.1073/pnas.0604088103.
- Yoo**, S. D., Cho, Y. H. y Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2, 1565-1572. doi: 10.1038/nprot.2007.199.
- Yu**, S. M., Lo, S. F., y Ho, T. D. (2015) Source–sink communication: Regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. *Trends in Plant Science* 20, 844-857. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.009.
- Yuan**, M. y Wang, S. (2013) Rice MtN3/Saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant* 6, 665-674. doi: 10.1093/mp/sst035.
- Zeilinger**, S., Gruber, S., Bansal, R. y Mukherjee P. K. (2016) Secondary metabolism in Trichoderma - Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30, 74-90. doi: 10.1016/j.fbr.2016.05.001.
- Zhao**, D., You, Y., Fan, H., Zhu, X., Wang, Y., Duan, Y., Xuan, Y. y Chen, L. (2018) The role of sugar transporter genes during early infection by root-knot nematodes. *International Journal of Molecular Sciences* 19:302. doi: 10.3390/ijms19010302.
- Zhou**, Y., Grof, C.P.L. y Patrick J.W. (2014a) Proof of concept for a novel functional screening system for plant sucrose effluxers. *Journal of Biological Methods* 1: e5. doi: 10.14440/jbm.2014.27.
- Zhou**, Y., Liu, L., Huang, W., Yuan, M., Zhou, F., Li, X. y Lin, Y. (2014b) Overexpression of OsSWEET5 in rice causes growth retardation and precocious senescence. *PLOS ONE* 9, e94210. doi: 10.1371/journal.pone.0094210.
- Zhou**, Y., Qu, H., Dibley, K. E., Offler, C. E. y Patrick, J. W. (2007) A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *The Plant Journal* 49, 750-764. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.03000.x.

11. ANEXOS.

Anexo 1. Preparación de material estéril para el aislamiento de RNA:

- Morteros estériles, libres de RNAsas: Para cada muestra se utiliza un mortero y su respectivo pistilo, ambos previamente tratados de la siguiente forma: Primero se lavan con agua y jabón, después se lavan con 15 a 20 mL de NaClO comercial, lavando las paredes del mortero con ayuda del pistilo, y dejando reposar el NaClO por 15 min. Posteriormente, se enjuagadan con agua DEPC y secados colocándolos sobre toallas de papel absorbente. Finalmente, se envuelven en papel aluminio y se esterilizan en autoclave por 30 min a 121 °C a una presión de 1.1 kg/cm² (15 lb/in²). Se almacenan a -20 °C hasta su uso.
- Agua DEPC: Se añade 1 mL de dietilpirocarbonato (DEPC) a 1 L de agua desionizada y se mantiene en agitación durante toda una noche en un recipiente tapado, para al otro día ser esterilizada en autoclave por 30 min a 121 °C a una presión de 1.1 kg/cm² (15 lb/in²).
- Material desechable: Las puntas de micropipetas, tubos de microfuga y espátulas se esterilizan en autoclave por 30 min a 121 °C a una presión de 1.1 kg/cm² (15 lb/in²).

Anexo 2. Purificación de fragmentos de DNA.

- Kit Zymoclean Gel DNA Recovery de Zymo Research: El producto de PCR resuelto es cortado del gel de agarosa con una navaja, y se transfiere a un tubo de microfuga de 1.5 mL previamente pesado, con lo que se sabrá el peso del gel por diferencia. Se añaden 3 volúmenes de ADB por cada volumen de agarosa extraído, considerando 100 µL por cada mg de agarosa. Se incuba a 55 °C durante 10 min, disolviendo por completo la agarosa. La agarosa fundida se transfiere a una columna Zymo-Spin en un tubo de colección, y es centrifugada a 13000 RPM por 1 min, descartando el sobrenadante. Después, se añaden 200 µL de amortiguador de Lavado de DNA a la columna, se centrifuga a 13000 RPM durante 30 s, se repite el paso y se descarta el sobrenadante. Se añaden 12 µL de agua DEPC directamente en la columna y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Al finalizar, se cambia el tubo

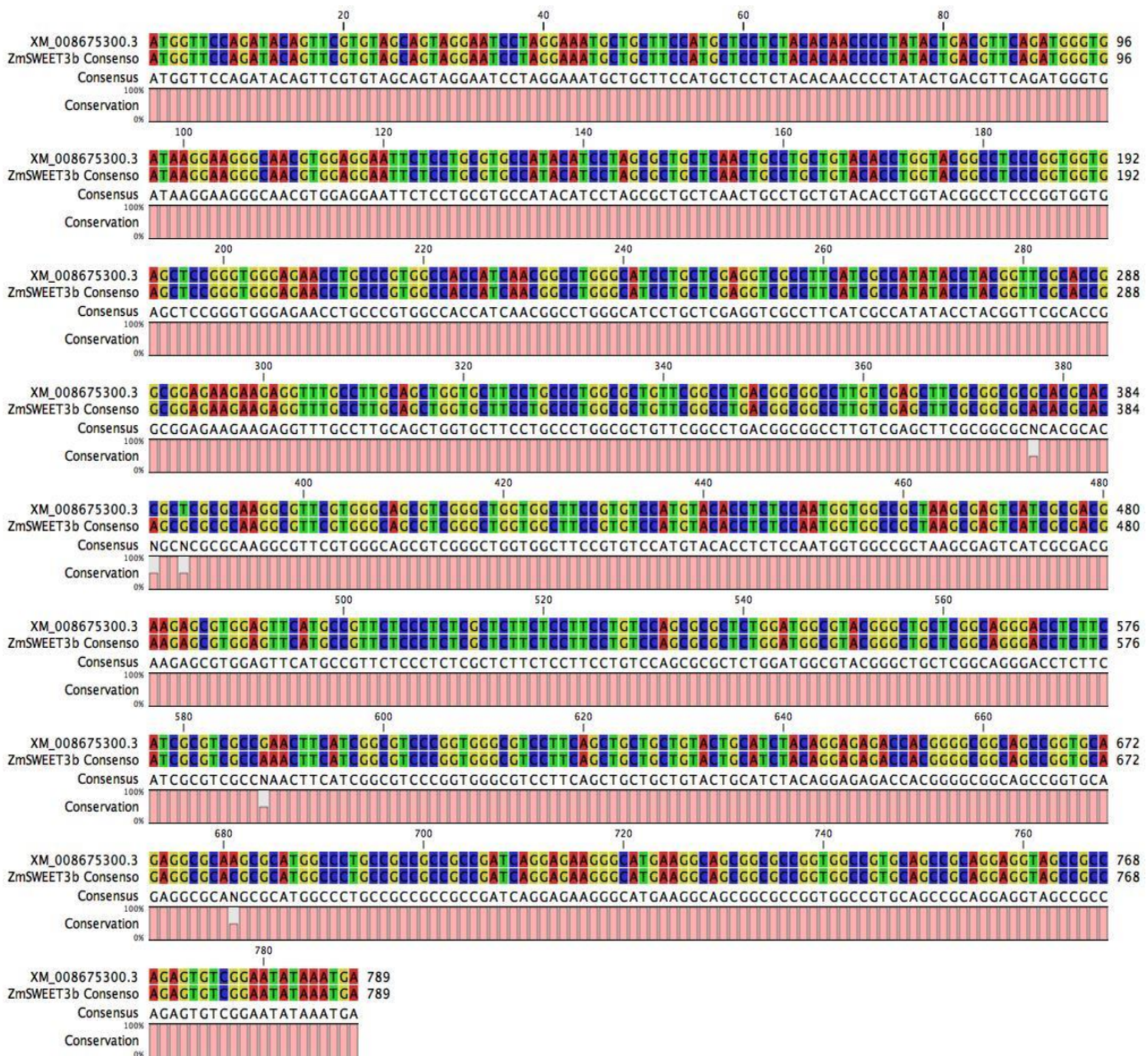
de colección por un tubo de microfuga de 1.5 mL y se centrifuga a 13000 por 1 min.

Anexo 3. Purificación de Plásmidos.

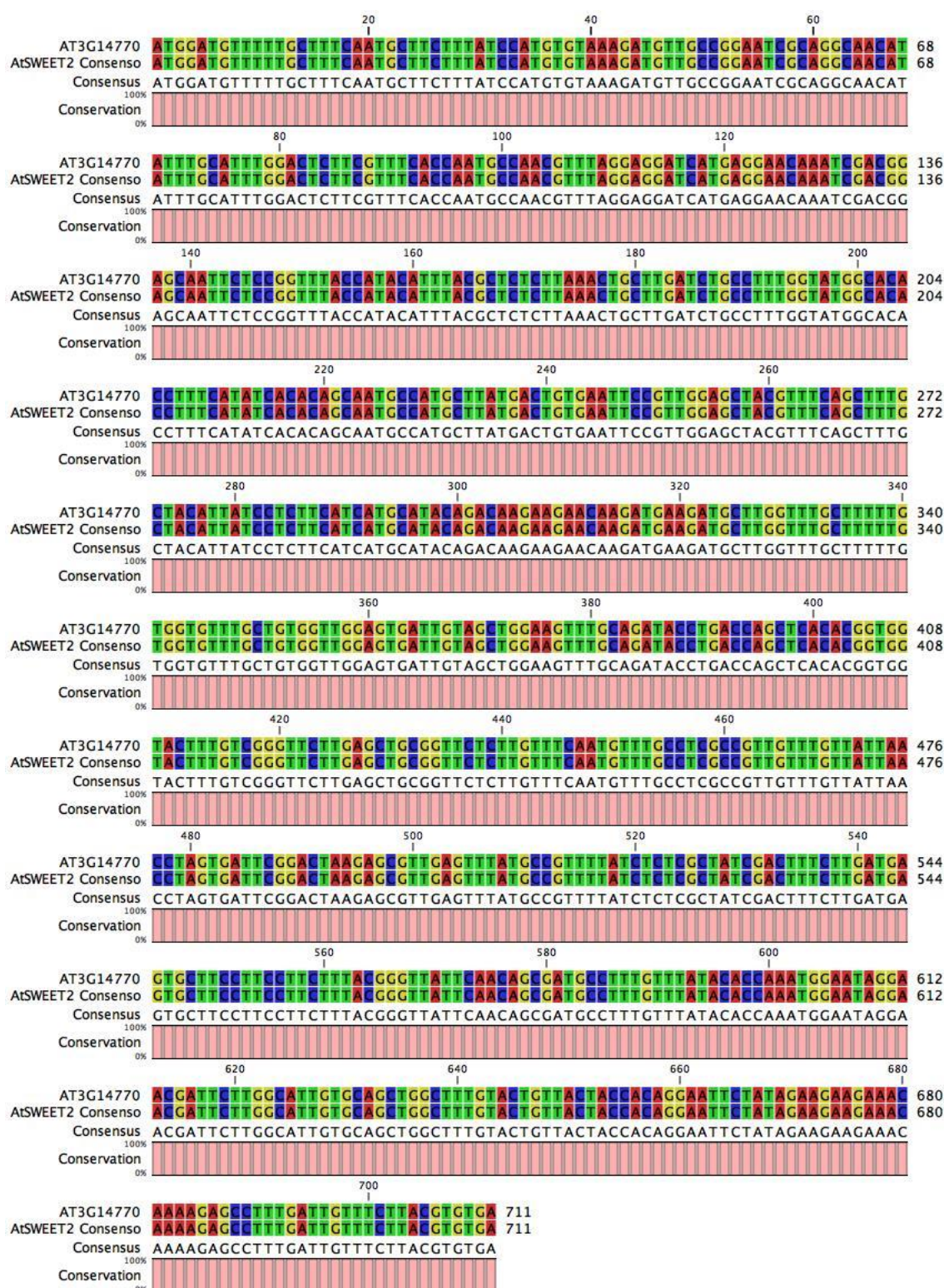
- Stock de almacenamiento de las cepas: Del tubo de 16 x 150 mm con medio líquido, se toman 640 µL del cultivo y se le añaden 360 µL de glicerol estéril (50 %) en un tubo de microfuga de 1.5 mL para el stock.
- Kit Zyppy Plasmid Miniprep de Zymo Research: Se toman 2 mL y se centrifugan a 13000 RPM durante 30 s hasta que se acabe el cultivo. El botón obtenido se resuspende en 600 µL de agua desionizada. Se añaden 100 µL de amortiguador de Lisis, se agita bien y debe de ser neutralizado con 350 µL del amortiguador de Neutralización en no más de 2 min después de añadir el amortiguador de Lisis, se agita hasta que la coloración sea totalmente amarilla. Después se centrifuga a 13000 RPM durante 4 min y el sobrenadante es transferido a una columna Zymo-Spin en un tubo de recolección, evitando los sólidos en el fondo. Se centrifuga a 13000 RPM durante 30 s y se descarta el sobrenadante. Se añaden 200 µL de Endo Wash, y se centrifuga a 13000 RPM durante 30 s. Después se añaden 400 µL de Wash amortiguador y se vuelve a centrifugar a 13000 RPM durante 30 s, se descarta el sobrenadante y se cambia el tubo de colección por un tubo de microfuga de 1.5 mL. Se añaden directamente a la columna 40 µL de agua estéril y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, se centrifuga a 13000 RPM por 1 min.

Anexo 4. Alineamientos de los fragmentos secuenciados a partir de las construcciones pGEM T-Easy-SWEET y las secuencias reportadas.

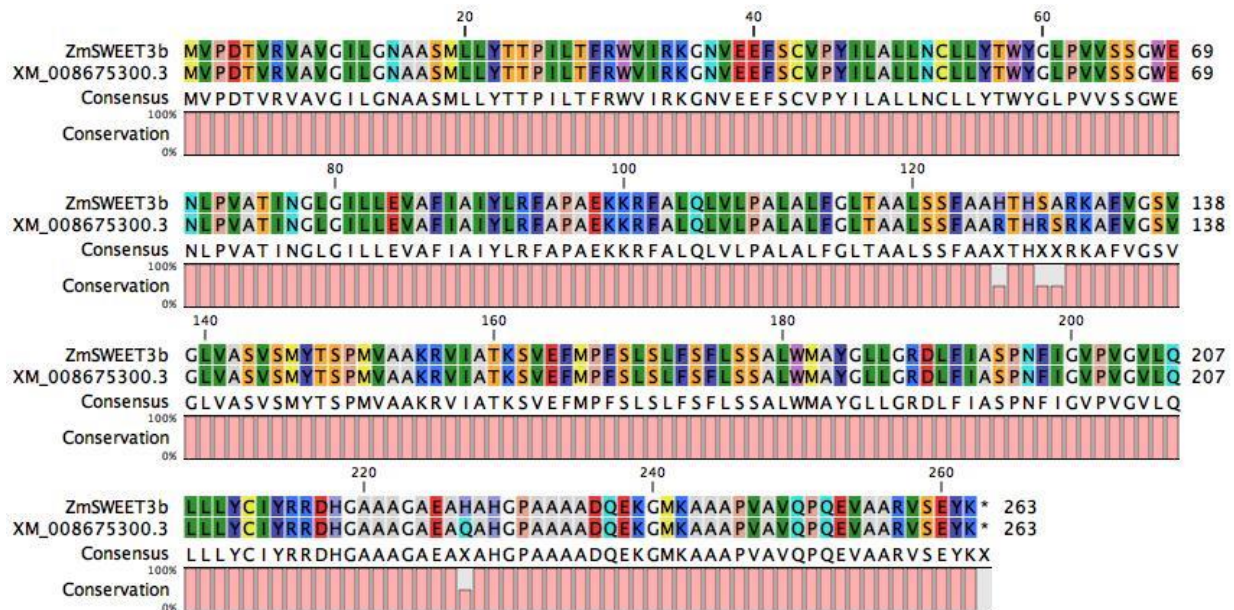
Anexo 4.1. ZmSWEET3b Consenso y XM_008675300.3 del NCBI.



Anexo 4.2. AtSWEET2 Consenso y AT3G14770 de EnsemblPlants.



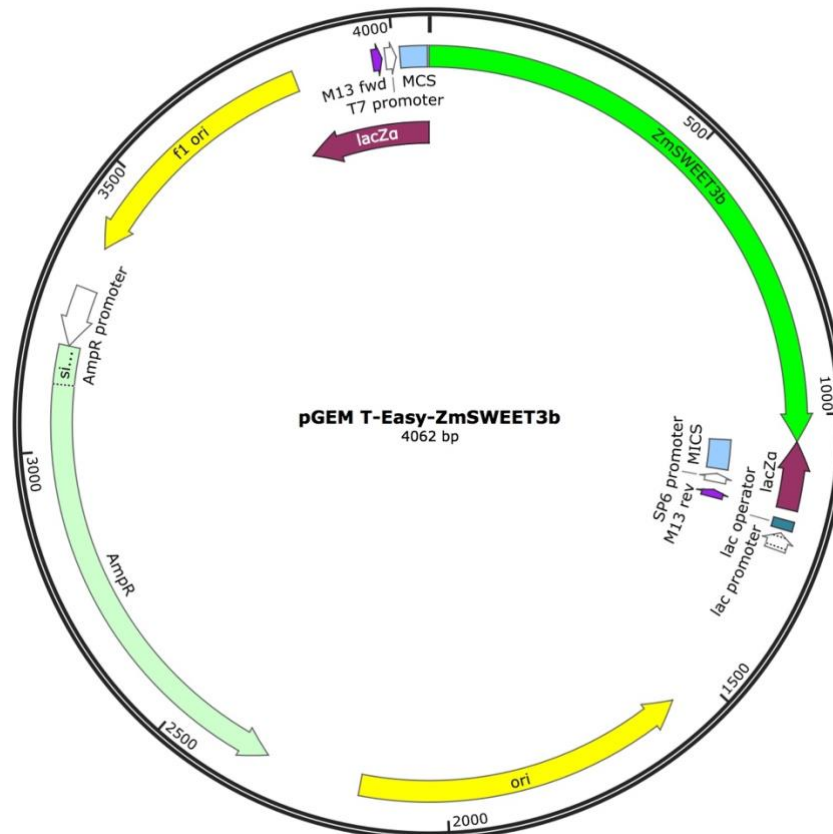
Anexo 4.3. ZmSWEET3b Consenso y XM_008675300.3 del NCBI en secuencia de aminoácidos.



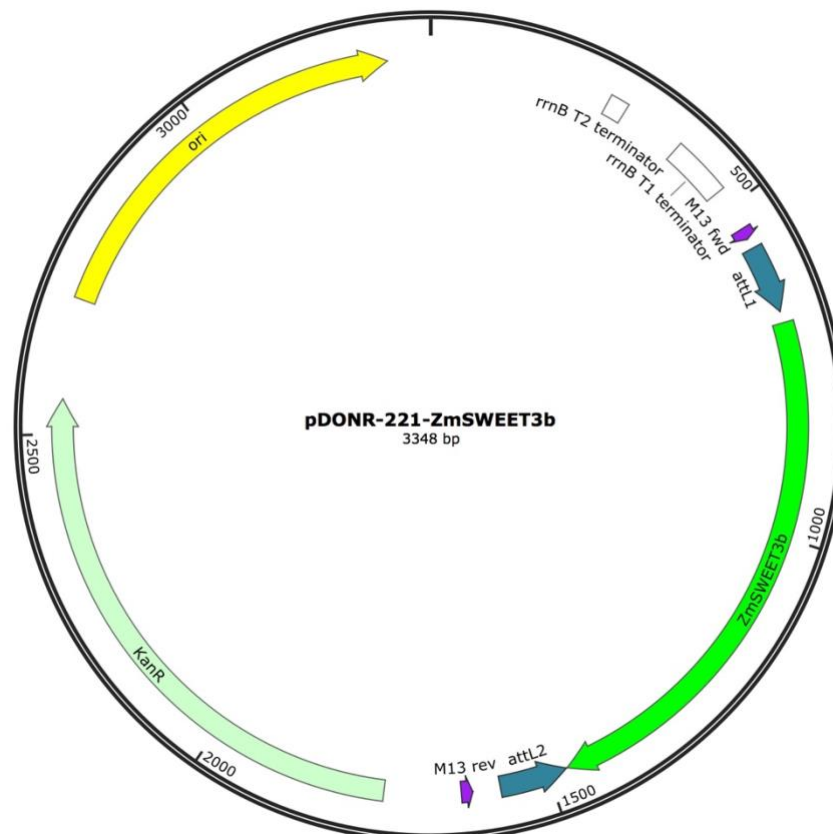
Anexo 5. Mapas de los vectores construidos en este trabajo.

Anexo 5.1. Vectores producidos con el gen *ZmSWEET3b*:

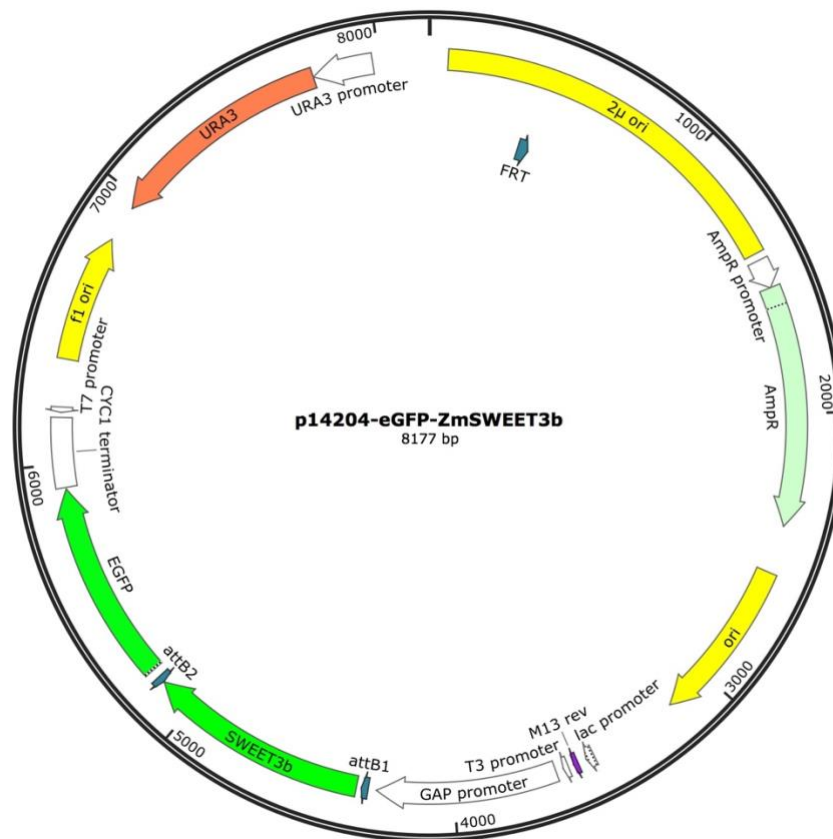
- pGEM T-Easy-ZmSWEET3b:



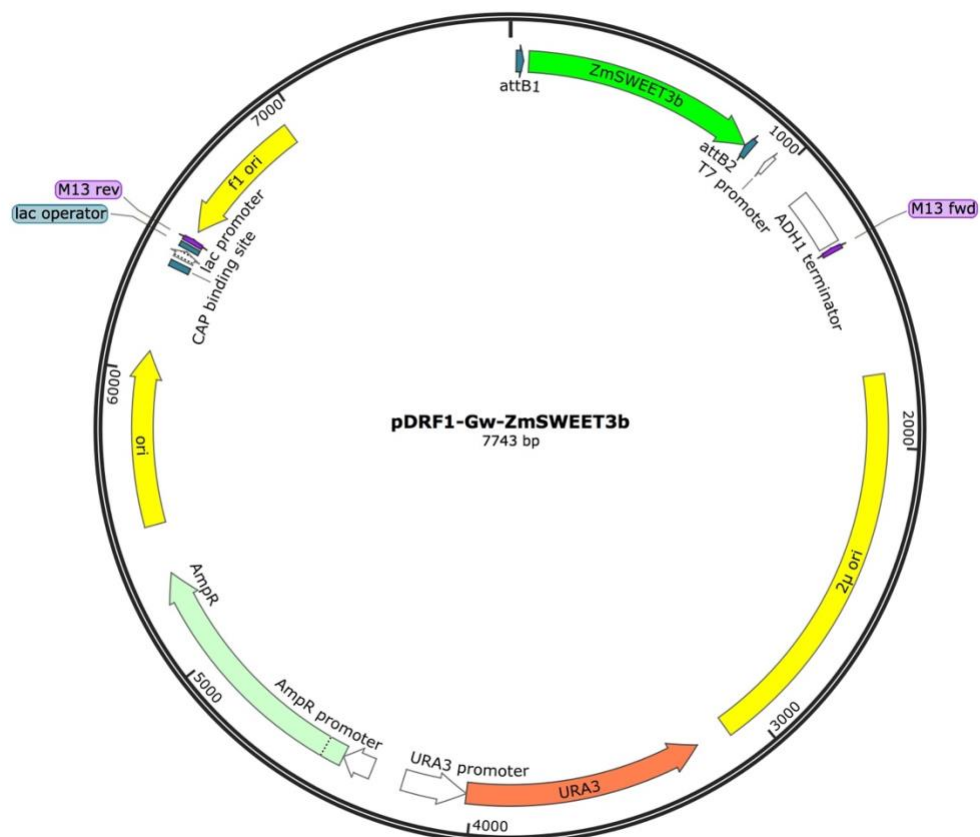
- pDONR-221-ZmSWEET3b:



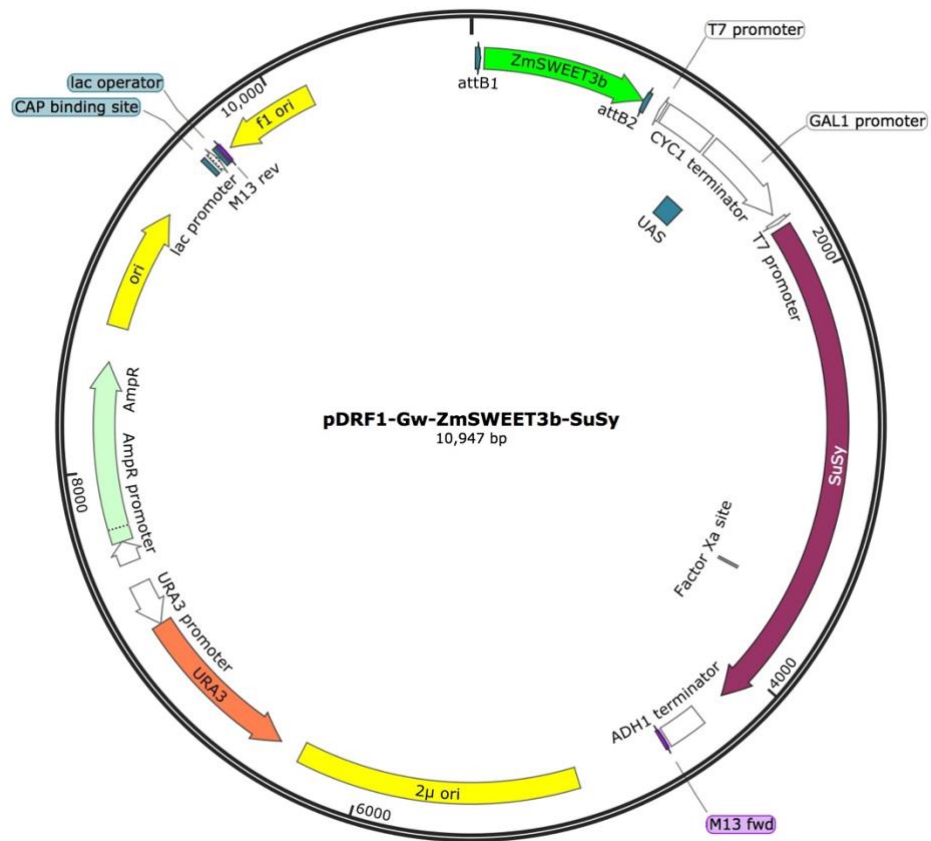
- p14204-eGFP-ZmSWEET3b:



- pDRF1-Gw-ZmSWEET3b:

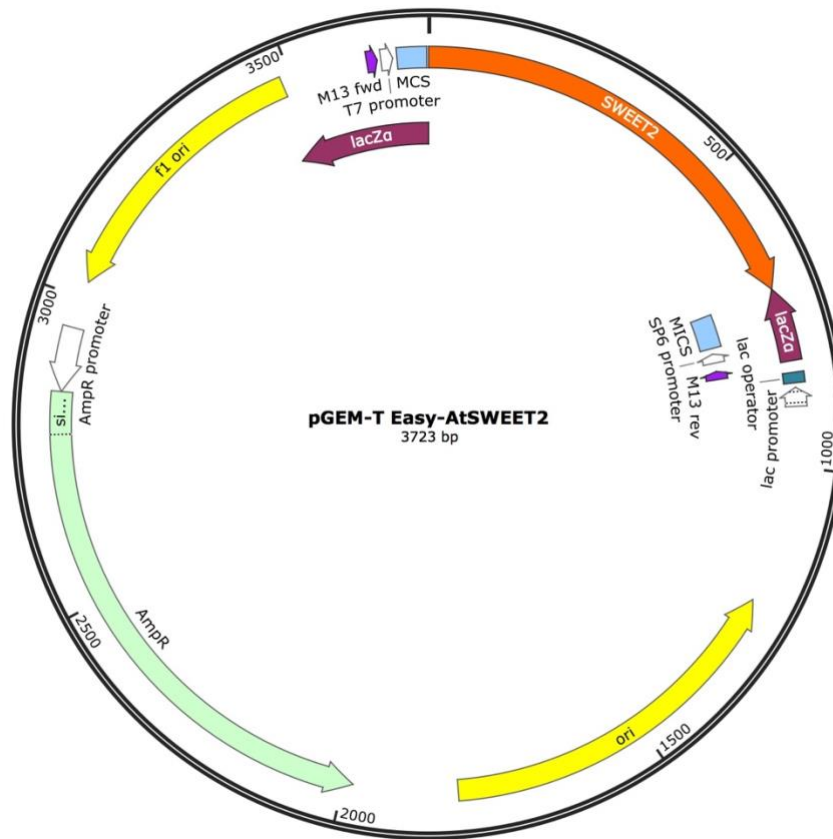


- pDRF1-Gw-ZmSWEET3b-SuSy:



Anexo 5.2. Vectores producidos con el gen *AtSWEET2*:

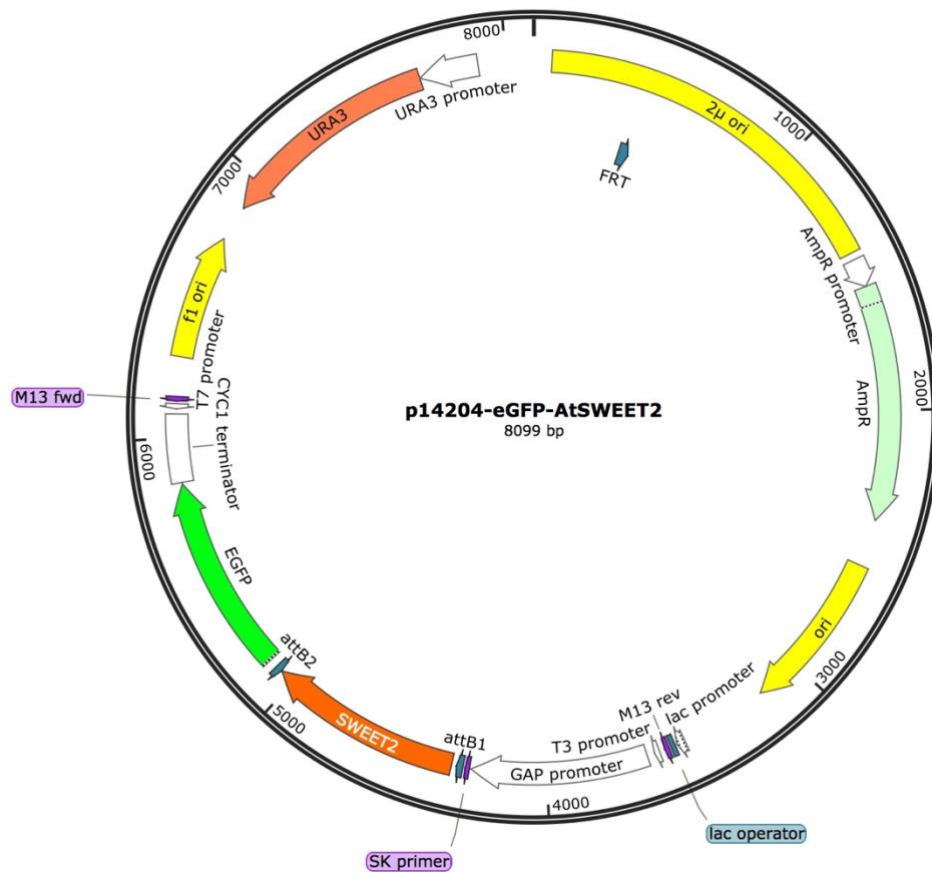
- pGEM T-Easy-*AtSWEET2*:



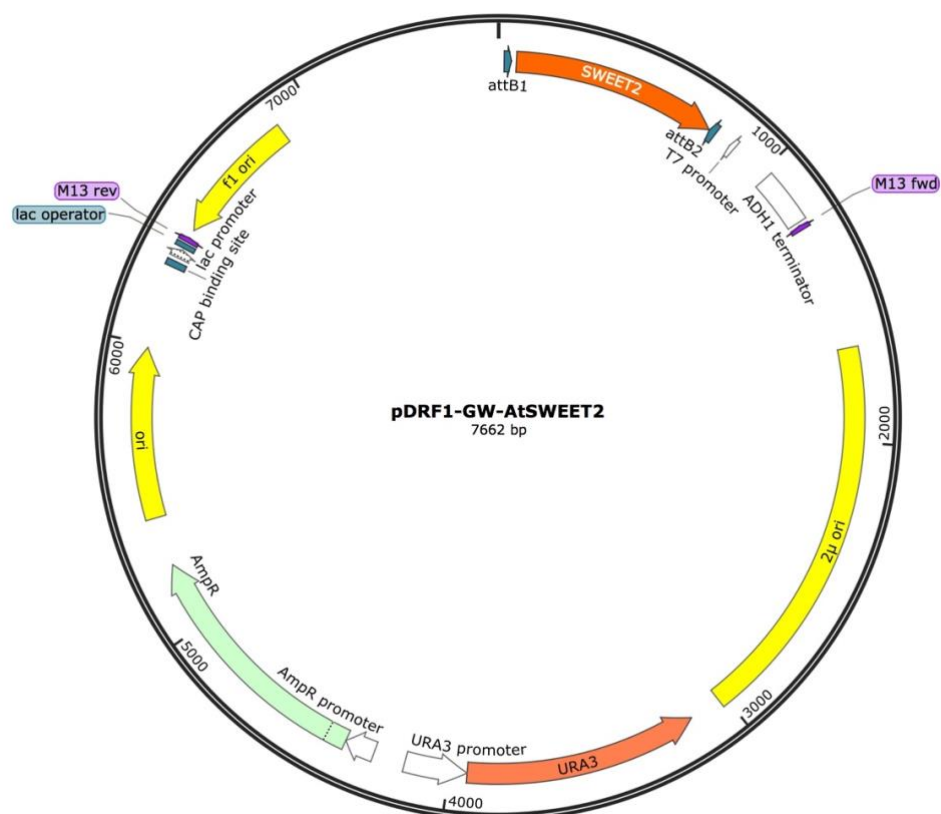
- pDONR-221-*AtSWEET2*:



- p14204-eGFP-AtSWEET2:



- pDRF1-Gw-AtSWEET2:



Anexo 6. Scores de WoLF PSORT de los SWEETs analizados.

Secuencia	Score en WoLF PSORT
AtSWEET1	plas: 6, mito: 2, E.R.: 2, golg: 2, chlo: 1, extr: 1
AtSWEET2	plas: 6, vacu: 3, chlo: 1, cyto: 1, extr: 1, E.R.: 1, golg: 1
AtSWEET3	plas: 8, vacu: 3, golg: 2, E.R.: 1
LjSWEET3	plas: 5, vacu: 5, E.R.: 2, chlo: 1, cyto: 1
ZmSWEET3b	plas: 9, E.R.: 3, chlo: 1, vacu: 1

plas: membrana plasmática, mito: mitocondria, E.R.: retículo endoplásmico, chlo: chloroplasto, extr: extracelular, cyto: citoplasmática y vacu: vacuolar.

Anexo 7. Predicción de la estructura transmembranal del ZmSWEET3b obtenida con el servidor TMHMM2.0.

