

55



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL TRANSPORTADOR DE  
SACAROSA/ $H^+$  EN LA GERMINACION DEL MAIZ

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A

**NAHIELI GREAVES FERNANDEZ**

200319



MEXICO, D. F.

2001.

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE  
SACAROSA/H<sup>+</sup> EN LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
PRESENTA

NAHIELI GREAVES FERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2001

Jurado asignado:

Presidente M. en C. Raúl Aguilar Caballero

Vocal: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Secretario: M. en C. Elpidio García Ramírez

1er. Suplente: Dr. Javier Plasencia de la Parra

2º. Suplente: M. en C. Luis Tonatihut Sánchez Linares

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

Asesor



Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Supervisor técnico



Dr. Javier Plasencia de la Parra

Sustentante



Nahieli Greaves Fernández

*DEDICATORIA*

*A mis padres*

*A Jiro*

*A Luis Alberto*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Facultad de Química**

Agradezco a la **Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo** por su ayuda técnica y apoyo en la realización del proyecto

Se agradece el apoyo técnico de la **M. en C. Manuela Nájera Martínez**.

Agradezco al **Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra** por su valiosa ayuda técnica.

A **Luis Sánchez Linares** y a **Felipe Cruz García** por su apoyo desinteresado

Agradezco a la **Dra. Rocío Cruz Ortega** por su interés y asistencia técnica en la obtención de la sonda.

A los miembros del jurado revisor por sus acertados comentarios y rápida revisión

Se agradece al **Ing. Alberto Trujillo** por la donación de una planta de maíz.

Se agradece también a la **Dra. Laura Ongay Larios, Marcela Sosa y Ma. Guadalupe Códiz** por su valiosa colaboración en la secuenciación de los productos de PCR.

Agradezco la colaboración del **Dr. Mark West** en la realización de la densitometría de las bandas obtenidas.

Este trabajo fue financiado por la **Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA)** con el proyecto IN224098.

Agradezco también la beca para la realización de la tesis a la **Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA)** y a **PROBETEL (Facultad de Química)**.

**Muchas gracias**

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional

A Jiro por cada momento compartido

A Luis Alberto por su apoyo y dedicación en la realización de las figuras y esquemas tanto de la tesis como de la presentación

A mi abuela y a toda mi familia por su apoyo e interés

A Sobeida por su incansable apoyo y ganas de enseñar y compartir

A Begoña, Santiago, David, Poncho y Nohemí por su amistad y las largas y agradables horas de trabajo

A todos mis compañeros del Laboratorio 101, he aprendido mucho de cada uno de ellos

A mis maestros de la Facultad de Química por todas sus enseñanzas

A Fundación Telmex por su apoyo a lo largo de mi carrera

## TABLA DE CONTENIDO

<b>I. RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>A. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE MAÍZ</b>	<b>11</b>
1. <i>Embrión</i>	11
2. <i>Tejidos de reserva no embrionarios</i>	12
<b>B. PRINCIPALES RESERVAS DE NUTRIENTES EN LA SEMILLA DE MAÍZ</b>	<b>12</b>
1. <i>Carbohidratos</i>	12
2. <i>Lípidos</i>	13
3. <i>Proteínas</i>	13
<b>C. GERMINACIÓN</b>	<b>14</b>
1. <i>Definición</i>	14
2. <i>Toma de agua</i>	14
3. <i>Respiración</i>	17
4. <i>Movilización de reservas</i>	18
5. <i>Desarrollo del embrión</i>	19
6. <i>Metabolismo</i>	20
<b>D. LA MEMBRANA PLASMÁTICA</b>	<b>22</b>
1. <i>Composición de la membrana plasmática</i>	22
2. <i>Estructura de la membrana plasmática: Modelo del Mosaico Fluido</i>	24
3. <i>Funciones de las membranas plasmáticas</i>	25
<b>E. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA</b>	<b>26</b>
1. <i>Transporte simplástico y apoplástico</i>	30
<b>F. TRANSLOCACIÓN: MOVIMIENTO DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DEL FLOEMA</b>	<b>30</b>
1. <i>Floema</i>	30
2. <i>Hipótesis del flujo de presiones como mecanismo de transporte a través del floema</i>	33
<b>G. TRANSPORTE DE SACAROSA</b>	<b>33</b>
<b>H. SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup></b>	<b>35</b>
1. <i>Tipos de transportadores de sacarosa</i>	37
2. <i>Caracterización de los simportadores sacarosa/H<sup>+</sup></i>	39
3. <i>Localización de los simportadores sacarosa/H<sup>+</sup></i>	41
4. <i>Evidencia in vivo de la función del simportador sacarosa/H<sup>+</sup></i>	42
5. <i>Estructura del transportador de sacarosa</i>	43



6. Conservación de residuos específicos y relaciones estructural/función	45
<b>III. ANTECEDENTES INMEDIATOS</b>	<b>47</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>48</b>
<b>V. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>49</b>
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>49</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>50</b>
A. ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE GERMINACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ	50
B. ENSAYO DE TRANSCRIPTASA REVERSA – REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	50
C. PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	53
D. ELABORACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	53
E. ENSAYO DE LIGACIÓN DEL INSERTO	54
F. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	55
G. PREPARACIÓN DE DNA DE PLÁSMIDOS (MINIPREP)	55
H. DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS	56
I. AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO	56
J. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	57
K. MARCAJE DE LA SONDA CON [ <sup>32</sup> P]-dCTP POR LA TÉCNICA DE RANDOM PRIMER	57
L. ELABORACIÓN DE UN GEL DESNATURALIZANTE	58
M. NORTHERN BLOT	59
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
A. CURVA DE GERMINACIÓN Y CONTENIDO DE AGUA DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ	61
B. OBTENCIÓN DE LA SONDA ESPECÍFICA PARA EL SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> DEL MAÍZ	63
C. CLONACIÓN DEL cDNA OBTENIDO EN EL ENSAYO DE PCR EN E. COLI CEPA DH5α	64
D. SECUENCIACIÓN DEL INSERTO	64
E. NIVELES DE TRANSCRITO DEL SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> EN DIFERENTES TEJIDOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ	65

---

F. PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> DURANTE LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES DE MAÍZ _____	67
G. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS DEL SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> DE EJES EMBRIONARIOS DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ __	68
H. INFLUENCIA DE DIFERENTES CARBOHIDRATOS SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RNAM DEL SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> _____	69
<b>IX. DISCUSIÓN</b> _____	<b>71</b>
A. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ _____	71
B. EXPRESIÓN DEL RNAM PARA EL SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> EN EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN _____	73
C. EXPRESIÓN DEL RNAM PARA EL TRANSPORTADOR EN DIFERENTES TEJIDOS_	74
D. EFECTO DE DIFERENTES CARBOHIDRATOS EN LA EXPRESIÓN DEL RNAM PARA EL SIMPORTADOR SACAROSA/H <sup>+</sup> _____	75
<b>X. CONCLUSIONES</b> _____	<b>77</b>
<b>XI. B IBLIOGRAFÍA</b> _____	<b>79</b>

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

1. Estructura de la semilla de maíz _____	11
2. Patrón de absorción de agua trifásico durante la germinación _____	16
3. Patrón de consumo de oxígeno por el embrión y por los tejidos de reserva durante y después de la germinación _____	18
4. Configuraciones de las proteínas transmembranales _____	24
5. Esquema de la membrana plasmática según el modelo del mosaico fluido _____	25
6. Caricatura de los diferentes transportadores según su estequiometría _____	28
7. Diagrama que ilustra las tres clases de proteínas transportadoras _____	29
8. Esquema del flujo de presiones a través del floema _____	32
9. Pasos transmembranales en los que se ha propuesto la existencia de transportadores de sacarosa _____	36
10. Árbol filogenético que muestra la relación entre los diferentes transportadores de sacarosa _____	43
11. Estructura propuesta para el simportador sacarosa/H <sup>+</sup> de apio _____	44
12. Plásmido pGEM®-T Easy Vector de Promega _____	54
13. Dispositivo para realizar la transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon _____	59
14. Curvas de germinación y de incremento de peso húmedo en ejes y embriones de maíz. _____	62
15. Fragmentos de cDNA del simportador sacarosa/H <sup>+</sup> obtenidos por la técnica de RT-PCR _____	63
16. Producto de clonación digerido con EcoRI _____	64
17. Secuencia del transportador de sacarosa obtenida a partir del cDNA clonado _____	65
18. Niveles de transcrito para el transportador de sacarosa en los diferentes tejidos de una planta de maíz _____	66
19. Perfil de expresión del transcrito del transportador de sacarosa en la germinación de embriones de maíz _____	68
20. Perfil de expresión del transcrito del simportador sacarosa/H <sup>+</sup> en la germinación de ejes embrionarios de maíz. _____	69
21. Expresión de los niveles de transcrito para el simportador sacarosa/H <sup>+</sup> en embriones germinados en presencia de diferentes carbohidratos _____	70

**ÍNDICE DE TABLAS**

1. Composición porcentual de las reservas almacenadas en diferentes partes de un grano de maiz \_\_\_\_\_ 12
2. Lista de las secuencias para los transportadores de sacarosa disponibles en las bases de datos \_\_\_\_\_ 38
3. Preparación de las mezclas para la síntesis de la segunda cadena de cDNA \_\_\_\_\_ 52

## I. RESUMEN

Durante la germinación, las reservas almacenadas en el endospermo se movilizan a través del escutelo para llegar al eje embrionario y proporcionarle los nutrientes indispensables para su desarrollo. El escutelo juega un papel muy importante en la movilización de reservas, ya que secreta enzimas hidrolíticas para degradar los compuestos almacenados en formas complejas hasta compuestos más sencillos, de fácil utilización por el eje embrionario (Derek y Black, 1994).

La sacarosa es el principal carbohidrato que se transloca en las plantas; se ha demostrado que el transporte de este carbohidrato es de tipo simporte, ya que la sacarosa es transportada hacia el interior de las células junto con protones (Lemoine, 2000; Aoki *et al.*, 1999). El gradiente de protones que dirige este transporte, está dado por la ATPasa de protones de la membrana plasmática. Recientemente se caracterizó esta enzima en embriones de maíz entre las 0 y 5 horas de germinación, demostrando que se encuentra presente y que inicia su actividad de bombeo de protones en cuanto comienza la imbibición (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998).

En arroz, se demostró la presencia del simportador de sacarosa durante la germinación, así como la inducción de éste por la presencia de carbohidratos administrados de manera exógena (Matsukura *et al.*, 2000).

En el presente trabajo, se obtuvo una sonda específica de cDNA del simportador de sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz con base en la secuencia reportada por Aoki *et al.* (1999). Con esta sonda se estudió el perfil de expresión del RNAm durante los primeros tres días de germinación de embriones y ejes embrionarios de maíz, encontrando que la expresión del transportador se incrementa conforme avanza el tiempo de germinación y que el escutelo puede jugar un papel fundamental en el transporte de sacarosa hacia el eje embrionario, ya que la mayor cantidad del simportador de sacarosa/H<sup>+</sup> se encuentra presente en este tejido.

Además, se estudió la influencia de los carbohidratos sobre la expresión del transportador, ya que existen reportes contradictorios con respecto a la inducción o represión de la expresión del transportador en diferentes especies y tejidos. Se encontró que tanto la fructosa como la glucosa ejercen una fuerte represión sobre la expresión del simportador,

mientras que la sacarosa parece no tener ningún efecto y la maltosa lo reprime ligeramente. Lo anterior coincide con algunos reportes que indican que los genes de las proteínas involucradas en el metabolismo de la sacarosa son reprimidos por glucosa, que es una fuente de carbono fácilmente asimilable (Lalonde *et al.*, 1999).

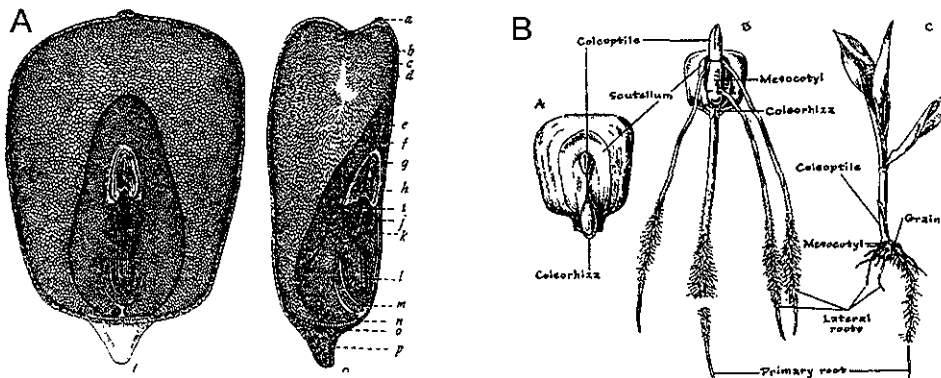
Las plantas son organismos autótrofos, sin embargo, poseen algunos tejidos heterótrofos, por lo que los compuestos sintetizados en los tejidos fotosintéticos (tejidos fuente) deben viajar a través del floema para llegar hacia los tejidos que lo requieren (tejidos demanda). Se ha demostrado que el transportador de sacarosa es el responsable de la descarga de sacarosa hacia el floema; asimismo se postula que puede ser responsable de la descarga de este carbohidrato desde el floema hacia los tejidos demanda, ya que se ha detectado la presencia del transportador en estos tejidos de algunas especies, como zanahoria (Shakia y Sturm, 1998). Para investigar el papel del simportador en la distribución de sacarosa en la planta de maíz, se detectaron y compararon los niveles de transcrito en varios tejidos, encontrando que la expresión mas alta para el transportador se encuentra en tallo, hoja, espiga y embrión germinado durante 72 horas, mientras que en raíz, pistilo y embrión inmaduro la expresión del transportador es muy baja. Lo anterior sugiere que en el maíz, la descarga desde las hojas hacia el floema se lleva a cabo a través del simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, mientras que la descarga desde el floema hacia los tejidos demanda se lleva a cabo por medio de otro mecanismo independiente del transportador.

## II. INTRODUCCIÓN

### A. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE MAÍZ

#### 1. Embrión

El embrión maduro de la planta de maíz está formado por un eje embrionario y un cotiledón, que está modificado formando el escutelo, el cual además de funcionar como reservorio de nutrientes; lleva a cabo la absorción de los nutrientes que se encuentran almacenados en el endospermo. El eje embrionario de maíz está constituido por tres regiones diferenciadas: la radícula, el mesocotilo (región que une al eje embrionario con el escutelo) y la plúmula (apéndice donde se encuentran las primeras hojas) (Figura 1). Tanto la radícula como la plúmula se encuentran cubiertas por la coleoriza y el coleoptilo respectivamente, estructuras que servirán como protección durante su emergencia en la germinación. (Raven *et al.*, 1992; Derek y Black, 1994).



**Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.** A. Corte longitudinal y lateral de una semilla de maíz mostrando las estructuras que la componen: a) cicatriz; b) pericarpio; c) aleurona; d) endospermo; e) escutelo; f) capa glandular del escutelo; g) coleoptilo; h) plúmula con tallo y hojas; i) primer internodo; j) raíz lateral seminal; k) nodo escutelar; l) raíz primaria; m) coleoriza; n) células basales conductoras del endospermo; o) capa café de abscisión; p) pedicelo

B. Estructuras principales durante la germinación de una semilla de maíz y su transformación a planta. (Neuffer *et al.*, 1997 Foster y Gifford, 1959)

## 2. Tejidos de reserva no embrionarios

En la semilla de maíz madura el **endospermo** es el principal tejido de almacenamiento de nutrientes, en este tejido, la mayoría de las células están muertas y el espacio citoplásmico se ha obstruido con reservas de nutrientes que fueron sintetizadas durante el desarrollo de la semilla. Existe en el exterior del endospermo un tejido vivo, llamado **capa de aleurona**, que no almacena reservas, sino que tiene como función secretar las enzimas necesarias para su movilización (Derek y Black, 1994).

### B. PRINCIPALES RESERVAS DE NUTRIENTES EN LA SEMILLA DE MAÍZ

Además de los componentes normales presentes en todos los tejidos vegetales, las semillas contienen cantidades adicionales de sustancias almacenadas como reservas alimenticias para mantener a la plántula en sus primeras etapas de desarrollo. En el maíz, las reservas se encuentran almacenadas tanto en el embrión como en los tejidos extraembrionarios, aunque la mayoría de éstas se localizan en el endospermo, el cual contiene regiones ricas en proteínas (endospermo córneo) y regiones ricas en almidón (endospermo harinoso) (Derek y Black, 1994).

**Tabla 1. Composición porcentual de las reservas almacenadas en diferentes partes de un grano de maíz (Derek y Black, 1994).**

Reserva	Grano entero	Endospermo	Embrión
Almidón	74	88	9
Grasas	4	< 1	31
Proteínas	8	7	19

## 1. Carbohidratos

En el maíz, la principal reserva de nutrientes está constituida por los carbohidratos (Tabla 1); de éstos, la forma más común es el **almidón**, constituido por amilosa y amilopectina, aunque también se encuentran presentes las hemicelulosas, compuestos amiloides y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa. También hay celulosa, pectinas y



mucilagos, aunque éstos tienen una función estructural más que de reserva. El almidón se encuentra almacenado en cuerpos subcelulares definidos llamados **cuerpos o granos de almidón**. La mayoría de estos granos se encuentran constituidos de aproximadamente 50-75% de amilopectina y 20-25% de amilosa (Derek y Black, 1994).

## 2. Lípidos

Las semillas de maíz contienen **triacilgliceroles**, de los cuales la mayoría son aceites, asimismo contienen fosfolípidos, glucolípidos y esteroides. Los ácidos grasos predominantes en las semillas son insaturados, y de éstos, el ácido oleico y el linoleico constituyen el 60% en peso de los lípidos totales de la semilla. Los triacilgliceroles se encuentran almacenados en organelos subcelulares llamados **cuerpos grasos** (Derek y Black, 1994). Los lípidos suministran la mayor cantidad de energía potencial por unidad de peso (Street y Öpik, 1986).

## 3. Proteínas

La principal proteína de almacenamiento encontrada en el endospermo de maíz es de tipo **prolamina** (aproximadamente 55%), estas proteínas son solubles en soluciones alcohol-agua; también se pueden encontrar proteínas denominadas **glutelinas**, con un porcentaje aproximado de 39%, éstas proteínas son solubles en ácidos o bases diluidas. Las proteínas de reserva de las semillas, se depositan dentro de organelos celulares especiales llamados **cuerpos proteicos**. Dentro de estos cuerpos puede haber enzimas que, durante la movilización de reservas, los conviertan en vacuolas autolíticas (Derek y Black, 1994).

## C. GERMINACIÓN

### 1. Definición

La germinación es el proceso que desencadena la rehidratación de la semilla y el inicio de la expansión de la radícula, involucrando la transición de las células de un estado poco hidratado (< 10% de contenido de agua en semillas de maíz) y baja actividad metabólica a un estado hidratado de intensa actividad metabólica. Dicho proceso culmina con el desarrollo de la radícula, que generalmente se debe al alargamiento celular, y su penetración en los tejidos adyacentes (Flores, 1999).

Durante la germinación, se reinicia la actividad metabólica y el crecimiento de los tejidos de la semilla, lo cual involucra procesos de rehidratación de proteínas, cambios en las estructuras subcelulares, respiración, utilización de las reservas de nutrientes, síntesis de macromoléculas, elongación de la radícula y desarrollo gradual de los sistemas sintéticos que permitirán a la nueva planta ser un organismo autótrofo (Street, H. E. y Öpik, H. 1986; Derek y Black, 1994).

Existen diversos factores ambientales que están involucrados directamente en el proceso de germinación, como son: temperatura, luz, gases y disponibilidad de nutrientes (Flores, 1999).

### 2. Toma de agua

En la semilla seca (antes de germinar), el endospermo es un tejido relativamente duro compuesto por células muertas, que representan una barrera para el crecimiento del embrión (Meyer *et al.*, 1973). Debido al escaso contenido de agua en las semillas secas (5-20%), su tasa metabólica es extremadamente baja, comparada con otros tejidos de la planta que se encuentran activos y cuyo contenido de agua oscila entre el 80 y el 95%. La mayor parte del agua presente en las semillas secas se encuentra fuertemente unida a coloides, por lo que se encuentra inaccesible para las reacciones hidrolíticas (Street y Öpik, 1986).

La imbibición de agua es el primer requisito para la germinación de las semillas, ya que permite la reactivación metabólica y la restauración de membranas y organelos; (Flores, 1999) ésta ocasiona un hinchamiento de la semilla, que es mayor en las células del embrión que en las células muertas del endospermo; debido a esto, la cubierta se rompe durante la fase de hidratación (Street y Öpik, 1986).

Dentro de la semilla, el agua avanza por capas de células, así que la hidratación no es homogénea. El movimiento de agua es mas rápido en los tejidos embrionarios que en los tejidos de almacenamiento de nutrientes (Street y Öpik, 1986). Bajo condiciones óptimas, la absorción de agua por la semilla es trifásica (Figura 2); a continuación se da una breve descripción de cada una de las fases que la componen:

a) **Fase rápida de imbibición inicial o fase I:** El potencial de agua de la semilla seca madura es mucho menor que el del suelo circundante. Está influida por la hidratación de matrices, tales como la pared celular, almidón y cuerpos proteicos (fuerzas mátricas,  $\Psi_c$ ). Esta fase es importante, ya que si la imbibición es muy rápida, las semillas pueden resultar dañadas. En este período se desprende energía en forma de calor y los gases de adsorción coloidal y los solutos son liberados como azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos y proteínas. Durante esta etapa, el contenido de agua de la semilla se incrementa hasta un 50-60% (Flores, 1999; Street y Öpik, 1986; Derek y Black, 1994). Durante la hidratación, las células y organelos subcelulares recuperan su forma y tamaño y el citoplasma recobra su estructura normal. Durante los primeros minutos de imbibición, las células pierden iones, carbohidratos e incluso proteínas (Street y Öpik, 1986). Lo anterior significa que la membrana semipermeable de las células, que normalmente es capaz de retener los solutos dentro de ellas, no actúa como barrera de retención durante la etapa inicial de la imbibición. La causa de esta fragilidad de las membranas es que durante la desecación de la semilla, la membrana sufre una transición de su estado líquido cristalino a un estado de gel, y durante la imbibición este proceso se revierte, lo que debilita temporalmente la estructura membranal. La incorporación de algunas moléculas, tales como sacarosa u oligosacáridos de rafinosa a los fosfolípidos de la membrana plasmática, evitan parcialmente la formación del estado de gel y por lo tanto la pérdida de solutos durante el inicio de la imbibición (Derek y Black, 1994).

- b) **Fase de ingreso lento de agua o fase II:** En esta fase el componente mátrico ya no es importante y el potencial de agua de la semilla ( $\Psi$ ) está dado por la concentración de solutos (potencial osmótico,  $\Psi_s$ ) y por la presión de potencial ( $\Psi_p$ ) que permite el ingreso de agua y genera presión en la pared celular (Flores, 1999).
- c) **Fase de elongación radicular o fase III:** Esta fase tiene lugar únicamente en semillas que se encuentran germinando activamente y generalmente coincide con la ruptura seminal y el comienzo del alargamiento y protrusión de la radícula. El incremento en la incorporación de agua está dado inicialmente por los cambios que experimentan las células de la radícula (Flores, 1999; Derek y Black, 1994).

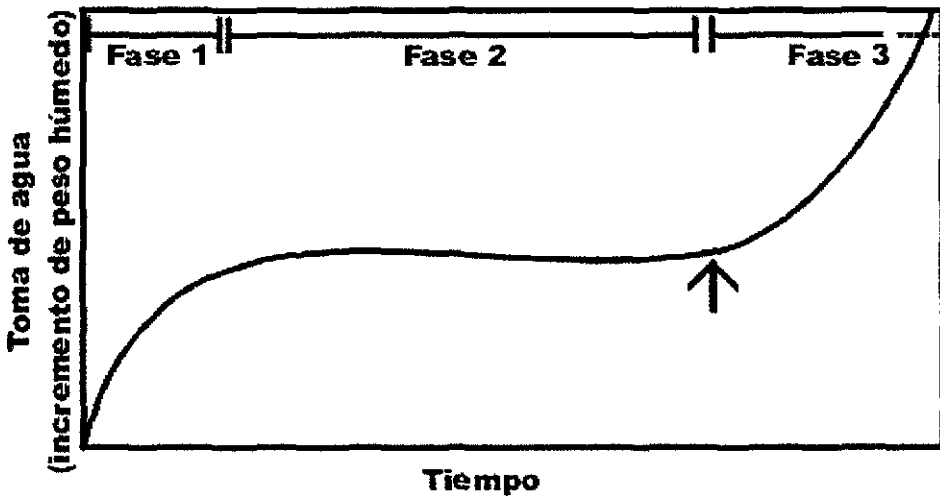


Figura 2. Patrón de absorción de agua trifásico durante la germinación. La flecha indica el tiempo en que ocurre la protrusión de la radícula (Derek y Black, 1994).

### 3. Respiración

En las semillas secas maduras la tasa respiratoria es muy baja comparada con las semillas en proceso de germinación, ya que el metabolismo tan intenso de estas últimas se acompaña de tasas respiratorias muy elevadas, tanto en el embrión como en los tejidos de almacenamiento. La concentración de ATP se incrementa rápidamente en las semillas embebidas. Después de la fase de hidratación, el incremento en la respiración está asociado con el aumento de enzimas respiratorias (Street y Ópik, 1986).

Existen tres vías a través de las cuales las semillas hidratadas llevan a cabo la respiración: glucólisis, vía de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs (Derek y Black, 1994).

Los cetoácidos ( $\alpha$ -cetoglutarato y piruvato), intermediarios importantes en el metabolismo respiratorio, son inestables y no se encuentran en las semillas secas, por lo que durante los primeros minutos de imbibición se regeneran a partir de aminoácidos, por medio de reacciones de desaminación y transaminación (Derek y Black, 1994).

La respiración involucra tres fases en el tejido embrionario y cuatro fases en los tejidos de reserva de nutrientes (Figura 3):

- **Fase I:** Inicialmente hay un incremento pronunciado en el consumo de oxígeno, que se debe a la activación e hidratación de las enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena transportadora de electrones (Derek y Black, 1994).
- **Fase II:** Es una fase de respiración lenta en la que el consumo de oxígeno se estabiliza y aumenta ligeramente. La hidratación de la semilla está completa y todas las enzimas preexistentes se encuentran activadas. Además hay una acumulación de piruvato, debido a que la activación de la glucólisis es más rápida que el desarrollo de las mitocondrias (Derek y Black, 1994).
- **Fase III:** En esta fase hay un segundo incremento respiratorio. En el embrión, esto se debe a un aumento en la actividad de las mitocondrias recién sintetizadas y al incremento de enzimas en las células del eje embrionario. En los tejidos de almacenamiento, el

número de mitocondrias también aumenta en proporción a la movilización de reservas (Derek y Black, 1994).

- **Fase IV:** Únicamente ocurre en los tejidos de reserva de nutrientes y coincide con su senescencia y el vaciamiento de las reservas almacenadas (Derek y Black, 1994).

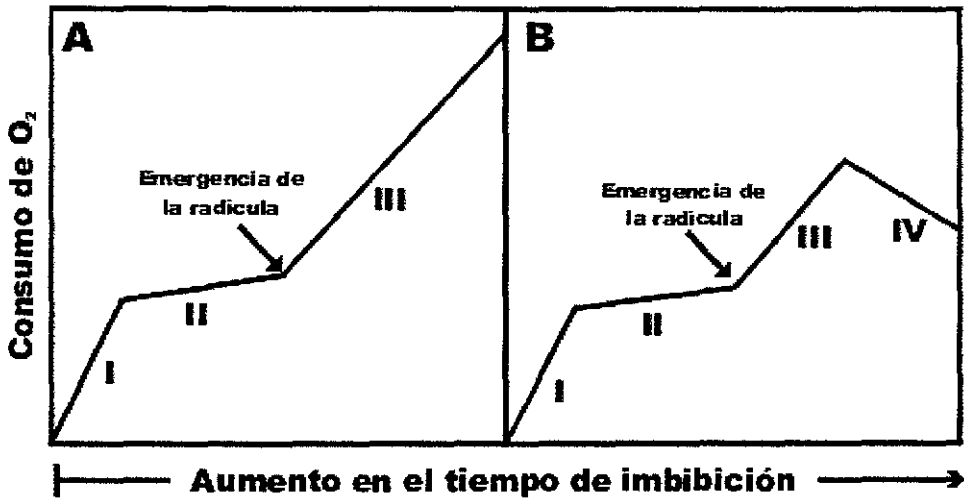


Figura 3. Patrón de consumo de oxígeno durante y después de la germinación por el embrión (A) y por los tejidos de reserva (B) (Derek y Black, 1994).

#### 4. Movilización de reservas

El metabolismo de los tejidos de reserva está encaminado hacia la hidrólisis de los nutrientes almacenados y a la traslocación de los productos solubles hacia las regiones en desarrollo (Street y Öpik, 1986).

La movilización de reservas y la activación enzimática dependen de la hidratación. Las amilasas son el primer sistema enzimático involucrado en la transformación de almidón en

azúcares solubles Las lipasas degradan los lípidos a ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos son  $\beta$ -oxidados a acetil coenzima A, que ingresa al ciclo del glioxilato y forma posteriormente carbohidratos. Algunas proteínas que también sirven como nutrientes son convertidas a formas solubles. Al inicio de la hidratación, los cuerpos proteicos se tornan difusos y luego desaparecen, para formar una única vacuola central y los liposomas desaparecen debido a la hidrólisis de triglicéridos (Flores, 1999).

En el maíz, la proporción de compuestos solubles se incrementa desde un 2% inicial hasta un 25% del peso seco durante los primeros cinco días de germinación. Una porción de los productos solubles se utiliza para la respiración, pero la mayor parte es transportada hacia el embrión. El escutelo actúa como un órgano de absorción, absorbiendo la glucosa y transformándola en sacarosa. La utilización de los productos de hidrólisis para síntesis de nuevos compuestos, requiere de interconversiones de los metabolitos, debido a que la composición química de las nuevas células es muy diferente de las células del tejido de almacenamiento. La mayoría de los lípidos almacenados son convertidos a sacarosa en los tejidos de almacenamiento (ciclo del glioxilato) y posteriormente son trasladados al embrión (Street y Öpik, 1986).

### 5. Desarrollo del embrión

El crecimiento del eje embrionario se inicia con la emergencia de la radícula, precediendo el alargamiento a la división celular. Esto es importante, ya que de esta manera, la planta puede tomar agua y minerales del suelo desde antes de que la fotosíntesis se establezca. Los cambios subcelulares de las células del eje embrionario implican la activación de los organelos preexistentes, la hidrólisis de reservas y el desarrollo de vacuolas. El escutelo está involucrado en el transporte de metabolitos del endospermo hacia el eje embrionario y en la liberación de enzimas hacia el endospermo. La diferenciación vascular en maíz es muy rápida y al inicio de la germinación se observan xilema y floema en el escutelo, el coleoptilo y la primera hoja foliar (Flores, 1999; Milthorpe y Moorby, 1974).

El crecimiento de la radícula se inicia cuando hay un relajamiento de sus paredes celulares. Se ha sugerido que este relajamiento se debe a que las células en expansión secretan protones hacia la pared celular, resultando en su acidificación, lo que conduce a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las cadenas adyacentes de los carbohidratos que

forman la pared celular; otra causa puede ser la activación de enzimas hidrolíticas que tienen un pH óptimo ácido. La disminución de la rigidez de la pared permite el crecimiento de las células radiculares (Derek y Black, 1994).

## 6. Metabolismo

El metabolismo de los tejidos de reserva de las semillas es de tipo catabólico, mientras que el metabolismo del embrión es anabólico. (Street y Öpik, 1986).

En el maíz, el endospermo está diferenciado en la capa de aleurona, que es metabólicamente activa, y las células del endospermo, que están muertas. En las semillas en reposo, las proteasas y esterasas se encuentran restringidas a la capa de aleurona y al embrión. La capa de aleurona contiene reservas de proteína y fitina. Sin embargo, la  $\beta$ -amilasa se encuentra en el endospermo y no en la capa de aleurona. Durante la germinación, la capa de aleurona secreta otras enzimas, como  $\alpha$ -amilasa hacia el endospermo para la degradación de polímeros de carbohidratos (Street y Öpik, 1986).

Durante las primeras etapas de la germinación, hay un incremento en las reservas totales de nucleótidos trifosfato. Al principio de la germinación, predomina la glucólisis, conduciendo a la formación de piruvato y a una discreta síntesis de ATP. Posteriormente, predomina la vía de las pentosas fosfato y se produce NADPH, que proporciona el poder reductor (Derek y Black, 1994).

Durante las primeras 24 horas de germinación, la extensión y división de las células del embrión depende completamente del consumo de los aminoácidos, lípidos y carbohidratos almacenados (Milthorpe y Moorby, 1974).

Las enzimas indispensables para el metabolismo básico, tales como las enzimas respiratorias, se encuentran presentes en las semillas secas pero requieren de la hidratación para activarse. Por el contrario, las enzimas hidrolíticas son sintetizadas *de novo* y aparecen principalmente después de la hidratación (Street y Öpik, 1986; Derek y Black, 1994).



Las enzimas hidrolíticas involucradas en la germinación son básicamente de dos tipos:

- a) Enzimas involucradas en la degradación de reservas de nutrientes: Convierten formas no respirables y no asimilables de nutrientes en formas asimilables.
- b) Enzimas que hidrolizan los componentes de la pared celular: Eliminan las barreras físicas que impiden el desarrollo del embrión (Meyer *et al.*, 1973).

Existen en las semillas en germinación dos diferentes fases de síntesis de DNA; durante las primeras horas de imbibición, hay una reparación del daño causado en el DNA durante el secado en el proceso de maduración de la semilla y su almacenamiento en la semilla seca. Posteriormente, la síntesis de DNA se asocia con la división celular de los tejidos en desarrollo (Derek y Black, 1994).

En las semillas secas se encuentran presentes ribosomas activos, que contienen RNAr, asimismo, las semillas contienen RNAt y RNAm. Existen, antes de la germinación, dos poblaciones de RNAm: los residuales y los almacenados. Los RNAm residuales son necesarios para sintetizar proteínas durante la maduración de la semilla, no se requieren para la germinación y son destruidos rápidamente después de la imbibición mientras que los RNAm almacenados se forman durante la maduración de la semilla de tal manera que se encuentran disponibles para ser traducidos a proteínas al comienzo de la germinación (Derek y Black, 1994). Poco tiempo después de la hidratación de las semillas secas, comienza la formación de polisomas y solamente de 10 a 15 minutos después de la imbibición, la semilla es capaz de sintetizar proteínas. Sin embargo, dentro de los primeros 30-90 minutos después de la hidratación, las células comienzan a sintetizar RNAm. Aunque se puede llevar a cabo la síntesis de proteínas en ausencia de síntesis de RNAm al inicio de la imbibición, posteriormente se hace indispensable la síntesis *de novo* para continuar con la germinación (Derek y Black, 1994).

Los genes que se expresan durante la germinación se pueden clasificar en dos tipos diferentes:

- a) Genes que codifican para enzimas y otras proteínas necesarias para las funciones básicas de las células, como respiración, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, síntesis de membranas y metabolismo de nucleótidos.
- b) Genes involucrados directamente con el proceso de germinación (Derek y Black, 1994).

## D. LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Las células vegetales contienen una diversidad de organelos y sistemas membranales entre los que se encuentran los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi, tonoplasto, retículo endoplásmico, vesículas y un núcleo; todos ellos se encuentran embebidos en el citoplasma y están delimitados dentro de la célula por una membrana plasmática, que a su vez está rodeada por una pared celular. Mientras que la pared celular proporciona a las células vegetales protección contra daños mecánicos, la membrana plasmática proporciona un medio relativamente constante para el metabolismo intracelular, realizando un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores (Larsson y Möller, 1990).

### 1. Composición de la membrana plasmática

Los principales componentes de la membrana plasmática son lípidos, proteínas y carbohidratos (Larsson y Möller, 1990).

a) **Lípidos:** Los lípidos principales de la membrana plasmática vegetal son los **esteroles, glicolípidos y fosfolípidos.**

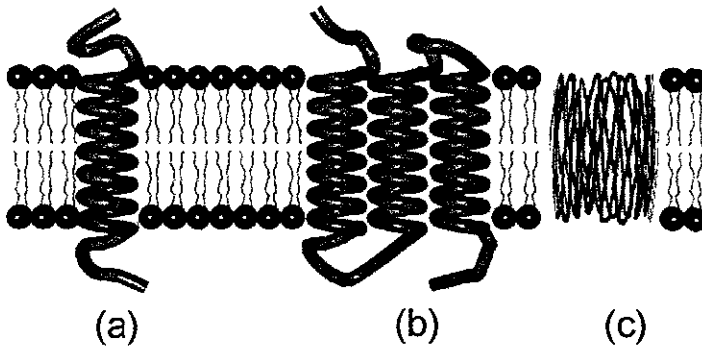
- **Esteroles:** La mayoría se encuentra en forma libre, aunque también hay una pequeña proporción en forma de ésteres, glicósidos y glicósidos acilados. La glicosilación de los esteroles ocurre en la membrana plasmática y es catalizada por la enzima UDP-glucosa:esterol glicosiltransferasa. De los esteroles libres, los más abundantes en células vegetales son el sitosterol, campesterol y estigmasterol. La composición de esteroles libres de la membrana plasmática varía dependiendo de los diferentes tejidos vegetales.
- **Glicolípidos:** El principal glicolípido hallado en la membrana plasmática es el glucocerebrósido, aunque también existen en menor cantidad monogalactosildiacilglicerol y digalactosildiacilglicerol.
- **Fosfolípidos:** La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son los fosfolípidos mayoritarios en las células vegetales. El tercer fosfolípido en abundancia es el ácido fosfatídico.

- **Ácidos grasos:** Los más abundantes son el palmítico (16:0), linoléico (18:2) y linolénico (18:3).

El punto isoelectrico de la superficie apoplástica de la membrana es muy bajo, lo que sugiere que la distribución de fosfolípidos, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico, que son muy ácidos, es principalmente en la parte externa de la membrana plasmática (Larsson y Möller, 1990).

**b) Proteínas:** Las proteínas membranales se han clasificado en dos grandes grupos:

- **Proteínas integrales o intrínsecas:** Contienen secuencias hidrofóbicas largas y atraviesan la membrana una o varias veces. Tienen orientaciones definidas en las membranas y las secuencias de cada lado tienen diferentes aminoácidos y estructura terciaria. Se encuentran unidas firmemente a la membrana y únicamente se pueden liberar con detergentes o tratamientos similares. En la superficie externa de algunas proteínas, se encuentran anclados **carbohidratos** de cadena corta que forman una cubierta en el exterior de la célula y que se cree que juegan un papel importante en los procesos de adhesión célula-célula y en el reconocimiento de moléculas (hormonas, virus y antibióticos) que interactúan con éstas. Las proteínas integrales son de particular interés ya que pueden estar involucradas en el transporte de solutos, síntesis de pared celular, transducción de señales y transporte de electrones entre otras funciones. Se han identificado tres configuraciones básicas de las proteínas transmembranales: **(a)** una alfa-hélice embebida en el interior hidrofóbico de la membrana con porciones hidrofílicas irregulares a ambos lados de ella (Figura 4a), **(b)** proteínas globulares grandes con estructuras terciaria y cuaternaria complejas que atraviesan repetidamente la membrana formando series de alfa-hélices (Figura 4b) y **(c)** porinas, que son proteínas triméricas cuyos monómeros están conformados por un barril beta de 16 cadenas. Esta proteína forma un poro a través de la membrana por el cual pueden atravesar solutos polares (Figura 4c). (Larsson y Möller, 1990; Raven *et al.*, 1992; Voet y Voet, 1995).



**Figura 4 . Configuraciones de las proteínas transmembranales.** a) alfa hélice embebida en la membrana; b) proteína globular compleja que atraviesa varias veces la membrana en series de alfa hélices; c) porina, proteína trimérica con configuración de barril beta (adaptado de Raven *et al.*, 1992; Voet y Voet, 1995).

- **Proteínas periféricas o extrínsecas:** Tienen secuencias hidrofílicas y están unidas a la superficie de la membrana, generalmente mediante interacciones electrostáticas y se pueden remover lavando las membranas en condiciones de alta salinidad y pH (Larsson y Möller, 1990) .

## 2. Estructura de la membrana plasmática: Modelo del Mosaico Fluido

El modelo del mosaico fluido fue propuesto por S. Jonathan Singer y Garth Nicholson en 1972 y establece que las membranas tienen una estructura básica que consiste en una bicapa lipídica en la cual las proteínas están embebidas y pueden difundir lateralmente, a menos que se encuentren asociadas con componentes celulares (Figura 5). Debido a su carácter anfipático, los lípidos membranales forman bicapas en medios acuosos, de tal

manera que sus cadenas hidrocarbonadas quedan protegidas del contacto con el agua. Esta disposición permite que las porciones polares de los lípidos membranales formen interacciones adecuadas con las proteínas extrínsecas, los iones y otras moléculas (Dey y Harborne, 1997; Voet y Voet, 1995).

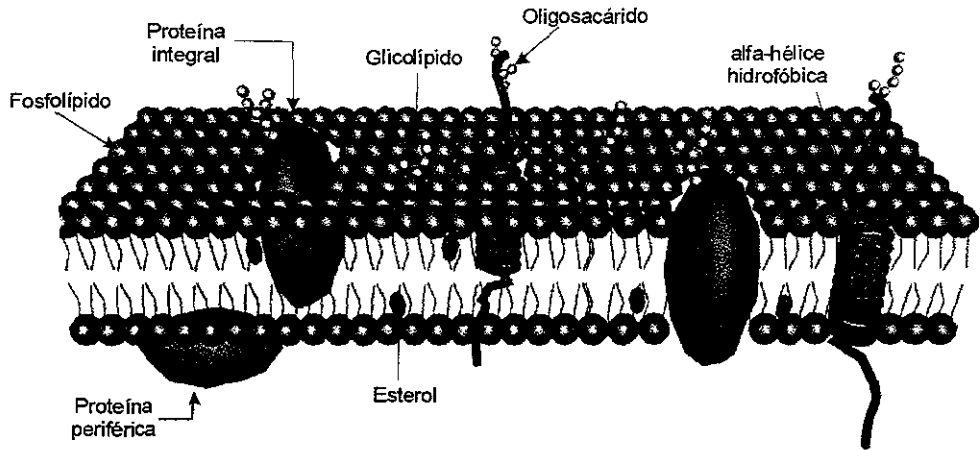


Figura 5. Esquema de la membrana plasmática según el modelo del mosaico fluido (adaptado de Voet y Voet, 1995).

### 3. Funciones de las membranas plasmáticas

- Proporcionan una barrera selectivamente permeable para muchas moléculas, permitiendo a las células mantener ambientes en los que se pueden llevar a cabo los diversos procesos metabólicos.
- En ellas se llevan a cabo las funciones enzimáticas de las proteínas intrínsecas.
- Las membranas se pueden utilizar en el empaquetamiento de compuestos y en procesos secretorios.

- Las membranas contienen receptores que sirven para mediar la influencia de las señales externas.
- Se encuentran en ella proteínas transportadoras que ayudarán a la acumulación selectiva de ciertos metabolitos.

### **E. TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA**

La naturaleza no polar de las membranas plasmáticas permite que compuestos *hidrofóbicos*, como el oxígeno y compuestos polares pequeños y sin carga, como el agua, difundan con facilidad a través de ellas; sin embargo, las hace altamente impermeables a la mayoría de los iones y compuestos polares, de tal manera que estas sustancias pueden atravesar las membranas únicamente mediante la acción de **proteínas transportadoras**. Dichas proteínas se requieren para mediar los movimientos transmembranales de iones y metabolitos y son responsables de los fenómenos electroquímicos que ocurren en las células (Voet y Voet, 1995; Raven *et al.*, 1992).

Las proteínas transportadoras son muy selectivas, tienen orientaciones membranales y *atravesan la membrana plasmática en repetidas ocasiones*. Gracias a ellas, los solutos pueden atravesar la membrana plasmática sin entrar en contacto con la matriz lipídica (Raven *et al.*, 1992).

El transporte de sustancias a través de la membrana se ha clasificado en tres categorías:

- a) **Transporte pasivo:** Se lleva a cabo cuando las moléculas atraviesan la membrana a favor del gradiente de concentración o a favor del gradiente electroquímico. Si la molécula no tiene carga, la dirección de su transporte se determina únicamente por la diferencia de concentración de dicha molécula en ambos lados de la membrana (**gradiente de concentración**). Sin embargo, si la molécula tiene carga, tanto el gradiente de concentración como el gradiente eléctrico a través de la membrana dirigen el transporte; ambos gradientes constituyen el **gradiente electroquímico** (Raven *et al.*, 1992).

- b) **Difusión facilitada:** Es el paso de sustancias a través de la membrana con la ayuda de una proteína acarreadora y a favor del gradiente de concentración (Raven *et al.*, 1992).
- c) **Transporte activo:** Se lleva a cabo en contra del gradiente de concentración e involucra la conversión de energía almacenada en enlaces químicos en gradientes electroquímicos de solutos (Wolfersberger, 1994). En plantas, una  $H^+$ -ATPasa genera un gran potencial eléctrico y un gradiente de pH, que es la fuerza motriz para el transporte de sustancias acoplado al transporte de protones. Gracias a este proceso, las células pueden acumular en su interior solutos, aún cuando la concentración en el exterior sea menor. El proceso directamente dependiente de energía (la bomba de protones) se conoce como **transporte activo primario**, mientras que al proceso de cotransporte se le llama **transporte activo secundario** (Raven *et al.*, 1992).

El transporte mediado por proteínas se clasifica en uniporte, simporte y antiporte dependiendo de la estequiometría del proceso (Figura 6). El uniporte involucra el movimiento de una molécula a la vez, el simporte es el paso simultáneo de dos moléculas en la misma dirección y el antiporte es el paso simultáneo de dos moléculas en direcciones opuestas (Voet y Voet, 1995).

Cuando existe cotransporte, uno de los sustratos (driving substrate) siempre se mueve a través de la membrana en la dirección que disipa el gradiente electroquímico establecido directa o indirectamente por transporte activo primario. El otro sustrato (driven substrate) se mueve en contra de su gradiente de concentración. Es importante resaltar que el cotransporte siempre resulta en una disipación neta de la energía almacenada en los gradientes de todos los sustratos transportados.

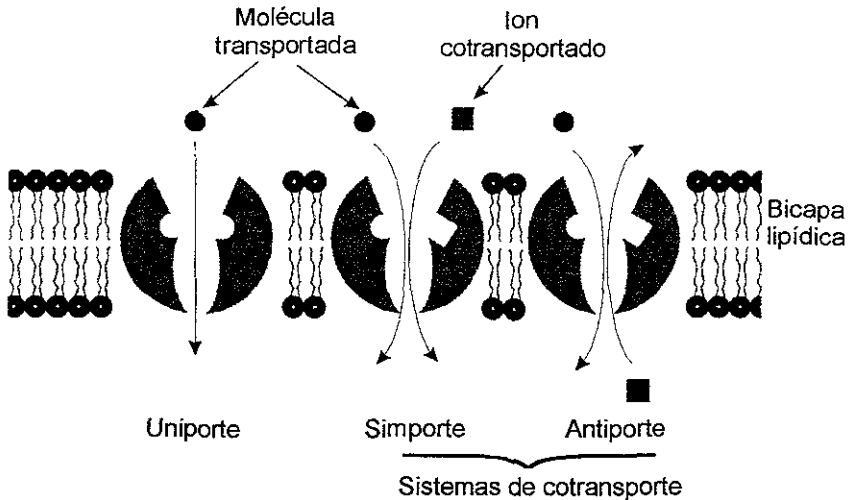


Figura 6. Caricatura de los diferentes transportadores según su estequiometría (Raven *et al.*, 1992).

Las proteínas transportadoras se pueden agrupar dentro de tres grandes grupos dependiendo de su estructura en la membrana y de la velocidad de transporte de solutos (Figura 7):

- a) **Bombas**: En plantas, la  $H^+$ -ATPasa genera un gradiente electroquímico al bombear protones hacia el exterior de la célula. Esta ATPasa es de tipo P, lo que significa que durante su ciclo catabólico se genera un intermediario fosforilado. La expulsión activa de protones por esta enzima genera un potencial negativo con valores de hasta  $-150$  mV y establece una diferencia de alrededor de dos unidades de pH, siendo el pH intracelular cercano a 7 y el extracelular o apoplástico entre 5 y 6. La velocidad de transporte de moléculas es relativamente baja, menos de 500 moléculas por proteína por segundo (Assmann y Haubrick, 1996; Raven *et al.*, 1992).
- b) **Acarreadores**: Se unen a un soluto específico y sufren un cambio conformacional para transportarlo a través de la membrana. Sus sitios de unión al sustrato nunca se encuentran accesibles para ambos lados de la membrana simultáneamente. El número



de moléculas que transportan varía entre 500 y 10,000 moléculas por proteína por segundo (Raven *et al.*, 1992; Wolfersberger, 1994).

- c) **Canales:** Constituidos por proteínas transmembranales que forman poros que contienen agua y que, cuando se abren, debido a alteraciones conformacionales, permiten el paso de solutos específicos (generalmente iones inorgánicos de tamaño y carga adecuados) a través de la membrana. La velocidad de transporte en los canales es muy alta, desde 10,000 hasta varios millones de moléculas por proteína por segundo (Raven *et al.*, 1992).

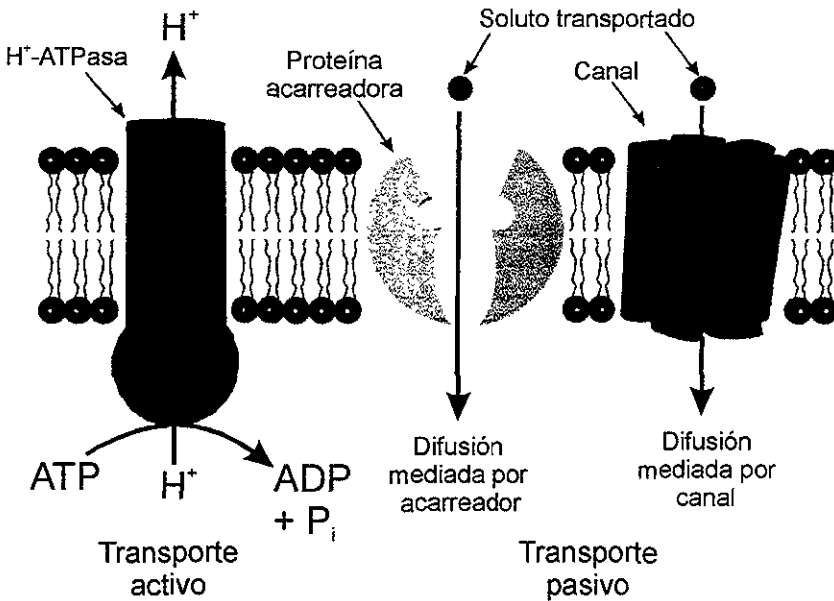


Figura 7. Diagrama que ilustra las tres clases de proteínas transportadoras (Raven *et al.*, 1992).

## 1. Transporte simplástico y apoplástico

En las plantas, las células vecinas pueden encontrarse interconectadas por uniones estrechas de pared celular y membrana que permiten formar un continuo entre el citoplasma de varias células. Estos túbulos, con una apertura aproximada de 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro son llamados plasmodesmata, y permiten el paso de agua y solutos de diferentes dimensiones que pueden ser tan grandes como el RNAm. El **transporte simplástico** es el transporte de moléculas a través de los plasmodesmata (Raven *et al.*, 1992), mientras que cuando el movimiento de sustancias se realiza a través del apoplasto, el transporte se denomina **apoplástico** (el apoplasto es la región comprendida entre la membrana plasmática y la pared celular). Ambos tipos de transporte se pueden llevar a cabo de manera simultánea para un mismo tipo de soluto, sin embargo, hay células que realizan uno u otro en mayor proporción (Raven *et al.*, 1992).

## F. TRANSLOCACIÓN: MOVIMIENTO DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DEL FLOEMA

La fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$  en las hojas maduras de las plantas superiores y la distribución de los productos de carbono asimilados entre los órganos fotosintéticamente inactivos, tejidos en desarrollo o tejidos de almacenamiento son dos procesos íntimamente relacionados. Los tejidos fotosintéticos poseen únicamente una capacidad limitada para el almacenamiento de los compuestos asimilados, por lo que la mayoría de éstos entran hacia el floema para ser distribuidos al resto de la planta, llevando así los compuestos necesarios a los tejidos no fotosintéticos y evitando su acumulación en los tejidos que los sintetizan (Sauer *et al.*, 1994).

### 1. Floema

El floema de las angiospermas está formado por varios tipos de células y se encuentra estrechamente asociado con el xilema (Lalonde *et al.*, 1999). El floema es el principal tejido conductor de compuestos asimilados en las plantas vasculares. Las células conductoras más importantes del floema son los **elementos cribosos**, que contienen células vivas anucleadas al alcanzar la madurez. La mayoría de los elementos cribosos carecen de un límite definido entre su citoplasma y sus vacuolas; cuando son inmaduros, contienen una o más vacuolas.

cada una separada del citoplasma por un tonoplasto o membrana vacuolar, pero en etapas tardías de su diferenciación, los tonoplastos desaparecen y la diferencia entre el contenido citoplásmico y vacuolar deja de existir. En su madurez, todos los componentes remanentes de los protoplastos de los elementos cribosos, como son la pared celular, retículo endoplásmico liso y algunos plastidios y mitocondrias, se encuentran distribuidos a lo largo de la pared celular. El término criboso se refiere a grupos de poros (**áreas cribosas**) a través de los cuales los protoplastos del floema están interconectados; estas áreas cribosas se encuentran concentradas en los extremos sobrepuestos de las células del floema. La parte de la pared celular que contiene las áreas cribosas con un gran número de poros se denomina **plato criboso** (Raven *et al.*, 1992).

Los elementos cribosos se encuentran típicamente asociados con células especializadas del parénquima, llamadas **células acompañantes**, que contienen todos los elementos encontrados comúnmente en las células vegetales, incluyendo el núcleo y numerosas mitocondrias. Estas células se encuentran conectadas a los elementos cribosos por medio de numerosos plasmodesmata, por lo que se piensa que son esenciales para la supervivencia de dichos elementos (Raven *et al.*, 1992; Lalonde *et al.*, 1999).

La dirección del transporte del floema no es constante, sino que está determinada por requerimientos metabólicos específicos. El movimiento de sustancias por el floema sigue el patrón fuente-demanda. A pesar de que las plantas son organismos autotróficos, están compuestas por varios tejidos heterotróficos que deben importar azúcares y aminoácidos. Un **tejido fuente** es aquel que produce más sustancias asimiladas que las que necesita para satisfacer su metabolismo y por lo tanto tiene capacidad de exportación, mientras que un **tejido demanda** es un importador o consumidor de las sustancias asimiladas. En ciertas etapas del desarrollo, todos los órganos serán tejidos demanda y conforme maduran pueden convertirse en tejidos fuente (Hopkins, 1995; Raven *et al.*, 1992; Bush *et al.*, 1996).

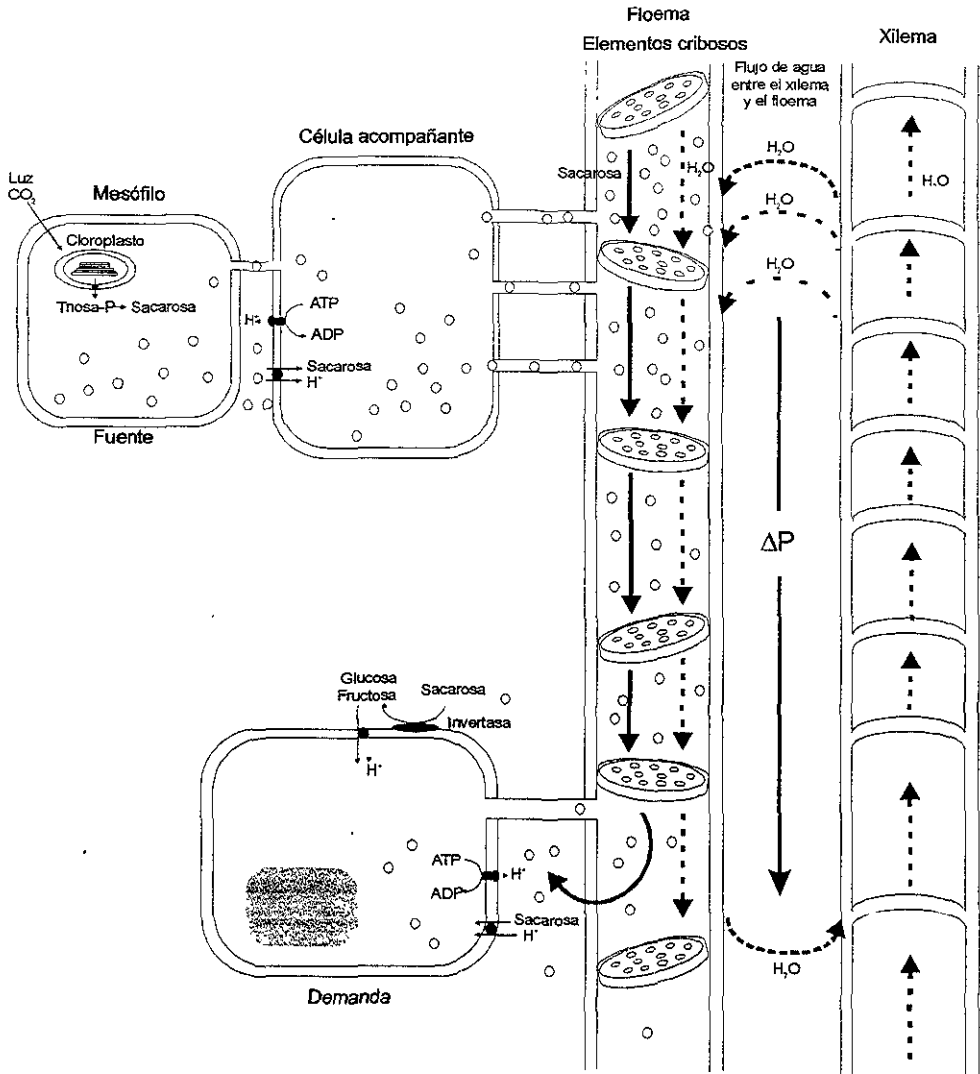


Figura 8. Esquema del flujo de presiones a través del floema (Adaptado de Hopkins, 1995; Raven et al., 1992; Lalonde et al., 1999).

## 2. Hipótesis del flujo de presiones como mecanismo de transporte a través del floema

Esta hipótesis establece que los compuestos asimilados son transportados desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda a través de un gradiente de presión de turgor desarrollada osmóticamente. El floema contiene una bomba osmótica cuya eficacia depende principalmente de tres tipos de proteínas de membrana plasmática: **(1) simportadores sacarosa/H<sup>+</sup>**, que acumulan sacarosa en el floema, creando un potencial osmótico; **(2) ATPasas de protones** que suministran la energía necesaria para el transporte activo y **(3) transportadores de agua**, potencialmente **acuaporinas** que toman agua derivada del xilema. Por ejemplo, la sacarosa producida por fotosíntesis en las hojas es secretada activamente hacia los tubos cribosos de las venas menores. Este proceso activo, denominado **descarga al floema**, disminuye el potencial de agua en el tubo criboso y causa la entrada de agua por ósmosis hacia los tubos cribosos de la hoja (la cantidad de sacarosa en los tubos cribosos puede ser hasta 40 veces mayor que en las células del mesófilo). Con el movimiento de agua hacia los tubos en el tejido fuente, la sacarosa es llevada pasivamente hacia los tejidos demanda, tales como tejidos en crecimiento o de almacenamiento, donde la sacarosa es descargada del tubo criboso, una vez allí, es degradada a glucosa y fructosa por la invertasa presente en la pared celular. Si la sacarosa que llega al apoplasto a través del floema no es degradada, vuelve a entrar al floema, para ser redistribuida hacia otros tejidos. La remoción de la sacarosa por los tejidos demanda, provoca un incremento en el potencial de agua en el tubo criboso y por lo tanto la salida de agua hacia el xilema, donde es recirculada (Hopkins, 1995; Raven *et al.*, 1992; Lalonde *et al.*, 1999).

### G. TRANSPORTE DE SACAROSA

La descarga al floema es un proceso selectivo en donde la **sacarosa** es el azúcar que se transporta en mayor proporción, ya que al no ser reductor, no reacciona con otros compuestos en su trayecto hacia los tejidos demanda, al contrario de las hexosas, que no juegan un papel importante en el transporte a larga distancia en las plantas. Alrededor de un 90% del contenido de la savia del floema está formado por sacarosa y la concentración de ésta va de 100 a 300 g/L. El flujo de este carbohidrato en el peciolo es muy alto, de alrededor de 2.5  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2\text{s}$ . Este carbohidrato, además de ser un metabolito de transporte y contribuir a la fuerza osmótica para la traslocación hacia el floema, sirve como una señal para activar o

reprimir genes específicos en diversos tejidos. (Raven *et al.*, 1992, Lalonde *et al.*, 1999). Recientemente la sacarosa ha sido considerada también como una molécula de señalización involucrada en la expresión de genes (Lemoine, 2000). Se ha demostrado que el transporte de sacarosa dirigido por la fuerza protón-motriz disminuye de un 50 a un 65% en hojas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) embebidas en 100 mM de sacarosa con respecto a los controles embebidos en agua. Este fenómeno es dependiente de la concentración y es específico para sacarosa administrada de manera exógena, aunque se ha demostrado que se requiere que la sacarosa se acumule en las hojas antes de que la represión sea evidente, ya que las hojas embebidas en 100 mM de sacarosa mostraron un incremento en el contenido de sacarosa de 3 a 6 veces la concentración del control. La especificidad de esta respuesta se determinó utilizando diferentes carbohidratos, tales como manitol o sorbitol y se demostró que únicamente la sacarosa tiene como resultado la disminución en el transporte. También se utilizaron glucosa y fructosa, para comprobar que era la sacarosa, y no sus productos de hidrólisis, la encargada de regular su transporte; aunque los resultados obtenidos muestran una disminución de actividad de transporte con ambos monosacáridos, no es de magnitud similar a la disminución ocasionada por la sacarosa. Experimentos posteriores mostraron un decremento en el tiempo de vida media de los RNAm de las hojas tratadas con sacarosa, lo cual indica que la represión es mediada, al menos parcialmente, por cambios en la actividad transcripcional o en el recambio de los RNAm. La imbibición de las hojas con manoheptulosa, un inhibidor de la hexocinasa que bloquea la señalización mediada por hexosas, no tuvo efecto alguno sobre el transporte de sacarosa, lo cual indica que la vía de señalización de la sacarosa es independiente de la vía de señalización de las hexosas. Además se demostró que el efecto inhibitorio de la sacarosa es reversible, lo que sugiere que esta vía de señalización responde a cambios dinámicos en la concentración de sacarosa (Chiu y Bush, 1998). Contrario a lo obtenido por Chiu y Bush, Aoki *et al.* demostraron que en las hojas de maíz, el transporte de sacarosa es regulado positivamente a nivel transcripcional por la cantidad de azúcares solubles presentes (Aoki *et al.*, 1999). Hirose *et al.* sugieren que cambios en los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa afectan al promotor del simportador de arroz (OsSUT1) (Hirose *et al.*, 1997).

El transporte a larga distancia en las plantas depende de una familia de proteínas que actúan como transportadores de sacarosa. Estudios a nivel fisiológico y molecular demuestran que el transporte de sacarosa está altamente regulado a varios niveles de

organización biológica y en respuesta a concentraciones variables de sacarosa. Los miembros de esta familia transportadora de sacarosa juegan un papel directamente involucrado en la transducción de señales para la regulación del transporte de azúcares y, por lo tanto, en el metabolismo vegetal en general (Lalonde *et al.*, 1999).

#### **H. SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup>**

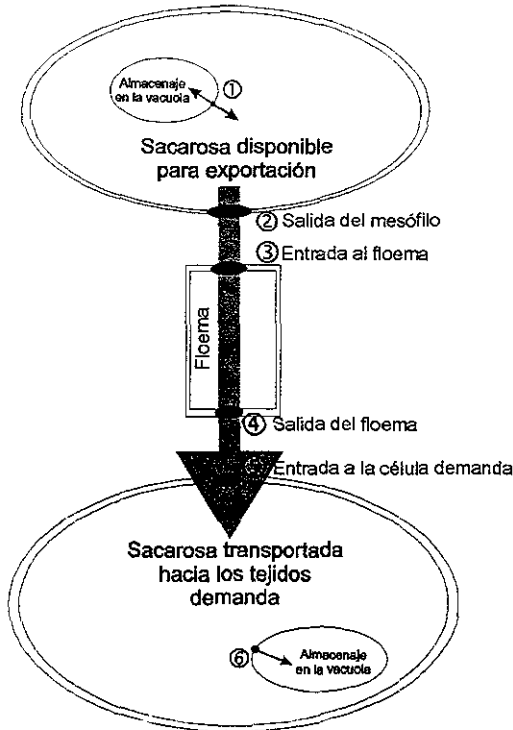
Como se mencionó anteriormente, el principal carbohidrato que se transloca hacia el floema es la sacarosa. Esto se debe principalmente a su naturaleza no reductora y su relativa insensibilidad al metabolismo, al contrario de lo que sucede con la glucosa (Lemoine, 2000).

En las plantas, la sacarosa es transportada desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda, donde es almacenada o metabolizada, de tal manera que se emplea tanto para la obtención de esqueletos carbonados como para la obtención de energía (Lemoine, 2000). Las hojas inmaduras son importadores netos de productos asimilados y únicamente comienzan a exportarlos después de su maduración, por lo que a lo largo de su desarrollo, las hojas invierten su función así como la dirección del transporte. En hojas de maíz en crecimiento, se ha demostrado que la cantidad de transcrito para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> se incrementa gradualmente desde la base, que es el tejido más joven, hacia la punta, que se encuentra completamente desarrollada. (Lemoine *et al.*, 1992; Aoki *et al.*, 1999). Un órgano demanda donde el transporte apoplástico puede tener una gran importancia es la semilla, en la cual el embrión se encuentra simplásticamente aislado del tejido materno y los nutrientes deben entrar al espacio apoplástico para llegar al eje embrionario en desarrollo (Riesmeier *et al.*, 1993).

La cantidad de sacarosa en el floema (0.8-1.0 M) es de 8 a 10 veces mayor que en las células del mesófilo. Tal acumulación de sacarosa únicamente puede ser posible gracias a un transportador de sacarosa. Esta hipótesis es además apoyada por la baja densidad de plasmodesmata que conectan a las células del mesófilo con las células acompañantes. (Riesmeier *et al.*, 1992, Lemoine, 2000). La existencia de un transportador de sacarosa en el floema fue propuesta a finales de la década de los 70's por Giaquinta, que sugería un posible papel del gradiente de pH y la ATPasa de membrana en el vaciado de sacarosa hacia el floema (Giaquinta, 1977) y por Kriedmann y Beevers, que demostraron que los cotiledones de

*Ricinus communis* toman la sacarosa sin hidrolizarla y que este transporte se logra gracias a un transportador específico para sacarosa (Komor, 1977).

La existencia de transportadores para sacarosa ha sido postulada y en algunos casos demostrada en varias membranas según se muestra en la figura 9.



**Figura 9. Pasos transmembranales en los que se ha propuesto la existencia de transportadores de sacarosa (Lemoine, 2000).**

La primera membrana que debe atravesar la sacarosa después de su síntesis es la vacuolar (1), que determina la cantidad de sacarosa almacenada y disponible para exportación. Posteriormente, la sacarosa sale de la célula del mesófilo (2) y desde el apoplasto entra hacia las células del floema (3). Para salir del floema, se han descrito tanto el mecanismo simplástico como el apoplástico (4). Una vez fuera del floema, la sacarosa entra hacia los tejidos demanda (5), donde se utiliza para el crecimiento y desarrollo o bien se almacena en vacuolas (6) (Lemoine, 2000).



## 1. Tipos de transportadores de sacarosa

De acuerdo con los diferentes pasos identificados los transportadores de sacarosa en las plantas pueden ser de tres tipos:

1. Transportadores ubicados en membrana plasmática: son responsables de la entrada de sacarosa hacia las células y son simportadores sacarosa/H<sup>+</sup>.
2. Transportadores ubicados en tonoplastos: se ha propuesto que son antiportadores sacarosa/H<sup>+</sup>, debido a que el interior de la vacuola es más ácido que el citoplasma.
3. Transportadores ubicados en la membrana plasmática: responsables de la salida de sacarosa desde las células, por ejemplo, desde los elementos cribosos hacia el apoplasto de las células demanda o desde las células del mesófilo hacia el apoplasto de las células acompañantes. Se ha propuesto que estos transportadores son acarreadores o antiportadores (Lemoine, 2000).

El primer simportador sacarosa/H<sup>+</sup> identificado fue el de espinaca. Para su estudio, Riesmeier *et al.* desarrollaron una cepa de levadura que únicamente podía crecer en sacarosa si era complementada con un transportador de sacarosa. Con este propósito, primero preparó una cepa de *S. cerevisiae* que fuera incapaz de secretar invertasa el medio de cultivo pero que sí fuera capaz de metabolizar la sacarosa una vez en su interior. Cuando el transportador de sacarosa de espinaca (SoSUT1) fue expresado en la levadura, ésta fue capaz de crecer. Dicho transportador mostraba además algunas de las características típicas de los transportadores membranales, como su alta hidrofobicidad y la presencia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas (Riesmeier *et al.*, 1992). El mismo método fue utilizado para identificar al transportador de sacarosa de papa (StUT1) (Riesmeier *et al.*, 1993). Todos los transportadores identificados después fueron obtenidos por hibridización o por amplificación por PCR a partir de las secuencias de papa y espinaca (Lemoine, 2000).

Todos los transportadores de sacarosa clonados hasta el momento se encuentran listados en la tabla 2.

**Tabla 2. Lista de las secuencias para los transportadores de sacarosa disponibles en las bases de datos.** Las Km que se muestran se obtuvieron a partir de la expresión funcional del transportador en levadura (Adaptada de Lemoine, 2000, con datos adicionales tomados de Aoki *et al.*, 1999).

Nombre	Especie	Longitud (aminoácidos)	Expresión funcional/K <sub>m</sub>
AgSUT1	Apio	512	Si/0.14 mM
AtSUC1	<i>Arabidopsis</i>	513	Si/0.45 mM
AtSUC2	<i>Arabidopsis</i>	512	Si/0.53 mM
AtSUTX1	<i>Arabidopsis</i>	474	No
AtSUTX2	<i>Arabidopsis</i>	513	No
AtSUTX3	<i>Arabidopsis</i>	492	No
AtSUTX4	<i>Arabidopsis</i>	594	No
BvSUT1	Remolacha	523	No
DcSUT1a/b	Zanahoria	501	Si/0.5 mM
DcSUT2	Zanahoria	515	Si/0.7 mM
LeSUT1	Jitomate	511	No
NtSUT1	Tabaco	507	No
NtSUT3	Tabaco	520	No
OsSUT1	Arroz	537	Si/No determinada
PmSUC1	<i>Plantago</i>	510	Si/0.3 mM
PmSUC2	<i>Plantago</i>	510	Si/1 mM
RcSCR1	Ricino	533	Si/2 mM
SoSUT1	Espinaca	525	Si/1.5 mM
StSUT1	Papa	516	Si/1 mM
VtSUT1	Haba	523	Si/1.4 mM
ZmSUT1	Maíz	521	No

En la tabla se observa que se han encontrado cuatro secuencias en *Arabidopsis*, las cuales presentan alta identidad con el transportador de sacarosa (Lemoine, 2000). También se reportan dos secuencias para zanahoria, idénticas en un 52% solamente (Shakya y Sturm, 1998). Aparentemente, tanto del transportador de sacarosa en arroz como del de maíz existe una sola copia (Aoki *et al.*, 1999).

La longitud de los diferentes transportadores es semejante (alrededor de 510 aminoácidos), que corresponden a un peso molecular aproximado de 55 kDa. La secuencia más larga reportada es obtenida de *Arabidopsis* (*AtSUTX4*, 594 aminoácidos). Las discrepancias observadas entre la masa molecular calculada (55 kDa) y la obtenida en geles de poliacrilamida con SDS (45-48 kDa) se deben a la naturaleza altamente hidrofóbica de estas proteínas (Lemoine, 2000).

## 2. Caracterización de los simportadores sacarosa/H<sup>+</sup>

Para demostrar que los transportadores encontrados son los transportadores de sacarosa propuestos, se realizaron diversos experimentos:

1. Para comprobar que el transportador es un simportador sacarosa/H<sup>+</sup> se utilizaron varios compuestos que colapsan el gradiente de pH establecido por la H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo P, como son los protonóforos CCCP (carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona) y DNP (2,4-dinitrofenol) y los inhibidores de la generación de ATP, antimicina y arsenato. Estos compuestos inhibieron fuertemente la toma de sacarosa por levaduras que expresaban al transportador. Además, todos los transportadores de sacarosa expresados en levadura, muestran una actividad óptima cuando el pH externo es ácido (4.5-5.5). Todos los datos anteriores concuerdan con las propiedades de los transportadores de sacarosa estudiados en hojas, protoplastos o vesículas de membrana plasmática (Lemoine, 2000; Bush, 1988; Delrot y Bonnemain, 1980; Riesmeier, 1993).
2. La actividad de transporte de sacarosa también es inhibida fuertemente por reactivos específicos que modifican los grupos tiol, tales como el PCMBs (ácido *p*-cloro-mercuri-bencensulfónico) y NEM (*N*-etil-maleimida) y por agentes tales como el DEPC (dietilpirocarbonato) que modifican histidinas (Riesmeier, 1993; Lemoine, 2000). A pesar de que el PCMBs inhibe al transportador, Bush demostró que el residuo sensible a este reactivo no se encuentra en el sitio de unión del sustrato, sino que la unión del PCMBs puede modificar la configuración del transportador de tal manera que no sea favorable para la unión de la sacarosa. Por el contrario, el aminoácido modificado por el DEPC se

encuentra aparentemente en el sitio de unión del sustrato o muy cerca de él. Además, los datos sugieren que la histidina modificada por este compuesto se encuentra accesible desde la cara externa de la proteína transportadora (Bush, 1993)

3. Para determinar la especificidad del transportador por la sacarosa se determinaron las  $K_m$ , especificadas en la tabla 2. Todos los resultados obtenidos por medio de la expresión de cDNAs del transportador en levadura están de acuerdo con las características descritas para el transportador en plantas ( $K_m$ , sensibilidad a inhibidores, dependencia del gradiente de pH), lo cual indica también que el transportador puede funcionar en un ambiente lipídico diferente (Lemoine, 2000).

De acuerdo con el modelo propuesto, el reconocimiento del sustrato por el transportador de sacarosa ocurre a través de una interacción hidrofóbica con la unidad de fructosa, mientras que los grupos hidroxilo en las posiciones C-3, C-4 y C-5 del glucopiranosilo le confieren especificidad al reconocimiento de la sacarosa. Sin embargo, datos más recientes indican que el hidroxilo en C-2 de la unidad de glucosa está involucrado también en la especificidad del reconocimiento. Para comprobar la especificidad del transportador de sacarosa por su sustrato, se han estudiado los efectos de diferentes carbohidratos. Éstos se colocaron en una concentración de 10 a 50 veces mayor que la concentración de sacarosa y en condiciones de energía optimizadas (medio externo acidificado por la estimulación de la ATPasa de protones con glucosa). De todos los disacáridos probados, únicamente la maltosa (dímero de glucosa unido en  $\alpha$  1-4) es capaz de inhibir la toma de sacarosa por el transportador, aunque el grado de inhibición varía dependiendo de la especie de planta, ya que en el caso de SoSUT1 (espinaca) es fuertemente inhibido, mientras que el transportador de papa (StSUT1) únicamente muestra una ligera inhibición (Lemoine, 2000; Riesmeier *et al.*, 1993). Finalmente, el  $\alpha$ -fenilglucósido, uno de los sustratos utilizados para demostrar la interacción hidrofóbica entre la unidad de fructosa de la sacarosa con su transportador, inhibe también fuertemente la toma de glucosa (Lemoine, 2000).

### 3. Localización de los simportadores sacarosa/H<sup>+</sup>

Con base en su mecanismo de transporte, se espera que el simportador de sacarosa esté involucrado en el vaciado hacia el floema y que por lo tanto se encuentre en la membrana plasmática de los complejos formados por los elementos cribosos y las células acompañantes. Los datos obtenidos por inmunocitocalización, hibridación *in situ* y expresión de genes reporteros acoplados al promotor del simportador han dado algunas indicaciones sobre las células en las que se expresa esta proteína (Lemoine, 2000; Lalonde, 1999). La primera hibridación *in situ* demostró la expresión de altos niveles de SUT1 en las células del floema de las hojas maduras y tallo de papa (Riesmeier, 1993). Por medio de inmunocitocalización por fluorescencia y tinción con anticuerpos acoplados con oro se demostró que en las especies de solanáceas (papa, jitomate y tabaco) el transportador de sacarosa se encuentra en la membrana plasmática de las células del floema. De manera sorprendente, también se demostró que el RNAm que codifica para el transportador se encuentra en los elementos cribosos, a pesar de que estas células carecen de ribosomas. Este hallazgo indica que la transcripción del gen de SUT1 se lleva a cabo en las células acompañantes y tanto el RNAm como la proteína son capaces de llegar a los elementos cribosos por medio de plasmodesmata. Debido a que los elementos cribosos no contienen bombas de protones, la fuerza protón-motriz que dirige al simportador en estas células se encuentra dada por el flujo de protones provenientes de las células acompañantes a través de plasmodesmata (Lemoine, 2000; Lalonde, 1999). En *Arabidopsis* y *Plantago*, SUC2 se ha localizado en la membrana plasmática de las células acompañantes (Lemoine, 2000).

La mayoría de los datos obtenidos indican que los transportadores de sacarosa están expresados en el floema, en todo lo largo de la vía de translocación y pueden estar involucrados en la descarga de sacarosa hacia los tejidos demanda. Actualmente, no se ha identificado ningún transportador involucrado específicamente en la entrada de sacarosa a estos tejidos (paso 5 de la figura 9); aunque dicha función ha sido reportada para DcSUT2, que se encuentra altamente expresado en las raíces de zanahoria, su expresión no se limita al floema. Además, se encontró dicho transportador en la lámina de las hojas, por lo que su función no es aún clara. Este transportador se encuentra en la zanahoria durante todas las etapas del desarrollo con los niveles más altos en flores y semillas en desarrollo (Shakia y Sturm, 1998; Lemoine, 2000). En *Ricinus*, se ha detectado un transportador de sacarosa con altos niveles en semillas, pero también detectado en hojas. Algo similar ocurre en *Vicia faba*,

donde las semillas expresan abundantemente el transportador pero la expresión no está restringida a estos órganos (Lemoine, 2000).

Los embriones de las semillas de legumbres en desarrollo reciben de la cubierta de la semilla los azúcares y aminoácidos que necesitan para su crecimiento y desarrollo. Éstos entran a la cubierta de la semilla a través del floema y son descargados simplásticamente hacia el parénquima de la cubierta. Posteriormente, deben ser vaciados hacia el espacio apoplásmico que existe entre la cubierta de la semilla y el embrión, por lo que existe un probable mecanismo de transporte para lograr que la sacarosa entre al embrión en desarrollo (De Jong *et al.*, 1996). Matsukura *et al.* (2000) demostraron la presencia del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> durante la germinación de embriones de arroz, y que ésta se encuentra regulada positivamente por el aporte de sacarosa del medio. Por su parte, Hirose *et al.* (1997) sugieren que OsSUT1 puede estar involucrado en la toma de sacarosa desde el apoplasto que se encuentra alrededor de la semilla de arroz en desarrollo. En el maíz, el transportador de sacarosa (ZmSUT1) se encuentra presente en altos niveles en semillas de 5 días germinación (Aoki *et al.*, 1999).

#### 4. Evidencia *in vivo* de la función del simportador sacarosa/H<sup>+</sup>

Debido a que el transporte mediado por el transportador de sacarosa es esencial para el vaciado de sacarosa hacia el floema, una reducción en la actividad de transporte afecta la distribución del carbono y la fotosíntesis. Riesmeier *et al.* (1993) generaron una planta de papa transgénica que expresa el transcrito del transportador en antisentido, causando una reducción en el flujo de carbohidratos desde los tejidos fuente, inhibición del crecimiento de la raíz y de la fotosíntesis y un incremento de la concentración de carbohidratos en las hojas. Con la disminución de aporte de carbohidratos en los tejidos demanda, las plantas presentaron raíces más pequeñas y un menor rendimiento de tubérculos (Hirose *et al.*, 1997; Lalonde *et al.*, 1999).

En tabaco, la supresión antisentido del transportador causó enrollamiento de las hojas y zonas de necrosis que llevaron a la planta a la muerte. Las hojas no tenían capacidad de exportar el CO<sub>2</sub> fijado y por lo tanto los carbohidratos solubles se acumularon en ellas, de modo que la fotosíntesis se redujo. También se demostró que no existía el movimiento de los

productos de la fotosíntesis entre las células del mesófilo en estas plantas transgénicas (Bürkle *et al.*, 1998)

## 5. Estructura del transportador de sacarosa

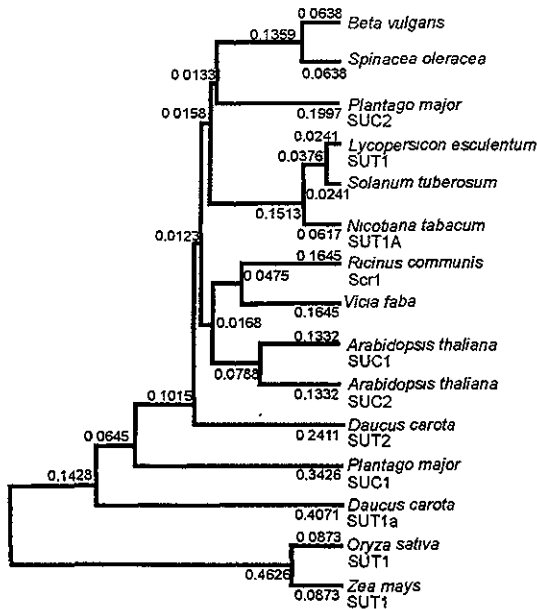


Figura 10. Árbol filogenético que muestra la relación entre los diferentes transportadores de sacarosa.

Como se mostró en la tabla 2, cDNAs tanto de dicotiledóneas como de monocotiledóneas han sido clonados. Las secuencias de todos los transportadores se encuentran relacionadas, esto es, presentan un alto grado de homología en sus secuencias de nucleótidos (Figura 10) (Aoki *et al.*, 1999).

Las secuencias más distantes entre sí muestran un 37% de identidad a nivel de proteína. Aunque actualmente no existen datos estructurales para ningún transportador de azúcares, se puede obtener información por medio de la comparación de las secuencias de los transportadores de sacarosa caracterizados. En la Figura 11 se muestra el modelo propuesto para AgSUT1 (apio) que consiste en 12 hélices transmembranales (dos unidades

de seis segmentos transmembranales unidos por un asa central. Comparando las secuencias de las diferentes especies, los residuos presentes en las secciones transmembranales de la proteína son los más conservados, mientras que las regiones amino y carboxilo terminal y el asa central muestran una alta variabilidad (Lemoine, 2000).

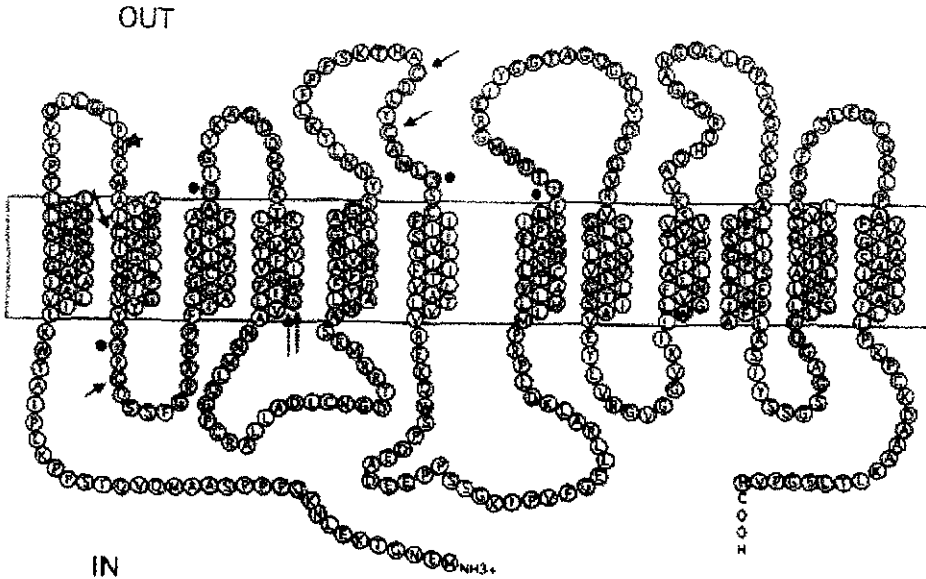


Figura 11. Estructura propuesta para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de apio (Lemoine, 2000)

En el modelo predicho el transportador está formado por una sucesión de  $\alpha$ -hélices atravesando la membrana, con los extremos amino y carboxilo en el lado citoplásmico. El análisis hidropático indica una sucesión de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. En el caso de los transportadores de sacarosa, se pueden identificar con cierta seguridad doce segmentos hidrofóbicos, excepto en el caso de los dos primeros segmentos transmembranales, que aparentemente forman una región hidrofóbica larga. El perfil de hidropatía de SoSUT1 se puede tomar como modelo para todos los demás transportadores de sacarosa conocidos hasta la fecha. Al realizar predicciones de la conformación del transportador en la membrana hay que tomar en cuenta que las asas cortas conectan segmentos transmembranales adyacentes, mientras que las asas largas pueden indicar que dos segmentos adyacentes en secuencia se pueden encontrar alejados en su estructura terciaria. A partir del modelo



presentado en la figura 11 es posible hipotetizar que las hélices 2, 3 y 4, así como las hélices 11 y 12 se encuentran adyacentes. A pesar de que existe un consenso general sobre la naturaleza de  $\alpha$ -hélice de los segmentos transmembranales, algunos autores han propuesto un modelo diferente, que consiste en un barril beta para la estructura de varios transportadores de carbohidratos. Esta controversia únicamente se resolverá cuando se cuente con la estructura en tercera dimensión de la proteína (Lemoine, 2000).

## 6. Conservación de residuos específicos y relaciones estructural/función

Como ya se mencionó, existen varios residuos conservados entre los transportadores de sacarosa. Se ha demostrado la presencia de sitios de glicosilación en diferentes secuencias, pero no se encuentran conservados; sin embargo, no existe evidencia de que el transportador se encuentre glicosilado *in vivo* (Riesmeier, 1993; Lemoine, 2000). Asimismo se han encontrado sitios de fosforilación conservados en los segmentos no transmembranales.

Para lograr el transporte acoplado de protones, se espera que existan residuos negativamente cargados en las regiones no transmembranales; sin embargo, en el caso de StSUT1 únicamente se ha identificado un residuo cargado negativamente (Asp) que se encuentra conservado en una región transmembranal (señalado con una doble flecha en la figura 11) (Lemoine, 2000).

Para encontrar un posible sitio de unión al sustrato, Jade *et al.* realizaron mutagénesis dirigida a un residuo de histidina que se encuentra conservado en todas los transportadores. En el caso de *Arabidopsis*, se trata de His65, mientras que en arroz es His84 y en maíz His69. (Lemoine, 2000; Aoki *et al.*, 1999). El residuo se encuentra en el primer asa extracelular cerca del inicio del segundo segmento transmembranal (marcado con una estrella en la figura 11). La razón para elegir esta histidina para la mutación es que se ha demostrado que la actividad de transporte se inhibe por DEPC, que modifica las histidinas y que esta histidina es la única conservada entre todas las especies (Jade y Bush, 1998). La histidina fue reemplazada por aminoácidos hidrofóbicos (Gly, Leu), polares (Cys, Asn, Gln, Ser, Tyr) y cargados (negativo, Asp y positivo, Lys, Arg). Todas las mutantes obtenidas se expresaron en los mismos niveles en levadura, excepto la mutante con cisteína, que aparentemente se degradó después de la traducción. Cuando la histidina se sustituyó por aminoácidos cargados positivamente, la

actividad de transporte se incrementó hasta 14 veces; sin embargo, no se midió la especificidad de estos transportadores por la sacarosa, ya que el incremento de actividad puede resultar en una disminución de la especificidad. Al sustituir la histidina por residuos cargados negativamente, la  $V_{max}$  disminuyó 8 veces. Sin embargo, al cambiar la histidina por residuos no cargados, no se encontraron cambios en las propiedades cinéticas comparadas con la planta silvestre, indicando que la carga positiva no es indispensable para la actividad. Por lo tanto, aún no queda claro el papel de la His65 en el transporte de sacarosa (Jade y Bush, 1998). La identidad de la His65 como blanco del DEPC quedó confirmada por el hecho de que los transportadores mutantes que carecían de este residuo aún fueron capaces de transportar sacarosa en presencia de DEPC (Lemoine, 2000).

### III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La entrada de agua hacia las semillas ocasiona un gran número de cambios dentro de éstas, todos ellos conducentes a la formación y desarrollo de una nueva planta. Uno de esos cambios es la liberación de enzimas por la capa de aleurona para la movilización de las reservas acumuladas en el endospermo, el almidón y los lípidos son metabolizados hasta sacarosa para su posterior entrada al eje embrionario en germinación. Otro de los grandes cambios que ocurre debido a la entrada de agua, es la reestructuración funcional de todas las membranas celulares es decir, recuperan sus funciones de compartimentalización, señalización y transporte (Derek y Black, 1994).

Recientemente se caracterizó la ATPasa de protones en embriones secos y a tiempos cortos de la germinación del maíz (Sánchez-Nieto et al., 1998). Esta enzima es la principal bomba primaria presente en plantas y tiene funciones muy importantes, tales como el mantenimiento del pH intracelular y extracelular y la creación de un gradiente de protones para dirigir procesos de transporte secundario, tales como el transporte de sacarosa. Sánchez Nieto *et al.* demostraron la presencia de actividad de la ATPasa de protones incluso en embriones secos, lo cual sugiere que esta enzima se encuentra presente desde la embriogénesis, para poder iniciar el bombeo de protones hacia el exterior de las células en cuanto comience la germinación de la semilla. Asimismo, demostraron un incremento de actividad que alcanzó un máximo a las 2 horas de imbibición (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998) y durante la elongación de la radícula (Sánchez-Linares, Tesis de Maestría)

En *Vicia faba* se demostró que aún cuando participan en un 50% los plasmodesmata en la traslocación de sacarosa hacia el embrión en desarrollo, se encontró también que el transportador sacarosa/H<sup>+</sup> tiene un papel fundamental (Frommer, 1995). En la germinación, las reservas acumuladas son degradadas hasta sacarosa y son presentadas al tejido embrionario para su crecimiento y diferenciación. Es probable que la presencia de la ATPasa de protones dirija el transporte secundario de sacarosa durante la germinación del maíz a través del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> y se facilite la entrada de nutrientes hacia el escutelo o bien hacia el eje embrionario.

#### ***IV. HIPÓTESIS***

Los carbohidratos y lípidos almacenados en el endospermo son transformados a sacarosa, metabolito que debe ser transportado para la nutrición del eje embrionario. Debido a que la composición y concentración de carbohidratos durante la germinación cambia, es probable que los niveles de transcrito para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> varíen durante esta etapa.

## V. OBJETIVOS GENERALES

Determinar los niveles de expresión de RNAm del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> durante la germinación de embriones y ejes embrionarios de maíz.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener una sonda homóloga para la detección del transcrito con base en la secuencia reportada en la literatura.
  - Diseñar oligonucleótidos capaces de amplificar un segmento de cDNA.
  - Establecer las condiciones de PCR para la amplificación del fragmento.
  - Clonar el inserto en *E. coli*.
  - Secuenciar el inserto.
2. Realizar curvas de germinación para determinar los tiempos adecuados de detección de los transcritos.
3. Obtener el patrón de expresión de los RNAm para el transportador de sacarosa en ejes y embriones de maíz y en diferentes tejidos de una planta de maíz.
4. Comparar el nivel de transcritos a lo largo de la germinación y en los dos tejidos en estudio.
5. Determinar el efecto de la adición de carbohidratos externos al tejido sobre la expresión de los RNAm para el transportador.
6. Evaluar la influencia del escutelo sobre la expresión de los transcritos del simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.
7. Adecuar la técnica de extracción de RNA para diferentes tejidos de maíz y establecer las condiciones de hibridación y lavado de los Northern Blots para detectar los niveles de expresión de los RNAm del transportador.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE GERMINACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ

Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Se desinfectaron lotes de 25 ejes o 25 embriones de maíz (*Zea mays*) variedad chalqueño, lavándolos con hipoclorito de sodio (Cloralex diluido 1/64) durante dos minutos, posteriormente se enjuagaron dos veces con agua desionizada estéril hasta que desapareciera el olor a hipoclorito de sodio.

Se seleccionaron los tiempos de muestreo, siendo 2 h, 5 h, 8 h, 12 h, 15 h, 18 h, 22 h, 24 h, 30 h, 33 h, 36 h, 48 h y 72 h. Para cada tiempo se prepararon dos cajas petri con agar al 1.2% y se sembraron 25 ejes o 25 embriones, previamente pesados. Se incubaron a 29°C y al finalizar el tiempo de incubación, se contaron los ejes y embriones germinados y no germinados y se pesaron. Con los datos anteriores se determinó el porcentaje de germinación y el contenido de agua, éste por comparación del peso húmedo con el peso del tejido antes de embeber.

### B. ENSAYO DE TRANSCRIPTASA REVERSA – REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Con base en la secuencia del cDNA del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en maíz reportada por Aoki, *et al.* en 1999, se diseñaron varios oligonucleótidos, utilizando el programa Primer3 disponible en la página [www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi); aquí se muestran los tres oligonucleótidos que llevaron a la amplificación de un producto:

- TCCTCTGGTTCCACAAACAAC                      Oligonucleótido 5' → 3' sentido
- CTTGACTGTAACCCTGTTCTCG                      Oligonucleótido 5' → 3' (oligonucleótido Interno)
- ACGAGCTGAATCCTAGAACGA                      Oligonucleótido 3' → 5' antisentido

Se realizaron dos combinaciones con los oligonucleótidos diseñados:

- Oligonucleótido sentido 5'→3' – Oligonucleótido antisentido 3'→5' cuyo producto es de 466 pb.
- Oligonucleótido sentido 5'→3' (interno) - Oligonucleótido antisentido 3'→5' cuyo producto es de 363 pb.

**a) Síntesis de la primera cadena de cDNA:**

Se colocaron en un tubo eppendorf 10  $\mu\text{g}$  de RNA total, cuya extracción se describe en el apartado J de la presente sección (1 OD = 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA), 4  $\mu\text{moles}$  de oligonucleótido antisentido y agua tratada con DEPC a un volumen final de 12  $\mu\text{L}$ . La mezcla anterior se incubó a 70°C durante 10 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente se le añadieron 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador de primera cadena 5 X (GIBCO), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (ditritiotreitol) 0.1 M y 1  $\mu\text{L}$  de una mezcla de dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (GIBCO), cada uno a una concentración 10 mM) y se incubó durante 2 minutos a 42°C. Al finalizar este tiempo se agregó 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa RNasa H-Superscript<sup>(TM)</sup> II (GIBCO) de 200 U/ $\mu\text{L}$  y se incubó a 42°C durante una hora. La reacción se detuvo calentándola a 70°C durante 10 minutos. A los controles se les adicionó el oligonucleótido 3'→5'.

**b) Síntesis de la segunda cadena de cDNA:**

Para ello se prepararon las diferentes mezclas que se encuentran en la Tabla 3, teniendo como controles aquellos en donde únicamente se adicionó uno de los diferentes oligonucleótidos.

Tabla 3. Preparación de las mezclas para la síntesis de la segunda cadena de cDNA

	Muestra 1	Muestra 2	Control 1	Control 2	Control 3
Buffer de PCR (GIBCO)	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	1.5 μM	1.5 μM	1.5 μM	1.5 μM	1.5 μM
DNTPs (GIBCO)	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Oligonucleótido 5'→3'	0.1 μM	-	0.1 μM	-	-
Oligonucleótido 3'→5'	0.1 μM	0.1 μM	-	0.1 μM	-
Oligonucleótido interno 5'→3'	-	0.1 μM	-	-	0.1 μM
CDNA de hoja	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
Taq polimerasa (Roche)	0.04 U	0.04 U	0.04 U	0.04 U	0.04 U
Agua	cbp 25 μL	cbp 25 μL	cbp 25 μL	cbp 25 μL	cbp 25 μL

El proceso de síntesis y amplificación del cDNA se llevó a cabo bajo diferentes condiciones, aquí se muestran las condiciones óptimas encontradas:

- 90°C durante 3 minutos } 1 ciclo
- 94°C durante 1 minuto } 25 ciclos
- 55°C durante 40 segundos }
- 72°C durante 1 minuto }
- 72°C durante 10 minutos } 1 ciclo

Los productos de reacción se separaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (50 μg/mL) por electroforesis horizontal y se visualizaron en un transiluminador UV. Se empleó un marcador de 100 pares de bases (GIBCO) para definir el tamaño de los productos amplificados.



### **C. PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA**

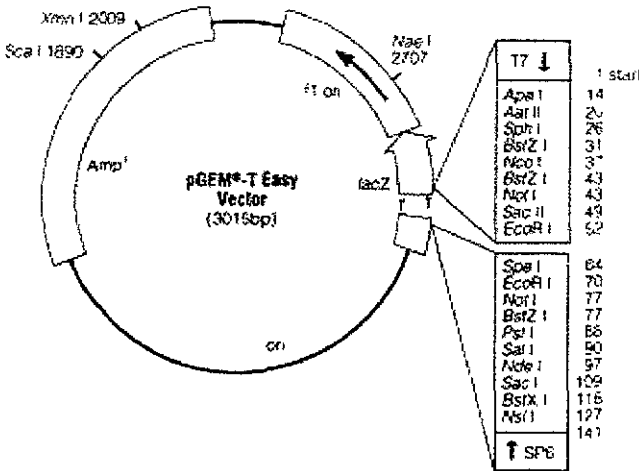
Se empleó el Kit GENECLEAN III, de BIO 101. Los cDNA obtenidos en el ensayo de RT-PCR se purificaron en un gel de agarosa al 1% preparado con TBE, las bandas de interés se cortaron y se colocaron en tubos eppendorf. Después se calculó el volumen del gel con el DNA (0.1 g son 100  $\mu$ L) y se agregaron al tubo 4.5 volúmenes de NaI y medio volumen de TBE modifier. Los tubos se colocaron en baño maría a 45-55°C durante 5 minutos aproximadamente, con movimientos de agitación cada minuto hasta que el gel se disolvió completamente, después de lo cual se añadieron 5  $\mu$ L de resina Glass Milk previamente agitada, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente, nuevamente con agitación. Se centrifugó a 12,000 rpm en una centrífuga Sorvall MC12 FA-MICRO durante 5 segundos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 700  $\mu$ L de New-Wash y se resuspendió el botón con ayuda de una pipeta. Se repitieron los lavados con New-Wash dos veces más, eliminando completamente el New-Wash en el último lavado. Se agregaron por último 15  $\mu$ L de agua estéril, se calentó a 50°C durante 3 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio sin tocar el botón.

### **D. ELABORACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

Se inocularon 10  $\mu$ L de células de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  en 2.5 mL de medio Luria (10 g de NaCl, 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura 1 mL de NaOH 2.5 N aforados a 1L con agua desionizada) y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación de 150-200 rpm en una incubadora Lab-Line Orbit Environ-Shaker. Del cultivo se tomaron 200  $\mu$ L, se inocularon en 25 mL de medio SOB (Peptona el 2% p/v, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6.7-7) y se colocaron a 16°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Las células se incubaron en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Jouan MR 1812. El botón se resuspendió suavemente en 8 mL de medio TB frío (PIPES (ácido piperazinodietanosulfónico) 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, pH 6.7) y se les agregó DMSO (dimetilsulfóxido) hasta una concentración final de 7%. Las células se colocaron en hielo durante 10 minutos y posteriormente se guardaron a -70°C en alícuotas de 100  $\mu$ L.

**E. ENSAYO DE LIGACIÓN DEL INSERTO**

Para realizar la ligación se utilizó el vector pGEM®-T Easy Vector de Promega (Figura 12), así como los reactivos contenidos en el kit. Este plásmido contiene extremos cohesivos con la base nitrogenada timina, por lo que los productos de PCR, a los que se les ha añadido una adenina en sus extremos, son complementarios y se puede llevar a cabo la reacción de ligación con la enzima ligasa. A continuación se muestra una diagrama del plásmido empleado:



**Figura 12. Plásmido pGEM®-T Easy Vector de Promega**

Se colocaron 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL del plásmido, 1 µL de T4 DNA ligasa (3 unidades weiss/µL), y una cantidad del DNA recién obtenido a partir de PCR, utilizando para el cálculo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector (50 ng)} \times \text{tamaño del inserto (kb)} \times 3}{\text{tamaño del vector (3.0 kb)} \quad 1} = \text{ng inserto}$$

Por último se agitó para homogenizar la mezcla y se incubó una hora a temperatura ambiente.

**F. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

A 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción de ligación se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de células competentes mezclando suavemente y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se incubó a 42°C, después de 45-50 segundos se regresó a 4°C y se dejó durante dos minutos. Se añadieron 950  $\mu\text{L}$  de medio SOC a temperatura ambiente (2 g de peptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1M, 0.25 mL de KCl 1M, 1 mL de  $\text{Mg}^{2+}$  2M esterilizado por filtración y 1 mL de glucosa 2M esterilizada por filtración aforados a 100 mL con agua desionizada) y se incubó a 37°C durante 1.5 horas con una agitación aproximada de 150 rpm en una incubadora Lab-Line Orbit Environ-Shaker. Una vez concluida la incubación se plaquearon 100  $\mu\text{L}$  en dos cajas de LB/ampicilina/IPTG/x-Gal (esterilizar 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar, pH 7.0; dejar enfriar a 50°C y agregar ampicilina a una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , IPTG a una concentración final de 5 mM y X-Gal a una concentración final de 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las cajas se incubaron 24-36 horas y se seleccionaron las colonias de color blanco, que son las que contienen el plásmido con el inserto. Para comprobar la transformación, se extrajo el plásmido, se digirió, según se detalla más adelante, y se realizó un gel de agarosa.

Para almacenar las células transformadas se sembraron las bacterias en LB y se incubaron a 37°C, con agitación de 200 rpm durante 14-16 horas. Se tomaron 350  $\mu\text{L}$  del cultivo y se le añadieron 150  $\mu\text{L}$  de una mezcla de glicerol-LB (1:1) estéril (la concentración final de glicerol es de 15%).

**G. PREPARACIÓN DE DNA DE PLÁSMIDOS (MINIPREP)**

Se centrifugaron 1.5 mL del cultivo de células transformadas a 12,000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga Sorvall MC12 FA-MICRO y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El botón se resuspendió con una pipeta en 200  $\mu\text{L}$  de buffer GTE y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2N/SDS 1% recién preparado, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 3M, pH 4.8, se mezcló el tubo por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Una vez concluida la incubación se centrifugó el tubo a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Jouan MR1812

con un rotor Jouan (número de catálogo 11174590) y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, al cual se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de RNasa GIBCO (concentración 15 mg/mL). La mezcla anterior se incubó durante 1.5 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó una extracción con 400  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12,000 rpm en una centrifuga Sorvall MC12 FA-MICRO. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se realizó una extracción con 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). Posteriormente se precipitó el DNA por la adición de 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol e incubando a -20°C durante 20 minutos. Para obtener el botón de DNA, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C se eliminó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70%. El etanol se eliminó por centrifugación a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el resto del etanol se evaporó a temperatura ambiente. El botón de DNA se resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

#### **H. DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS**

En un tubo eppendorf de 0.5 mL se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de DNA plasmídico, 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador 3 (10X) (GIBCO) y 12  $\mu\text{L}$  de agua estéril. El tubo se calentó a 110°C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente se añadió 1  $\mu\text{L}$  de EcoRI (GIBCO) y se incubó durante 1 h a 37°C.

#### **I. AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO**

Para el aislamiento del plásmido se utilizó el kit QUIAGEN Plasmid Midi Kit. Se realizó el procedimiento según el protocolo indicado por el fabricante.

La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, a cargo de la Dra. Laura Ongay, Marcela Sosa y María Guadalupe Códiz. La secuencia del cDNA obtenido se realizó utilizando el oligonucleótido 5'→3' como cebador con el kit de secuenciación Big Dye Terminator Cycle (Perkin Elmer Applied Biosystem) y un secuenciador automático AB1PRISM 310 de Perkin Elmer.

### ***J. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL***

Se utilizaron 25 ejes o 5 embriones de los diferentes tiempos de germinación (independientemente del peso) y se colocaron en un mortero estéril, agregándoles nitrógeno líquido para congelarlos. El material congelado se molió hasta polvo fino, se le añadió 1 mL de TRIzol® de GIBCO BRL, se homogenizó y se transfirió a un tubo eppendorf. Cuando se realizó la extracción de RNA de hoja se utilizó una relación de 2.5 g de tejido por 3 mL de TRIzol® repartidos en 4 tubos eppendorf, mientras que para la obtención de RNA de raíz, tallo, espiga y pistilo, la relación fue de 3.5-4 g de tejido por 4 mL de TRIzol® repartidos en 5 tubos eppendorf.

El homogenizado se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 minutos, para después centrifugar a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos (centrífuga Jouan MR1812, rotor con número de catálogo 11174590). El sobrenadante se transfirió a tubos limpios, se agregaron 0.2 mL de fenol-cloroformo 1:1 a cada uno y se agitaron durante 15 segundos. Las mezclas se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos y las fases acuosas se transfirieron a tubos eppendorf limpios a los que se agregaron 0.5 mL de isopropanol y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez concluida la incubación, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos, los sobrenadantes se decantaron y los botones se lavaron con 1 mL de etanol al 70% a -20°C, preparado con agua tratada con DEPC (se agregaron 2 mL de DEPC por cada litro de agua, se dejó agitar toda la noche y se esterilizó durante 2 horas). Después se centrifugaron a 6,400 rpm a 4°C durante 5 minutos, los sobrenadantes se decantaron, dejándose secar los botones durante 4 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los botones obtenidos en cada eppendorf se resuspendieron en los siguientes volúmenes de agua tratada con DEPC: para ejes y embriones de maíz, 100 µL; para hoja, 25 µL; para raíz, tallo, espiga y pistilo, 20 µL. El RNA del mismo tejido resuspendido en diferentes eppendorf, se colectó en un solo tubo

### ***K. MARCAJE DE LA SONDA CON [<sup>32</sup>P]-dCTP POR LA TÉCNICA DE RANDOM PRIMER***

Se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL 12 µL de DNA purificado a partir de un gel de agarosa y 9 µL de agua. El tubo se calentó a 100°C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente en un baño de hielo. Se agregaron 3 µL de una mezcla de dATP (500 µM), dGTP (500 µM) y dTTP (500 µM), 20 µL de Random Primer Solution 2.5X y 1 µL de Klenow

DNA polimerasa I, provenientes del kit RadPrime DNA Labelling System de GIBCO BRL. A la mezcla anterior se le añadieron 5  $\mu\text{L}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  mezclando suavemente. Se incubó durante 1 hora a 37°C en un contenedor de plomo y concluido este tiempo se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

Para purificar la sonda se colocaron 75  $\mu\text{L}$  de DNA marcado a una columna de Sephadex 50 (una jeringa de insulina empacada con Sephadex 50 hasta la marca de 0.8 mL), centrifugándola durante 5 minutos a 2000 rpm en la centrífuga Sorvall RT 6000D. La sonda se almacenó a -20°C en un contenedor de plomo hasta su uso.

**L. ELABORACIÓN DE UN GEL DESNATURALIZANTE**

Se preparó un gel de agarosa al 1.2% de la siguiente manera: 1.82 g de agarosa, 15 mL de MOPS 10X (EDTA 10mM, MOPS 0.2M, acetato de sodio 50mM, pH 7, preparado en agua tratada con DEPC) se aforaron a 150 mL con agua tratada con DEPC y se añadieron 112.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio 50mg/mL. Se preparó la siguiente mezcla para la desnaturalización del RNA:

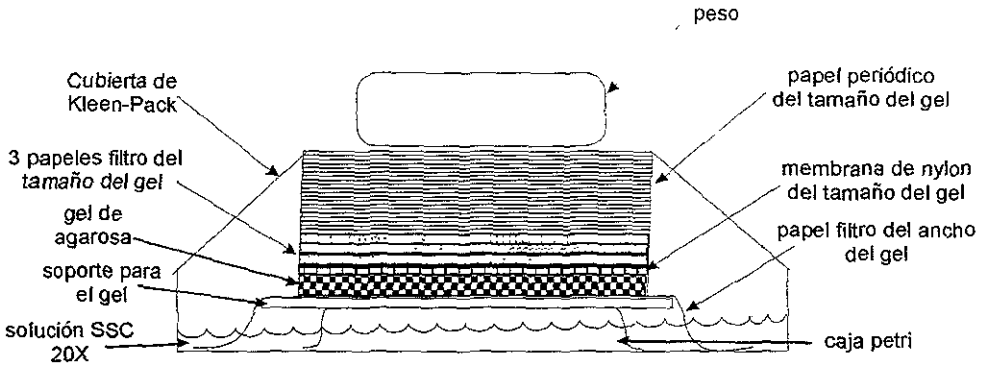
Reactivo	Cantidad
DMSO	22.5 $\mu\text{L}$
MOPS 1X	5.0 $\mu\text{L}$
Glioxal 6M desionizado	6.6 $\mu\text{L}$
RNA	10 – 20 $\mu\text{g}$
Agua tratada con DEPC	cbp 45 $\mu\text{L}$

Las muestras se incubaron a 50°C durante 1 hora, se enfriaron en hielo y se les adicionaron 6  $\mu\text{L}$  de buffer de carga para RNA. Se corrió el gel a 100 V a 4°C por 4 horas utilizando como buffer de corrida MOPS 1X.

**M. NORTHERN BLOT**

**a) Transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon:**

Para ello, se montó el dispositivo que se muestra en la figura 13



**Figura 13. Dispositivo para realizar la transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon**

La transferencia se realizó durante 18 horas como mínimo. Una vez concluido ese tiempo, la membrana se lavó durante 5 minutos en SSC 20X estéril (87.65 g NaCl, 44.1 g de citrato de sodio aforados a 500 mL con agua tratada con DEPC) y se dejó secar al aire. El RNA se fijó a la membrana mediante luz ultravioleta, aplicando 2 ciclos de "Optimal Crosslink" en un equipo UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HS1.

**b) Hibridación**

*Prehibridación:* Se colocó la membrana de nylon en un tubo de hibridación y se colocaron 15 mL de solución de hibridación (fosfato dibásico de sodio 0.5M, fosfato monobásico de sodio 0.5M, SDS al 7%, EDTA 10mM, BSA al 1%) La membrana se prehibridó durante 2 horas a 68°C en un horno Hybaid® Micro-4.

*Hibridación:* Se eliminó la solución de prehibridación y se agregaron de 8 a 10 mL de solución fresca. Se agregó una cantidad de sonda que contuviera aproximadamente  $1 \times 10^7$  cpm y se hibridó la membrana a 68°C durante 16-24 horas.

**c) Lavados**

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, se realizaron varios lavados, con la finalidad de eliminar la sonda que no se unió específicamente, por lo que para determinar el número de lavados a realizar, se midió la radiación emitida con un contador Geiger marca Technical Associates, modelo PUG 1AB; tomando en cuenta que únicamente se debe observar emisión de radiación superior a 100 cpm en una región muy definida de la membrana. Los lavados utilizados incrementan su astringencia progresivamente y fueron los siguientes:

*Primer lavado:* Solución SSC 2X/SDS 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente en el tubo de hibridación.

*Segundo lavado:* Solución SSC 1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55°C.

*Tercer lavado:* Solución SSC 0.5X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55°C.

*Cuarto lavado:* Solución SSC 0.1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55°C.

**d) Exposición de la membrana**

La membrana de nylon se colocó sobre un soporte, se cubrió con Kleen Pack eliminando todas las burbujas y se introdujo en un cassette. Posteriormente, en el cuarto oscuro se colocaron dos películas Kodak, se guardó el cassette en una bolsa negra y se almacenó a -70°C durante dos semanas.

**e) Revelado de las películas**

Se retiró una de las películas colocadas en el cassette después de una semana de exposición y la otra a las dos semanas, ambas se revelaron con reactivos para revelar KODAK GBX.

**f) Densitometría de las bandas**

La densitometría de las bandas se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular a cargo del Dr. Mark West. El equipo empleado fue el LKB Bromma Ultra Scan XL Enhanced Densitometer, que utiliza el programa Gel Scan XL (2.1).



## VIII. RESULTADOS

### A. CURVA DE GERMINACIÓN Y CONTENIDO DE AGUA DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ

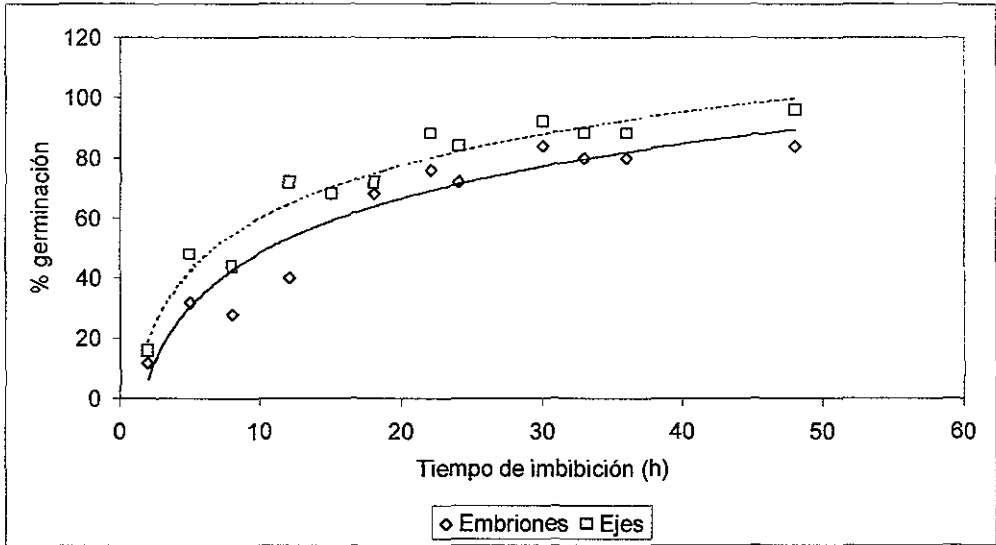
Con la finalidad de determinar la viabilidad de los ejes y embriones de maíz se realizaron curvas de germinación tanto de embriones como de ejes embrionarios de maíz. Asimismo, se realizó la determinación del incremento de peso húmedo, para observar los tiempos en los que ocurren las tres fases de entrada de agua hacia el tejido embrionario y seleccionar los tiempos óptimos para la detección de los RNAs para el transportador de sacarosa por medio de Northern Blot.

En los resultados obtenidos se puede observar que los ejes germinan en un tiempo más corto que los embriones, alcanzando 60% de germinación a las 12 horas, mientras que los embriones llegan a este mismo punto a las 16 h (Figura 14). Una probable explicación a esto es que la entrada de agua hacia los embriones se vea retrasada por la presencia del escutelo. El porcentaje máximo de germinación obtenido es del 84% para los embriones y del 96% para los ejes embrionarios, resultado que indica que la viabilidad de ambos tejidos es adecuada para la realización de los experimentos.

Para ambos tejidos se pueden observar las tres fases de toma de agua descritas según Derek y Black, coincidiendo la fase III con la elongación radicular a las 30 horas del tiempo de imbibición (Derek y Black, 1994).

En vista de lo anterior se escogieron tiempos de germinación que abarcaran las tres fases de toma de agua y además tiempos tardíos en la germinación (0 h, 8 h, 15 h, 24 h, 36 h, 48 h y 72 h).

A



B

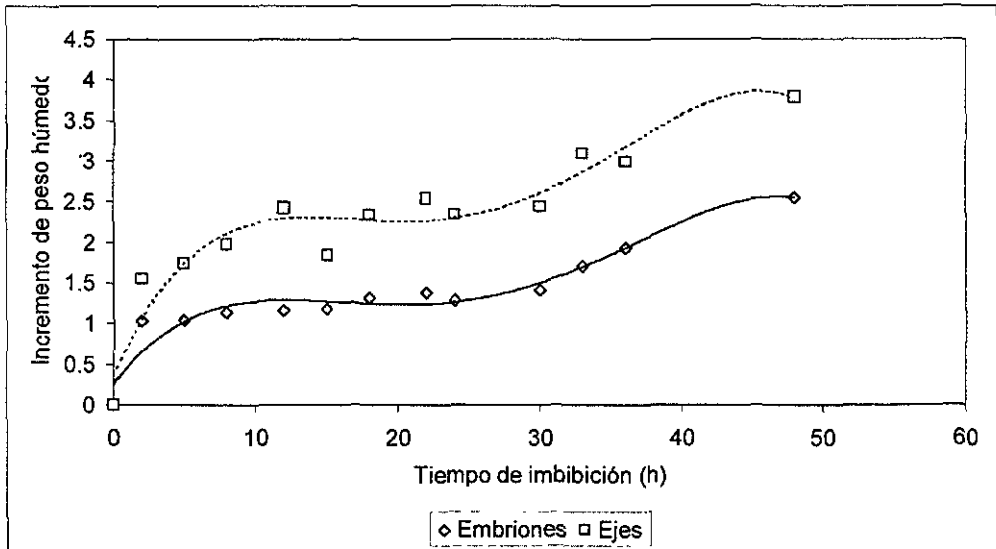
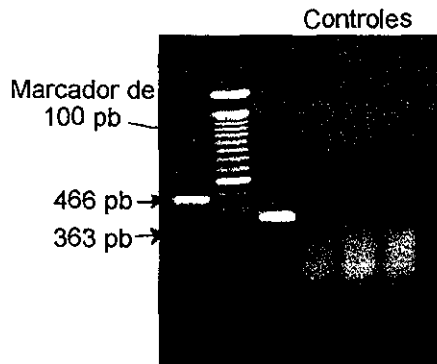


Figura 14. Curvas de germinación (A) y de incremento de peso húmedo (B) en ejes y embriones de maíz.

## B. OBTENCIÓN DE LA Sonda ESPECÍFICA PARA EL SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup> DEL MAÍZ

Con el fin de detectar a los RNAm del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> obtuvo un fragmento de DNA específico para el transportador, para utilizarlo como sonda específica. Se determinó realizar ensayos de RT-PCR en vista de que la secuencia para el simportador se encontraba ya disponible en la base de datos del GenBank, con el número de acceso AB008464 (Aoki *et al*, 1999). Se diseñaron oligonucleótidos con base en esta secuencia y de éstos, tres fueron los que resultaron en la amplificación de los productos deseados. La región elegida para amplificar está muy cercana al extremo 3' del cDNA del simportador de maíz, secuencia específica y conservada para el transportador en las diferentes especies en las que ha sido caracterizado y que nos evitaría encontrar reacciones cruzadas con otros genes.

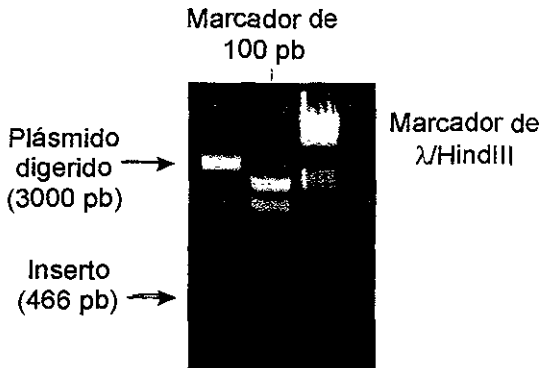
Para la reacción de la transcriptasa reversa, se empleó tanto RNA de embrión germinado 24 horas como RNA de hoja madura (proveniente de una planta de 4 semanas de edad), obteniéndose únicamente producto amplificado del RNA de hoja. Los oligonucleótidos utilizados fueron el que va de 5'→3' y de 3'→5', obteniéndose un producto de 466 pb, mientras que al realizar el ensayo con el oligonucleótido interno (5'→3') y el 3'→5' se obtuvo un producto de 366 pb (Ver Figura 15). Por la longitud de ambos fragmentos, se presume que el DNA amplificado corresponde al transportador de sacarosa. En los controles de PCR no se observó ningún producto amplificado.



**Figura 15. Fragmentos de cDNA del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> obtenidos por la técnica de RT-PCR.** En el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se muestran dos productos amplificados por RT-PCR, uno de 466 pb y otro de 366 pb. Los controles se realizaron utilizando únicamente uno de los tres oligonucleótidos en cada caso.

### C. CLONACIÓN DEL cDNA OBTENIDO EN EL ENSAYO DE PCR EN *E. coli* CEPA DH5 $\alpha$

Con el objetivo de obtener y conservar la sonda para el transportador de sacarosa, el cDNA de 466 pb se clonó en *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ , por medio del vector pGEM®-T Easy Vector de Promega. Para comprobar que la clonación se hubiera llevado a cabo, se purificó el plásmido y se digirió con EcoRI, como se observa en la figura 16, se encontraron dos bandas en el gel de agarosa; una correspondiente al plásmido digerido (de alrededor de 3000 pb) y otra correspondiente al inserto de cDNA. Cabe mencionar que únicamente se logró la clonación del cDNA de 466 pb.



**Figura 16. Producto de clonación digerido con EcoRI.** Se muestra el plásmido digerido de alrededor de 3000 pb y el inserto de cDNA de 466 pb en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

### D. SECUENCIACIÓN DEL INSERTO

Con la finalidad de verificar que el cDNA clonado perteneciera efectivamente al transportador de sacarosa, se mandó secuenciar este fragmento en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, obteniéndose una secuencia (Figura 17) que presenta una identidad del 97% con respecto al transportador de sacarosa reportado en maíz (Aoki *et al.*, 1999).

GTGCAGCCAA CTCAATCTTC TGTTCCTGGA TGGCGCTGGG AACATCCTA GGCTATTCCT  
CTGGTTCCAC AAACAACTGG CACAAGTGGT TTCCGTTCTT TTTAACAAAC GCGTGTCTGTG  
AAGCCTGCGC AACCTGAAAG GCGCGTTTCT GGTGGCTGTG GTGTTCTTAG FCATGTGCTT  
GACTGTAACC CTGTTCTTCG CCAACGAAGT GCCCTACAGA GGAAACCAGA ACCTCCCCAC  
AAAGGCAAAC GGCGAGGTCG AGACTGAACC TTCCGGCCCA CTCGCTGTGC TCAAGGGCTT  
CAAGAACTTG CCCACGGGGA TGCCGTCCGT GCTCCTCGTA ACTGGACTCA CCTGGCTCTC  
TTGGTTCCCG TTCATCCTCT ACGACACCGA CTGGATGGGC CGTGAGATCT ACCACGGCGA  
CCCCAAGGGT AGCAACGCTC AGATCTCGGC GTTCGACGAA GCGGTCAGAG TTGGCTCGTT  
CGGGCTGCTG CTCAACTCGA TCGTTCTAGG ATTCAGCTCG TCCTGATCG AGCCCATGTG

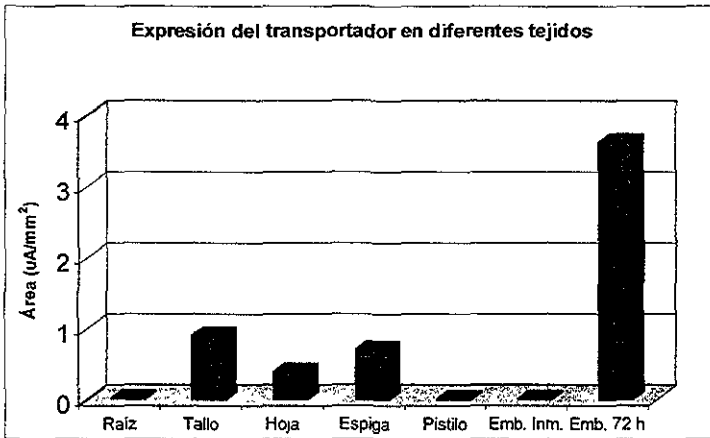
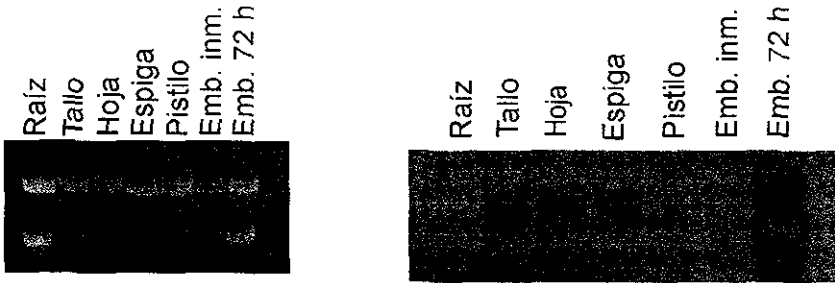
**Figura 17. Secuencia del transportador de sacarosa obtenida a partir del cDNA clonado.** En negritas se muestra la secuencia amplificada por el RT-PCR; la secuencia de los oligonucleótidos está subrayada.

### **E. NIVELES DE TRANSCRITO DEL SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup> EN DIFERENTES TEJIDOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ**

En vista de que la sonda para detectar al RNA del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> se obtuvo a partir de hoja, se evaluó primero el nivel de RNAm para este transportador en los diferentes tejidos de una planta de maíz.

Para este ensayo se seleccionaron diferentes tejidos de maíz, cada uno con un metabolismo y requerimientos de aporte de sacarosa distintos. Los tejidos seleccionados fueron: tallo, raíz, hoja, espiga, pistilo, embrión inmaduro y embrión germinado durante 72 h. Todos los tejidos anteriores se obtuvieron de una planta de 15 semanas de edad con 3 días de polinización, recolectada en el INIFAB de Zacatepec, Morelos. Se cargó una cantidad similar de RNA de los diferentes tejidos (Figura 18A).

La cantidad de transcrito presente en raíz es muy pequeña (como se muestra en las figuras 18B y 18C), mientras que en tallo existe una cantidad ocho veces mayor así como en hoja y espiga. En el pistilo se encontró una cantidad muy pequeña y en embrión inmaduro no se detectó la presencia del transportador. Resulta muy interesante que en el embrión germinado durante 72 horas, se encuentre un nivel tan alto de expresión, lo que sugiere que el transportador debe jugar un papel muy importante en el desarrollo de la planta una vez que protruye la radícula.

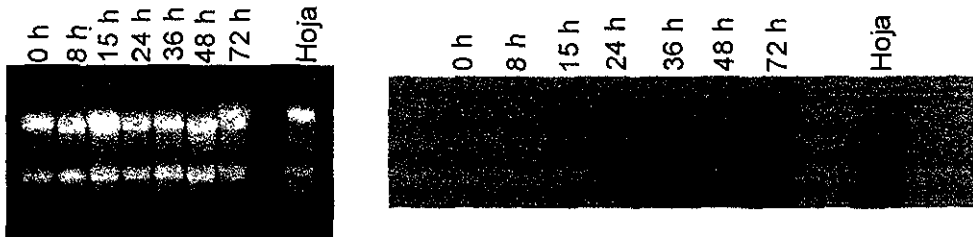


**Figura 18.** Niveles de transcrito del transportador de sacarosa en los diferentes tejidos de una planta de maíz. **A.** Gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el corrimiento de los RNA de los diferentes tejidos; **B.** autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito para el transportador de sacarosa en embriones germinados a 15 h y 36 h con 100 mM de fructosa, 100 mM de glucosa, 100 mM de sacarosa y 100 mM de maltosa; como controles se emplearon embriones germinados 15 h, 36 h y 48 h; **C.** Comparación de la cantidad de transcrito en los diferentes tejidos obtenida a partir de la densitometría de las bandas de la figura B.

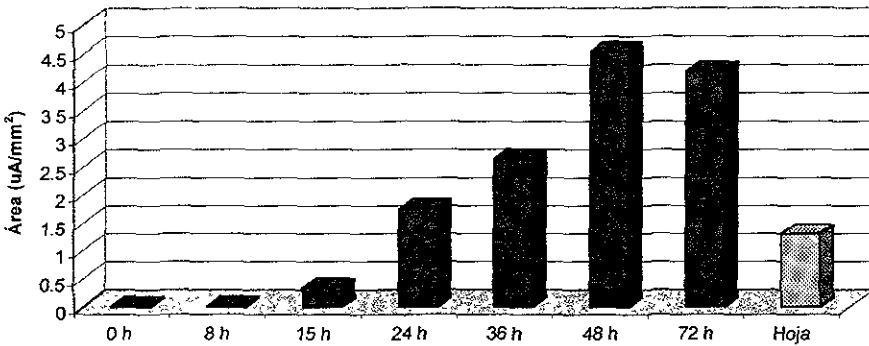
### F. PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup> DURANTE LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES DE MAÍZ

Se obtuvo el RNA total de los embriones embebidos diferentes tiempos, así como el RNA total de hoja, que se utilizó como control, ya que se ha reportado que el transcrito para el transportador se encuentra en abundancia en este tejido (Aoki *et al.*, 1999) y además la sonda se obtuvo a partir de RNA de hoja.

En la figura 19A se muestra un gel teñido con bromuro de etidio, como control de que en los diferentes carriles se cargó una cantidad similar de RNA. En la autorradiografía del papel de nitrocelulosa (Figura 19B), se detectaron bandas correspondientes a un RNA de aproximadamente 2000 pb. En los resultados se observa que tanto en embriones secos como a las 8 horas de germinación existe una escasa cantidad de transcrito, aumentando ligeramente a las 15 horas. Se advierte un incremento notable a las 24 horas y a partir de este tiempo, la cantidad de transcrito comienza a aumentar hasta alcanzar un máximo a las 48 horas, decreciendo ligeramente hacia las 72 horas. Sorprendentemente, la cantidad de transcrito presente en el RNA total de hoja es incluso menor que la cantidad de RNA a las 24 h. Lo anterior es más evidente en la gráfica de la densitometría de las bandas obtenidas (Figura 19C).



Patrón de expresión en embriones de maíz y hoja



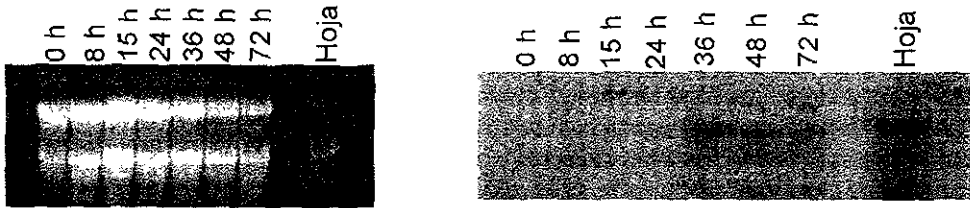
**Figura 19.** Perfil de expresión del transcrito del transportador de sacarosa en la germinación de embriones de maíz. **A.** Gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento del RNA de los diferentes tiempos de germinación; **B.** autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito para el transportador de sacarosa presente a diferentes tiempos de germinación y en hoja madura de maíz; **C.** curso temporal de transcritos para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, obtenida a partir de la densitometría de las bandas de la figura B.

### **G. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS DEL SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup> DE EJES EMBRIONARIOS DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ**

Para poder establecer el papel del escutelo en el transporte de sacarosa, se realizó la determinación de la cantidad de transcrito presente en ejes embrionarios de maíz, eligiéndose los mismos tiempos que en el ensayo de Northern Blot de embriones para poder realizar una comparación.

Nuevamente se realizó el control de cargado de RNA en los diferentes carriles (Figura 20A) para determinar que los posibles cambios o variaciones en los niveles de transcritos para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> se debieran exclusivamente al tiempo de germinación y no a que el carril contuviera una cantidad mayor o menor de RNA total. En la autorradiografía (Figura 20B) se observa que no existen cantidades apreciables de transcrito para el transportador de sacarosa antes de las 36 horas; a este tiempo aparece una cantidad pequeña de RNA que se incrementa ligeramente conforme avanza el tiempo de germinación. Se empleó nuevamente como control el RNA total de hoja.





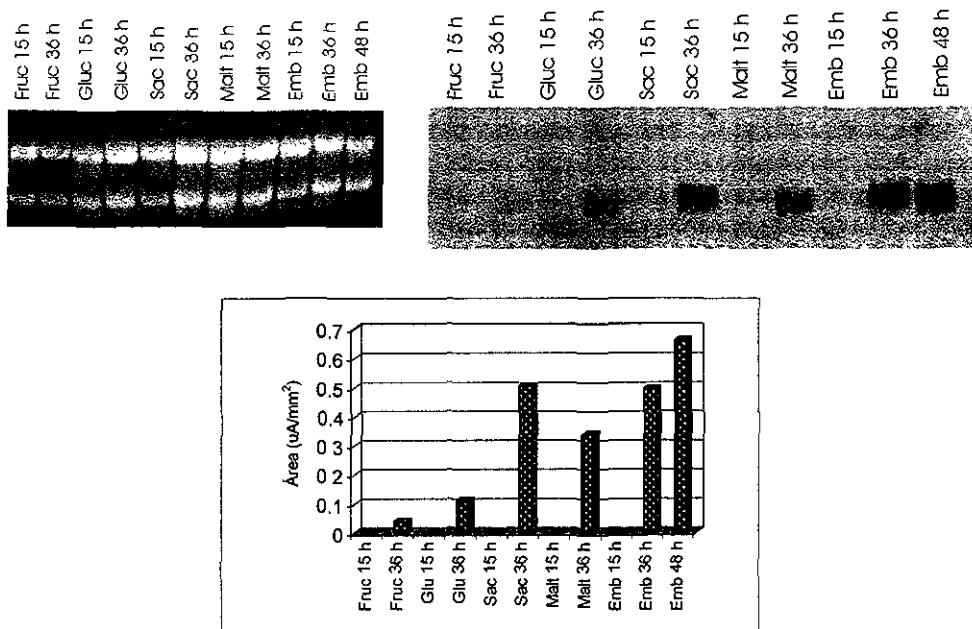
**Figura 20. Perfil de expresión del transcrito del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en la germinación de ejes embrionarios de maíz. A.** Gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento del RNA de los diferentes tiempos de germinación; **B.** autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito para el transportador de sacarosa presente a diferentes tiempos de germinación y en hoja madura de maíz.

#### **H. INFLUENCIA DE DIFERENTES CARBOHIDRATOS SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DEL SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup>**

Con la finalidad de determinar la influencia de los carbohidratos sobre la expresión de los transcritos del simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, se germinaron embriones de maíz en presencia de 100 mM de los siguientes carbohidratos: glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. Tanto la glucosa como la fructosa son los productos de hidrólisis de la sacarosa y se ha reportado que estas concentraciones de carbohidrato son capaces de disminuir ligeramente la actividad de transporte debido al simportador en remolacha (Chiou y Bush, 1998). La sacarosa se empleó para observar la influencia del sustrato propio del transportador, mientras que la maltosa, otro disacárido, se utilizó ya que se ha reportado que el transportador es capaz de transportarla, aunque su afinidad por éste es muy baja (Lemoine, 2000). Existen evidencias contradictorias respecto a la influencia de los carbohidratos sobre el transportador referentes a una represión o inducción de los genes que codifican para esta proteína; debido a lo anterior, se seleccionaron dos tiempos de germinación: 15 h y 36 h; tiempos en los cuales se podría observar cualquiera de estos dos efectos. Los controles empleados fueron embriones germinados 15 h, 36 h y 48 h en agar suave sin suplemento de carbohidratos, el control de 48 h se incluyó también por que es el tiempo en el que se observa un máximo de transcrito en embriones germinados sin influencia externa de carbohidratos.

En la figura 21A se muestra el corrimiento de los RNA totales de los ejes germinados en presencia de carbohidratos a 15 h y 36 h, se observa que la cantidad de RNA presente en cada carril es similar.

En los resultados obtenidos se observa (Figura 21B y 21C) que tanto la glucosa como la fructosa reprimen la expresión del transcrito para el transportador de sacarosa, ésta última en mayor grado; mientras que la sacarosa parece no tener influencia en los niveles de transcrito. La maltosa también ejerce un efecto de represión (30% menor que el control) aunque no tan marcado como la glucosa y la fructosa.



**Figura 21** Expresión de los niveles de transcrito para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en embriones germinados en presencia de diferentes carbohidratos. **A.** Corrimiento del gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el corrimiento de los RNA de los embriones germinados en presencia diferentes carbohidratos; **B.** autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito para el transportador de sacarosa en embriones germinados a 15 h y 36 h con 100 mM de fructosa, 100 mM de glucosa, 100 mM de sacarosa y 100 mM de maltosa; como controles se emplearon embriones germinados 15 h, 36 h y 48 h; **C.** comparación de los niveles de expresión del transcrito del transportador de sacarosa germinados con diferentes carbohidratos obtenida a partir de la densitometría de las bandas de la figura B.

## IX. DISCUSIÓN

Alrededor del 80% de las reservas de nutrientes almacenadas en una semilla de maíz son carbohidratos (Derek y Black, 1994), su degradación y transporte hacia el eje embrionario durante el proceso de germinación, puede ser un proceso limitante y requisito necesario para el mantenimiento del metabolismo de la semilla y su establecimiento como organismo autótrofo.

Existen varios sistemas de transporte de azúcares en plantas, el mecanismo simplástico y el apoplástico. El primero involucra a los conductos que interconectan a los citoplasmas de las células adyacentes, los plasmodesmatas; mientras que el segundo tipo de transporte involucra a proteínas específicas inmersas en la matriz lipídica de la membrana.

Teniendo como antecedente el reporte de la existencia de una ATPasa de protones en la membrana plasmática durante la germinación de maíz (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998), trabajo en donde se determina la actividad de esta enzima transductora de energía en tiempos cortos de la germinación, resulta interesante el estudio del transporte secundario de sacarosa en la germinación del maíz, ya que la actividad de la ATPasa de protones puede influenciar grandemente la actividad del *simportador* sacarosa/H<sup>+</sup>.

Aún cuando el cDNA del transportador de sacarosa en maíz (*ZmSUT1*) fue clonado y secuenciado en 1999 (Aoki, *et al.*) no ha sido estudiada su posible participación en el proceso germinativo. Sin embargo, nos dio las herramientas para realizar el presente trabajo.

Por lo anterior en este estudio se determinaron los niveles de RNAm del *simportador* sacarosa/H<sup>+</sup> en las tres diferentes etapas de la germinación del maíz y en tiempos posteriores a ésta.

### A. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ

Se establecieron tiempos adecuados dentro de la germinación, en los cuales se llevaría a cabo este trabajo, utilizando para ello dos parámetros fisiológicos habitualmente utilizados en la literatura (Derek y Black, 1994): porcentaje de germinación y toma de agua.

En la gráfica de incremento de peso húmedo se encontraron las tres fases de toma de agua. El período que dura cada una de las fases es similar en ejes y embriones de maíz, sin embargo, el incremento en la toma de agua es mayor para los ejes. La fase inicial (I) terminó a las dos horas de imbibición; fase rápida de entrada de agua que se postula que ocurre por la hidratación de las matrices, tales como la pared celular, el almidón y los cuerpos protéicos. Durante esta fase, las células y organelos subcelulares recuperan su forma y tamaño y el citoplasma adquiere su estructura normal. Las membranas celulares sufren daño estructural causado por el probable rearrreglo de los lípidos del estado líquido cristalino cuando la semilla está seca a un estado de gel (en el estado hidratado) (Derek y Black, 1994; Street y Öpik, 1986). La segunda fase de toma de agua (II) cubrió el período comprendido entre las 2 y las 30 horas; fase de ingreso lento de agua en el que su entrada está determinada por la concentración de solutos y el potencial de turgor. A partir de las 30 horas, se encontró la fase de elongación radicular (III), en la que existe alrededor de un 80% de germinación para los embriones y de un 96% para los ejes embrionarios; este período coincide con la ruptura seminal y el comienzo del alargamiento y protrusión de la radícula y el incremento en la incorporación de agua está dado inicialmente por los cambios que experimentan las células de la radícula (Flores, 1999; Derek y Black, 1994).

Respecto a la toma de agua, como ya se mencionó, los ejes embrionarios acumulan agua más rápidamente que los embriones de maíz; es probable que al carecer del escutelo, las células del eje se hidraten más rápidamente. Sin embargo, aún cuando los ejes embrionarios toman agua más rápido y germinan más pronto, las raíces y tallos de los embriones jóvenes son más grandes, esto probablemente está influenciado por los carbohidratos que el escutelo aporta para su desarrollo.

Se tomaron los tiempos de 0 h, 8 h, 15 h, 24 h y 36 h dentro de las tres fases de la germinación y tiempos posteriores a la emergencia de la radícula, 48 h y 72 h, en los cuales se esperaba un cambio dramático en las necesidades de aporte de carbohidratos por los tejidos en crecimiento.

## B. EXPRESIÓN DEL RNAm PARA EL SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup> EN EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN

El transportador de sacarosa en maíz (*ZmSUT1*) es el segundo cDNA clonado en una especie monocotiledónea y el primero de una especie C<sub>4</sub> (Aoki *et al.*, 1999). Mediante la técnica de RT-PCR y los oligonucleótidos TCCTCTGGTTCCACAAACAAC (5' → 3'), CTTGACTGTAACCCTGTTCTTCG (5' → 3', oligonucleótido interno) y ACGAGCTGAATCCTAGAACGA (3' → 5') se obtuvieron dos bandas amplificadas, correspondientes a los pesos moleculares esperados, de 466 y 363 pb. El producto de 466 pb fue clonado y secuenciado presentando una homología del 97% con el cDNA reportado por Aoki *et al.* (1999), para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz.

Empleando la sonda obtenida, se detectaron por Northern Blot, bandas de una longitud aproximada de 2000 pb, que es coincidente con la reportada en la literatura (Aoki *et al.*, 1999). Los resultados muestran que existe un incremento en los niveles de RNAm para el transportador conforme transcurre la germinación de embriones de maíz a partir de las 24 h y hasta las 72 h; lo anterior sugiere que existe un mayor requerimiento de carbohidratos por parte del eje embrionario conforme se acerca a la protrusión de la radícula, que se ha propuesto que ocurre por elongación celular, y poco después del comienzo de la división celular. Los carbohidratos serían necesarios para la formación de nuevas células y para la obtención de energía. Aún cuando a las 72 h hay un crecimiento activo de las hojas y raíz, se encuentra una disminución del 8% del transcrito para el transportador; una posible explicación es el agotamiento de las reservas de carbohidratos presentes en el escutelo, o bien que el transporte de monosacáridos se esté haciendo más importante en esta etapa.

El nivel de los transcritos para el transportador en los ejes embrionarios germinados es muy bajo y solo a tiempos posteriores de la elongación de la radícula comienza la expresión del transportador en este tejido, aunque ésta es mínima comparada con la del escutelo, sugiriendo que el transportador de sacarosa se localiza principalmente en el escutelo. Este resultado coincide con datos obtenidos recientemente en el laboratorio, en los que por medio de inmunocitocalización se encontró que el transportador de sacarosa se localiza abundantemente en el escutelo. Beevers y Kriedemann demostraron que los cotiledones de *Ricinus communis* toman la sacarosa proveniente del endospermo sin hidrolizarla y que este transporte se logra gracias a un transportador específico para sacarosa (Komor, 1997).

Matsukura *et al.* (2000) recientemente encontraron por medio de hibridización *in situ* que el transporte de azúcares en semillas de arroz en germinación ocurre desde el apoplasto del endospermo a través de la membrana plasmática hacia las células escutelares; datos que apoyan la propuesta de que en los embriones de maíz el escutelo representa el tejido fuente y el eje embrionario en desarrollo el tejido demanda (Humphreys, 1986).

La baja cantidad de transportador presente en el eje embrionario indica que la sacarosa entra a éste por otro mecanismo; muy probablemente la invertasa que se encuentra en la pared celular de este tejido degrade la sacarosa a las dos unidades monoméricas, glucosa y fructosa, y éstas atraviesen la membrana plasmática gracias a un transportador de hexosas, aunque ninguno ha sido caracterizado hasta el momento en este estadio del desarrollo.

### C. EXPRESIÓN DEL RNAm PARA EL TRANSPORTADOR EN DIFERENTES TEJIDOS

La presencia del transportador de sacarosa en hojas de maíz fue reportada por Aoki *et al.* (1999), los resultados sugieren que el transportador podría jugar un papel clave en la descarga de sacarosa hacia el floema y por lo tanto en la distribución de ésta hacia los tejidos demanda. En el presente estudio se observó que en el tallo existe una gran cantidad de transcrito para el transportador y en hoja y espiga también hay niveles importantes. La presencia del transportador en el tallo sugiere que la salida de sacarosa llevada por el floema va hacia los tejidos demanda. No se detectó la presencia de transcritos para el transportador ni en raíces ni en pistilo; en algunas especies, tales como zanahoria, se ha reportado la presencia del transportador en raíces y se ha involucrado con el proceso de descarga del floema hacia los tejidos demanda (Shakia y Sturm, 1998); la ausencia del transportador en raíces de maíz sugiere que el mecanismo de salida de la sacarosa hacia los tejidos demanda esté mediado por un mecanismo diferente. El pistilo fue tomado de una planta de maíz de tres días de polinizado, por lo que éste posiblemente ya había cumplido su función de transporte de polen para la fertilización y es probable que ya no necesitara aporte de sacarosa, por lo que ya no sintetiza transcritos para el transportador. El embrión inmaduro tampoco presentó transcritos para el transportador, ya que se ha propuesto que el llenado de la semilla con sustancias de almacenamiento muy al inicio de la embriogénesis es a través de plasmodesmata (Jones *et al.*, 1986). En el embrión germinado durante 72 horas, el

requerimiento de carbohidratos para el desarrollo es muy alto, por lo que el escutelo transporta desde el apoplasto del endospermo la sacarosa necesaria para aportar al eje embrionario.

#### **D. EFECTO DE DIFERENTES CARBOHIDRATOS EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm PARA EL SIMPORTADOR SACAROSA/H<sup>+</sup>**

Se ha propuesto que los azúcares no solo participan como metabolitos fuente de energía en las células vegetales, sino también forman parte del sistema de señalización para la represión o inducción de genes que son importantes en la asimilación y síntesis de carbohidratos. De esta manera, los genes que codifican para la fotosíntesis y la movilización de reservas son inducidos por el agotamiento de carbohidratos mientras que altas concentraciones de azúcares estimulan la expresión de genes para la utilización y almacenamiento (Lalonde *et al.*, 1999). En la germinación es probable que existan mecanismos finos de censado de carbohidratos y que puedan desatar un cambio rápido en el metabolismo celular, ya que es cuestión de pocas horas para que el metabolismo de las células embrionarias cambie para llevar a la elongación celular entre las 2 y 30 horas en el maíz en estudio y posteriormente de las 30 a las 72 horas, el período posgerminativo y de formación de nuevas células y de gran diferenciación celular.

Debido a que en el escutelo se encontró el mayor nivel de transcrito para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, se exploró la influencia de diferentes azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) en concentración 100 mM sobre la expresión de los transcritos de embriones que fueron embebidos 15 y 36 horas en presencia de los diferentes carbohidratos.

Los niveles de transcrito para el transportador cuando los embriones germinan en presencia de sacarosa no se modifican, mientras que en embriones de arroz la sacarosa es un inductor de la síntesis de RNAm específicos (Matsukura *et al.*, 2000). Se ha reportado que hojas de remolacha embebidas en una solución 100 mM de sacarosa presentan represión de la transcripción (Chiou y Bush, 1998). El hecho de que no exista inducción en el transcrito para el transportador de sacarosa en maíz se puede deber a que la concentración presente en el escutelo es la máxima concentración que puede estimular la transcripción. La maltosa por su parte, ejerce un efecto de represión, aunque en menor grado que la glucosa y la fructosa. Esto se debe posiblemente a que el mecanismo de censado de maltosa sea diferente que

para los demás carbohidratos, o a que la maltosa pueda entrar a la célula por un transportador diferente

La glucosa y la fructosa reprimieron de manera importante la expresión del transportador, en mayor grado que lo observado en remolacha (Chiou y Bush, 1998). Contrario a lo que encontraron Matsukura *et al.* (2000) quienes demostraron que embriones de arroz embebidos en glucosa y fructosa e incubados en presencia de luz, incrementan su contenido en estos carbohidratos y encontraron que los embriones que fueron colocados con glucosa expresan el transcrito en mayor proporción al los embriones control (sin la adición de carbohidratos). Sin embargo, observaron que al germinar en oscuridad, no hay presencia de transcritos para el transportador sino hasta las 72 horas, ésto al embeber los embriones en medio con glucosa y fructosa. En maíz, aún en ausencia de carbohidratos y en la oscuridad, existe una elevada expresión de los transcritos para el simportador desde las 24 horas y cuando germinan en presencia de glucosa y fructosa existe una represión en la expresión del transportador.

El mecanismo de censado y regulación de la transcripción aún no está muy claro, pero se ha propuesto que existen diferentes mecanismos de señalización para hexosas y para sacarosa (Lalonde *et al.*, 1999). Habría que investigar con más detalle si pudieran existir grandes diferencias en estos mecanismos en arroz y maíz, ya que ambas especies son monocotiledóneas y se ha planteado que el transportador de sacarosa puede ser uno de los puntos clave en el mecanismo de transducción de señales. Como se ha señalado, existe una identidad del 75% entre los transportadores de ambas especies y es posible que las diferencias entre ambas secuencias lleven a señales diferentes en cuanto a la represión o inducción del gen para el transportador.

El hecho de que aparentemente exista únicamente un gen que codifica para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en maíz es muy relevante, ya que su producto es vital para el metabolismo de la sacarosa.



## X. CONCLUSIONES

1. Se aisló, clonó y secuenció un fragmento de cDNA de 466 pb específico para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz que puede ser utilizado como sonda.
2. El RNAm para el transportador es más abundante en embriones germinados 72 horas que en tallo, hoja y pistilo. En raíces y embriones inmaduros no se detectó a los transcritos.
3. No se encontró RNAm para el transportador entre las 0 y 8 horas de germinación, comenzando su síntesis a partir de las 15 horas con un incremento importante del mensajero a las 24 horas y hasta las 72 horas de germinación. Lo anterior sugiere que al inicio de la germinación la actividad de transporte podría ocurrir con la proteína residual o que se encontraba funcional durante la embriogénesis y que el producto de la traducción de los RNAm después de las 24 horas, son transportadores propios de la germinación tardía.
4. Es probable que el gen para el transportador esté sujeto a un control metabólico importante, debido a que durante la germinación alcanza niveles de expresión aún mas altos que los encontrados en hoja, que es un tejido que se encuentra sintetizando y transportando sacarosa activamente.
5. Comparando los niveles de transcrito de los embriones con el eje embrionario, es claro que el escutelo es el que produce una mayor cantidad de transcrito, sugiriendo que este tejido es el más importante en la semilla para la translocación de sacarosa hacia el eje embrionario para su desarrollo.
6. Fructosa y glucosa ejercen un efecto represor en la expresión del transcrito, mientras que hay una pobre represión de éste por maltosa. La sacarosa no tiene ningún efecto aparente en los niveles de RNAm para el transportador.

7. Es posible que existan *al menos dos* mecanismos de comunicación entre el apoplasto y la célula, mediados uno, por la concentración de sacarosa y otro, por los productos de su hidrólisis.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. AOKI, N., HIROSE, T., TAKAHASHI, S., ONO, K., ISHIMARU, K., OHSUGI, R. (1999). Molecular cloning and expression of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiology*, **40**(10): 1072-1078.
2. ASSMANN S.M., HAUBRICK, L.L. (1996). Transport proteins of the plant plasma membrane. *Current Opinion in Cell Biology*, **8**(4): 458-467.999
3. BÜRKLE, L. HIBBERD, J.M., QUICK, W.P., KÜHN, C., HIRNER, B., FROMMER, B. (1998). The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter *NtSUT1* is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, **118**: 59-68.
4. BUSH, D.R. (1988). Proton-coupled sucrose transport in plasmalemma vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L. cv Great Western) leaves. *Plant Physiology*, **89**: 1318-1323.
5. BUSH, D.R. (1990). Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiology*, **93**: 1590-1596.
6. BUSH, D.R. (1993). Inhibitors of the proton-sucrose symport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **307**: 355-360.
7. BUSH, D.R., CHIOU, T.J. CHEN, L. (1996). Molecular analysis of plant sugar and amino acid transporters. *Journal of Experimental Botany*, **47**: 1205-1210.
8. CHIOU, T.J. y BUSH, D.R. (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences.USA*, **95**: 4784-4788.
9. De JONG, J.W., KOERSELMAN-KOOIJ, J.W., SCHUURMANS, J.A.M.J. (1996). Characterization of the uptake of sucrose and glucose by isolated seed coat halves of developing pea seeds. Evidence that a sugar facilitator with diffusional kinetics is involved in seed coat unloading. *Planta*, **199**: 486-492.
10. DELROT, S y BONNEMAIN, J.L. (1980). Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiology*, **67**: 560-564.
11. DEREK, J. y BLACK, M. Seeds Biology of Development and Germination. 2a edición. Plenum Press. EUA. 1994. pp 1-33, 99-111, 147-197.
12. DEY, P.M y HARBORNE J.B. (editores). Plant Biochemistry. Academic Press. Gran Bretaña. 1997. pp. 263-264
13. FLORES, E. La planta, estructura y función. Ed. El Libro Universitario. Costa Rica. 1999 pp 773-803

14. FOSTER, A.S., GIFFORD, E.M. Comparative morphology of vascular plants. W.H. Freeman and Company. USA. 1959. pp. 536
15. GIAQUINTA, R. (1977). Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. *Science*, **267**: 369-370.
16. HIROSE, T., IMAIZUMI, N., SCOFIELD, G.N., FURBANK, R.T., OSHUGI, R. (1997). CDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiology*, **38(12)**: 1389-1396.
17. HOPKINS, W.G. Introduction to Plant Physiology. John Wiley & Sons. EUA. 1995. pp. 285-339.
18. HUMPHREYS, T.E. (1987). Sucrose efflux and export from the maize scutellum. *Plant, Cell and Environment*, **10**: 259-266.
19. JADE, M y BUSH, D.R. (1998). His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, **95**: 9025-9030.
20. KOMMOR, E., ROTTER, M., TANNER., W. (1977). A proton-cotransport system in a higher plant: sucrose transport in *Ricinus communis*. *Plant Science Letters*, **9**: 153-162.
21. JONES, R.J., GRIFFITH, S.M., BRENNER, M.L. (1986). Sink regulation of source activity by hormonal control. Regulation of carbon and nitrogen reduction and utilization in maize. *American Society of Plant Physiology*, 233-245.
22. LARSSON, C. y MÖLLER I.M. (editores). The Plant Plasma Membrane. Structure, Function and Molecular Biology. Ed. Springer-Verlag. Alemania. 1990. pp. 1-13.
23. LALONDE, S. BOLES, E., HELLMANN H., BARKER, J., PATRICK, J., FROMMER, W.B. (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *The Plant Cell*, **11**: 707-726.
24. LEMOINE, R. GALLET, C., GAILLARD, C., FROMMER, W.B., DELROT, S. (1992) Plasma membrane vesicles from source and sink leaves. *Plant Physiology.*, **100**: 1150-1156.
25. LEMOINE, R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1465**: 246-262.
26. MATSUKURA, C., SAYITO, T., HIROSE, T., OSHUGI, R., PERATA, P., YAMAGUCHI, J. (2000). Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiology*, **124**: 85-94.
27. MEYER, B.S. Introduction to Plant Physiology. 2a edición. Ed. D. Van Nostrand Company. EUA. 1973. pp. 530-547.

28. MILTHORPE, F.L. y MOORBY, J. An Introduction to Crop Physiology. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 1974. pp 111-123.
29. NEUFFER, G.M., COE, E.H., WESSLER, S.R. Mutants of Maize. Cold Spring Harbor Lab. Press. EUA. 1997. pp 17.
30. RAVEN, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. Biology of Plants. 5a edición. Worth Publishers. EUA. 1992. pp 66-68, 441-452, 575-572.
31. RIESMEIER, J.W. WILLMITZER, L., FROMMER, W. (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal*, **11**: 4705-4713.
32. RIESMEIER, J.W., HIRNER, B., FROMMER, W.B. (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *The Plant Cell*, **5**: 1591-1598.
33. SÁNCHEZ-LINARES, L. Tesis de maestría. Actividad de bombeo de H<sup>+</sup> por la ATPasa de la membrana plasmática en embriones de maíz durante la germinación. UNAM. 1998.
34. SÁNCHEZ-NIETO, S., TUENA DE GÓMEZ-POYOU, M., RODRÍGUEZ-SOTRES, R., CARBALLO, A., GAVILANES-RUIZ, M. Comparison of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1414**: 175-187.
35. SAUER, N., BAIER, K., GAHRTZ M., STADLER, R., STOLZ, J., TRUERNIT, E. (1994) Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Plant Molecular Biology*, **26**: 1671-1679.
36. SHAKYA R. y STURM A. (1998). Characterization of source- and sink- specific sucrose/H<sup>+</sup> symporters from carrot. *Plant Physiology*, **118**: 1473-1480.
37. STREET, H.E. y ÖPIK, H. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development. 3a edición. Ed. Edward Arnold. Gran Bretaña. 1986. pp 5-25.
38. VOET D. y VOET J.G. *Biochemistry*. 2ª edición. Ed. John Wiley & Sons. EUA. 1995. pp. 290-304, 513-524.
39. WOLFERSBERGER, M.G. (1994) Uniporters, Symporters and Antiporters. *Journal of Experimental Biology*, **196**: 5-6.