



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*"REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS EN
LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ"*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ALEJANDRA GÓMEZ CALDERAS



MÉXICO, DF

2008.



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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Blas Lotina Hennsen
Vocal: Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Secretario: Dra. Sobeida Sánchez Nieto
1er. Suplente: Dra. Carmen Giral Barnés
2º Suplente: M. en C. María Manuela Nájera Martínez

Este trabajo se realizó en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Asesor

M. en C. María Manuela Nájera
Martínez

Supervisor Técnico

Alejandra Gómez Calderas

Sustentante

*Todos sabemos que nada ni nadie habrá de ahorrarnos el final
sin embargo hay que vivir como si fuéramos inmortales*

*Sabemos que tras cada victoria el enemigo regresa buscando triunfos
y que volveremos a ser inexorablemente derrotados vale decir que venceremos*

Mario Benedetti

DEDICATORIA

Como cada uno de mis logros, este trabajo es dedicado a las personas más importantes en mi vida y sin las cuales la realización de este sueño no habría sido posible:

A mi padre Modesto Gómez, de quien herede el coraje para lograr mi meta más importante.

A mi madre Patricia Calderas, quien ha sido la partícipe primordial en la realización de mis sueños.

Y a mi hermana Citlali, quien me ha enseñado a ver la vida de una manera distinta.

Los amo!!!

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas aquellas personas que participaron en la realización del sueño mas importante de mi vida, por brindarme su apoyo y transmitirme el coraje para lograrlo, en especial a:

Mis padres, por ser un ejemplo de lucha y tenacidad, por ser la fuente de inspiración en mi vida, por traerme al mundo, por darme la tan maravillosa vida que tengo, por todo lo que me han enseñado, por su paciencia, comprensión apoyo y amor.

Citlali, por acompañarme a lo largo de la vida, porque crecer contigo ha sido una de las mejores experiencias. Porque contigo he visto la vida de una forma más amena. Te quiero mucho.

Familia, por todo el cariño que me han brindado, por la comprensión que he recibido de ustedes comprensión y el apoyo incondicional.

Sobeida, por todo el apoyo, paciencia y cariño que me brindaste a lo largo de este tiempo. Con tu asesoría, este trabajo además del cumplimiento de un sueño es la concepción de un triunfo.

Pilar, quien a lo largo de la carrera fue mi tutora, consejera y amiga. Gracias por todo el apoyo, enseñanza, consejos y amistad.

Roy, por aparecer, acompañarme y ayudarme en los momentos más difíciles de la carrera, por estar conmigo justo cuando lo necesite, por todo tu apoyo, pero sobre todo por tu amistad incondicional.

Leo, por llegar a mi vida en el momento preciso, por todas las pláticas, los consejos, los regaños, por enseñarme tanto de la vida, pero sobre todo por tu amistad y cariño. Porque gracias a ti aprendí más de mí.

San, porque más allá de una compañera de carrera has sido una gran amiga, por los buenos momentos y los no tan buenos, por el apoyo, consejos, y amistad. Sabes que gracias a ti estudie esta carrera.

Erika, quien desde la preparatoria ha sido una persona muy importante en mi vida, de quien además de apoyo he recibido una amistad incondicional.

Arturo, por todos estos años de compartir experiencias, por el apoyo, y por tu amistad. A pesar de la distancia te siento siempre cerca de mí.

Zazú, por todas esas comidas, pláticas y terapias, por tu sincera amistad, confianza y cariño.

Víctor, Gerardo, Olga, Beto, Bob, Kari, Norma, Neto y Eric, por el apoyo que cada uno a su manera me ha brindado, por los gratos momentos y su sincera amistad.

Mis compañeros de laboratorio 114, Silvia, Aída, Jorge, Pablo, porque con ustedes la estancia en el laboratorio fue aun más amena.

Diana, por todo el apoyo y paciencia a lo largo del desarrollo experimental de este trabajo,

Todas aquellas personas que me enseñaron lo necesario para llegar hasta aquí. A mis profesores quienes me transmitieron sus conocimientos.

La Facultad de Química quien me abrió las puertas y me forjo como profesional, brindándome las herramientas necesarias para defenderme en el ámbito laboral.

Mi amada UNAM, arropándome a lo largo de estos años, los mejores de mi vida.

Este trabajo se realizó con apoyo de:

PAPIIT IN218505, DGAPA, UNAM.

PAIP 6290-12 de la Facultad de Química.

Beca para la realización de tesis de licenciatura, otorgada por PAPIIT IN218505, DGAPA, UNAM.

Dr. Javier Plasencia, Manuela, Diana y Mariana, por todo su apoyo y asesoría durante el desarrollo experimental del presente trabajo.

Dr. Felipe Cruz por su ayuda en el diseño de los primers específicos.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	12
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	15
TRANSPORTE A DISTANCIA DE SACAROSA EN LAS PLANTAS	15
TRANSPORTE APOPLÁSTICO	18
TRANSPORTADOR DE SACAROSA	19
TRANSPORTADORES DE SACAROSA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA	20
TRANSPORTADORES DE SACAROSA DEL TONOPLASTO	23
TRANSPORTADORES DE SALIDA DE SACAROSA.	23
TRANSPORTADORES DE MONOSACÁRIDOS.	24
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS POR CARBOHIDRATOS.	28
ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ.	31
GERMINACIÓN	33
TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS EN SEMILLAS.	35
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
METODOLOGÍA	39
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	39
GERMINACIÓN DE EJES Y EMBRIONES DE MAÍZ.....	40
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE UNA CLONA PARA EL TRANSPORTADOR DE HEXOSAS.	41
OBTENCIÓN DE RNA POR EL MÉTODO DEL TRIZOL	44
VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA.	45
REACCIÓN DE RT (TRANSCRIPTASA REVERSA)	45
ENSAYOS DE PCR Y EXTENSIÓN DEL PRIMER	48
PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR (QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT).....	48
REACCIÓN DE LIGACIÓN	49
TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> COMPETENTE	49
PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO (GENELUTE PLASMID MINIPREP KIT)	50
DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO (KIT DE INVITROGEN)	51
PREPARACIÓN DE STOCK DE GLICEROL.	51
RESULTADOS	52
CLONACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE HEXOSAS DE TEJIDO EMBRIONARIO DE MAÍZ.....	52
EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE TEJIDO DEL GENE PARA EL TRANSPORTADOR DE HEXOSAS.....	57
<i>Niveles de RNAm para el transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz.</i>	<i>58</i>
<i>Efecto de los carbohidratos en la expresión del transportador de hexosas.....</i>	<i>61</i>
<i>Efecto de la imbibición del tejido embrionario en carbohidratos en la expresión del transportador de sacarosa.....</i>	<i>64</i>
<i>Efecto de la presencia de ABA en los niveles de RNAm para el transportador de hexosas... 66</i>	<i>66</i>
<i>Efecto de la presencia de ABA en los niveles de RNAm para el transportador de sacarosa.. 69</i>	<i>69</i>
DISCUSIÓN	70
CLONACIÓN DE UN TRANSPORTADOR DE HEXOSAS ESPECÍFICO DE EMBRIÓN DE MAÍZ.	70
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE HEXOSAS Y SACAROSA.	71
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	77
APÉNDICE	78
REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte a distancia de sacarosa	...16
Figura 2. Modelos topológicos de los transportadores de sacarosa y hexosas	...19
Figura 3. Semilla de maíz mostrando los tejidos que la conforman	...31
Figura 4. Curva de toma de agua por la semilla	...34
Figura 5. Protocolo utilizado en la clonación de un transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz	...39
Figura 6. Diagrama de trabajo empleado para la determinación de los niveles de transcrito del transportador en diferentes tejidos y durante las fases de la germinación de ejes y embriones de maíz.	...40
Figura 7. Secuencia de nucleótidos de Zendofermo	...43
Figura 8. Establecimiento de las condiciones óptimas para amplificación de productos específicos para el transportador de hexosas y sacarosa	...47
Figura 9. Mapa circular del vector p-GEM-T Easy	...49
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra la liberación del inserto	...52
Figura 11. Árbol filogenético de proteínas transportadoras de monosacáridos	...55
Figura 12. Alineamiento de la secuencia obtenida del transportador de hexosas con otros transportadores	...56
Figura 13. Análisis por RT-PCR de la expresión ZmHT en varios tejidos.	...57
Figura 14. Expresión del transportador de sacarosa durante la germinación de ejes y embriones de maíz	...59
Figura 15. Comparación de la expresión del transportador de hexosas durante la germinación de ejes y embriones de maíz	...60
Figura 16. Patrón de expresión del transportador de hexosas en ejes y embriones embebidos en diferentes carbohidratos	...62
Figura 17. Efecto de la imbibición en carbohidratos sobre el peso en el tejido embrionario de maíz embebidos 24 h	...63
Figura 18. Comparación de la expresión del transportador de sacarosa en ejes y embriones embebidos en diferentes carbohidratos	...65
Figura 19. Efecto de la imbibición en carbohidratos sobre el peso de tejidos embrionarios de maíz embebidos 24 h	...67
Figura 20. Comparación de la expresión del transportador de hexosas en ejes y embriones embebidos en diferentes concentraciones de ABA	...68
Figura 21. Comparación de la expresión del transportador de sacarosa en ejes y embriones embebidos en diferentes concentraciones de ABA	...69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de algunos transportadores de sacarosa en plantas	...22
Tabla 2. Constantes de afinidad por hexosas de algunos transportadores de STP	...27
Tabla 3. Regulación por carbohidratos de algunos transportadores de carbohidratos	...30
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar y clonar al transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz	...41
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar el transcrito para el transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz	...46
Tabla 6. Condiciones empleadas para la reacción de PCR	...47
Tabla 7. Proteínas transportadoras de monosacáridos que producen alineamientos significativos	...53

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AG	Ácido giberélico
cDNA	DNA templado
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
g	Fuerza centrífuga
HT	Transportador de hexosas
IPTG	Isopropil-thio- β -D-galactopiranosido
kDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria
MST	Transportador de monosacáridos
NaAc	Acetato de sodio
PCI	Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
STP	Transportador de azúcares (del inglés "sugar transporter protein")
SUT	Transportador de sacarosa
TA	Temperatura ambiente
VMP	Vesículas de membrana plasmática
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosido

RESUMEN

La germinación es el conjunto de fenómenos que tienen lugar en la semilla, para la formación de una plántula a partir del embrión. Para que esto ocurra, deben darse las condiciones fisiológicas apropiadas, como oxigenación, temperatura, luz y humedad.

A partir de la germinación de una semilla, se forma un embrión o plántula. Para el desarrollo y crecimiento de esta plántula, las semillas tienen almacenados nutrientes como la sacarosa y el almidón. La sacarosa, será proporcionada por el escutelo, capa que rodea inmediatamente al eje embrionario, reserva que ayudará a que la germinación ocurra; mientras que el almidón –polisacárido formado por glucosa- presente en el endospermo, será la fuente importante de glucosa posterior a la salida de la radícula.

Debido a que en un estudio previo se encontró que la membrana del eje embrionario no presentaba transportador de sacarosa, entonces se podía predecir que el carbono debería importarse durante la germinación, o al menos durante el periodo temprano germinativo en forma de hexosas. Demostramos nuevamente que el transportador de sacarosa sólo se expresaba en el escutelo y nos preguntamos si el transportador de hexosas era necesario e importante para el crecimiento del eje, clonando al menos un transportador en tejido embrionario.

En este trabajo se clonó un transportador de hexosas que se encuentra expresado principalmente en tejido embrionario, aunque mayormente en el escutelo. Durante la germinación, los RNAm para el transportador de hexosas, que denominamos ZmHT, se incrementan teniendo su máximo a las 36 h en eje y 48 h en embrión. Por lo que ZmHT podría ser importante en la nutrición del eje para su crecimiento, así como para el importe de glucosa al escutelo.

Como se ha propuesto en la literatura, los carbohidratos modifican la expresión del transportador. El RNAm para ZmHT se reduce al incubar el eje embrionario en

glucosa y sacarosa, pero se incrementa en presencia de fructosa y sorbitol. En el embrión sin embargo, sacarosa, glucosa, fructosa y manosa incrementan el nivel de transcrito pero sorbitol lo reduce. Es probable que el sorbitol esté ejerciendo un efecto osmótico negativo en la expresión de los transportadores de carbohidratos, ya que el transportador de sacarosa también se afecta por sorbitol. Se sugiere que ZmHT podría transportar fructosa, ya que el incremento en la fructosa externa al tejido incrementa el nivel de transcrito.

De manera interesante, el transcrito para ZmHT se incrementa por ABA cuando se embeben los ejes embrionarios en ABA, aunque disminuye el transcrito en los embriones. Se sabe que algunos transportadores tienen elementos de respuesta a ABA y el que el RNAm de ZmHT cambie con ABA podría explicar porque el sorbitol a 50 mM modifica su expresión, además que sugiere que el transportador podría estar sujeto durante la germinación a los cambios en el potencial osmótico. Además, corrobora estudios en donde se sugiere que el ABA es percibido de manera distinta en los tejidos de una planta, los tejidos sintetizadores como el escutelo bloquean la movilización de lípidos cuando ABA está presente, por lo que el efecto represor en la expresión del transportador de hexosas se explica, ya que de ABA disminuye la síntesis de sacarosa y por tanto la disponibilidad de hexosas.

El presente trabajo presenta evidencia novedosa sobre la presencia de un transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz y durante su germinación, ZmHT. Además, se encontró que ZmHT es regulado de manera tejido específica y probablemente se deba a la diferente función de los tejidos examinados. El eje embrionario como tejido importador de nutrimentos y el escutelo como tejido anabólicamente muy activo y capaz de donar el carbono sintetizado al eje embrionario.

INTRODUCCIÓN.

Transporte a distancia de sacarosa en las plantas

La sacarosa ha sido probablemente seleccionada por las plantas como forma de transporte de carbono y energía, debido a su naturaleza no reductora y a su escaso metabolismo durante el paso por el floema, aunque algunas plantas transportan rafinosa o algunos otros polioles no reductores. Cerca del 80% del carbono asimilado durante la fotosíntesis es exportado para satisfacer las necesidades de las células no fotosintéticas o demanda. La sacarosa se transporta a distancia en la solución de la savia del floema, flujo que ocurre en una red especializada de células llamadas elementos amorfos de la savia. Estas células no contienen núcleo y dependen de la actividad metabólica de las células vecinas, llamadas células acompañantes. Las células de los elementos amorfos están conectadas para formar un tubo en el que ocurre una muy pobre resistencia al paso de solutos. La entrada de sacarosa al floema y la subsiguiente toma de agua que viene del xilema, mueve al carbohidrato en un gradiente osmótico que conduce al carbohidrato a las zonas de bajo contenido de azúcares, esto es, finaliza en los tejidos de demanda (Figura 1; Turgeon, 2006). El flujo de solutos desde las células del mesófilo al floema se denomina llenado o “loading” de solutos, mientras que la salida de solutos del floema hacia las células demanda, es llamada descarga o “unloading” de solutos.

Los carbohidratos son sintetizados en las células del mesófilo, especialmente en las células en palizada del parénquima, desde ahí, el azúcar debe ser translocado a varias células hasta llegar a la red venosa. En su camino el carbohidrato debe pasar por varios tipos de células, como las que rodean a las células del mesófilo, las células de la vaina y el parénquima del floema o células acompañantes (Turgeon, 2006).

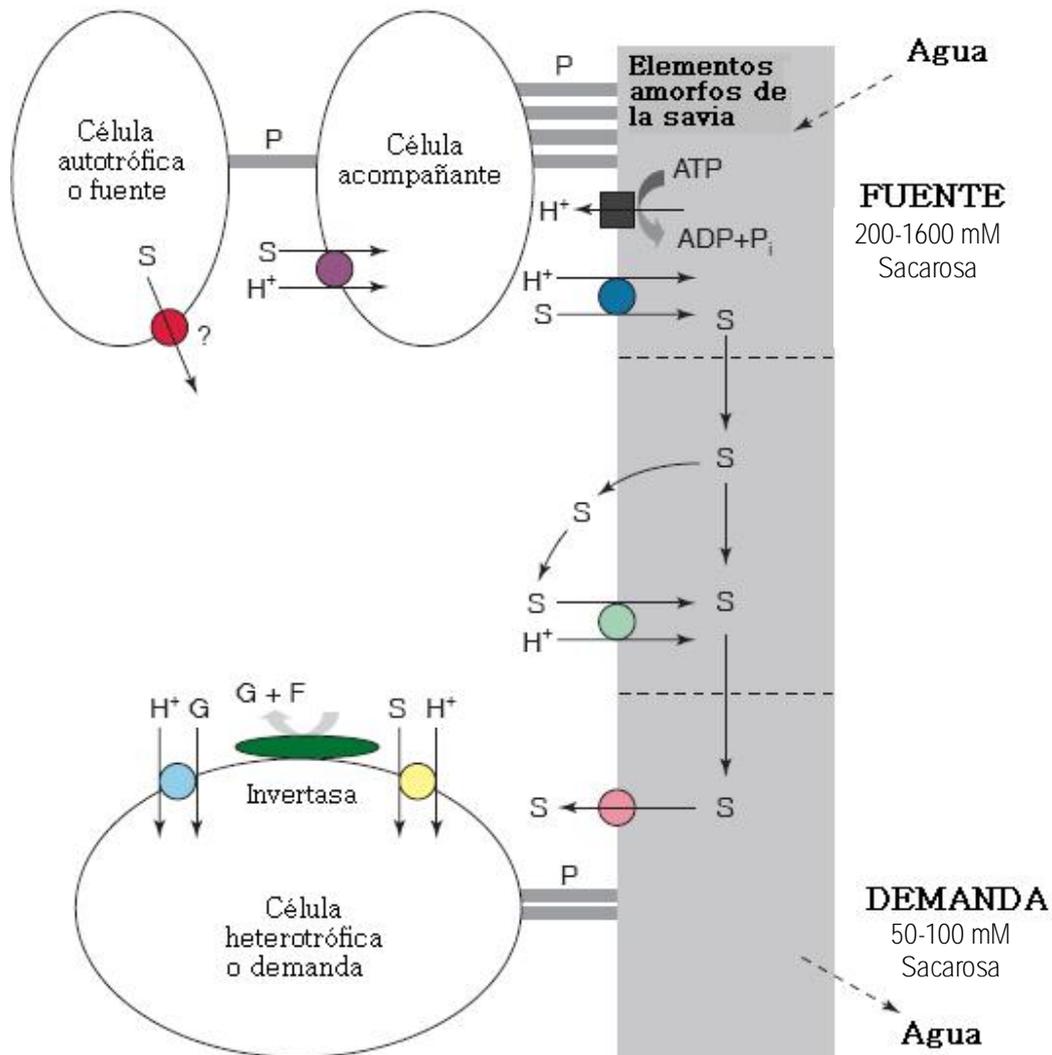


Figura 1. Transporte a distancia de sacarosa (Tomado de Williams *et al.*, 2000). La sacarosa (S) puede ser transportada a través de plasmodesmos (P) hacia las células acompañantes y a los elementos amorfos de la savia, o bien a través de transportadores de sacarosa que pueden ser uniportadores en salida o bien simportadores con protones. El recorrido a través del floema puede llevar a la pérdida por difusión de sacarosa y su reentrada es mediada por transportadores en la membrana plasmática del floema. Una vez en las cercanías de las células demanda, la sacarosa sale al apoplasto o bien es transportada a la célula demanda a través de plasmodesmos. El carbono de la sacarosa es introducido desde la vecindad de la célula demanda, ya sea por transportadores de sacarosa o bien por transportadores de hexosas, ya que la sacarosa puede ser hidrolizada en glucosa y fructosa (G y F) por la invertasa localizada en la pared celular de la célula demanda.

Las vías de transporte a distancia que pueden estar involucradas en el movimiento de sacarosa entre los tejidos fuente y demanda son: la apoplástica y la simplástica (Turgeon, 2006; Williams *et al.*, 2000). En la simplástica se encuentran implicados conductos proteicos membranales que comunican a los citoplasmas de diferentes células, lo que hace que los solutos lleguen a la célula blanco sin pasar por el apoplasto, estos conductos se denominan plasmodesmos. La otra vía de transporte es a través de proteínas transportadoras localizadas en las membranas plasmáticas, en el caso particular del movimiento de carbohidratos podemos encontrar a los transportadores de disacáridos y a los de hexosas (Figura 1).

Algunas plantas tienen numerosas conexiones de plasmodesmos entre las células del mesófilo y los elementos amorfos/células acompañantes (“SE-CC” del inglés Savia Element-Companion Cell). En estas especies generalmente el transporte es de rafinosa más que de sacarosa (Turgeon y Beebe, 1991). En la mayoría de las especies, al menos en las especies agrícolas, los SE/CC están simplásticamente aisladas de las células de alrededor. En estas plantas, el paso propuesto de transporte de azúcares es el apoplástico.

Durante la vida de la planta también ocurren transiciones entre etapas las que algunos tejidos presentan numerosas conexiones de plasmodesmos y otros en donde disminuyen. Ciertos tejidos demanda, tales como son las hojas jóvenes o puntas de las raíces, tienen un acceso directo al floema vía numerosos plasmodesmos. Otras células como las de los granos de polen, el tubo polínico, las del tapete de la antera, del embrión en desarrollo y las células guarda están simplásticamente aisladas y pueden importar fotoasimilados sólo con la ayuda de proteínas de transporte en su membrana plasmática (Büttner y Sauer, 2000).

Después del llenado del floema, cuando el azúcar alcanza las cercanías de un tejido demandante, la sacarosa puede ser directamente liberada al apoplasto o bien la sacarosa se mueve a través del floema y la célula en crecimiento a través de los plasmodesmos (Tanner y Caspari, 1996). En el caso del vaciado

apoplástico del floema, la sacarosa es transportada al tejido demandante mediante transportadores de sacarosa, aunque también la sacarosa al ser utilizada por la invertasa ácida apoplástica, produce hexosas que son subsecuentemente transportadas hacia el citosol para su posterior metabolismo (Figura 1).

Transporte apoplástico

Los transportadores son proteínas que cruzan la membrana con estructuras secundarias de α -hélice o de β -plegada (sólo las porinas) y transportan nutrientes, metabolitos, iones o proteínas a través de la membrana; también se les conoce como permeasas, acarreadores o translocadores (Lehninger *et al.*, 1995).

Se conoce que el transporte de carbohidratos se lleva a cabo por un grupo de proteínas que pertenece a la superfamilia de facilitadores mayores (Pao, *et al.*, 1998), proteínas que presentan en general una disposición de 12 cruces transmembranales, con los dominios carboxilo y amino localizados en el interior celular (Figura 2). Se presume que esta clase de proteínas surgió por la duplicación de un gene ancestral, ya que los primeros 6 cruces transmembranales presentan secuencias conservadas y similares a los segundos o siguientes 6 cruces transmembranales de la proteína, además el asa que conecta a ambas secciones del transportador es diferente en extensión y tipo de aminoácidos entre las diferentes especies (Lalonde *et al.*, 2004; Pao *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000).

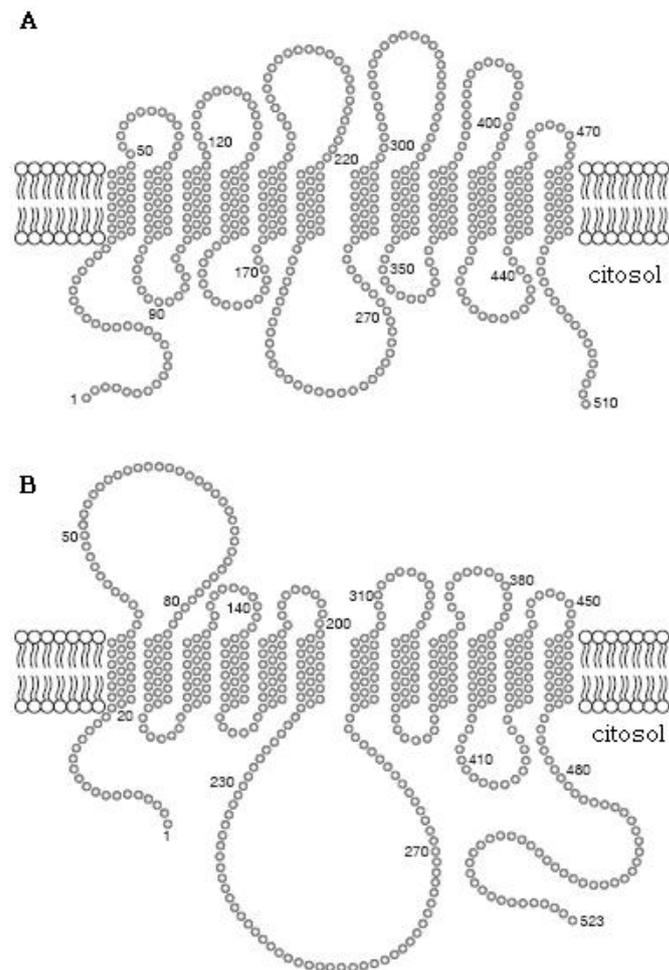


Figura 2. Modelos topológicos de los transportadores de sacarosa y hexosas (Tomado de Williams *et al.*, 2000). A) Transportador de sacarosa de *Plantago major*, PmSUT2 y B) Transportador de monosacáridos de *Nicotiana tabacum*, NtMST1.

Transportador de sacarosa

Después de la síntesis citosólica de la sacarosa en las células del mesófilo, el carbohidrato debe ser transportado hacia la vacuola, almacén temporal de la sacarosa antes de su exportación. Los eventos de salida de la sacarosa de la célula del mesófilo hasta la célula demandante usando la vía apoplástica prevén la existencia de diferentes tipos de transportadores (Figura 1): 1) los transportadores que importan sacarosa hacia la célula, simportadores sacarosa/H⁺; 2) los transportadores del tonoplasto propuestos como simportadores o antiportadores y 3) los transportadores en salida que son responsables de la descarga de la

sacarosa hacia el apoplasto de la célula del mesófilo o bien del conducto del floema hacia el apoplasto de la célula demanda (Williams *et al.*, 2000).

Transportadores de sacarosa en la membrana plasmática

El primer transportador de azúcares en plantas fue clonado en 1992, SoSUT1 (por su siglas en inglés "*Spinacia oleracea* Sugar transporter 1"). Riesmeier y colaboradores complementaron una mutante de levadura con una biblioteca de cDNA de plantas. El peso molecular estimado para SoSUT1 es de 55 kDa y el análisis de su secuencia sugería que contenía 12 dominios transmembranales. Después, se obtuvo la secuencia del gene de papa utilizando el mismo procedimiento que en espinaca. Debido al alto nivel de expresión en las hojas y su alto grado de homología a nivel de DNA, la búsqueda heteróloga de los genes ha sido exitosa y a través de ella se han clonado otros genes en especies como tabaco, tomate, *Arabidopsis* y plantago (Gahrtz *et al.*, 1994; Sauer y Stolz, 1994; Weig y Komor, 1996; Burkle *et al.*, 1998).

El análisis detallado de las secuencias encontradas para el transportador de sacarosa ha permitido encontrar un motivo conservado que podría ser utilizado como la firma que caracteriza a todos estos miembros. El patrón inicialmente encontrado fue R-XG-R-(KR), localizado en el asa que conecta a los cruces transmembrana 2 y 3. El segundo motivo es (MSTA)-S-x(2)-(LIVM)-(EYQD)x-(LIMF)-(GCAV)-(RK)-x(3)-(GA), localizado entre el segmento transmembrana 8 y 9, aunque este motivo no está conservado en todos los transportadores de sacarosa analizados al 2004 (Lalonde *et al.*, 2004).

Aún no se tiene la estructura tridimensional para algún transportador de sacarosa y su obtención ayudará a resolver las características cinéticas y funcionales de la proteína. Las características cinéticas de algunos de los transportadores han sido obtenidas por la sobreexpresión del transportador en sistemas heterólogos como levadura y ovocitos de *Xenopus*, aunque también se tienen algunos estudios en vesículas de membrana plasmática. Los valores de Km para los transportadores

se estiman en el intervalo de 0.3 a 11 mM, e inhibidores del gradiente de protones reducen notablemente la actividad, por lo que se ha postulado que son proteínas que transportan a la sacarosa en simporte con protones (Bush, 1993; Lim *et al.*, 2006). Utilizando los modelos bidimensionales y las características cinéticas de las isoformas para los transportadores, recientemente se planteó que existen 4 subfamilias. El Grupo 1 y 2 corresponde a transportadores de la membrana plasmática, el primero localizado en las monocotiledóneas y el segundo en las dicotiledóneas. El grupo 3 presenta a las proteínas con una asa citoplásmica alargada aproximadamente 60 aminoácidos y de localización en la membrana plasmática, estos transportadores inicialmente fueron propuestos como sensores de carbohidratos, aunque no se ha logrado corroborar ese papel hasta el momento. El grupo 4 representa a las proteínas que se encuentran en el tonoplasto de los tejidos demandantes (Sauer, 2007).

Los simportadores sacarosa/H⁺ se han encontrado localizados en las hojas y en el floema, particularmente en las células acompañantes (Stadler and Sauer, 1996), y en tejidos demanda (Gahrtz *et al.*, 1996). Experimentos de hibridación *in situ* del RNAm para los transportadores de sacarosa AtSUC1, AtSUT2, PmSUC1 y StSUT1 demuestran su presencia en los SE-CC, sugeriendo que promueven la entrada de sacarosa al floema (Tabla 1). En *Plantago* y *Arabidopsis*, los transportadores PmSUC1 y AtSUC2, fueron detectados por inmunofluorescencia y co-localizaban con marcadores específicos para células acompañantes (Stadler *et al.*, 1995; Stadler y Sauer, 1996). Mientras que usando la inmunolocalización por inmunofluorescencia y anticuerpos unidos a oro coloidal detectaron a NtSUT1, StSUT1 y LeSUT2 en la membrana plasmática de los elementos amorfos del floema de tabaco, papa y tomate, respectivamente (Kühn *et al.*, 1997).

Tabla 1. Características de algunos transportadores de sacarosa en plantas.

Nombre del gene	Referencia	Organismo	Longitud (aa)	Expresión funcional	Sitio de expresión
AgSUT1	Noiraud <i>et al.</i> , 2000	<i>Apium graveolens</i>	512	Sí	Hoja
AgSUT2a	Noiraud <i>et al.</i> , 2000	<i>Apium graveolens</i>	512	Sí	Hoja
AtSUC1	Sauer y Stolz, 1994	<i>Arabidopsis thaliana</i>	513	Sí	Floema
AtSUC2	Sauer y Stolz, 1994	<i>Arabidopsis thaliana</i>	512	Sí	Floema
DcSUT1	Shakya y Sturm, 1998	<i>Dacus carota</i>	501	Sí	Hoja
DcSUT2	Shakya y Sturm, 1998	<i>Dacus carota</i>	515	Sí	Raíz
LeSUT1	Barker <i>et al.</i> , 2000	<i>Lycopersicon sculentum</i>	511	No	Hoja
LeSUT2	Barker <i>et al.</i> , 2000	<i>Lycopersicon sculentum</i>	604	Sí	Elementos de la savia
NtSUT1	Burkle <i>et al.</i> , 1998	<i>Nicotiana tabacum</i>	507	No	Hoja
OsSUT1	Hirose <i>et al.</i> , 1997	<i>Oryza sativa</i>	538	Sí	Hoja
PmSUC1	Gahrtz <i>et al.</i> , 1996	<i>Plantago major</i>	503	Sí	Floema
PmSUC2	Gahrtz <i>et al.</i> , 1996	<i>Plantago major</i>	510	Sí	Floema
RcSCR1	Weig <i>et al.</i> , 1996	<i>Ricinus communis</i>	533	Sí	Cotiledón
SoSUT1	Riesmeier <i>et al.</i> , 1992	<i>Spinacea oleracea</i>	525	Sí	Hoja
StSUT1	Riesmeier <i>et al.</i> , 1993	<i>Solanum tuberosum</i>	516	Sí	Floema
TaSUT1	Aoki <i>et al.</i> , 2002	<i>Triticum aestivum</i>	523	Sí	Grano
VfSUT1	Weber <i>et al.</i> , 1997	<i>Vicia faba</i>	523	Sí	Cotiledón
ZmSUT1	Aoki <i>et al.</i> , 1999	<i>Zea mays</i>	521	Sí	Hoja

Se han encontrado transportadores preferentemente en las zonas de importación, para el influjo de la sacarosa en las semillas en desarrollo, tejido demanda (Weber *et al.*, 1997). Un transportador de arroz, OsSUT1, se expresa en órganos fuente como son la hoja bandera y las semillas en germinación, mientras que no hay expresión en tejidos demandantes como las raíces, en el endospermo y el embrión (Lim *et al.*, 2006). Sin embargo, en *Vicia faba* sí se han encontrado en el embrión (Weber *et al.*, 1997; Harrington *et al.*, 1997). El RNAm para el transportador,

DcSUT2, de zanahoria, se encontró principalmente en la coleorriza. En el embrión en desarrollo de chícharo se localizó el RNAm para PsSUT1 en las células del parénquima de la cubierta seminal y en las células de transferencia epidermales del cotiledón (Tegeeder *et al.*, 1999).

La expresión en anti-sentido del gene para el transportador de sacarosa en tabaco (Bürkle *et al.*, 1998) y papa (Riesmeier *et al.*, 1994) aportó valiosa información sobre la importancia del simportador en el llenado del floema: las plantas mutantes mostraron una reducida actividad de transporte, acumularon azúcar en las hojas y el crecimiento de la raíz fue pobre.

Transportadores de sacarosa del tonoplasto

Originalmente estos transportadores fueron caracterizados como de localización en la membrana plasmática, StSUT4 y AtSUC4 (Weise *et al.*, 2000) y HvSUT2 (Weschke *et al.*, 2000), analizados en el sistema de expresión de levadura. Cada uno de estos transportadores se localizaron en la membrana plasmática de la levadura e importaban la sacarosa al interior celular. Sin embargo, recientemente se demostró por el análisis de las proteínas del tonoplasto, que AtSUC4 y HvSUT2 se localizan en ese compartimiento celular (Endler *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia de aminoácidos y de la topología de la proteína, ubica a AtSUC4 y HvSUT2 en un grupo diferente al de los transportadores de sacarosa de la membrana plasmática (Sauer, 2007).

Transportadores de salida de sacarosa.

Varias actividades de eflujo de sacarosa han sido reportadas (Laloi *et al.*, 1993). Sin embargo, hasta el momento sólo se han encontrado una enorme diversidad (isoformas) de transportadores de sacarosa en plantas, todos ellos clasificados como simportadores, por lo que se ha sugerido que el simportador podría funcionar *in vivo* como un transportador difusional en salida. En vesículas de membrana plasmática (VMP) de tabaco se determinó la actividad de transporte de

sacarosa, se encontró que sólo cuando las VMP se hacían en presencia de sorbitol, la sacarosa presentaba una cinética de transporte en entrada y dependiente del ΔpH y $\Delta\Psi$. Pero cuando las VMP se preparaban en una solución que contenía sacarosa, inicialmente entraba la sacarosa pero después ocurría la salida de sacarosa de una manera independiente del gradiente eléctrico y del pH (Borstlap y Schuurmans, 2004). Con esta aproximación es difícil postular que la salida de sacarosa sea a través del simportador y no de otra proteína.

Con un enfoque experimental diferente se encontró que un simportador puede ser un exportador difusional. ZmSUT1 se expresó en ovocitos de *Xenopus*, se midió la actividad de transporte de sacarosa y se determinó que era un simportador sacarosa/ H^+ . Sin embargo, la inyección previa de 50 mM de sacarosa al ovocito causó una salida rápida de la sacarosa. *In vivo*, en las células del floema cercanas a las células fuente, la diferencia de potencial eléctrico es de aproximadamente -150 mV, gradiente que podría impulsar la entrada de sacarosa a la célula en simporte con protones, aún cuando el interior contenga 500 mM de sacarosa (Carpaneto *et al.*, 2005). Por su parte, las células demanda presentan cuando mucho -60 mV de potencial eléctrico, con una concentración interna en el floema mayor a 50 mM sacarosa y una concentración apoplástica de 0.8 mM sacarosa, bajo estas condiciones es factible que *in vivo* el transportador funcione exportando sacarosa hacia el apoplasto de la célula demanda (Carpaneto *et al.*, 2005).

Transportadores de monosacáridos.

A pesar de que la sacarosa es el carbohidrato que se transporta en el floema, los transportadores de hexosas juegan un papel significativo en el intercambio intercelular tanto en tejidos fuente como demandantes. La glucosa y la fructosa son sintetizadas como uno de los productos primarios de la fotosíntesis en el cloroplasto y su movilización tanto intra como extracelular es necesaria. Mientras que en los tejidos heterotróficos que generalmente se encuentran simplásticamente aislados, la sacarosa es frecuentemente hidrolizada en el

apoplasto y los monosacáridos resultantes son almacenados o consumidos en la respiración de las células del parénquima (Kühn *et al.*, 1999).

Plantas mutantes de zanahoria presentan actividad reducida en invertasas de pared celular, disminuyeron el crecimiento de la raíz afectando el metabolismo de carbono tanto en hojas como en las raíces (Tang *et al.*, 1999). Una mutación específica de una invertasa de pared de grano de maíz localizada en el endospermo, disminuye la formación de almidón en el desarrollo (Cheng y Chourey, 1999). Ambos resultados resaltan la importancia de la hidrólisis de la sacarosa y el subsiguiente transporte de hexosas en el desarrollo de las plantas.

El transportador CkHUP1 de hexosas de *Chlorella* fue el primer transportador clonado en un organismo eucarionte (Sauer y Tanner, 1989). La secuencia de CkHUP1 fue una herramienta útil en la búsqueda de transportadores de hexosas en bibliotecas genómicas o de cDNA de otros organismos. La primera secuencia de plantas superiores fue la de AtSTP1 denominada así por sus siglas en inglés “*Arabidopsis thaliana* Sugar Transporter Protein” (Sauer *et al.*, 1990). Mediante el uso de las técnicas de PCR y la hibridación heteróloga se identificaron en *Arabidopsis thaliana* 14 genes AtSTP (Büttner *et al.*, 2000). Sorprendentemente a pesar de que la sacarosa es la molécula que se transporta a distancia en las plantas, éstas presentan más transportadores de hexosas que de sacarosa. Recientemente, el análisis detallado de la base de datos del genoma de *Arabidopsis*, reveló la existencia de una familia de transportadores de monosacáridos con 53 miembros, entre los cuales se incluyen a candidatos que podrían ser transportadores localizados en organelos o transportadores de polioles (Büttner, 2007). El análisis de las secuencias de los 53 genes, así como las características del transporte de algunos de ellos, ayudó a proponer un árbol filogenético en el que se encuentran 7 subfamilias de genes que codifican para transportadores (Büttner, 2007): 1) STP, genes que codifican para las proteínas que transportan azúcares 2) AtVGT, genes que codifican para transportadores de glucosa vacuolares, 3) AtTMT, genes para transportadores de monosacáridos en

el tonoplasto, 4) AtpGlcT, genes que codifican para transportadores de glucosa en los plastidios; 5) AtPLT, genes que codifican para transportadores de polioles, 6) AtINT genes que codifican para transportadores de inositol y 7) genes tipo ERD (early-responsive to dehydration) y que en levadura son proteínas sensoras de carbohidratos. Los transportadores STP han sido los más estudiados, por lo que a continuación se detalla la información sobre los transportadores STP.

Las propiedades cinéticas de los transportadores de hexosas se han obtenido utilizando sistemas heterólogos o por reconstitución en liposomas (Tabla 2), permitiendo el análisis del transportador sin la contribución de los otros transportadores de hexosas que *in vivo* coexisten en la planta. Se han caracterizado alrededor de 13 diferentes transportadores de hexosas, a través del uso de los sistemas heterólogos de expresión en levadura o en ovocitos de *Xenopus*. Todos ellos se han caracterizado como simportadores con protones. La especificidad de los transportadores de hexosas por los carbohidratos es amplia, si bien la mayoría prefiere usar glucosa, también transportan galactosa, manosa o pentosas, además de polioles como el sorbitol, manitol, mio-inositol entre otros. Las constantes de afinidad por los diferentes monosacáridos se encuentran en el rango μM (Tabla 2). De manera interesante, la mayoría de los transportadores no son capaces de transportar fructosa, por lo que es probable que exista una familia distinta de transportadores para el transporte específico de fructosa y que aún no ha sido identificada (Büttner y Sauer, 2000).

Tabla 2. Constantes de afinidad por hexosas de algunos transportadores de STP. Tomado de Büttner y Sauer, 2000.

Gene	Caracterizado funcionalmente en	Km para diferentes sustratos* (µM)	Sitio de expresión del gene
CKHUP1	<i>S. pombe</i> , <i>Xenopus</i>	Glu: 15-46 Fru: 392 Man: 136 Xil: 725 Gal: 3000 Glu>Fru>Man>Xil>Gal	Alga
CKHUP2	<i>S. pombe</i>	Gal: 25 Gal>Glu=Xil>> Man	Alga
CKHUP3	<i>S. pombe</i>	Gal:900 Glu>Fru>Man>Xil>Gal	Alga
AtSTP1	<i>S. pombe</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Xenopus</i> , <i>liposomas</i>	Glu: 20 Glu>> Gal>>Fru	Semilla en germinación y raíces de plántulas. Células guarda
AtSTP2	<i>S. pombe</i>	Gal: 50 Gal>Xil>Glu=Man	Polen
AtSTP3	<i>S. pombe</i>	Glu: 2000 Glu>Xil>Man>Gal	Hojas fuente Aumenta en estrés.
AtSTP4	<i>S. pombe</i>	Glu:15 Gal>Glu>Xil=Man	Punta de las raíces, tubo polínico y hojas.
MtST1	<i>S. cerevisiae</i>	Glu>Fru	Raíces, hojas, tallos y aumenta cuando se asocia a micorrizas.
NtMST1	<i>S. cerevisiae</i>	Glu>>Gal=Xil	Raíces
RcHEX3	<i>S. cerevisiae</i>	Glu: 80	Raíces, hojas demanda.
VfSTP1	<i>S. pombe</i>	Glu: 30 Glu>Man>Gal>Fru	Embrión

*Glu, glucosa; Fru, fructosa; Gal, galactosa; Man, manosa; Xil, Xilulosa.

Construcciones quiméricas demostraron que la especificidad por su sustrato en CkHUP1 (transportador de glucosa) y CkHUP2 (transportador de galactosa) se encuentra en la porción N-terminal de la proteína y que podría esencialmente depender de un residuo de asparagina que se encuentra en la primera asa externa (Will y Tanner, 1996; Will *et al.*, 1994). Por otra parte, un motivo de 4 aminoácidos (HWFV) se encuentra altamente conservado en la porción C-terminal y se demostró que es esencial para la actividad de transporte de CkHUP1 (Grass *et al.*, 2000). No hay estudios de residuos de aminoácidos relevantes para el transporte en transportadores de hexosas de plantas superiores.

Se ha realizado el análisis de la expresión de algunos transportadores de hexosas mediante técnicas de Northern blot, hibridización *in situ* e inmunohistoquímica,

encontrándose que la mayor parte de los transportadores de hexosas presentan una mayor expresión en órganos demanda que en los órganos fuente (Tabla 2). Raíces, flores y hojas jóvenes para NtMST1, polen para StSTP2 y Pmt1. AtSTP1 es muy abundante en la germinación de semillas y las raíces de plántulas, en donde representa un actividad de transporte del 60%, actividad determinada con estudios en una línea mutante para *Atstp1* (Sherson *et al.*, 2000). Aunque también se ha encontrado que AtSTP1 se encuentra en las células guarda de los cotiledones, las hojas en roseta, los sépalos, ovarios y tallos. En las células guarda, la expresión de AtSTP1 es regulada positivamente por la oscuridad (Stadler *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se han encontrado algunos transportadores de hexosas que aumentan su expresión cuando el metabolismo celular se incrementa por estímulos ambientales, como la presencia de un patógeno o heridas. El análisis de la expresión del RNAm para AtSTP4 en células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* tratadas con un evocador, mostró que se produjo un incremento de 50 veces en el RNAm (Truernit *et al.*, 1996). De 2 a 4 veces fue el incremento en la expresión del gene para el transportador MtST1 en las raíces de *Medicago trunculata* cuando fueron colonizadas por el hongo *Glomus versiforme* o *Glomus intraradices* (Harrison, 1996).

Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos por carbohidratos.

Además del papel central de las hexosas y la sacarosa como fuente de carbono y energía, se sabe que la glucosa y la sacarosa son capaces de cambiar la expresión de genes involucrados en procesos como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno, la glucosa, sacarosa y almidón, además de la regulación del ciclo celular (Koch, 1996). Hasta el momento no se conoce el mecanismo exacto y las implicaciones fisiológicas están lejos de ser entendidas. Varios componentes del sistema de percepción de azúcares, han sido identificados en levaduras. En plantas, tres son los mecanismos probables, uno que involucra a la hexocinasa,

otro que involucra a los transportadores de carbohidratos y un tercero que involucra a las cinasas como la SNF1 (por las siglas en inglés “Sucrose Non-Fermenting 1”). Existen en levadura y en humanos y se postula que los transportadores de carbohidratos en plantas tengan un papel de sensor (Rolland *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae*, se encontró que las proteínas denominadas SNF3 y RGT2 son sensores de azúcares (Özcan, 1998). SNF3 percibe las concentraciones bajas de glucosa, mientras RGT2 es responsable de la percepción de concentraciones altas de glucosa. Ambas proteínas modulan la función de RGT1, una proteína que actúa como activador o represor de la transcripción de los genes para los transportadores de hexosas de alta o baja afinidad, que depende de las concentraciones extracelulares de glucosa. SNF3 y RGT2 se localizan en la membrana plasmática de la levadura, son homólogas a los transportadores de hexosas, con un C-terminal inusualmente largo. La transferencia de la región carboxilo terminal de la SNF3 de *S. cerevisiae* al transportador de hexosas, HXT1 y HXT2 convierte a estas proteínas en sensores y son capaces de restaurar el fenotipo silvestre de una levadura mutante en SNF3. Modificaciones similares podrían hacer que una proteína transportadora de hexosas en plantas pudiera percibir glucosa, sin embargo, a la fecha no se ha encontrado a una proteína sensora similar a la de levadura.

Debido a que uno de los efectos de una concentración cambiante de glucosa en el medio externo de la levadura es cambiar la expresión de un transportador de hexosas (Tabla 3), se han realizado experimentos de perfusión o imbibición en carbohidratos de tejidos de plantas, para analizar si la expresión del RNAm o la proteína para el transportador de hexosas o sacarosa se ha alterado. Algunos de los resultados se resumen en la Tabla 3. Como se observa, la mayoría de los transportadores analizados son los de sacarosa. Los resultados son difíciles de interpretar, por ejemplo, en remolacha la glucosa no cambia la expresión del transportador BvSUT1, pero sacarosa sí, disminuye entre 2 a 4 veces la

transcripción de BvSUT1 en las hojas (Chiou y Bush, 1998; Vaughn *et al.*, 2002); en haba, el RNAm para VfSUT1 disminuye tanto con la imbibición con glucosa como sacarosa (Weber *et al.*, 1997). Lamentablemente, los experimentos han sido realizados en condiciones experimentales distintas, por ejemplo en el caso de remolacha y haba, en el primero se usaron hojas maduras, perfundidas o inyectadas con el carbohidrato de 2 a 8 h previamente a la extracción del RNAm o la proteína; mientras que en haba se utilizaron embriones en desarrollo suspendidos en una solución de carbohidrato por 2-4 h, el análisis de la expresión del RNAm para el transportador se realizó por hibridación *in situ*. Otra fuente de error es la existencia de múltiples formas para el transportador en una membrana, lo que podría ocasionar que la isoforma analizada no cambie pero otra sí. Únicamente en maíz se puede eliminar esa posibilidad, ya que a la fecha se ha encontrado sólo un transportador de sacarosa en maíz (Aoki *et al.*, 1999).

Tabla 3. Regulación por carbohidratos de algunos transportadores de carbohidratos.

Transportador	Especie	Tejido y/o estadio de desarrollo	Efactor probado		Referencia
			Glucosa	Sacarosa	
HXT1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Induce su transcripción (60mM)	No probado	Tomas-Cobos <i>et al.</i> , 2004
VvHT1	<i>Vitis vinifera</i>		Induce su transcripción (56mM)	Induce su transcripción (58mM)	Atanassova <i>et al.</i> , 2003
BvSUT1	<i>Beta vulgaris</i>	Hojas maduras (imbibición o inyección de peciolos)	Sin efecto	Reprime su transcripción y traducción (25-250mM)	Chiou y Bush, 1998 Vaughn <i>et al.</i> , 2002
VfSUT1	<i>Vicia faba</i>	Embrión en desarrollo (imbibición)	Reprime su transcripción (150mM)	Reprime su transcripción (150mM)	Weber <i>et al.</i> , 1997
OsSUT1	<i>Oryza sativa</i>	Embrión germinado en carbohidratos	Induce su transcripción (100mM)	Induce su transcripción (100mM)	Matsukura <i>et al.</i> , 2000
ZmSUT1	<i>Zea mays</i>	Embrión germinado en carbohidratos	Induce su transcripción y traducción (100mM)	Sin efecto	Greaves-Fernández, 2001; Ramírez-Verdejo, 2007

Estructura y composición de la semilla de maíz.

El maíz, *Zea mays* L., es una especie monocotiledónea anual, perteneciente a la familia de las poáceas. La semilla de maíz está constituida de tres partes fundamentalmente, el pericarpio que es el tejido más externo que rodea a la semilla, el endospermo y el embrión (Figura 3A). El pericarpio protege a la semilla de los cambios ambientales o del ataque de los microorganismos, el endospermo, contiene una reserva de nutrimentos alta. El embrión en la semilla, es una planta en miniatura en estado de vida latente o letargo (Leszecz y Vincent, 2002).

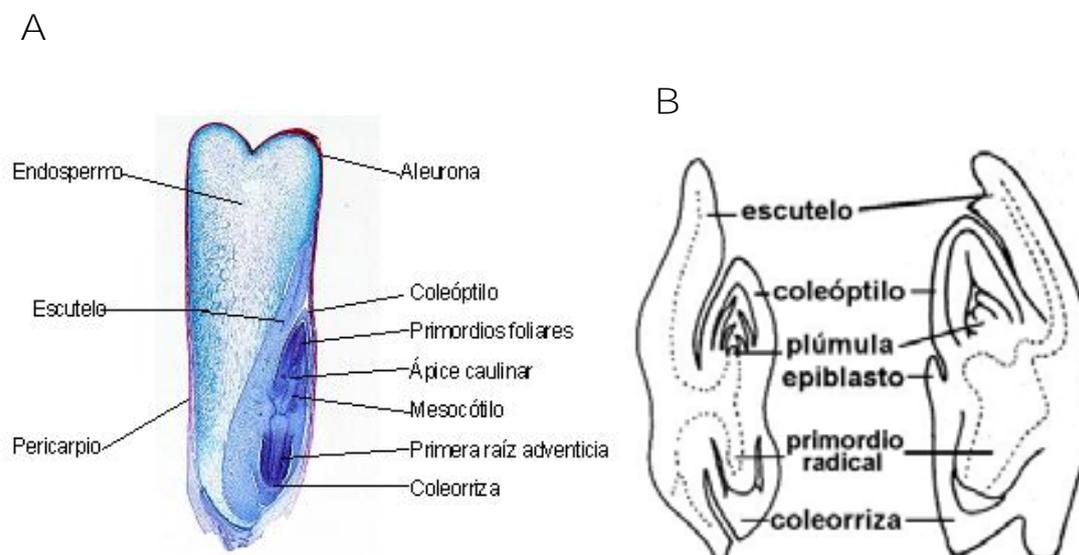


Figura 3. Semilla de maíz mostrando los tejidos que la conforman, tomado de página de internet A y B, 2007. A) Corte longitudinal de la semilla madura y seca de maíz. B) Vista detallada del embrión de maíz que está constituido por el escutelo y el eje embrionario, este último alberga los tejidos que conformarán a la nueva plántula y en el cual se puede observar las zonas de formación del sistema vascular.

En las monocotiledóneas como el maíz, el embrión presenta un solo cotiledón, su posición es lateral, igual que la de la plúmula y se denomina escutelo (Figura 3B). Este cotiledón transformado en órgano absorbente, se encuentra adosado al endospermo. La epidermis abaxial es un epitelio secretor, segrega enzimas que solubilizan las sustancias de reserva, las absorbe y las transporta al eje embrional. El eje embrional está formado por la plúmula, el coleóptilo y la coleoriza. La plúmula presenta varios primordios foliares, que pueden ser de 3 a 5. El coleóptilo

es una vaina que encierra a la plúmula. Presenta, en el momento de la germinación, un orificio apical por donde saldrá la plúmula o primera hoja. Mientras que la coleoriza es la vaina que envuelve a la radícula y la caliptra (Leszecz y Vincent, 2002).

El almidón es el principal representante de los carbohidratos de reserva de la mayoría de las semillas; tanto en las endospermadas como en los cotiledones de las exoendospermadas. El maíz es una semilla endospermada con un contenido alto en almidón, 80% del peso de la semilla. El endospermo se encuentra rodeado por una sola capa de células denominada capa de aleurona (Figura 3A), células muy activas que secretan enzimas hidrolíticas como esterasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas y ribonucleasas (Devlin, 1999). Debido a la actividad de estas enzimas se producen moléculas sencillas que son movilizadas para su utilización en el periodo final de la germinación y hasta que la plántula se establece como organismo autotrófico. El almidón no es el único polisacárido de reserva. En menor proporción (1-3%) se encuentran azúcares libres como glucosa o sacarosa. La pared celular, especialmente la de las células del pericarpio y del embrión pueden considerarse como un compartimiento extra de almacenaje de carbohidratos que ayudarán en la etapa post-germinativa al establecimiento de la plántula (Bewley y Black, 1994).

En cuanto a las reservas de nutrimentos que se encuentran en el propio embrión se encuentran los lípidos, localizados preferencialmente en el escutelo (27% en base seca), aunque también contiene carbohidratos, del total de éstos, el 93% es sacarosa, mientras que glucosa y fructosa oscilan entre el 4.0% y 2.1% respectivamente (Dure, 1960). Los lípidos durante la germinación y en el periodo post-germinativo temprano son metabolizados en sacarosa, los que en parte sustentarán el metabolismo escutelar, aunque la función primordial será abastecer de carbono al eje embrionario (Stryer y Cantliffe, 1984; Attucci *et al.*, 1991; Martínez-Marcelo, 2007).

Germinación

La germinación de las semillas puede definirse como la serie de cambios morfológicos y bioquímicos que causan la transformación de un embrión en plántula (Sánchez de Jiménez, 2005). De acuerdo a la definición botánica, la germinación inicia con la entrada de agua y culmina con la salida de la radícula (Bewley y Black, 1994), definición que se utilizó en este trabajo.

Para que ocurra la germinación deben reunirse las condiciones ambientales y fisiológicas óptimas, entre las primeras se encuentran la oxigenación, la temperatura, la luz y la humedad. Dentro de las condiciones fisiológicas se encuentran la madurez del embrión, las concentraciones de hormonas, principalmente ácido abscísico (ABA) y la dureza de la testa.

Cuando las semillas viables secas se embeben en agua, se suceden una cadena de eventos bioquímicos que finalizan con la salida de la radícula. Bajo condiciones óptimas, la toma de agua por las semillas se lleva a cabo en tres fases (Figura 4):

Fase I. El potencial del agua de una semilla madura seca es mucho menor que el de su alrededor húmedo y puede exceder -100 MPa, a causa de este alto potencial del componente matricial, la toma de agua ocurre rápidamente e independientemente de si la semilla es dormante¹ o no-dormante, viable o no viable. La absorción de agua ocurre a nivel del hilio o el micrópilo. El hinchamiento de la semilla producido por la absorción de agua distiende los tegumentos seminales que finalmente se rompen en la zona más débil, cerca del micrópilo. Al final se alcanza un contenido de agua de alrededor del 60% y éste facilita el reacomodo de las estructuras celulares y por lo tanto el reinicio de la actividad metabólica.

¹ Dormancia. Inhabilidad del embrión a germinar a causa de alguna insuficiencia inherente (Bewley y Black, 1994).

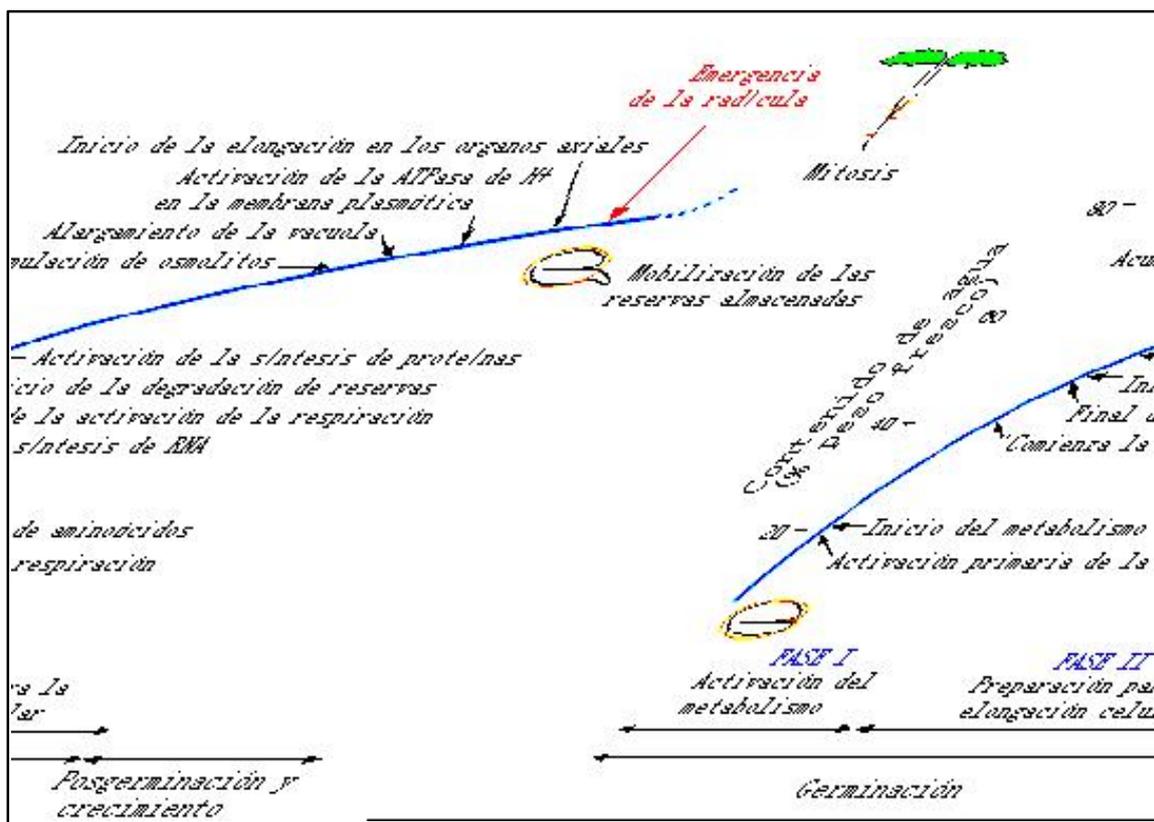


Figura 4. Curva de toma de agua por la semilla. Se ilustran las fases características del proceso de la germinación (traducido de Bove et al., 2001).

Fase II. Esta es la fase *lag* o estacionaria de la toma de agua y ocurre cuando el componente matricial ya no juega un papel significativo. En esta fase, el valor de potencial hídrico para muchas semillas probablemente no excede -1 a -1.5 MPa. La respiración, la actividad enzimática y la biogénesis y reparación de organelos, y la síntesis de RNA y proteínas son actividades celulares fundamentales para que la germinación progrese. La fase II es una fase preparativa para el crecimiento posterior y finaliza con la salida de la radícula.

Fase III. Aunque semillas dormantes pueden llevar a cabo la fase II, solamente las semillas germinadas entran en esta tercera fase, que inicia con la salida de la radícula. El incremento de la toma de agua está inicialmente relacionada a los cambios que las células de la radícula experimentan, como su extensión, así como también en el crecimiento de las partes aéreas de la plántula. El endospermo y los

cotiledones no se expanden, por el contrario se están degradando (Bewley y Black, 1994).

Transporte de carbohidratos en semillas.

La localización *in situ* del RNAm de SUT en trigo (TaSUT1) y avena (HvSUT1), sugiere que el transporte de sacarosa desde el tejido materno hacia el endospermo en desarrollo es mediada por el transportador, si bien el transporte que debe ocurrir es en eflujo desde el floema de la planta madre hacia las células de transferencia o basales del tejido en desarrollo (Takeda *et al.*, 2001). Así como en cereales, en legumbres también se ha propuesto que los transportadores de carbohidratos se encuentran en la membrana de los tejidos filiales para la biosíntesis de reservas (Weber *et al.*, 1997; Weschke *et al.*, 2000). Evidencias que demuestran la importancia del transportador en el llenado de grano provienen de la plantas de arroz que perdieron la función de un solo transportador, OsSUT1. En éstas plantas que expresaron en anti-sentido fragmentos de cDNA de OsSUT1, las plantas no presentaron diferencias en la capacidad fotosintética de las hojas bandera comparada con la actividad de las plantas silvestre. No obstante, hay efectos drásticos en el llenado del grano, que se observan como un desarrollo retardado al inicio del crecimiento vegetativo (Scofield *et al.*, 2002).

En la siguiente etapa del desarrollo, la germinación, se tienen pocos estudios sobre el transporte de carbohidratos. Durante la germinación ocurre la movilización de las reservas de carbono, lípidos y proteínas en dos fases esencialmente, en la primera se utilizan las reservas o metabolitos que se quedaron en los tejidos embrionarios de la semilla. En la segunda fase de movilización se incluyen las reservas que se encuentran en los tejidos extraembrionarios como el endospermo que es una fuente rica en glucosa y que esencialmente ocurre después de la salida de la radícula o fase III de la toma de agua de la semilla.

Se ha explorado con detalle en arroz la expresión de los transportadores de carbohidratos durante la fase posterior o tardía de la salida de la radícula (Matsukura *et al.*, 2000). Se detectó el RNAm para OsSUT1 en las células acompañantes de hojas de plántulas de arroz de 5 días de crecimiento. Sin embargo, no se encontró expresión del gen OsMST5 (transportador de monosacáridos), aunque sí se encontró durante el desarrollo de la flor.

Durante la germinación de embriones de maíz hemos observado que el RNAm para transportador de sacarosa se encuentra exclusivamente en el escutelo (Greaves-Fernández, 2001), así como la proteína y la actividad de transporte de sacarosa (Zavala-Zendejas, 2001). La presencia de ZmSUT1 en el escutelo permite sugerir que el transportador es necesario en el tejido fuente para proveer de esqueletos carbonados al eje embrional en crecimiento. La entrada de carbono al eje embrionario necesariamente debe ocurrir a expensas de al menos un transportador de hexosas, por lo que en el presente trabajo uno de los objetivos era clonar al menos un transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz y medir su expresión durante la germinación.

Por otra parte, debido a que la expresión específica del tejido del transportador de sacarosa puede estar relacionada con la capacidad de síntesis de sacarosa del escutelo y la fuerza de demanda del eje embrionario, es probable que tanto los niveles de los transcritos para los transportadores de sacarosa y de hexosas se encuentren regulados por los niveles de carbohidratos, como glucosa o sacarosa. Por lo que en este trabajo se analizaron los efectos de la imbibición del tejido embrionario en carbohidratos, sobre la expresión comparada de ambos transportadores de carbohidratos.

HIPÓTESIS

La expresión de los genes de los transportadores de hexosas y sacarosa está regulada por los niveles de carbohidratos durante la germinación del maíz.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de los RNAm de los transportadores de hexosas y sacarosa variando cualitativa y cuantitativamente los carbohidratos a embriones de maíz en germinación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clonar un transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz.
2. Determinar el patrón de expresión de los RNAm para el transportador de hexosas obtenido en el punto 1, en diferentes tejidos de maíz y en la germinación de tejidos embrionarios de maíz.
3. Determinar en tejidos embrionarios de maíz el efecto de su imbibición en carbohidratos sobre la expresión de los RNAm para los transportadores de hexosas y sacarosa.

METODOLOGÍA

Esquema general de trabajo

El trabajo experimental que se llevó a cabo en el presente trabajo se dividió en dos partes, la primera fue la clonación del transportador de hexosas y la segunda fue la determinación de los niveles de transcrito del transportador en diferentes tejidos y durante las diferentes fases de la germinación de ejes y embriones de maíz. También se midió el efecto de la imbibición en diferentes carbohidratos o ABA en la expresión de los transportadores de carbohidratos (Figura 6).

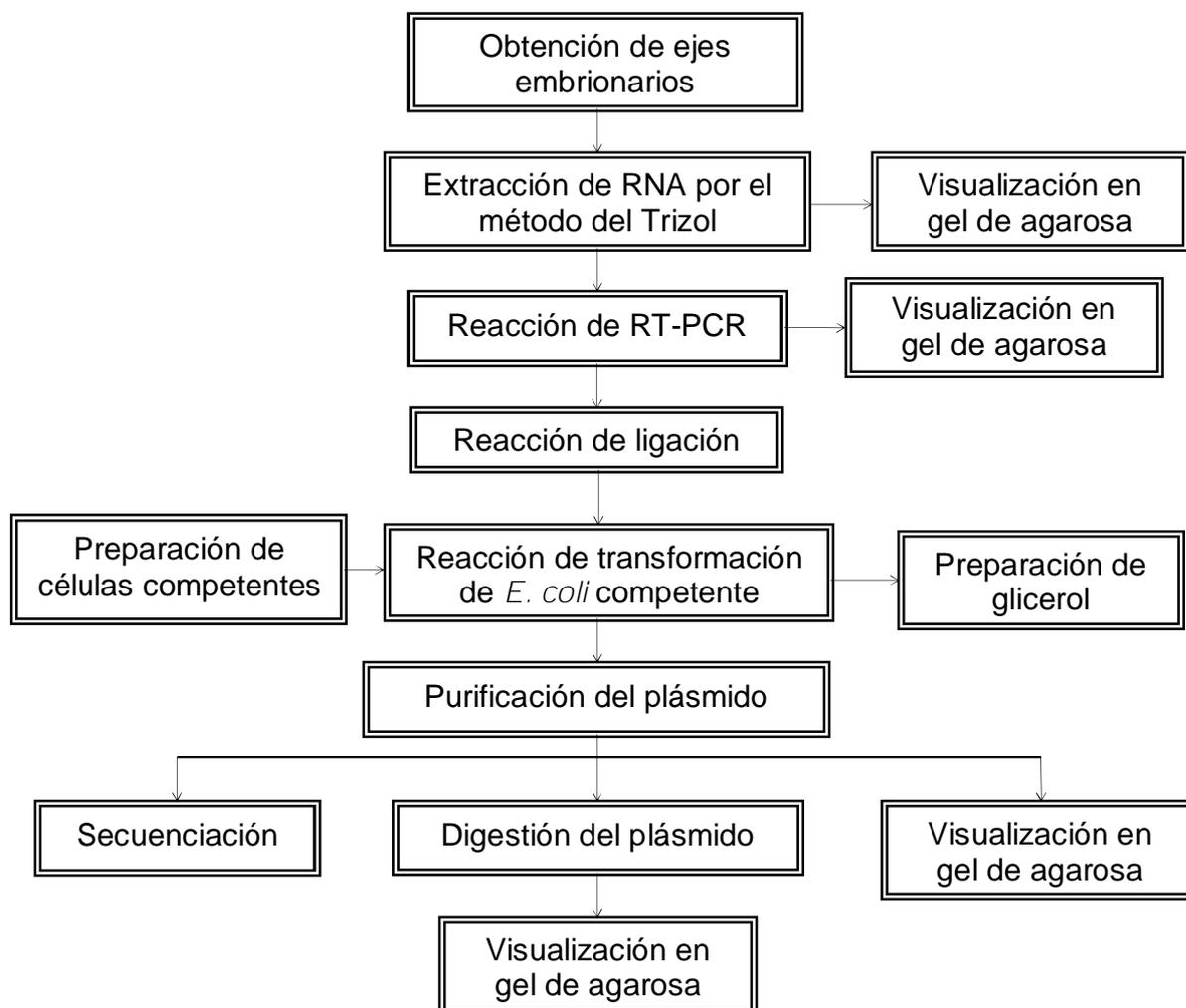


Figura 5. Protocolo utilizado en la clonación de un transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz.

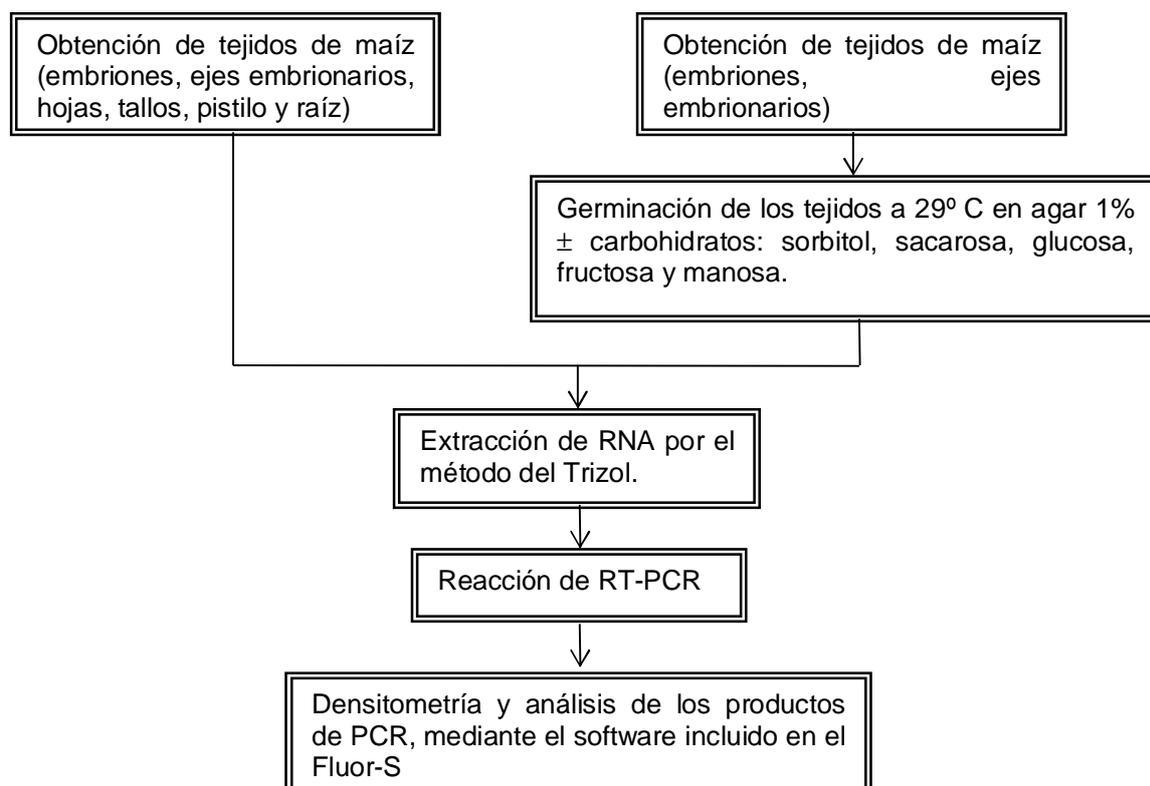


Figura 6. Diagrama de trabajo empleado para la determinación de los niveles de transcrito del transportador en diferentes tejidos y durante las fases de la germinación de ejes y embriones de maíz.

Germinación de ejes y embriones de maíz.

Desinfección. Se obtuvieron ejes y embriones de la semilla de maíz por disección manual. Se lavaron los tejidos con 2% de hipoclorito de sodio por 2 min, y se enjuagaron con agua estéril al menos tres veces, o hasta que el olor a cloro ya no fuera percibido.

Germinación. Se colocaron 10 a 15 ejes o embriones de maíz en cajas Petri con Agar al 1% y se incubaron por diferentes tiempos a 29°C. Cuando se germinaron en presencia de carbohidratos, al agar se le adicionaron 50 mM de sorbitol, sacarosa, glucosa, fructosa o 5 mM manosa y se incubaron por 24 h a 29°C. Para el tratamiento de ABA, se añadieron al Agar ya solidificado tres concentraciones

distintas 10, 30 y 50 μM de ABA, ya que la solución estaba disuelta en metanol. Se dejó secar por unos minutos, previo a la colocación del tejido embrionario.

Captación de agua. Tanto ejes como embriones secos se pesaron antes de colocarlos en imbibición y al final se pesaron nuevamente. Se consideró como 100% el peso húmedo inicial.

Diseño de oligonucleótidos para la obtención de una clona para el transportador de hexosas.

La primer parte de este trabajo fue la clonación de un transportador de hexosas (Figura 5). Para esto, se realizó una búsqueda en el Genbank, para encontrar alguna secuencia reportada para un transportador de hexosas en maíz. De la búsqueda se encontraron tres secuencias parciales en la biblioteca de EST de maíz. De éstas, una fue obtenida de endospermo de maíz, nosotros la denominamos Zendospermo y tiene el número de acceso BT018728.1 (Figura 7). Se analizó la secuencia y se comparó con otras secuencias de transportadores de hexosas cuya función de transporte era conocida. Encontramos que la secuencia tenía un grado de identidad alto, entre 74 y 95%, con otras secuencias anotadas como transportadores de hexosas.

Con esta información se diseñaron dos oligonucleótidos que nos fueran útiles para encontrar una secuencia para el transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa de Workbench 4.0 que se encuentra disponible en Internet (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar y clonar al transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz.

Dirección de la amplificación	Secuencia del oligonucleótido	T _m	Longitud (pb)	Contenido de GC (%)
Sentido	CTTCTACGCGCCGGTCC	62.90	17	70.5
Antisentido	GCGATGACGAAGGTGAAGAG	60.94	20	54.5

Los oligonucleótidos diseñados se localizan entre los nucleótidos 1226 y 1631 de la secuencia de nucleótidos de Zendofermo, para amplificar un producto de 405 pb (Figura 7).

gcacgacgtatccccaacatgctggctctgtgtgtccccattcacttctcactctagactctagt
tcgccccatgagctctggcaggtcaaagaaggaagagacaaccgaaggatcaacggatcaagcgag
gtagacgactccgcgtctaattaacctgtggtctgcggacgggcggtcgtcggtagagcat tgc
ttccgtgtggtgcggttgatagctcggatcttctgctggcggagtccgtcttggaggagaagagag
agagagagcgcgcgcgccgggatcggagccaggaagcatccagcagcgatggcgggcgcggggtg
gcggcgctgggctgaagacggagcgcgcggcgcagtacaagggcgcatgacgctcgcgctcgcc
acgacctgcctcgtggccgcgctcggggcgccatcttcggctacgacatcggcatctccggaggc
gtgacatccatggaccattcctggagaaattcttcccggtagtggtccaccggaagaactccggc
gggaagaacaactactgtaagtacgacaaccagggactagcggcgttcacatcgtcactctacctc
gccggcctcgttgctccctcgtcgcgtcccccgtagcaggaactacggccgcaaagctagcatt
gtctgcgggcggtgagcttctcatcggcgcggccctcaacgtggccgctgaatctggctatg
ctcatcctcgggcatcatgctcggcgtcggcatcggtttggcaaccaggctgtgcccgtgtac
ctgtcggagatggcgcggcgcacctccgcccggcctgaacatgatgtccagctcgcgacgacg
ctgggcatctcaccgtgaacctgatcaactatggcacgcagaacatcaagccgtgggggtggcgg
ctgtcgtcggcctcgcggcggtgcccgcgtgctgatgacgttgggcggtctcttctccggag
actcccaacagcctcattgagcgcggcgcgtggaggagggtcggcgcgtgctggagcgcacccgg
ggcacggccgacgtggacgccgagttcacggacatgggtggaggcgagcgagctggccaacaccgtc
gagcaccgctccggaaca [tcctgcagccgcgcaaccggc](#) cgcagctggtgatggccgtgtgcatg
ccggcgttccagatcctgacgggcatcaactccatcctcttctacgcgcggctcctgttccagagc
atgggttccggcgggaacgcgtccctctactcctccgtgctcaccggcgccgtgctcttctcctcg
acgctcatctccatcggcatcgtcgaccgcctcggccgcccgaagctcctcatcagcggcgggatc
cagatgatcgtctgccaggtgatcgtggcgggtgatcctggcgtgaagtccggggcggagaagcaa
ctggcgcggagctactcggtcgcggtggtggtggtgatctgcctgt [tcgttctggcgttcgggtgg](#)
[tcgtggggcccgctgggatggacggtgccgagcgagatcttcccgtggagacgcggtcggcgggg](#)
cagagcatcaagggtggccgtgaacctgctcttccacctcgtcatcgcgcaggcgttctcgtcgtg
ctgtgcccctcaagttcggcatcttctcttttccgcccgggtggatcaccgtcatgaccgtgttt
gtctacgtcttctgcccggagaccaagggcgtgcccatcgaagagatgggtgctgctatggcggaa
cactggttttggagaaggtcatgccggacatgccgctcagggatggctggggcgcggtgagggt
catgcggcacctgccagcaacaatcacaagggatgactggagtgagcatgcatggttgccctggtt
ggtttcgtggaccctttatataaactgaagaaaaaagacaccactaacatgtaggcggctgc
ttattcttattgtatttgtataaaaaggtggtgatatgcagggataaaaaacgaacgagatc
gttccaaataaccttcttttgttttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 7. Secuencia de nucleótidos de Zendofermo (Tomada del Genbank). Con letra azul se muestran las secuencias de oligonucleótidos que se usaron para la amplificación de la secuencia.

Obtención de RNA por el método del Trizol

En la sección del Apéndice se describen los cuidados y la preparación de las soluciones que se usaron en este trabajo.

1. Usualmente se usaron 15 ejes o 10 embriones. Se congeló el tejido con N₂ líquido y se pulverizó hasta obtener un polvo muy fino.
2. Se le agregaron 3 volúmenes de la solución Trizol (Invitrogen) y se homogeneizó hasta obtener una suspensión (ejes y embriones).
3. Esta suspensión se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 2 mL, 1 mL por cada tubo, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
4. Se centrifugó a 13,000 g durante 15 min a 4 °C.
5. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril, se le agregaron 200 µL de PCI y se agitó durante 15 s.
6. Se centrifugó el tubo nuevamente a 13,000 g durante 10 min a 4 °C.
7. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf y se llevó a 1 mL con H₂O-DEPC.
8. Se le agregaron 400 µL de cloroformo y se volvió a centrifugar a 13,000 g durante 5 min a 4 °C.
9. El sobrenadante se separó y se le agregaron 400 µL de cloroformo, nuevamente se centrifugó a 13,000 g durante 5 min a 4 °C.
10. Se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril y se le agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló bien por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.
11. Se centrifugó nuevamente a 13,000 g a 4°C durante 10 min.
12. El sobrenadante se decantó y se le agregó 1 mL de etanol al 70%, se agitó con vortex hasta desprender el botón de la pared del tubo y se centrifugó a 13,000 g a 4 °C durante 5 min.
13. Se decantó el sobrenadante y se secó el botón durante 4 min a TA.
14. El botón se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC y posteriormente se agregaron otros 250 µL de H₂O-DEPC.
15. Se añadió 167 µL de LiCl 8M (4°C) e incubó a 4°C toda la noche [LiCl]_{final}= 2M.

16. Se centrifugó a 13,000 g por 15 min a 4°C.
17. El botón se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 500 µL de etanol al 95 % y 25 µL de NaAc 3M. Se incubó a -70°C durante toda la noche.
18. La muestra se centrifugó a 13,000 g por 20 min a 4 °C.
19. Se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y centrifugó a 13,000 g por 20 min, 2 veces.
20. Se eliminó el etanol residual y el botón se secó a TA por ~ 10 min.
21. El botón se resuspendió en 40 µL de H₂O-DEPC.
22. La muestra de RNA total se cuantificó a 260 nm, y se visualizó en un gel de agarosa. Se almacenó a -70°C.

Visualización en gel de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X y 0.5 µL/mL bromuro de etidio (1 mg/mL). A cada muestra se le agregó de volumen de buffer de carga 3X previamente a su colocación en el carril. Se corrió la muestra en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X frío, a 90 mV por 20 min.

Cuando se corrieron las muestras con RNA, se lavó previamente la cámara con SDS 10% durante toda la noche o por 2 h y se enjuagaba con H₂O-DEPC.

Para la obtención del perfil de los transcritos para los transportadores de hexosas y sacarosa, se corrieron geles con 1 µg de RNA para todos los tejidos examinados ajustándose los volúmenes cuando fue necesario para que el contenido de RNA que se utilizaba para la producción de cDNA fuera el mismo en todas las condiciones o tratamientos de los tejidos, al que denominamos control de la cantidad de RNA empleado en la reacción de RT.

Reacción de RT (Transcriptasa Reversa)

La reacción contuvo 1 µL de oligo dT (20 µM), 1 µg de RNA y se adicionó agua a un volumen de 5 µL, la mezcla se calentó a 70°C por 5 min para desnaturalizar el

RNA, después se enfrió a 4°C por 5 min. Posteriormente, se añadieron 6.6 µL de H₂O libre de nucleasas, 4 µL de 5X First-Strand buffer (Promega), 2.4 µL de MgCl₂ (Promega), y 1 µL de dNTP's 10 mM (GIBCO). Se mezcló con vortex y se calentó a 25°C durante 5 min, después a 42°C por 1 h. A esta mezcla se agregó 1 µL de Super Script II RT (Promega). Finalmente, para inactivar la enzima se calentó a 70°C durante 15 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Ensayos de PCR y extensión del Primer

Para realizar el análisis de la expresión del transcrito para el transportador de hexosas, también se determinó el nivel de expresión del transportador de sacarosa, para ello se utilizaron los dos oligonucleótidos que se utilizaron en un trabajo previo en el laboratorio para determinar la expresión del transportador (Greaves-Fernández, 2001), las secuencias de oligonucleótidos aparecen en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar el transcrito para el transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz.

Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	T _m (50mM Na ⁺)	Longitud (pb)	Contenido de GC (%)
Sentido	TCCTCTGGTTCCACAAACAAC	60	21	48
Antisentido	ACGAGCTGAATCCTAGAACGA	59	21	48

Para establecer las condiciones óptimas para la expresión tanto del transportador de sacarosa como el de hexosas, se realizaron curvas a diferentes concentraciones de cDNA, de oligonucleótidos y de números de ciclos de amplificación. Las condiciones óptimas para amplificar al transcrito para el transportador de hexosas fueron 1 µl de cDNA, 0.2 µM oligonucleótidos y 33 ciclos de amplificación (Figura 8A, B y C). Mientras que las condiciones óptimas para amplificar al transcrito del transportador de sacarosa fueron: 1 µl de cDNA, 0.08 µM oligonucleótidos y 33 ciclos de amplificación (Figura 8D, E y F).

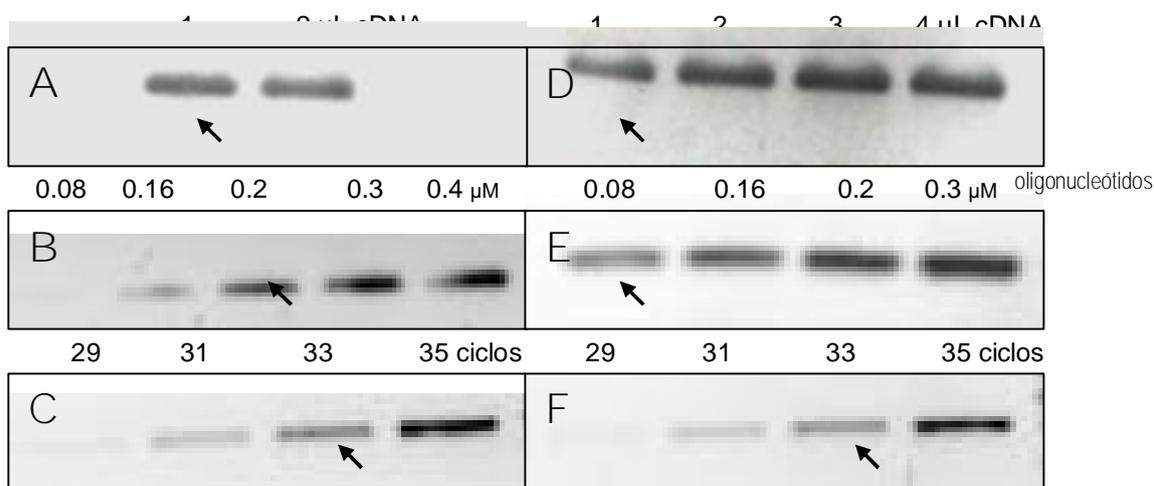


Figura 8. Establecimiento de las condiciones óptimas para la amplificación de productos específicos para el transportador de hexosas y sacarosa. Se utilizó 1 μg de RNA de embriones embebidos 24 h en agar para la obtención del cDNA. Con flechas se muestran las condiciones determinadas como óptimas. A, B y C corresponden al producto específico de la amplificación con los oligonucleótidos para el transportador de hexosas. Mientras que D, E y F son los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos diseñados para amplificar al RNA para el transportador de sacarosa.

Los componentes de reacción para el transportador de hexosas fueron: 12.5 μL de PCR Master Mix, 0.25 μL de oligonucleótido Sentido (20 μM), 0.25 μL de oligonucleótido antisentido (20 μM), 1 μL de DNA templado, 11 μL de H_2O . Mientras que para el transportador de sacarosa fueron: 12.5 μL de PCR Master Mix (Promega), 0.1 μL de oligonucleótido sentido (20 μM), 0.1 μL de oligonucleótido antisentido (20 μM), 1 μL de DNA templado, 11.3 μL de H_2O . Posterior a esto, se programó el termociclador Applied Biosystems, PCR systems 9700, bajo las condiciones mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones empleadas para la realización de la reacción de PCR.

Pre-desnaturalización	Amplificación PCR/ ciclo (33 ciclos)	Extensión final
94°C por 3 min	Desnaturalización, 94°C por 15 s Templado, 55°C por 1 min Extensión, 72°C por 2 min	72°C por 10 min

Para clonar el producto de PCR específico para el transportador de hexosas, se realizó primero la purificación del producto de PCR del gel de agarosa, posteriormente se ligó a un vector y se transformaron células competentes. Para determinar que efectivamente el producto de PCR se encontraba en la bacteria, se realizó la obtención del plásmido y se realizó un ensayo de restricción del fragmento, posteriormente se envió a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular para su secuenciación (Figura 5). A continuación se describen todos los métodos empleados.

Purificación del producto de PCR (QIAquick Gel Extraction Kit)

1. Se cortó el fragmento de DNA amplificado del gel de agarosa utilizando una navaja estéril, se colocó en un tubo eppendorf estéril y se pesó.
2. Se añadieron 3 volúmenes del buffer QG por cada volumen de gel (100mg~100µL).
3. Se incubó a 50°C por 10 min.
4. Después de que el gel se disolvió completamente, se añadió 1 volumen de isopropanol a la muestra y se mezcló.
5. Se colocó una columna QIAquick en un tubo para colectar de 2 mL (provisto en el kit), se añadió la muestra a la columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm.
6. El líquido filtrado se decantó y se agregaron 500 µL de buffer QG a la columna QIAquick. Se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm.
7. Para lavar, se agregaron 750 µL de buffer PE a la columna QIAquick y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm.
8. Se decantó el líquido y se centrifugó la columna QIAquick por 1 min adicional a 13,000 rpm.
9. La columna QIAquick se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y se le agregaron 30 µL de buffer de elución en el centro de la membrana QIAquick, manteniéndose en la columna por 1 min, y entonces se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm.

Reacción de ligación

Los componentes de la reacción fueron: 5 μ l del buffer de ligación rápida 2X, 1 μ l de pGEM-T Easy (Figura 9), 3 μ l del producto de PCR y 1 μ l de T4 DNA ligasa. El volumen final de la reacción debe ser 10 μ l. La reacción se incubó toda la noche a 4°C.

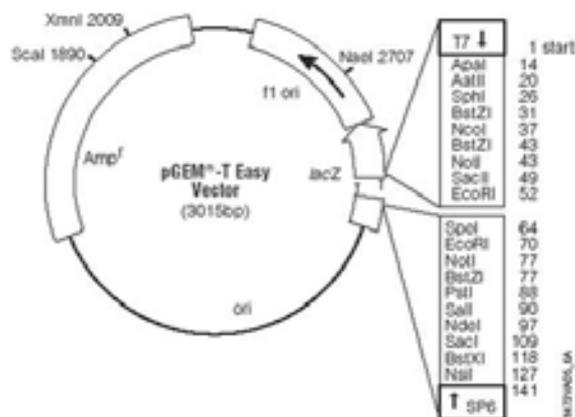


Figura 9. Mapa circular del vector p-GEM-T Easy. Muestra los puntos de corte de algunas enzimas de restricción.

Transformación de *E. coli* competente

1. La mezcla de reacción de ligación se centrifugó brevemente.
2. Se añadieron 50 μ l de células competentes, se mezclaron e incubaron por 20 min en hielo.
3. La mezcla anterior fue calentada por 45-50 s a una temperatura de 42°C (no exceder la temperatura). Inmediatamente se incubó en hielo por 2 min.
4. Posteriormente se agregaron 950 μ l de medio LB a temperatura ambiente y se incubó por 1.5 h a 37 °C con agitación.
5. Se inocularon 2 cajas petri con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal con 100 μ l de la mezcla anterior.
6. Estas cajas fueron incubadas toda la noche a 37°C. De las colonias blancas, 5 fueron seleccionadas y aisladas en 5 cajas petri con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. A partir de una colonia de cada caja se inocularon 12 mL de medio LB líquido con ampicilina.

Purificación del plásmido (Genelute Plasmid Miniprep Kit)

1. Se transfirieron 12 mL del cultivo de *E. coli* recombinante (con 12 h de crecimiento) a un tubo eppendorf y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante.
2. El pellet fue resuspendido totalmente con 200 μ L de la solución de resuspensión.
3. Para lisar las células resuspendidas se añadieron 200 μ L de la solución de lisis, mezclando inmediatamente el contenido por inversión suave (6-8 veces), hasta que el contenido fuera claro y viscoso. ¡No se usa vortex!. La reacción de lisis no debe exceder 5 min.
4. Se precipitaron las células agregando 350 μ L de la solución de neutralización y mezclando suavemente por inversión del tubo de 4 a 6 veces. Se centrifugó la mezcla a 13,000 rpm por 10 min para eliminar las células.
5. Se insertó una columna Gen Elute Miniprep Binding en el tubo eppendorf incluido en el kit y se añadieron 500 μ L de la solución de preparación de la columna. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30-60 s y se decantó el líquido.
6. El lisado claro obtenido en el paso 4 se colocó sobre la columna preparada en el paso 5 y se centrifugó a 13,000 rpm por 30-60 s, decantando posteriormente el líquido.
7. Se añadieron 500 μ L de la solución de lavado opcional a la columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 30-60 s. Se decantó el líquido.
8. Se añadieron 750 μ L de la solución de lavado a la columna. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30-60 s. El líquido se decantó y de nuevo se centrifugó a 13,000 rpm por 1-2 min para remover el exceso de etanol.
9. La columna se transfirió a un tubo eppendorf limpio. Se añadieron 40 μ L de agua a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. El plásmido se encuentra en el líquido filtrado.

Digestión del plásmido (kit de Invitrogen)

Los componentes de la reacción fueron: 0.3 μL de EcoRI, 1 μL de buffer ECORI, 1 μg de DNA y se llevó a 10 μL con agua. Esta mezcla fue incubada por 2 h a 37°C.

Preparación de stock de glicerol.

Para conservar a las células que contenían al fragmento de PCR deseado, se tomaron 700 μL de cada clona obtenida y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL, se le agregaron 300 μL de glicerol al 50%. Los tubos fueron congelados con N_2 líquido y almacenados a -70 °C.

RESULTADOS

Clonación del transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz.

A partir de RNA de embriones de maíz embebidos 24 h se amplificó un producto de PCR con peso molecular de 405 pb. Se purificó el producto de PCR en un gel de agarosa y se clonó en el vector pGEM-T-easy (Promega). La reacción de ligado se hizo para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α que fueron crecidas en medio LB con IPTG, X-Gal y ampicilina. Las colonias que contenían el plásmido recombinante (blancas) se seleccionaron y se crecieron en medio LB líquido con ampicilina para aumentar su concentración y purificar los plásmidos. El DNA plasmídico se purificó y se cortó con la enzima de restricción EcoRI para determinar qué colonias contenían al inserto. La reacción de digestión se corrió en un gel de agarosa como se muestra en la Figura 10.

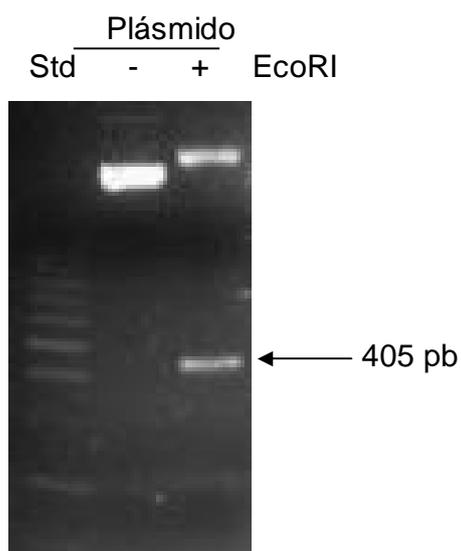


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra la liberación del inserto. Digestión del plásmido con EcoRI.

El inserto clonado en el plásmido se mandó a secuenciar. Esta secuencia fue analizada y comparada como secuencia de nucleótidos con las secuencias anotadas en el Genbank, en donde resultó con una identidad de hasta 96% con otros transportadores de carbohidratos reportados, especialmente hexosas (Tabla

7). En la Tabla 7 se muestran las probabilidades (E) predichas por el BLAST, valores de E menores a 10^{-4} se consideran como valores suficientes para determinar un alto grado de similitud entre dos secuencias. En la Tabla se muestran las secuencias que presentan una E menor a 10^{-10} .

Tabla 7. Proteínas transportadoras de monosacáridos que producen alineamientos significativos.

Descripción	Transportador	Secuencia cubierta (%)	Valor E	Máxima identidad (%)
<i>Saccharum hybrid</i> H65-7052	Glucosa	100	3e-153	96
<i>Oryza sativa</i> OsMST3	Monosacáridos tipo 3	98	3e-44	73
<i>Oryza sativa</i>	Monosacáridos tipo 8 (MST8)	92	1e-43	75
<i>Oryza sativa</i>	Monosacáridos tipo 7 (MST7)	92	2e-40	73
<i>Oryza sativa</i>	Monosacáridos tipo 6 (MST6)	98	6e-35	70
<i>Zea mays</i>	Monosacáridos tipo 1 (MST1)	98	7e-34	70
<i>Vitis vinífera</i>	Hexosas putativo (HT3)	70	8e-33	74
<i>Vitis vinífera</i>	Hexosas 7 (HT7)	70	4e-31	73
<i>Oryza sativa</i> OsMST2	Monosacáridos tipo 2	87	3e-26	70
<i>Oryza sativa</i> OsMST2	Monosacáridos tipo 4 (MST4)	40	3e-25	80
<i>Ricinus communis</i> (clona PST9)	Proteína acarreadora de azúcares (RCSTA)	99	4e-24	67
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Azúcares putativo(AT4G02050)	73	1e-18	69
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Azúcares (STP7)	73	1e-18	69
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Azúcares (STP1)	29	2e-16	81
<i>Arabidopsis thaliana</i> (clona U10927)	Glucosa putativo (At1g11260)	29	2e-16	81
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glucosa putativo (At1g11260)	29	2e-16	81
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glucosa (STP1)	29	2e-16	81
<i>Vitis vinífera</i>	Hexosas putativo (HT4)	30	7e-15	80
<i>Prunus persica</i> (clona)	Hexosas (STP2)	26	7e-15	82
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hexosas (HT3)	72	7e-15	68
<i>Viscum album</i> subespecie	Monosacáridos (MST5)	30	7e-15	78
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Azúcares putativo (AT1G77210)	39	7e-15	72

Dentro de los transportadores que muestran alta identidad al encontrado en éste trabajo, se encuentra una proteína transportadora de monosacáridos encontrada en un banco de EST de raíces de *Zea mays*, con un 70% de identidad.

Con la ayuda de las herramientas disponibles en el Genbank se realizó un árbol filogenético, que nos muestra de una manera distinta a la mostrada en la Tabla 7, la cercanía de nuestra clona con la encontrada en otras especies (Figura 11). Nuestro transportador se encuentra en una rama cercana a la de transportador de glucosa de una especie de caña de azúcar híbrida (especie monocotiledónea), así como también se encuentra cercana, pero en una rama distinta a algunos de los transportadores clonados de arroz. En el árbol aparece la única secuencia de transportador de hexosas de maíz reportada hasta el momento, pero está alejada de la secuencia que se encontró en este trabajo. Lo anterior indica que nuestra secuencia es diferente a la encontrada en las raíces, aunque coincide con la secuencia que se encuentra en el banco de secuencias EST de embrión temprano de maíz (Figura 12). Hay que recordar que las secuencias EST (del inglés "Expressed Sequence Tags") son secuencias que se obtuvieron al realizar una biblioteca o búsqueda de genes en una biblioteca de expresión para algún tratamiento especial o particular de un tejido. Generalmente, son secuencias cortas de 300 a 500 pb y que muy probablemente no tienen una relevancia para quién la encontró, sin embargo la anotó en el banco de EST del Genbank.

Si se hace un alineamiento de la secuencia de nucleótidos que se clonó en los embriones de maíz y al que denominaremos de aquí en adelante ZmHT, con 3 de los transportadores con los que presenta mayor identidad, así como con la secuencia de nucleótidos Zendsperm reportada en el GenBank (Figura 12), se observan amplias regiones conservadas en las 5 secuencias analizadas. Sin embargo, como secuencia de nucleótidos es difícil asignar a qué parte de la proteína corresponde, porque no todas las secuencias disponibles de los transportadores están completas.

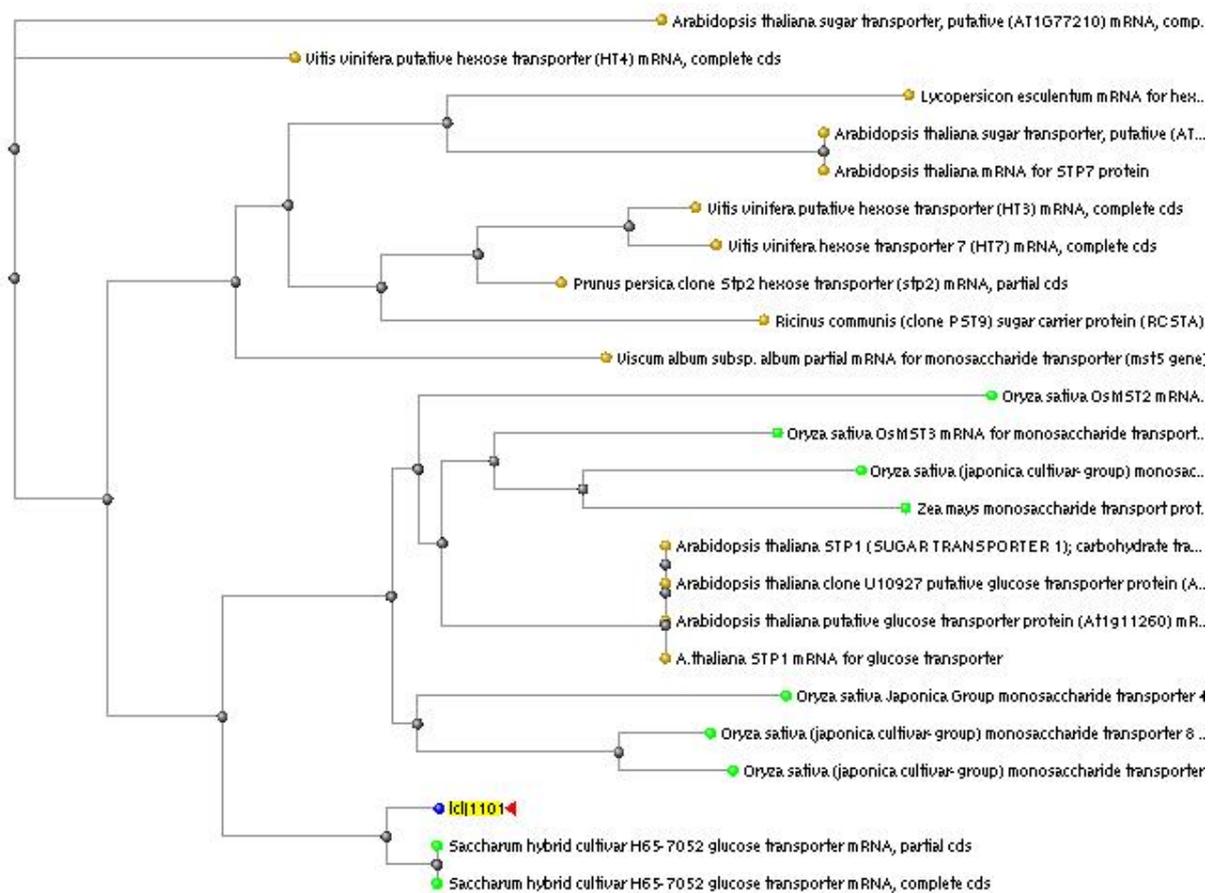


Figura 11. Árbol filogenético de proteínas transportadoras de monosacáridos, obtenido de un blast en el programa NCBI, en internet. Con una flecha se indica la clona parcial que se obtuvo en este trabajo (ICI1101).

<i>ZmHT</i>	1	ACTGTCGAGC--TGGGTTT CGGCGGGA--CGCGTCCCTTCTACTCCTCCGTGC
<i>Zendosperm</i>	1245	GTTCCAGAGCATGGGTTT CGGCGGGAACGGTCCCTCTACTCCTCCGTGC
<i>ShGT</i>	242	GTTCCAGAGCATGGGTTT CGGCGGGAACGGTCCCTCTACTCCTCCGTGC
<i>AtSTP1</i>	1010	GTTCAACACCATTGGTTTACGACCGATGCTTCTCTCATGTCCGCTGTGG
<i>OsmST4</i>	918	GTTCAACACGCTCGGGTTCAAGACCGACGCGTCCCTCTACTCCGCGGTGA
<i>ZmHT</i>	49	TCACCGGCGCCGTGCTCTTCTCCTCGACGCTCATCTCCATCGGCATCGTTC
<i>Zendosperm</i>	1295	TCACCGGCGCCGTGCTCTTCTCCTCGACGCTCATCTCCATCGGCATCGTTC
<i>ShGT</i>	292	TCACCGGCGCCGTGCTCTTCTCCTCGACGCTCATCTCCATCGGCATCGTTC
<i>AtSTP1</i>	1060	TCACTGGCTCGGTTAAAGTTGGGCTACGCTTGTTTCTATCTACGGTGTTC
<i>OsmST4</i>	968	TCACGGGGGCCGTGAACGTTGCTGTCCACGCTGGTCTCCGTCTACTCGGCG
<i>ZmHT</i>	99	GACCGCCTCGGCCGCCGGAAGCTCCTCATCAGCGGC GGGATCCAGATGAT
<i>Zendosperm</i>	1345	GACCGCCTCGGCCGCCGGAAGCTCCTCATCAGCGGC GGGATCCAGATGAT
<i>ShGT</i>	342	GACCGCCTCGGCCGCCGGAAGCTCCTCATCAGCGGC GGGATCCAGATGAT
<i>AtSTP1</i>	1110	GACAGATGGGGACGTCGGTTTCTCTTTCTTGAAAGTGCTACACAAATGCT
<i>OsmST4</i>	1018	GACAGGGTGGGGAGGCGGATGCTGCTGCTGGAGGCCCGGTGCAGATGTT
<i>ZmHT</i>	149	CGTCTGCCAGGTGATCGTGGCGGTGATCCTGGGCGTGAAAGTTCCGGGCGG
<i>Zendosperm</i>	1395	CGTCTGCCAGGTGATCGTGGCGGTGATCCTGGGCGTGAAAGTTCCGGGCGG
<i>ShGT</i>	392	CGTCTGCCAGGTGATCGTGGCGGTGATCCTGGGCGTGAAAGTTCCGGGCGG
<i>AtSTP1</i>	1160	TATATGCCAGGCTGTGGTTGCAGCTTGCAATAGGGCCCAAGTTTGGGGTAG
<i>OsmST4</i>	1068	CCTGTCGCAGGTGGCCATCCGCCCTCGTGTGGGATCAAGGT---GACGG
<i>ZmHT</i>	199	AGAAG-----CAACTGGCGCGGAGCTACTCCGTCGCCGTTGGTGGT
<i>Zendosperm</i>	1445	AGAAG-----CAACTGGCGCGGAGCTACTCCGTCGCCGTTGGTGGT
<i>ShGT</i>	442	ACAAG-----CAGCTTCCGCGGAGCTACTCCGTCGCCGTTGGTGGT
<i>AtSTP1</i>	1210	ACGGGACCCTTGGTTCAGCTACCAAAG--TGGTATGCTATAGTGGTCTTAAC
<i>OsmST4</i>	1115	ACCGG---TCGGACAACCTCGGCCACGGGTGGGCGATCATGGTGGTGGT
<i>ZmHT</i>	239	GGTGTATCTGCCTGTTCTGTTCTGGCGTTTCGGGTGGTCTGGGGCCCCTGG
<i>Zendosperm</i>	1485	GGTGTATCTGCCTGTTCTGTTCTGGCGTTTCGGGTGGTCTGGGGCCCCTGG
<i>ShGT</i>	482	GGTGTATCTGCCTGTTCTGTTCTGGCGTTTCGGGTGGTCTGGGGCCCCTGG
<i>AtSTP1</i>	1259	GTTTATTTGCATCTATGTGGCGGTTTTCGCTGGTCTGGGGCCCCTAG
<i>OsmST4</i>	1161	GATGGTGTGCACGTTCTGTCCTCCTTCGCGTGGTCTGGGGCCCCTCG
<i>ZmHT</i>	289	GATGGACGGTCCGAGCGAGATCTTCCCCTGGAGACCGGTCGGCGGGG
<i>Zendosperm</i>	1535	GATGGACGGTCCGAGCGAGATCTTCCCCTGGAGACCGGTCGGCGGGG
<i>ShGT</i>	532	GGTGGACGGTCCGAGCGAGATCTTCCCCTGGAGACCGGTCGGCGGGG
<i>AtSTP1</i>	1309	GTTGGTTAGTACCGAGTGAATCTTCCCCTGGAGATAAGGTCGGCGGGG
<i>OsmST4</i>	1211	GGTGGCTCATCCCAGCGAGACGTTCCCCTGGAGACCGGTCGGCGGGG
<i>ZmHT</i>	339	CAGAGCATCACGGTGGCCGTGAACCTGCTCTTACCTTCGTCATCGC---
<i>Zendosperm</i>	1585	CAGAGCATCACGGTGGCCGTGAACCTGCTCTTACCTTCGTCATCGCGCA
<i>ShGT</i>	582	CAGAGCATCACGGTGGCCGTGAACCTGCTCTTACCTTCGTCATCGCGCA
<i>AtSTP1</i>	1359	CAGAGTATCACCGTGTCCGTGAACATGATCTTACCTTCGTCATTCGGCA
<i>OsmST4</i>	1261	CAGAGGTCACCGTGTGCGTCAACCTGCTCTTACCTTCGTCATTCGGCA

Figura 12. Alineamiento de la secuencia obtenida del transportador de hexosas con otros transportadores. Donde *ZmHT* es el transportador de hexosas de maíz clonado en este trabajo, *Zendosperm* es la secuencia EST de maíz encontrada en el genBank, *ShGT* es la secuencia del transportador de glucosa de caña de azúcar, *AtSTP1* es la secuencia del transportador de azúcares tipo 1 de *Arabidopsis thaliana*, *OsmST4* es la secuencia del transportador de monosacáridos tipo 4 de *Oryza sativa*. El programa asigna en color verde a las Adeninas, en azul a las citidinas, timidinas en rojo y a las guaninas en negro.

Expresión específica de tejido del gene para el transportador de hexosas.

Se realizaron ensayos de RT-PCR para detectar los RNAm para el transportador de hexosas en tejidos embrionarios y diferentes tejidos de planta adulta. Los ensayos de PCR se realizaron con diferentes ciclos de amplificación y temperaturas de hibridización y se encontró que solamente el eje, el embrión y en el tallo esporádicamente se presenta una tenue banda de aproximadamente 400 pb (Figura 13). Se propone que el transportador que se clonó presenta una expresión específica en tejido embrionario, sin embargo, es necesario realizar estudios de Northern blot, hibridización *in situ* o tal vez otras condiciones de PCR, para demostrar que efectivamente el transportador de hexosas ZmHT es específico del embrión.



Figura 13. Análisis por RT-PCR de la expresión ZmHT en varios tejidos de maíz. A) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en donde se visualizan los productos de PCR para el transportador de hexosas en eje y embrión secos, hoja, pistilo, raíz y tallo B) controles de que la cantidad de RNA que se utilizó para la reacción de RT-PCR era similar en cada carril (control de carga). Este experimento fue realizado por duplicado, obteniéndose resultados semejantes, se muestran los resultados de uno de ellos.

Niveles de RNAm para el transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz.

Experimentos previos en nuestro laboratorio demostraron un incremento en la síntesis de sacarosa a partir de las 24 h en los escutelos del maíz (Martínez-Marcelo, 2008), además de la presencia del transportador de sacarosa sólo en los escutelos (Greaves-Fernández, 2001, Zavala-Zendejas, 2001). La ausencia de transportador de sacarosa en el eje embrionario, asociado con un incremento de 5 veces en la actividad de invertasa en el eje embrionario a las 24 h, es indicativo de que el transportador de hexosas debe encontrarse presente en el eje embrionario para cumplir con la función de nutrición del tejido.

Considerando lo anterior, primero confirmamos que la expresión del transportador de sacarosa estaba ausente en el eje embrionario o si se presentaba en el embrión completo (Figura 14). Aún cuando se realizaron diferentes ciclos de amplificación, no se encontró transcrito para el transportador en los ejes embrionarios. Sin embargo, en los embriones desde el tiempo 0 ya había transcrito, mismo que aumento gradualmente conforme avanzaba el tiempo de germinación (Figura 14).

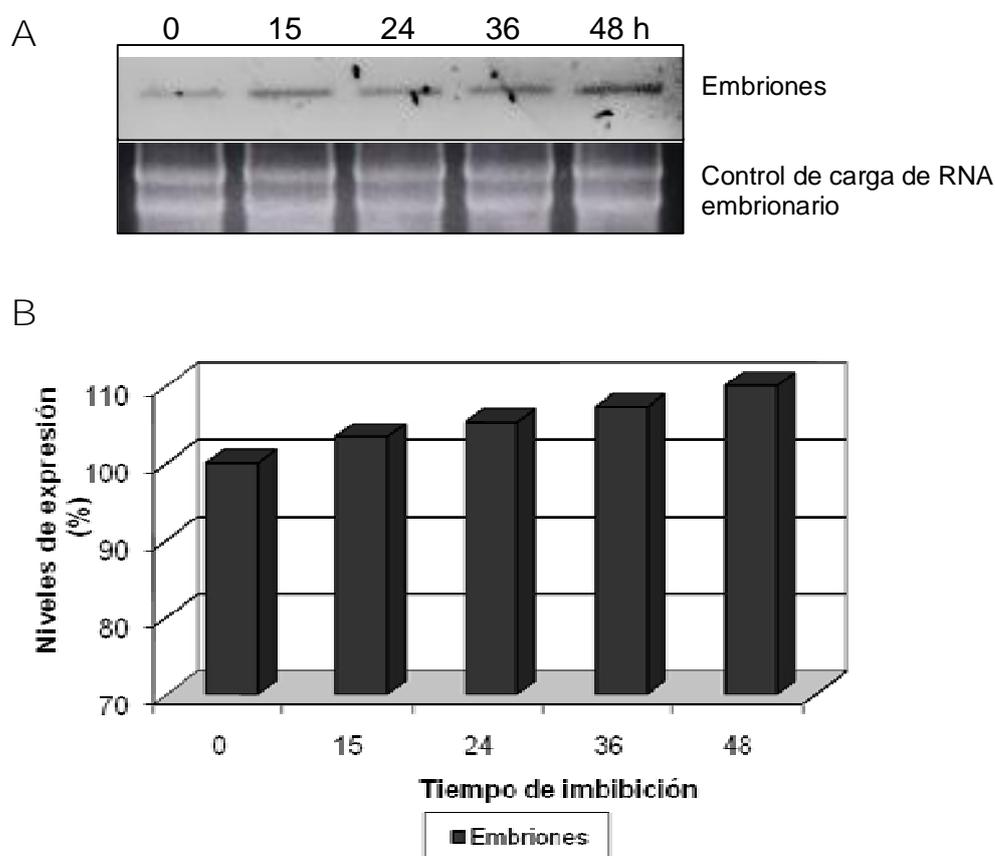


Figura 14. Expresión del transcrito del transportador de sacarosa durante la germinación de ejes y embriones de maíz. A) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en donde se visualizan los productos de PCR para el transportador de sacarosa de ejes embrionarios y embriones de maíz germinados por diferentes tiempos, también se muestran los controles de que la cantidad del RNA que se utilizó para la reacción de RT-PCR era similar en cada carril (control de carga). B) Densitometría de las bandas encontradas (se tomó como 100% la densitometría de la banda encontrada a las 24 h, tanto para ejes como para embriones). Estos experimentos fueron realizados por duplicado, obteniéndose resultados semejantes, se muestra el resultado de uno de ellos.

Usando los oligonucleótidos diseñados para clonar al transportador de hexosas y los RNA de los tejidos embrionarios embebidos diferentes tiempos, se realizaron ensayos de RT-PCR, determinándose el nivel de RNAm para el transportador de hexosas. Se encontró el transcrito para el transportador de hexosas tanto en ejes embrionarios como en los embriones en el tejido sin embeber y a las 15 h se

incrementó. El nivel máximo de transcrito en los ejes embrionarios se encontró a las 36 h, mientras que para los embriones es a las 48 h (Figura 15).

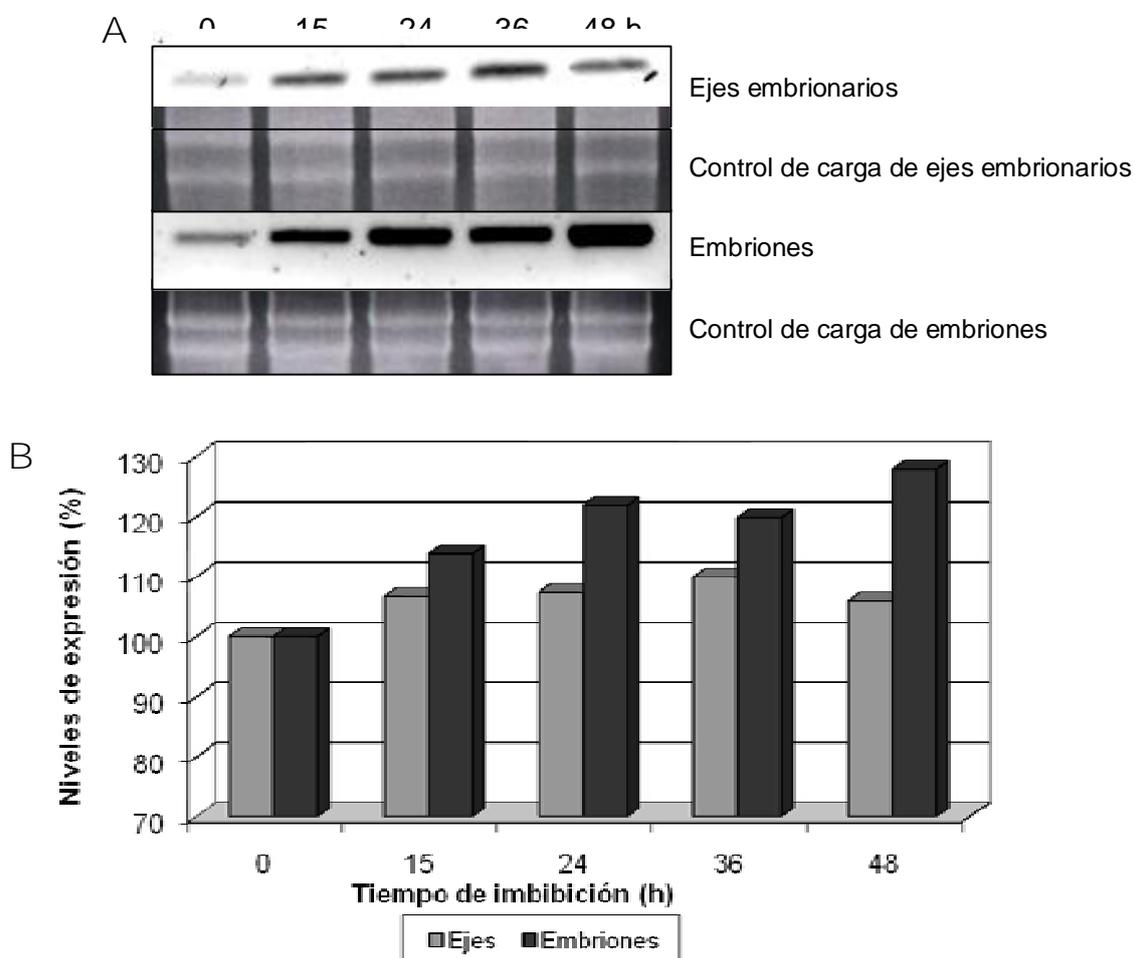


Figura 15. Comparación de la expresión del transcrito del transportador de hexosas durante la germinación de ejes y embriones de maíz. A) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en donde se visualizan los productos de PCR para el transportador de hexosas de ejes embrionarios y embriones de maíz germinados por diferentes tiempos, también se muestran los controles de que las cantidades de RNA que se utilizó para la reacción de RT-PCR eran similares en cada carril (control de carga). B) Densitometría de las bandas encontradas (se tomó como 100% la densitometría de la banda encontrada a las 24 h, tanto para ejes como para embriones). Estos experimentos fueron realizados por duplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

Efecto de los carbohidratos en la expresión del transportador de hexosas.

Durante la germinación, el tejido embrionario de maíz experimenta cambios continuos en el nivel de sus carbohidratos, principalmente sacarosa y glucosa (Martínez-Marcelo, 2008), éstos cambios pueden generar gradientes en los tejidos que pueden inducir o reprimir la expresión de genes importantes en el metabolismo, como se ha encontrado que ocurre durante el desarrollo de las plantas (Rolland *et al.*, 2006).

Adicionalmente, se ha propuesto que los transportadores de carbohidratos se regulan por carbohidratos (Lalonde *et al.*, 2004). Por lo anterior, se investigó si los transportadores de carbohidratos del tejido embrionario de maíz se regulaban por carbohidratos.

Se encontró que la incubación del tejido embrionario en carbohidratos cambiaba la expresión del transportador de hexosas tanto en ejes como en embriones, pero de manera distinta (Figura 16). En ejes embrionarios la expresión en agar y manosa es similar, fructosa y sorbitol inducen su expresión, mientras glucosa y sacarosa reprimen la expresión del transportador. A pesar de que uno esperaría que la glucosa indujera la expresión del transportador de hexosas y por tanto su entrada ayudará al crecimiento del eje embrionario, este no fue el caso, debido probablemente a que haya más de un transportador de hexosas en el eje embrionario, por lo que es posible sugerir que ZmHT podría presentar una alta afinidad de glucosa y su presencia no es necesaria a altas concentraciones de glucosa. Por otra parte, el transportador parece ser importante en el transporte de fructosa, ya que se induce por ese carbohidrato. Lo anterior hace interesante el estudio de éste transportador, ya que sólo se han reportado dos con capacidad para transportar fructosa, ambos en el polen de *Arabidopsis thaliana* (Schneidereit *et al.*, 2005; Scholz-Starke *et al.*, 2003).

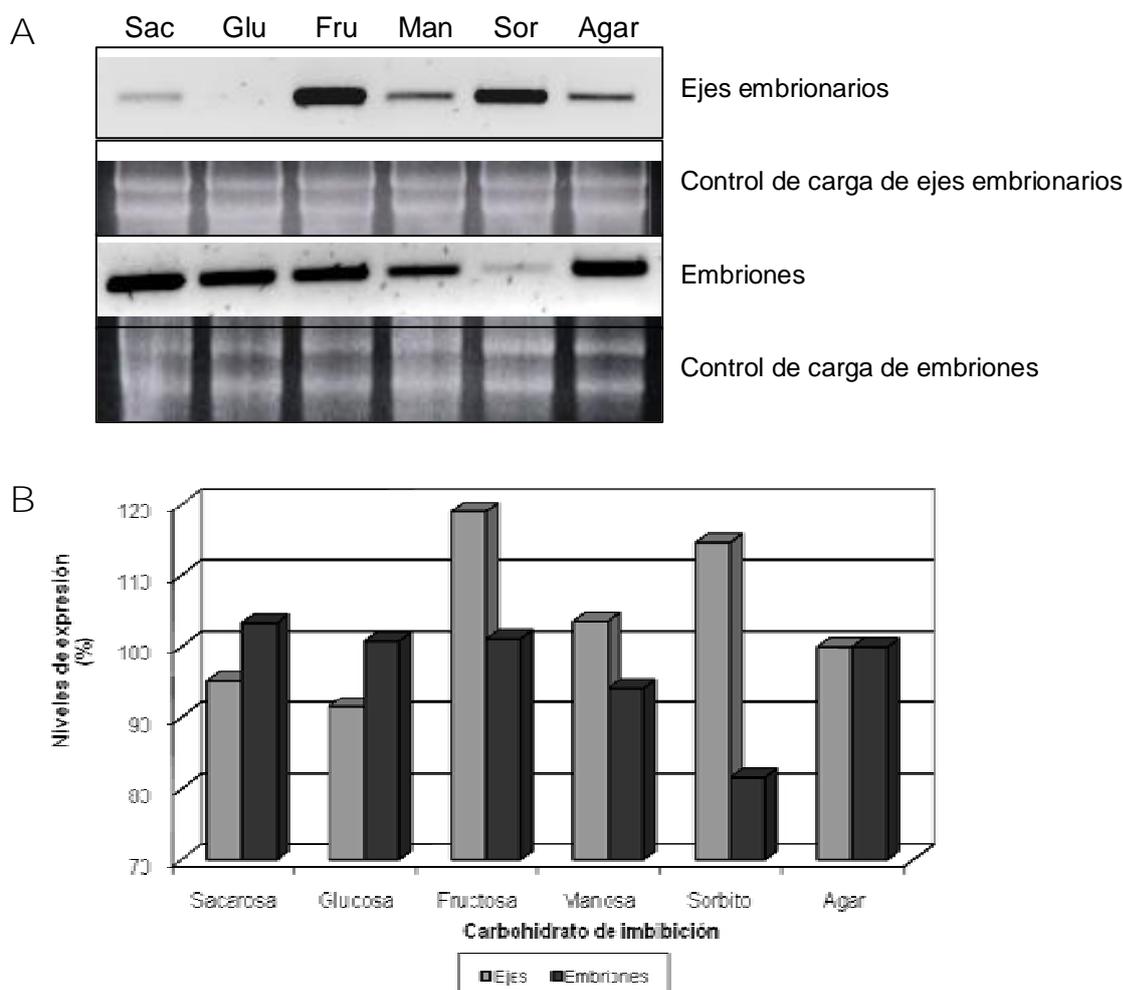


Figura 16. Patrón de expresión del transcrito del transportador de hexosas en ejes y embriones embebidos en diferentes carbohidratos. A) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en donde se visualizan los productos de PCR para el transportador de hexosas de ejes embrionarios y embriones de maíz germinados por 24 h en sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol 50 mM y manosa 5 mM, también se muestran los controles de que el RNA que se utilizó para la reacción de RT-PCR era similar en cada carril (control de carga). B) Densitometría de las bandas encontradas, se tomó como 100% la densitometría de la banda o zona de la muestra que fue embebida en Agar, tanto para ejes como para embriones. Estos experimentos fueron realizados por duplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

Por otra parte, los embriones de maíz mantienen un nivel alto de su transportador de hexosas cuando se embebe en cualquiera de los carbohidratos ensayados, excepto en sorbitol y manosa. Sorbitol a 50 mM, disminuye en un 20% el contenido de transportador de hexosas, el sorbitol fue incluido como un control de osmolaridad, pero resultó tener un efecto negativo en la expresión del

transportador de hexosas, aún cuando el porcentaje de germinación (80%) y peso húmedo acumulado no disminuyeron al crecer al embrión en sorbitol (Figura 17A).

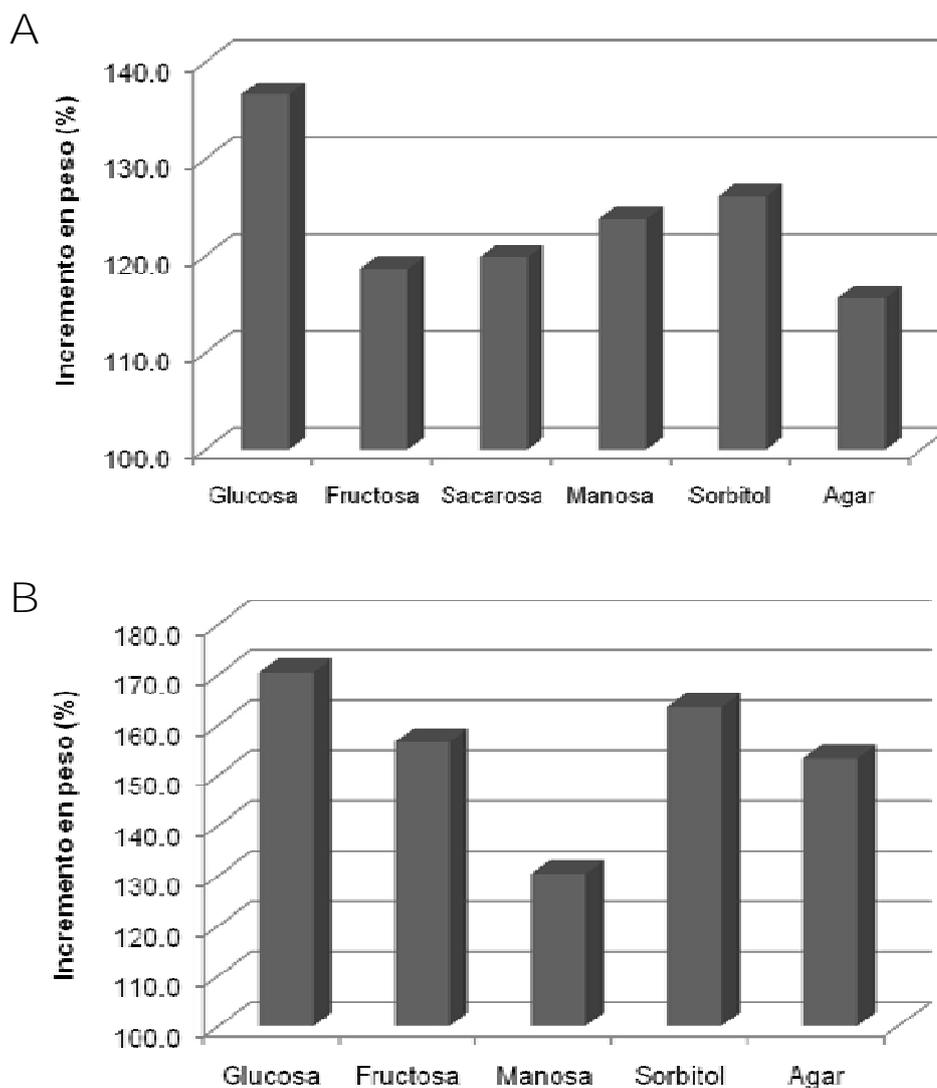


Figura 17. Efecto de la imbibición en carbohidratos sobre el peso en el tejido embrionario de maíz embebidos 24 h. A) embriones y B) ejes embrionarios. Los resultados se muestran como incremento en peso considerando como 100% el peso al tiempo 0. Estos experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

Efecto de la imbibición del tejido embrionario en carbohidratos en la expresión del transportador de sacarosa.

Con la finalidad de comparar el efecto de la imbibición en los carbohidratos en el nivel de expresión del transportador de hexosas con la del transportador de sacarosa, realizamos un experimento similar al anterior. Observamos que los ejes embrionarios no mostraron expresión del transportador de sacarosa, ni aún embebido en los diferentes carbohidratos, excepto en sorbitol. De nuevo, el sorbitol a pesar de que inicialmente lo incluimos como un control, parece estar ocasionando algún tipo de estrés, ya que induce la expresión del transportador de sacarosa (Figura 18), aún cuando tampoco afecta el peso húmedo del tejido germinado (Figura 17B).

En cuanto al efecto de los carbohidratos en la expresión del transportador de sacarosa en embriones, encontramos que sacarosa, glucosa, fructosa y manosa inducen su expresión, alrededor de un 50%, pero sorbitol sólo es ligeramente mayor al nivel que encontramos en agar (Figura 18). Es probable que sea importante siempre mantener niveles altos de transporte de sacarosa en los escutelos, ya que éste tejido tiene la capacidad de sintetizar sacarosa desde las 12 h de la germinación y además podría percibir tanto sacarosa externa como altos contenidos de glucosa, lo anterior cuando el almidón comience a ser movilizado del endospermo.

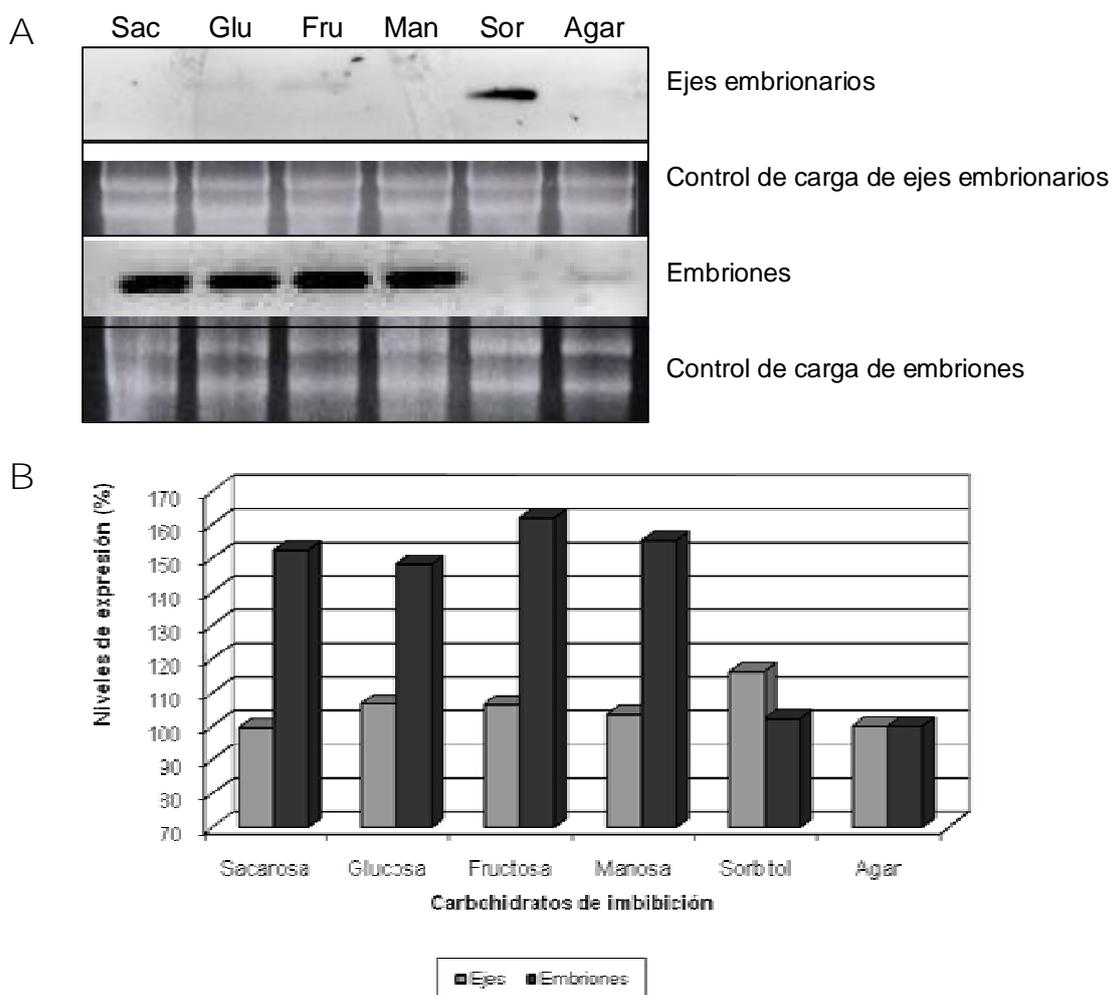


Figura 18. Comparación de la expresión del transcrito del transportador de sacarosa en ejes y embriones embebidos en diferentes carbohidratos. A) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en donde se visualizan los productos de PCR para el gene del transportador de sacarosa de ejes embrionarios y embriones de maíz germinados por 24 h en sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol 50 mM y manosa 5 mM, también se muestran los controles de que el RNA que se utilizó para la reacción de RT-PCR era similar en cada carril (control de carga). B) Densitometría de las bandas encontradas, se tomó como 100% la densitometría de la banda encontrada o la zona en donde se corrió la muestra de embriones embebidos en agar, tanto para ejes como para embriones. Estos experimentos fueron realizados por duplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

Efecto de la presencia de ABA en los niveles de RNAm para el transportador de hexosas.

La germinación de las semillas se sabe es alterada por carbohidratos y se ha propuesto que el mecanismo de percepción está relacionado con los niveles de ABA, ya que mutantes que son insensibles a sacarosa presentan mutaciones en la síntesis o percepción de ABA (Price *et al.*, 2003). Es por ello que medimos el efecto de ABA en la expresión de los transportadores de carbohidratos.

ABA, como otras hormonas de plantas, tiene múltiples funciones, aunque en general tiene un efecto inhibitor del crecimiento y del metabolismo. En la germinación de las semillas y su posterior crecimiento, la adición de ABA reduce el crecimiento (Srivastava, 2002). Encontramos que la imbibición del tejido embrionario en ABA produjo resultados distintos en la acumulación de peso húmedo. Los ejes embrionarios de maíz al ser embebidos en ABA redujeron la acumulación de peso húmedo a concentraciones de 10 o 30 μM , pero no así 50 μM , a pesar de que esperábamos que al irse incrementando la concentración externa de ABA, se produjera una reducción mayor en el peso húmedo del tejido el experimento (Figura 19A). Mientras que en los embriones, las tres concentraciones de ABA que se probaron redujeron la acumulación de peso húmedo del tejido en un 15% (Figura 19B).

Cuando se midió en estos tejidos el nivel de transportador de hexosas, se incrementó en presencia de ABA 10 y 50 μM ABA en ejes embrionarios, caso contrario en los embriones, en los cuales ABA redujo el contenido del transportador (Figura 20).

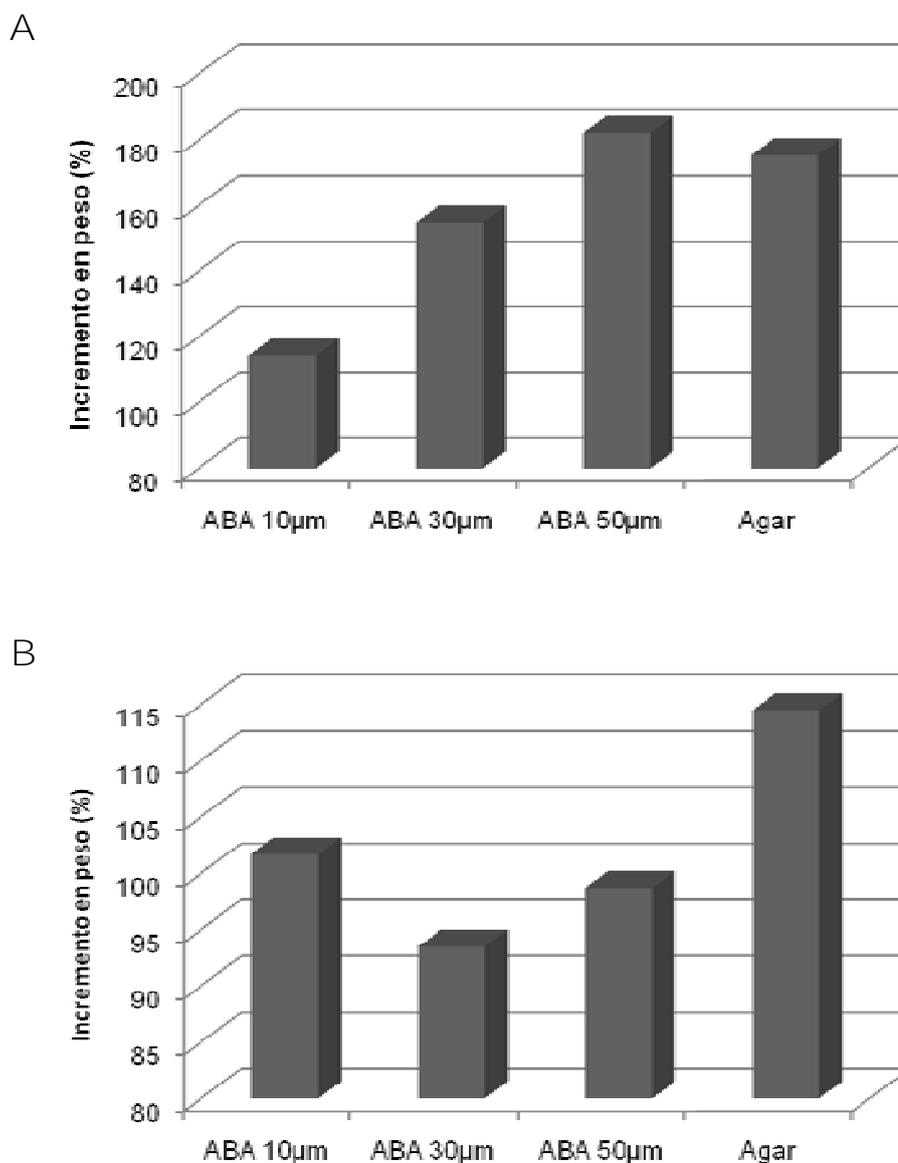


Figura 19. Efecto de la imbibición en carbohidratos sobre el peso de tejidos embrionarios de maíz embebidos 24 h. A) ejes y B) embriones. Los resultados se muestran como incremento en peso considerando como 100% el tejido seco. Estos experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

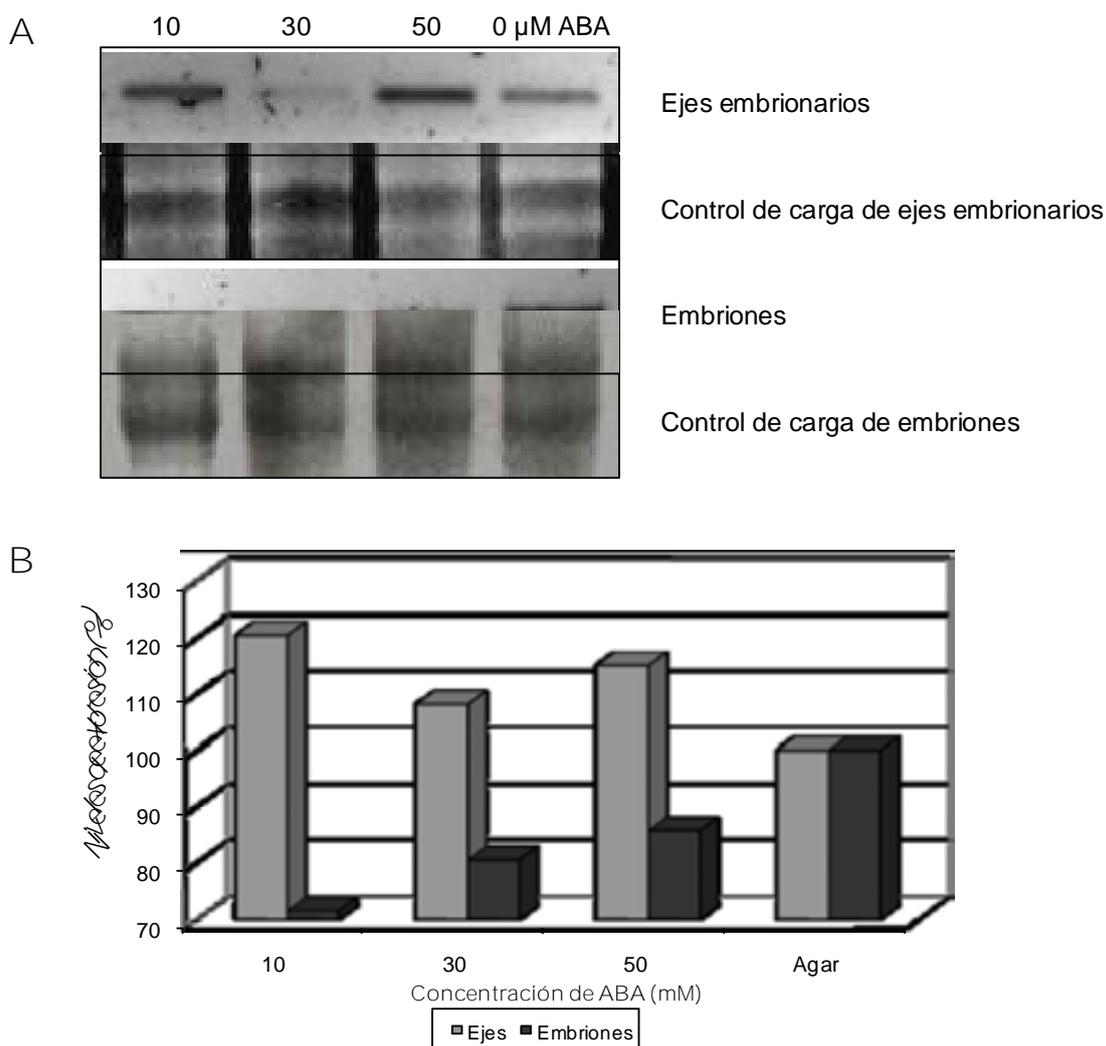


Figura 20. Comparación de la expresión del transcrito del transportador de hexosas en ejes y embriones embebidos en diferentes concentraciones de ABA. A) Geles de agarosa 2% de las reacciones de PCR de ejes embrionarios y embriones embebidos 24 h en ABA 10, 30 y 50 μ M con sus respectivos controles. B) Perfil densitométrico de las bandas obtenidas en A, tomando como 100 % los valores de densitometrías halladas en agar. Estos experimentos fueron realizados por duplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

Efecto de la presencia de ABA en los niveles de RNAm para el transportador de sacarosa.

En cuanto al transcrito del transportador de sacarosa encontramos que en el embrión se reduce su contenido cuando se expone el tejido en ABA (Figura 21). Lo anterior sugiere que una concentración baja de ABA es capaz de reducir la cantidad de transcrito para el transportador.

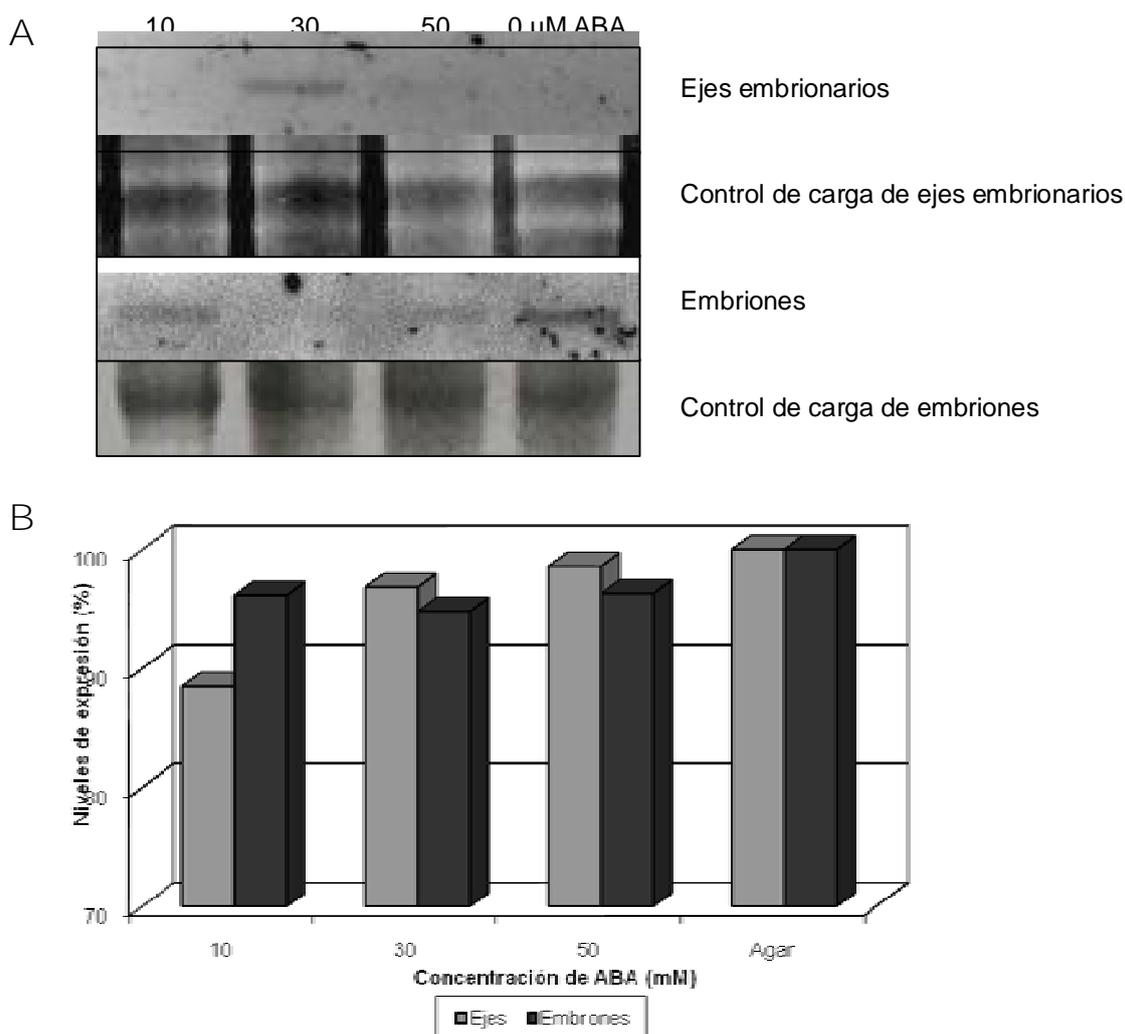


Figura 21. Comparación de la expresión del transportador de sacarosa en ejes y embriones embebidos en diferentes concentraciones de ABA. A) Geles de agarosa 2% de las reacciones de PCR de ejes embrionarios y embriones embebidos 24 h en ABA 10, 30 y 50 μ M con sus respectivos controles. B) Perfil densitométrico de las bandas obtenidas en A, tomando como 100 % los valores de densitometrías halladas en agar. Estos experimentos fueron realizados por duplicado, obteniéndose resultados semejantes para cada uno de los tejidos (ejes embrionarios y embriones), se muestran los resultados de cada uno de ellos.

DISCUSIÓN

Clonación de un transportador de hexosas específico de embrión de maíz.

En este trabajo se obtuvo una clona parcial de un transportador de hexosas que presenta su mayor expresión en el embrión de maíz, transportador al que llamamos ZmHT. La homología de ZmHT con los transportadores de hexosas es alta, presentando hasta un 96% de homología con uno descrito en la caña de azúcar. El análisis de su expresión en diferentes tejidos y durante la germinación mostró que la abundancia del transportador es mayor durante el proceso germinativo, aunque en el tejido seco también se encuentra presente. La clona fue obtenida a partir de una secuencia que se encuentra en el banco de genes EST, banco que fue construido para determinar genes que se encendían durante la embriogénesis temprana de la semilla de maíz. Es necesario realizar un análisis más detallado de su expresión durante la embriogénesis y hasta que la germinación comienza, e importante obtener la amplificación y clonación del transportador completo, para realizar estudios de expresión en sistemas heterólogos, en levadura o en ovocitos de *Xenopus* para determinar su especificidad por sustratos y Km.

En arroz se han encontrado y caracterizado 5 transportadores de hexosas OsMST1 al 5, de ellos OsMST4 se expresa en abundancia en embriones en desarrollo, con una localización específica en el parénquima vascular y la vena chalazal que cruza las células entre el tejido nuclear y el endospermo, los autores sugieren que es entonces importante el transportador para la formación de almidón en el endospermo en desarrollo (Wang *et al.*, 2007).

En trigo también se han encontrado mRNAs para el transportador de hexosas en semillas, utilizando una sonda de una secuencia conservada en la mayor parte de los transportadores de hexosas. La localización específica del transportador fue en la epidermis del escutelo (Aoki *et al.*, 2006), lo que sugiere que el transportador

se utilizará cuando la degradación de almidón comience y la glucosa producida sea tomada por el escutelo para convertirlo en sacarosa por el metabolismo del escutelo (Bewley y Black, 1994).

En maíz, sólo otro transportador de hexosas se encuentra reportado en el Genbank, mismo que se encontró del análisis de genes que se encienden cuando hay estrés de tipo salino. Esta secuencia de DNA que es 70% idéntica a la de ZmHT. Se conoce que en otras especies como *Arabidopsis* hay hasta 66 secuencias que se han clasificado como posibles transportadores de hexosas (Sauer, 2007), por lo que la presencia de más de un transportador de hexosas en maíz es altamente probable. La obtención de más de una clona para el transportador será posible, ya que la clona con la que ahora se cuenta puede ser usada como sonda en experimentos de réplica en Northern para obtener otras secuencias que presenten hibridación con la nuestra. Además, nos permitirá determinar cuáles son los transportadores que son más importantes durante el proceso germinativo, su localización en los tejidos embrionarios y su posible regulación.

Regulación de la expresión de los transportadores de hexosas y sacarosa.

Es ampliamente reconocido que los carbohidratos son capaces de ejercer modificaciones en la expresión de genes en el metabolismo de carbono (Rolland *et al.*, 2006) así como también de algunos transportadores (Lalonde *et al.*, 2004). En el caso del transportador de sacarosa observamos que glucosa y sacarosa son capaces de inducir la expresión del transportador en el escutelo del tejido, lo cual sugiere que la capacidad de transporte del escutelo es alta en tiempos en los que puede estar percibiendo un alto contenido de estos azúcares. La glucosa se sabe aumenta poco después de la emergencia de la radícula, ya que la movilización del almidón comienza en esa etapa (Bewley y Black, 2004). La llegada de glucosa al escutelo y su transporte se ha planteado que ocurre por un transporte de difusión facilitada y que el escutelo es capaz de convertir la glucosa en sacarosa para

posteriormente transportarla al eje embrionario en crecimiento. La sacarosa sabemos que comienza a sintetizarse a partir de las 24 h a partir de los lípidos de reserva, mientras que el eje embrionario no tiene esa capacidad (Martínez-Marcelo, 2008), por lo que la actividad del transportador de sacarosa en el escutelo es muy importante.

La ausencia de transportador de sacarosa en el eje embrionario fue lo que motivó este estudio, ya que era altamente probable que el eje embrionario contuviera al menos un transportador de hexosas. Encontramos que efectivamente, el transportador de hexosas se encuentra presente en el eje embrionario y que aumenta su expresión conforme la germinación avanza. Sin embargo, el transportador de hexosas es más abundante en el embrión completo, lo que sugiere que el transportador se encuentra en abundancia en el escutelo.

De lo anterior surgen más preguntas a resolver: ¿En qué células embrionarias se encuentra expresado el transportador de hexosas? ¿Qué tipo de transporte realiza el transportador, difusión o activo, ya que se ha propuesto que el escutelo contiene transporte difusional de glucosa? ¿Cuál es la especificidad del transportador?. Todas estas preguntas podrán ser resueltas en corto plazo al obtener una clona del gene completo para el transportador, o bien realizar experimentos de hibridación *in situ* con la clona actual, para detectar la localización específica del transportador.

Las localizaciones temporal y espacial podrían estar reguladas por los gradientes de carbohidratos que experimentan los tejidos embrionarios durante la germinación, por lo que sería importante determinarla. Experimentos en los que se embebió a los ejes o embriones en diferentes carbohidratos nos proporcionan información sobre la regulación del transportador de hexosas, ZmHT.

Glucosa y sacarosa a concentraciones de 50 mM produjeron una reducción de la cantidad de RNAm para ZmHT en el eje embrionario de maíz, resultado

inesperado, ya que a pesar de que el tejido dispone de un cantidad alta de hexosa o sacarosa que puede ser hidrolizada por sus invertasas apoplásticas (Martínez-Marcelo, 2008), esta no induce su expresión. Una posible explicación es que el transportador tenga una Km baja por glucosa y que a concentraciones altas del carbohidrato sea necesario utilizar un transportador de baja afinidad, tal y como ocurre en levadura, en donde la transcripción del transportador de baja afinidad se incrementa en concentraciones altas de glucosa y se reduce cuando ocurre lo opuesto (Rolland *et al.*, 2001).

Adicionalmente, el transportador se induce por fructosa y sorbitol. Sólo dos transportadores de hexosas se han encontrado que son capaces de transportar fructosa, ambos, AtSTP9 y AtSTP11, fueron encontrados en el desarrollo del polen de *Arabidopsis thaliana* (Scholtz-Starke *et al.*, 2003; Schneidereit *et al.*, 2005). Lo anterior resalta la importancia de determinar la especificidad del transportador ZmHT.

En este trabajo, sorbitol fue usado como un control de la osmolaridad del medio, pero tuvo efectos en la expresión del transportador de hexosas y también del de sacarosa. Incrementó el nivel de ambos transportadores en los ejes y lo redujo en los embriones. En *Arabidopsis* se ha encontrado que el estrés por deshidratación o por tratamiento con frío induce la expresión de ERD6, del inglés “early response to dehydration (Kiyosue *et al.*, 1998). El análisis de la secuencia de ese gene demostró que es homólogo a un transportador de azúcares con 12 dominios transmembranales y cae dentro del grupo 7 de la clasificación de transportadores de hexosas propuesta por Sauer (2007). Con los resultados obtenidos con el sorbitol no podemos asegurar que este transportador sea un transportador del grupo 7, pero sugiere que la regulación coordinada de los transportadores de carbohidratos en los tejidos embrionarios del maíz puede ocurrir no sólo por la presencia de carbohidratos, sino también por los cambios en la presión de turgor que son propios del paso del estado seco hidratado. Sugerencia que tendríamos que probar experimentalmente modificando de manera controlada la presión

osmótica del medio y analizando la expresión de los transportadores, así como también el análisis de la expresión de los transportadores durante la embriogénesis. Esto nos ayudaría a postular un efecto de la deshidratación o hidratación en la regulación del contenido de transcrito para los transportadores de carbohidratos.

Adicionalmente, en algunos transportadores se han encontrado elementos cis en las regiones promotoras del DNA, identificados como elementos de respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico. En los transportadores de azúcares y en particular de hexosas, como en VvHT1, AtSTP2, AtSTP3, AtSTP4, elementos que responden a auxinas y ácido salicílico, de éstos, uno tiene un elemento de respuesta a ácido abscísico y a tres elicitores (Delrot *et al.*, 2001).

Se conoce que ABA incrementa el nivel de tolerancia de las plantas a varios tipos de estrés causados por factores tanto ambientales como bióticos. Cuando las plantas pasan por periodos de estrés por agua o deshidratación, se incrementan rápidamente los niveles de ABA (Srivastava, 2002). Lo anterior aunado a que el sorbitol modificaba la expresión de los transportadores de carbohidratos, nos llevó a investigar que ocurría en cuanto al nivel de expresión del transportador de hexosas, si al medio de crecimiento de los embriones se les adicionaba ABA. La presencia de ABA en el medio de imbibición produjo una reducción en el transportador de hexosas en los embriones a niveles muy similares a los que encontramos en la semilla seca, lo que sugiere que ZmHT podría contener un elemento de respuesta a ABA, que también sugiere el hecho de que el transportador se reduzca en presencia de sorbitol, es probable que tanto la concentración de ABA como la de agua y carbohidratos modifiquen la expresión del transportador. En los ejes, la respuesta es opuesta, la adición de ABA incrementa el nivel de ZmHT, que también coincide con el aumento en la expresión del transportador de sacarosa. Para poder explicar los resultados necesitamos conocer la concentración de los carbohidratos en presencia de ABA y determinar si un aumento en ambos transportadores se debe a que la

concentración de carbohidratos se incrementó o a que perdieron la sensibilidad por ABA. Se conoce que durante la germinación el aumento en la concentración externa de carbohidratos a 167 mM incrementa la concentración de ABA y se inhibe la germinación (Prince *et al.*, 2003). Postulamos que es probable que ABA esté regulando la concentración de carbohidratos a través de modificar la expresión de enzimas del metabolismo que ayudan a la movilización de carbohidratos. En la literatura se ha encontrado que ABA afecta de manera diferencial la movilización de lípidos, disminuye la movilización de triacilgliceroles en el embrión de *Arabidopsis thaliana*, pero no afecta la movilización de éstos ni tampoco del almidón en el endospermo o el tejido de reserva de la semilla (Penfield *et al.*, 2004). Por lo que los genes para los transportadores de carbohidratos también se ven modificados.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo una clona con una secuencia parcial de un gene correspondiente a un transportador de hexosas específico de embriones de maíz, al que denominamos ZmHT.
2. En ejes embrionarios se caracterizó la expresión del transportador. En el eje seco aparece el RNAm para ZmHT y se incrementa conforme avanza la germinación. Su expresión se incrementa cuando el tejido es embebido en fructosa y sorbitol y se reduce en presencia de sacarosa y glucosa. Estos resultados sugieren que la secuencia aislada que codifica al transcrito en cuestión probablemente corresponda a un transportador de fructosa regulado por efecto osmótico o ABA.
3. En embriones, el transcrito ZmHT también se encuentra en el tiempo 0 de imbibición, pero en mayor cantidad que en el eje embrionario. Se incrementa conforme avanza la germinación. Mientras que el transportador de hexosas se incrementa cuando se expone el tejido a sacarosa, glucosa y fructosa pero disminuye con sorbitol. Nuevamente ZmHT se regula por sorbitol, pero en embriones, negativamente, una respuesta similar a la que ABA produce en la expresión del transportador de hexosas.
4. Se confirmó que los ejes embrionarios no contienen RNAm para el transportador de sacarosa y que el transportador se induce por glucosa y sacarosa en los embriones. Sin embargo, ABA reduce los niveles de transportador de manera similar al efecto que produce el sorbitol.
5. Es posible que haya más transportadores de hexosas en el tejido embrionario, lo proponemos ya que la reducción del RNAm al embeber el tejido en 50 mM de glucosa y su aumento al ser embebido en 50 mM de fructosa, lo cual sugiere ZmHT es un transportador de alta afinidad por glucosa e importante para el transporte de fructosa. Asimismo en la literatura se encuentran descritas que todas las especies de plantas examinadas contienen múltiples formas de transportador.

PERSPECTIVAS

- Clonar el transportador de hexosas completo, para realizar su expresión en sistemas heterólogos y determinar su especificidad por sustratos y Km.
- Analizar la expresión de ZmHT durante la embriogénesis.
- Determinar si hay más transportadores de hexosas y determinar cuáles son más abundantes durante la germinación, así como su localización.
- Analizar la expresión de los transportadores modificando de manera controlada la presión osmótica del medio.
- Estudiar la expresión de ZmHT en mezclas de carbohidratos y ABA y determinar si la expresión de los transportadores en presencia de ABA se debe a la concentración de los carbohidratos o a que perdieron la sensibilidad por ABA, o al efecto de ABA en la movilización de carbohidratos o lípidos.

APÉNDICE

Medio LB

Disolver en 1 litro de agua 10 g de NaCl, 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y agregar 1mL de NaOH 2.5N. Esterilizar por 20 min.

Agar-LB

El medio agar-LB está compuesto por 1.5% de agar y 2.5% de medio LB. Esterilizar por 20 min y cuando esté a TA, verter en cajas Petri, 30 mL por caja aproximadamente. Dejar enfriar y almacenar a 4 °C.

1 caja Petri con medio agar-LB

Mezclar 20µL X-Gal (40mg/mL), 1.6 µL IPTG (500 mg/mL), 22.5 µL de ampicilina (100 mg/mL). Tomar esta mezcla y depositar en el centro de la caja con medio agar-LB y asperjar. Dejar que se absorba, al menos 10 min.

IMPORTANTE:

- Todo el material empleado para RNA deberá ser esterilizado por 1 h.
- Las soluciones empleadas para RNA deben ser preparadas con H₂O-DEPC

Buffer de carga de muestra 3X para geles de agarosa

Preparar solución de glicerol al 60% y agregar 1mg/mL de azul de bromofenol y 1 mg/mL de xylencianol. Generalmentes se tiene uno para correr DNA y otro para RNA.

TAE 1X

La solución TAE 1X contiene 40 mM de Tris, 20 mM de acetato de sodio y 1 mM EDTA. Si el buffer será empleado para muestras de RNA deberá prepararse con H₂O-DEPC y esterilizar por 1 h.

SOLUCIÓN PARA LAVADO DE CÁMARA ELECTROFORESIS

Se hace una solución al 10% de SDS con H₂O-DEPC estéril.

H₂O-DEPC

Por cada litro de agua agregar 1 mL de DEPC (SIGMA) y dejar en agitación por toda la noche. Esterilizar por 1 h.

Glicerol para conservación de clonas

En un tubo eppendorf estéril se depositan 700 µL del cultivo transformado y 300 µL de un stock de glicerol estéril al 50%. Se cierra bien el tubo y se congela en N₂ líquido. Se almacena a -70 °C. NOTA IMPORTANTE: Para medir el volumen correcto de glicerol humedezca la punta de micropipeta con agua estéril y posteriormente tome el glicerol.

REFERENCIAS

- Aoki N, Hiroshi T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru, K, Oshugi R. 1999. Molecular cloning and expression of a gene of sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.) Plant Cell Physiol 40: 1072-1078.
- Aoki N, Scofield GN Wang X-D, Offler CE, Patrick JW, Furbank RT. 2006. Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. Plant Physiol 141, 1255-1263.
- Aoki N, Whitfeld P, Hoeren F, Scofield G, Newell K, Patrick J, Offler C, Clarke B, Rahman S, Furbank RT. 2002. Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. Plant Mol Biol 50: 453–462.
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S. 2003. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gen in grape. Plant Physiol 131: 326-334.
- Attucci S Carde J P, Raymond P Saint-Ges V, Spiteri A, Praded A. 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. Plant Physiol 95: 390-398.
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J M, Frommer W B. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. Plant Cell 12: 1153–1164
- Bewley J D y Black M. 1994. Physiology and biochemistry of seeds. VI. Development, germination and growth. Springer-Verlag. 147-151, 177.
- Borstlap A C, Schuurmans J A M J. 2004. Sucrose transport into plasma membrane vesicles from tobacco leaves by H⁺-symport or counter exchange does not display a linear component. J Membrane Biol 198: 31–42.
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. Genome Biol. 3: rev 1002.1-1002.5

-
-
- Bürkle, L, Hibberd, J M, Quick, W P , Kühn, C, Hirner, B, Frommer, W B. 1998. The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol* 118: 59–68
- Bush, D R. 1993. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Ann. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 513-542.
- Büttner M. 2007. The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 581: 2318-2324.
- Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1465: 263-274.
- Büttner M, Tuernit E, Baier K, Scholz-Starke J, Sontheim M, Lauterbach C, Huss VAR, Sauer N. 2000. AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H⁺ symporter of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 23: 175-184.
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* 280: 21437–21443.
- Cheng W H, Chourney P S. 1999. Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theor Appl Genet* 98: 485-495.
- Chiou T, Bush D R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4784-4788.
- Devlin T M. 1999. *Bioquímica*. 4^a edición. España: Editorial Reverté, 130.
- Delrot S, Atanassova R, Gomès E, Coutos- Thévenot P. 2001. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Sci* 161, 391-404.
- Dickinson C D, Altabella T, Chrispeels M J. 1991. Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. *Plant Physiol* 95: 420-425.

- Dure L S. 1960. Gross nutritional contributions of maize endosperm and scutellum to germination growth of maize axis. *Plant Physiol* 35: 919-925.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schenider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG. 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* 141: 196-207.
- Gahrtz M, Schmeltzer E, Stolz J, Sauer N. 1996. Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L., is induced during seed development. *Plant J* 9: 93-100.
- Gahrtz M, Stolz J, Sauer N. 1994. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J* 6: 697-706
- Grass R, Robl I, Opekarova M, Tanner W. 2000. The C-terminal tetrapeptide HWFW of the Chlorella HUP1 hexose/H⁺ symporter is essential for full activity and an α -helical structure of the C-terminus. *FEBS Lett* 468: 225-230.
- Greaves-Fernández N. 2001. Estudio de la expresión del transportador de sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Harrington G N, Nussbaumer Y, Wang X D, Tegeder M, Franceschi V R., Frommer W B, Patrick J W, Offler C E. 1997. Spatial and temporal expression of sucrose transport-related genes in developing cotyledon of *Vicia faba* L. *Protoplasma* 200: 35-50.
- Harrison M. 1996. A sugar transporter from *Medicago trunculata*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J* 9: 491-503.
- Heineke D, Sonnewald U, Büssis D, Günter G, Leidreiter K, Wilke I, Raschke K, Willmitzer L, Heldt HW. 1992. Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. *Plant Physiol* 100: 301-308.

-
-
- 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 Physiol* 38: 1389-1396.
- Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Schinozaki K, Shinozaki K. 1998. ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induce gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter. *Biochim Biophys Acta* 1370, 187-191.
- Koch K. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Mol Biol* 47: 509-540.
- Kühn C, Barker L, Bürkle L, Frommer W B. 1999. Update on sucrose transporter in higher plants. *J Exp Bot* 50: 935-953.
- Kühn C, Franceschi V R, Schulz A, Lemoine R, Frommer W B. 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275: 1298–1300
- Laloi M, Delrot S, M'Batchi B. 1993. Characterization of sugar efflux from sugar beet leaf plasma membrane vesicles. *Plant Physiol Biochem* 31: 731-741.
- Lalonde S, Wipf D, Frommer W B. 2004. Transport mechanism for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* 55: 341-372.
- Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. 1995. *Principios de Bioquímica*, 2ª edición. España: Ediciones Omega. 286-290, 557-558.
- Leszek P, Vincent D. 2002. *Zea mays* (maize, corn). *Encyclopedia of Life Sciences* 1-7.
- Lim J D, Cho JII, Park Y-II, Hahn T-R, Choi S-B, Jeon J-S. 2006. Sucrose transport from source to sink seeds in rice. *Physiol Plant* 126: 572-584.
- Martínez-Marcelo V. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

-
-
- 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 Physiol* 124: 85-94.
- Noiraud, N, Delrot S, Lemoine R. 2000. The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol* 122: 1447-1455.
- Özcan S, Dover J, Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17: 2566-25673.
- Pao S, Paulsen I, Saier M, JR. 1998. Major facilitator superfamily. *Microb Mol Biol Rev* 62: 1-34.
- Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Larson TR, Graham IA. 2004. Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires phosphoenolpyruvate carboxykinase1. *Plant Cell* 16, 2705-2718.
- Prince J, Li TC, Kang SG, Na JK, Jang J-C. 2003. Mechanism of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiol* 132, 1424-1438.
- Ramírez-Verdejo S. 2007. Detección *in situ* de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación por carbohidratos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Riesmeier J W, Hirner B, Frommer W B. 1993. Expression of source transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. *Plant Cell* 5: 1591-1598.
- Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* 11: 4705-4713.

-
-
- Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. 1994. Anti-sense repression of the sucrose transporter affects assimilate partitioning in transgenic potato plants. *EMBO J* 13: 1-7
- Rolland F, Baena-González E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plantas: Conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709.
- Rolland F, Winderickx J, Johan MT. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26: 310-317.
- Schneidereit A, Scholtz-Starke J, Sauer N, Büttner M. 2005. AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Plant* 221, 48-55.
- Scholtz-Starke J, Büttner M, Sauer N. 2003. AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide transporter in pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 131: 70-77.
- Sanchez J E, Dinkova T D, Reyes C H. 2005. Mecanismos de control traduccional en la germinación de maíz. Mensaje Bioquímico vol. XXIX. http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico/Mensaje_Bioq05v29p001_Estela-Sanchez_03.pdf
- Sauer N, Friedländer K, Gräml-Wicke U. 1990. Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 8: 3045-3050.
- Sauer N, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*. Expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* 6: 67–77.
- Sauer N, Tanner W. 1989. The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Lett* 259: 43-46.
- Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* 581: 2309–2317
- Scofield G, Hirose T, Gaudron J, Upadhyaya N, Ohsugi R, Furbank R T. 2002. Antisense suppression of the rice sucrose transporter gene, OsSUT1, leads to

- impaired grain filling and germination but does not affect photosynthesis. *Func Plant Biol* 29: 815-826.
- Shakya R, Sturm A. 1998. Characterization of source- and sink specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiol* 118: 1473–1480.
- Sherson S M, Hemmann G, Wallace G, Forbes S, Germain V, Stadler R, Bechtold N, Sauer N, Smith S M. 2000. Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of Arabidopsis seeds and seedlings to sugar. *Plant J* 24: 849-857.
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N. 1995. Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7: 1545–1554.
- Stadler R, Büttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson S M, Smith S M, Sauer N. 2003. Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis. *Plant Physiol* 133: 528-537.
- Stadler R, Sauer N. 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot Acta* 109: 299–306.
- Stryer R C, Cantliffe D J. 1984. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiol* 76: 196-200.
- Takeda T, Toyofuku K, Matsukura C, Yamaguchi J. 2001. Sugar transporters involved in flowering and grain development of rice. *J Plant Physiol* 158: 465-470.
- Tang Guo-Qing, Lüscher M, Sturm A. 1999. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11: 177-189.
- Tanner W, Caspari T. 1996. Membrane transport carriers. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 47: 595-626.

-
-
- Tegeder M, Wang XD, Frommer WB, Offler CE, Patrick JW. 1999. Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J* 18: 151-161.
- Tomás-Cobos L, Casadomé L, Mas G, Sanz P, Posas F. 2004. Expression of the HXT1 low affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signaling pathways. *J Biol Chem* 279: 22010-22019.
- Tuernit E, Schmid J, Epple P, Illig J and Sauer N. 1996. The sink specific and stress-related Arabidopsis STP4 gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors and pathogen challenge. *Plant Cell* 8:2169-2182.
- Turgeon R. 2006. Phloem loading: How leaves gain their independence. *Bioscience* 56: 15-24
- Turgeon R, Beebe D U. 1991. The evidence for symplastic phloem loading. *Plant Physiol* 96: 349-354.
- Vaughn M, Harrington G N, Bush D R. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 10876-10880.
- Von-Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L. 1990. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to inhibition of sucrose export, accumulation of carbohydrates and inhibition of photosynthesis, and strongly influences growth and habitus of transgenic tobacco plants. *EMBO J* 9: 3033-3044.
- Wang Y, Xu H, Wei X, Chai C, Xiao Y, Zhang Y, Chen B, Xiao G, Ouwerkerk PBF, Wang M, Zhu Z. 2007. Molecular cloning and expression analysis of a monosaccharide transporter gene osMST4 from rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Mol Biol* 65, 439-451.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in faba bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908.

-
-
- Weig A, Komor E. 1996. An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedling of *Ricinus communis* L. J. Plant Physiol 147: 685-690.
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer W B, Ward J M. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. Plant Cell 12: 1345-1355.
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U. 2000. Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization for two transporters and implications for seed development and starch accumulation. Plant J 21: 455-467.
- Will A, Caspari T, Tanner W. 1994. Km mutants of the *Chlorella* monosaccharide/H⁺ cotransporter randomly generated by PCR. Proc Natl Acad Sci USA 91: 10163-10167.
- Will A, Tanner W. 1996. Importance of the first external loop for substrate recognition as revealed by chimeric *Chlorella* monosaccharide/H⁺ transporters. FEBS Lett 381: 127-130.
- Williams, L E, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants-a diversity of roles and complex regulation. Trends Plant Sci 5: 283-290
- Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Referencias de internet:

A) <http://cursweb.educadis.uson.mx/ecanseco/paginas-interiores/sala-de-discusion.htm>

B) http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema6/6_8embrion.htm

*Es el final de un libro que se hizo
con ansiedades a tristeza abierta
y con convalecientes utopías
dilemas entre el frío y la humildad
y el nacimiento de los entusiasmos
tal vez con la alegría inesperada
que apareció en el filo del amor
si bien se mira es / después de todo /
sólo una crónica de franjas mínimas
que en su momento fueron esenciales.*

Mario Benedetti