



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

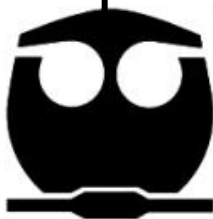
“EFECTO DE *Fusarium verticillioides* EN EL
TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS EN LA
GERMINACIÓN DE TEJIDO EMBRIONARIO DE MAÍZ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

VIRIDIANA ZURITA VILLEGAS



MÉXICO, D. F.

2011



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 Henssen |
| Vocal: | M.en C. Raúl Genaro Aguilar Caballero |
| Secretario: | Dra. Sobeida Sánchez Nieto |
| 1er. Suplente | Dra. Nora Andrea Gutiérrez Najera |
| 2do. Suplente: | M en C. Laura Carmona Salazar |

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Asesor

Viridiana Zurita Villegas
Sustentante



AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los apoyos recibidos para la realización de este proyecto a:

- PAPIIT DGAPA, UNAM con los proyectos IN203708 y IN220511
- CONACYT 90021

Se agradece también a las siguientes personas por su apoyo:

Al Dr. Javier Plasencia por proporcionarnos la cepa del hongo *Fusarium verticillioides* para el desarrollo del presente proyecto.

A la Q. Laurel Elidé Fabila Ibarra por su apoyo y supervisión en el manejo del contador de centelleo líquido.

Por último agradezco a mi amada Universidad Nacional Autónoma de México y a mi querida Facultad de Química por cobijarme todos estos años, porque en ellas viví muchas experiencias, conocí muy buenos profesores y amigos que me formaron tanto académicamente como personalmente. Gracias.



DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a cada una de las personas que nombraré, porque cada una ha contribuido de alguna u otra forma a ser la persona que soy:

A mis padres Samuel Zurita y Sonia Villegas, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo y que sin ellos no hubiera logrado estar donde estoy ni ser quien soy. Por toda la confianza que siempre depositaron en mí, por consentirme, por su comprensión, cuidados, cariño y por el lindo ambiente familiar en el que he crecido. Gracias porque nunca me ha faltado nada en esta vida.

A mi hermano Samuel, porque desde niño siempre has tenido esa gentiliza y ternura conmigo. Gracias simplemente por crecer a mi lado y por todos los ratos divertidos que pasamos y por los pleitos también (“si los hermanos no se pelean es porque no se quieren”, jajaja), por esa complicidad de hermanos (no le cuentes a mamá, jajaja) ... de verdad que mejor hermano no me pudo tocar.

A mis abuelos, por ser un soporte en la familia; a mi abuelita Rosa Galván por cuidarme desde pequeña, acogerme en su casa día con día y por todos aquellos consejos que me ha brindado siempre.

A mis tíos Eduardo, Raúl, Marcos, Eliseo, Froylan, David y Gerardo porque siempre los he visto como un ejemplo a seguir. A mis tías Emilia, Vico y Paty por su cariño, cuidados y paciencia conmigo que yo sé no es sencillo, jajajaja. A mis tías Irma, Verónica, Eva, Elsa, Belem, Luisa, Mary y Ale por su cariño, consejos y buenos momentos.

A mis primos Misael, Arlette, Montse, Gerardo, Israel, Rosario, Alex, Ana, Blanca, Rosy y Froylan, porque con ellos tuve una bonita infancia, especialmente en las navidades. A Luis Roberto, Luis Eduardo, Claudio, Bárbara y Fabiola por todas las anécdotas acumuladas y porque hasta la fecha me divierto mucho con todos y a



falta de más hermanos ustedes lo han sido para mí. A Beto, Fernanda y a mis primos los más pequeños Diego, Dany, Emiliano y Moni por todas sus ocurrencias y travesuras. A mi sobrina Grecia que desde que era un bebé la he querido mucho y a mis nuevas sobrinitas.

A la mejor Dra. de todas, a la Dra. Sobeida por su apoyo durante mi estancia en su laboratorio y su confianza en mí, lo logre Dra.!!! Gracias no solo por ser una buena asesora, sino también por ser una gran persona, por todos los consejos dados y por dedicarme tiempo para escucharme =).

A mis amigos y hermanos de la secu, con los que he crecido toda mi adolescencia (y lo seguimos haciendo chicos!!!). A Nat porque siempre me hace reír y a pesar de la distancia siempre está allí; a Tona por ese año sabático que nos tomamos y por confiar en mí; a Sofi y Gaby por su apoyo (gracias por defenderme de los molestones, jajaja); y finalmente a mis dos amigos-amores Mark y Mat, por ser más que hermanos para mí, porque los quiero como no tienen idea. A Mark porque vivimos tantas cosas juntos, desde risas hasta lágrimas, no sé cómo agradecerle tantos buenos momentos, sin duda mi mejor amigo. A Mat porque a pesar de todo siempre nos hemos entendido, porque en un tiempo fuiste mi mayor apoyo y sabes que siempre tendrás un lugar especial en mi corazóncito, te quiero.

A mis mejores amigas. A Lau y Piby por todas las ocurrencias vividas, me acuerdo y me hacen sentir bien =), gracias a lo diferente que somos nuestra amistad ha crecido y sé que siempre podré confiar en ustedes chicas, las quiero!!! A Susy porque... pues porque simplemente es de esas amigas a las que uno llega a querer y estimar mucho. A Amanda por tan buenas charlas y momentos, la amiga más diferente que he conocido y la que me enseñó que pese a la distancia siempre está allí apoyándome =).

A mis amigos de la Facultad de Química. Peter tan buen apoyo moral y consejos nos hemos dado; Sujhey, Sam y Paos, un excelente apoyo para mí en todos los



sentidos y qué decir de las risas (arriba Samzup!). Gracias por compartir tantas noches de desvelo con las prácticas y trabajos. A hija Torta (Karla) y Rojo porque ambos me hacen pasar buenos ratos, sobre todo cuando hay que reír, jajaja. A “los hospicio” (Macedo, Lalo, Diana Leticia, Diana Betsabé, Joel, Bochm, Angie, Gaby Gachuz, Luis, Vivi y Tomás) por ese compañerismo que los caracteriza y permitirme ser parte del grupo. Y finalmente a los amigos que fui conociendo y he llegado a estimar: Diana Rivera, Marianita y Ady.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 114. A Fer, un gran amigo que me enseñó a no juzgar antes de conocer, ahora sé que me caes super bien y te estimo mucho pese a tus observaciones diarias, jajajajaaja. A Viri Jefa por las confesiones realizadas mientras esperábamos a que nos salieran los experimentos, jajajaja, tkm tocashi!!! al igual que a mi otra tochashi Viri Lu por su apoyo. A Silvia por sus asesorías y buenos momentos. A Paos de nuevo por su confianza, a Juan Ma, Mariel y Sam (de nuevo) por hacer de mi estancia en el laboratorio un lugar agradable.

A todos los amigos que conocí en el camino y que en su tiempo me llenaron de experiencias. Cito algunos de ellos: “amigui” Rouse (la prepa no hubiera sido lo mismo sin ti), Cacho, Mabel y Angie.

Y por qué no??? dedicada a mí, por todo mi esfuerzo, noches de desvelo, días de andar corriendo, depresiones y alegrías post-experimento, por todos los momentos que no pude estar con mi familia y amigos por estudiar o hacer un trabajo. Gracias a todos por su paciencia y tiempo dedicado a mí. Los quiero!!!

Y para cerrar con broche de oro a Carlos, por todo su apoyo incondicional a lo largo de la carrera y por aguantar todas mis paranoias día con día, por hacerme reír, por compartir su tiempo conmigo, por los viajes, por las comidas juntos, por..... no tengo más palabras para ti, solo que te amo.



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 4 |
| II. 1 Transporte a través de las membranas celulares..... | 4 |
| II. 2 Tipos de transporte: Clasificación energética | 4 |
| II.2.1 Transporte pasivo | 4 |
| II.2.2 Transporte activo | 6 |
| II.3 Transporte de carbohidratos en plantas..... | 8 |
| II.3.1 Sistema vascular en plantas | 8 |
| II.3.2 Modelos de llenado del floema | 11 |
| II.4 Transportadores de carbohidratos en plantas | 14 |
| II.4.1 Transportadores de sacarosa | 15 |
| II.4.2 Transportadores de monosacáridos | 17 |
| II.5 Regulación del transporte de carbohidratos | 18 |
| II.5.1 Regulación por compuestos internos de la planta: hormonas y carbohidratos..... | 19 |
| II.5.2 Modulación durante el estrés salino e hídrico | 20 |
| II.5.3 Modulación durante el estrés biótico..... | 21 |
| II.6 El maíz..... | 22 |
| II.7 <i>Fusarium verticillioides</i> | 24 |
| II.7.1 Características generales del hongo..... | 24 |
| II.7.2 Micotoxinas producidas por <i>Fusarium verticillioides</i> | 25 |
| II.7.3 Infección del maíz por parte de <i>Fusarium verticillioides</i> | 27 |
| III. ANTECEDENTES INMEDIATOS | 30 |
| IV. HIPÓTESIS | 33 |
| V. OBJETIVO GENERAL | 34 |
| VI. OBJETIVOS PARTICULARES | 34 |



| | |
|--|----|
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| VII.1 Material biológico..... | 36 |
| VII.2 Germinación de embriones y ejes embrionarios de maíz..... | 36 |
| VII.3 Obtención del concentrado de conidios y calibración del inóculo del patógeno <i>Fusarium verticillioides</i> | 36 |
| VII.4 Estandarización de la metodología para la toma de carbohidratos | 37 |
| VII.5 Determinación de la toma de carbohidratos..... | 41 |
| VII.6 Determinación del tipo de transporte mediante el uso de inhibidores y protonóforos. | 42 |
| VIII. RESULTADOS | 44 |
| VIII.1 Evaluación de la capacidad de transporte de carbohidratos de tejido embrionario de maíz | 44 |
| VIII.2 Evaluación de la actividad de transporte de carbohidratos de ejes embrionarios y embriones maduros de maíz a lo largo de la germinación | 45 |
| VIII.3 Determinación del tipo de transporte mediante el uso de inhibidores | 47 |
| VIII.4 Medición del efecto de la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> en la toma de glucosa | 50 |
| VIII.5 Medición del efecto de la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> en la toma de sacarosa | 52 |
| IX. DISCUSIÓN | 55 |
| IX.1 Evaluación de la capacidad de transporte de carbohidratos de tejido embrionario de maíz. | 55 |
| IX.2 Evaluación de la actividad de transporte de carbohidratos de ejes embrionarios y embriones maduros de maíz a lo largo de la germinación. | 58 |
| IX.2.1 Toma de glucosa..... | 58 |
| IX.2.2 Toma de sacarosa..... | 60 |
| IX.3 Medición del efecto de la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> en la toma de glucosa y sacarosa. | 65 |
| X. CONCLUSIONES | 69 |
| XI. PERSPECTIVAS | 70 |
| XII. ANEXOS | 71 |



| | |
|--|-----------|
| XII.1 Anexo I. Familias integrantes de la Familia de Facilitadores Mayores (MFS) | 71 |
| XII.2 Anexo II: Técnica de centelleo líquido y calibración del equipo | 73 |
| XIII.3 Anexo III: Reactivos y soluciones | 75 |
| XII.4 Anexo IV: Cálculos | 78 |
| XIII. REFERENCIAS | 83 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Tipos de transporte de acuerdo a su clasificación energética..... | 5 |
| Figura 2. Diferencias entre los sistemas de co-transporte y el transporte facilitado por los transportadores en uniporte..... | 6 |
| Figura 3. Representación esquemática del transporte de azúcares de los tejidos fuente hacia los tejidos demanda..... | 10 |
| Figura 4. Transporte de sacarosa en el floema en plantas.. | 15 |
| Figura 5. Topologías de las subfamilias de transportadores de sacarosa..... | 16 |
| Figura 6. Síntomas de infección de maíz infectado con <i>Fusarium</i> | 23 |
| Figura 7. Estructura química de las fumosinas de la serie B producidas por <i>Fusarium verticillioides</i> | 26 |
| Figura 8. Esquema general de trabajo. | 35 |
| Figura 9. Efecto de la cantidad de [¹⁴ C glucosa] añadida en la toma de glucosa de los embriones de maíz. | 39 |
| Figura 10. Determinación del tiempo de incubación óptimo para determinar la toma de glucosa radiactiva por los embriones de maíz. | 40 |
| Figura 11. Toma de carbohidratos en diferentes tejidos embrionarios de maíz. .. | 44 |
| Figura 12. Actividad de la toma de glucosa durante la germinación de embriones maduros y ejes embrionarios. | 46 |
| Figura 13. Actividad de la toma de sacarosa en embriones maduros y ejes embrionarios durante la germinación. | 47 |
| Figura 14. Efecto del CCCP sobre la toma de glucosa de embriones germinados por 24 h..... | 48 |
| Figura 15. Efecto del CCCP sobre la toma de sacarosa en embriones maduros con 24 de germinación..... | 49 |
| Figura 16. Efecto del PCMBS sobre la toma de sacarosa en embriones maduros con 24 de germinación..... | 50 |



| | |
|---|----|
| Figura 17. Actividad de toma de glucosa en y sin presencia de <i>Fusarium verticillioides</i> | 51 |
| Figura 18. Actividad de toma de sacarosa en y sin presencia de <i>Fusarium verticillioides</i> | 53 |
| Figura 19. Comparación de los índices de toma de glucosa y sacarosa de los embriones infectados/ embriones sin infectar o control. | 54 |
| Figura 20. Comparación de los niveles de transcrito para el transportador putativo ZmHT con la toma de glucosa durante la germinación de embriones maduros de maíz..... | 59 |
| Figura 21. Comparación de los niveles de transcrito para el transportador de sacarosa ZmSUT1 con la toma de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz. | 62 |
| Figura 22. Transporte de hexosas y sacarosa durante la germinación de la semilla de maíz..... | 64 |
| Figura 23. Efecto del patógeno <i>Fusarium verticillioides</i> en la actividad de transporte y los niveles de los transcritos para los transportadores de carbohidratos..... | 66 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Comparación entre las CPM obtenidas y la actividad de toma de glucosa obtenida en los embriones. | 39 |
| Tabla 2. Tabla que muestra la relación entre las CPM y la cantidad de glucosa que es tomada por el embrión a las 24 horas de germinación. | 41 |
| Tabla 3. Familias integrantes de la Familia de Facilitadores Mayores (MFS)..... | 73 |
| Tabla 4. Reactivos que se emplean en la preparación del medio de reacción y el medio de lavado para glucosa. | 76 |
| Tabla 5. Reactivos que se emplean en la preparación del medio de reacción y el medio de lavado para sacarosa. | 76 |
| Tabla 6. Preparación de líquido de centelleo. | 77 |



ABREVIATURAS

| | | | |
|-----------------------------------|---|----------------|--|
| ABA | Ácido abscísico | MFS | Familia de Facilitadores Mayores (Major Facilitator Superfamily) |
| ABC | Superfamilia de transportadores (ATP-binding cassette) | μCi | microCurie |
| ABRE | Elemento de respuesta a ABA (Abscisic acid Responsive Element) | mM | miliMolar |
| ATP | Trifosfato de Adenosina | mRNA | RNA mensajero |
| ATPasa | Trifosfato de Adenosina hidrolasa | MST | Transportadores de monosacáridos |
| CCCP | Carbonil Cianuro-m-Cloro Fenilhidrazona | PCMBS | p-CloroMercuriBencen Sulfónico |
| CO₂ | Dióxido de carbono | pmol | picoMoles |
| CPM | Cuentas Por Minuto | PPO | 2,5 Dinfenil oxazol |
| ddp | Días después de la polinización | RNA | Ácido ribonucleico |
| DPM | Desintegraciones Por Minuto | SE-CC | Elementos cribosos del floema-células acompañantes (Sieve Element-Companion Cells) |
| FAO | Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization) | STP/HXT | Transportadores de hexosas |
| FB1 | Fumonisina B1 | SUC/SUT | Transportadores de sacarosa |
| GA | Ácido giberélico | ZmHT | Transportador putativo de hexosas en maíz |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno | ZmSUT1 | Transportador de sacarosa en maíz |
| KCl | Cloruro de potasio | | |
| Km | Constante de Michaelis-Menten | | |



I. RESUMEN

La infección de plantas con patógenos fúngicos se sabe que puede alterar el metabolismo de carbono de la planta, aunque también el metabolismo del hongo. Se ha encontrado que los hongos inducen la producción de hexosas y uso de éstas para sobrevivir por un tiempo prolongado en el huésped. En las plantas la movilización de hexosas y sacarosa es indispensable para sostener sus funciones celulares. El transporte de ambos carbohidratos es entonces esencial y necesita ser regulado, ya que no todas las células tienen la capacidad de sintetizar azúcares y por tanto establecen relaciones de consumo y síntesis coordinada. Cuando el patógeno ataca a la planta el balance entre la síntesis, transporte y consumo se afecta. Uno de los principales puntos que es regulado durante el ataque por el patógeno es la disponibilidad del carbono, por lo que los transportadores de azúcares llegan a aumentar y ocasionar la modificación sustancial del metabolismo.

En el presente trabajo se estudió inicialmente la capacidad de transporte de glucosa y sacarosa que presentan diferentes tejidos embrionarios de maíz, encontrando que los embriones inmaduros toman más glucosa y sacarosa que los embriones maduros y ejes embrionarios sin embeber, probablemente debido a la mayor necesidad metabólica del tejido inmaduro. Del mismo modo los ejes embrionarios presentaron una toma mayor que los embriones maduros, tejido altamente demandante. Cabe destacar que en todos los tejidos se observó una toma mayor de glucosa que de sacarosa y que supone que las invertasas apoplásticas se encuentran funcionando en los tres tejidos.

Por otro lado se estudió la toma de ambos carbohidratos a lo largo de la germinación en embriones maduros y ejes embrionarios. Se compararon tanto la toma de glucosa o sacarosa, valores obtenidos en este trabajo de tesis con los valores de los niveles de dos transcritos, obtenidos por Guzmán-Chávez (2010),



quién obtuvo los perfiles para un transportador de hexosas y un transportador de sacarosa.

La toma de glucosa aumentó conforme transcurrió el tiempo de germinación y los niveles de expresión del transportador de hexosas ZmHT presentaron un perfil similar hasta las 18 horas de germinación, lo que sugiere que la toma es mediada por un transporte activo secundario, ya que es probable que este transcrito se traduzca a un transportador de tipo activo; después el nivel de transcrito disminuye y la toma de glucosa aumenta lo que nos habla de un transporte difusional o bien un transporte de hexosas distinto a los conocidos. Evidencia adicional de que hay dos tipos de transporte de glucosa durante la germinación se obtuvo al determinar el efecto del CCCP en la toma de glucosa de embriones germinados a 24 horas, encontrándose que la toma de glucosa se inhibía un 50%, esta sería la contribución del transporte activo. Así que la toma de glucosa se está llevando a cabo tanto por transporte difusional como por transporte activo secundario, este último a través de ZmHT.

Por otro lado, la toma de sacarosa coincide con la expresión del transcrito ZmSUT1, nuevamente sugiere que el carbohidrato se está transportando esencialmente por un transporte activo secundario. Sin embargo, al embeber embriones por 24 horas y medir la toma de sacarosa en presencia del iónoforo CCCP y del reactivo PCMB5 (un inhibidor del transportador de sacarosa), apenas hubo una inhibición de alrededor del 15% en la toma de sacarosa, lo que sugiere que esencialmente el transporte de sacarosa se está llevando a cabo por un transporte difusional, aunque el transporte activo se encuentra presente.

La infección que provoca *Fusarium verticillioides* en los embriones de maíz afecta la toma de carbohidratos. Este es el resultado que esperábamos ya que indujo un aumento en el nivel de transcritos para ZmHT y ZMSUT1 (Guzmán-Chávez, 2010). Respecto a la toma de glucosa encontramos que aumenta a tiempos prolongados de la infección, sugiriendo que se está sintetizando el



transportador para incrementar la toma de glucosa. Posteriormente, pese a que la toma de glucosa es alta, al compararla con el nivel para el transcrito ZmHT, este disminuye. Lo que pudiera ser causa de diversos factores, en primer lugar un transporte difusional como se planteó anteriormente o bien una toma excesiva ocasionada por la reducción en la impermeabilidad de la membrana de los embriones debido a la infección por el hongo.

La infección de *Fusarium verticillioides* incrementa la toma de sacarosa desde las 12 horas de germinación, cerca de 1.5 veces y se mantiene alta a lo largo de los tiempos analizados excepto a las 36 horas. No obstante la toma alta de sacarosa a los tiempos prolongados de la infección sugiere que al igual que sucede con la toma de glucosa, la toma se debe a un cambio en la permeabilidad de la membrana, ya que en otro trabajo en el laboratorio encontramos que ésta cambia.

Por lo anterior concluimos que el hongo *Fusarium verticillioides* ocasiona un aumento en la toma de carbohidratos en los embriones de maíz germinados, sin embargo este aumento no es suficiente para que las células del embrión sobrevivan, ya que después de las 24 horas el embrión se encuentra totalmente invadido, cambia su textura, pierde la integridad membranal y se necrosa.



II. INTRODUCCIÓN

II. 1 Transporte a través de las membranas celulares

La bicapa lipídica de una célula constituye una barrera de permeabilidad selectiva que le permite a la célula mantener diferentes concentraciones de solutos entre ella y su medio extracelular. Es esencialmente impermeable a la mayor parte de las sustancias hidrosolubles, por lo que la célula ha tenido que desarrollar mecanismos de transporte que le permiten transportar moléculas polares y así incorporar nutrientes esenciales como azúcares, aminoácidos y lípidos; excretar productos de desecho; asegurar la permanencia en la célula de intermediarios metabólicos; y regular las concentraciones intracelulares de iones. El transporte de dichos solutos solubles en agua es mediado y facilitado por proteínas llamadas *proteínas de transporte a través de membranas* (Alberts *et al.*, 2004).

II. 2 Tipos de transporte: Clasificación energética

Dada la importancia del transporte a través de la membrana, la célula utiliza un gran número de mecanismos de transporte. Estos mecanismos se clasifican en tres categorías dependiendo de la actividad energética del mismo en, difusión simple, difusión facilitada y transporte activo y que brevemente se describirán a continuación (Figura 1).

II.2.1 Transporte pasivo

II.2.1.1 Difusión simple

Algunas moléculas pequeñas no polares como el O_2 y el CO_2 y algunas moléculas pequeñas polares pero no cargadas como la urea o el agua se difunden a través de la membrana de forma pasiva (“cuesta abajo”; Figura 1). Este tipo de transporte se realiza mediante el movimiento aleatorio de las moléculas a través de las membranas y solo depende de la permeabilidad del soluto en la membrana.

En este proceso no hay especificidad y el movimiento a través de la porción hidrófoba de la membrana es el paso limitante de la velocidad de las moléculas a través de las membranas celulares, cuanto más hidrófoba sea una molécula se difundirá con más rapidez a través de una bicapa lipídica. Es un tipo transporte lento y muchas veces resulta insuficiente para las necesidades funcionales y metabólicas de las células (Alberts *et al.*, 2004).

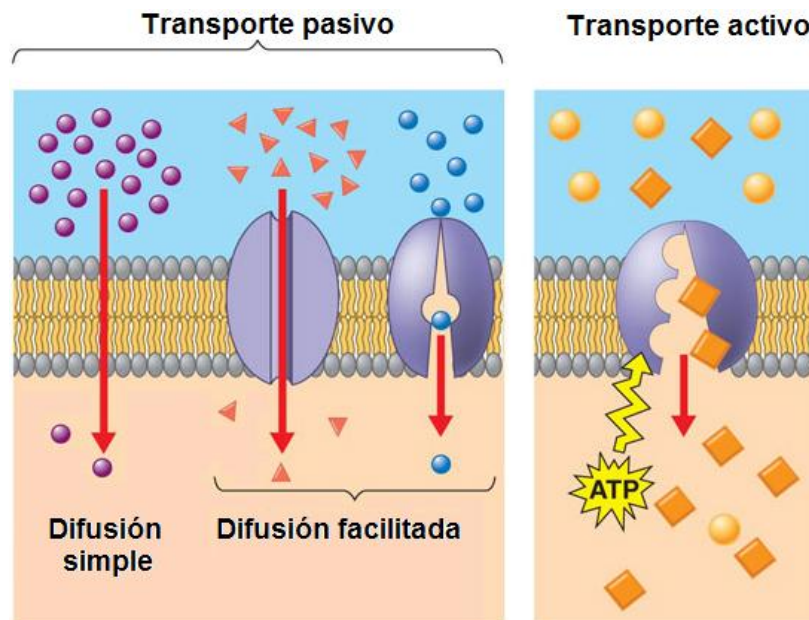


Figura 1. Tipos de transporte de acuerdo a su clasificación energética.
(Tomado de <http://flipper.diff.org/app/items/info/1549>)

II.2.1.2 Difusión facilitada

Este tipo de transporte es facilitado por proteínas dentro de las que se encuentran los canales y los transportadores en uniporte (Figura 2). Del mismo modo que la difusión pasiva los canales transportan agua o tipos específicos de iones a favor de sus gradientes de concentración o potencial eléctrico. Los canales contienen un poro aumentando así la tasa de difusión del ión. Por otro lado los uniportadores son proteínas transmembranales que realizan el transporte vectorial de una molécula a la vez a favor de su gradiente de concentración (Alberts *et al.*, 2004).

Existen varias diferencias entre este tipo de transporte y el transporte por difusión simple: la velocidad del transporte facilitado es alto, específico y saturable; mientras que la velocidad del transporte pasivo aumenta de manera lineal hasta que se alcanza la concentración en equilibrio de la molécula transportada (Alberts *et al.*, 2004; Lodish *et al.*, 2002).

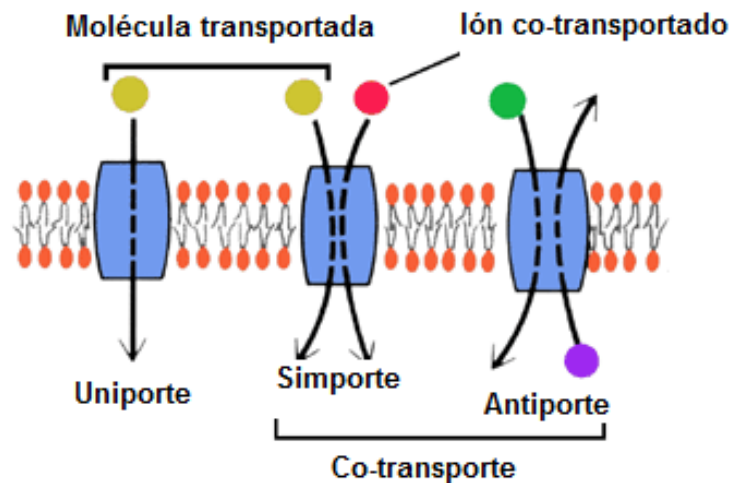


Figura 2. Diferencias entre los sistemas de co-transporte y el transporte facilitado por los transportadores en uniporte. (Tomado de Cellupedia, Cell Anatomy, http://library.thinkquest.org/C004535/cell_membranes.html)

II.2.2 Transporte activo

Dentro de este tipo de transporte se encuentran el transporte activo primario y secundario.

II.2.2.1 Bombas impulsadas por ATP

Las bombas impulsadas por ATP son proteínas que transportan iones en contra de sus gradientes de concentración. Existen cuatro clases principales de bombas transportadoras: la bomba tipo P, la bomba tipo V, la bomba de tipo F y la superfamilia ABC. Las clases P, V y F sólo transportan iones, mientras que la



superfamilia ABC transporta moléculas pequeñas además de iones. Los transportadores tipo F son los únicos que sintetizan ATP, mientras que los otros transportadores hidrolizan el ATP y crean un gradiente electroquímico de protones, son estas últimas bombas las que son denominadas también **transportadores de tipo activo primario, sólo describirán estas últimas.**

Las *bombas iónicas de clase P* son proteínas que poseen un dominio catalítico que contiene un sitio de unión para el ATP y llevan a cabo dos reacciones, la primera es una reacción escalar, la hidrólisis de ATP y la otra es una reacción vectorial en la que los iones se mueven a través de la membrana. Durante el proceso de transporte la proteína se autofosforila en un residuo de ácido aspártico a expensas del fosfato gama del ATP, al final de la catálisis la proteína pierde el fosfato y recupera su conformación original. Es en el dominio transmembranal donde se encuentra el sitio para el transporte o movimiento de los iones. Ejemplos de esta clase de transportadores son la ATPasa de Na^+/K^+ de la membrana plasmática en células animales, la ATPasa de Ca^{2+} de las células musculares y la bomba de H^+ de las células secretoras de ácido del estómago de los mamíferos y de la membrana plasmática de las células vegetales.

Las *bombas iónicas de la clase F y clase V* son proteínas oligoméricas que contienen por lo menos tres tipos de proteínas transmembranales y cinco tipos de proteínas hidrofílicas que conforman el dominio citosólico y catalítico de la enzima. Estas bombas sólo transportan protones en un proceso en el que no interviene ningún intermediario fosfoproteico, a pesar de que si realizan la hidrólisis del ATP. Las bombas de clase V en general funcionan para mantener el pH ácido de las vacuolas vegetales, de los lisosomas y de otras vesículas ácidas en las células animales, mediante el uso de energía liberada por la hidrólisis del ATP, para bombear protones desde la cara citosólica hacia el interior del organelo en contra del gradiente electroquímico protónico (Lodish *et al.*, 2002; Mathews *et al.*, 2002).



II.2.2.2 Transporte activo secundario

En el sistema de transporte activo secundario el movimiento de una sustancia a través de la membrana se acopla con el transporte espontáneo de otra sustancia que generalmente es un ión. El estrecho acoplamiento entre el transporte de los dos solutos permite que estos transportadores utilicen la energía almacenada en el gradiente electroquímico de un soluto, típicamente un ión (que normalmente es sodio) o un protón, para transportar el otro. Así, la energía libre liberada durante el desplazamiento se utiliza como fuerza impulsora para bombear otros solutos en contra de sus gradientes electroquímicos. Debido a que las bombas primarias o ATPasas crearon el gradiente iónico entonces a los transportadores que aprovechan este gradiente para transportar a otro soluto se denominan **transportadores de tipo activo secundario** (Alberts et al., 2004).

En estos sistemas se encuentran los sistemas de transporte mediado por simportadores y antiportadores, ambos median reacciones acopladas en las que una reacción energéticamente desfavorable (en contra de su gradiente de concentración) se acopla a otra energéticamente favorable (a favor de su gradiente de concentración), sin embargo no hidrolizan ATP para ello y pueden importar y exportar tanto iones como moléculas pequeñas, por ejemplo glucosa y aminoácidos (Mathews *et al.*, 2002).

El transporte acoplado que supone la transferencia simultánea de un segundo soluto en la misma dirección es llevado a cabo por los simportadores, mientras que la transferencia de un segundo soluto en dirección contraria se debe a los antiportadores (Figura 2).

II.3 Transporte de carbohidratos en plantas

II.3.1 Sistema vascular en plantas

Los monosacáridos representan la principal fuente de carbono y energía en la mayoría de los organismos heterotróficos y en plantas la situación es bastante similar. Durante la fotosíntesis el CO₂ fijado es convertido a monosacáridos como



glucosa o fructosa, los cuales representan las unidades centrales para el metabolismo, el almacenamiento y el transporte (Williams *et al.*, 2000). Frecuentemente es necesario convertir temporalmente estos metabolitos en otros compuestos que sean osmóticamente menos activos y/o menos accesibles a la acción de las enzimas del metabolismo celular. Posteriormente son almacenados por largos periodos y/o transportados a distancia sin ser enzimáticamente atacados o modificados, para eventualmente ser retransformados nuevamente a glucosa y otros monosacáridos. Estos metabolitos son el almidón, los polioles y la sacarosa y sus derivados como la rafinosa (Büttner y Sauer, 2000).

A las células que son capaces de fijar el CO₂ para convertirlo posteriormente en monosacáridos son llamadas autótrofas o bien parte de los tejidos fuente, mientras que a las células, tejidos u órganos que dependen del importe de carbono orgánico son llamados demanda (Williams *et al.*, 2000). Para que la planta pueda llevar a cabo todas sus funciones metabólicas es necesario que sea capaz de transportar los nutrientes que necesita desde los tejidos fuente hasta los tejidos demanda, los cuales se localizan alejados entre sí. Para ello tanto las plantas como los animales han desarrollado tejidos vasculares que ayudan al transporte de los nutrientes (Sjölund, 1997).

El sistema vascular de las plantas comprende dos elementos conductores: el floema y el xilema; los cuales llevan a cabo el intercambio de nutrientes esenciales. El xilema transporta tanto agua como nutrientes minerales de la raíz hasta los órganos productores (las hojas), por lo que el flujo es ascendente y conducido por un gradiente tensional a lo largo de un eje central. Por su parte el floema se encarga de distribuir azúcares, aminoácidos y otros nutrientes y no solo en una dirección sino hacia todos los tejidos demandantes (Ruiz-Medrano *et al.*, 2001). Sin embargo hay evidencia de que el floema no solo se encarga del transporte de nutrientes, sino que también participa en una serie de vías de señalización que involucran diversos metabolitos como azúcares, aminoácidos, fitohormonas, proteínas y RNAs para mantener la capacidad de la planta de hacer

ajustes fisiológicos o desarrollar respuestas basadas en la disponibilidad de nutrientes y requisitos ambientales, como el ataque por patógenos o el estrés hídrico y salino (Dinant y Lemoine, 2010).

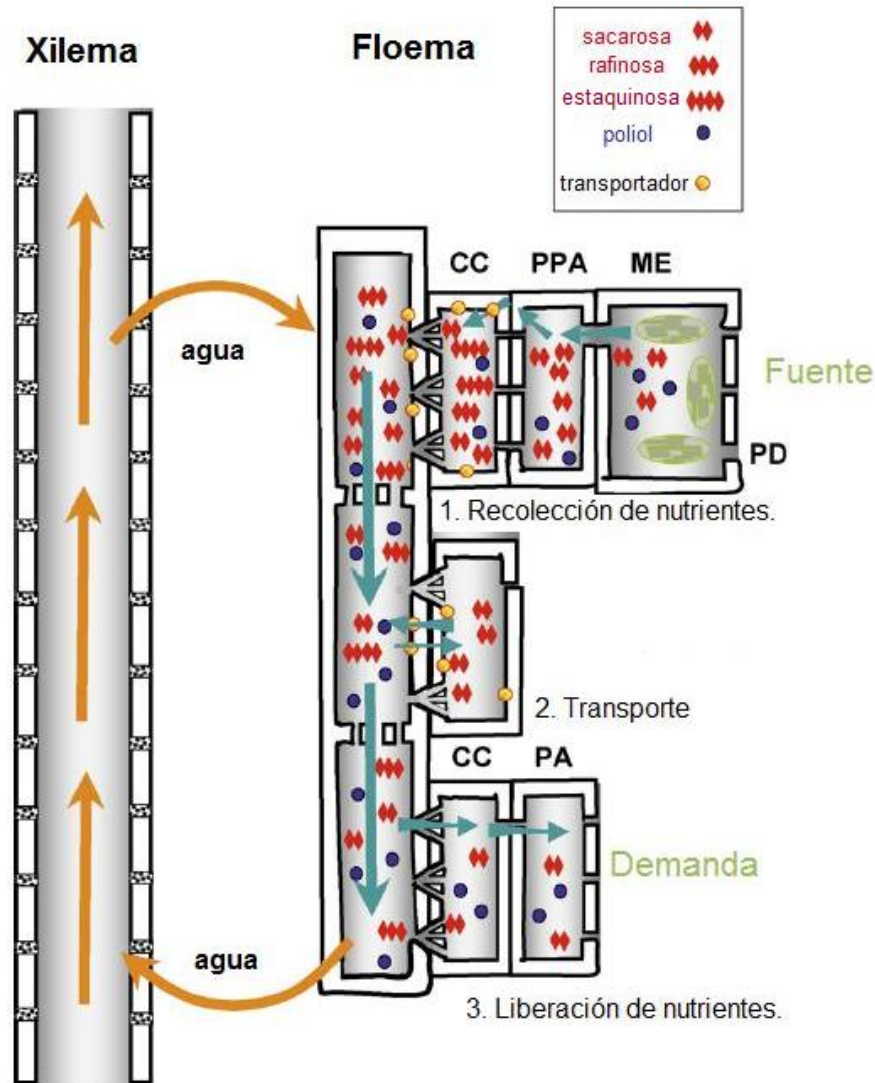


Figura 3. Representación esquemática del transporte de azúcares de los tejidos fuente hacia los tejidos demanda. En las células mesófilas (ME), la sacarosa y otros azúcares como los polioles, que son producidos como resultado del ciclo de Calvin en los cloroplastos, son transportados de célula en célula a través del plasmodesmata hacia las células del parénquima del floema (PPA, del inglés “phloem parenchyma cells”) y después son trasladados al apoplasto (Recolección de nutrientes). La sacarosa y los polioles son tomados en el complejo elementos cribosos del floema-células acompañantes (SE-CC) por un simportador azúcar- H^+ (círculos amarillos) energizado por la bomba de protones ATPasa. En la carga simplástica, los azúcares son transportados por difusión pasiva de las células mesófilas hacia el complejo SE-CC vía plasmodesmata (PD) (Tomado de Dinant y Lemoine, 2010).



Las funciones del floema difieren de acuerdo a la ubicación de órganos, sin embargo hay básicamente tres funciones principales de las cuales se encarga: la recolección de nutrientes en los tejidos fuente, el transporte a través de él y la liberación de los nutrientes en los tejidos demanda (Dinant y Lemoine, 2010). Lo anterior se lleva a cabo por el complejo de “elementos cribosos del floema-células acompañantes” (SE-CC, del inglés sieve element – companion cells). Durante el desarrollo del floema la división de una célula madre del floema permite la formación de estos dos tipos de células. En la diferenciación, los elementos cribosos sufren una autofagia en la cual la mayoría de los organelos incluyendo los ribosomas, el aparato de Golgi, el núcleo, las vacuolas y el retículo endoplásmico rugoso son degradados y eliminados, logrando una extensión longitudinal de estas células y la formación de grandes poros cribosos en las paredes celulares de los elementos cribosos, que facilitan el flujo de solutos, metabolitos y otras moléculas de célula a célula (Sjölund, 1997), quedando así conectados los elementos cribosos del floema con las células acompañantes y formando el complejo SE-CC. Una función importante de las células acompañantes es el suministro de energía y proteínas a los elementos cribosos (Williams *et al.*, 2000).

El complejo está conectado a otras células vecinas, las células del parénquima del floema, y a otros tipos celulares con el fin de hacer una red de transporte coordinando en conjunto la recopilación, almacenamiento, carga y descarga de moléculas y metabolitos (Dinant y Lemoine, 2010).

II.3.2 Modelos de llenado del floema

Actualmente existe evidencia que respalda la hipótesis que en plantas superiores existe más de un mecanismo de transporte en el floema, es decir, existen dos tipos de “cargado o llenado del floema”, el **apoplástico** y el **simplástico**. En la carga simplástica, una vez que es sintetizada la sacarosa, que es la principal forma de carbono transportado en plantas, pasa desde las células mesófilas hasta el complejo SE-CC, moviéndose de célula en célula vía plasmodesmata. Por otro



lado la carga apoplástica ocurre activamente en el complejo SE-CC desde el espacio extracelular, en el que se involucran transportadores específicos de membrana localizados en la membrana plasmática del complejo SE-CC (Sjölund, 1997).

En los tejidos fuente la liberación de azúcares ocurre principalmente vía apoplástica, mientras que en los tejidos demanda ocurre vía simplástica, lo cual se ilustra en la Figura 3 (Dinant y Lemoine, 2010).

El paso final de transporte en el complejo SE-CC, ya sea apoplástico o simplástico, se conoce comúnmente como llenado, un término que indica el uso de energía para conducir el movimiento de azúcares en contra de un gradiente de concentración. En 1930, Münch formuló la teoría del flujo de presiones ahora ampliamente aceptada. De acuerdo a dicha teoría, los poros cribosos funcionan como un tubo impermeable dentro del cual es impulsado el flujo de masa de solutos por un gradiente de presión de regiones de alta concentración de solutos a regiones de baja concentración (Oparka y Turgeon, 1999).

Para elucidar si la vía por la cual se está transportando un soluto es simplástica o apoplástica, se ha estudiado el transporte de dichos solutos a través del floema mediante modificadores químicos no penetrantes solubles en agua, cuya función es la modificación de grupos químicos que se encuentran en la superficie membranal de las células. Un caso particular es el ácido p-Cloro MercuriBencenSulfónico (PCMBs), el cual reacciona con los grupos sulfidrido de la membrana (cisteínas), provocando una desestabilización de esta (Giaquinta, 1976). Si la sacarosa es transportada vía apoplástica, su transporte se ve reducido por dicha vía (Atwell *et al.*, 2003).

II.3.2.1 Transporte apoplástico.

El llenado del floema a través de la vía apoplástica se lleva a cabo en varias especies como las Solanáceas y en *Arabidopsis* (brassicéa). Los transportadores



que se encargan de este tipo de transporte son del tipo simporte sacarosa- H^+ , empleando la energía almacenada en el gradiente de protones transmembrana establecido por el bombeo de protones de la ATPasa de protones en la membrana plasmática. Alternativamente, la sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructuosa por catálisis de las invertasas apoplásticas, ya que se han encontrado también transportadores del tipo simporte monosacárido- H^+ (Williams *et al.*, 2000). Estos transportadores para sacarosa y hexosas pertenecen a la Familia de los Facilitadores Mayores (MFS, del inglés “Major Facilitator Superfamily”), que representa uno de los grupos más grandes de transportadores de azúcares (Vardy *et al.*, 2004).

La Familia de Facilitadores Mayores es una de las familias más grandes de transportadores relacionados evolutivamente, representan un amplio rango de proteínas de membrana cuyas funciones abarcan desde la acumulación de nutrientes en bacteria hasta la recaptura de neurotransmisores a través de la membrana sináptica en humanos (Hirai *et al.*, 2003).

Dichos transportadores son responsables de la concentración de distintos solutos en el interior de la célula con respecto al exterior, al igual que el gradiente de solutos en organelos internos como la mitocondria, las vesículas sinápticas y los lisosomas (Pao *et al.*, 1998; Saier, 2000). Por lo tanto, los transportadores son esenciales para el sustento de la célula y para su adaptación a cambios en el medio que la rodea (Vardy *et al.*, 2004).

En 1998 Pao y colaboradores reportaron 17 familias pertenecientes a MFS, basándose en datos filogenéticos por medio de estudios de secuenciación y comparación de secuencias. Actualmente, se han encontrado alrededor de 29 familias y 5 adicionales que se cree pudieran también pertenecer a esta familia (ver Apéndice I; Saier *et al.*, 1999; Saier, 2000). A excepción de la familia DHA2 todos los miembros poseen 12 cruces transmembranales, de los cuales los



primeros seis presentan cierta homología con los últimos seis, lo que sugiere que MSF surgió de la duplicación y fusión de un gene primitivo (Pao *et al.*, 1998).

II.4 Transportadores de carbohidratos en plantas

Como se ha descrito hasta ahora, la sacarosa representa la principal forma de carbono transportado a través de los elementos cribosos del floema desde los tejidos fuente, donde es sintetizada y almacenada temporalmente en la vacuola, hasta los tejidos demanda donde también es almacenada en la vacuola hasta su uso (Lemoine, 2000); ya sea vía simplástica o vía apoplástica. La ruta por la cual sea transportada depende de la especie y de la etapa de desarrollo de la planta. Alternativamente puede ser hidrolizada en glucosa y fructosa, por invertasas de la pared celular, para ser tomada como hexosas por transportadores de monosacáridos (Figura 4). Es por ello que en plantas existe una gran cantidad de transportadores de monosacáridos y disacáridos que coordinan el transporte de azúcares en diversos tejidos, en diferentes etapas de desarrollo de la planta y bajo distintas condiciones ambientales (Williams *et al.*, 2000).

Se sabe que al menos hay 69 transportadores homólogos que han sido encontrados en *Arabidopsis* y han sido clasificados en 8 familias: transportadores de sacarosa (SUC/SUT), transportadores de hexosas (STP/HXT), transportadores de polioles (PLT), transportadores de *mio*-inositol (ITR/MIT), transportadores plastídicos de glucosa (pGlcT), proteínas sensoras putativas de monosacáridos (AZT/MSSP), SFP y una familia no caracterizada de transportadores de monosacáridos. SUC/SUT y STP/HXT son las familias mejor caracterizadas y son miembros de la familia OHS y SP de MFS respectivamente (Shiratake, 2007). A continuación se describen ambas familias de transportadores.

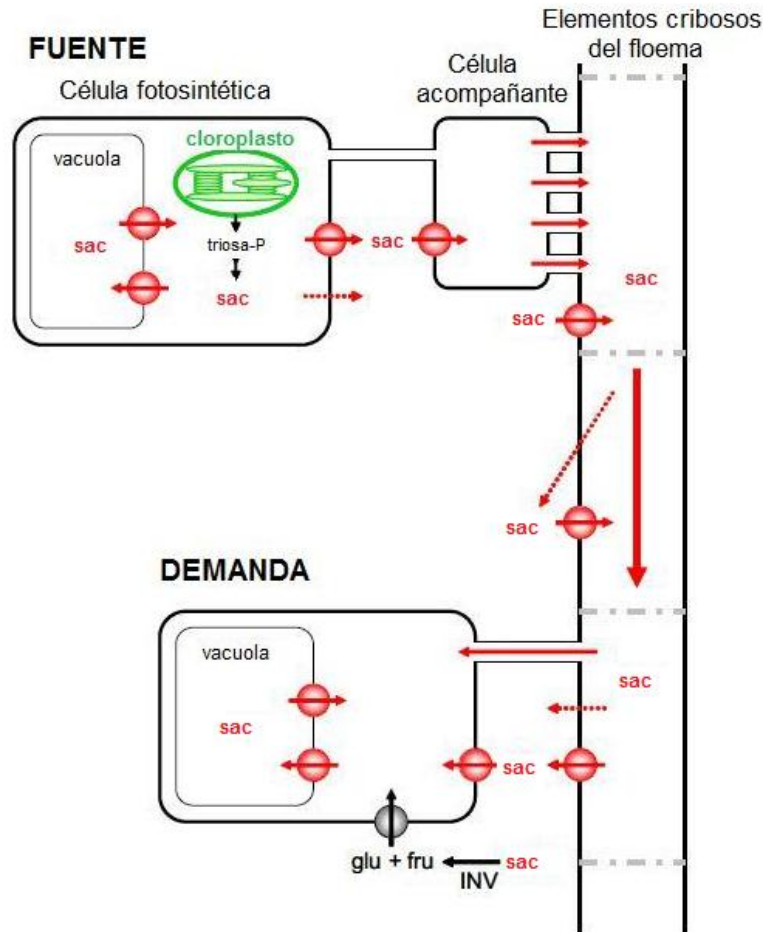


Figura 4. Transporte de sacarosa en el floema en plantas. Movimiento de sacarosa desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda, mediado por plasmodesmata o transportadores membranales. sac, sacarosa; glu, glucosa; fru, fructosa; INV, invertasa. (Tomado de Shiratake, 2007).

II.4.1 Transportadores de sacarosa

Generalmente son antiportadores y simportadores los cuales, según análisis bioquímicos, estudios de inmunolocalización y evidencia genética, se localizan en la membrana plasmática de las células vegetales y/o en el tonoplasto. Sin embargo, los que se encuentran localizados en el cloroplasto son todos simportadores (Kühn y Grof, 2010). Los transportadores de los que se ha hablado y que son de interés para este trabajo son los del tipo simporte- H^+ , pertenecientes a la familia denominada SUC/SUT, cuya nomenclatura fue asignada por la palabra en inglés "Sucrose" (Sauer, 2007). La familia SUC/SUT se divide a su vez en 3 subfamilias: **SUC2/ SUT1**, **SUC3/ SUT2** y **SUC4**.

SUC2/ SUT1. Esta subfamilia presenta una alta afinidad/ baja capacidad de transporte por sacarosa, con una K_m que va de 100 μM a 2 mM (Shiratake, 2007) e incluye el grupo 1 y el grupo 2 de transportadores, ambos localizados en la membrana plasmática de células acompañantes o elementos cribosos del floema y tienen como función la toma de sacarosa en el floema y en las células demanda. La diferencia entre ambos grupos radica en que el grupo 1 (como SUT1) se presenta sólo en plantas monocotiledóneas, mientras que el grupo 2 en plantas dicotiledóneas (Ibraheem *et al.*, 2008; Sauer, 2007). La subfamilia SUC2/ SUT1 se divide en 5 clases o tipos de transportadores (de SUT1 a SUT5).

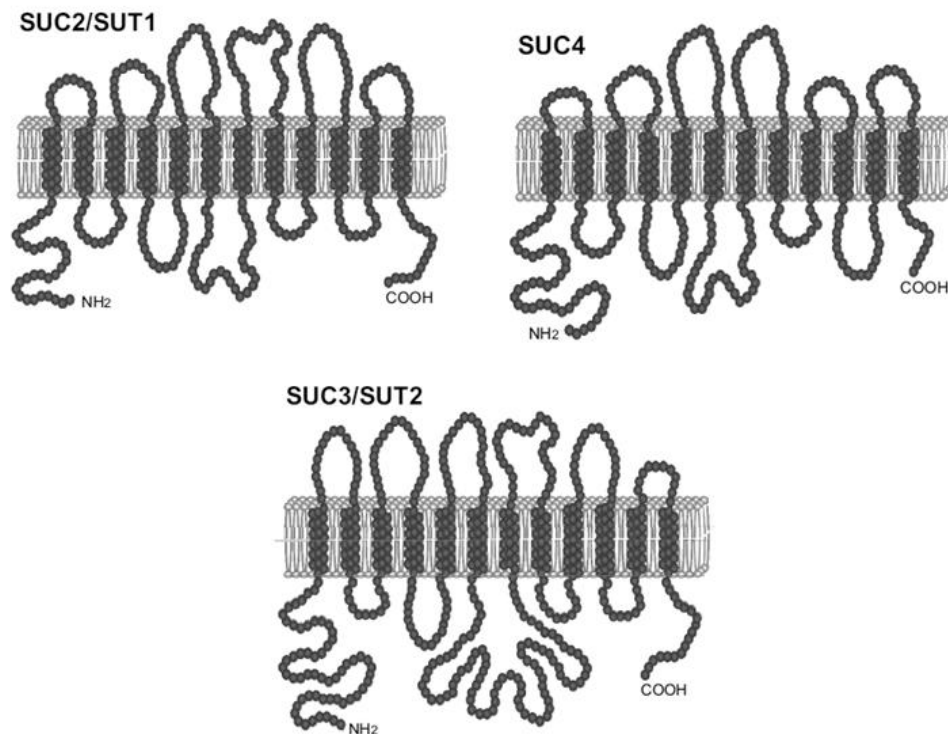


Figura 5. Topologías de las subfamilias de transportadores de sacarosa (Shiratake, 2007).

SUC3/ SUT2. Subfamilia de baja afinidad por sacarosa con valores altos de K_m (Shiratake, 2007), que incluye el grupo 3 de transportadores encontrados en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Sauer, 2007). Suelen ser inusuales en el sentido de que presentan 50 aminoácidos de longitud adicional en el dominio



central y su extremo amino terminal es 30 aminoácidos más grande que el de las demás subfamilias (Figura 5). Esta homología con proteínas sensoras de azúcares como las SNF3 y RGT2 sugiere que estos transportadores pudieran tener una actividad sensora. Estudios publicados por Barker y colaboradores en 2000 reportaron que esta subfamilia tiene una actividad sensora y no transportadora, sin embargo la comunidad científica no está de acuerdo con ello. SUC3/ SUT2 se localiza en los elementos cribosos del floema y en tejidos demanda (Ibraheem, 2008; Sauer, 2007; Shiratake, 2007).

SUC4. Es la última subfamilia con baja afinidad/alta capacidad de transporte por sacarosa, grupo 4 que se encuentra tanto en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Originalmente los transportadores pertenecientes a SUC4 fueron localizados en la membrana plasmática y recientemente se han encontrado en la membrana vacuolar, principalmente en tejidos demanda (Ibraheem, 2008; Sauer, 2007).

La localización de los transportadores de sacarosa entonces depende de la especie y de las necesidades de cada especie, por ejemplo PmSUC2 (*Plantago major*) se localiza predominante en células acompañantes del floema, mientras que LeSUT1 (*Lycopersicon esculentum*) se haya principalmente en elementos amorfos de la savia (Weise *et al.*, 2000).

II.4.2 Transportadores de monosacáridos

Así como la sacarosa representa la principal fuente de transporte y almacenamiento en plantas, los monosacáridos, como la glucosa y la fructuosa, representan la principal fuente de carbono y energía. Sin embargo, para que estos carbohidratos puedan ser utilizados por la planta son necesarios dos factores: una invertasa de pared celular y una vía de transporte por la cual los azúcares ingresan al interior de la célula. Esta vía de transporte suele ser por medio de transportadores específicos de monosacáridos que se encuentran en la membrana plasmática (ver Figura 4).



El primer gene reportado que codifica para un transportador de monosacáridos que no provenía de animales fue CkHUP1 del alga unicelular *Chlorella kessleri*. Dicho gen reveló cierta homología con los facilitadores de monosacáridos en animales y levaduras y con los simportadores monosacáridos- H^+ de bacterias, (Büttner y Sauer, 2000). A partir de este hallazgo se logró la clonación de los transportadores de hexosas de plantas, los que se han estudiado mediante sistemas de expresión heterólogos como lo son las levaduras y los ovocitos de *Xenopus* (Delrot *et al.*, 2001).

Los transportadores de monosacáridos en plantas pertenecen a la familia SP de MSF. En *Arabidopsis* se han encontrado 14 genes pertenecientes a la familia MST, del inglés “Monosaccharide Transporter (-like),” que incluye 53 genes que codifican para proteínas que presentan homología con transportadores de monosacáridos. MST se ha dividido a su vez en siete subfamilias, algunas de las cuales han sido mencionadas previamente. Estas familias ya estudiadas en *Arabidopsis* son: proteínas de transporte de azúcares, STP; transportador vacuolar de glucosa, VGT; transportador tonoplástico de monosacáridos, TMT; transportador plastídico de glucosa/Supresor de proteína G beta 1, GlcT/ SGB1; PLT; transportador de inositol, INT; y proteínas de respuesta temprana a la deshidratación, ERD6 (Büttner, 2007). Los valores de K_m para MST se encuentran generalmente entre 10 y 100 μM y su localización es preferencial en los tejidos demanda (Williams *et al.*, 2000). A pesar de ser una numerosa familia, la información sobre los transportadores de hexosas es menor a la que se tiene comparada con los transportadores de sacarosa en plantas.

II.5 Regulación del transporte de carbohidratos

Como se describió los transportadores de azúcares juegan un papel importante en la interacción fuente-demanda, por lo que su actividad está perfectamente controlada. Los factores bióticos y abióticos a los que está sujeta la planta como la luz, estrés hídrico y salino, fitohormonas, contaminación por metales pesados y



ataques por patógenos pueden afectar la actividad de los transportadores de carbohidratos (Delrot *et al.*, 2001; Williams, 2000).

II.5.1 Regulación por compuestos internos de la planta: hormonas y carbohidratos

Al igual que en los animales las plantas cuentan con sustancias reguladoras llamadas hormonas. Hay cinco clases principales de hormonas en plantas: auxinas, giberelinas (como el ácido giberélico, GA), citocinas, etileno y ácido abscísico (ABA). Se ha demostrado que el mRNA de los transportadores SUT1 se induce por la adición de auxinas y citocinas en hojas. Transportador que es regulado a nivel post-transcripcional por fosforilación (Lalonde *et al.*, 1999).

Por otro lado existe evidencia de que cambios en niveles de azúcares pueden afectar la expresión y actividad de los transportadores de azúcares. Sin embargo, no se ha obtenido información certera sobre si la adición de carbohidratos, ya sea glucosa o sacarosa, modifican positiva o negativamente la expresión de los transportadores en plantas, debido probablemente a la variabilidad en los enfoques experimentales utilizados, empleando diversos tejidos (fuente o demanda), concentraciones de 3 hasta 300 mM de los azúcares, mediciones en presencia de luz, la medición de transcritos o la de la actividad de la proteína, entre otros. Por ejemplo, la expresión del gene de VfSUT1 (transportador de sacarosa) de *Vicia faba*, pero no del gene de VfSTP1 (transportador de glucosa), decrece en los cotiledones después de la exposición a altas concentraciones de sacarosa o glucosa, mientras que para bajas concentraciones no afecta los niveles de transcripción para dichos transportadores (Williams *et al.*, 2000).

Dos de las modificaciones posibles son la fosforilación de la proteína y los cambios en el estado de oligomerización de la proteína, ya que ambas han sido identificadas que ocurren en diferentes transportadores de carbohidratos en animales y también en plantas (Kühn y Grof, 2010). Son mecanismos que se



propone aumentarían la capacidad de transporte de las plantas, pero no se ha comprobado que se incremente *in vivo* la capacidad de transporte.

II.5.2 Modulación durante el estrés salino e hídrico

La deshidratación es un estado de pérdida excesiva de agua y sales minerales, el cual se suele presentar en las plantas. La síntesis de compuestos osmóticamente activos, como la prolina y los polioles, ayuda a dar resistencia a la planta ante este tipo de estrés. En *Arabidopsis* una deshidratación corta o bien condiciones de frío en la planta induce la expresión del gene ERD6, el cual presenta homología con un transportador de azúcares con 12 cruces transmembranales. Su función aún no es clara, pero probablemente está involucrado en la redistribución de azúcares usados como fuente de energía o bien actúa como osmoprotector (Delrot *et al.*, 2001).

Al igual que la sacarosa, ciertos polioles como el manitol y el sorbitol, son transportados por varias familias de transportadores bajo condiciones de no estrés (Delrot *et al.*, 2001). Se ha estimado que hasta un 30% del carbono fijado por la plantas es en forma de polioles, los cuales son sintetizados en el citoplasma de los tejido fuente como producto de la fotosíntesis y exportados a los tejido demanda en la misma forma que la sacarosa, pero por diferentes transportadores (Noiraud *et al.*, 2000). El transporte de manitol ha sido caracterizado con detalle en el apio y su incremento está asociado al estrés hídrico y salino. Por ingeniería genética se modificaron plantas de tabaco o *Arabidopsis* capaces de sintetizar manitol y se observó que este último provee de resistencia a las plantas ante el estrés hídrico. También se ha reportado que el manitol confiere resistencia a la planta ante el estrés oxidativo. Noiraud y colaboradores clonaron el primer transportador de manitol en plantas (en apio): AgMAT1; el cual transporta manitol con una K_m de 340 μM y es inhibido por otros polioles como sorbitol, xilol y mio-inositol. Por otro lado, también se ha caracterizado un transportador para sorbitol en manzana (Delrot *et al.*, 2001).



En *Arabidopsis* el transportador AtSUC1 codifica para un transportador altamente expresado en polen y mutantes en este transportador acumulan menos antocianinas que la tipo silvestre. Ya que la acumulación de antocianinas es un signo de estrés de tipo hídrico, la regulación por ABA de la transcripción del gene de AtSUC1 era posible. Hoth y colaboradores en 2002 encontraron que su transcripción es inhibida por ABA e inducida por sacarosa. Recientemente se demostró que el transportador AtSUC1 contiene un elemento de regulación denominado ABRE (del inglés “Abscisic acid Responsive Element”) y mediante experimentos de doble híbrido sugieren que las proteínas ABI5 y AREB3 interaccionan con este elemento regulando la expresión AtSUC1 (Hoth *et al.*, 2010).

II.5.3 Modulación durante el estrés biótico

Otro tipo de estrés al que se enfrentan las plantas es el ataque a patógenos como lo son los hongos. Entre ambos, hongo y planta, ocurre una transferencia de nutrientes, lo que conlleva a una competición por ellos. Para ello, el hongo sintetiza toxinas que pueden afectar directa o indirectamente el sistema de co-transporte azúcar- H^+ que se encuentra en la membrana plasmática y a transportadores de aminoácidos, que genera una disminución en la planta para absorber o recuperar los compuestos del apoplasto. Las toxinas también inhiben directamente transportadores de azúcares (Delrot *et al.*, 2001). En cultivos celulares de *Arabidopsis* el transportador de monosacáridos AtSTP4 se induce por elicitores de bacterias y hongos, lo que indica que AtSTP4 juega un papel en el transporte de monosacáridos en los tejidos demanda y que responde a un incremento en la demanda de carbohidratos por las células bajo condiciones de estrés. En uva también se encontró que la infección de las hojas por un hongo biotrófico induce la expresión del transportador VvHT5, así como también la expresión de la invertasa apoplástica, coincidiendo con un aumento en la concentración de ABA. Los autores proponen que el transportador VvHT5 está involucrado en la demanda de glucosa en condiciones de estrés (Hayes *et al.*, 2010).



Aún no es muy claro cómo funciona este mecanismo, sin embargo se sugiere que el transportador pudiera ayudar a incrementar el importe de carbohidratos en tejidos infectados con el fin de incrementar la demanda relacionada con la respuesta de defensa o bien que pudiera estar recuperando los azúcares del apoplasto y así reducir la pérdida de estos para el patógeno.

A continuación se describe brevemente el material biológico usado en este trabajo.

II.6 El maíz

El maíz es uno de los tres cereales más importantes a nivel mundial junto con el arroz y el trigo, ya que constituye uno de los principales cultivos para consumo humano. Pero su uso no solo se centra en la alimentación humana sino que también forma parte de la alimentación animal. Es una materia prima básica de la industria de la transformación con la que se producen bebidas alcohólicas y no alcohólicas, harina para pan, almidón, aceite para la fabricación de pinturas o jabón, edulcorantes alimenticios y hasta hace poco combustible. De las partes no aprovechables se emplea en la industria del caucho, resina, plástico, insecticidas o líquidos para embalsamar (Botanical Online, 1998-2011; FAO, 1993).

Es una planta anual originaria de América e introducida en Europa en el siglo XVI. En México se producen en promedio alrededor de 18.2 millones de toneladas de grano, de las cuales 90% es maíz blanco y se destina al consumo humano. La producción nacional de maíz se centra en cuatro estados: Jalisco, Sinaloa, Ciudad de México y Chiapas; seguidos por Guerrero, Michoacán, Puebla y Oaxaca (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010).

Su nombre científico del maíz es *Zea mays* y botánicamente es una gramínea por poseer tallos en forma de caña, aunque macizos en su inferior a diferencia del resto de los miembros de su familia que los tienen huecos (Botanical Online, 1998-2011). Constituido mayoritariamente de tejido foliar con un tallo

principal en forma de barra esbelta y segmentado, que presenta a lo largo de él una serie de nodos y que soporta dos filas de hojas únicas opuestas una de la otra. Destaca fundamentalmente por sus inflorescencias unisexuales, ya que las demás gramíneas presentan inflorescencias bisexuales. Las inflorescencias masculinas se localizan a lo largo de estructuras ramificadas llamadas espigas, las cuales se encuentran en la parte superior de la planta, mientras que las inflorescencias femeninas se encuentran en una disposición compacta alrededor de un eje y colectivamente forman la mazorca, en donde se encuentran las semillas (granos de maíz) agrupadas a lo largo de un eje. Cada mazorca se localiza al final de una rama corta lateral a lo largo de la región media de la planta (Botanical Online, 1998-2011).

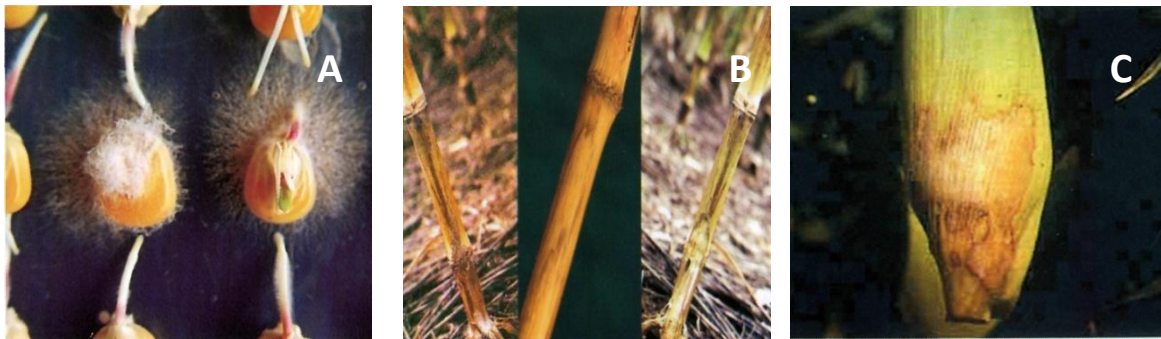


Figura 6. Síntomas de infección de maíz infectado con *Fusarium*. **A.** Infección durante la germinación de semillas de maíz, **B.** Infección en el tallo y **C.** Infección en la mazorca. (Tomado de Carmona *et al.*, 2007).

Todas las partes de la planta del maíz son susceptibles a un cierto número de enfermedades que reducen la capacidad de la planta para crecer de una manera normal y producen en última instancia la pérdida de cosecha del grano. La mayoría de las enfermedades contagiosas causadas en las plantas son producidas por hongos, ya que de las casi 100 000 especies de hongos que han sido descritas, se sabe que más de 8 000 son patógenos de las plantas. Los hongos pueden atacar a todas las partes de una planta y causar una gran variedad de síntomas. En maíz, los hongos más corrientemente asociados con la



podrición de la mazorca y el tallo son *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium subglutinans* (Figura 6). Estos patógenos sobreviven al suelo en restos de plantas infectadas y también pueden infectar la semilla del maíz sin síntomas visibles, afectado el embrión y el pericarpio de esta (Morales-Rodríguez *et al.*, 2007; White, 2004).

II.7 *Fusarium verticillioides*

II.7.1 Características generales del hongo

De los tres hongos mencionados anteriormente, *Fusarium verticillioides* es la especie más reportada que causa infección en el maíz. Es un hongo ascomiceto cosmopolita, capaz de crecer en el suelo y su éxito se debe a su alta capacidad de reproducción, habilidad para sobrevivir bajo condiciones desfavorables, eficiencia de nutrientes y a la promoción de crecimiento e inducción de los mecanismos de defensa de las plantas. Formalmente llamado *Fusarium moniliforme* y en su estado teleoformo (estadio reproductivo sexual) *Gibberella molimorfis* (Glenn *et al.*, 2004).

En cuanto a su morfología macroscópica presenta colonias vellosas-secas, planas y blancas en un inicio para tornarse naranjas o violetas posteriormente; en su morfología microscópica presenta un micelio septado e hialino con hifas delgadas y tabicadas y con conidióforos ramificados cortos con macroconidios fusiformes (de 3 a 5 septos) y microconidios solos y en cadenas. Los macroconidios son generalmente escasos y con forma de hoz y los microconidios son abundantes en el micelio aéreo con forma ovalada y de igual forma presentan septos. Los conidios varían en tamaño y forma dependiendo de la especie (Bonifaz, 2010).

Fusarium verticillioides presenta dos tipos de reproducción. En su reproducción asexual se producen los conidios por mitosis repetidas para formar



largas cadenas de estos. Los conidios son pequeños e hialinos, resistentes a factores ambientales como viento y lluvia, por lo que se consideran vectores de dispersión, lo que es claramente importante para la supervivencia, reproducción, dispersión y ciclos de enfermedad de este hongo. Su reproducción sexual es por medio de la conjugación de dos células diferenciadas o no y mediante tres fenómenos reproductivos: plasmogamia (unión de dos protoplasmas); cariogamia (fusión de dos núcleos); y meiosis (Bonifaz, 2010).

Los principales factores que influyen en el crecimiento de *Fusarium verticillioides* son la temperatura ambiental y la actividad de agua del sustrato. Su temperatura óptima de crecimiento es de 22.5° a 27.5° C y la mínima es de -5° a 2.5° C; mientras que su actividad mínima de agua es de 0.87 (Granjo *et al.*, 2007).

II.7.2 Micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides*

Las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular producidas en forma de metabolitos secundarios por hongos filamentosos, cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea puede provocar la enfermedad o la muerte de animales y personas. *Fusarium verticillioides* es capaz de producir tres tipos de micotoxinas: moniliforminas, fusarinas y fumonisinas (Nelson *et al.*, 1994). Las fumonisinas son compuestos polares, solubles en agua y en soluciones acuosas como metanol y acetronilo producidas por varias especies de *Fusarium*, las cuales se dividen en 4 grupos o series (A, B, C y P). Su estructura básica es una cadena aminopolihidroxiálquica de 19 a 20 átomos de carbono que se di-esterifica con ácidos tricarbónicos. La serie B de fumonisinas contiene el grupo amino en el C2, los grupos metilo en el C12 y C16 y los ésteres tricarbónicos en los C14 y C15 (Figura 6). Los 4 tipos de fumonisinas existentes de esta serie (FB₁, FB₂, FB₃ y FB₄) varían en estructura de acuerdo a su hidroxilación en la cadena. De los 4 tipos, la fumonisina FB₁ es la más abundante en maíz contaminado por este hongo, encontrándose alrededor del 70-95 % en relación con los otros 3 tipos de fumonisinas (Desjardins y Plattner, 2000; Sánchez-Rangel *et al.*, 2005; Norhasima *et al.*, 2009).

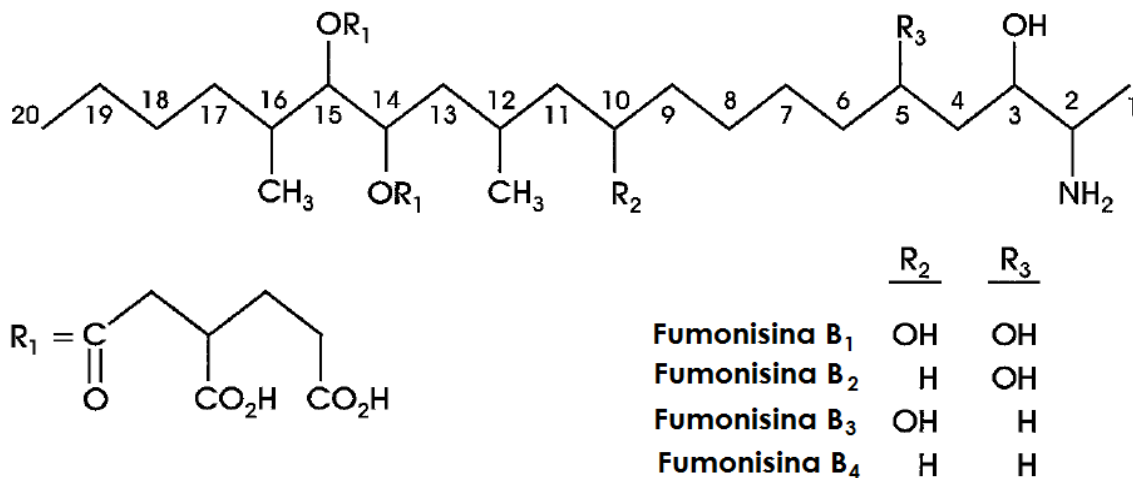


Figura 7. Estructura química de las fumosinas de la serie B producidas por *Fusarium verticillioides* (Luna-Löaiza, 2011).

La fumonisina FB₁ es capaz de inhibir a la esfinganina N-aciltransferasa y a la esfingosina N-aciltransferasas (Desjardins y Plattner, 2000; Sánchez-Rangel *et al.*, 2005). La inhibición de estas enzimas causa una disminución en la biosíntesis de ceramida, una acumulación de esfinganina, esfingosina y de otras bases esfingoides, una mayor degradación de las bases esfingoides provenientes de la dieta y finalmente, una reducción en la formación de esfingomiélin (Lino *et al.*, 2004; Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010).

Los esfingolípidos forman parte de la membrana celular e intervienen en los procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular al mantener la estructura de la membrana, la comunicación intercelular, la interacción entre células y la matriz extracelular, regulando los receptores del factor de crecimiento y actuando como segundos mensajeros. El agotamiento de lípidos complejos (ceramida, esfingomiélin y glicofosfolípidos) y la acumulación de bases esfingoides (esfingosina y esfinganina) alteran las funciones celulares mencionadas anteriormente y favorecen el estrés oxidativo y la proliferación de peroxisoma entre otros. A través de la activación del factor de necrosis tumoral, la exposición a



FB₁ altera el balance de muerte celular y replicación y de esta forma contribuye a la carcinogénesis (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010).

La biosíntesis de FB₁ está influenciada por la cantidad de almidón y la actividad de la α -amilasa. En granos inmaduros y deficientes de almidón, la biosíntesis de FB₁ no se ve sustentada; sin embargo en granos inmaduros y con una gran cantidad de almidón almacenado se obtienen altos niveles de producción de esta fumonisina. Por otro lado la interrupción de la α -amilasa resulta en altos niveles de la biosíntesis de FB₁ en el endospermo (Bluhm *et al.*, 2008). De igual modo, la cantidad de fumonisinas que produce el hongo depende de la cepa. En el Noroeste de México las cepas de hongos aisladas son en su mayoría grandes productores de FB₁, mientras que las aisladas en la zona centro, principalmente en el Estado de México, son productoras de bajas cantidades de FB₁ (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010).

El consumo de fumonisinas al ingerir maíz contaminado con *Fusarium verticillioides* ha causado micotoxicosis, incluyendo leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos y cáncer de hígado en ratas. La Agencia Internacional de Investigación en el Cáncer ha asociado el consumo de fumonisinas al cáncer esofágico en humanos (Desjardins y Plattner, 2000; Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

II.7.3 Infección del maíz por parte de *Fusarium verticillioides*

Al igual que en los animales y en el humano, *Fusarium verticillioides* provoca daños en la planta de maíz al infectarla, como es la pudrición de la mazorca y el tallo, asociándose con todas las etapas del desarrollo de la planta, ya que el hongo es llevado a la semilla y se transmite de semilla a semilla, colonizando la planta sistémicamente (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005). Esta forma de infección comienza con la presencia de conidios o de un micelio del hongo dentro de una semilla o bien en su superficie. Cuando la semilla germina, el hongo es capaz de moverse en la planta desde las raíces a través del tallo para llegar finalmente a la mazorca



y a los granos. Sin embargo, en etapas tempranas a la infección, el hongo no cuenta con suficiente biomasa para provocar la ruptura de tejidos o síntomas notables en la planta. Se han realizado estudios en donde se inocula con una misma cepa de *Fusarium verticillioides* la raíz y las semillas de maíz. Se presenta una disminución en el crecimiento de la semilla, mientras que no hay supresión del crecimiento de la planta. Esto sugiere que una misma cepa del hongo puede causar la mejora o el retardo en el crecimiento de la planta de maíz dependiendo del nivel de colonización que es influenciado por la cantidad de inóculo del hongo en el suelo y en la semilla. También se ha demostrado que en el intento de la planta por eliminar al microorganismo de su sistema se obtienen ciertos beneficios para la misma, dentro de los cuales se incluye un mejoramiento en el desarrollo de la raíz, una mayor tolerancia a la sequía y una mayor protección contra herbívoros debido a la producción de compuestos tóxicos. Dichas características resultan ser temporalmente favorables para la planta (Oren *et al.*, 2003).

La otra forma de infección y la más reportada es a través de conidios que se encuentran en el aire y se implantan en el estigma una vez que se ha llevado a cabo la polinización, ya que los estigmas se convierten en tejido muerto, sirviendo de sustrato y de vía de entrada donde crecerá la hifa del hongo. Sin embargo un pequeño porcentaje de los granos infectados presentará síntomas (Bush, 2001; Oren *et al.*, 2003).

Como se ha venido describiendo, una planta de maíz infectada con *Fusarium verticillioides* no presenta síntomas inmediatos, pero después de un tiempo se hace notoria la infección. Los granos presentan lo que se denomina “estallido estelar”, que son líneas blancas que irradian la capa del grano por la pérdida de transparencia debido a la desintegración de las células del pericarpio (Duncan y Howard, 2010; Oren *et al.*, 2003). Posteriormente se observan micelios del hongo color blanco-rosado en los tejidos severamente infectados y en las semillas, y por último la pudrición de la planta (Bush, 2001).



Es por todo lo anterior que resulta de gran importancia el estudio de este hongo y los mecanismos específicos por medio de los cuales el hongo es capaz de interactuar e infectar a la planta de maíz.



III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Como se mencionó anteriormente el consumo y la producción de maíz en nuestro país es de gran relevancia, sin embargo ambas actividades pueden verse afectadas por *Fusarium verticillioides*, por lo que el estudio del maíz y su interacción con dicho hongo es un tema que sin duda debe ser abordado.

En nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* durante la germinación de embriones de maíz a varios niveles. ¿Por qué la germinación? Se escogió el proceso de la germinación debido a que es un sistema en el que, en corto tiempo, se tiene información sobre los eventos que el hongo está afectando, ya que a las 24 h de haber colocado el embrión de maíz en Agar, se obtiene la salida de la radícula, es decir, la germinación ha concluido (Bewley, 1997). Además conocemos algunos de los eventos que ocurren durante la germinación en cuanto al metabolismo de carbohidratos, esto es, una desaparición acelerada de la sacarosa presente tanto en ejes embrionarios y embriones en las primeras 18 h de la germinación (Martínez-Marcelo, 2008), el incremento de la sacarosa en los embriones posterior a este tiempo de germinación, debida a la movilización del carbono de los lípidos de reserva del escutelo hacia la formación de carbohidratos (Martínez-Marcelo, 2008; Luna-Loaiza, 2011) y la presencia de un transportador de sacarosa en los embriones de maíz y la posibilidad de encontrar más de un transportador de hexosas tanto en el escutelo como en el eje embrionario (Gómez-Calderas, 2008; Ramírez-Verdejo, 2009; Raya-Sandino, 2011). Sumado a esto se ha encontrado en el laboratorio que durante la germinación de embriones en presencia de *Fusarium verticillioides*, hay una modificación en los contenidos de carbohidratos solubles glucosa y sacarosa, un decremento en el uso de sacarosa al inicio de la infección (previo a las 18h, medido como cantidad de sacarosa presente) y el posterior incremento en su uso y por tanto el aumento en el contenido de glucosa después de las 24 h de exposición al hongo (Luna-Löaiza, 2011; Guzmán-Chávez,



2010). Como se mencionó anteriormente, la síntesis de sacarosa es un evento normal durante la germinación de embriones de maíz, en donde los lípidos almacenados en el escutelo son degradados para ser llevados a la síntesis de carbohidratos a través del ciclo del glioxilato, sin embargo, cuando el hongo se encuentra presente el incremento en la actividad de la enzima se encuentra 8 h antes que en los embriones sin infectar (Luna-Löaiza, 2011), sugerente de un aporte adelantado de carbono para contender a la infección.

Los cambios en los contenidos de carbohidratos en presencia de hongos patógenos han sido reportados con anterioridad y se sugiere que lo que ocurre es que el patógeno está demandando nutrientes de la planta para continuar su crecimiento. Se ha observado que generalmente la planta incrementa sus niveles de invertasas en el apoplasto además de reforzar su pared celular al sintetizar callosa en un intento porque la invasión no continúe, sin embargo, la planta al hacerlo lleva a un incremento de las hexosas en una zona localizada, lo que favorece el crecimiento del hongo (Essman *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010). Otra de las sugerencias es que las hexosas en el apoplasto llevan a elevar el transporte de hexosas en el tejido vegetal (Hayes *et al.*, 2010).

Con esta información se buscó el efecto del hongo en el perfil de expresión de los transcritos para los transportadores de carbohidratos y se encontró que el transportador de sacarosa ZmSUT1 se expresa 6 horas antes cuando el embrión está infectado con *Fusarium verticillioides* y que su nivel máximo de expresión ocurre a las 12 horas de germinación (Guzmán-Chávez, 2010). En cuanto al nivel de transcritos para el transportador de hexosas ZmHT también se observó un adelanto de 6 horas en la expresión de dicho transportador cuando el embrión se encuentra infectado y su máxima expresión, que es a las 12 horas, también se adelanta 6 horas respecto a los embriones no infectados (Guzmán-Chávez, 2010).

Lo anterior sugiere que a tiempos cortos las células del embrión están intentando contender con la invasión por el patógeno, incrementando su



capacidad de uso de glucosa y su transporte. Para corroborar que el aumento en el RNAm se traduce en un incremento en el transporte de los carbohidratos, se hace necesario medir el transporte de ambos carbohidratos en presencia de *Fusarium verticillioides* en embriones de maíz.

Para cumplir el objetivo del trabajo se estableció una metodología para la determinación de la toma de azúcares en tejido embrionario de maíz y se caracterizó la actividad de transporte, es decir, cuál era la contribución del transporte difusional y del transporte activo secundario en los embriones.



IV. HIPÓTESIS

Debido a que los transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas, ZmSUT1 y ZmHT se inducen al inicio de la infección de embriones de maíz con *Fusarium verticillioides*, entonces se espera que la actividad de transporte de sacarosa y hexosas aumente al inicio de la infección con el hongo.



V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de transporte de glucosa en tejido embrionario de maíz y determinar si *Fusarium verticillioides* modifica dicha actividad durante la germinación de embriones de maíz.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la capacidad de transporte de carbohidratos de tejido embrionario de maíz.
2. Evaluar la actividad de transporte de carbohidratos de ejes embrionarios y embriones maduros de maíz a lo largo de la germinación.
3. Determinar si la toma de glucosa y sacarosa es difusional o activa.
4. Medir el efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en la toma de glucosa.
5. Medir el efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en la toma de sacarosa.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó y comparó la capacidad de transporte de glucosa y sacarosa tanto de ejes, embriones maduros e inmaduros. Adicionalmente se obtuvo la contribución de la toma de azúcares por el transporte difusional y por el transporte activo. Por otra parte, se determinó durante la germinación de embriones si la infección por *Fusarium verticillioides* ocasionaba un cambio en la toma de glucosa y/o sacarosa (Figura 7).

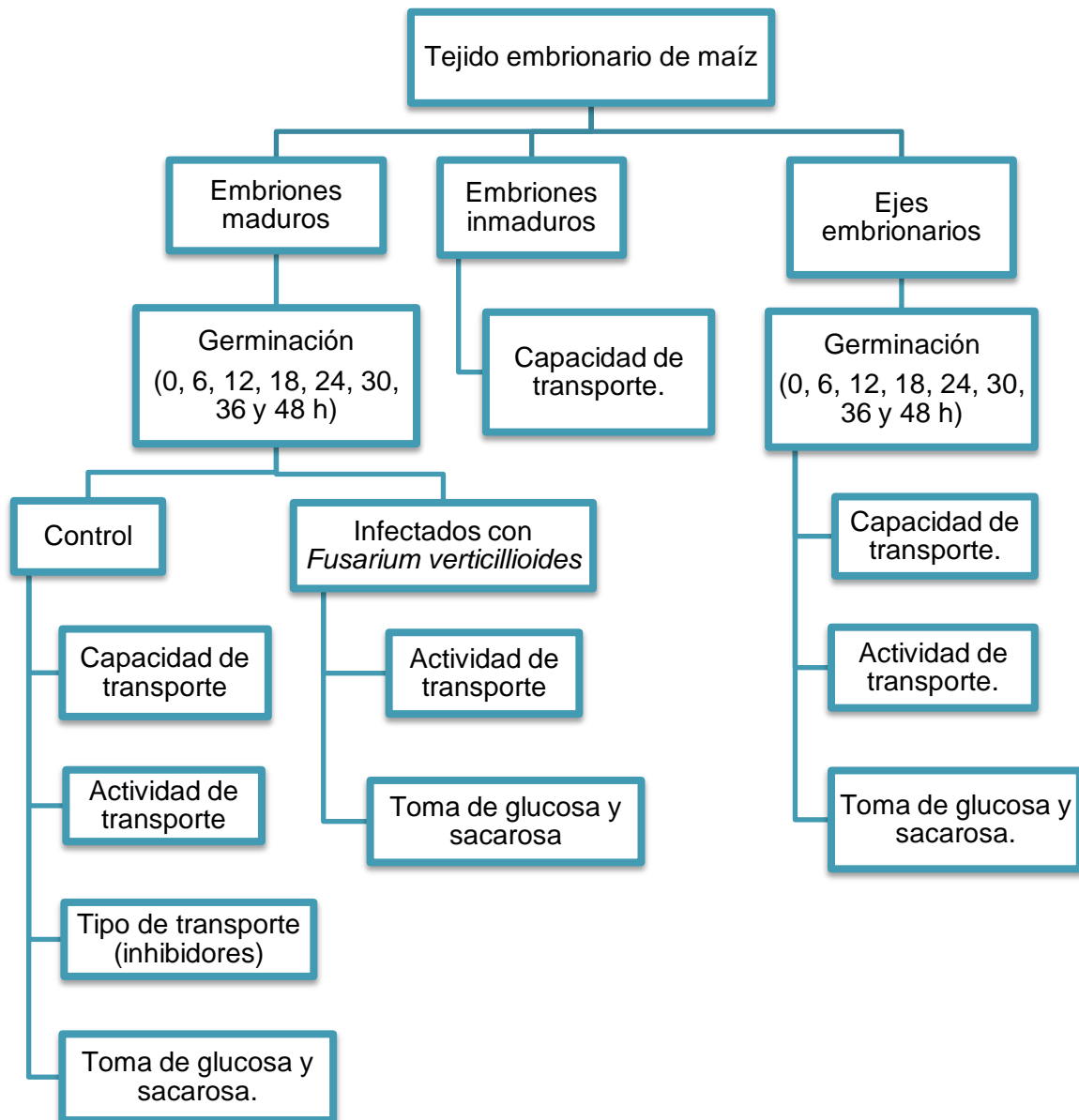


Figura 8. Esquema general de trabajo.



VII.1 Material biológico

Se obtuvieron embriones maduros y ejes embrionarios de maíz mediante extracción manual con navaja. Se refrigeraron a 4°C hasta su uso. Por otro lado se obtuvieron embriones inmaduros de una mazorca de maíz. La extracción se realizó manualmente desprendiendo un grano de maíz y oprimiéndolo hasta obtener el embrión inmaduro.

VII.2 Germinación de embriones y ejes embrionarios de maíz

Desinfección del material biológico. Tanto los embriones maduros como los ejes embrionarios de maíz se sometieron a un proceso de lavado con hipoclorito de sodio al 2%, agitándolos vigorosamente durante unos minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua estéril desionizada hasta que el olor del hipoclorito de sodio desapareció. Por último se dejaron secar en papel filtro estéril.

Germinación. Los embriones maduros y ejes embrionarios ya desinfectados se embebieron en cajas Petri estériles con agar al 1%. Se incubaron a 29°C en obscuridad en una incubadora Incubator Lab-Line por 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 horas. Para la germinación de embriones infectados con *Fusarium verticillioides* se realizó el mismo procedimiento antes descrito, salvo que antes de incubarse, cada embrión se inoculó con 10.0 µL de la suspensión de conidios previamente calibrada.

VII.3 Obtención del concentrado de conidios y calibración del inóculo del patógeno *Fusarium verticillioides*

Se agregaron 5.0 mL de agua desionizada estéril a una caja petri que contenía la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* en Agar Papa Dextrosa 0.5 X con tres semanas de crecimiento, la cual produce altos niveles de fumonisinas. Posteriormente la caja se colocó en agitación constante y moderada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se colectó la



“suspensión de conidios” en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles y se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos a 4° C en una centrífuga Universal 320 R Heitich Zentrifugen. Las tres cuartas partes de sobrenadante de cada tubo obtenido se desecharon y se resuspendieron los botones, los cuales se juntaron en otro tubo eppendorf estéril y se aforó a 1.5 mL con agua desionizada estéril. Nuevamente se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos a 4° C, desechando de igual forma el sobrenadante y resuspendiendo el botón en 1.0 mL de agua estéril desionizada para obtener finalmente la “suspensión concentrada de conidios”.

Con esta suspensión concentrada de conidios se realizó una dilución 1:100 con agua destéril desionizada, tomando de ella 10.0 μ L para cargar la Cámara de Neubauer y realizar el conteo de conidios en cada uno de los cuadrantes con un microscopio óptico Olympus CH30 (Anexo III: Fórmulas y Cálculos; Guzmán-Chávez, 2010). Con los datos obtenidos del conteo se calculó el volumen necesario de la suspensión concentrada de conidios que se necesitaba para preparar un inóculo de 6 500 conidios/ μ L (Anexo III: Fórmulas y Cálculos; Guzmán-Chávez, 2010). Finalmente del inóculo preparado, se emplearon 10.0 μ L (65 000 conidios) para inocular a cada embrión como se mencionó anteriormente, los cuales se vertieron a lo largo de toda la superficie del tejido antes de proceder a germinar.

VII.4 Estandarización de la metodología para la toma de carbohidratos

Se realizaron dos curvas de glucosa para determinar la cantidad de [14 C-glucosa] (glucosa caliente) y el tiempo óptimo de incubación con dicho carbohidrato para medir la toma de glucosa en los distintos tejidos embrionarios de maíz. Las lecturas de Cuentas Por Minuto (CPM) fueron obtenidas por la técnica de centelleo líquido (véase *Anexo II: Técnica de centelleo líquido y calibración del equipo*) (Bombém AM, 1997).



Determinación de la cantidad de [¹⁴C-glucosa] en tejido completo

Se emplearon 3 embriones con 24 horas de germinación. Cada uno de los embriones se sumergió en 500.0 µL del medio de reacción para toma de glucosa (véase *Anexo III: Reactivos y soluciones*) más 5.0, 10.0, 15.0 ó 20.0 µL de glucosa caliente, que equivalen a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µCi respectivamente, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (25° C aproximadamente). Posteriormente se lavaron en el medio de lavado para glucosa (véase *Anexo III: Reactivos y soluciones*) y se dejaron secar en papel filtro durante unos minutos. Una vez secos se colocaron en un tubo eppendorf y les agregó 500.0 µL de un medio de lisis (H₂O₂:HClO₄ en una proporción de 2:1). Se dejaron en el medio de lisis durante 5 horas, agitándolos esporádicamente para promover la lisis celular. Por último se tomaron 100.0 y 200.0 µL de la solución de lisis y se vertieron en viales de centelleo que contenían 3.0 mL de líquido de centelleo (véase *Anexo III: Reactivos y soluciones*). Se leyeron las muestras durante 3 minutos cada una detectando únicamente ¹⁴C, en un Contador de Centelleo Multi-Purpose Scintillation Counter LS 6500 Beckman Coulter que fue calibrado previamente (véase *Anexo II: Técnica de centelleo líquido y calibración del equipo*).

Las CPM obtenidas se procesaron para obtener los pmol de glucosa que tomo el tejido a las distintas cantidades agregadas de [¹⁴C-glucosa] (véase *Apéndice IV: Cálculos*) y se realizó una gráfica con el promedio de los datos obtenidos para los 100.0 y 200.0 µL leídos (Figura 9).

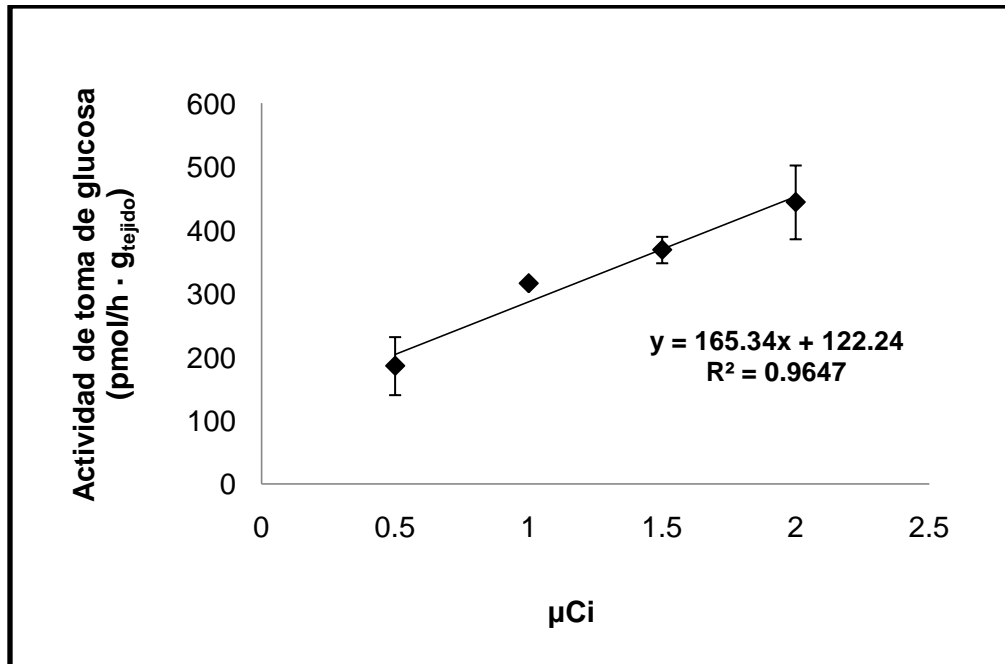


Figura 9. Efecto de la cantidad de $[^{14}\text{C}]$ glucosa] añadida en la toma de glucosa de los embriones de maíz.

Como se puede observar el coeficiente de correlación es aceptable y muestra una tendencia lineal, de modo que a mayor cantidad de glucosa añadida la toma de glucosa por parte del embrión es mayor y por lo tanto las cuentas obtenidas son más grandes como se muestra en la tabla 1, sin embargo para fines económicos se tomó un punto intermedio en la recta, 1.0 μCi , en donde si bien la actividad de glucosa no es muy grande, las cuentas obtenidas son aceptables.

| Cantidad de $[^{14}\text{C}]$ glucosa] (μCi) | Promedio de CPM | Promedio de la actividad de glucosa ($\text{pmol/h} \cdot \text{g}_{\text{tejido}}$) |
|---|-----------------|--|
| 0.5 | 941.9 | 186.2 |
| 1.0 | 1507.6 | 316.2 |
| 1.5 | 1788.6 | 369.1 |
| 2.0 | 2097.0 | 444.2 |

Tabla 1. Comparación entre las CPM obtenidas y la actividad de toma de glucosa obtenida en los embriones.

Determinación del tiempo óptimo de incubación con [¹⁴C-glucosa]

Para determinar un tiempo óptimo de incubación en la toma de glucosa, la actividad de glucosa se determinó en unidades de pmol de glucosa por gramo de tejido. Se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente, empleando 3 embriones germinados por 24 horas, cada uno de los embriones se sumergió en 500.0 μL de un medio de reacción para medir la toma de glucosa del tejido adicionado de 5.0 μL de glucosa caliente y se incubaron por 5, 10, 15, 30, 45 ó 60 minutos a temperatura ambiente (25° C aproximadamente). La gráfica mostrada a continuación también es un promedio de los datos obtenidos con 100.0 y 200.0 μL de la lisis (Figura 9).

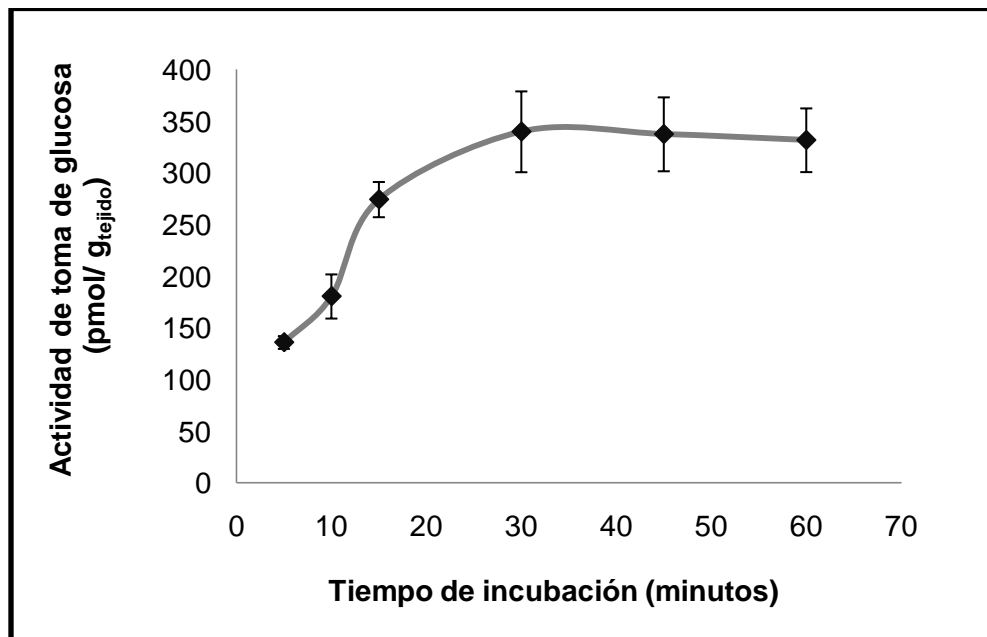


Figura 10. Determinación del tiempo de incubación óptimo para determinar la toma de glucosa radiactiva por los embriones de maíz.

A tiempos cortos de incubación la toma de glucosa aumenta progresivamente (Figura 10), sin embargo, alrededor de los 15 minutos la toma de glucosa ya no es tan rápida y empieza a permanecer constante después de los 30 minutos e incluso se puede observar una ligera disminución probablemente debida



al metabolismo del carbohidrato por parte del embrión. Por tal motivo se decidió que a los 10 minutos, cuando la toma de glucosa está aumentando rápidamente, era un tiempo óptimo para medir la toma de glucosa, ya que a ese tiempo se podrían observar los cambios que pudieran presentarse a lo largo de la germinación en ausencia y presencia del hongo. Se compararon también las actividades de toma de glucosa con las CPM, solo para corroborar que las CPM fueran altas y minimizar el error debido a la medición tabla 2.

| Tiempo de incubación (min) | Promedio de CPM | Promedio de la actividad de glucosa (pmol/ g _{tejido}) |
|----------------------------|-----------------|--|
| 5 | 1233.9 | 136.0 |
| 10 | 1609.9 | 180.5 |
| 15 | 2479.6 | 274.3 |
| 30 | 3033.9 | 339.9 |
| 45 | 3018.9 | 337.5 |
| 60 | 2976.9 | 331.7 |

Tabla 2. Tabla que muestra la relación entre las CPM y la cantidad de glucosa que es tomada por el embrión a las 24 horas de germinación.

VII.5 Determinación de la toma de carbohidratos

Con la estandarización del método, la determinación de carbohidratos se realizó como se describe a continuación.

Se emplearon tejidos embrionarios de maíz (embriones inmaduros, embriones maduros y ejes embrionarios) germinados en presencia o ausencia del hongo *Fusarium verticillioides* y se colocaron en 500.0 μ L del medio de reacción, ya sea para glucosa o para sacarosa (véase Anexo III: Reactivos y soluciones), más lo equivalente a 1.0 μ Ci del carbohidrato caliente. Para los ensayos de glucosa la cantidad añadida de glucosa caliente fue de 10.0 μ L, mientras que para los ensayos de sacarosa la cantidad añadida de [¹⁴C-sacarosa] (sacarosa



caliente) fue de 13.0 μL (los cálculos para esta determinación se muestran en el *anexo IV: Cálculos*). Posteriormente se dejaron incubar durante 10 minutos y transcurrido este tiempo se lavaron en el medio de lavado para glucosa o para sacarosa (véase *Apéndice III: Reactivos y soluciones*). Después se dejaron secar en papel filtro durante unos minutos y luego cada tejido se colocó en un tubo eppendorf donde se le añadió 500.0 μL del medio de lisis previamente descrito. Finalmente se tomaron 300.0 μL de la lisis y se colocaron en viales de centelleo más 3.0 mL de líquido de centelleo. Las muestras se leyeron en el Contador de Centello, determinando únicamente Carbono 14 y con un tiempo de lectura de 3 minutos para cada muestra. Cabe destacar que para cada tiempo de germinación se emplearon al menos 3 tejidos embrionarios de maíz.

VII.6 Determinación del tipo de transporte mediante el uso de inhibidores y protonóforos.

Efecto del CCCP en la toma de glucosa por los embriones

Debido a que la toma de glucosa por los embriones puede ser por un transporte difusional facilitado o un transportador activo secundario, se empleó la estrategia de adicionar un reactivo que equilibra las concentraciones de protones a través de la membrana, por lo que se conocería la contribución a la toma de glucosa del transporte difusional al inhibir el transporte activo. Se emplearon embriones maduros germinados por 24 horas y se colocaron en un medio de incubación que contenía glucosa y suplementado en el medio con una solución de Carbonil Cianuro-m-CloroFenilhidrazona (CCCP; ionóforo para protones) a las concentraciones de 10.0, 50.0, 100.0 y 200.0 μM . La determinación prosiguió como se describe en la determinación de la toma de carbohidratos.

Efecto del CCCP y del PCMBS en la toma de sacarosa por los embriones

Se emplearon embriones maduros con 24 horas de germinación, adicionándolos a un medio que contenía sacarosa y CCCP, éste último a las concentraciones de 10.0, 50.0 y 100.0 μM , para inhibir el transporte activo secundario (Alberts, 2004).



Además se usó el ácido p-CloroMercuriBencenSulfónico (PCMBS) como reactivo modificador de grupos sulofidrido y que se conoce inhibe al transportador de sacarosa- H^+ , si bien no es un reactivo que solo inhibe al transportador de sacarosa, si es empleado para este fin en la literatura (Lichtner y Spanswick, 1981). El PCMBS se agregó de igual modo al medio de reacción para sacarosa a las concentraciones de 500.0 μ M, 2.5 mM y 5.0 mM. La determinación prosiguió como se describe en la determinación de la toma de carbohidratos.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Evaluación de la capacidad de transporte de carbohidratos de tejido embrionario de maíz

Inicialmente se midió la actividad de glucosa y sacarosa en tejido embrionario de maíz no germinado para poder elucidar la demanda de carbohidratos en dichos tejidos y poder inferir sobre la capacidad que tienen de transportar carbohidratos.

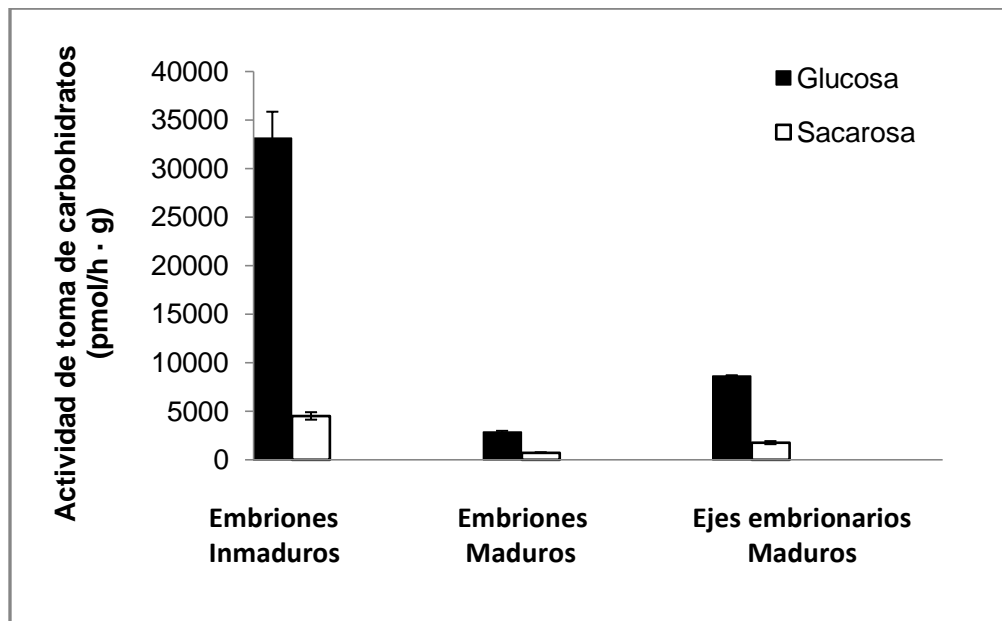


Figura 11. Toma de carbohidratos en diferentes tejidos embrionarios de maíz.

Al comparar la actividad de toma de glucosa con la de sacarosa en los diferentes tejidos, encontramos que la toma de glucosa es mayor a la de sacarosa en los tres tejidos examinados (Figura 11). Los embriones inmaduros presentan la mayor capacidad de toma de carbohidratos, tanto de glucosa como de sacarosa, siendo en el caso de glucosa alrededor de 6 veces que la encontrada en los embriones maduros y de 3.5 veces más que en los ejes embrionarios. En cuanto a



la sacarosa es 5 y 2.5 veces menor en embriones maduros y ejes embrionarios, respectivamente, comparados con los embriones inmaduros. Lo anterior no es sorprendente, ya que generalmente los embriones inmaduros presentan una mayor demanda de carbohidratos por encontrarse en la embriogénesis, llevando el carbono tomado de la planta madre hacia los reservorios que proveerán los esqueletos carbonados en la siguiente etapa del desarrollo, la germinación (Bradford, 2004; Nonogaki, 2010). Mientras que los tejidos ya maduros, ejes embrionarios y embriones maduros, contienen las reservas de carbono almacenadas en forma de aminoácidos, lípidos y carbohidratos que serán hidrolizados o usados en forma de monómeros durante la germinación hasta que la semilla se convierta en una plántula capaz de llevar a cabo la fotosíntesis (Bradford, 2004; Nonogaki, 2008).

VIII.2 Evaluación de la actividad de transporte de carbohidratos de ejes embrionarios y embriones maduros de maíz a lo largo de la germinación

Se evaluó la actividad de transporte de carbohidratos en los ejes embrionarios y de embriones maduros de maíz durante el proceso de germinación (Figuras 12 y 13). Se encontró que la toma de glucosa en los ejes embrionarios se incrementa 2 veces de 0 hasta las 12 horas, para posteriormente mantenerse constante hasta las 48 horas de germinación. Mientras que los embriones tienen una capacidad de toma de glucosa a las 0 horas 3 veces más baja que los ejes embrionarios secos. Los embriones aumentan su toma de glucosa cerca de 3 veces de 0 hasta las 18 horas de germinación, sin embargo mantienen constante esta toma hasta las 36 horas de germinación, para posteriormente incrementarse. Es de notarse que a pesar de que los embriones incrementan su toma de glucosa nunca alcanzan la capacidad de toma de glucosa de los ejes embrionarios. Es probable que el eje embrionario necesite de una toma de carbono alta ya que es el tejido que lleva a cabo la mayor actividad metabólica durante la germinación, a partir de él emerge la raíz y el tallo de la plántula (Nonogaki, 2008).

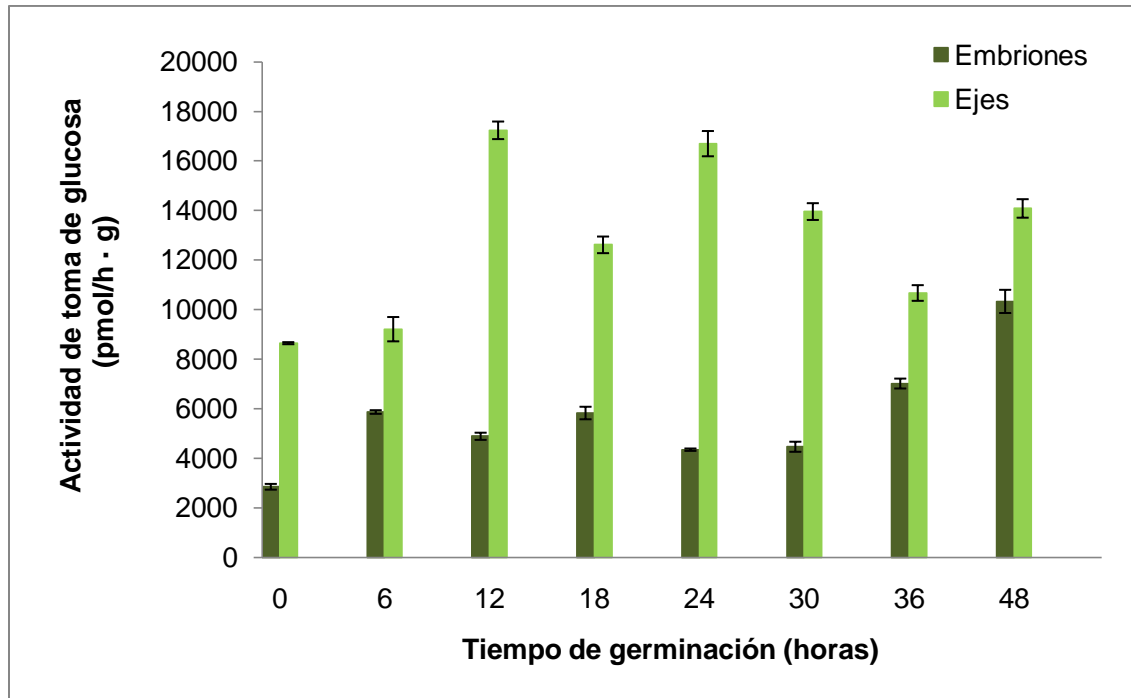


Figura 12. Actividad de la toma de glucosa durante la germinación de embriones maduros y ejes embrionarios.

Por otra parte la toma de sacarosa, aunque menor que la de glucosa, también muestra un patrón similar al mostrado para la toma de glucosa. Es decir, más alta la toma del carbohidrato en los ejes que en los embriones (Figura 13).

La toma de sacarosa por los embriones es constante hasta las 30 horas y a diferencia de la toma de glucosa se incrementa ligeramente en los dos últimos tiempos. Mientras que la toma de sacarosa es mayor en ejes embrionarios, observando un incremento importante a las 6 horas y a los últimos tiempos de germinación. Esto hace suponer que a diferencia de la glucosa, que se está empleando desde el inicio por parte de los ejes embrionarios, la sacarosa parece estar transportando al final de la germinación. Lo anterior sería plausible, ya que hemos observado en estudios anteriores a este, que al inicio de la germinación tanto los embriones como los ejes consumen su reserva de sacarosa casi a su totalidad a las 18 horas de la germinación y que los embriones son capaces de sintetizar a partir de este tiempo más sacarosa con el carbono de sus lípidos de

reserva, probablemente para transportarlos hacia el eje embrionario en crecimiento (Martínez-Marcelo, 2008; Luna-Loaiza, 2011).

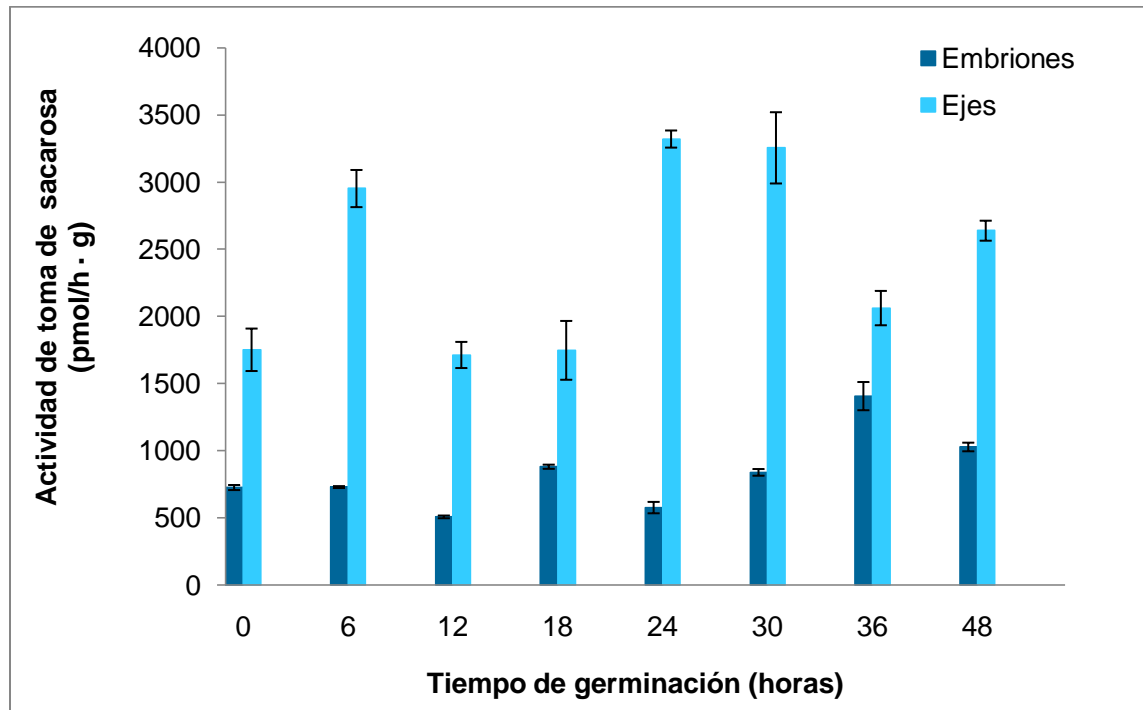


Figura 13. Actividad de la toma de sacarosa en embriones maduros y ejes embrionarios durante la germinación.

La evaluación de la actividad de transporte de glucosa y de sacarosa se llevo a cabo no solo con el fin de observar la toma de ambos carbohidratos por parte de los tejidos embrionarios, sino también para obtener el comportamiento de toma de carbohidratos de ambos tejidos en ausencia del patógeno *Fusarium verticillioides*.

VIII.3 Determinación del tipo de transporte mediante el uso de inhibidores

Para determinar si la toma de glucosa y sacarosa en embriones maduros era difusional o activa se emplearon dos compuestos el CCCP y el PCMBS a diferentes concentraciones. Se sabe que el CCCP es un iónoforo para protones, el

cual se encarga de igualar las concentraciones de protones en ambos lados de la membrana y por tanto es útil para inhibir el transporte activo secundario, ya que éste es impulsado en plantas por el movimiento de protones (Williams *et al.*, 1990; Alberts, 2004). Por su parte el PCMBs es un reactivo que reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, y en particular inhibe la despolarización de la membrana dependiente de sacarosa, es decir directamente inhibe a una proteína transportadora de sacarosa dependiente de protones (transporte activo; Lichtner y Spanswick, 1981).

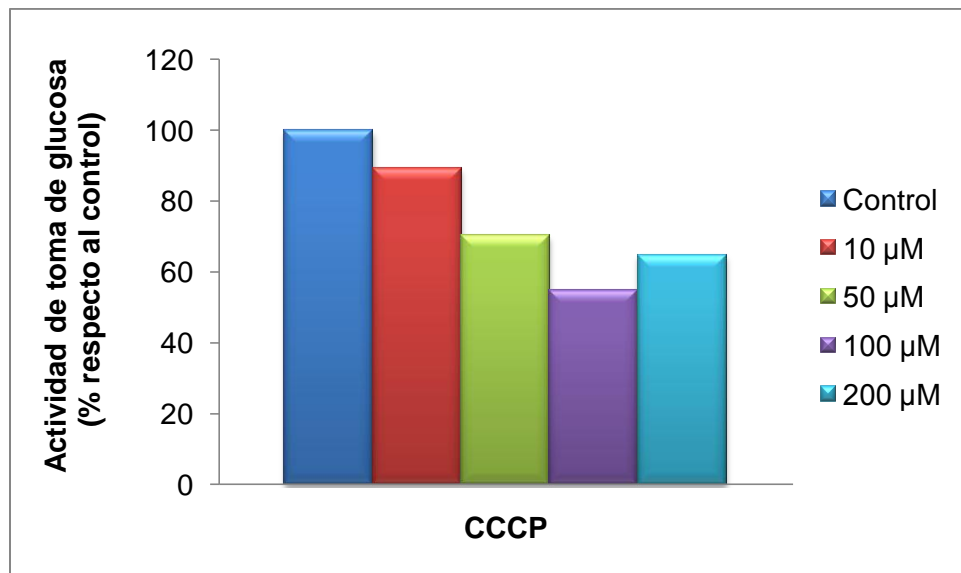


Figura 14. Efecto del CCCP sobre la toma de glucosa de embriones germinados por 24 h.

Para determinar la contribución al transporte en glucosa en embriones, se adicionó al medio de toma de glucosa CCCP. Se encontró que conforme se aumenta la concentración de CCCP hay una reducción de la toma de glucosa, para llegar a aproximadamente 50% de actividad de transporte en presencia del inhibidor respecto al control (100 μM CCCP; Figura 14). Adiciones mayores a 100 μM no aumentan la inhibición por lo que se predice que la toma de glucosa en los

embriones tiene una contribución cercana al 50% por el transporte por difusión y el restante 50% por el transporte de tipo activo secundario.

Por otro lado se examinó el efecto que tiene el CCCP en la toma de sacarosa por los embriones maduros con 24 de germinación. En este caso solo se observó que el CCCP inhibió aproximadamente un 15% la actividad de transporte. Sin embargo, es difícil con esto asegurar que el 85% restante solo se deba al transporte difusional, ya que se conoce que el transportador de sacarosa de maíz puede ser un transportador de sacarosa con protones hacia el interior de la célula (transportador activo secundario) o bien realizar un transporte difusional en salida cuando las condiciones fisiológicas lo requieren (Carpaneto *et al.*, 2005).

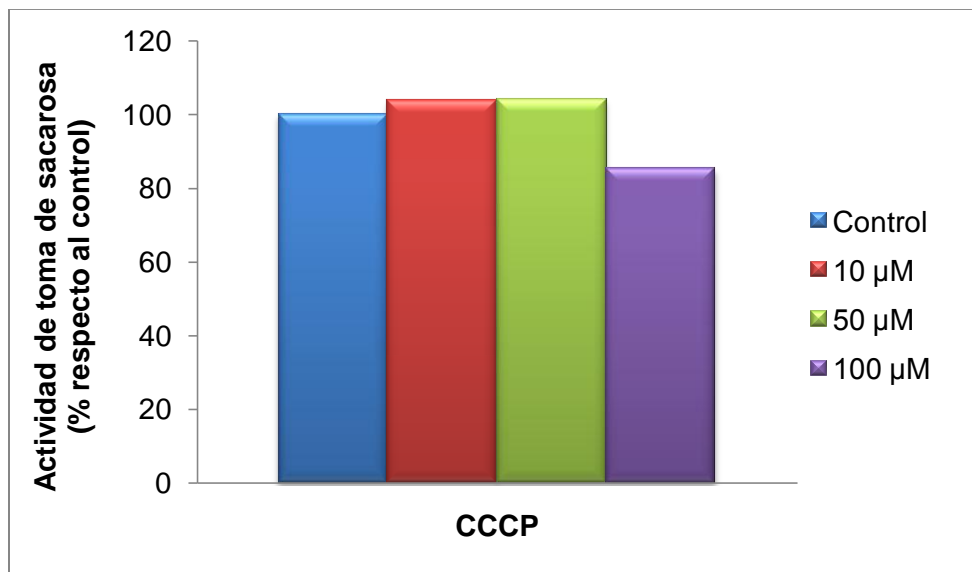


Figura 15. Efecto del CCCP sobre la toma de sacarosa en embriones maduros con 24 de germinación.

Otra forma de medir el efecto sobre el transportador de sacarosa tipo activo fue incubando el tejido en el medio de toma de glucosa adicionado con PCMBS. Del mismo modo el transporte activo secundario de la sacarosa solo se inhibe en un 15% aproximadamente a la concentración de 2.5 mM (figura 16). Tanto el PCMBS como el CCCP no inhiben en más del 15% la toma de sacarosa, por lo

que se pueden pensar que la mayor parte de sacarosa se está transportando vía simplástica en embriones maduros de maíz o bien ya que no lo podemos descartar que el transportador sacarosa- H^+ no esté funcionando metiendo sacarosa a la célula sino transportando hacia los apoplastos.

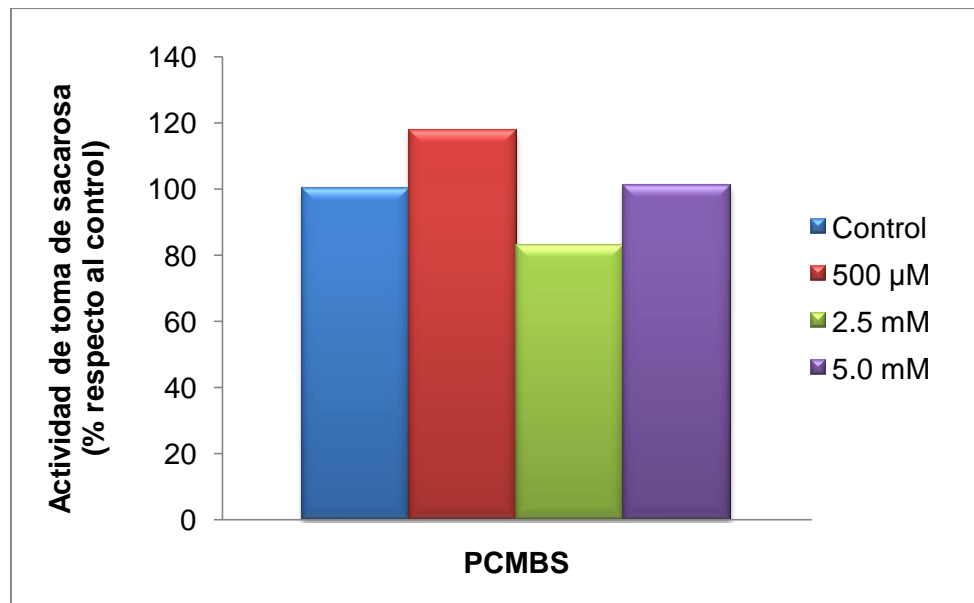


Figura 16. Efecto del PCMBS sobre la toma de sacarosa en embriones maduros con 24 de germinación.

VIII.4 Medición del efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en la toma de glucosa

Para determinar el efecto que tiene *Fusarium verticillioides* sobre la toma de glucosa se infectaron embriones maduros con este hongo y se germinaron a 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 horas (embriones infectados). Para poder comparar el efecto de *Fusarium verticillioides* se midió la toma de glucosa en embriones maduros a las mismas horas de germinación, pero sin la presencia del patógeno (embriones control). La comparación de ambos se muestra en la Figura 17.

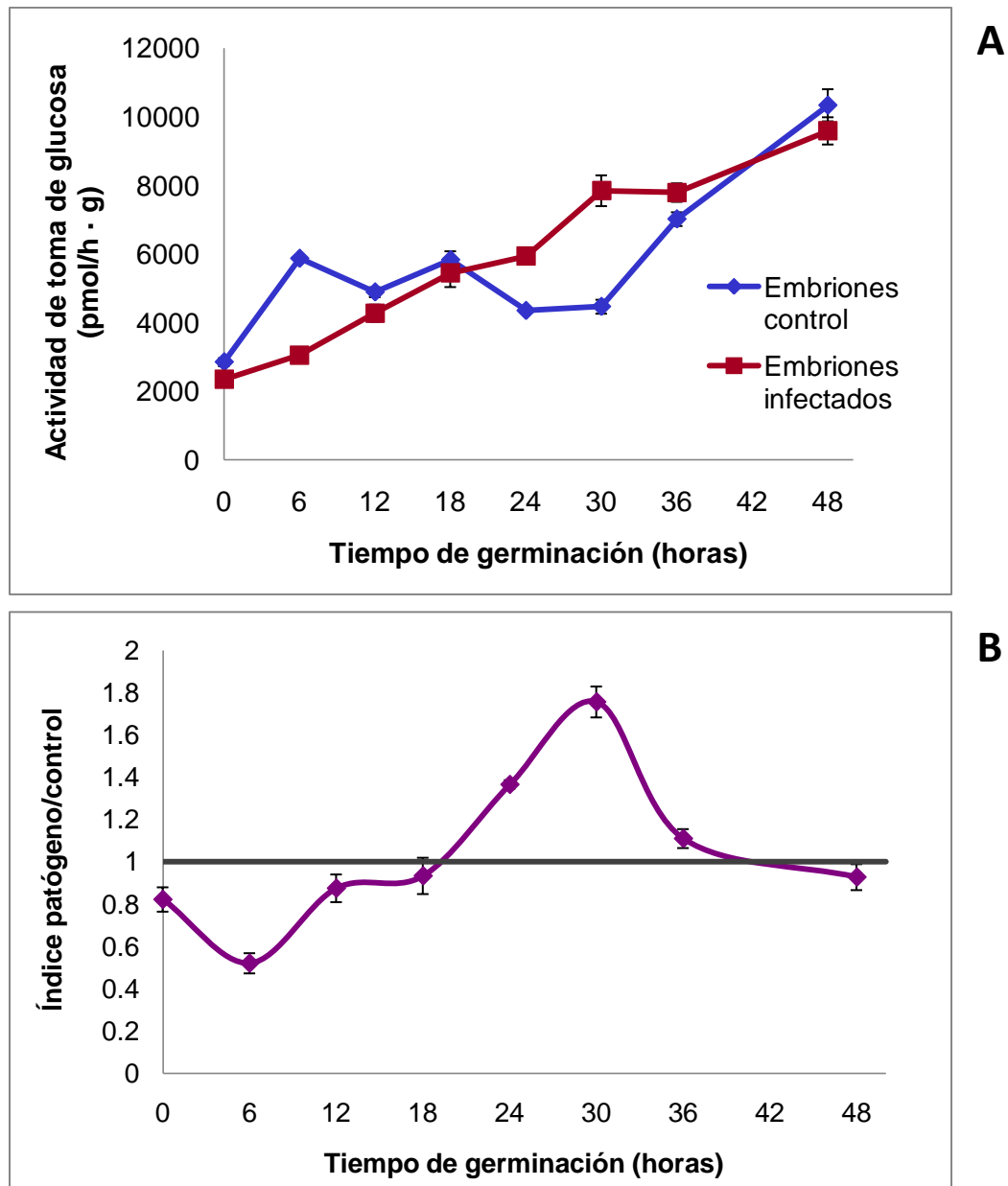


Figura 17. Actividad de toma de glucosa en y sin presencia de *Fusarium verticillioides*. A. Toma de glucosa por los embriones germinados en presencia y ausencia del hongo *Fusarium verticillioides*. B. Índice de la actividad de toma de glucosa de embriones infectados entre la actividad de toma de glucosa de embriones control. Valores diferentes de 1.0 son considerados como cambios inducidos por la presencia del hongo en los embriones.

Se observa que la toma de glucosa en los embriones control aumenta a las primeras 6 horas de germinación para posteriormente mantenerse constante hasta



las 18 horas de germinación, después se reduce ligeramente para a las 36 horas aumentar; mientras que la toma de glucosa en embriones infectados aumenta de manera constante a lo largo de todos los tiempos de germinación (Figura 17A).

Cabe destacar que la toma de glucosa en ningún caso comienza en cero. El índice de toma de glucosa de embriones infectados/embriones control muestra que la toma es menor a las 6 horas, y mayor a las 24 y 30 horas (Figura 17B), esto es, valores diferentes de 1.0 nos muestran diferencias entre los perfiles. A las 24 horas ya se aprecia un crecimiento del hongo en el embrión y es a esta hora donde la toma de glucosa es mayor en comparación con los embriones control como posible consecuencia de la infección. El posterior decremento en presencia del hongo (48 horas) puede deberse a que la infección ya ocasionó un ablandamiento del tejido del embrión.

VIII.5 Medición del efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en la toma de sacarosa

La toma de sacarosa en los embriones sin infectar aumenta ligeramente conforme avanza la germinación y su toma es similar a la toma de glucosa por los embriones infectados solo a las 6 horas de germinación, posteriormente la toma de estos últimos es mayor que en los embriones control, encontrándose dos aumentos importantes a las 18 y 36 horas (Figura 17A).

Como se observa claramente en el índice de toma de sacarosa en los embriones infectados/embriones control hay un incremento en la toma de sacarosa cuando el hongo se encuentra en los embriones (Figura 17B). A diferencia de la toma de glucosa, la toma de sacarosa se modifica desde tiempos cortos de la infección y coincide con lo previamente observado en la expresión del transcrito para el transportador ZmSUT1 (Guzmán-Chávez, 2010).

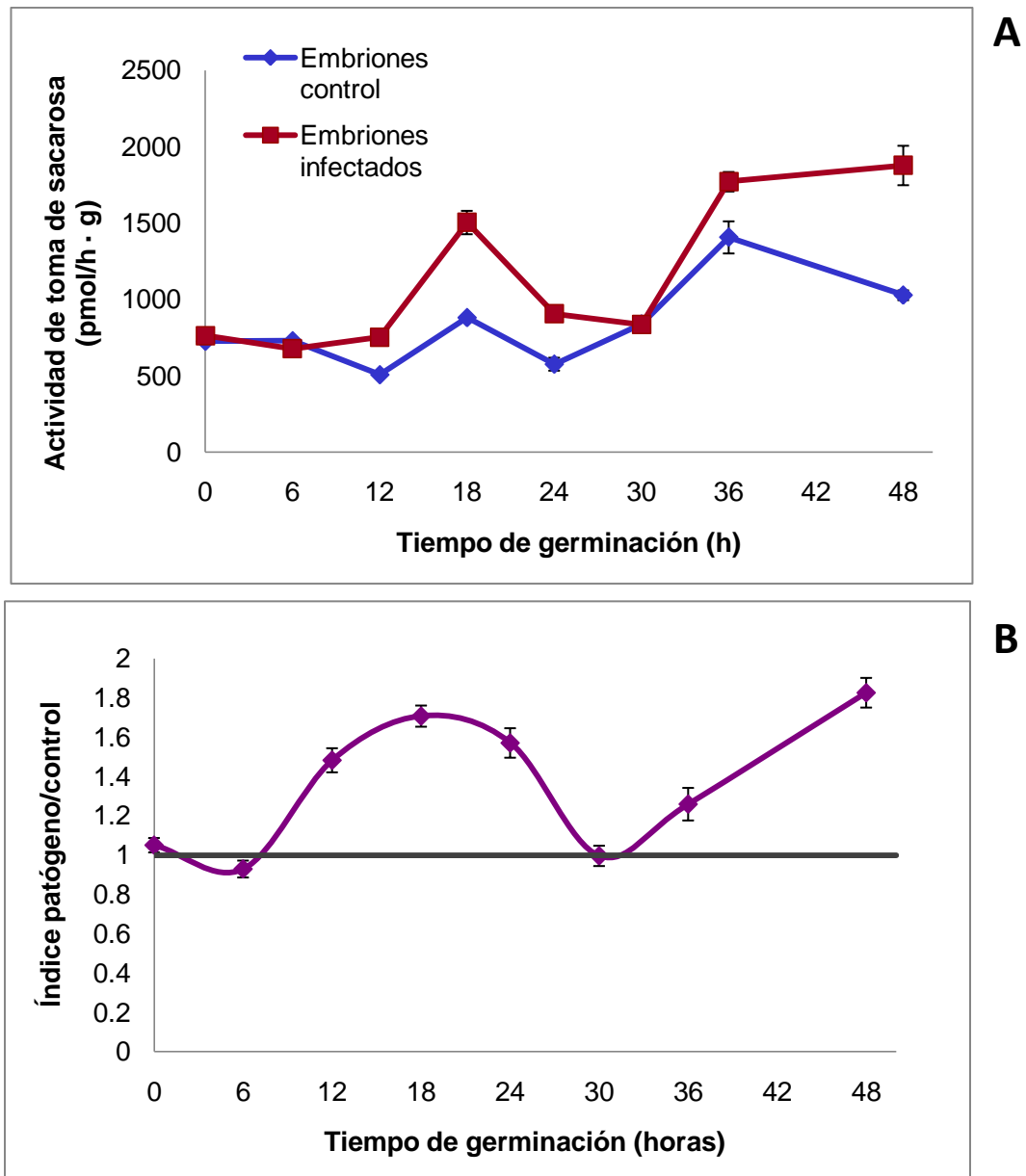


Figura 18. Actividad de toma de sacarosa en y sin presencia de *Fusarium verticillioides*. A. Toma de sacarosa por los embriones germinados en presencia y ausencia del hongo *Fusarium verticillioides*. B. Índice de la actividad de toma de sacarosa de embriones infectados entre la actividad de toma de sacarosa de embriones control. Valores diferentes de 1.0 son considerados como cambios inducidos por la presencia del hongo en los embriones.

Por último se realizó una comparación entre los perfiles de expresión de la actividad de toma de glucosa y sacarosa (Figura 19). Se observa que la toma de glucosa y sacarosa presentan un perfil similar en las primeras 12 horas de

infección con hongo, para después presentar una tendencia opuesta, esto es, se incrementa la toma de glucosa pero disminuya la de sacarosa y luego disminuye la de la toma de sacarosa y aumenta la toma de glucosa.

Es posible que la actividad de transporte de carbohidratos sea muy sensible a la presencia del hongo, ya que a tiempos cortos de la germinación hay un cambio en la toma de glucosa y sacarosa. Siendo la toma de sacarosa la más sensible. Sugerimos que las fluctuaciones en la toma de glucosa y sacarosa a tiempos posteriores a los 18 horas se deben a un ajuste tardío en el contenido de carbohidratos en las células del embrión y mencionamos esto como tardío, ya que el embrión muestra signos de muerte celular (Guzmán-Chávez, 2010).

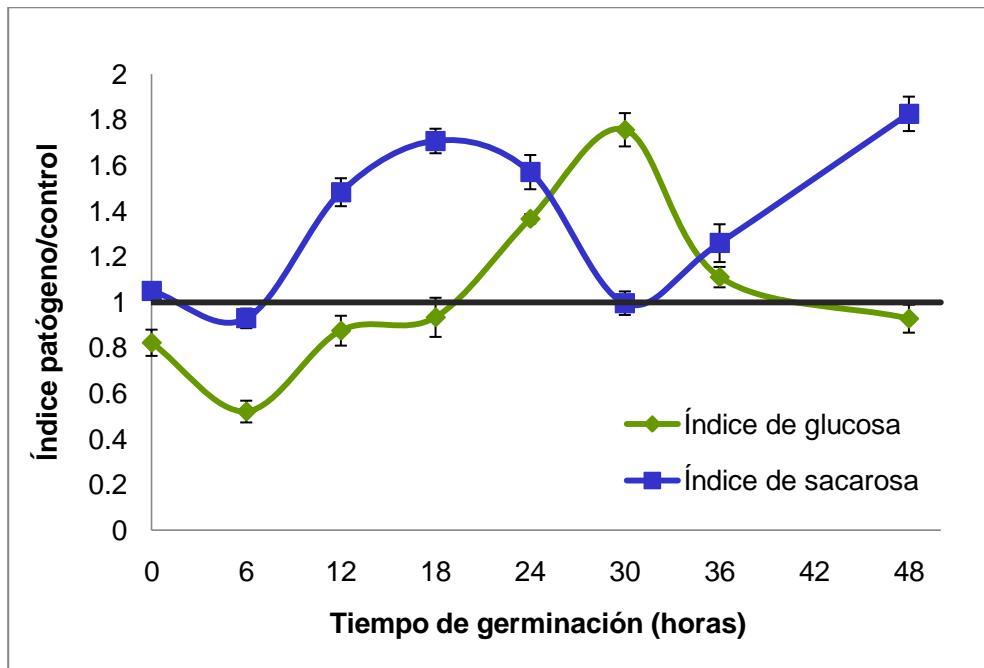


Figura 19. Comparación de los índices de toma de glucosa y sacarosa de los embriones infectados/ embriones sin infectar o control.



IX. DISCUSIÓN

IX.1 Evaluación de la capacidad de transporte de carbohidratos de tejido embrionario de maíz.

Durante las diferentes etapas del desarrollo de las plantas ocurre el movimiento de carbono desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda. Los tejidos fuente producen los fotoasimilados y los transportan a los diferentes tejidos dependiendo de su demanda. Un tejido fuertemente demandante es la semilla, en donde la sacarosa es utilizada directamente para el metabolismo o para ser almacenada temporalmente, ya que las reservas de nutrimentos son usadas en la posterior etapa del desarrollo, la germinación (Weber *et al.*, 1997).

Examinando la capacidad de transporte tanto de glucosa como de sacarosa de los embriones inmaduros y de los tejidos embrionarios maduros de una semilla de maíz, se encontró que, efectivamente, en la etapa del desarrollo de la semilla el embrión inmaduro es un tejido fuertemente demandante de nutrimentos, ya que su capacidad de transporte de carbohidratos fue varias veces mayor a los tejidos embrionarios ya maduros, 6.5 y 3.8 veces más transporte de glucosa que los embriones maduros y los ejes embrionarios, respectivamente. Mientras que para sacarosa fue de 6.2 y 2.5 veces más alto el transporte que para los embriones maduros y los ejes embrionarios, respectivamente. Cabe mencionar que este es el primer trabajo en donde se mide la actividad comparada del transporte de sacarosa y glucosa en embriones en desarrollo y la toma de carbohidratos con el tejido embrionario maduro, lo que nos proporciona información sobre la alta capacidad de transporte del tejido embrionario.

Análisis por microarreglos de los genes que se encienden en embriones de maíz a los 5 días después de la polinización (ddp), muestran que hay una expresión alta de genes que codifican para varios homólogos de transportadores en *Arabidopsis*, como los transportadores de sacarosa, canales de potasio y



transportadores de lisina e histidina (Lee *et al.*, 2002), así que se esperaba desde tiempos muy tempranos del desarrollo de la semilla, que los transportadores de carbohidratos fueran activos.

Por otro lado Griffith y colaboradores (1987) reportaron que la toma de glucosa en embriones de maíz (*Zea mays* L. cv W64A X A619) era 4 y 5.5 veces mayor a los 22 a 32 ddp, respectivamente, comparada con la toma a los 5 ddp. A pesar de ello encontraron que la sacarosa se acumula mayoritariamente en las semillas a esos tiempos, lo que sugiere que la glucosa se está utilizando para almacenarse en parte como sacarosa. A tiempos posteriores (38 ddp) encontraron que la semilla en desarrollo mantiene el contenido de sacarosa, pero el contenido de almidón es 16 veces mayor a este, es decir, ya comienza la acumulación de las reservas en forma de almidón en el endospermo. Resultados similares se encontraron en semillas de *Vicia faba* durante la etapa de pre-almacenamiento o fase I del desarrollo de la semilla, la sacarosa era transportada hacia la semilla en formación, sin embargo las hexosas eran las que preferentemente se transportaban hacia el interior del cotiledón. Es un requisito que al inicio del desarrollo se utilice la glucosa en lugar de la sacarosa, ya que se ha observado que la actividad de las invertasas es alta y que al incubar el tejido en un medio que contiene glucosa se mantiene la velocidad de división pero se dificulta la función de almacenamiento en forma de almidón (Weber *et. al.*, 1997; Glim-Lacy y Kaufman, 2006).

La alta toma de glucosa por parte de los embriones inmaduros usados en este trabajo sugiere que la etapa del desarrollo del embrión aún no se ha completado, y que probablemente la sacarosa que le llega de la planta madre, en condiciones naturales, es hidrolizada por la invertasa de la pared celular para la producción de hexosas necesarias para su metabolismo.

Respecto a la actividad de las invertasas, se conoce que durante la fase de almacenamiento o fase II de *Vicia faba* disminuye considerablemente y la



sacarosa transportada es tomada directamente por los cotiledones para producir productos de reserva como el almidón (Weber *et al.*, 1997). Mientras que para la semilla de maíz se conoce que la supresión de la invertasa de la pared celular ocasiona un fenotipo mutante, mutantes miniatura, semillas que no contienen reservas de almidón y que reducen el tamaño de la semilla a solo 1/5 menor del de la semilla silvestre (Miller y Chourey, 1992).

Por lo anterior, el embrión inmaduro que se utilizó en este trabajo probablemente se encuentra entre las dos primeras fases del desarrollo de la semilla, es decir, entre la fase en donde ocurren las divisiones celulares y la diferenciación de los tejidos (fase I) y la fase en la que se produce la acumulación de los compuestos de reserva, almidón, ácidos grasos y proteínas de reserva (fase II) (Taiz y Zeiger, 2006). Se propone lo anterior ya que la toma de sacarosa es considerablemente menor que la de glucosa (7.3 veces menor). La toma de sacarosa debe ser menor para favorecer el crecimiento del embrión en primera instancia y posteriormente un correcto almacenamiento de reservas en la semilla, ya que se ha demostrado en *Vicia faba* que al embeber cotiledones jóvenes en un alto contenido de sacarosa se favorece el almacenamiento de reservas comparado con el crecimiento (Weber *et al.*, 1997).

De la contribución del transporte simplástico o apoplástico a la toma de azúcares en embriones inmaduros de maíz, se ha encontrado mediante estudios de la toma radiactiva de glucosa en presencia y ausencia de protonóforos que ambos pueden coexistir, sin embargo el transporte mediado por transportadores membranales o apoplástico parece ser más importante (Raya-Sandino, 2011). En arroz se ha encontrado que mutaciones en transportadores de sacarosa no producen fenotipo en plantas maduras pero si en la formación del grano, los granos presentan defectos en el llenado así como retraso en su desarrollo, mostrando la importancia del transporte apoplástico (Lim *et al.*, 2006). Por otra parte en cotiledones en desarrollo de chícharo se encontró que existe tanto



transportador de sacarosa en simporte con protones (transporte activo, PsSUT1) como el difusional (transportadores PsSUF1 y PsSUF4) (Zhou *et al.*, 2009).

IX.2 Evaluación de la actividad de transporte de carbohidratos de ejes embrionarios y embriones maduros de maíz a lo largo de la germinación.

El proceso de germinación de las semillas es interesante de estudiar desde el punto de vista de sus transportadores de carbohidratos, ya que en la semilla se encuentran tanto tejidos fuente de nutrimentos, representados por el endospermo y el escutelo, como tejidos demanda como el eje embrionario, tejido fuertemente demandante de nutrimentos. La movilización de carbono en la semilla inicia con este proceso de germinación, es decir, con la hidratación de la semilla, lo que conlleva a la reactivación de su metabolismo. Se conoce que durante las dos primeras fases de la germinación la actividad metabólica es alta ya que se prepara para la división y expansión celular y que visiblemente culminan con la emergencia de la radícula o el final de la germinación (Bradford, 2004; Bewley, 1997; Hiroyuki, *et al.*, 2010; Nonogaki, 2008). No obstante en muchos estudios en los que indican que realizaron experimentos durante la germinación, la fase que realmente están estudiando es posterior, ya que la radícula ya emergió y la plántula está cercana a ser fotosintéticamente competente (Aoki *et al.*, 2006).

IX.2.1 Toma de glucosa

La toma de glucosa tanto de embriones maduros como de ejes embrionarios al tiempo cero representa la capacidad que tiene el tejido de embrionario de tomar azúcares, actividad necesaria desde el inicio de la germinación. La toma de glucosa que se encontró fue 3 veces mayor en ejes embrionarios que en embriones maduros, actividad de toma que se explica considerando que los ejes son un tejido demanda. El carbono lo utilizará como fuente de energía y para la síntesis de biomoléculas que llevarán a la emergencia de la radícula (Taiz y Zeiger, 2006).

En el laboratorio se ha demostrado que los embriones de maíz contienen transportadores de hexosas en sus membranas plasmáticas, ya que anticuerpos específicos contra estos detectan proteínas en los embriones a lo largo de la germinación (Ramírez-Verdejo, 2009). Evidencia adicional de la presencia de transportadores de hexosas en la germinación la encontró Guzmán-Chávez (2010), quien realizó el análisis de expresión de un transcrito para un transportador putativo de hexosas de maíz. Guzmán-Chávez encontró que aumenta el nivel de transcritos conforme transcurre el tiempo de germinación, para después de las 36 h decrecer (Figura 20).

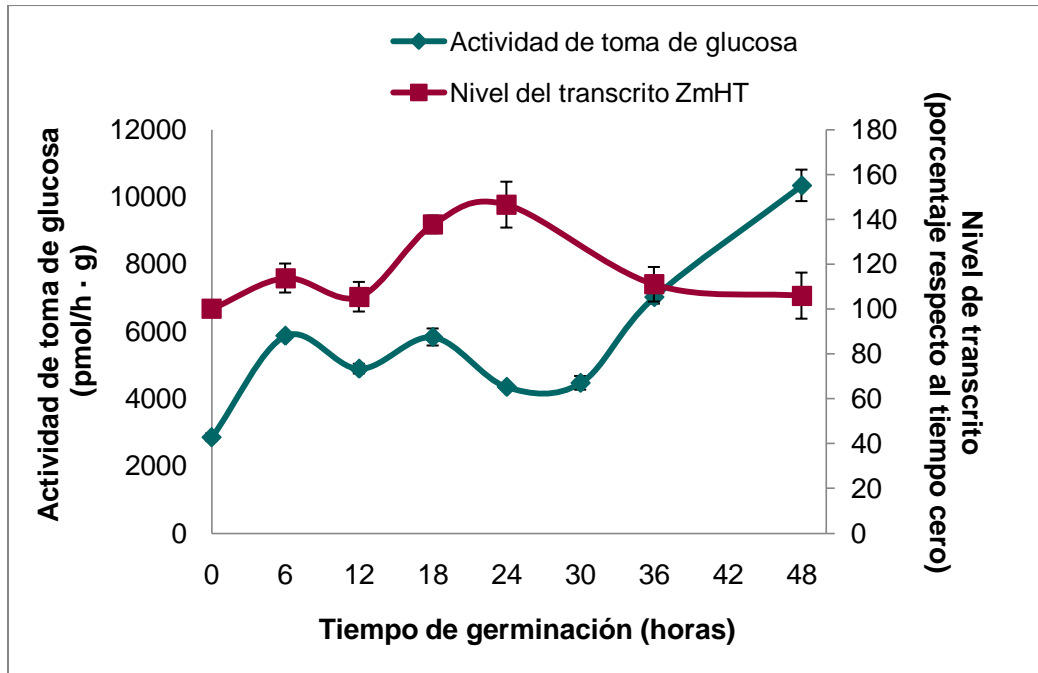


Figura 20. Comparación de los niveles de transcrito para el transportador putativo ZmHT con la toma de glucosa durante la germinación de embriones maduros de maíz. Datos del transcrito fueron tomados del trabajo de Guzmán-Chávez (2010) y los de la toma de glucosa pertenecen a este trabajo.

Al comparar los datos de los niveles de transcritos (Guzmán-Chávez, 2010) con los obtenidos en este trabajo sobre la actividad de transporte de hexosas en los embriones completos (Figura 20), se encontró que hay coincidencia en los



patrones de expresión del transcrito y los niveles de actividad de toma de glucosa hasta las 18 horas. Después de este tiempo el transportador disminuye su expresión, mientras que la toma de glucosa aumenta, lo que podría indicar que el transporte de glucosa se está llevando a cabo por difusión pasiva o bien por otro tipo de transporte de hexosas aun no caracterizado.

Para confirmar que existen dos tipos de transporte después de las 24 horas de la germinación se midió la actividad de transporte o incorporación de glucosa radiactiva en presencia o ausencia de un iónoforo para protones (CCCP), lo cual demostraría que la toma de hexosas depende del paso de protones (transporte activo) o no (transporte difusivo).

Se encontró que la toma de glucosa por los embriones germinados a 24 horas es inhibida aproximadamente un 50% con CCCP, indicando que efectivamente el transporte activo secundario se ve inhibido y que el 50% de la actividad de transporte restante que se observa se está llevando a cabo por transporte difusional. Aoki y colaboradores (2006) señalan que los escutelos aislados de semillas germinadas de maíz presentan un flujo de hexosas que parece ocurrir por difusión pasiva.

IX.2.2 Toma de sacarosa

En estudios realizados con embriones maduros de distintas semillas se ha encontrado que la concentración de sacarosa en el tejido embrionario al inicio de la germinación es mucho mayor que la glucosa y la fructosa y que es empleada para su metabolismo al iniciar la germinación (Aoki *et al.*, 2006; Matsukura *et al.*, 2000; Martínez-Marcelo, 2008). Si bien la sacarosa no representa la principal fuente de reserva de la semilla como lo es el almidón y no se compara con este último en cantidad, si es una fuente importante de carbono al inicio de la germinación, ya que el almidón que se encuentra principalmente en el endospermo se usa poco tiempo antes de iniciar la fase III de la germinación o la también llamada fase postgerminativa (Bradford, 2004).



Entonces, si el embrión contiene la sacarosa necesaria para su metabolismo, no necesita tomar la sacarosa del medio al inicio de la germinación. Sin embargo, debemos aclarar que el embrión está formado por el escutelo y el eje embrionario y que el eje embrionario a pesar de contener un abasto suficiente de sacarosa, en cantidades similares a las del escutelo, se las acaba más rápidamente que el escutelo, esto es, a las 8 horas ya ha consumido el 80% de sacarosa que contiene y una vez que esto sucede el eje embrionario necesita del aporte de carbono del exterior (Martínez-Marcelo, 2008).

El escutelo es un tejido muy activo, es capaz no solo de usar la sacarosa interna a través de sus invertasas intracelulares o la sacarosa sintasa (que principalmente hidroliza sacarosa; Martínez-Marcelo, 2008), sino que también degrada sus lípidos para llevar a cabo la síntesis de carbohidratos a través de la activación del ciclo del glioxilato (Luna-Loaiza, 2011) por lo que después de las 18 horas es capaz de elevar su concentración de sacarosa a un valor cercano al 50% del encontrado al tiempo cero de la germinación (Martínez-Marcelo, 2008; Luna-Loaiza, 2011). Además de señalar la actividad metabólica del escutelo, su capacidad de transporte de sacarosa no necesariamente lleva a cabo la actividad de transporte de sacarosa hacia el interior de sus células, sino que tiene la capacidad de exportar sacarosa para la nutrición del eje embrionario y todo ello a través del mismo transportador de sacarosa. Proponemos este tipo de transporte dual, ya que se ha comprobado que este transportador es simportador de protones de sacarosa hacia adentro y también un transportador difusional hacia afuera (Carpaneto *et al.*, 2005).

En este trabajo se evaluó la actividad de transporte de sacarosa tanto en ejes como en embriones de maíz, encontrando nuevamente que el transporte de sacarosa es mayor en los ejes. Este resultado que fue sorprendente, ya que los niveles de transcrito para el único transportador de sacarosa descrito en maíz, ZmSUT1, no se expresan en el eje embrionario, sugiriendo que la toma de sacarosa depende de un transporte difusional en él.

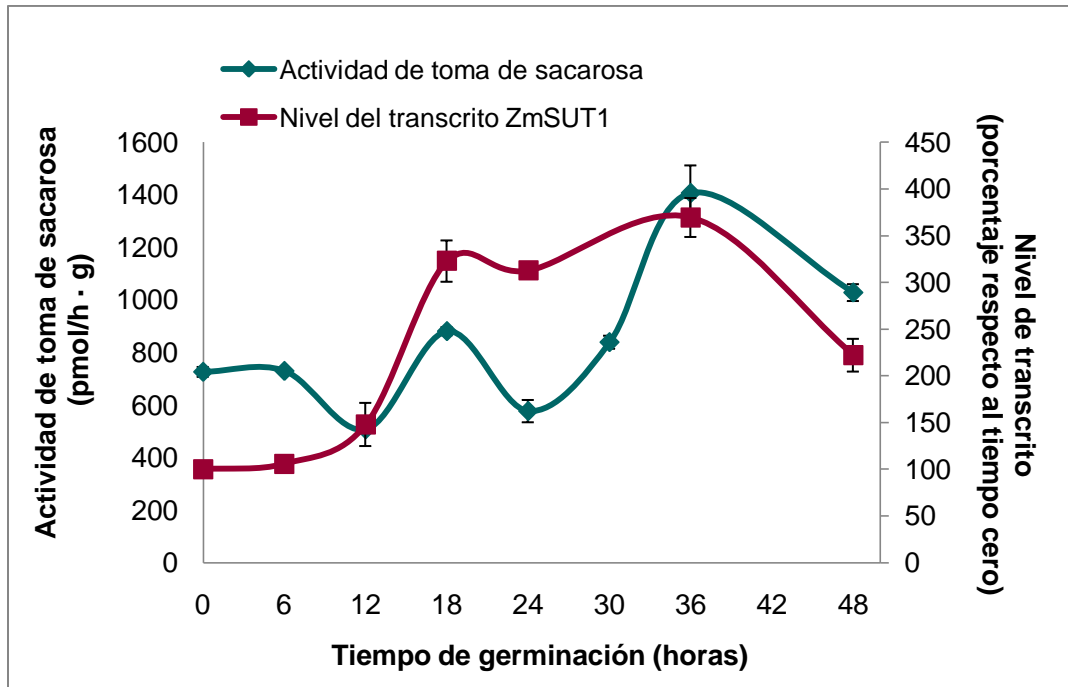


Figura 21. Comparación de los niveles de transcrito para el transportador de sacarosa ZmSUT1 con la toma de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz. Datos del transcrito fueron tomados del trabajo de Guzmán-Chávez (2010) y los de la toma de glucosa pertenecen a este trabajo.

Por su parte, los embriones si presentan un nivel de transcrito que aumenta conforme avanza la germinación (Figura 21), mientras que la actividad de toma de sacarosa desde un inicio de la germinación se encuentra en un valor muy similar hasta las 30 horas de la germinación, si bien hay un pico de actividad a las 18 horas. Posterior a las 30 horas ya hay un incremento en la toma de sacarosa. Probablemente la toma de sacarosa que encontramos sea un reflejo de la capacidad de toma de sacarosa por parte del tejido, pero obviamente no nos dice si el transportador es capaz de mover en eflujo a la sacarosa para nutrir al eje embrionario, ya que para la medición de toma de sacarosa se colocó al embrión en el medio con la $[C^{14}\text{-sacarosa}]$ y después de 10 minutos de incubación se detuvo la reacción, por lo que se midió esencialmente es la entrada y no la salida, ya que al realizar el experimento a tiempos mayores, por ejemplo a 30 minutos, lo que se obtenían eran valores fluctuantes difíciles de interpretar, ya que se tiene una mezcla de actividades, la actividad de entrada de sacarosa, la de salida y la



del probable metabolismo de las células del embrión, ya que se usó el tejido completo.

Sin embargo para evidenciar la posible actividad del transporte difusional en el embrión germinado a 24 horas, se determinó la actividad de transporte en presencia del iónoforo CCCP, al igual que para el transporte de glucosa, en donde al disiparse el gradiente de protones por la presencia del CCCP, se inhibe el transporte de tipo activo. Además del CCCP se utilizó el PCMBS, que comúnmente se usa como inhibidor del transporte de sacarosa.

Al incubar tanto con CCCP como con PCMBS los embriones maduros, la toma de sacarosa solo se inhibió en un 15% a las concentraciones de 100 μM y 2.5 mM respectivamente. Esto supondría que el embrión presenta un transporte de sacarosa en su mayoría difusional, sin embargo al realizar nuevamente una comparación entre la expresión del transportador ZmSUT1 de maíz (Guzmán-Chávez, 2010) con la toma de sacarosa a lo largo de la germinación, se observa que existe una similitud en los patrones; cuando la expresión del transportador aumenta lo hace la toma de sacarosa, lo que indicaría que si se está llevando un transporte activo secundario (Figura 21).

Se ha documentado que los escutelos aislados de maíz son capaces de tomar la sacarosa ya que la aleurona sintetiza la sacarosa a partir de los lípidos que contiene, por lo que si existe una función de transporte en entrada de sacarosa en el escutelo. La sacarosa acumulada en las células de la epidermis del escutelo se dirige hacia las células del parénquima vascular del escutelo por vía simplástica para llegar a los elementos cribosos del floema, ya sea por vía simplástica o vía apoplástica, y finalmente al eje embrionario por vía simplástica como se ilustra en la Figura 22 (Aoki *et al.*, 2006; Ramírez-Verdejo, 2009; Raya-Sandino, 2011). El transporte entre las células de la epidermis y las células del parénquima vascular en el escutelo vía simplástica podría ser la toma que se observa de sacarosa que no se ve inhibida ni por el CCCP ni por el PCMBS.

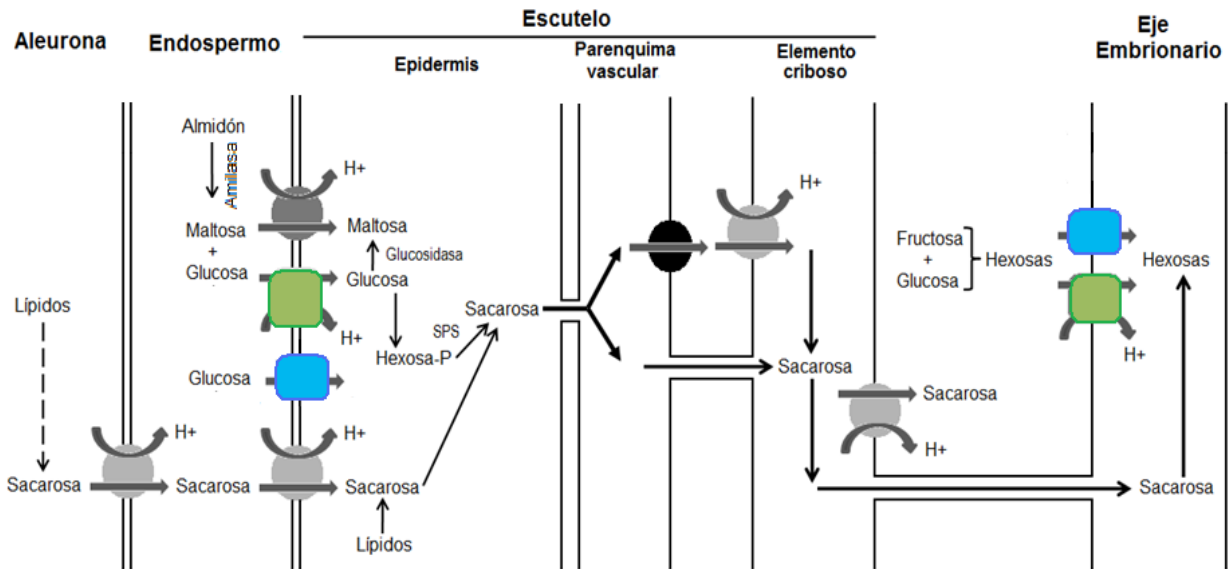


Figura 22. Transporte de hexosas y sacarosa durante la germinación de la semilla de maíz.

En resumen, se menciona que encontramos evidencia de dos actividades de transporte en los embriones de maíz, el difusional y el transporte activo, tanto de glucosa como de sacarosa. La sacarosa se usará en el escutelo para su metabolismo o se transportará a través de transportadores de hexosas o vía simplástica hacia el eje embrionario, el cual contiene un transporte de sacarosa esencialmente difusional, ya que no contiene transcritos para el transportador de sacarosa (Gómez-Calderas, 2008) y es capaz también de tomar glucosa del medio extracelular a través de transportadores de hexosas tanto simportadores como difusionales. Cuando la germinación avanza la aleurona y el propio escutelo sintetizan sacarosa, el escutelo toma la sacarosa que proviene de la aleurona vía apoplástica, además de la glucosa que proviene de la hidrólisis del almidón en el endospermo, una gran cantidad de carbono que esencialmente se lleva al haz vascular para la nutrición de la joven plántula.



IX.3 Medición del efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en la toma de glucosa y sacarosa.

El transporte de carbohidratos es controlado en todos los estadios del desarrollo de las plantas, así como en condiciones favorables o poco favorables del ambiente. Las condiciones cambiantes del ambiente tienen un impacto en el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que la respuesta en la distribución de los carbohidratos es sensible a estos cambios. Se conoce que la presencia de patógenos fúngicos es capaz de alterar el nivel de los transcritos para los transportadores de carbohidratos (Delrot *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2010; Hoth *et al.*, 2010). En un trabajo anterior, se encontró que al infectar un embrión maduro de maíz con *Fusarium verticillioides* se producía un aumento en el consumo de oxígeno, cambios en el contenido de carbohidratos, así como en el nivel de los transcritos para los dos transportadores estudiados, ZmSUT1 y ZmHT (Guzmán-Chávez, 2010), cambios a consecuencia del probable desajuste en el uso de los carbohidratos debido a la infección.

Se conoce que los patógenos necesitan del aporte de nutrimentos del organismo huésped. En el caso de la interacción planta-patógeno, los patógenos son capaces de incrementar la concentración de glucosa o sacarosa en los apoplastos de las cercanías al sitio de la infección, lo que aumenta las probabilidades de uso de estos carbohidratos por los hongos para aumentar su biomasa en el huésped (Kocal *et al.*, 2008; Talbot, 2010).

Para comprobar si efectivamente el cambio en el nivel de transcritos debido a la infección conducía a una modificación en la toma de glucosa y sacarosa, se embebieron embriones en presencia del hongo *Fusarium verticillioides* en condiciones similares a las usadas por Guzmán-Chávez (2010) y se midió la toma de ambos carbohidratos a lo largo de la germinación.

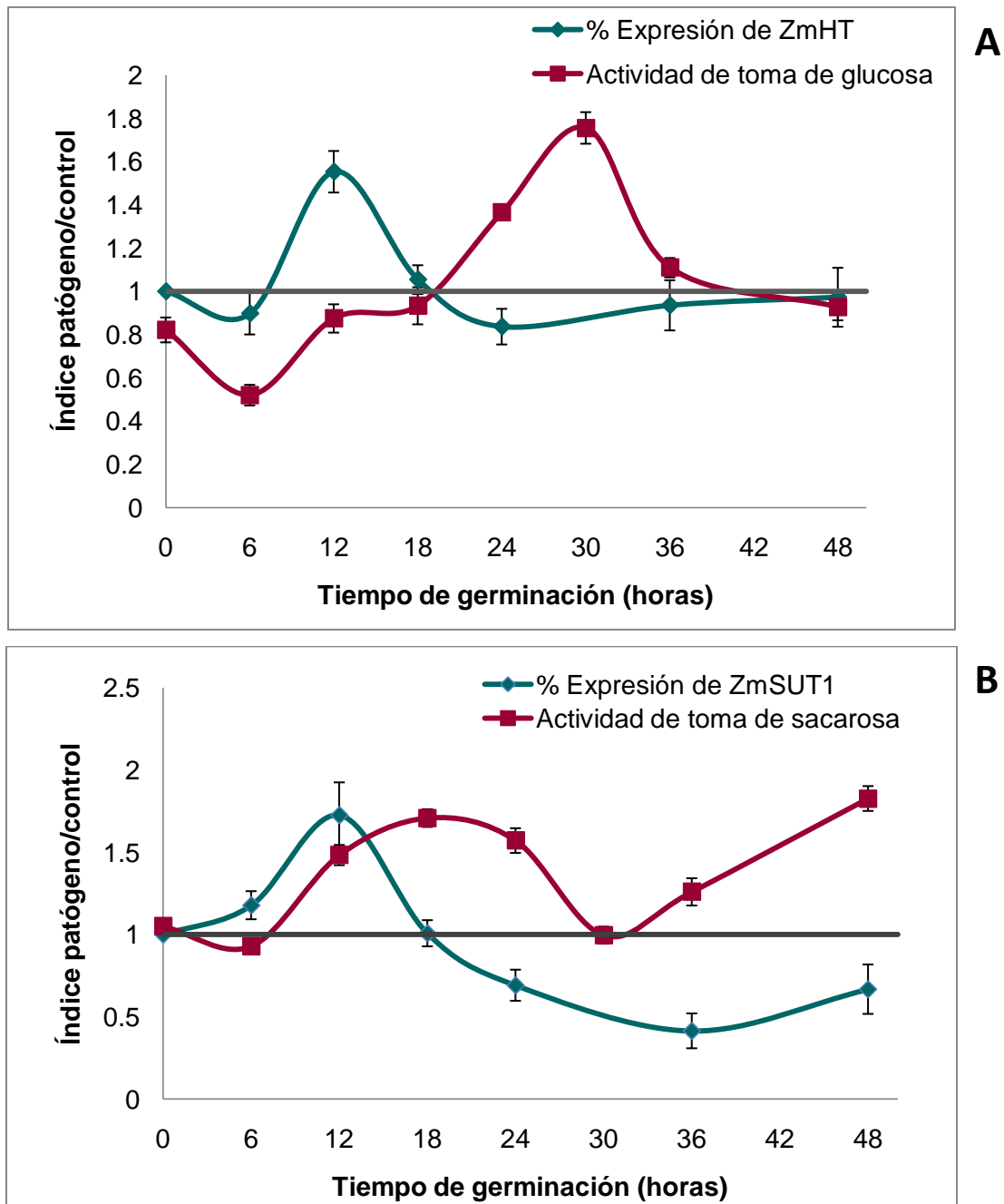


Figura 23. Efecto del patógeno *Fusarium verticillioides* en la actividad de transporte y los niveles de los transcritos para los transportadores de carbohidratos. A. Transporte de hexosas B. Transporte de sacarosa.

En cuanto a la toma de glucosa se encontró que en las primeras 12 horas de la germinación el índice patógeno/ control de la toma de glucosa es similar al índice patógeno/control del nivel de transcrito (ZmHT), va en aumento conforme



avanza la germinación, si bien la toma de glucosa empieza siendo pobre para los embriones infectados con *Fusarium*. Lo anterior podría sugerir que la elevación en los transcritos es para compensar la pobre toma de glucosa (Figura 23A). Después de las 18 horas, la infección comienza a ser visible en los embriones (Guzmán-Chávez, 2010) y el índice de los niveles de transcrito del patógeno/control empiezan a descender, contrario al índice patógeno/control en la toma de glucosa aumenta, probablemente debido al incremento en la toma de glucosa por la presencia del hongo en el embrión, que como se mencionó anteriormente ya ha invadido al tejido. Otra explicación a la toma aumentada a tiempos prolongados de la infección es que la toma de glucosa sea difusional debida a la inestabilidad de la membrana del embrión, ya que Calzada-Alejo ha observado en los embriones embebidos, después de las 18 horas de la infección, que han aumentado su permeabilidad membranal (2011). *Fusarium verticillioides*, es un agresivo invasor del maíz llegando a necrosar el tejido y consumir todo el embrión, por lo que es evidente que el nivel de los transcritos se ve afectado, así como la toma de glucosa que empieza a caer a tiempos prolongados de la infección (Figura 23A).

Por otro lado, el índice patógeno/control en la toma de sacarosa es similar al índice patógeno/control del nivel del transcrito del transportador de sacarosa a etapas muy tempranas de la germinación (Figura 23B), lo que sugiere que la proteína transportadora se está sintetizando e incorporando en la membrana celular llevando a cabo el transporte de sacarosa para su utilización. Aunque, el nivel de transcrito cae a las 18 horas de la germinación y el nivel de transporte se mantiene todavía por 12 horas más. Entre las 24 y 36 horas los índices patógeno control de los transcritos y la toma de sacarosa coinciden, bajo nivel de transcrito baja actividad de transporte. A las 48 horas el nivel de toma de sacarosa aumenta sustancialmente pero el nivel de transcrito cae, lo cual puede deberse a un aumento en la toma debida al patógeno o bien a una entrada no controlada de toma de sacarosa debida a la ruptura de la integridad membranal del embrión o a ambos procesos.



Durante la infección por el patógeno *Fusarium verticillioides* los transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas al inicio de la infección muestran un nivel de cambio similar al del nivel de toma de ambos carbohidratos, lo que sugiere que el transporte de ambos carbohidratos está fuertemente influenciado por la cantidad de los transportadores de carbohidratos que son codificados tanto por ZmSUT1 como por ZmHT, y no son influenciados grandemente por la actividad de transporte simplástico.

A pesar de que la toma de carbohidratos es mayor para el embrión infectado con *Fusarium verticillioides*, esto no se traduce en una mejoría en el crecimiento del embrión ya que al final muere. Lo anterior nos abre más preguntas ¿Por qué ocurre la inducción de sus transportadores de carbohidratos?, ¿Qué molécula del hongo se encuentra involucrada en la inducción de los transportadores de carbohidratos?, o será que es una molécula que en general puede percibir la planta ante cualquier tipo de estrés y entonces responde.

Con lo que hay en la literatura, respecto a la regulación del transporte de carbohidratos y el efecto del estrés, podemos plantear que es posible que la modificación en la actividad de transporte se deba a que la modulación de la transcripción debida a los niveles de ácido abscísico. Lo anterior lo postulamos ya que en varios tipos de estrés se ha encontrado que ABA cambia y generalmente se eleva (Hey *et al.*, 2010), aunado a esto se ha encontrado que en la región promotora para un transportador de sacarosa de *Arabidopsis* existe una caja ABRE, que es posible que una al menos un factor de transcripción que depende del aumento del ABA (Hoth *et al.*, 2010). Asimismo se encontró que un transportador de uva aumenta durante la infección del tejido y que curiosamente con la infección aumenta la concentración de ABA (Hayes *et al.*, 2010). Por lo que es probable que durante la infección se estén alterando los niveles de ABA y esto lleve a que el embrión modifique el nivel de sus transcritos para los transportadores de hexosas y sacarosa. Un efecto colateral a la infección y no específico del patógeno.



X. CONCLUSIONES

- La toma de glucosa y de sacarosa en embriones inmaduros es mayor que en todos los tejidos embrionarios; a su vez la toma de estos carbohidratos en ejes embrionarios maduros es mayor que la de los embriones maduros de maíz.
- La toma de glucosa es mayor que la de sacarosa en todos los tejidos embrionarios de maíz estudiados.
- La toma de glucosa aumenta conforme aumenta la germinación, si bien el incremento en la toma es mayor en los ejes embrionarios que en los embriones maduros. En los embriones la toma de glucosa se debe a la contribución en un 50% al transporte difusional y un 50% al transporte activo.
- La toma de sacarosa en los embriones es similar conforme avanza la germinación, mientras que en los ejes es mayor. Los ejes embrionarios tomaron sacarosa pero probablemente de manera difusional, ya que hemos demostrado anteriormente que no sintetiza al mensajero del único transportador de sacarosa encontrado en maíz (Gómez-Calderas, 2008).
- La toma de carbohidratos en embriones de maíz si se ve modificada con la infección de *Fusarium verticillioides*:
 - La toma de glucosa al inicio de la infección es similar a la de los embriones sin infectar, pero después de las 18 horas se incrementa y se mantiene alta pese a que el embrión se ve visiblemente dañado, por lo que la toma aumentada puede ser difusional y causada por la pérdida de la permeabilidad membranal del embrión.
 - La toma de sacarosa aumentó después de las 12 horas de germinación, lo que sugiere que la proteína se está sintetizando e insertando en la membrana para llevar a cabo el transporte de sacarosa. A las 48 horas el nivel de transcrito disminuye y la toma de sacarosa aumenta lo que nos habla que la infección con el patógeno pudiera estar afectando la integridad membranal y con ello el transporte de este carbohidrato.



XI. PERSPECTIVAS

- Determinar la contribución del transporte difusional y activo al transporte de sacarosa y glucosa para los embriones inmaduros.
- Evaluar la contribución que tiene el transporte difusional y activo en el transporte de ejes embrionarios.
- Medir los niveles de ABA en los embriones y ejes embrionarios al exponerlos al patógeno *Fusarium verticillioides*.
- Determinar si la concentración de glucosa o sacarosa en los apoplastos cambia, como un indicio de si la concentración de los carbohidratos tiene un impacto sobre la toma o los transcritos para los transportadores de carbohidratos.
- Medir la actividad de invertasas en los apoplastos durante la infección del hongo en los embriones para explicar porque los tejidos toman más glucosa que sacarosa.



XII. ANEXOS

XII.1 Anexo I. Familias integrantes de la Familia de Facilitadores Mayores, MFS (Milton *et al.*, 1999)

| No. de familia | Familia |
|----------------|--|
| 1 | Familia portadora de azúcar (SP) (Sugar Porter Family) |
| 2 | Familia antiportadora 1 fármaco: H ⁺ (DHA1) (Drug: H ⁺ Antiporter-1 Family) |
| 3 | Familia antiportadora 2 fármaco: H ⁺ (DHA2) (Drug: H ⁺ Antiporter-2 Family) |
| 4 | Familia antiportadora organofosfato: P (OPA) (Organophosphate: P Antiporter Family) |
| 5 | Familia simportadora oligosacárido:H ⁺ (OHS) (Oligosaccharide:H ⁺ Symporter Family) |
| 6 | Familia simportadora metabolito:H ⁺ (MHS) (Metabolite: H ⁺ Symporter Family) |
| 7 | Familia simportadora fucosa:H ⁺ (FHS) Fucose: H ⁺ Symporter Family |
| 8 | Familia portadora nitrato/nitrito (NNP) (Nitrate/Nitrite Porter Family) |
| 9 | Familia simportadora fosfato: H ⁺ (PHS) (The Phosphate: H ⁺ Symporter Family) |
| 10 | Familia simportadora nucleósido: H ⁺ (NHS) (Nucleoside: H ⁺ Symporter Family) |
| 11 | Familia antiportadora oxalato: formiato (OFA) (Oxalate: Formate Antirporter Family) |
| 12 | Familia simportadora sialato: H ⁺ (SHS) (Sialate: H ⁺ Symporter Family) |
| 13 | Familia portadora monocarboxilato (MCP) (Monocarboxylate Porter Family) |



| | |
|----|---|
| 14 | Familia simportadora anión: catión (ACS) (Anion: Cation Symporter Family) |
| 15 | Familia simportadora ácido aromático: H ⁺ (AAHS) (Aromatic Acid: H ⁺ Symporter Family) |
| 16 | Familia transportadora sideróforo: hierro (SIT) Siderophore-Iron Transporter Family |
| 17 | Familia permeasa cianato (CP) (Cyanate Permease Family) |
| 18 | Familia permeasa poliol (PP) (Polyol Permease Family) |
| 19 | Familia transportadora catión orgánica (OCT) (Organic Cation Transporter Family) |
| 20 | Familia transportadora de flujo de azúcar (SET) (Sugar Efflux Transporter Family) |
| 21 | Familia antiportadora 3 fármaco: H ⁺ (DHA3) (Drug: H ⁺) Antiporter-3 Family |
| 22 | Familia transportadora neurotransmisora vesicular (VNT) (Vesicular Neurotransmitter Transporter Family) |
| 23 | Familia transportadora de sales biliares conjugadas (BST) (Conjugated Bile Salt Transporter Family) |
| 24 | Familia desconocida de facilitadores mayores 1 (UMF-1) (Unknown Major Facilitator-1 Family) |
| 25 | Familia transportadora péptido-acetil-coenzima A (PAT) (Peptide-Acetyl-Coenzyme A Transporter Family) |
| 26 | Familia desconocida de facilitadores mayores 2 (UMF-2) (Unknown Major Facilitator- 2 Family) |
| 27 | Familia permeasa fenil propionato (PPP) (Phenyl Propionate Permease Family) |
| 28 | Familia desconocida de facilitadores mayores 3 (UMF-3) (Unknown Major Facilitator-3 Family) |
| 29 | Familia desconocida de facilitadores mayores 4 (UMF-4) (Unknown Major Facilitator-4 Family) |
| *1 | Familia simportadora glicosidasa-pentosida-hexuronida:catión (GPH) (Glycoside-Pentoside-Hexuronide: Cation Symporter Family) |



| | |
|----|--|
| *2 | Familia transportadora proton-oligopéptido dependiente (POT) (Proton-dependent Oligopeptide Transporter Family) |
| *3 | Familia transportadora organo anion (OAT) (Organo Anion Transporter Family) |
| *4 | Familia transportadora Folato-Biopterina (FBT) (Folate-Biopterin Transporter Family) |
| *5 | Familia putativa de entrega de bacterioclorofila (BCD) (Putative Bacteriochlorophyll Delivery Family) |

Tabla 3. Familias integrantes de la Familia de Facilitadores Mayores, MFS (Milton *et al.*, 1999)

XII.2 Anexo II: Técnica de centelleo líquido y calibración del equipo

Principio

La técnica de medición por centelleo líquido es una técnica sensible y versátil para la cuantificación y detección de radiactividad, aplicable a todo tipo de emisores: partículas alfa y beta, captura electrónica y radionucleídos gamma emisores. Se basa en la cuantificación de la tasa de luz emitida por una muestra líquida, donde un centellador líquido actúa como transductor de energía transformando la energía de decaimiento del radionucleído en luz. Ésta es captada por tubos fotomultiplicadores que generan pulsos eléctricos, los cuales convenientemente amplificados, analizados y discriminados son clasificados de acuerdo a su amplitud y registrados (Bombém, 1997).

El material radioactivo al decaer emite radiaciones que involucran una liberación de energía, siendo ésta característica del radionucleído. La energía es absorbida por el medio circundante, siendo este último proceso de interés en la técnica de centelleo líquido. Para asegurar una transferencia de energía eficiente, la solución centelladora (o líquido de centelleo) debe actuar como solvente de la muestra radioactiva. La mezcla consiste en una mezcla de solvente y soluto, siendo este último el centellador. En un radionucleído beta emisor, como el ^{14}C ,



las partículas beta manifiestan su presencia por colisiones con las moléculas de solvente, estas moléculas excitadas pueden transferir su energía a otras similares y también a moléculas de soluto. Cuando la energía de excitación del solvente es transferida a la molécula de soluto altera la nube electrónica provocando un estado de excitación. La molécula de soluto al regresar a su estado basal emite un fotón en la región del UV. El número total de fotones provenientes de las moléculas de centellador excitadas constituye el proceso de centelleo (Bombém, 1997).

Calibración del Contador de Centelleo Multi-Purpose Scintillation Counter LS 6500 Beackman Coulter

En las mediciones por centelleo líquido realizadas con equipos de centelleo líquido de última generación, la calibración y corrección por apagamiento (término usado para describir la disminución de la intensidad de una sonda marcada radiactivamente en ciertos ensayos biológicos, <http://peligrociencia.com/2010/03/03/quenching/>) se realiza automáticamente (Bombém, 1997).

El equipo que se usó fue un Contador de Centelleo Multi-Purpose Scintillation Counter LS 6500 Beackman Coulter. En este equipo la calibración se realiza automáticamente, para lo cual se emplearon 2 fuentes calibradas (^3H y ^{14}C) selladas como referencia que permiten un ajuste automático de parámetros. Al momento de introducir las fuentes, el contador las leyó durante 1 minuto y después de ello indicó que el aparato había sido calibrado exitosamente. Por otro lado, para obtener la eficiencia del aparato de acuerdo al isótopo trabajado, en este caso ^{14}C , se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{\text{CPM-Background}}{\text{DPM}} \times 100$$



donde:

CPM = Cuentas Por Minuto de la referencia de ^{14}C

Background = Cuentas Por Minuto del Background

DPM = Desintegraciones Por Minuto de la referencia de ^{14}C

Con la ecuación anterior se determinó el porcentaje de eficiencia del contador de centelleo líquido:

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{93\,492.0 - 40.0}{96\,800.0} \times 100$$

$$\% \text{ Eficiencia} = \mathbf{96.5\%}$$

El manual proporcionado por Beckman del aparato indica que el porcentaje de eficiencia para ^{14}C debe ser mayor a 95.0 %, por lo que se cumplió con esta especificación.

XIII.3 Anexo III: Reactivos y soluciones

Medio de reacción para la medición de toma de carbohidratos y Medio de lavado.

Para medir la toma de glucosa, se preparó el medio de reacción y el medio de lavado con los reactivos indicados en la Tabla 3. La glucosa fría es glucosa sin ^{14}C . Una vez preparado el medio se mantuvo en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.



| Medio de reacción | Medio de lavado |
|--|--|
| Sorbitol 330 mM Hepes 50 mM, pH=6 Glucosa fría 10 mM KCl 5 mM | Sorbitol 330 mM Hepes 50mM, pH=6 Glucosa fría 100 mM KCl 5 mM |

Tabla 4. Reactivos que se emplean en la preparación del medio de reacción y el medio de lavado para glucosa.

Para medir la toma de sacarosa, al medio de reacción y el de lavado se les añaden los mismos reactivos, salvo que en vez de usar glucosa fría se emplea sacarosa fría (sin ^{14}C) a las mismas concentraciones (Tabla 4).

| Medio de reacción | Medio de lavado |
|---|---|
| Sorbitol 330 mM Hepes 50 mM, pH=6 Sacarosa fría 10 mM KCl 5 mM | Sorbitol 330 mM Hepes 50mM, pH=6 Sacarosa fría 100 mM KCl 5 mM |

Tabla 5. Reactivos que se emplean en la preparación del medio de reacción y el medio de lavado para sacarosa.

Líquido de centelleo

El líquido de centelleo está constituido por tres partes principalmente: el solvente, el centellador y los surfactantes y gelificantes.

El primero actúa como disolvente de la muestra y también como centellador, ya que a él es transferida inicialmente la energía de los productos de decaimiento del material radioactivo en estudio. Las mezclas de xileno son usadas



por su alta eficiencia de conversión de energía y porque son de menor riesgo que otros disolventes. En estas mezclas se incluye Tritón X-100 para muestras acuosas.

Dentro de los centelladores, cuya función es convertir la energía cinética de los emisores (en este caso partículas beta) en energía luminosa, se encuentra el PPO, que es el más usado por presentar: alta eficiencia de centelleo a concentraciones moderadas, buena solubilidad en solventes, relativamente bajo costo y baja reactividad con la parte de las sustancias medidas por centelleo líquido.

Por último se encuentran los surfactantes y gelificantes (etilenglicol y etanol) que proveen el medio de obtener soluciones homogéneas entre muestras acuosas y soluciones centelladoras orgánicas. Cuando la cantidad de solución acuosa incorporada a una solución centelladora surfactante es pequeña se obtiene un sistema de fase única de naturaleza líquida, clara y homogénea.

Para el procedimiento experimental llevado a cabo, el líquido de centelleo empleado contiene los reactivos que se muestran en la tabla 5 y su preparación se describe en la misma.

| Reactivos | Modo de preparación |
|---|--|
| 2,5-Difenil-Oxazol (PPO) Etilenglicol Etanol Tritón X-100 Xilol | Para preparar 100.0 mL de líquido de centelleo se pesan 0.3 g de PPO. Posteriormente se va agregando 3.7 mL de etilenglicol, 10.6 mL de etanol, 25.7 mL de tritón y 60.0 mL de xilol. Se mezcla todo hasta obtener una solución final translúcida. Cuidar de que no se incorpore agua a la solución. |

Tabla 6. Preparación de líquido de centelleo.



XII.4 Anexo IV: Cálculos

Determinación de la actividad de toma de glucosa

A continuación se describen los cálculos que se efectuaron para determinar la actividad de glucosa. En el empaque de la glucosa marcada ($[^{14}\text{C}]$ glucosa) utilizada en este trabajo especificaba una actividad de 310 mCi/mmol o 0.1 mCi/mL o bien que por cada μL de la solución hay 0.1 μCi .

Por otro lado se determinó el número de cuentas por minuto (CPM) que hay en un μL de la solución de $[^{14}\text{C}]$ glucosa]. Para ello se colocó en un vial de centelleo, un μL de dicha solución más 3.0 mL de líquido de centello. La muestra se leyó en el Contador de Centello durante 3 minutos detectando únicamente ^{14}C . Para un μL se obtuvieron 59 877.68 CPM.

Ahora bien si:

$$0.1 \mu\text{Ci} = 1.0 \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C}] \text{ glucosa] y}$$

$$1.0 \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C}] \text{ glucosa] = 59 877.68 CPM}$$

entonces,

$$0.1 \mu\text{Ci} = 59 877.68 \text{ CPM.}$$

A continuación se hace una relación entre las cuentas obtenidas y la referencia. Por ejemplo si se obtienen 10 443 CPM:

$$0.1 \mu\text{Ci} - 59 877.68 \text{ CPM}$$

$$X - 10 443 \text{ CPM}$$

$$X = 0.02 \mu\text{Ci}$$



Ahora sabiendo que en el empaque hay 310 mCi/mmol o lo que es lo mismo 310 000 μ Ci/mmol, se puede hacer otra relación con los μ Ci obtenidos anteriormente para obtener los milimoles de glucosa:

$$\begin{aligned} 310\,000\ \mu\text{Ci} &- 1\ \text{mmol de glucosa} \\ 0.02\ \mu\text{Ci} &- Y \\ Y &= 5.63 \times 10^{-8}\ \text{mmol de glucosa} \end{aligned}$$

Por último sólo se hace una conversión para obtener los pmol de glucosa y se divide entre el peso húmedo promedio de cada tejido embrionario (peso seco para los embriones inmaduros) y el tiempo de incubación que fue de 10 minutos (0.17 horas), para obtener así la actividad de glucosa expresada en pmol de glucosa/ gramo de tejido · hora. Se muestra el ejemplo del cálculo a continuación:

$$\begin{aligned} 5.63 \times 10^{-8}\ \text{mmol glucosa} &\left(\frac{1\,000\,000\,000\ \text{pmol de glucosa}}{1\ \text{mmol glucosa}}\right) \left(\frac{1}{0.1498\ \text{g de tejido}}\right) \left(\frac{1}{0.17\ \text{horas}}\right) \\ &= \mathbf{2\,210.79\ \text{pmol de glucosa/ g de tejido} \cdot \text{h}} \end{aligned}$$

Determinación de la actividad de toma de sacarosa

Antes de proceder a obtener los pmol de sacarosa como en el ejemplo anterior, se obtuvo la equivalencia que se hizo con la glucosa, es decir, que los pmol de glucosa agregados a cada ensayo fueran los mismos que de sacarosa, para de este modo poder comparar la toma de ambos carbohidratos.

Para ello se obtuvieron inicialmente los pmol de glucosa que había en los 10.0 μ L de [^{14}C glucosa] añadidos al medio de reacción. Se hizo la siguiente relación:

$$\begin{aligned} 0.1\ \mu\text{Ci} &- 1.0\ \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C}\ \text{glucosa}] \\ V &- 10.0\ \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C}\ \text{glucosa}] \\ V &= 1.0\ \mu\text{Ci} \end{aligned}$$



Recordando que hay 310 000 μCi por mmol de glucosa, entonces se tiene que en 1.0 μCi hay **3.22×10^{-6} milimoles de glucosa**. Estos milimoles debían ser los mismos para sacarosa, por lo que se realizó el cálculo de los μL que debían ser añadidos al medio de reacción para cumplir con esta condición.

Nuevamente se obtuvo del empaque de sacarosa marcada (^{14}C sacarosa) la especificación de que hay 401 mCi/mmol y que por cada μL de la solución hay 0.1 μCi . Sabiendo lo anterior entonces:

$$401\ 000\ \mu\text{Ci} - 1\ \text{mmol}$$

$$W - 3.22 \times 10^{-6}\ \text{mmol}$$

$$W = 1.29\ \mu\text{Ci}$$

Conociendo que se necesitaban 1.29 μCi , se obtuvieron los μL necesarios de la solución de [^{14}C sacarosa] de la siguiente forma:

$$0.1\ \mu\text{Ci} - 1.0\ \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C}\ \text{sacarosa}]$$

$$0.2\ 1.29\ \mu\text{Ci} - X$$

$$X = 12.91\ \mu\text{L} \approx \mathbf{13.0\ \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C}\ \text{sacarosa}]}$$

Entonces, para los ensayos con sacarosa, la cantidad agregada de la solución de [^{14}C sacarosa] fue de 13.0 μL , los cuales contienen la misma cantidad de mmoles que los añadidos en los 10.0 μL de la solución de [^{14}C glucosa].

Los cálculos para la actividad de sacarosa se llevaron a cabo de la misma forma que para los de glucosa, sin embargo como las especificaciones del empaque de cada carbohidrato son diferentes, se realizaron los ajustes pertinentes. De igual forma se hizo una referencia, agregando 1 μL de la solución de sacarosa caliente a un frasco especial para el Contador de Centelleo que contenía 3.0 mL de líquido de centelleo y se leyó durante 3 minutos en un



Contador de Centelleo detectando únicamente [^{14}C], obteniendo así que en un μL de la solución de [^{14}C sacarosa] hay 215 040.30 CPM. Entonces, si:

$$\begin{aligned} 0.1 \mu\text{Ci} &= 1.0 \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C sacarosa}] \text{ y} \\ 1.0 \mu\text{L de la solución de } [^{14}\text{C glucosa}] &= 215\,040.30 \text{ CPM,} \\ \text{en } 0.1 \mu\text{Ci} &\text{ hay } 215\,040.30 \text{ CPM.} \end{aligned}$$

Tomando el ejemplo de la determinación de la actividad de glucosa, si se tienen 10 443 CPM:

$$\begin{aligned} 0.1 \mu\text{Ci} &- 215\,040.30 \text{ CPM} \\ Y &- 10\,443 \text{ CPM} \\ Y &= 4.85 \times 10^{-3} \mu\text{Ci} \end{aligned}$$

Ahora sabiendo que hay 401 000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, se hace la relación para obtener los milimoles de sacarosa:

$$\begin{aligned} 401\,000 \mu\text{Ci} &- 1 \text{ mmol de sacarosa} \\ 4.85 \times 10^{-3} \mu\text{Ci} &- Z \\ Z &= 1.21 \times 10^{-8} \text{ mmol de sacarosa} \end{aligned}$$

Por último sólo se hace la conversión descrita anteriormente para obtener así la actividad de glucosa expresada en pmol de sacarosa/gramo de tejido \cdot hora:

$$\begin{aligned} 1.21 \times 10^{-8} \text{ mmol sacarosa} &\left(\frac{1\,000\,000\,000 \text{ pmol de sacarosa}}{1 \text{ mmol sacarosa}} \right) \left(\frac{1}{0.1498 \text{ g de tejido}} \right) \left(\frac{1}{0.17 \text{ horas}} \right) \\ &= 475.55 \text{ pmol de sacarosa/ g de tejido} \cdot \text{h} \end{aligned}$$



De este modo se obtienen los pmoles se sacarosa, que no son los mismos que se obtuvieron para glucosa como se puede ver. Esto debe a que hay que considerar que el ejemplo es uno de los resultados que se obtuvo con embriones maduros infectados con *Fusarium verticillioides* a las 0 horas de germinación y que las CPM obtenidas para el mismo ensayo con sacarosa probablemente hubieran sido distintas. Esto se debe a diversos factores. En primer lugar la toma de ambos carbohidratos no es la misma por parte de los tejidos embrionarios de maíz, que es precisamente el efecto que se quiso estudiar en el presente trabajo; en segundo lugar se sabe que cada tejido embrionario de maíz se comporta de manera independiente y única por ser un organismo vivo; en tercera, el peso de cada tejido embrionario de maíz fue distinto; y por último, las condiciones de germinación debido al patógeno fueron distintas. Todo esto conlleva a obtener lecturas de CPM distintas en cada caso y por consiguiente pmol diferentes de ambos carbohidratos, sin embargo se puede realizar una comparación entre todos los datos obtenidos debido a que la cantidad de mmoles añadidos fue la misma tanto para la glucosa como para la sacarosa y, por otro lado, la metodología empleada para todos los ensayos realizados fue la misma.



XIII. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Barcelona, España. 615-630 pp.
- Atwell B, Kriedemann P, Turnbull C. 2003. *Plants in action. Adaptation in nature, performance in cultivation*. Macmillan Publishers. Nueva Zelanda, Australia. 171-174 pp. <http://plantsinaction.science.uq.edu.au/>
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066.
- Bluhm BH, Kim H, Butchko RAE, Woloshuk CP. 2008. Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of FST1, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Mol. Plant Pathol*. 9: 203-211.
- Bombém AM. 1997. *Centelleo líquido. Apuntes del curso metodología y aplicación de radioisótopos*. Buenos Aires, Argentina.
<http://200.0.198.11/MenoriaT/MT95-97/Pi5-97.pdf>
- Bonifaz AJ. 2010. *Micología médica básica*. 3ª edición. Mc Graw Hill. México, México. 25, 49-50, 394-396 pp.
- Botanical Online. 1999-2011. *El mundo de las plantas. El maíz*.
www.botanical-online.com/maiz.htm
- Bradford KJ. 2004. Germination: imbibitions, activation and reserve mobilization. In *seed production and quality*. 85-94 pp.



- Bush BJ. 2001. *Fusarium verticillioides* infection, fumonisin contamination and resistance evaluation in North Carolina maize. Thesis for the degree of Master of Science. Faculty of North Carolina State University. USA. 7-19 pp.
- Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporter in plants: structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 263-274.
- Büttner M. 2007. The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS letters*. 581: 2318-2324.
- Carmona MA, Reis EM, Trezzi CR. 2007. Identificación y manejo de las principales enfermedades del maíz. Pudrición de raíces en plantas jóvenes. Manual. Eds. Bayer, Aapresid, Maizar. 8 pp.
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J y 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. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 21437-21443.
- Delrot S, Atanassova R, Gomés E, Coutos-Thévenot P. 2001. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Sci*. 161: 391-404.
- Desjardins AE, Plattner RD. 2000. Fumonisin B₁-Nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J. Agric. Food Chem*. 48: 5773-5780.
- Dinant S, Lemoine R. 2010. The phloem pathway: New issues and old debates. *C. R. Biologies*. 333: 307-319.



- Duncan KE, Howard RJ. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. Mol. Plant-Microbe Int. 23: 6-16.
- Essmann J, Bones P, Weis E, Scharte J. 2008. Leaf carbohydrate metabolism during defense: intracellular sucrose-cleaving enzymes do not compensate repression of cell wall invertase. Plant Signal. Behav. 3:885-887.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1993. El maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm>
- Giaquinta RT. 1976. Evidence for phloem loading from the apoplast. Chemical modification of membrane sulfhydryl groups. Plant Physiol. 57: 872-875.
- Glenn AE, Richardson EA, Bacon CW. 2004. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. Mycologia. 96: 968-980.
- Glim-Lacy J and Kaufman P. 2006. Seed structure and germination. Segunda edición. Botany Illustrated. Springer. USA. 40-41 pp. <http://www.springerlink.com/>
- Gómez-Calderas A. 2008. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Granjo CA, Alves dos Reis T, Gambale W, Corrêa B. 2007. Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*. Mycopathologia. 164: 119-126.
- Griffith SM, Jones RJ, Brenner ML. 1987. In vitro transport sugar transport in *Zea mays* L. Kernels. Plant Physiol 84, 472-475.



- Gupta S, Chakraborti D, Sengupta A, Basu D, Das S. 2010. Primary metabolism of chickpea is the initial target of wound inducing early sensed *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri race I. PLoS One. 5 (2): e9030.
- Guzmán-Chávez F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Hayes MA, Byrne E, Halford NG. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. Plant Physiol. 153: 211-221.
- Hey SJ, Byrne E, Halford NG. 2010. The interface between metabolic and stress signaling. Annals Bot. 105: 197-203.
- Hirai T, Heymann JAW, Maloney PC, Subramaniam S. 2003. Structural model for 12-helix transporters belonging to the major facilitator superfamily. J. Bacteriol. 185: 1712-1718.
- Hoth S, Nierdermeir M, Feuerstein A, Horning J, Sauer N. 2010. An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression. Planta. 232: 911-923.
- Ibraheem O, Hove RM, Bradley G. 2008. Sucrose assimilation and the role of sucrose transporters in plant wound response. African J. Biotech. 7: 4850-4855.
- Kocal N, Sonnewald U, Sonnewald S. 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Plant Physiol. 148: 1523–1536.



- Kühn C, Grof CPL. 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 288-298.
- Ladonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM. 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell.* 11: 707-726.
- Lee J-M, Williams ME, Tingey SV, Rafalski JA. 2002. DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. *Funct Integr Genomics.* 2: 13–27.
- Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 246-262.
- Lichtner FT, Spanswick RM. 1981. Electrogenic sucrose transport in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 67: 869-874.
- Lin JD, Cho JII, Park Youn-II, Han TR, Choi S-B, Jeon S-S. 2006. Sucrose transport from source to sink seeds in rice. *Physiol Plant.* 126: 572-584.
- Lino CM, Silva LJG, Pena AS. 2004. Fumonisin: presence in foods, health implications and legislative aspects. *Revista portuguesa de Ciências Veterinárias.* 99: 181-192.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudarra P, Baltimore D, Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular.* 4ª edición. Edición Médica Panamericana. Madrid, España. 578-598 pp.
- Luna-Löaiza V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.



- 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.
- Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2002. Bioquímica. 3ª edición. Pearson Educación. Madrid, España. 373-386 pp.
- Miller ME, Chourey PS. 1992. The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell*. 4: 297-305.
- Morales-Rodríguez I, Yañez-Morales MJ, Silva-Rojas HV, García-de-los-Santos G, Guzmán-de-Peña DA. 2007 Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia*. 163: 31-39.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 7 (4): 479-504.
- Noiraud N, Delrot S, Lemoine R. 2000. The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Phys*. 122: 1447-1455.
- Nonogaki H. 2008. Seed germination and reserve mobilization. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Doi: 10.1002/9780470015902.a0002047.pub2
- Nonogaki H, Bassel GW and Bewley JD. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science*. Doi: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010



- Norhasima W, Abdulamir AS, Bakar AS, Son R, Norhafniza A. 2009. The health and toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. *American Journal of Infectious Diseases*. 5 (4): 283-291.
- Oparka KJ, Turgeon R. 1999. Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*. 11: 739-750.
- Oren L, Ezrati S, Cohen D, Sharon A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolated. *Appl. Environ. Microbiol*. 69: 1695-1701.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier Jr MH. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*. 62 (1): 1-34.
- Ramírez-Verdejo SA. 2009. Detección in situ de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación por carbohidratos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Raya-Sandino JA. 2011. Caracterización bioquímica del transporte de glucosa en tejido embrionario de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Ruíz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ. 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Plant Biol*. 4: 202-209.
- Saier Jr MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WHM, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS. 1999. The Major Facilitator Superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 1(2): 257-279.



- Saier Jr MH. 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology*. 35 (4): 699-710.
- Sánchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A, Plasencia J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8565-8571.
- Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters*. 581: 2309-2317.
- Shiratake K. 2007. Genetics of sucrose transporter in plants. *Genes, genomes and genomics*. 1 (1): 73-80.
- Sjölund RD. 1997. The phloem sieve element: A river runs through it. *Plant Cell*. 9: 1137-1146.
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Fisiología vegetal*. Volumen 1. Tercera edición. Publicaciones de la Universitat Jaume I. 1073 pp.
- Talbot NJ. 2010. Living the sweet life: How does a plant pathogenic fungus acquire sugar from Plants? *PLoS Biology* 8 e1000308.
- Torres-Sánchez L, López-Carrillo L. 2010. Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud pública de México*. 52: 461-467.
- Vardy E, Arkin IT, Gottschalk KE, Kaback HR, Schuldiner S. 2004. Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. *Protein Sci.* 13:1832-1840.



- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci.* 2 (5): 169-174.
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM. 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.
- Williams LE, Nelson SJ, Hall JL. 1990. Characterization of solute transport in plasma membrane vesicles isolated from cotyledons of *Ricinus communis* L. II. Evidence for a proton-coupled mechanism for sucrose and amino acid uptake. *Planta.* 182: 540-545.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Plant Sci.* 5 (7): 283-290.
- White DG. 2004. *Plagas y enfermedades del maíz.* Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 2-4 pp.
- Zhou Y, Chan K, Wang T, Hedley CL, Offler CE, Patrick JW. 2009. Intracellular sucrose communicates metabolic demand to sucrose transporters in developing pea cotyledons. *J. Exp. Bot.* 60: 71-85.