



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TÍTULO DEL TEMA ESCRITO**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES SWEET EN**  
**ESPIGA, TEJIDO EMBRIONARIO SECO Y DURANTE LA GERMINACIÓN**  
**DEL MAÍZ.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

***MIREYA FLORES BARRERA***



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Bertha Reséndiz Vázquez  
**VOCAL:** J. Eleazar Martínez Barajas  
**SECRETARIO:** Sobeida Sánchez Nieto  
**1er. SUPLENTE:** Tzventanka Dimitrova Dinkova  
**2° SUPLENTE:** Verónica Garrocho Villegas

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Sobeida Sánchez Nieto**

**SUSTENTANTE:**

---

**Mireya Flores Barrera**

## **Agradecimientos**

El trabajo de tesis “Análisis de la expresión de los transportadores SWEET en espiga, tejido embrionario seco y durante la germinación del maíz” realizado por **Mireya Flores Barrera** fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Recibió financiamiento a través de:**

- DGAPA-PAPIIT proyecto PAPIIT IN217214.
- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.

## Índice general

<b>1.Resumen</b>	<b>10</b>
<b>2.Introducción</b>	<b>11</b>
2.1. Generalidades del maíz	11
<b>3.Morfología y fisiología del maíz</b>	<b>12</b>
3.1. Estructura de la semilla del maíz	12
<b>4. La germinación de la semilla</b>	<b>13</b>
<b>5.El desarrollo vegetativo</b>	<b>16</b>
5.1. La floración y la polinización	16
<b>6.Transporte de sustancias</b>	<b>19</b>
6.1.Transporte de azúcares	22
6.2. SWEETs.	26
<b>7.Función fisiológica de los SWEETs</b>	<b>26</b>
<b>8.Justificación</b>	<b>27</b>
<b>9.Hipótesis</b>	<b>31</b>
<b>10.Objetivo</b>	<b>31</b>
<b>11.Materiales Y Métodos</b>	<b>32</b>
11.1. Estrategia experimental	32
11.2. Diseño de las secuencias de oligonucleótidos para los presuntos transportadores SWEET de tejidos reproductivos y semilla de maíz.	33
11.3. Material biológico	34
11.4. Extracción de RNA por el método de Trizol	35
11.5. Cuantificación y calibración del RNA extraído	37
11.6. Reacción de RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la Polimerasa)	38

<b>12.Resultados</b>	<b>41</b>
12.1. Expresión de los SWEETs considerados como específicos de tejido reproductivo y semillas.	41
12.2. Expresión baja en espigas, embriones y semillas inmaduras de los SWEETs considerados como específicos de hojas.	45
12.3. Expresión en espigas, embriones y semillas inmaduras de los SWEETs considerados como específicos de raíces.	48
12.4. Perfil general de 18 presuntos SWEETs de maíz en los tejidos reproductivos y los embriones germinados.	51
12.5. Expresión de SWEETs durante la germinación del maíz.	53
<b>13.Discusión</b>	<b>56</b>
13.1. Expresión de SWEETs en tejidos reproductivos	56
13.2. Expresión de SWEETs durante la germinación del maíz	64
<b>14.Conclusiones</b>	<b>678</b>
<b>15.Perspectivas</b>	<b>689</b>
<b>16.Referencias</b>	<b>70</b>
<b>17.Anexos</b>	<b>756</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de la semilla de maíz. _____	12
<b>Figura 2.</b> Curso temporal de los procesos celulares involucrados durante la germinación de semillas. _____	14
<b>Figura 3.</b> Planta de maíz, mostrando la espiga madura y la mazorca en formación. _____	17
<b>Figura 4.</b> Proceso de doble fertilización y formación del embrión. _____	21
<b>Figura 5.</b> Vías de transporte celular. _____	23
<b>Figura 6.</b> Topología propuesta para el SWEET13a de maíz en la membrana _____	25
<b>Figura 7.</b> Transporte de sacarosa a través del floema.. _____	22
<b>Figura 8.</b> Modelo del transporte de azúcares en tejido embrionario de maíz. ____	30
<b>Figura 9.</b> Estrategia experimental para obtener los niveles de expresión de los SWEETs de tejido reproductivo y semilla. _____	32
<b>Figura 10.</b> Partes del maíz usadas para medir la expresión de los SWEETs. ____	41
<b>Figura 11.</b> Expresión de los SWEETs en embrión seco, germinado, espigas jóvenes y maduras y semilla inmadura. _____	43
<b>Figura 12.</b> Niveles de expresión de ZmSWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14b y 15b en embriones, espigas y semilla inmadura. _____	44
<b>Figura 13.</b> Expresión los SWEETs1b, 4a, 13a, 13b, 15a, 11a en embriones, espigas y mazorca. _____	46
<b>Figura 14.</b> Niveles de expresión de SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15a en embriones, espigas y semilla inmadura. _____	47
<b>Figura 15.</b> Expresión los SWEET2, 3, 12a, 12b y 14b en embriones, espigas y semilla inmadura _____	49

<b>Figura 16.</b> Niveles de expresión de SWEET2, 3, 12a, 12b y 14b en embriones, espigas y semilla inmadura. _____	50
<b>Figura 17.</b> Niveles de expresión de los 18 presuntos transportadores SWEETs _____	53
<b>Figura 18.</b> Expresión de los SWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14a y 15b en embriones germinados de maíz. _____	54
<b>Figura 19.</b> Niveles de expresión de SWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14a y 15b durante la germinación de embriones de maíz. _____	55

## Índice de tablas



<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los SWEETs de espiga, semilla en formación y tejido maduro. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Mezcla de reacción para la reacción de Transcriptasa reversa .....	39
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de cada uno de los SWEETs en espigas, semillas de maíz y endospermo. ....	39
<b>Tabla 4.</b> SWEETs de mayor expresión en inflorescencias masculinas.....	60
<b>Tabla 5.</b> SWEETs con mayor expresión durante la germinación de embriones de maíz. ....	67

## Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
cDNA	DNA complementario
CC	Células acompañantes, componente del floema
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización mundial de las naciones unidas para la alimentación y agricultura
SPT	Sugar Protein Transporter
SUT	Sucrose Transporter
SWEET	Transportadores exportadores de azúcares del inglés “Sugars Will Eventually be Exported Transporters”
PC	Células del parénquima
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
SE	Elementos cribosos de la savia, componente del floema

## 1. Resumen

Los SWEETs son uniportadores de eflujo, son importantes para exportar la sacarosa de las células fotosintéticas hacia el floema, además de ser esenciales para nutrir a los tejidos con alta demanda de azúcares. Se desconoce si la expresión de los SWEETs se encuentra coordinada entre tejidos que tienen funciones relacionadas, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar y analizar la expresión de los presuntos SWEETs de maíz que se presentan en tejidos reproductivos, en embriones secos y germinados, tejidos que requieren de un gran aporte de nutrientes y que funcionalmente están relacionados.

Para su estudio se analizaron las secuencias de los posibles SWEET en la base de datos de ARAMEMNON y MaizeGDB, dividiéndose en tres grupos, 1) hojas, 2) en raíces y 3) en otros tejidos. En este último grupo se encontraron ZmSWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14b y 15b y se diseñaron oligonucleótidos para amplificar específicamente cada uno. Se obtuvo y calibró el RNA de cada uno de los tejidos y se realizó la reacción de RT-PCR para los SWEETs de los tres grupos de tejidos. Los SWEETs que se expresan de manera alta y muy similar en tejido reproductivo, en semillas y embriones fueron ZmSWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a y 14b, estos dos últimos con una mayor expresión. Es posible que la función de los tejidos y el abasto de los azúcares estén relacionados para la expresión diferencial de los SWEETs.

Adicionalmente, se encontró que el paso del embrión en estado seco a embrión germinado involucró un cambio en el perfil de expresión de los 7 SWEETs analizados. SWEET4b, 4c y 6b aumentaron su expresión a las 6 h, SWEET6a aumento a las 12 y 18, SWEET14 tuvo la más alta expresión, cerca de 300 veces más que en el embrión seco. SWEET11a no se expresó al tiempo 0 pero aumentó conforme transcurrió la germinación hasta 300 veces. Por el contrario el SWEET15 se expresó a niveles similares durante las 30 h de imbibición analizadas. Con este estudio se identificaron posibles SWEETs que podrían ser necesarios para nutrir al tejido embrionario evento necesario para que ocurra la emergencia de la radícula.

## 2. Introducción

### 2.1. Generalidades del maíz

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente “lo que sustenta la vida” (FAO, 1993). Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. El maíz presenta tanto la flor femenina (elote, mazorca, choclo o panoja) como la masculina (espiga o espiguilla), ambas se encuentran en distintos lugares en la planta. *Z. mays* es una especie que se reproduce por polinización cruzada, es decir que generalmente es producto de la cruce de dos individuos diferentes. La polinización cruzada tiene como ventajas una base genética más grande y mayor facilidad de adaptación a los cambios ambientales, en comparación a aquellas especies que se autocruzan.

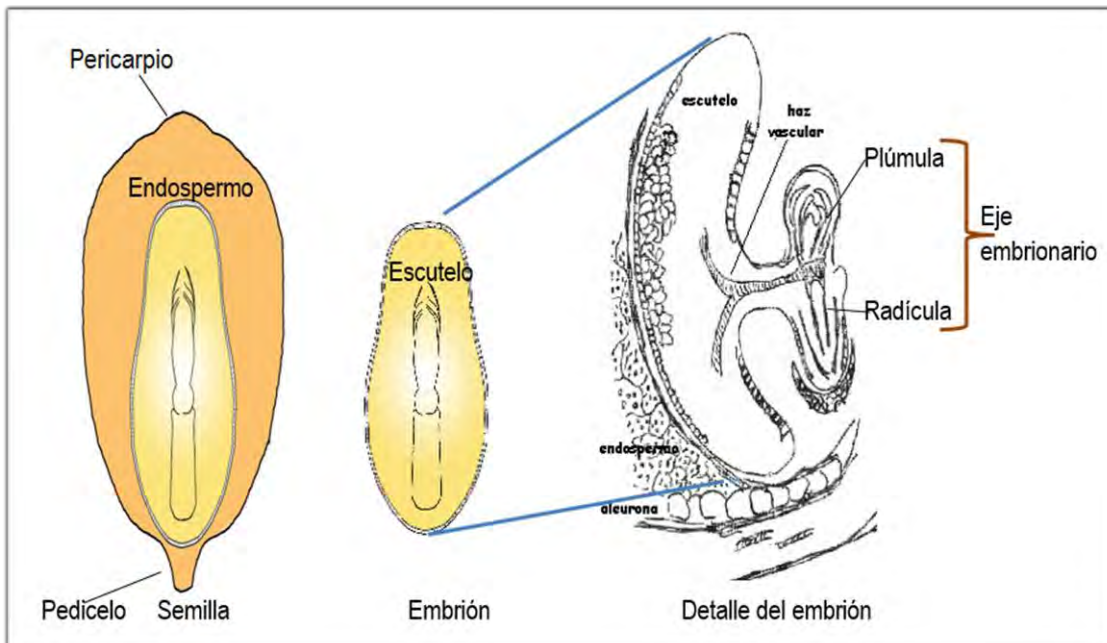
Las panojas (a menudo, una por tallo) son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1 000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1 000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42 % del peso en seco de la planta (FAO, 1993).

El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado, diferencias debidas a los compuestos químicos depositados o almacenados en él. Las variedades cultivadas fundamentalmente para alimentación comprenden al maíz dulce y el reventador, aunque también se usan en buena medida el maíz dentado, el amiláceo o harinoso y el cristalino. El maíz de tipo dentado tiene un endospermo calloso y vítreo a los lados y en la parte posterior del grano, pero el núcleo central es blando. El maíz de tipo cristalino posee un endospermo grueso, duro y vítreo, que encierra un centro pequeño, granuloso y amiláceo (FAO, 1993). El maíz normal inmaduro en la panoja es objeto de gran consumo, hervido o tostado. En México, Guatemala y los países andinos el maíz harinoso es un grano con endospermo blando.

### 3. Morfología y fisiología del maíz

#### 3.1. Estructura de la semilla del maíz

La semilla contiene un embrión y un tejido de reserva, encerrado por dos, tegumentos seminales, el pedicelo que le permite sujetarse a la planta madre, y el pericarpio que le protege de los cambios ambientales y de eventuales ataques de patógenos externos como hongos y bacterias (Figura 1). Los embriones del maíz se componen de un cotiledón, que estructuralmente son análogos a las hojas, sin embargo en el maíz este cotiledón está modificado, recibe el nombre de escutelo, este le permite absorber y sintetizar moléculas para la nutrición del eje embrionario, que es el tejido más interno del embrión. El eje embrionario, tiene en su extremo superior a la plúmula, que consiste en un meristemo con varias hojas rudimentarias, mientras que en el extremo opuesto se encuentra la raíz primaria o radícula. Recubriendo al embrión se encuentra el endospermo el cual contiene considerables cantidades de nutrimentos que fueron acumulados durante la fase de maduración de la semilla (Meyer, 1996).



**Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.** Tomado y modificado de Enríquez-Arredondo 2005 y Sánchez-Linares *et al.*, 2012.

El endospermo constituye la principal reserva energética de la semilla, de la cual la plántula obtiene almidón y sustancias proteicas para hacer frente a sus necesidades durante el periodo previo al desarrollo del aparato radicular y a la aparición de las hojas, una vez que la plántula sea fotosintéticamente activa, será capaz de sintetizar la cantidad de carbohidratos necesarios para su desarrollo y crecimiento. El endospermo, en el maíz dentado, supone 4/5 del peso total de la semilla y está constituido por un 90 % de almidón y un 7% de proteína y pequeñas cantidades de lípidos y sustancias minerales (Bartolini, 1989; Domínguez, 1992).

El embrión tiene un alto contenido de lípidos, del 35 al 40 % además de otras biomoléculas, que en los primeros estadios de la germinación y crecimiento de plántula le proveerán de nutrientes al eje embrionario, que es propiamente una planta en miniatura (Bartolini, 1989; Sánchez-Linares *et al.*, 2012)

#### **4. La germinación de la semilla**

La germinación es la reanudación del crecimiento activo de la semilla seca y madura, fase crítica en el ciclo de la vida de la planta y el primer paso para el establecimiento exitoso de la misma. La germinación inicia cuando entra en contacto con el agua bajo condiciones favorables de temperatura, lo que provoca el aumento de volumen de los tejidos, su activación metabólica y la ruptura de los tegumentos seminales con el brote de los tejidos embrionarios (Meyer, 1996).

La germinación consta de tres fases de acuerdo a la toma de agua por parte de la semilla: Fase I o de hidratación, Fase II o de germinación y Fase III o de crecimiento. (Figura 2)

En la Fase I o de imbibición ocurre el ingreso rápido del agua al interior de las semillas. Puesto que las semillas contienen entre un 8 a 12 % de agua, la entrada de agua se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico que es menor en las semillas secas en comparación con el medio exterior (McDonald y Kwong, 2005). La rehidratación de la semilla impone un considerable daño a los

componentes celulares, ya que el ordenamiento de las biomoléculas a bajo contenido de agua permitía tener poco contacto con agua, así la presencia de agua les permite mayor movilidad a las biomoléculas y la formación de nuevos puentes de hidrógeno, por lo que principalmente comienzan los mecanismos de reparación del DNA, mitocondrias y membranas (Bewley, 1997; Weitbrecht *et al.*, 2011).

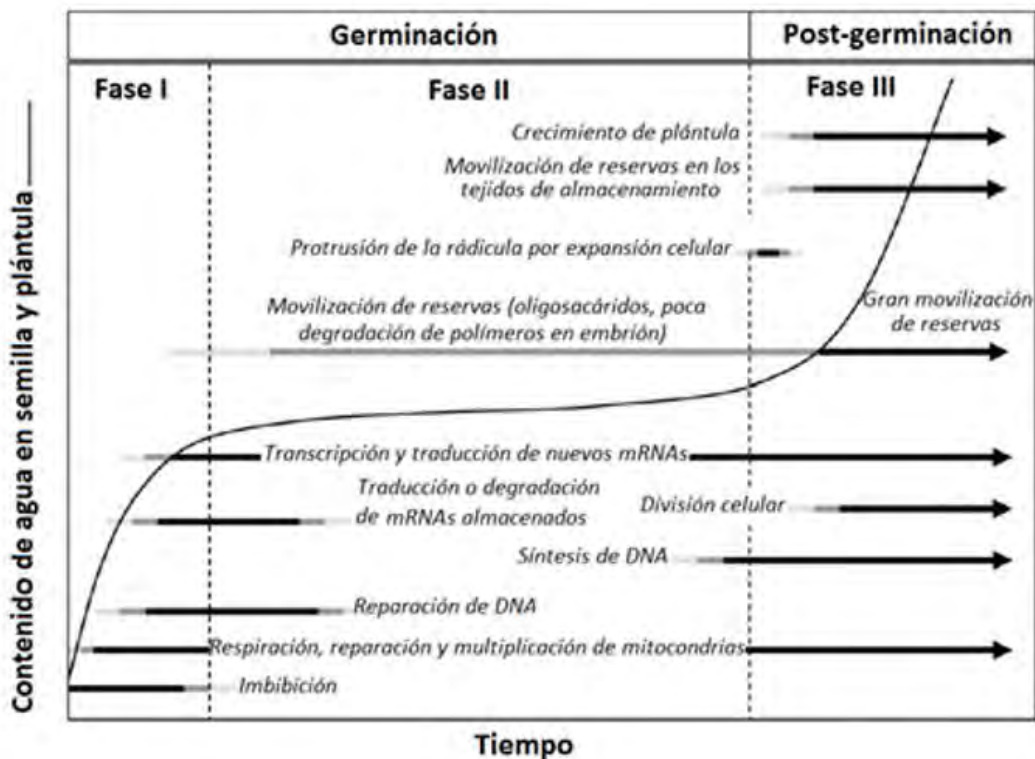


Figura 2. Curso temporal de los procesos celulares involucrados durante la germinación de semillas (Nonogaki *et al.*, 2010).

En la Fase II, son los factores ambientales y la fisiología de la semilla los que determinan si se continúa con el proceso de germinación. Esta fase es la de mayor actividad metabólica ocurren la transcripción de nuevos genes, la síntesis de enzimas relacionadas con el crecimiento del embrión, la síntesis de DNA, entre otros. Durante esta fase se observa que la cantidad de agua permanece o se incrementa muy poco en el interior de la semilla, sin embargo hay un uso alto de

las reservas propias del embrión para la biosíntesis de las moléculas necesarias para continuar con la fase III (Bradford y Nonogaki, 2007; Sánchez-Linares *et al.*, 2012).

La Fase III presenta un incremento en la absorción de agua, así como los cambios morfológicos visibles en la semilla. Esta fase es considerada post-germinativa ya que se inicia con la protrusión de la radícula, evento previo a la división celular. En la fase III comienza la movilización de las reservas que provienen del endospermo y que le permitirán al embrión mantenerse tanto en términos de energía como de moléculas estructurales para las primeras etapas del desarrollo de la plántula (Bradford y Nonogaki, 2007).

En condiciones de campo temporalmente dos a tres días después de la entrada de agua, la semilla se hincha, si las condiciones climatológicas se mantienen favorables, emerge la radícula; posteriormente, en el espacio de dos a tres días más, emerge también la plúmula (primeras hojas), mientras que en su interior se comienzan a formar las hojas adicionales (hojas verdaderas). A los diez días después de la hidratación de la semilla despunta en la superficie el coleóptilo, nombre que se le da a la plúmula una vez que ha salido de la semilla, en forma de punta de consistencia rígida, y que apenas percibe la luz emite dos hojas, la primera de las cuales tiene una forma redonda y que no será después reconocible en la planta adulta. Alrededor de 15 a 18 días después de la siembra, la plántula tiene normalmente de 5 a 6 hojas abiertas, mientras que el sistema radicular primario permite a la planta una cierta independencia de las ahora ya agotadas reservas nutritivas de la semilla (Bartolini, 1989).



## **5. El desarrollo vegetativo**

El desarrollo de la plántula es seguido de una fase durante la cual el maíz adecúa el aparato radicular a la estructura foliar definitiva, a la que habrá de sostener y aportar nutrimentos. La planta llegará a tener de 20 a 23 hojas que son producidas por el llamado “nodo” o “punto vegetativo” que está localizado en el interior del tallo, un poco por debajo de la superficie del terreno. La producción foliar terminará poco antes de la floración. Después de la formación de la espiga (órgano reproductor masculino), del nudo inferior del tallo salen las raíces aéreas, que penetran el terreno (Bartolini, 1989).

### **5.1 La floración y la polinización**

El maíz, como excepción entre todos los cereales importantes, tiene inflorescencias masculinas y femeninas separadas, aunque se forman sobre la misma planta (Figura 3). La espiga, órgano masculino, tiene la misión exclusiva de producir granos de polen en cantidad suficiente para asegurar la fecundación del órgano femenino, formado más abajo y denominado mazorca. Se estima, que el número de granos de polen emitidos por la espiga de una planta sana y vigorosa oscila entre los 2 y 5 millones. La inflorescencia femenina, está constituida por un grupo cilíndrico de flores femeninas, cada una de las cuales está en situación de formar una cariósida (semilla). En una mazorca de dimensiones normales se puede encontrar de 700 a 1000 óvulos (futuras cariósidas maduras), dispuestos siempre en un número par de filas a lo largo del olote; que al final podrá contener de 16 a 18 e incluso 22 (Bartolini, 1989).

Dos o tres días después del inicio de la dispersión del polen, de la mazorca salen los estilos, llamados “barbas” o “sedas”, conductos largos y estrechos, cada uno de los cuales termina en la base de un óvulo (Figura 3). Los primeros en aparecer son los que corresponden a la base de la mazorca. Todos los estilos están en condiciones de recibir “activamente” los granos de polen entre dos y tres días después de la emisión del polen, con lo que queda asegurado el tiempo necesario para que la fecundación tenga lugar (Bartolini, 1989). Solamente las partes

esenciales de la flor, el pistilo y los estambres, están relacionados directamente en la formación de la semilla. En estos órganos se llevan a cabo los procesos que concluyen con la formación del grano de polen y de la ovocélula. La secuencia de eventos que concluyen con la formación de óvulos es muchas veces simultánea con la formación del grano del polen en la misma flor.

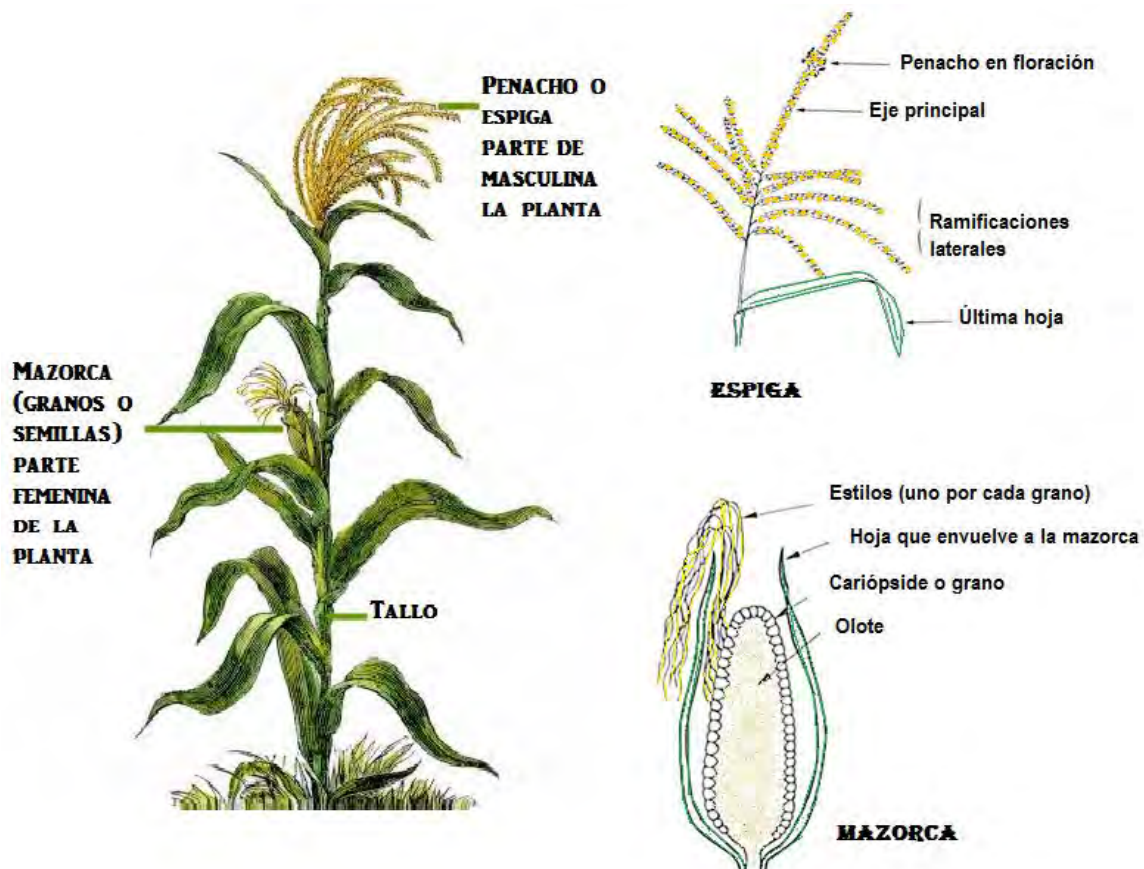
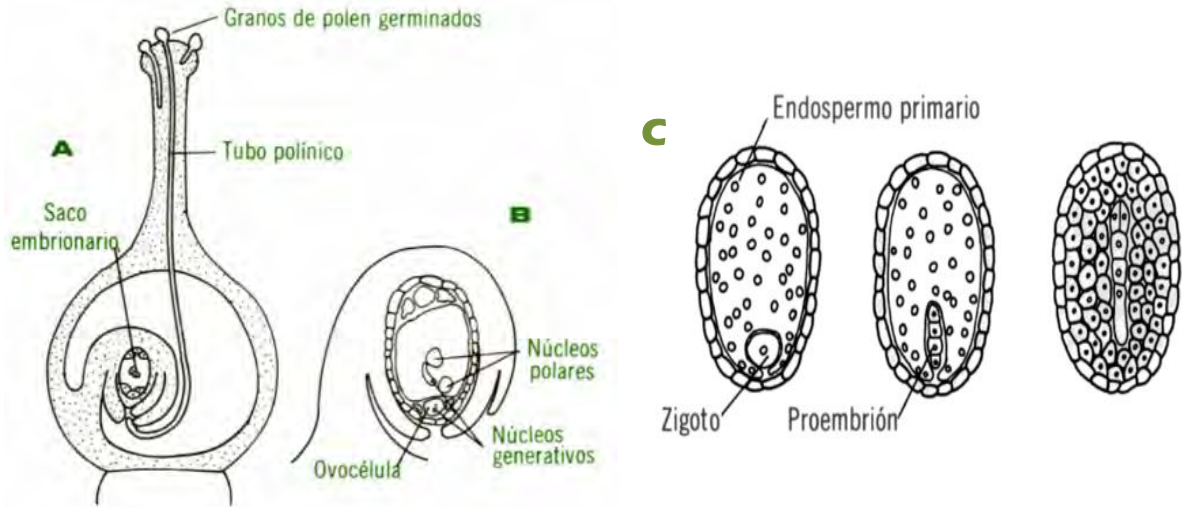


Figura 3. Planta de maíz, mostrando la espiga madura y la mazorca en formación. Modificado de Bartolini, 1989.

Cuando un grano de polen cae al estigma de una flor de la misma planta ocurre la autopolinización; si se transfiere a las flores de otras plantas ocurre la polinización cruzada. Normalmente el grano de polen germina unas pocas horas después de entrar en contacto con el estigma, originando el tubo polínico, el cual crece a través del estilo y de la pared del ovario (Figura 4A). La punta del tubo polínico pasa a través del micrópilo y penetra en el saco embrionario donde se rompe y

descarga su contenido. Si no se ha desintegrado antes el núcleo vegetativo, puede ser liberado en este momento y luego se degenera.



**Figura 4. Proceso de doble fertilización y formación del embrión. Tomado de Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo – Arregocés 1983.**

Unos de los núcleos espermáticos se fusiona con el núcleo de la ovocélula de la nueva planta, el cigoto (Figura 4B). El otro núcleo espermático se fusiona con dos núcleos del endospermo primario (Figura 4C). La fertilización de la ovocélula restablece el número normal de cromosomas,  $2n$ , de las especies. El producto de la triple fusión de los núcleos centrales inicia la formación del endospermo, que proveerá los nutrientes para el desarrollo del embrión. Estas dos uniones, la de los núcleos espermáticos con la ovocélula y los núcleos polares se conoce como doble fertilización (Arregocés, 1983).

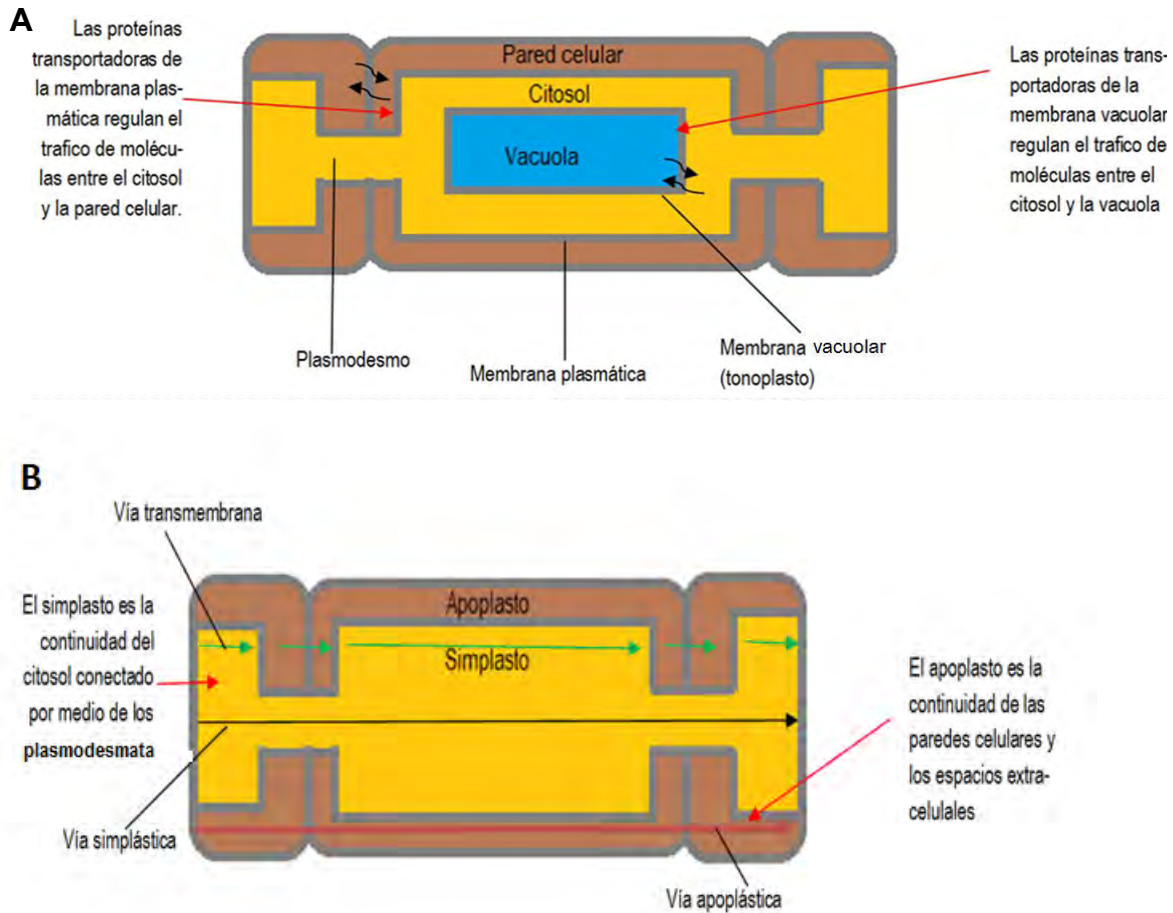
Al cabo de varias horas o días las células del proembrión están más lejos del micrópilo y se agranda y divide formando las primeras células del embrión (Figura 4C). De las células formadas por esta división las más cercanas al micrópilo darán origen a las raíces y su capa protectora, la coleoriza; las otras conformarán las partes aéreas, como son los tallos, las hojas y eventualmente las flores. A medida que la semilla continúa su desarrollo va aumentando en tamaño y peso seco, al final el endospermo está repleto de reservas nutritivas, concluye su

dependencia de la planta cuando en la base de la cariósida (en la parte que se al olote) se forma una pared callosa pardo negruzca, que impide la posterior acumulación de nutrientes en la cariósida (Arregocés, 1983). Posteriormente la semilla pasa por un estado de secado que le permite mantenerse durante largo tiempo en almacén, generalmente llega a humedades de 12 a 15 %.

El proceso de formación de nuevos órganos es altamente demandante de nutrimentos. Cuando una espiga aparece en el extremo del tallo y se puede ver la punta, la planta reduce de una manera considerable el crecimiento que tenía anteriores al ápice, y se prepara para la parte final del ciclo vegetativo, coincidiendo con la floración y la fecundación. Acceder a los nutrimentos necesarios para completar el ciclo de vida de la planta es uno de los eventos fundamentales, en el que probablemente depende del número, tipo y características de los transportadores localizados en las membranas de los tejidos en formación. A continuación, se revisa muy resumidamente el principio de transporte de solutos en las membranas y posteriormente el transporte de azúcares en las plantas.

## **6. Transporte de sustancias**

La permeabilidad selectiva de la membrana plasmática de la célula vegetal controla el movimiento de solutos dentro y fuera de la célula. Cuando los solutos tienden a difundirse a favor de su gradiente de concentración se denomina transporte pasivo, porque se produce sin gasto directo de energía metabólica de la célula. Contrario al transporte activo donde los solutos atraviesan la membrana en contra de su gradiente electroquímico, es decir los efectos combinados del gradiente de concentración del soluto (parte química) y del voltaje o carga del soluto (la parte eléctrica) a través de la membrana. El transporte es activo porque la célula debe gastar energía en forma de ATP, para sobrepasar las barreras de transportar un soluto hidrofílico en contra de su gradiente de concentración (Campbell, 2007).



**Figura 5. Vías de transporte celular.** A) Aislamiento entre la pared celular, el citosol y la vacuola son los tres compartimentos principales de la mayoría de las células vegetales maduras. B) Vías de transporte entre las células. A nivel tisular, existen las tres vías. 1. El paso de los solutos puede ser a través de los apoplastos zona café en el diagrama, también llamada vía transcelular, vía del transporte a larga distancia. 2° La vía simplástica (flecha negra) entre el plasmodesmo. 3° vía de transporte es la apoplastica (flecha verde) en donde los solutos pasan de membrana a apoplasto y de este a membrana para moverse entre células. Las sustancias pueden transferirse de una vía a la otra. Tomado de Campbell, 2007.

La membrana plasmática es una barrera entre dos compartimentos principales: la pared celular y el citosol, aunque también la vacuola contribuye en las células vegetales de manera importante a regular la concentración de solutos y la osmolaridad (Figura 5). Cuando el movimiento de solutos ocurre a largo del continuo de los apoplastos, esta vía es denominada extracelular o transcelular.

Por otra parte, en las células vegetales se puede establecer un continuo de células vecinas para el paso de ciertos solutos a través de conductos especializados denominados plasmodesmata (nombre en plural del plasmodesmo), formados de proteínas, retículo endoplásmico y membrana. Estos conductos tienen la capacidad de permitir el paso de muchas moléculas, entre ellas los azúcares, y se presentan tanto en el floema, como en algunas células, de hecho hay plantas que mantienen el movimiento de moléculas mayoritariamente a través de estos conductos. Al continuo de las paredes celulares y el interior celular se denomina simplasto, por lo que esta vía de transporte de solutos es denominada simplástica y el movimiento de solutos es difusional.

Hay células que no contienen plasmodesmata o bien que en algunas etapas críticas del desarrollo pierden estas conexiones, por lo que los solutos se transportan a través de proteínas membranales, es decir el soluto en algún momento se encuentra en el apoplasto, por lo que este tipo de transporte también es referido como apoplástico y depende de transportadores membranales (Eschrich, 1980; Campbell, 2007).

Los transportadores proteicos son proteínas anfipáticas, estereoespecíficas por el soluto a transportar y permiten el paso de solutos hidrofílicos. En el caso del movimiento de los azúcares, en plantas hay tres familias encargadas de su transporte. **Los transportadores simportadores azúcar/H<sup>+</sup>**, concentran los azúcares en la célula a expensas del movimiento de protones. Los transportadores SUT (Sucrose Transporter) y los SPT (Sugar Protein Transporter) son simportadores, el primero transporta sacarosa y el segundo hexosas o pentosas en contra de gradiente de concentración (Braun *et al.*, 2014).

El otro tipo de transportador localizado en la membrana fue reportado en el 2010 (Cheng *et al.*, 2010) y fue nombrado **SWEET** (Sugars Will Eventually be Exported Transporters por las siglas en inglés), transportador que eventualmente expulsa azúcares. Los SWEETs son proteínas que se pliegan en la membrana con 7 hélices transmembranales (Figura 6). El monómero tiene actividad de transporte pero se sugiere que forman trímeros, lo que posiblemente favorece un transporte cooperativo. Los SWEETs tienen la capacidad de mover azúcares de manera difusional y bidireccional (Sonnenwald, 2011; Xuan *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2015).

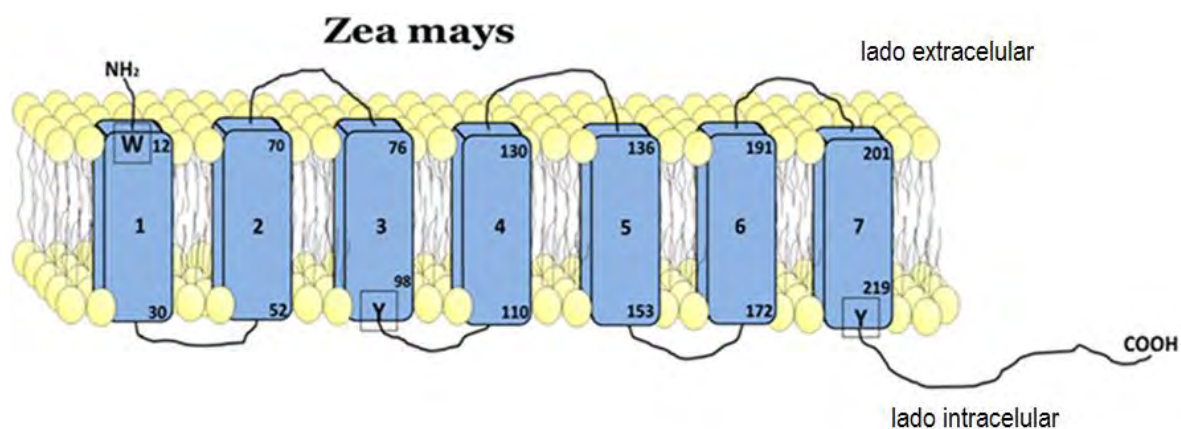


Figura 6. Topología propuesta para el SWEET13a de maíz en la membrana. Tomado de Carvente-García, 2014.

### 6.1. Transporte de azúcares

La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis, se produce en los tejidos verdes de la planta, que son denominados “fuente” debido a que sintetizan cantidades en exceso de azúcares, el exceso de estos es exportado para su distribución en los tejidos no fotosintéticos, también llamados tejidos demanda como las raíces, meristemos, tubos polínicos, frutos, semillas entre otros (Büttner, 2007; Schroeder *et al.*, 2013). Las concentraciones de sacarosa que se pueden alcanzar en el tejido fuente son de 0.5 a 1 M, mientras que en el tejido demanda de 5 a 150 mM.

El transporte y distribución de la sacarosa se debe a diferentes transportadores. Si dividimos a la planta por el proceso de transporte la podríamos dividir en tres: Cargado del floema, que es el movimiento de azúcares desde las células del mesófilo de las hojas hacia el floema. Transporte en el floema, en donde el movimiento de los azúcares ocurre a lo largo del floema para llevar los azúcares a las cercanías de los tejidos demanda; y el tercero la descarga del floema, el transporte de azúcares desde el floema hacia el interior de las células demanda.

**Transporte en el floema.** El movimiento de azúcares en el floema es difusivo. El floema además de azúcares transporta aminoácidos, RNA, factores de transcripción, minerales, compuestos de defensa y moléculas señal, entre otros, y los dirige a todos los tejidos demanda (Slewinski *et al.*, 2013). El floema está formado esencialmente por tres tipos de células: los elementos cribosos (SE), las células acompañantes (CC) y las del parénquima (PC). Los SE están altamente modificados para crear un conducto de células contiguas que presentan baja resistencia al paso de solutos, no contienen núcleo, mitocondrias o cloroplastos (Figura 7). Las CC son vecinas de los SE y son las encargadas de mantener a los SE ya que las CC si tienen la capacidad biosintética que han perdido los SE, mientras que las PC son las más externas del floema y las que están en contacto con las células del mesófilo o los tejidos demanda.

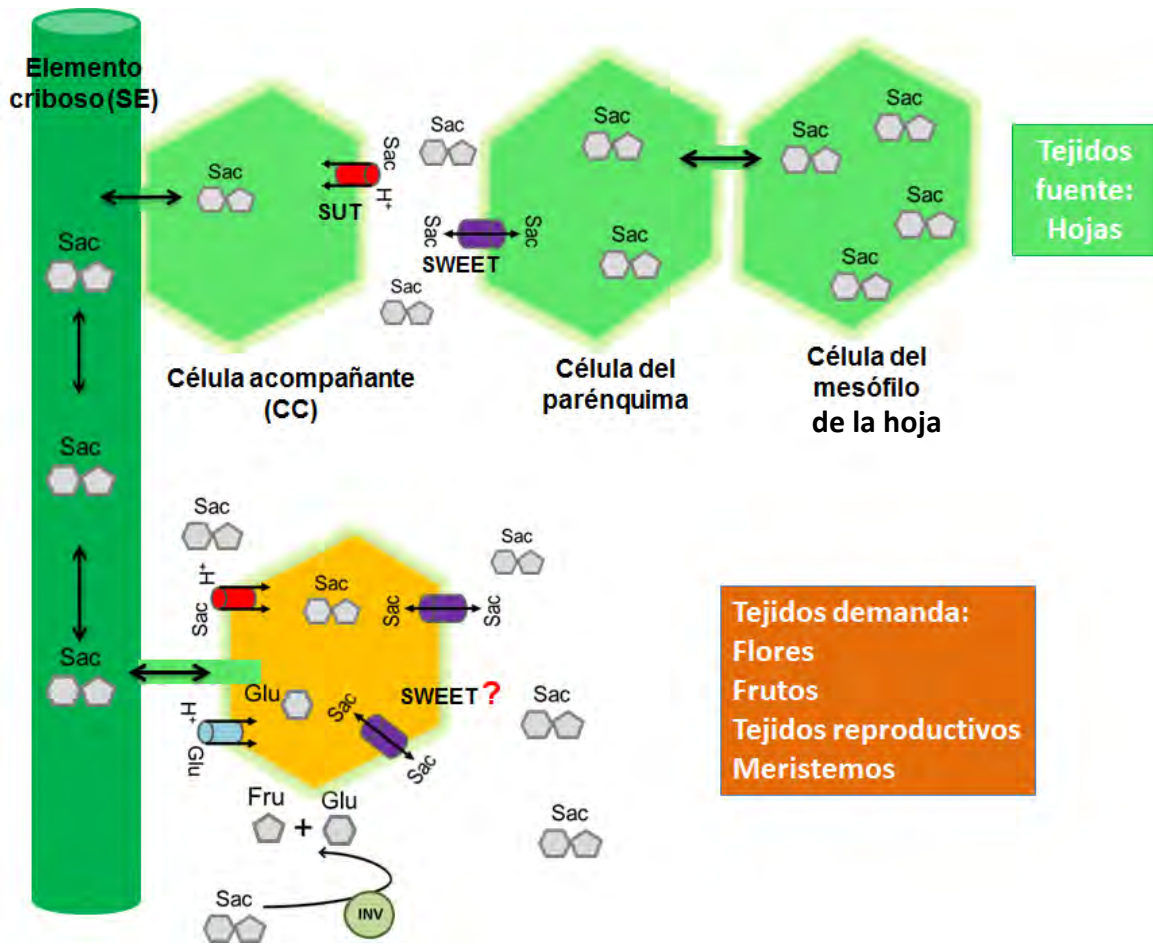
**Cargado del floema.** El proceso de “llenarse o cargarse” de nutrimentos así como el de “descarga” hacia los tejidos demanda es múltiple, ya que existen diferentes mecanismos de transporte (Wang *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la reducción en el transporte de sacarosa debido a un transportador membranal afecta el crecimiento de la planta de maíz (Braun *et al.*, 2014), lo anterior señala que no solo los plasmadesmata y la integridad del floema son importantes en el movimiento de los azúcares sino también el transporte apoplástico.

Para el llenado del floema, los azúcares tienen que ser concentrados en el tubo criboso o SE, sin embargo, los azúcares tienen que moverse difusionalmente



desde la célula del parénquima de la hoja hacia las CC, si ambas células están conectadas simplásticamente, los plasmodesmata harán el trabajo, sino entonces los azúcares son transportados hacia los apoplastos de la CC, en este paso interviene un SWEET (Chen et al., 2010), entonces la CC a través de transportadores SUT concentran sacarosa y luego el CC a través de plasmodesmata le transfiere el azúcar al SE (Figura 7).

**Descarga del floema.** La sacarosa que viene del floema puede ser directamente colocada en la célula a través de plasmodesmata o bien en los apoplastos, si esto último ocurre, hay transportadores SUT que la importaran a la célula demanda (Figura 7). Alternativamente la sacarosa puede hidrolizarse en glucosa y fructosa en el espacio extracelular por las invertasas de la pared celular (Wang *et al.*, 2013). Las hexosas producidas son internalizadas por los transportadores de monosacáridos, SPT o SWEET (Lemoine, 2000; Rolland *et al.*, 2006; Slewinski, 2011).



**Figura 7. Transporte de sacarosa a través del floema.** La sacarosa se sintetiza en la célula del mesófilo de la hoja, se concentra y posteriormente se transporta vía plasmodesmata a la célula del parénquima del floema, así ambas células tienen concentraciones altas de sacarosa (cerca de 1M). Posteriormente el azúcar se puede transportar hacia las células acompañantes, sin embargo no todas las células están conectadas vía plasmodesmata, por lo que los transportadores difusionales SWEETs transportan la sacarosa a los apoplastos. Los azúcares son tomados por los transportadores SUT para concentrar a los elementos cribosos de la savia, entonces el floema se ha cargado de sacarosa. Ésta se moverá hacia lugares menos concentrados de azúcares (50 a 150 mM) y al llegar a un tejido demanda puede descargarse hacia este, vía plasmodesmata o bien por transportadores: SUT, SPT o SWEETs se pueden encargar de tomar la sacarosa o las hexosas producidas de la hidrólisis de la sacarosa por invertasas (INV), llevando el azúcar a las células demanda. Tomado y modificado de Carvente-García (2014).

## 6.2. SWEETs.

Los SWEETs son una familia multigénica, en el caso de *Arabidopsis* la familia contiene 17 miembros, mientras que en maíz se proponen 22 miembros (ARAMEMNON), de esta familia solo se ha reportado el papel de SWEET4c aunque no su capacidad de transporte (Sosso *et al.*, 2015). Hay algunos SWEET que están especializados en el movimiento de sacarosa (Chen *et al.*, 2010) y otros en el de hexosas (Chen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016), aunque SWEET11 y 12 parecen transportar tanto sacarosa como hexosas pero con afinidades muy diferentes para cada uno (Le Hir *et al.*, 2015). Muchos se han encontrado en la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2010), pero también hay localizados en la vacuola (Klemens *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015b) y en el caso de los humanos en donde solo hay un SWEET se encuentra en el Golgi y en el retículo endoplásmico de las células del riñón (Chen *et al.*, 2010).

## 7. Función fisiológica de los SWEETs

Antes de describirse a los SWEETs se desconocía como ocurría el movimiento difusional de azúcares, actividad importante no solo en el cargado (Chen *et al.*, 2010 y 2012) y probablemente en la descarga del floema, sino también en otros procesos de la planta.

La salida de azúcares de las raíces es un proceso necesario para la atracción de microorganismos benéficos a la rizósfera<sup>1</sup>, recientemente se encontró que en parte se debe a la actividad de los SWEETs (Chen *et al.*, 2015b; Durand *et al.*, 2016; Palacios-Vargas, 2016). La entrada de azúcares para la formación del polen en *Arabidopsis* se encontró que depende de AtSWEET8, una mutación en este gen previene la formación del desarrollo del microsporocito ya que se inhibe la

---

<sup>1</sup> Región del suelo cuya actividad biológica es influenciada por las raíces de las plantas. Compuesta por las raíces de las plantas, microorganismos, los exudados de ambos y los componentes del suelo (<http://biologiadelsueloudea20132.blogspot.mx/p/macrobiologia-del-suelo.html>).

salida de glucosa desde las células del tapetum (Guan *et al.*, 2008). La salida de azúcares hacia los nectarios, tejido que tiene la función de atraer a los polinizadores, se debe a la presencia de AtSWEET9 (Lin *et al.*, 2014).

La formación de la semilla necesita de un gran aporte de nutrientes por parte de la planta madre, ya que se acumulan las reservas de nutrimentos que le permitirán continuar su ciclo, durante esta etapa se encontró que los transportadores SWEET son importantes para el movimiento de los azúcares, principalmente de hexosas entre los tres integumentos que recubren al embrión de *Arabidopsis*, así los SWEET11, 12 y 15 son críticos (Chen *et al.*, 2015b). También en maíz se investigó la participación de los SWEETs en el llenado del grano, encontrándose que el transportador SWEET4c es necesario para que el endospermo se llene de almidón. La ausencia de la actividad de transporte del SWEET4c reduce el llenado del grano a 1/3 de su capacidad (Sosso *et al.*, 2015).

## 8. Justificación

Los transportadores SWEETs han sido caracterizados en *Arabidopsis*, arroz, tomate, uva entre otros. En la base de datos de las proteínas de membrana (ARAMEMNON) hay 22 secuencias anotadas como posibles transportadores SWEETs de maíz, de estos solo el SWEET4c ha sido caracterizado.

El SWEET4c se encuentra involucrado durante la embriogénesis en el llenado de la semilla, ya que una mutación en este transportador lleva a que la semilla madura tenga un contenido reducido de almidón, similar en fenotipo a la mutante miniatura que debe su fenotipo a la mutación en el gen de la invertasa de la pared celular (Sosso *et al.*, 2015).

Los transportadores SWEET mueven los azúcares, sacarosa o monosacáridos a favor del gradiente de concentración es decir de sitios en donde se han acumulado hacia donde hay menor concentración (Chen *et al.*, 2012). Durante la formación de

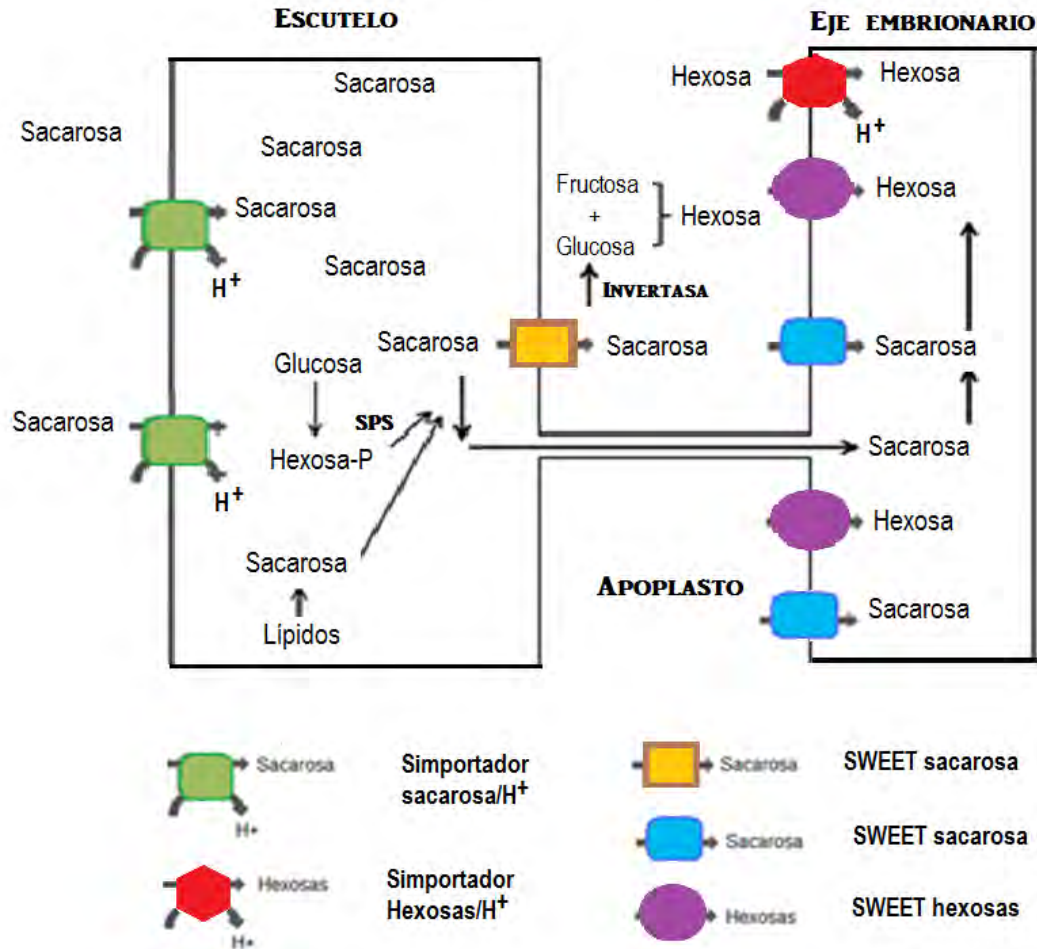
los diferentes tejidos de la planta es necesario el transporte de azúcares. Se conoce que en *Arabidopsis* los SWEET11 y 12 están involucrados en el transporte de los azúcares hacia el floema (Chen *et al.*, 2012; Le Hir *et al.*, 2015) así como en el llenado de la semilla (Chen *et al.*, 2015a), aunque se desconoce la función de muchos SWEETs y si son específicos de la formación de ciertos tejidos.

El desarrollo de los tejidos reproductivos en maíz es un evento coordinado, la inflorescencia masculina aparece primero seguido de la maduración de los granos de polen, 2 o 3 días después aparece la inflorescencia femenina y los estilos aún inmaduros pueden albergar al polen y permitirle polinizar al óvulo (Azcon, 1993). Es posible que la expresión coordinada de un mismo SWEETs o varios permitan la movilización de los azúcares desde el tejido vascular de la planta madre hacia los tejidos reproductivos y le permitirán a la planta continuar con su ciclo de desarrollo, la formación de la semilla. Con la idea de que es posible que el abasto de nutrientes debido a los SWEETs sea un evento coordinado entre tejidos, se seleccionaron un grupo de SWEETs para estudiar su expresión en tejidos reproductivos y en la semilla.

También se evaluó la expresión de los SWEETs durante la germinación, que es el evento inmediato posterior a la formación de la semilla. En nuestro grupo se ha estudiado el transporte de azúcares durante la germinación y el estudio de los transportadores SWEETs contribuirá a determinar el mecanismo y la temporalidad de los eventos de transporte de azúcares en los tejidos embrionarios hacia su emergencia y desarrollo como planta. Durante el proceso de germinación el transporte de solutos desde los tejidos almacenadores como el endospermo y el escutelo se dirigen hacia el eje embrionario (Figura 8). Se conoce que el escutelo tiene un contenido alto de lípidos que degrada para formar sacarosa, contiene transportadores en simporte para transportar sacarosa y  $H^+$ , que le permiten a este tejido acumular sacarosa (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). La salida de los azúcares hacia los apoplastos podría ser difusional y debida a los SWEETs, a la fecha no se ha estudiado al transportador que exporta estos azúcares en los escutelos. Se

desconoce también si el eje embrionario toma los azúcares en forma de hexosas o sacarosa y que transportador es el encargado incorporarlos a las células del eje embrionario, los transportadores SWEETs son buenos candidatos para cubrir esta función. El eje carece de transportador de sacarosa/ H<sup>+</sup> (Sánchez-Linares *et al.*, 2012), por lo que es posible que algún transportador SWEET se ocupe específicamente de la nutrición del eje durante la germinación.

Para dilucidar el papel de estos transportadores es necesario primero determinar si estos genes se expresan en el tejido y etapa del desarrollo de interés. En este trabajo el objetivo principal fue identificar a los SWEETs que se expresan de manera alta en los tejidos embrionarios o reproductivos del maíz, conocimiento que será útil para caracterizar funcionalmente a los SWEETs que son clave durante las fases de germinación o de formación del grano y en los tejidos reproductivos y que permitirá determinar si un grupo de SWEETs es específico de la formación de tejidos relacionados.



**Figura 6. Modelo del transporte de azúcares en tejido embrionario de maíz.** El embrión se encuentra formado del escutelo (tejido fuente) y el eje embrionario (tejido demanda). En el escutelo se logra acumular una gran cantidad de azúcares solubles en la germinación, ya sea por su síntesis en ese tejido o bien por su transporte, a través de los transportadores de sacarosa/H<sup>+</sup> que han sido encontrados exclusivamente en los escutelos (Sánchez-Linares et al., 2012). El movimiento de sacarosa hacia el eje embrionario podría ocurrir a través de transportadores SWEETs o a través de plasmodesmata, aunque al inicio de la germinación el tejido vascular está poco desarrollado. El eje por su parte podría tomar la sacarosa o bien las hexosas, mediante transportadores SWEET específicos para cada azúcar o bien a través de simportadores Hexosas/H<sup>+</sup>.

## **9. HIPÓTESIS**

Un grupo de SWEETs se expresaran mayoritariamente en tejidos que dependen de glucosa, fructosa y sacarosa para alcanzar su maduración de manera coordinada, en tejidos relacionados funcionalmente.

## **10. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Obtener el nivel de expresión de 18 de los transportadores SWEETs predichos para maíz en tejido reproductivo y en semillas durante la germinación.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

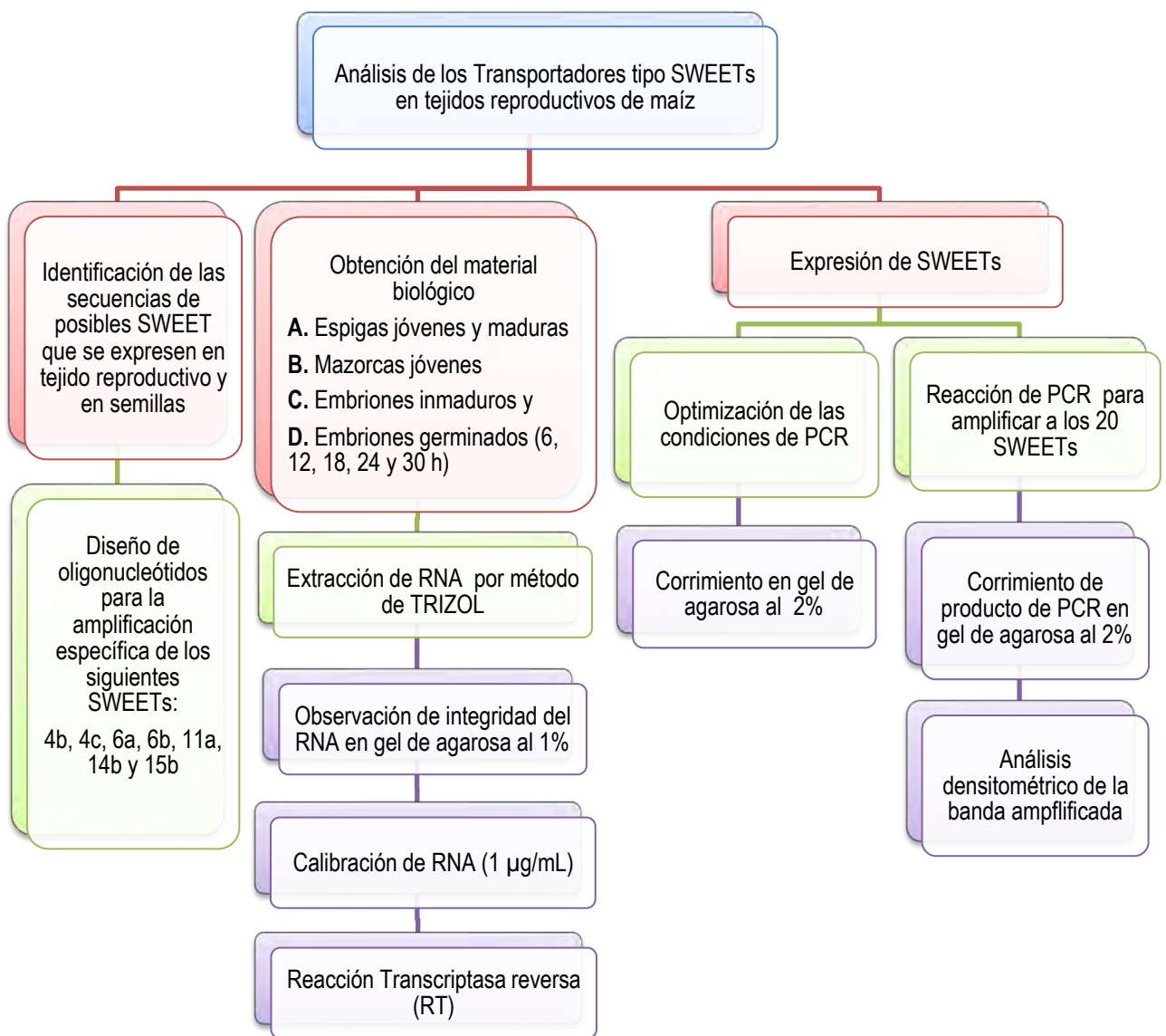
1. Diseñar oligonucleótidos específicos para los transportadores SWEETs de maíz que se expresan en tejido reproductivo y semilla.
2. Obtener las condiciones de amplificación para los SWEETs que se expresan preferencialmente en tejido reproductivo y semilla.
3. Crecer plantas de maíz y germinar embriones por diferentes tiempos.
4. Extraer, cuantificar y calibrar el RNA de tejido reproductivo y semilla
5. Analizar los perfiles de expresión de 18 presuntos SWEETs en los tejidos seleccionados mediante PCR punto final.



## 11. MATERIALES Y MÉTODOS

### 11.1. Estrategia experimental

Para cumplir los objetivos de este trabajo el proceso experimental implicó (Figura 9): a) Análisis Bioinformático de las secuencias tipo SWEET en tejidos reproductivos de maíz, para diseñar los oligonucleótidos que específicamente los amplificarían; b) Obtención de tejidos y extracción de RNA y c) Reacción de PCR para obtener los niveles de expresión de 19 genes de los propuestos SWEETs de maíz.



**Figura 9.** Estrategia experimental para obtener los niveles de expresión de los SWEETs de tejido reproductivo y semilla.

## **11.2. Diseño de las secuencias de oligonucleótidos para los presuntos transportadores SWEET de tejidos reproductivos y semilla de maíz.**

Se obtuvieron las secuencias de los presuntos transportadores SWEET de maíz de la base de datos del Genbank y EnsemblePlants. Hay 22 secuencias reportadas que podrían codificar para transportadores SWEET en maíz. En este trabajo solo se buscaron aquellas secuencias que se encontraban en espiga y semilla, de acuerdo a la base de datos del MaizeGDB en total se seleccionaron 7. Sin embargo, se analizó la expresión de 18 SWEETs en los tejidos reproductivos.

La expresión de genes SWEETs reportada en MaizeGDB fue obtenida mediante microarreglos en una línea de maíz denominada B73 (Sekhon *et al.*, 2011). Es posible que los presuntos genes para los transportadores SWEETs se encuentren expresados de una manera similar en el maíz que usamos en este trabajo, Chalqueño, pero esto tenía que ser demostrado, además de que no se tiene información del número SWEETs y nivel de expresión de estos durante la germinación del maíz.

Una vez identificados los genes en las bases de datos (Anexo 1) se realizó el diseño de los oligonucleótidos para evaluar mediante PCR punto final los niveles de expresión de los SWEETs en algunos tejidos demanda como la espiga, la semilla en formación, la semilla seca y el embrión germinado. El diseño se realizó mediante el programa Primer3 disponible en línea (Tabla 1). Cada uno de los oligonucleótidos se analizó mediante el programa Oligoanalyzer, el cual arrojó información de las energías libres de formación de dímeros (homo y heterodímeros de oligonucleótidos). Valores cercanos a -10 Kcal/mol sugieren formación de dímeros, así que se elegían aquellos que tuvieron valores mucho menores. Además se analizó por comparación con las secuencias de interés que fuera específico para el gen esperado (Anexo 2).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los SWEETs de espiga, semilla en formación y tejido maduro.

SWEET	Secuencia de oligonucleótidos	Peso molecular del producto esperado (pb)
4b	F5'-AAATGGCTGGCCTGTCTCTA-3' R5'-TGATGAGCAGGAAGCTCGTTG-3'	240
4c	F5'-CAGCAAGCAAAAGCCACATA-3' R5'-AGCAACAAGACAGCAGCAGA-3'	218
6a	F5'-GTTCTCGCTTCTCGTCTCT-3' R5'-GAGAGATCATCTTCGGTCGC-3'	104
6b	F5'-CTCCTCGGCCTATAAAGTG-3' R5'-CTCGTCTCTTCGTCTAGCC-3'	110
11a	F5'-GTCGCCTTAGCTCCTCTCC-3' R5'-AAGAGGCCTCCTGCCATTAT-3'	227
14b	F5'-TAACCAACCTACGCCTCCAC -3' R5'-CGACATCGACATCGAAGCTA-3'	224
15b	F5'-TAACCAACCTACGCCTCCAC -3' R5'-CGACATCGACATCGAAGCTA 3'	240

### 11.3. Material biológico

**Tejidos de plantas maduras de maíz.** Para germinar a las semillas de maíz Chalqueño se les quitó el pedicelo y después se desinfectaron con una solución de 2% de hipoclorito de sodio preparado a partir de Cloralex® al 2 % con agitación por 2 min. Posteriormente las semillas se enjuagaron con agua estéril al menos 5 veces hasta que el olor del hipoclorito desapareciera. Las semillas colocaron en 1 % agar a 29°C por 72 h y aquellas semillas que germinaron se colocaron en macetas de 10 L de capacidad con Metromix Sunshine 4 como sustrato. Las plantas se colocaron en el invernadero con fotoperiodo natural a una temperatura de 20 a 25 °C y fueron regadas cada tercer día con agua corriente. Al mes se les añadió el fertilizante triple 17 que contiene nitrógeno, fósforo y potasio a un porcentaje del 17 % cada uno. Los tejidos que se cortaron de las plantas maduras (aproximadamente 3 meses) fueron: espiga joven, espiga madura, mazorca joven. Los tejidos se cortaron en el invernadero y fueron cubiertos con papel aluminio y

congelados con N<sub>2</sub> líquido y después almacenados a -80°C hasta su uso. El experimento se realizó en tres réplicas independientes.

**Embriones secos y germinados de maíz.** Para la extracción manual de los embriones de las semillas de maíz se usó una navaja de un solo filo. Un lote de 20 embriones se desinfectaron como se describió anteriormente y luego se germinaron en 1 % agar a 29°C en la oscuridad por diferentes tiempos. Después el tejido fue envuelto en papel aluminio, congelado con N<sub>2</sub> líquido y almacenado a -80°C hasta su uso. El experimento se realizó en tres réplicas independientes.

#### **11.4. Extracción de RNA por el método de Trizol**

**Fundamento.** Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de las muestras en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción y precipitación del RNA total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa. El RNA total se purifica selectivamente para eliminar las proteínas, por otro lado el DNA y otros contaminantes son extraídos por ácidos orgánicos. El tratamiento con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico es necesario para remover contaminantes por extracción ácida con fenol, donde el DNA y una porción de las proteínas queda en la fase orgánica, mientras que el RNA permanece en la fase acuosa y es concentrado por precipitación con isopropanol para posteriormente lavarse con etanol (Barrón,1997).

**Técnica de extracción de RNA.** Para tener una muestra representativa de los tejidos que se estudiaron se molieron aproximadamente 10 g de cada tejido en morteros libres de RNAsas (previamente lavados con 5 mL Cloralex®, enjuagados con agua-dietilpirocarbonato o DEPC y esterilizados por 30 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm<sup>2</sup>). Se pulverizo cada tejido con N<sub>2</sub> líquido y se transfirió a un tubo falcón estéril y frío se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la obtención del RNA se tomaron de 50-100 mg del pulverizado en un microtubo de 1.5 mL y se le agregó 1 mL de Trizol se mezcló el contenido del tubo

con un vortex hasta resuspender. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente, después se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 seg. Nuevamente se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 15 min a 12000 x g a 4°C. Con una pipeta se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo evitando la interfase.

Para precipitar el RNA se añadieron 0.5 mL de isopropanol frío (-20°C) y se mezcló por inversión, agitando los tubos 5 veces. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4°C. El RNA formó un botón blanco o transparente en el fondo o en el lado del microtubo.

El lavado del RNA se realizó descartando cuidadosamente el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 70 % y se mezcló con vortex por 15 seg, se centrifugó a 12000 x g por 5 min a 4°C y se repitió el lavado dos veces más. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente con micropipeta y se dejó secar al aire por 5 min. El botón se disolvió el botón en 30-60  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. Por último, se almacenó a -80°C.

En el caso de los embriones secos y germinados se llevó a cabo todo el procedimiento hasta la precipitación del RNA con la adición de isopropanol, pero ya que la solución se enturbiaba excesivamente se realizó un tratamiento adicional en el botón para quitar el exceso de carbohidratos que contiene. Para asegurar la resuspensión completa del botón de RNA se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O estéril. Después se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de PCC (mezcla hecha con 200  $\mu\text{L}$  0.1 M de amortiguador de citratos pH 4.2 y 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo). Después se centrifugó por 10 min a 12000 x g a 4°C y la fase acuosa se colocó en un microtubo limpio, evitando la interfase y se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se mezcló el contenido del tubo con un vortex, se centrifugó nuevamente por 10 min a 12000 x g a 4°C. Se colocó la fase acuosa en un microtubo limpio evitando la interfase y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de 3 M acetato de sodio y 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 100 %, se mezcló

por inversión de 5 a 8 veces y se precipitó a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Después se centrifugó por 10 min a  $12000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  y se retomó el protocolo básico en el punto de lavado de RNA con etanol mencionado anteriormente.

### **11.5. Cuantificación y calibración del RNA extraído**

El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 200 Thermo® Scientific,. Se calculó el volumen necesario para obtener  $1 \mu\text{g}$  de RNA. Para evaluar la integridad del RNA se cargaron geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X (40 Mm Tris acetato pH 8.2 a 8.4 y 1 mM EDTA y bromuro de etidio ( $0.5\mu\text{L}/\text{Ml}$ ), usando  $1 \mu\text{g}$  de la muestra de RNA de cada uno de los tejidos, para ello al volumen de RNA calculado se le agregaron  $2 \mu\text{L}$  de amortiguador de carga 6X LD Thermo® Scientific y  $\text{H}_2\text{O-DEPC}$  c.b.p  $10 \mu\text{L}$ . El gel se corrió en una cámara de electroforesis con TAE 1X frío a 85 mV por 45 min y se visualizó en un transiluminador UV. Se visualizaron 2 bandas de RNA que muestran que el RNA se encuentra íntegro y que corresponden a los pesos de 28 y 18S.

Para evaluar la expresión de los SWEETs en los diferentes tejidos se calibró primero el RNA, para ello de ser necesario, se variaron los volúmenes añadidos de RNA en el gel para que la intensidad de las bandas de los RNA ribosomales fuera similar. La calibración se realiza para que las diferencias en la expresión de los SWEET sean debidas a los niveles de los transcritos para estos genes y no por la cantidad de RNA que se usó para hacer el cDNA. Para la calibración de las bandas se corrieron geles de agarosa/bromuro de etidio como se mencionó anteriormente y se registró después de su corrida la densitometría de las bandas mediante el equipo QuemiDoc MP BIO-RAD® Imaging System.

## 11.6. Reacción de RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la Polimerasa)

**Fundamento.** La reacción RT-PCR se logra mediante dos reacciones la primera reacción conocida como de transcripción reversa es controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el RNAm en una molécula de cDNA, éste se utiliza cuando analizamos la expresión del RNAm de algún gen de interés.

La segunda reacción la de PCR corresponde a la amplificación del gen de interés partiendo como molde el cDNA del tejido a analizar. Los elementos importantes en la PCR son el templado o molde (DNA o cDNA), la polimerasa, los oligonucleótidos desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) el ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ), una solución amortiguadora y  $H_2O$ -DEPC. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

**Técnica de RT.** Esta reacción se llevó acabo en un microtubo, se agregó 1  $\mu$ L de Oligo DT (60  $\mu$ M), el volumen de RNA ajustado a la misma concentración para todas las muestras y el volumen se completó con  $H_2O$  a 10  $\mu$ L. El microtubo fue colocado en un bloque de calentamiento a 70°C por 5 min para la desnaturalización del RNA, posteriormente se colocó en hielo por 5 min y se agregaron 10  $\mu$ L de la mezcla de reacción previamente preparada, como se observa en la Tabla 2. Posteriormente en el termociclador Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler, las muestras se calentaron a 25 °C por 5 min para realizar el alineamiento, 42°C por 60 min y por último a 70°C por 15 min para inactivar la enzima, esto realizado El cDNA obtenido se almacenó a -20°C para su posterior uso.

**Tabla 2.** Mezcla de reacción para la reacción de Transcriptasa reversa

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer ImProm-II-5X	4.0
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2.4
dNTP'S 10mM	1.0
RT (Transcriptasa reversa)	1.0
H <sub>2</sub> O-DEPC	1.6
	c.b.p. 10 $\mu\text{L}$

**Técnica para la reacción PCR.** Esta reacción se realizó para evaluar la presencia de transcritos de 20 posibles transportadores SWEETs en los diferentes tejidos, dos SWEETs no fueron evaluados ya que la secuencia predicha es más similar a otra proteína que a los SWEETs. Para los SWEETs que se encontraban preferentemente en espiga, embrión y semilla se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 1, en una mezcla de PCR indicada en la Tabla 3. La PCR se realizó por 94°C por 5 min y 37 ciclos a 94°C por 40 seg para desnaturalizar, 57°C por 1 min para la hibridación y 72°C por 40 seg para la extensión, para finalmente pasar a 72°C por 7 min.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de cada uno de los SWEETs en espigas, semillas de maíz y endospermo. La solución stock de cada oligonucleótido fue de 20  $\mu\text{M}$ . Los oligonucleótidos usados para la amplificación de cada SWEET se enlistaron en la Tabla 1.

SWEET	Oligonucleótidos ( $\mu\text{L}$ )	cDNA ( $\mu\text{L}$ )	PCR MM ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O Libre de DNAsas ( $\mu\text{L}$ )
4b	0.5	2	12.5	10
4c	0.25	2	12.5	14
6a	0.5	2	12.5	10
6b	0.5	2	12.5	10
11a	1.0	2	12.5	9.5
14b	0.5	2	12.5	10
15b	1.0	2	12.5	9.5

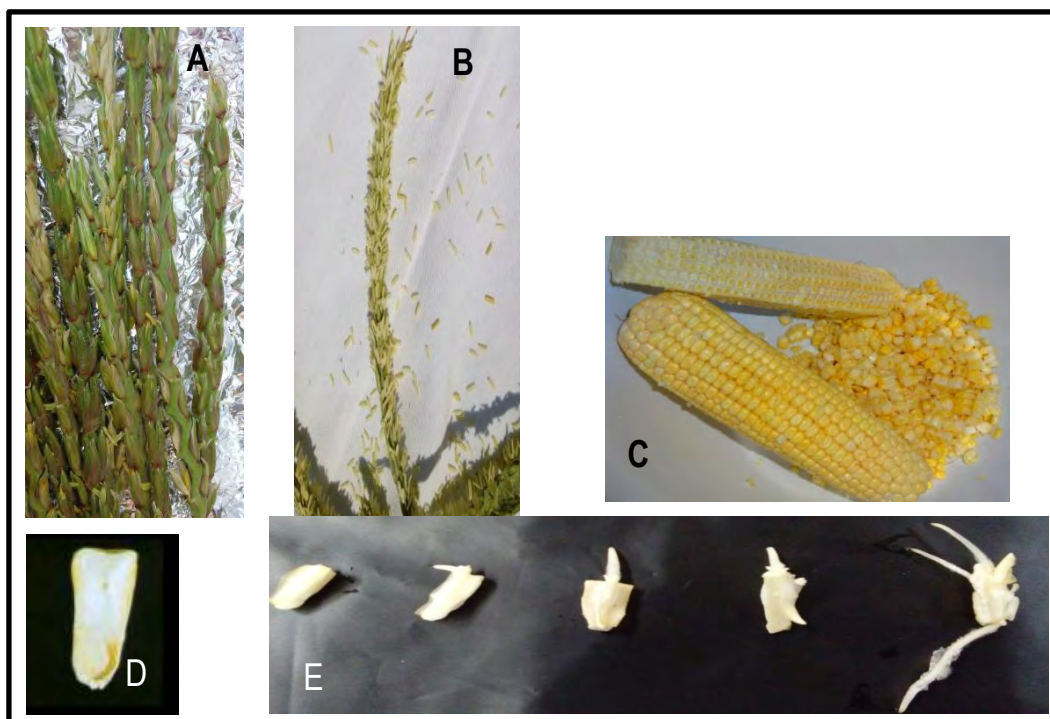


En cuanto a la amplificación de los presuntos transportadores SWEETs que se encuentran en otros tejidos se utilizaron los oligonucleótidos que se enlistan en el Anexo 5, mismos que fueron diseñados por otros miembros del laboratorio. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X y bromuro de etidio (0.5  $\mu$ L/mL de gel). El gel se corrió en una cámara de electroforesis con TAE 1X frío a 85 mV por 45 min y se visualizó en un transiluminador UV. Por último se registró la densitometría de las bandas mediante el equipo QuemiDoc MP BIO-RAD® Imaging System. Se calculó el nivel de expresión de cada SWEET como un índice entre la intensidad de la banda amplificada del SWEET entre la intensidad de la banda de los RNA ribosomales de tres réplicas biológicas.

## 12. Resultados

### 12.1. Expresión de los SWEETs considerados como específicos de tejido reproductivo y semillas.

Se usaron en este estudio los tejidos reproductivos espiga joven y madura que son considerados la inflorescencia masculina en el maíz (Figura 10A y B), además de los granos de la mazorca joven (Figura 10C) que fueron obtenidos cortando la parte que corresponde al endospermo del maíz, y aquí le denominamos semilla inmadura. También se extrajeron los embriones de semillas maduras y una parte de ellos se germinaron (Figura 10D y E). No se usaron semillas completas, ya que la cantidad de almidón en el endospermo dificultaba la obtención de RNA de buena calidad, que es un requisito importante para realizar la reacción de PCR y tener resultados confiables.

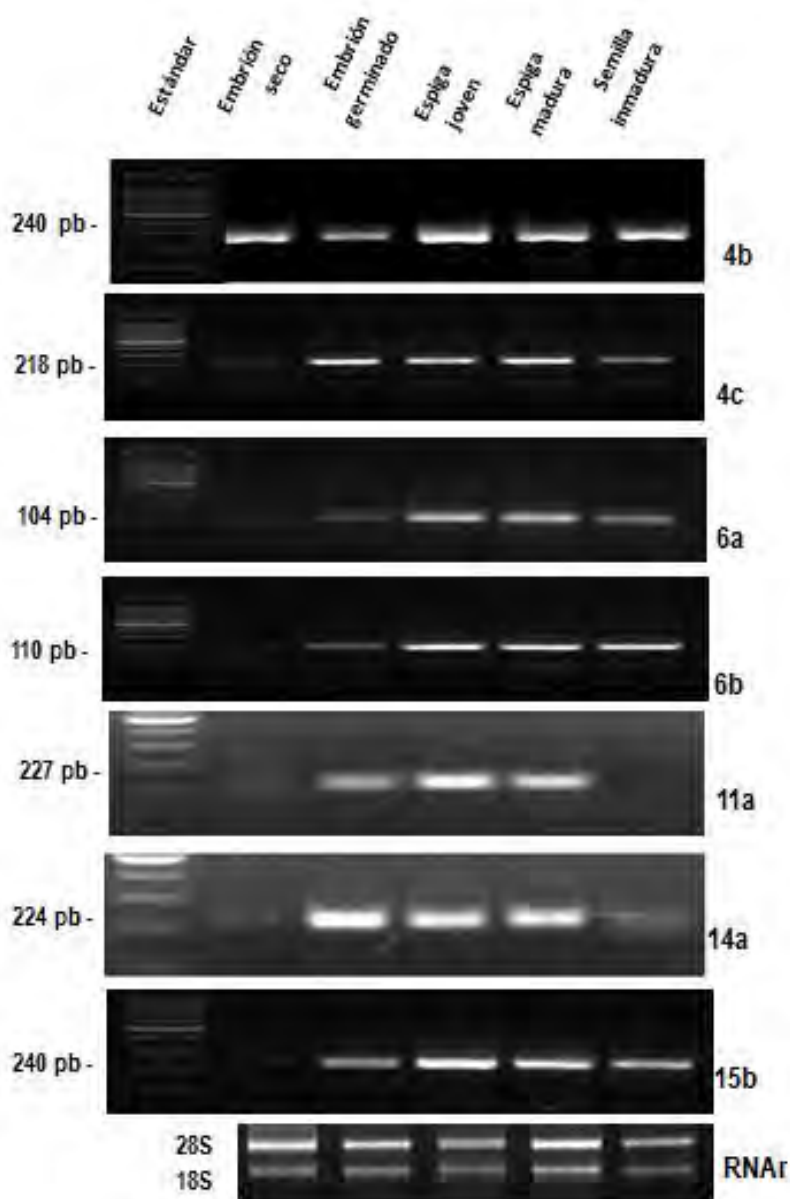


**Figura 10.** Partes del maíz usadas para medir la expresión de los SWEETs. A) y B) Espigas, C) Mazorca con semillas en formación o inmaduras, D) Embrión maduro seco y E) embriones germinados por diferentes tiempos.

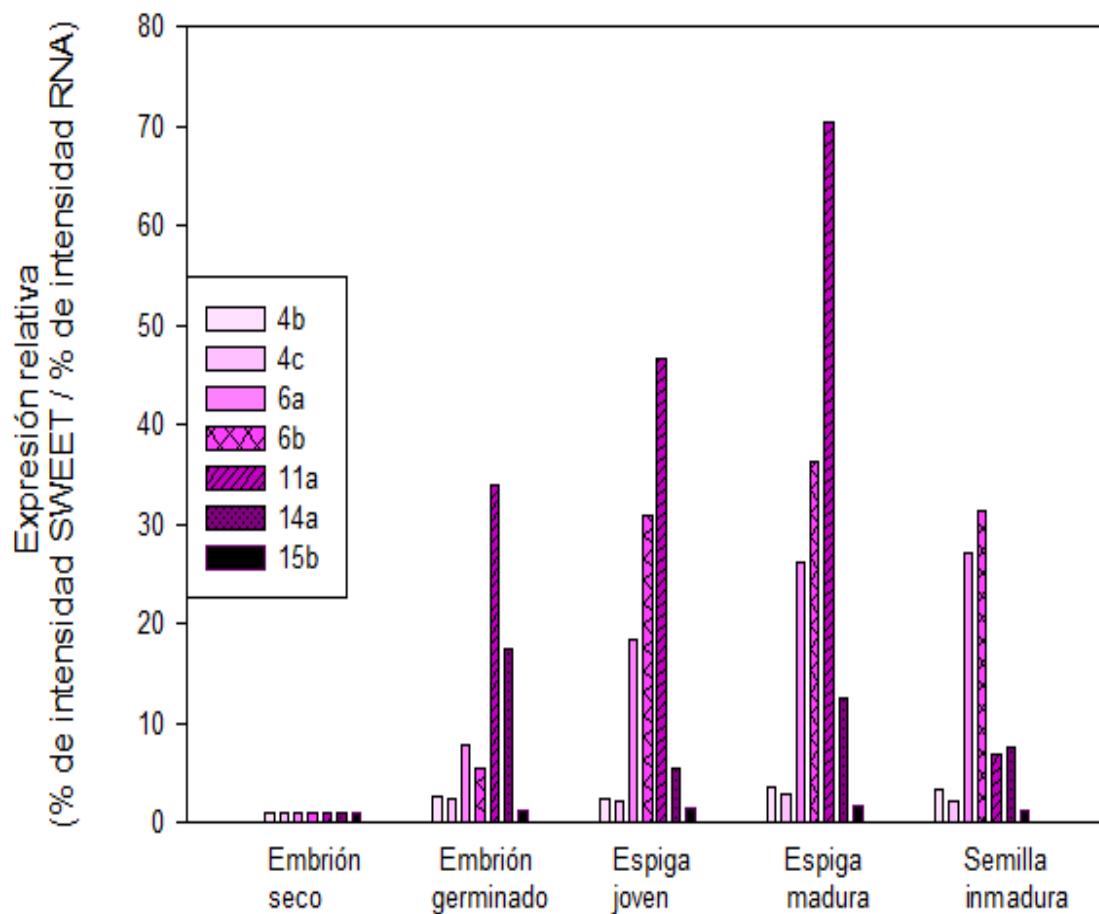
Para obtener los niveles de expresión de ZmSWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14b, 15b en los diferentes tejidos, se obtuvo el RNA de tres réplicas biológicas de todos los tejidos analizados. Se calibró el RNA se retrotranscribió y con el cDNA se realizó la reacción de PCR. En la Figura 11 se presentan los resultados representativos de la amplificación de los SWEETs. Además, se obtuvo de cada una de las tres réplicas la intensidad de las bandas amplificadas, con estos valores se calculó el porcentaje de expresión considerando la intensidad del valor del embrión seco como el 100 %. Para poder comparar la expresión entre tejidos se obtuvo la intensidad del RNA de cada tejido usado en la producción del cDNA, posteriormente se calculó la expresión relativa como el índice de la intensidad de la banda del SWEET entre la de la intensidad del RNA ribosomal (Figura 12).

Como se observa el embrión maduro seco es el que presenta el menor nivel de expresión de los 7 SWEETs examinados (Figura 11 y 12), este tejido tiene poca actividad metabólica debido a que proviene del proceso de secado o de pérdida de agua en la fase final de la maduración de la semilla. Se esperaba una expresión basal y no nula, ya que durante la embriogénesis se necesita del aporte de nutrientes y los transcritos podrían estar presentes (Weitbrecht *et al.*, 2011). El SWEET4b fue el que se encontró más expresado en este tejido.

En la embriogénesis de la semilla de maíz se conoce que el SWEET4c está involucrado en el llenado del grano (Sosso *et al.*, 2015), este SWEET se encontró en la semilla inmadura del maíz Chalqueño y con una expresión dos veces más alta que el embrión seco. Otros dos transcritos contenían valores más altos de expresión fueron los SWEET6a y 6b, que los hace interesantes para un estudio posterior. Mientras que en la germinación de los embriones los SWEET con mayor expresión fueron el 11a y 14b, diferentes a los presentes durante la formación de la semilla. Por otra parte en las espigas la mayor expresión se encontró para SWEET6a, 6b y 11b. Solo SWEET15b tuvo una expresión baja o ligeramente mayor en todos los tejidos a la de embriones secos (1 a 1.8 veces).



**Figura 11.** Expresión de los SWEETs en embrión seco, germinado, espigas jóvenes y maduras y semilla inmadura. Los embriones fueron germinados 24 h. Se presenta un gel de agarosa al 2 % de una de las tres réplicas con los productos de RT-PCR para cada SWEET. Se muestran los marcadores de peso molecular y el RNA que se usó para la producción de cDNA.



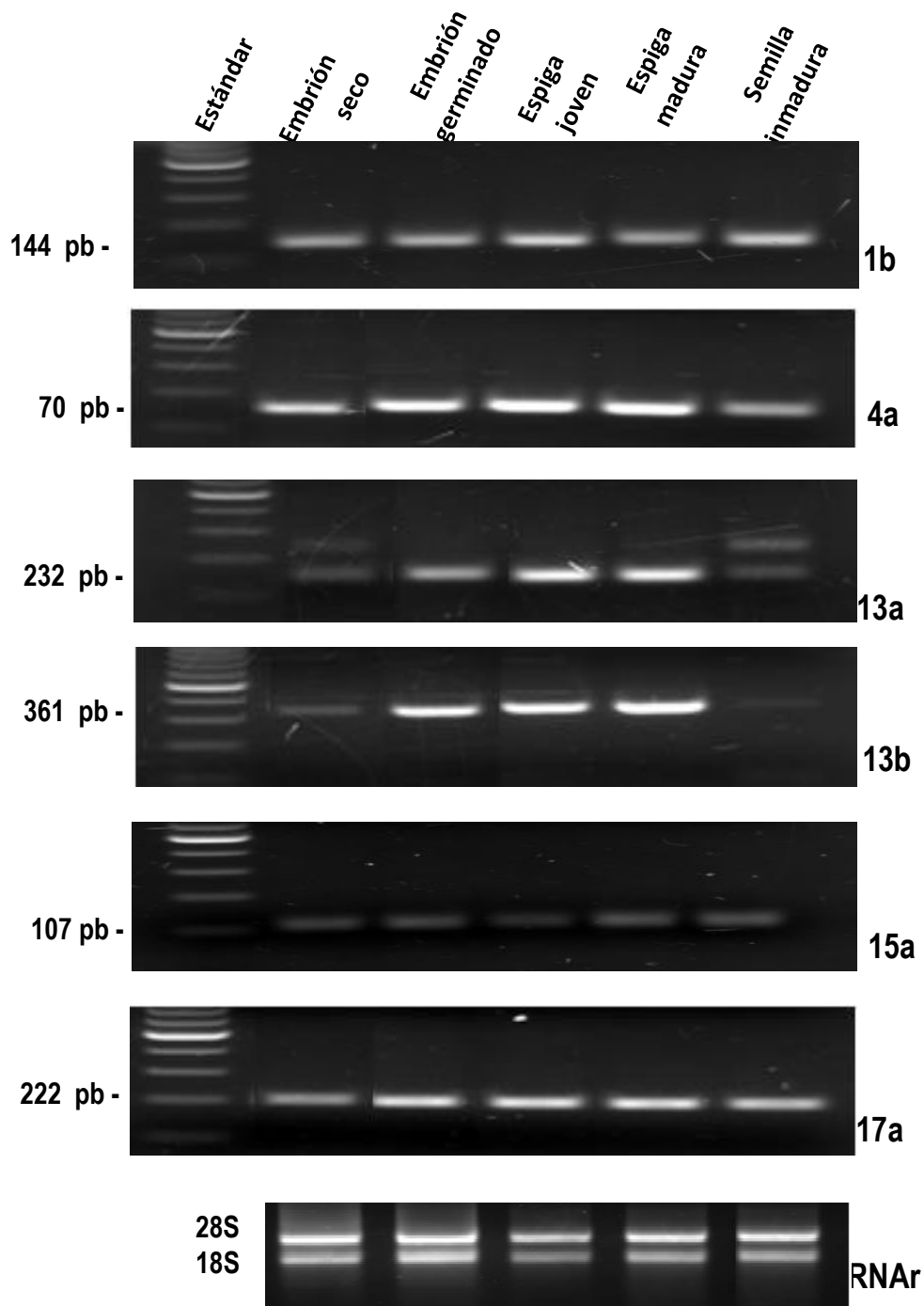
**Figura 12.** Niveles de expresión de ZmSWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14b y 15b en embriones, espigas y semilla inmadura. Los valores corresponden al promedio de dos de las tres réplicas y está expresado como el índice de la intensidad de la banda amplificada para cada SWEET (tomando como 100% al embrión seco) entre la intensidad de la banda de los RNA ribosomal de alto peso molecular (28S).

## **12.2. Expresión baja en espigas, embriones y semillas inmaduras de los SWEETs considerados como específicos de hojas.**

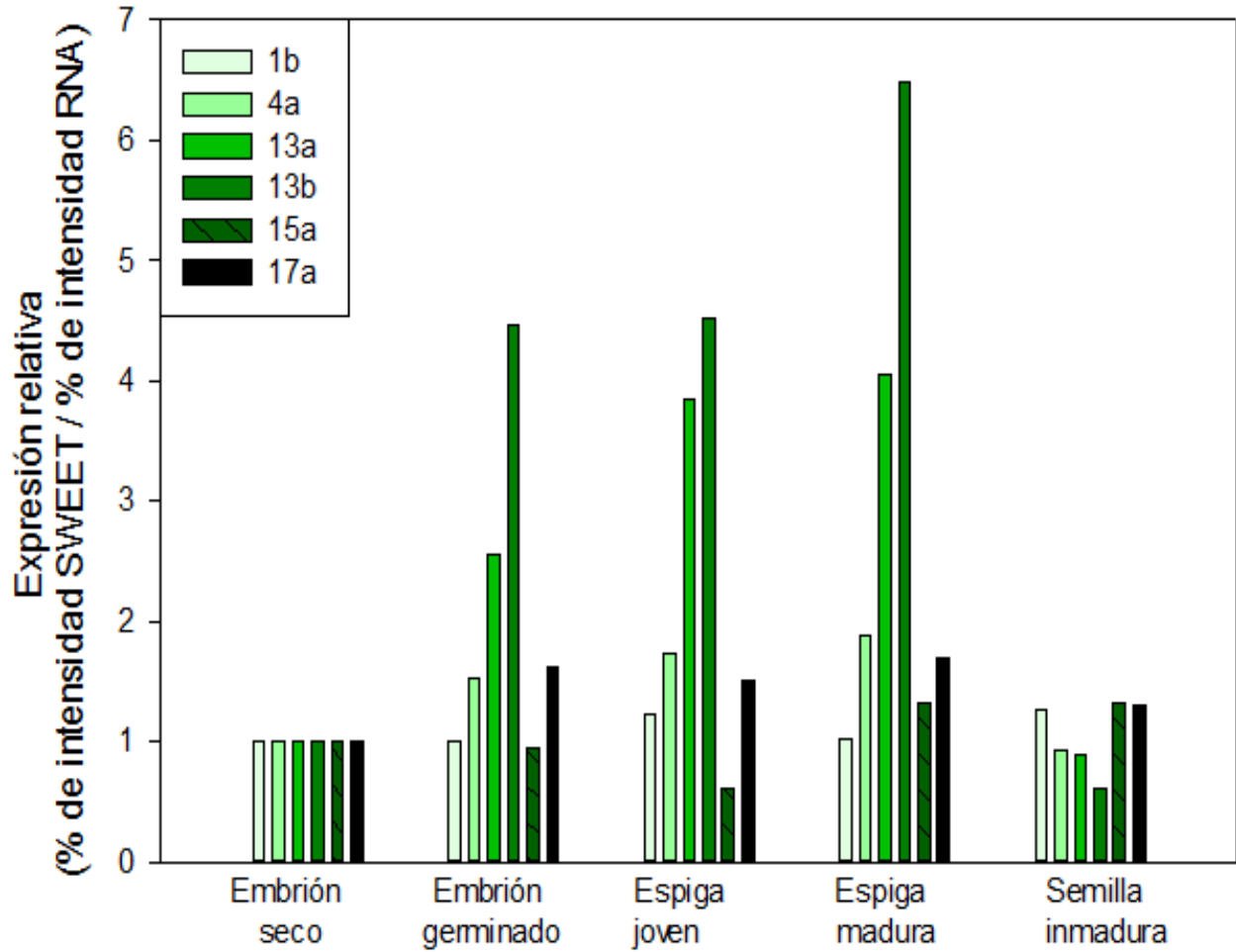
Debido a que otros SWEET también podrían encontrarse en las espigas, embriones y semillas inmaduras, se evaluó mediante RT-PCR la expresión de estos SWEETs. Primero se evaluó la expresión de los presuntos SWEETs que son más abundantes en hojas de maíz (Sekhon *et al.*, 2011), con los oligonucleótidos diseñados por el pQA Nestor Delgado-Rubio (Anexo 3).

En la Figura 13 se observan los productos de amplificación para los ZmSWEET1b, 4a, 13a, 13, 15a y 17a. Mientras que en la Figura 14 se muestran los índices de las intensidades de las bandas amplificadas expresadas como porcentaje respecto al embrión seco (100%) entre las intensidades del RNA ribosomal 28S expresado como porcentaje. Un problema que se tuvo fue que los oligonucleótidos diseñados para amplificar al SWEET13a dieron dos bandas de reacción una que si corresponde al peso esperado del amplicón y otra más alta. Se tomó la intensidad de la banda esperada, sin embargo, se están diseñando otros oligonucleótidos, ya que se desea realizar la cuantificación de la expresión por tiempo real.

Se obtuvieron amplicones para todos los SWEETs probados, aunque el ZmSWEET15 tuvo la menor amplificación en todos los tejidos, aun cuando se usaron varios pares de oligonucleótidos para amplificar este gen. La expresión de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 15a y 17a en todos los tejidos, no fue mayor a las 2 veces respecto al embrión seco. Por el contrario en la semilla inmadura y el embrión germinado la expresión de este juego de SWEETs fue menor que en el embrión seco, excepto para ZmSWEET13a y 13b que presentaron una mayor expresión, 2.5 a 4 y 4-5 veces respectivamente, en embrión germinado y espigas joven y madura (Figura 14).



**Figura 13.** Expresión de SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15a, 17a en embriones, espigas y mazorca. Se sabe que los SWEETs examinados se expresan preferentemente en hojas de maíz. Se presenta un gel de agarosa al 2% de una de las tres réplicas con los productos de RT-PCR para cada SWEET. Se muestran los marcadores de peso molecular y el RNA que se usó para la producción de cDNA.



**Figura 74.** Niveles de expresión de SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15a en embriones, espigas y semilla inmadura. Los valores corresponden al índice de la intensidad de la banda amplificada para cada SWEET (tomando como 100% al embrión seco) entre la intensidad de la banda de los RNA ribosomal de alto peso molecular 28S expresado en porcentaje.

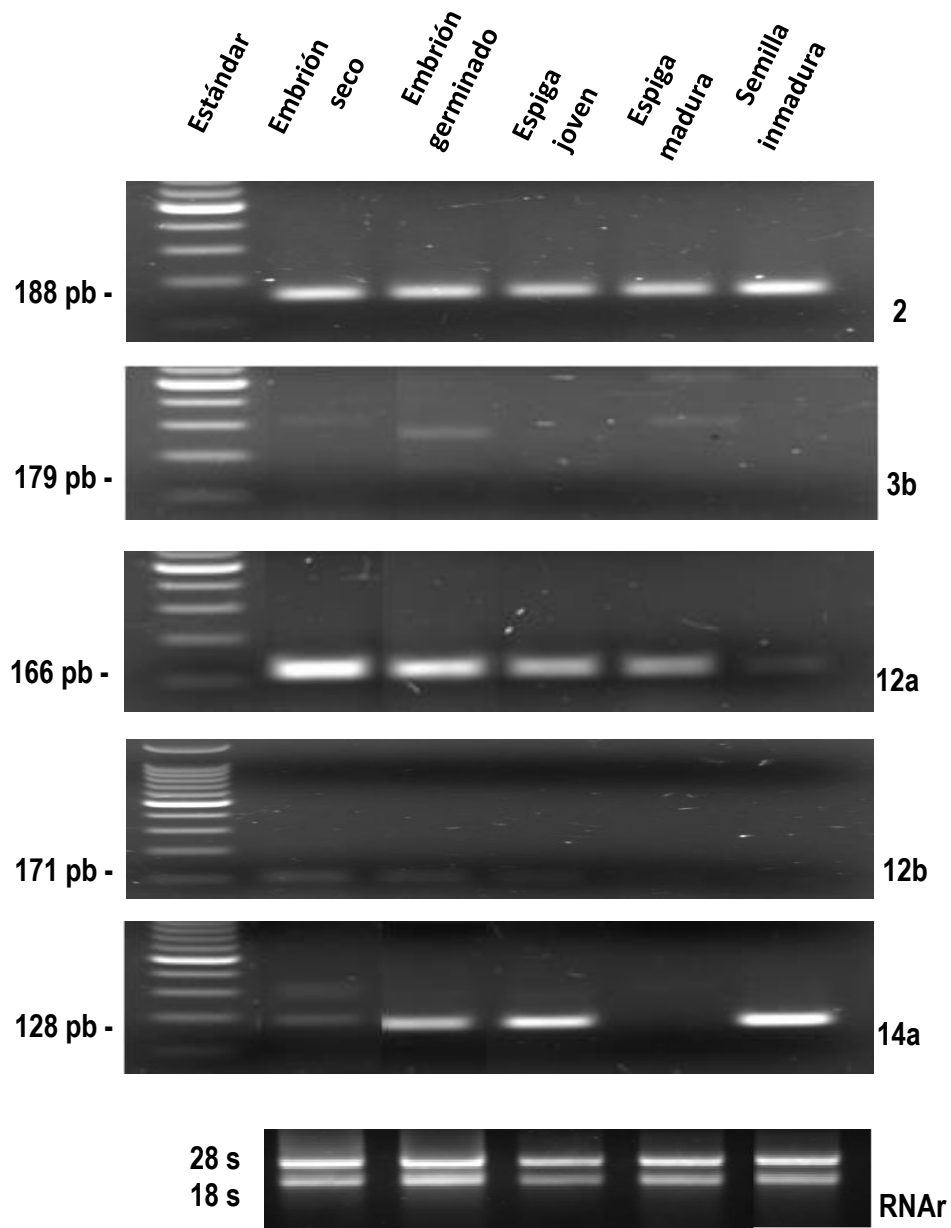


### **12.3. Expresión en espigas, embriones y semillas inmaduras de los SWEETs considerados como específicos de raíces.**

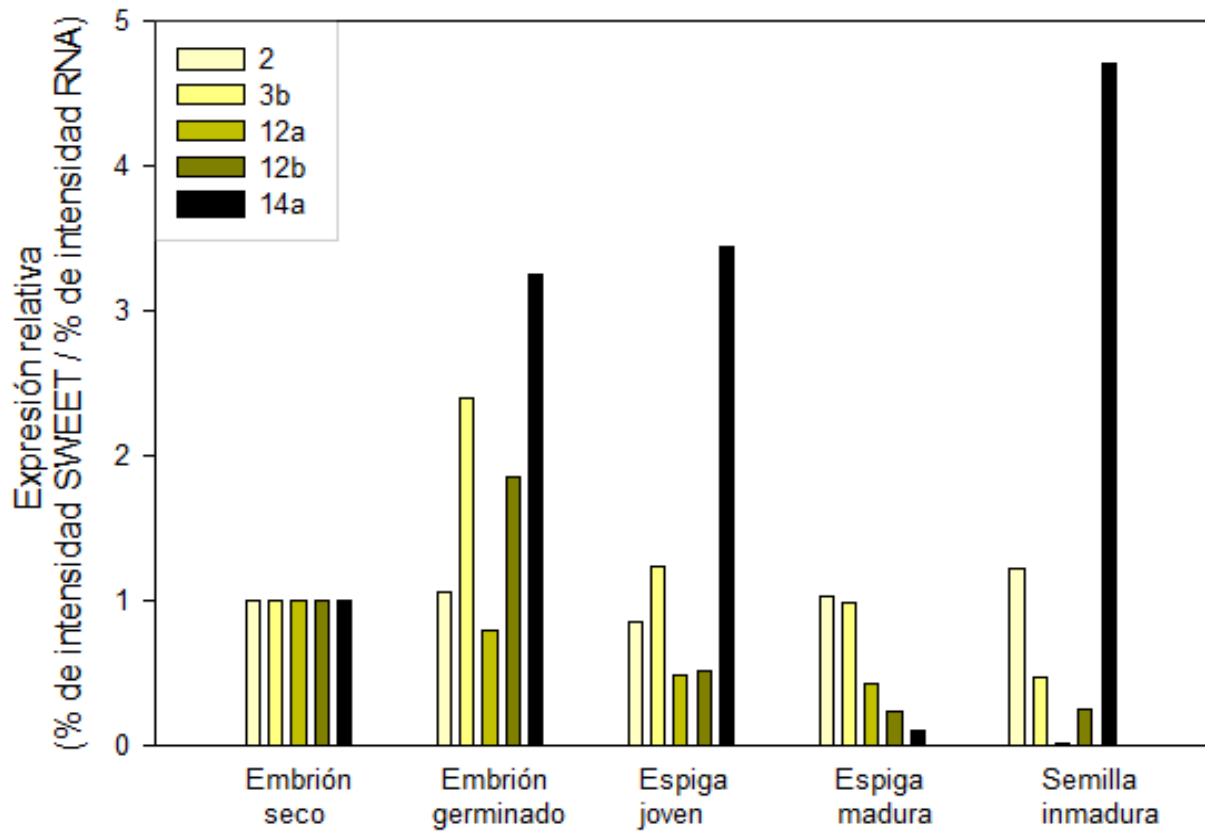
Por último, se evaluó otro grupo de SWEETs que se ha reportado una expresión preferente en raíces (Sekhon *et al.*, 2011; Palacios-Vargas, 2016; oligonucleótidos Anexo4): ZmSWEET2, 3, 12a, 12b y 14a. Al igual que en los otros casos se realizó la determinación en tres réplicas biológicas. Se muestra un gel representativo, en donde se encuentran los amplicones de cada SWEET (Figura 15). Como se observa hubo una pobre amplificación de SWEET3 y 12b.

Se realizaron las densitometrías de las bandas obtenidas de las tres réplicas y se construyó la gráfica de la Figura 16, en donde se muestra la relación de intensidades entre las bandas amplificadas y la del RNA ribosomal 28S.

En general los SWEETs de este grupo, se encontraron expresados a niveles bajos en los tejidos examinados. ZmSWEET2, 12a, y 14a se expresan de manera similar en el embrión seco, germinado y la espiga joven. Mientras que en la espiga madura los SWEET3, 12b y 14a fueron poco expresados y en las semillas inmaduras los SWEET3, 12a y 12b también se expresan pobremente. Sin embargo se encontró una expresaron alta de SWEET14a en embrión germinado, espiga madura y semilla inmadura.



**Figura 85.** Expresión los SWEET2, 3b, 12a, 12b y 14a en embriones, espigas y semilla inmadura. Los SWEETs examinados se expresan preferentemente en raíces de maíz. Productos de RT-PCR en gels de agarosa al 2%.

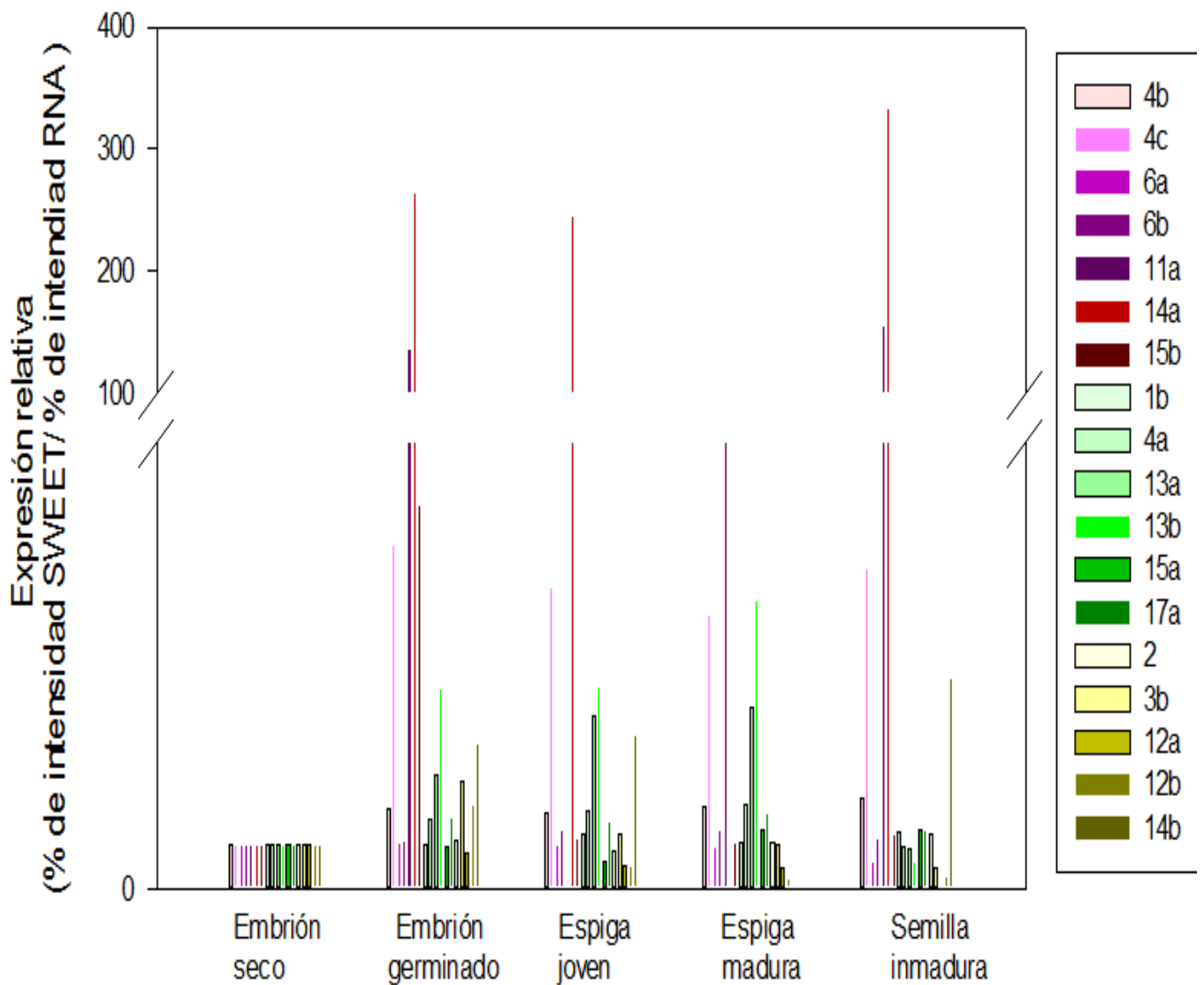


**Figura 96.** Niveles de expresión de SWEET2, 3b, 12a, 12b y 14a en embriones, espigas y semilla inmadura. Los valores corresponden al índice de la intensidad de la banda amplificada para cada SWEET (tomando como 100% al embrión seco) dividido entre la intensidad de la banda de los RNA ribosomal de alto peso molecular 28S expresado en porcentaje.

#### **12.4. Perfil general de 18 presuntos SWEETs de maíz en los tejidos reproductivos y los embriones germinados.**

Para observar con claridad cómo se expresan los 18 presuntos SWEETs de maíz en embrión, espigas y semilla inmadura se realizó la Figura 17. Con estos resultados fue posible agrupar la expresión en tres niveles:

- **Alta expresión.** SWEET 11a y 14b se encontraron presentes en los 5 tejidos, principalmente en el embrión germinado, la espiga madura y la semilla inmadura, donde se observó de 100 a 300 veces de expresión más que el embrión seco. Ambos SWEETs aparecen en los histogramas de expresión del banco de expresión MaizeGDB en tejidos reproductivos.
- **Mediana expresión.** El nivel de los amplicones está por debajo de las 10 veces de expresión, pero por arriba del nivel de expresión del embrión seco. Diez de los 18 presuntos SWEETs se expresan en estos niveles ZmSWEET4b, 4c, 6b, 15b, 1b, 13a, 13b, 17a.
- **Muy baja expresión.** Los amplicones propuestos se expresaron muy por debajo del embrión seco, son el caso de los ZmSWEET4a, 6a, 15a, 2, 12a y el 12b



**Figura 17.** Niveles de expresión de 18 presuntos SWEETs en embriones, espigas y semilla inmadura. Las primeras 7 barras en cada tejido corresponden a SWEETs que según los datos de expresión del MaizeGDB están presentes en semillas. Las siguientes 6 barras corresponden a SWEETs que se expresan más en hojas y las últimas 5 barras corresponden a SWEETs que se expresan más en raíces.

## **12.5. Expresión de SWEETs durante la germinación del maíz.**

En vista de que había una clara diferencia entre la expresión de los SWEETs en la semilla seca y germinan por 24 h (Figura 10), entonces se realizó la determinación del perfil de expresión de los SWEETs a lo largo de la germinación. Se sembraron embriones de maíz para obtener los tiempos 0, 6, 12, 18, 24 y 30 h de germinación en 1% agar, se obtuvo el RNA y se realizaron los ensayos de RT-PCR para determinar la expresión del grupo de SWEETs que encontramos preferentemente en embriones y tejidos reproductivos. Los patrones de expresión se muestran en la Figura 16 y la relación de intensidades de las bandas amplificadas en la Figura 17.

Se observa que la expresión de los SWEETs cambió con solo 6 h de imbibición los embriones, encontrando tres perfiles distintos:

### **PERFIL 1. Se presentan a tiempo cero y luego aumentan su expresión.**

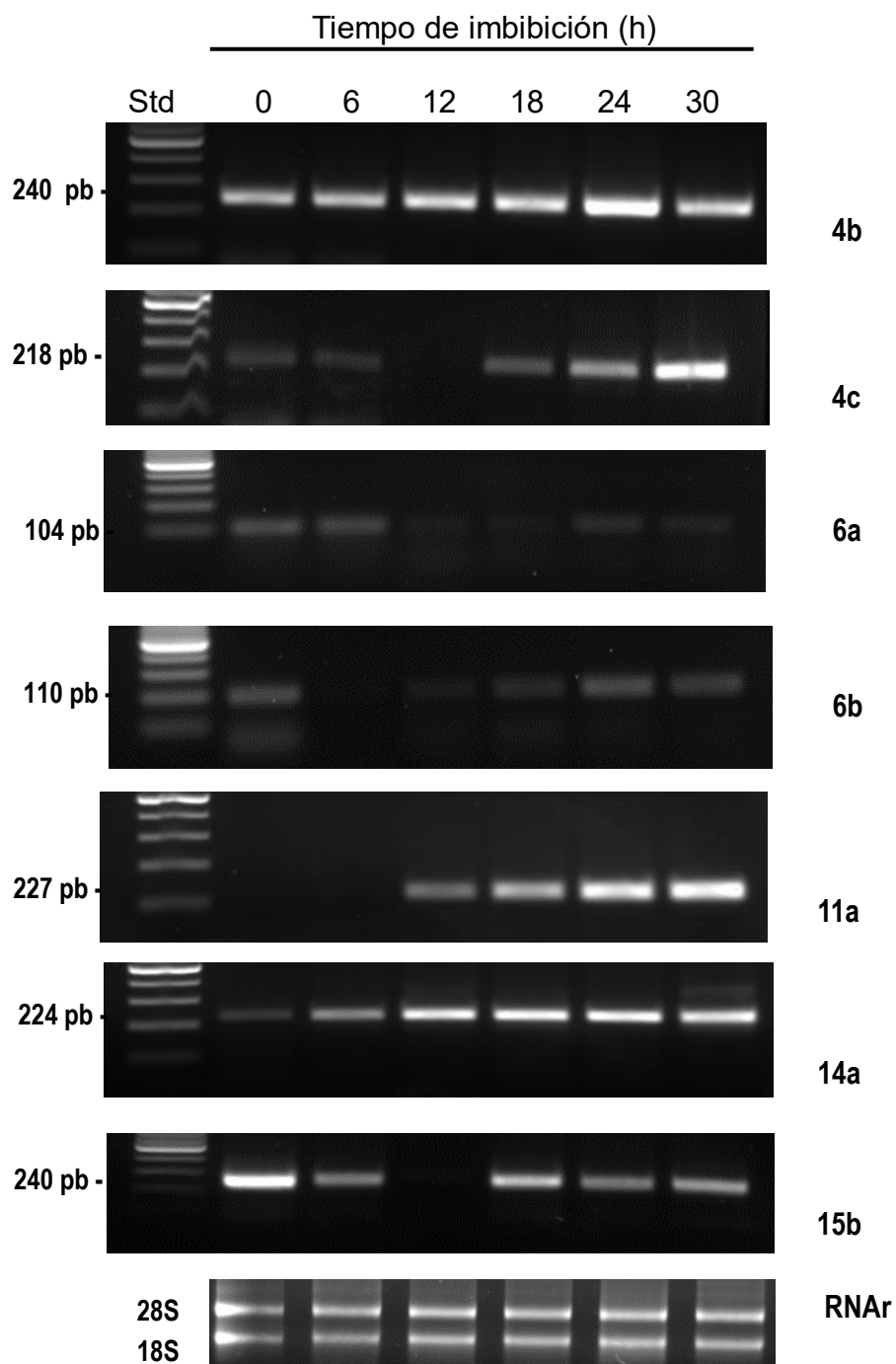
- **SWEET4b, 4c y 6b**, su expresión aumenta a las 6 h y después se mantienen constante hasta las 30 h de germinación
- **SWEET 6a** comienza a incrementar su expresión hasta las 12 h, aumenta un poco más a las 18 h y luego vuelve a los valores de expresión que tenía a las 0 h.
- **SWEET14b** aumenta a las 6 h y continúa en aumento alcanzar 300 veces más transcrito comparado con el tiempo cero.

### **PERFIL 2. Muy pobre o nula expresión a las 0 y 6 h**

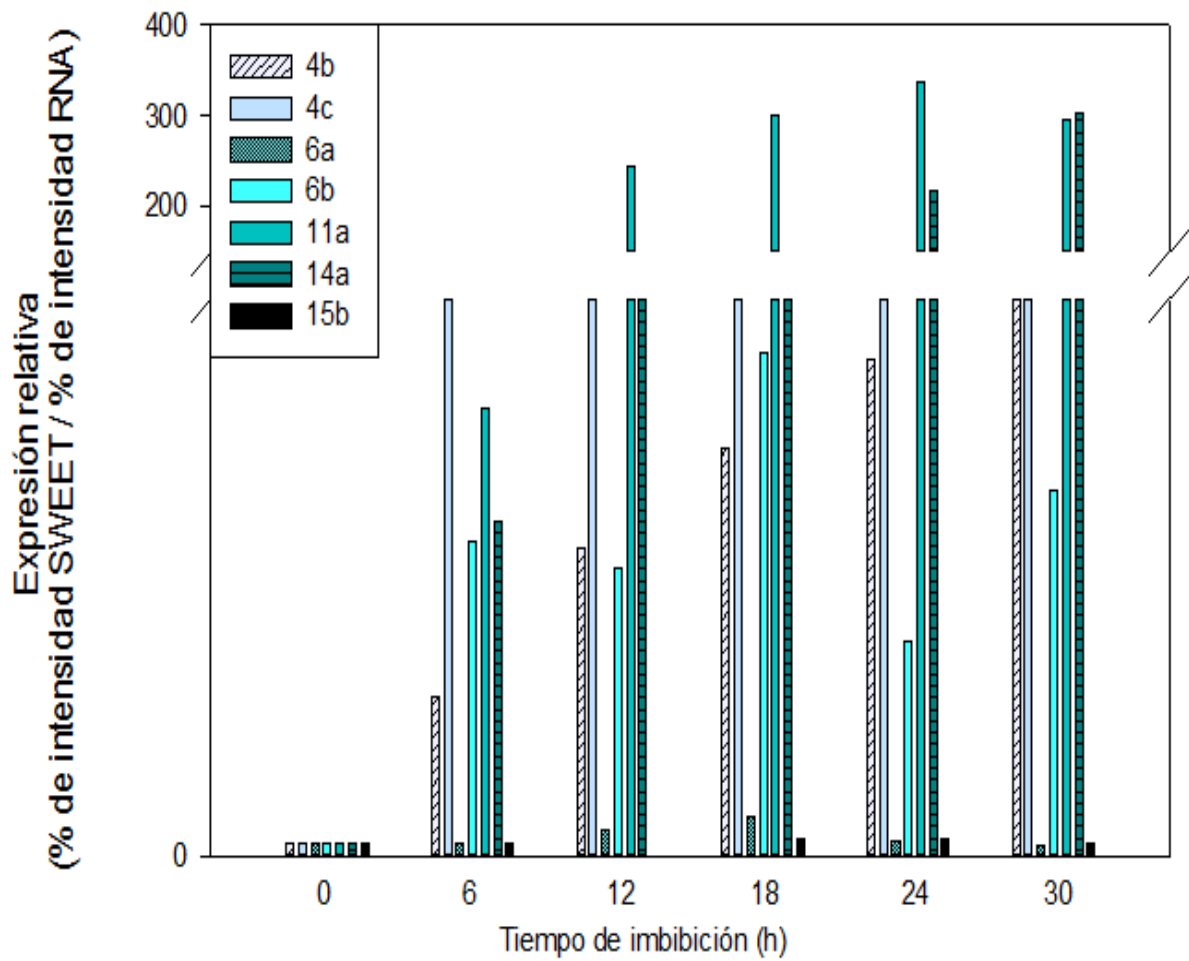
- **SWEET11a** comienza a expresarse a las 12 h y sigue incrementando su expresión conforme pasa el tiempo de germinación hasta alcanzar valores de 300 veces al encontrado al tiempo cero.

### **PERFIL 3. Se expresa en la semilla seca y se mantiene constante por 30 h**

- **SWEET15b**, excepto que baja la cantidad de transcrito a las 12 h.



**Figura 108.** Expresión de los SWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14a y 15b en embriones germinados de maíz. Se muestran los productos de RT-PCR para los SWEETs seleccionados en geles de agarosa al 2%,



**Figura 19.** Niveles de expresión de SWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14a y 15b durante la germinación de embriones de maíz. Los valores corresponden al índice de la intensidad de la banda amplificada para cada SWEET (tomando como 100% al embrión seco) dividido entre la intensidad de la banda de los RNA ribosomal 28S expresado en porcentaje.



## 13. DISCUSIÓN

### 13.1. Expresión de SWEETs en tejidos reproductivos

El proceso de fecundación y polinización de la planta de maíz es de gran importancia para su subsistencia, la formación de ambos gametos requiere de un gran suministro de nutrientes, ya que el número de óvulos que se tienen que formar y que al final van a ser fertilizados es alrededor de 700 a 1000, mientras que para asegurar su fertilización el número de granos de polen oscila entre 2 a 5 millones (Bartolini, 1989; FAO 1993).

La necesidad del aporte de azúcares de la hoja para la formación de las inflorescencias masculina y femenina, se demostró en la línea mutante de maíz *sut1*, en donde el gene para el transportador SUT1 fue interrumpido por la presencia de un elemento transponible, mutator o Mu. La planta presenta una floración tardía, es decir 14 días de retraso en comparación con la línea silvestre, las células de las anteras y el polen tienen un desarrollo disminuido, así como también se retrasa la formación de la mazorca y hay una acumulación alta de azúcares en la hoja (Slewinski *et al.*, 2009).

El transporte posterior de azúcares desde el floema hacia las inflorescencias podría ser difusional en un principio ya que al ser un tejido demandante de nutrientes, la cantidad de azúcares es baja. Aunque es posible que el transporte activo ocurra cuando la mazorca se llena o en la etapa final del desarrollo del polen y la antera, ya que estos tejidos están rodeados o inmersos de nutrientes, pero conforme madura el polen y la semilla necesitan del transporte activo de nutrientes ya que se van llenando de almidón (Tsou *et al.*, 2015).

En el caso de la formación del polen la capa de células denominada tapetum o tapete juega un papel crítico, ya que se encuentra rodeando al saco polínico durante su desarrollo temprano, para posteriormente degradarse en las anteras maduras. El tapetum contribuye al desarrollo del polen secretando azúcares y proteínas que son necesarios para el crecimiento y desarrollo del polen, el cual está aislado simplásticamente (Goetz *et al.*, 2001).

Como se ha mencionado los monosacáridos y disacáridos son solutos hidrofílicos que difícilmente pueden difundirse a través de los compartimentos acuosos dentro de las células de plantas incluyendo el citosol, lumen de la vacuola, y plastidios (Slewinski, 2011). Para que los azúcares difundan hacia el citosol de las células vecinas deben encontrarse los plasmodesmata, lo que permite el intercambio de los compuestos solubles, es decir, el transporte pasivo simplástico (Turgeon y Medville, 1998). Pero entre dos células simplásticamente aisladas, como entre el tapetum y el polen, se requieren transportadores específicos en la membrana para el movimiento de los azúcares. Aquí hemos examinado la expresión de los SWEETs, transportadores difusionales que pueden exportar glucosa, fructosa, galactosa o sacarosa a través de las membrana plasmática o vacuolar, con capacidad de transporte bidireccional dependiente del gradiente de concentración de azúcares (Chen *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2010). Aunque no se determinó si existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de los transcritos detectados con la proteína colocada en la membrana y su función de transporte de azúcares, nos permite analizar la posibilidad de que la presencia de transcritos sea porque están traduciendo. Ya que el gasto energético en producir RNA no es bajo. Además se utilizó esta estrategia experimental como primer abordaje para encontrar a los RNAm para los SWEETs mas representados, para posteriormente profundizar en su estudio y encontrar su especificidad por azúcares, su localización subcelular y su papel fisiológico en la planta.

Los SWEETs que se expresaron más en la inflorescencia masculina fueron 6a, 6b, 11a, 13a, 13b y el 14a, aunque la espiga madura presenta entre 2 a 2.5 veces más expresión de SWEET11a, 14b y 14a que la espiga madura. Los SWEET13a y 13b según el atlas del transcriptoma del maíz se expresan más en hojas mientras que SWEET14b en raíces (Sekhon *et al.*, 2011), aunque en *Arabidopsis* se ha encontrado a SWEET13 en las células del tapetum (Sun *et al.*, 2015). En la Tabla 4 se resumen los niveles de expresión de los SWEETs de la inflorescencia masculina y también se señalan algunas características que podrían tener en base a sus homólogos en otras plantas.

Al momento no se ha caracterizado a ningún miembro homólogo de SWEET6 lo que sería útil para predecir su especificidad por azúcares. En arroz se colocó a OsSWEET6a y 6b dentro del clado II del árbol filogenético de la familia SWEET, en donde se encuentran SWEETs que transportan hexosas (Eom *et al.*, 2015), sin embargo desconocemos si SWEET6 transporta hexosas. En cuanto a su localización, el SWEET6 de *Arabidopsis* se encontró en el retículo endoplásmico de semillas secas (Chen *et al.*, 2015a).

El homólogo al ZmSWEET11a ha sido estudiado en *Arabidopsis*, AtSWEET11 se ha comprobado que transporta sacarosa en la membrana plasmática, aunque también puede transportar hexosas con muy baja afinidad. Este SWEET se ha involucrado en el cargado del floema junto con AtSWEET12, ya que dobles mutantes AtSWEET11 y 12 acumulan almidón en las hojas (Chen *et al.*, 2010). AtSWEET11 se ha encontrado en los integumentos de la semilla, participando en la nutrición del embrión durante la embriogénesis de la semilla de *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2015a). Mutantes de AtSWEET11 y 12 afectan el desarrollo de la pared del xilema, aunque se desconoce el mecanismo por el cual los azúcares se acumulan en el xilema (Le-Hir *et al.*, 2015).

**Tabla 4.** SWEETs de mayor expresión en inflorescencias masculinas. En una escala donde el embrión seco representa el 100 % de expresión. Los tejidos con \* aumentan de 2 a 10 veces más y los demás tejidos aumentan de 11 a 70 veces más en comparación al embrión seco. El orden en que se enlistan los tejidos es de mayor a menor expresión. También se indica la posible localización y especificidad de azúcar, según se comportan los transportadores que pertenecen al mismo clado. ND: no determinado.

SWEET	Clado	Tejido	Posible Localización	Probable azúcar transportado
4b	II	Espiga madura* Semilla inmadura* Embrión germinado (24h)* Espiga joven *	Membrana Plasmática	Hexosas
4c	II	Espiga madura* Embrión germinado(24h)* Espiga joven* Semilla inmadura*	Membrana plasmática	Hexosas (glucosa)
6a	II	Semilla inmadura Espiga madura Espiga joven	Membrana plasmática	Hexosas
6b	II	Espiga madura Espiga joven Semilla inmadura	Membrana plasmática	Hexosas
11a	III	Espiga madura Espiga joven Embrión germinado (24h)	Membrana plasmática	Sacarosa
14a	III	Embrión germinado	Membrana plasmática	Sacarosa
13a	III	Espiga madura* Espiga joven* Embrión germinado (24h)*	Vacuola	Sacarosa
13b	III	Espiga madura* Espiga joven* Embrión germinado(24h)*	Vacuola	Sacarosa
3	I	Embrión germinado(24h)*	ND	ND
12a	III	Embrión germinado (24h)*	Membrana plasmática	Sacarosa
14b	III	Semilla inmadura* Espiga joven* Embrión germinado(24h)*	Membrana plasmática	Sacarosa

Mientras que para SWEET14b y 14a el homólogo OsSWEET14, es regulado transcripcionalmente por los efectores TAL (similares a activadores transcripcionales, por sus siglas en inglés) secretados y translocados al interior de la célula vegetal por bacterias. El SWEET14 es un transportador de sacarosa de la membrana plasmática y se ha detectado en las flores de *Arabidopsis* (Streubel *et al.*, 2013). Tanto ZmSWET11a, 13b como el 14b se expresan más en las espigas maduras, es posible que los granos de polen requieran aún más azúcares cuando están a punto de caer a los pistilos. Se ha observado por microscopía que los granos de polen maduros acumulan cantidades grandes de almidón (Tsou *et al.*, 2015), lo que supone un alto influjo de azúcares, que a su vez explicaría la alta expresión de SWEETs.

En cuanto a SWEET13a y 13b, se encuentran dentro del clado III en donde se agrupan los SWEETs 9–15, algunos miembros transportan sacarosa en la membrana plasmática. Otro nombre que se ha propuesto para este SWEET13 es RPG2 y se encuentra expresado en el tapetum, las tétradas del polen y en las hojas de mutantes *sweet11;12*.

Se ha propuesto que podrían auxiliar en el eflujo de azúcares del tapetum en *Arabidopsis* junto con SWEET8 y SWEET5, lamentablemente para estos dos SWEETs no tenemos oligonucleótidos específicos. En nuestro laboratorio se clonaron SWEET13a y 13b de maíz. Estos no se encontraron en la membrana plasmática y tampoco complementaron a mutantes de levadura que carecen de transportadores de hexosas en su membrana plasmática o de aquellas levaduras con mutaciones de invertasas, que son útiles para determinar la actividad de transporte de sacarosa. Los resultados nos indican que se encuentra en el interior celular, aparentemente en las vacuolas (pQFB Nancy Hernández-Chávez, comunicación personal).

Plantas transgénicas de tabaco con una construcción en antisentido de una invertasa extracelular, denominada Nin88, bloquea el desarrollo del polen en estadios tempranos. La invertasa degrada la sacarosa en los apoplastos, por lo que la incapacidad de las células de producir hexosas imposibilita el desarrollo del polen (Goetz *et al.*, 2001). Es posible que la sacarosa sea expulsada de las vacuolas por ZmSWEET13a y 13b presumiblemente de las células del tapetum, mientras que ZmSWEET11, 14a y 14b, si es que estos son transportadores de sacarosa, posiblemente sean los encargados de exportar sacarosa de las células del tapetum. Por otra parte, la función de importe de azúcares por las células del polen en desarrollo podría ser mediado por ZmSWEET6a y 6b siempre y cuando fueran transportadores de membrana plasmática (Tabla 4). Se necesita profundizar en la caracterización de estos transportadores para establecer el tipo de azúcar que transportan, su localización a nivel celular y en el tejido y su papel en la nutrición del polen en desarrollo. El transporte de azúcares en el polen es importante ya que se ha asociado a la esterilidad masculina de la planta y a las pérdidas en el rendimiento en cultivos de cereales tales como el arroz y el trigo, debido a reducción de la fertilización de las espiguillas que, a su vez, reduce el número de granos producidos en plantas individuales (Ji *et al.*, 2010). Lo anterior resalta que el transporte apoplástico de azúcares es vital para la planta.

Por otra parte, la secuencia de eventos que concluyen con la formación de óvulos es muchas veces simultánea con la formación del grano del polen en la misma flor, para que en corto tiempo ocurra la fertilización del óvulo por el polen. La formación del embrión ocurre a horas o días después de la polinización (Arregocés, 1983).

El desarrollo de embriones depende de la nutrición de los tejidos maternos a través de la cubierta de la semilla y del endospermo, sin embargo, los mecanismos de suministro de nutrientes a los embriones de plantas han sido difíciles de medir. En este trabajo se determinó la expresión de los SWEETs en semillas inmaduras, con 20 días después de la polinización, y se encontró que se expresaron SWEET4b, 4c, 11a, 14a, 14b y 15b, aunque los más expresados fueron SWEET6a y 6b. Es interesante que estos dos últimos SWEETs se expresaran tanto en la semilla inmadura como en las espigas joven y madura a niveles altos y muy similares, su expresión en estos tejidos podría estar coordinada al ser tejidos funcionalmente relacionados.

Mutantes en invertasas de maíz han demostrado que la acumulación de almidón en el endospermo depende de las hexosas que se producen de la hidrólisis de sacarosa a partir de los 2/3 más alejados de la conexión de la semilla a la planta madre, el pedicelo (Miller y Chourey, 1992). Por lo que la difusión de azúcares en la semilla podría ser facilitada por los SWEETs. En este trabajo se encontró que los SWEETs más expresados son 6a y 6b, que como mencionamos anteriormente se encuentra en el clado II de la familia de SWEETs, y podría transportar hexosas (Eom *et al.*, 2015), en *Arabidopsis* se encontró en la semilla seca. Para demostrar su papel en la formación de la semilla tendríamos que determinar primero que estos son transportadores de hexosas, segundo que son de membrana plasmática y tercero que efectivamente se encuentran localizados en el endospermo del embrión.

En este trabajo se encontró que también se expresaban otros miembros del clado II, SWEET4b y 4c, con 2 a 3.5 veces más expresión comparada con la del embrión seco. En maíz se describió que SWEET4c se expresa más cuando el importe de azúcares a la semilla en formación es máximo, entre los 10 y 15 días después de la polinización (Sosso *et al.*, 2015). El SWEET4c es esencial para el llenado de la

semilla, ya que semillas con versiones mutantes de SWEET4c (líneas de inserción del transposon Mutator, en el exón 3 o en el 5) producen semillas con pericarpio vacío, es decir los azúcares no son movilizados hacia el endospermo. Los nutrientes pasan de la planta madre al embrión en desarrollo a través de una capa única de células denominada de transferencia del endospermo basal (BETL) y que tiene muchas invaginaciones lo que hace que la superficie membranal sea muy amplia. Sosso y colaboradores demostraron que la expresión ZmSWEET4c era abundante en el BETL (Figura 21; Sosso *et al.*, 2015). Es probable que las semillas inmaduras que tenemos no coincidan en tiempo con las de Sosso y colaboradores por lo que en lugar de encontrar muy expresado al SWEET4c encontramos a ZmSWEET6a y 6b. ZmSWEET4c es un transportador de glucosa y es probable que ZmSWEET6a y 6b sean también transportadores de hexosas, su presencia se podría explicar a que la semilla estuviera en una etapa más avanzada del llenado, en donde se requiere movilizar más hexosas o con una velocidad distinta o en un compartimento diferente. Esto último es necesario abordarlo, obteniendo los niveles de los transcritos para los SWEETs en diferentes etapas del desarrollo de la semilla y también determinando los niveles de azúcares solubles y la localización tejido específico de los SWEETs. Además, no hay que olvidar que es probable que el maíz Chalqueño tenga una carga genética distinta al usado por Sosso y colaboradores, y es por eso esta diferencia de expresión de los SWEETs.

Los homólogos en *Arabidopsis* del SWEET11a y 15b, son importantes en la nutrición del embrión en formación, triples mutantes en AtSWEET11, 12 y 15 afectan la formación del embrión, retardan su desarrollo, reducen el peso seco de la semilla y tienen un bajo contenido de almidón y lípidos, así como una acumulación de almidón en la cubierta de la semilla (Chen *et al.*, 2015b). Es probable que SWEET11a y 15b de maíz también tengan un papel en la formación del embrión. Ambos SWEETs son transportadores de sacarosa en la membrana plasmática.



A medida que la semilla continúa su desarrollo el tamaño y peso seco aumenta hasta llegar a su máximo, que es cuando presenta todas las estructuras características y ha alcanzado la capacidad de germinar. El maíz y otras gramíneas almacenan la mayor parte de sus azúcares en forma de almidón, de manera similar a los tubérculos de papa (Giroux *et al.*, 1996; Viola *et al.*, 2001). La semilla al final de su formación pasa por una etapa de secado que la mantiene en contenidos bajos de agua, hasta que se inicie la germinación. Se encontró que en el embrión seco la expresión de los SWEETs era muy baja.

### **13.2. Expresión de SWEETs durante la germinación del maíz**

La germinación es un proceso clave en la vida de la planta, comienza con la rehidratación de la semilla y termina con el inicio de la elongación del eje embrionario y la salida de la radícula de la cubierta de la semilla (Bewley y Black, 1994; Bove *et al.*, 2001). La hidratación reactiva el metabolismo, se ha encontrado incremento en la respiración durante las primeras horas de imbibición de las semillas (Rosental *et al.*, 2014). Si bien las mitocondrias extraídas de semillas secas están parcialmente desarrolladas, son capaces de oxidar sustratos como el succinato y NADH, además de producir ATP (Rosental *et al.*, 2014), la ganancia de la actividad mitocondrial depende de la síntesis activa de proteínas (Logan *et al.*, 2001) y contribuye al incremento de metabolitos pertenecientes al ciclo de ácidos tricarbónicos. El inicio de la actividad metabólica es un indicador de una necesidad de sustratos respirables, unos de estos podrían ser los azúcares.

Sánchez-Linares y colaboradores (2012) describieron que los azúcares solubles, sacarosa, glucosa y fructosa se encuentran presentes tanto en ejes embrionarios como escutelos de maíz. Sin embargo la sacarosa es el azúcar soluble más abundante y su consumo es alto en las primeras horas de la germinación. Lo cual coincide con la alta actividad metabólica que se inicia conforme la semilla se

hidrata. La disponibilidad de estos azúcares para el crecimiento del eje embrionario podría depender de la capacidad de exportar sacarosa del escutelo, que es el tejido que contiene 10 veces más sacarosa que el eje embrionario, por lo que la expresión de los SWEETs podría ser necesaria en esta etapa.

De cero a 6 h de imbibición aumentó la expresión de SWEET4b, 4c, 6b, 11a y 14a, todos ellos se expresaban en los embriones en desarrollo, aunque en estos últimos también se encontraban los SWEETs 6a, 14b y 15b, pero con una menor expresión. Se conoce que los embriones de maíz están compuestos de dos tejidos, uno de estos es el escutelo, el cual tiene un contenido alto de lípidos y que durante la germinación los convierte en sacarosa. Mientras que el otro tejido es el escutelo y es el que propiamente se convertirá en una planta, este es dependiente de los nutrientes que le proporciona el escutelo o cuando está en la semilla completa también del endospermo (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). Ya que la sacarosa podría ser exportada del escutelo hacia el eje embrionario por difusión facilitada y que por comparación con los SWEETs homólogos de *Arabidopsis* presumiblemente SWEET11a y 14a transportarían sacarosa en la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2015a). SWEET11a y 14a podrían ser los encargados de colocar a la sacarosa en los apoplastos del eje embrionario (Tabla 5). Mientras que los SWEETs 4b, 4c y 6b son homólogos a transportadores de hexosas (Chen *et al.*, 2015a) estos podrían ayudar a la nutrición del eje embrionario, ya que este último carece de transportadores SUT1 en sus membranas y además tiene una invertasa de pared celular que se encuentra activa durante el proceso germinativo, lo que explicaría el movimiento de hexosas al interior del eje (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). Siendo necesario caracterizar a los SWEETs para determinar su papel en la nutrición del eje embrionario.

**Tabla 5.** SWEETs con mayor expresión durante la germinación de embriones de maíz. En una escala donde el embrión seco representa el 100 %. Los tejidos aumentan de 20 a 300\* veces más en comparación con el embrión seco. El orden de horas de germinación esta dado de mayor a menor expresión. También se indica la posible localización y especificidad de azúcar, según se comportan los transportadores que pertenecen al mismo clado.

SWEET	Clado	Tiempo de germinación (h)	Posible localización	Presunto azúcar que transporta
4a	II	30, 24, 18	Membrana Plasmática	Hexosas
4c	II	24, 30, 18, 12, 6	Membrana plasmática	Hexosas (glucosa)
6b	II	18, 30	Membrana plasmática	Hexosas
11a*	III	24*, 18, 30, 12, 6	Membrana plasmática	Sacarosa
14b	III	30, 24, 18, 12, 6	Membrana plasmática	Sacarosa

Los SWEETs que se expresaron en todos los tejidos reproductivos seleccionados y durante la germinación de los embriones de manera alta fueron 6b, 11a y 14a. Lo que los hace interesantes de un estudio más profundo para determinar si su expresión está coordinada y es lo que favorece la formación del polen y a su vez la de los estilos y la polinización.

En el maíz el SWEET4c se expresa más cuando las invertasas se expresan y los contenidos de glucosa aumentan (Sosso *et al.*, 2015), por lo que es posible que en los tejidos reproductivos exista una señal que podrían ser los mismos azúcares y que lleven a que de manera coordinada se expresen los SWEET en la inflorescencia masculina y la femenina para culminar en la formación de la semilla.

## 14. CONCLUSIONES

El grupo de SWEETs que se seleccionó como de expresión en tejido reproductivo si se expresó más en estos tejidos:

- En la fluorescencia masculina fueron SWEET6a, 6b, 11a, 13a, 13b y el 14a, aunque la espiga madura presenta entre 2 a 2.5 veces más expresión de SWEET11a, 14a y 14b que la espiga madura.
- En semillas inmaduras, con 20 días después de la polinización, se expresaron SWEET4b, 4c, 11a, 14a, 14b y 15b, aunque los más expresados fueron SWEET6a y 6b.
- En embriones secos hubo poca expresión de los SWEETs pero a las 6 h de imbibición la expresión fue alta de SWEET4b, 4c, 6b, 11a y 14a.

Los SWEETs que se expresaron en todos los tejidos reproductivos seleccionados y durante la germinación de los embriones de manera alta fueron 6b, 11a y 14a. Siendo posible que su expresión este coordinada y favorezca la formación del polen y a su vez la de los estilos y la polinización, sin embargo, esto resta por ser comprobado.

## 15. PERSPECTIVAS

1. Determinar la especificidad por azúcares y la localización de los SWEETs más expresados o que se expresaron en todos los tejidos examinados:
  - a. Clonar a SWEET6b, así como SWEET11a y SWEET14a.
  - b. Expresar en levaduras mutantes para determinar la actividad de transporte de los SWEETs encontrados en los tejidos examinados
  - c. Determinar la localización subcelular de los SWEETs usando el sistema heterólogo de expresión en protoplastos de Arabidopsis
2. Localizar a los SWEETs mediante hibridización *in situ* en:
  - a. En varios estadios de la formación del polen, ejes y embriones durante la germinación.
3. Determinar si los azúcares y las hormonas podrían estar regulando la expresión de los SWEETs que se expresan más en todos los tejidos examinados para establecer si hay una regulación coordinada que favorezca la polinización de los óvulos y la formación de la semilla.

## 16. REFERENCIAS

- Arragocés Oscar y Fernández de Soto José. 1983. Desarrollo y morfología de las semillas. CIAT. Colombia: 54-60.
- Barron D. 1997. RNAgents total RNA isolation system. Promega Notes Magazine. 61, 33.
- Bartonili Roberto. 1989. El maíz. Editorial Española depósito legal. Madrid: 11-25.
- Bewley JD, Black M. 1994. Seeds. Second edition. Plenum Publishing Corporation Springer, Nueva York. 445 páginas. ISBN 0-306-44748-7
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2002. Functional genomics in th study of seed germination. Genome Biology 3(1): reviews 10002.1- reviews 10002.5
- Bütner M. 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. FEBS Letters 581 (12), 2318-2324
- Brandford K.B. y Nonogaki H. 2007. Seed devolepment, dormancy and germination. Annu. Plant Rev.27:264-295.
- Braun DM, Wang L. Ruan YL. 2014. Understanding nd manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. Journal of Experimental Botany 65, 1713-1735.
- Campbell A. Neil y Reece B. Jane. 2007. Biología. Panamericana. Madrid: 752
- Carvente-García R. 2014. Clonación molecular y perfil de expresión del RNAm de un transportador de azúcares tipo SWEET durante la infección del maíz por los hongos *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química UNAM.
- Chen HY, Huh JH, Yu YC, Ho LH, Chen LQ, Tholl D, Frommer WB, Guo WJ. 2015a. The Arabidopsis vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium infection*. Plant Journal 83(6), 1046-1058.

- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323):527-32.
- Chen LQ, Lin IW, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HE, Londono A, Samuels AL, Frommer WB. 2015b. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell*, 27(3): 607-19.
- Chen LQ, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WF. 2015a. Transport of sugars. *Annu. Rev. Biochem.* 2015. 84:865–94
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* 335(6065): 207-11.
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. 2016. Water deficit enhances C export to the roots in *A. thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiology* 170 (3), 1460-1479.
- Enríquez-Arredondo C, Sánchez-Nieto S, Rendón-Huerta E, González-Halphen D, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D. 2005. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Science* 169: 11-19.
- Eom, J.S. et al. 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr. Opin. Plant Biol* 25:53-62.
- Eschrich W. 1980. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Plant Biology* 93(1), 363-378.
- FAO. 2010 La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm>).

- Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsh T. 2001. Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *PNAS* 98(11), 6522–6527
- Ji, X., et al. 2010. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant Cell Environ*, 33:926-942.
- Klemens PA, Patzke K, Deitmer JW, Spinner L, Le Hir R, Bellini C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus HE. 2013. Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth and stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 163(3):1338-52.
- Le Hir R, Spinner L, Klemens PA, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Gery C, Teoule E, Chabout S, Mouille G, Neuhaus HE, Dinant S, Bellini C. 2015. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 8(11), 1687-1690.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, et al. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4, 272.
- Lin IW, Sosso D, Chen LQ, Gase K, Kim SG, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou BH, Qu XQ, Carter CJ, Baldwin IT, Frommer WB. 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature*, 508(7497):546-9.
- Liu X, Zhang Y, Yang C, Tian Z, Li J. 2016. AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development. *Science Reports*. 6:24563.
- McDonald M. B., Kwong F. 2005. Flower Seeds. *Biology and technology*. CABI publishing. UK:145-150.
- Meyer Bernards, B. Anderson Donald, H. Böhning Richard. 1996. *Introducción a la fisiología vegetal*. Editorial Universitaria de Buenos Aires: 550-551.



- Miller ME, Chourey PS. 1992. The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation 1s associated with aberrant pedicel and endosperm development. *The Plant Cell*, 4, 297-305.
- Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science* 179:574-581
- Palacios-Vargas GI. 2016. Identificación de los transportadores SWEET de las raíces de plántulas de maíz y su regulación por la infección con *Trichoderma asperellum*. Facultad de Química, UNAM.
- Rolland F, Baena-Gonzales E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:675-709.
- Römer P, Recht S, Strauss T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S, Lahaye T. 2010. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *The New Phytologist* 187, 1048–1057.
- Rosental L, Nonogaki H, Fait A. 2014. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research* 24, 1-15.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zuriuta-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/ers130.
- Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Guerinot ML, Harrison MJ, Herrera-Estrada, Horie T, Kochiam LV, Munns R, Nishizawa NK, Tsay Y-F, Sanders D. 2013. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* 497, 60-66.
- Sekhon RS, Lin H, Childs KL, Hansey CN, Buell R, deLeon N, Kaepler SM. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal* 66(4) 553-563.

- Slewinski TL. 2011. Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Molecular Plant* 4, 641–662.
- Sonnewald U. 2011. SWEETS-The missing sugar efflux carriers. *Frontiers in Plant Science*, 2. Doi:10.3389/fpls.2011.00007
- Sosso D, Luo D, Li QB, Sasse J, Yang J, Gendrot G, Suzuki M, Koch KE, McCarty DR, Chourey PS, Rogowsky PM, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer WB. 2015. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics* 47 (12), 1489-1493.
- Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B. 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *New Phytologist*, 1-12.
- Sun MX, Huang XY, Yang J, Guan YF, Yang ZN. 2013. Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reproduction* 26:83–91
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2(2) 70-78.
- Tao Y, Cheung LS, Li S, Eom JS, Chen LQ, Xu Y, Perry K, Frommer WB, Feng L. 2015. Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature*. 527(7577):259-63.
- Turgeon R, Medville R. 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *PNAS* 95, 12055-12060.
- Tsou CH, Cheng PC, Tseng CM, Yen HJ, Fu YL, You TR, Walden DB. 2015. Anther development of maize (*Zea mays*) and longstamen rice (*Oryza longistaminata*) revealed by cryo-SEM, with foci on locular dehydration and pollen arrangement. *Plant Reproduction* 28, 47–60.
- Wang J, Nayak S, Koch K, Ming R. 2013, Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species). *Front. Plant Sci.* 4, 201. doi: 10.3389/fpls.2013.00201

- Xuan YH, Hu YB, Chen LQ, Sosso D, Ducat DC, Hou BH, Frommer WB. 2013. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(39):E3685-94.
- Yamada, K., et al. 2010. Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *J. Biol. Chem*:285, 1138-1146.
- Zhou Y, Liu L, Huang W, Yuan M, Zhou F, Li X, Lin Y. 2014. Overexpression of OsSWEET5 in rice causes growth retardation and precocious senescence. *PLoS One* 9, e94210. 2008. The biology of *Zea mays* L. ssp *mays* (maize or corn). [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/maize-3/\\$FILE/biologymaize08\\_2.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/maize-3/$FILE/biologymaize08_2.pdf)

**Recurso en línea:**

- 2008. The biology of *Zea mays* L. ssp *mays* (maize or corn). [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/maize-3/\\$FILE/biologymaize08\\_2.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/maize-3/$FILE/biologymaize08_2.pdf)

## 17. Anexos

**Anexo 1.** Números de acceso y expresión reportada en el maíz B73 de 19 SWEETs, así como los alumnos encargados del estudio de su expresión en el maíz Chalqueño.

Número de acceso EnsemblePlants	Nombre propuesto comparado con arroz	Datos de expresión (MaizeGDB)	Alumno que reporta su expresión
GRMZM2G153358	Zm_SWEET1b	Hoja planta madura	Nestor E. Delgado Rubio
GRMZM2G153358_P01	Zm_SWEET1b	Coleóptilo, hoja madura	Nestor E. Delgado Rubio
GRMZM2G324903	Zm_SWEET2	Raíz primaria	G. Itzel Palacios Vargas
GRMZM2G060974	Zm_SWEET3	Raíz primaria	G. Itzel Palacios Vargas
GRMZM2G000812	Zm_SWEET4a	Hoja de planta madura	Nestor E. Delgado Rubio
GRMZM2G144581	Zm_SWEET4b	Embrión	Mireya Flores Barrera
GRMZM2G137954	Zm_SWEET4c	Endospermo	Mireya Flores Barrera
GRMZM2G416965	Zm_SWEET6a	Espiga	Mireya Flores Barrera
GRMZM2G157675	Zm_SWEET6b	Espiga	Mireya Flores Barrera
GRMZM2G368827	Zm_SWEET11a	Cariópside, espiga	Mireya Flores Barrera
GRMZM2G133322	Zm_SWEET12a	Raíz primaria	G. Itzel Palacios Vargas
GRMZM2G099609	Zm_SWEET12b	Raíz primaria	G. Itzel Palacios Vargas
GRMZM2G173669	Zm_SWEET13a	Hojas	Roberto D. Carvente García
GRMZM2G021706	Zm_SWEET13b	Hojas	Nestor E. Delgado Rubio
GRMZM2G015976	Zm_SWEET14a	Raíz primaria	G. Itzel Palacios Vargas
GRMZM2G094955	Zm_SWEET14b	Endospermo	G. Itzel Palacios Vargas
GRMZM2G168365	Zm_SWEET15a	Base de las hojas y espiga	Nestor E. Delgado Rubio
GRMZM5G872392	Zm_SWEET15b	Embrión	Mireya Flores Barrera
GRMZM2G106462	Zm_SWEET16	Coleóptilo	Nestor E. Delgado Rubio

**Anexo 2.** Secuencias de los presuntos SWEET4b, 4c, 6a, 6b, 11a, 14b y 15b y localización de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR punto final.

**Zm\_SWEET 4b**

**GRMZM2G144581**

ACTCACAAGAAGCCGGGGACGGAGAGCAGAGAGCTTCAGCGCAACTGTGCTCAATCGTTTCTT  
CGTCTTTAGTTGGTGTCTGGTCTCCCTCCGTCTCTGTTTCCAAACAGAGGTGTCTCAGCTGAC  
TCTTTTGCTTAGCAAATAGCACACTCTCTCTAGAGCTGAGCACCACCTTGTGAAGGCA  
GCTAGCTAGCGACGACCATGGTCTCCTCGACACCATCCGCACGGCCATCGGCGTCATCGGCA  
ATGGGACCGCCCTGGTGTCTTCTCTCCCGGTGCCTACGTTTCATCCGCATCTGGAAGAAGG  
GTCGGTGGAGCAGTACTCGCCGATCCCGTACGTGGCGACGCTGCTGAACTGCATGATGTGGGT  
GTTGTACGGGCTGCCGCTGGTGCACCCGCACAGCATGCTGGTGATCACCATCAACGGCACCGG  
CATGCTCATCCAGCTGACCTACGTGGCGCTTCTCTCGTCTACTCCGCGGGGGCGGCGCGCCG  
CAAGGTGTCCCTCTGCTGGCCGCGAGGTGCCTTCGTGCGCGCCGTCGCCGCGCTGGTGC  
TCGCCCTGGCGCACACCCACGAGCGCAGGTCCATGGTGGTCCGATCCTCTGCGTCTCTTCG  
GCACCGGCATGTACGCCGCGCGCTCTCCGTATGAAAATGGTGTGATCCAGACGAAGAGCGTGG  
AGTACATGCCGCTGTTCTGTCACTGGCTTCCCTGGTGAACGGCATCTGCTGGACCGCCTACGC  
GCTCATCCGCTTCGACCTCTACATCACCATCCCAACGGGCTGGGCGTGCTGTTCCGCGCTGGC  
GCAGCTGCTCCTGTACGCCATCTACTACAAGA**ACACCCAGAAGATCGTGGAGGCACGCAAGCG**  
**CAAGGCGGGTCAGGTCGCCATGACGGAGGTGGTCTCGACGGCAGCAGGGCCTCCAACAACA**  
**ACAACAACAACGGCGGCAGCGGCACCTACTGATGATGATGAGTACGACGTAATATTGTGGTAC**  
**CACGCCAACACAACACCAAGCAACACGGGGGGCAACGCCAACGCCGTGTGTATCTAGCACTAG**  
**CAAGCGTCTTCTTCTGAC**GAAGGGATGATCTATGCATCTTAAGCAGCCGTCGTCGTCGCTT  
CTTCTTCTTCTTCTGTTAATCACTAGCTTTTACTTTCTCCATGCTTCTAGTAACGAAGCTTTGCC  
CACTGATTAGTACTTATATGTTGAATCATAATATTACGACTTCGACAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Zm\_SWEET4c**

**GRMZM2G137954**

TCTCGTACATCGCTCTCGCTCTCGCTCTCTCTCCTGCTGTCCACGACCGACCAAAGGCGCCGGG  
CACAGACTCTTCGTGGATCCAAGAGAAGCTCGCGCCCTCCCGACCATGGTCTCGGCGGATA  
CCATCCGTACGGCTATCGGCGTCATCGGCAATGGCACCGCCCTTGTGCTCTTCTCTCCCGGT  
GCCACCTTCGTGGGCATCTGGAAGAAGCGTGGGTGGAGCAGTACTCGCCGATCCCGTACGT  
GGCGACGCTGCTGAACTGCATGATGTGGGTGCTGTACGGGCTGCCGCTGGTGCACCCGCACA  
GCATGCTGGTGGTACCATCAACGGCACCGGCATGCTCATCCAGCTGACCTACGTGGCGCTCT  
TCATCCTCTGCTCCGCGGGGGCGGTGCGCCGCAGGGTCGTGCTCCTGTTCCGCCCGGAGGTC  
GCCTTCGTGCTGCCTTGGCCGCGCTGGTGTACCCCTGGCGCACACGCACGAGCGCAGGTC  
CATGCTCGTCGGCATCGTCTCCGTCTTCTTCGGCACCGGCATGTACGCTGCGCCGTCTCGGTC  
ATGAAATTGGTGTGATCCAGACAAAGAGCGTGGAAATACATGCCCTGTTCTGTCCCTGGCCTCCC  
TCGCCAACAGCATCTGCTGGACCGCTACGCGCTCATCCGCTTCGACCTCTACATCACCATCCC  
CAACGGGCTGGGCGTGCTGTTCCGCGCTGGGTACGCTGGGCTGTACGCCATGTTCTACAAGAA  
CACCAAGCAGATCATGGAGGCACGCAGGCGCAAGGCCGACCAGCAGTCAACCATGATGGAGGT  
GGTACCGACGCCTCCGCCACGCCGCCCGCCACCCAACAACAACAGGCGGCGGGCGGCGG  
GCAACGGTACTGATCGCATGCAACAGGAAGGACGACGACGATCGAC**CAGCAAGCAAAAGCC**  
**ACATACATAGCGTCTGTCGTAGCGCCCCGCCGCCACCGAATGCTTGTGTTCCGATTCCGATCT**  
**CCCCAAGGGGACGATGCTCCGTTGCATTCTCTGCATATCTACTAATAACGAAACGAAACAAA**  
**ACAAAAGACAGCACAAAAGGGCTTGTGGGTTTCACATTTACCATATATAATCGTCTGCTGCTGT**  
**CTTGTGCTGGTATCT**

**Zm\_SWEET6a**  
**GRMZM2G416965**

CCCCGAGCCGCAAACCTGCAACCACCTTCCCAAATCCTA**GTTCTCGCTTCTCGTCTAGCCT**  
**CGGCCCCGTTCCAAAAGCCCCGCAGCTCTCGCATCTCATCAGACGCCACCACCACCTCCGGCGA**  
**CCGAAGATGATCTCT**CCGGATGCAGCCCGCAACGTCGTAGGCATCATCGGCAATGTCATCTCC  
TTCGGCCTCTTCTCTCCCCAGTGCTGACGTTCTGGCGGATCTGCAAGGCCAGGGACGTGGAG  
GAGTTTAAGCCTGACCCCTACCTGGCGACGCTGCTCAACTGCATGCTCTGGGTGTTCTACGGCA  
TCCCCGTCGTCCACCCCAACAGCATCCTCGTCGTCAACGCGTCGGGCTCGTCATCG  
AGGCCATCTACCTACCATCTTCTTCTTTACTCTGATGGCCCGAAACGCAGGAAAGCGTTCCG  
AATCCTGGCCGTGGAGATTTTGTTCATGGTCGCCGTGGTGTGTTGGTGTGATTTTGGGCGCCAC  
ACGCACGAGAAGCGCTCCATGATCGTCGGCATTCTCTGCGTCATTTTCGGCTCGATGATGTACG  
CCTCCCCACTCACCATTATGAGCCGTGTGATCAAGACCAAGAGCGTTGAGTACATGCCCTTCT  
CCTCTCGCTGGTGTAGCTTCTCAATGGCTGCTGCTGGACGGCCTACGCGCTCATCCGCTTCA  
CCTCTACGTTACGATCCCCAACGCCCTTGGCGCCTTCTTGGCCTCATCCAGTAATCCTCTACT  
TCTGCTACTACAAGTCGACCCCAAGGAGAAGAATGTGGAGCTGCCACCGTCTCCAGCAACG  
CCGGCGGCGGCAACGTCACCGTCAGCGTCGAGCGATAGGCGACGTAGCTGCAGCGGCAGCGC  
CGCCGCCCGTCGAGAAAGAACTCGACGAGACGTACTTTAGCAATAGTAGTTGCCATTCATCGCT  
CTTCTAGGATGGTTTGTTTTAAAGTAGTGCTACCTAGTTTTGCCCGGTGCGTGTGCGTGTCAAAGA  
ACAGTTAGGGGTGTTTGGTTACCCCAATTAATAAAGTTAAAGTTTAGTATTTGCTCTGAATGTT  
GAATAGTAATTATGACTATTAATATAGTTTTAACTAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Zm\_SWEET6b**  
**GRMZM2G157675**

AGGGACTCGCGTTTCGTGGCGGCCCTGGCCAGAGTCTGCGCCCGCTCCTGCCCCCGCCCCGG  
GCCAGGCCACCCTCGC**CTCCTCGCGCTATAAAGTGCGGGCGTACGGCGTACCCGATTGCC**  
**CAAGCCGCAACCTCAACCACCTTCCCAAATCTCAGTAGTCGCCTCTCGTCTTCTCGTCTAGCC**  
CGGCCCCGTTCCAAAACCTCCGTAGCCGCCCGCCGCCACCCCGGCGACCGAAGATGATCTCCCC  
GGACGCAGCCCGCAACGTAGTCGGCATCATCGGCAATGTCATCTCCTTCGGCCTCTTCTGTCC  
CCAGTGCTGACGTTCTGGCGGATCTACAAGGCCAAGGACGTGGAGGAGTTCAAGCCGGACCCT  
TACCTGGCGACGCTGCTCAACTGCATGCTCTGGGTGTTCTATGGCATCCCCGTGCTCCACCCCA  
ACAGCATTCTCGTCGTCAACATCAACGGCATCGCCTCGTCATCGAGGCCGTCTACCTCACTAT  
CTTCTTCTCTATTCCGACAGCCAGAAGCGCAAGAAGGCGTTTCGCGATCCTGGCCGTGGAGATT  
CTGTTTCATGGTCGCCGTGGTGTGCTCGGTGTGATCCTCGGCGCGCACACTCACGAGAAACGTTCC  
ATGATCGTCGGCATCCTCTGCGTCATCTTTCGGCTCGATGATGTACGCCTCACCACTCACTATCAT  
GAGTCGAGTGATCAAGACCAAGAGCGTTGAGTACATGCCCTTCTCCTGTGCTGGTGGAGCTTC  
CTCAACGGCTGCTGCTGGACGGCCTACGCGCTCATCCGCTTCGACCTCTACGTCACGATCCCG  
AACGCCCTGGGCGCATTCTTTCGGCCTCGTCCAGCTGATCCTCTACTTCTGCTACTACAAGTCGA  
CCCCAAGAAGGAGAAGAACGTGGAGCTGCCACCGTCTCCAGCAACGTCGGCGGCGGCAAC  
GTCACCGTCAGCGTTGAGCGATAGATGATGTAGCTGCCGCCGCCCGTCGAGAACGAACCTCGAC  
GAGACGTGCTTACCACAAGTAGTTTTGGCCTTGTCTAATTGCTCTTCTCGGATGATCGTTAA  
GTGAGTGTTAGTTAGTTTTGCCCTGCGTGTGATGTCAGGAACAATTAATATATCCATGTGGCTGT  
GTTTGCCATTCTAGATGAAAAAAAAAAAAAAAAA

Zm\_SWEET11a  
GRMZM2G368827

ACACACAAACACATCAGCATTAGCAATAGCTAATCGAGCATC**GTCGCCTTAGCTCCTCTCCTCT**  
**CCTCTTCTCTCCGTCGTCGTGGAAC TTCTCTCCGCCGGCTGCCATATAAAGGAGGAAGAAGAGA**  
**ACAGCAACGCTAGCTAGCCGGCCGGCCTCCGTCGTCGCCGGCGTCGTCGACTAGCTAGCTAAC**  
**TCTCGATCTCCAGTTCTGCCCCCGCCCCACGCCCGGCCGTCGTCGATCGTCAGCAATAAAT**  
**GGCAGGAGGCCTCTTC**TCCATGGCTCACCCGGCCGTCACCCTCTCCGGCATCGCAGGAAACAT  
CATCTCCTTCTGTTGTTCCCTTGACCAGTGGCGACGTTCTGCAGGTGTACCGGAAGAAGTGC  
ACGGGCGGGTTCAGCTCGGTGCCGTACGTGGTGGCGCTTTCAGCTCGGTGCTGTGGATCTTC  
TACGCGCTGGTGAAGACCAACTCGAGGCCGCTGCTGACCATCAACGCCCTTCGGCTGCGGCCGTG  
GAGGCGGCCTACATAGTCTCTACCTGGCGTACGCGCCGCGGCCGGCGCGCCTGCGGACTCT  
GGCCTACTTCTTCTGCTGGACGTGGCGGCCTTCGCGCTCGTCGTCGCCGTCACGCTCTTCGC  
CGTCCGCGAGCCCCACCGCGTCAAGTTCTCGGCAGCGTCTGCCTCGCCTTCTCCATGGCCGT  
CTTCGTCGCGCCGCTCAGCATCATCGTCAAGGTGGTCAAGACCAAGAGCGTCGAGTTCCTGCC  
CATCAGCCTCTCCTTCTGCCTCAGCTCAGCGCCGTCGCTGGTTCTGCTACGGCCTTTCACC  
AAGGACCCCTTTGTCATGTACCCCAACGTCGGCGGCTTCTTCTTCAGCTGCGTCCAGATGGGCC  
TCTACTTCTGGTACCGCAAGCCCCGCCCGGCCAAGAACAACGCCGTGCTGCCGACGACCA  
CGGACGGCGGCAACGCGGTGCAGGTGCAGGGGCAGGTATCGAGCTGGCGCCCAACACGGT  
GGCCATCCTGTCCGTGAGCCCCATCCCCATCGTGGGCGTGCACAAGATCGAGGTGGTGGAGCA  
GCAGCACAAGGAGGCCGCCGTGGCCGCCGAGACCCGCCGGATGGCCGCCGCAAACCCGGAC  
GGCGCCATGCCGGAGGTATCGAGATCGTCCCCGCCGCCGCCGGGTGTGACCAACGCCAA  
TCACCATGCACCGTACACACCCTGCTAGCTTCTTATTAGCTAGCTCGGATGACGTACGACAGTTT  
GGTGGCAAGTGGCTGGCAGCTCAAGCATGCAGATGCAGGCATCGTCGTCGCTATAGTTGGTC  
GTTTAGTTGGTTAATTGTTGGATTATTATTGCGTATCTCTCTCGTGTGCGTCGTAGCCTTGTCTCA  
GTTCAAGTTCAGTGTCAATCAAGTAGTAGTGTGTTGTTTGCATTGGATCTGACAATGCATGCA  
TGCTAATAATTATGGTGGTGTGATGGTCTTGGTCGATCTGGTGTATGTAATGTACGTACGCGCG  
GGTACGTACGTAGTCTACGTACGCCGTGTCAACGTCGTAGATCTCTACGGGAAGATGATAA  
GACTGTAACATGCAGGGCATGCATCTATTTATACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Zm\_SWEET14a  
GRMZM2G094955

CTCGGAGAGTAGTAAGCTGTCACGGTCACCGGCCGGCCTCGCTCCGATCCTCTCTCTCGTTT  
TCTCACTGAGAAGAAGAGAGAACCAAGTGGTCAGAACTCAGAAGCTTGGCATAGAAATCCCTGC  
TTGGCCACGATCGCCTTCTTCTAATCTACAGATTATATTCCTCATAAACGCTCGTACGTACGTAC  
CAAATTATCAAGCAAAGGTCTCC**AAATGGCTGGCCTGTCTCTACAGCATCCCATGGCCTTCGCC**  
**TTCCGGCCTCCTCGGCAACATCATCTCCTTCATGACGTACTTGGCCCCGCTGCCGACGTTCTGCC**  
**GGATCTACAGGAACAAGTCGACGGAGGGGTTCCAGTCGGTGCCGTACGTGGTGGCGCTCTTCA**  
**GCGCCTGCTGTGGATCTACTACGCGCTGCTCAAGTCCAACGAGTTCCTGCTCATCA**CCATCAAC  
TCCGCCGGCTGCGTCATCGAGACCCTCTACATCGCCACCTACCTCCTCTACGCGCCCAACAAG  
GCAAAGCTGTTACGGCCAAGATCCTCCTCCTCAACGTGGGCGTGTTCGGCCTCATCCTCC  
TCCTACGCTGCTGCTCTCCGCGGGGCCGACCCGCGTCGTCGTCCTCGGCTGGGTCTGCGTC  
GCCTTCTCCGTACGCTCTTCGTCGCGCCGCTCAGCATCATCCGCCAGGTGGTGGCACGCGG  
AGCGTGGAGTTCATGCCCTTCTCCCTCTCCTTCTCGCTCACCGCCAGCGCCGTGCTCTGGTTCC  
TCTACGGCCTGCTCATCAAGGACAAATACGTGCGCCTGCCAAACGTGCTCGGCTTACCTTCGG  
CGTCGTCCAGATGGGCATGTACGCGCTTACCGTAACGCGACGCCAGGGTGCCTGCTGCCAA  
GGAGGCGGGCGGCGGCGGACGACGGCAACACCTTCAACTTCAAGGCGCCCGGCGAGCAT

GTGGTGACCATCGCCAAGCTGACCGCAGCGGCGCCTGCGACGGCGGCGGAGCTTATCATCAA  
GGCCCGCGACGACGCGCAGCACCCCGGAGGAAGAAGCAGCAGCAGCCAAGGCGGCGCCG  
GCGAAGTCTAAATTATTAATCCCCCTCCAGAACATGCGTACGCATGTATGTGTATCATCCGGTC  
CGGGTCACATCATAAACTAGGCCGTGCGTGCCTGCTCGGTACTAGCACACGCCCGCCCGCCTG  
CCTGCCCCGCCGCATGATCCAATCGAGCTGCTATATACGAAAGGGATGAAGACGATGAGATCTA  
CTCTGAGAGAACCAGAAGGGGGCTAGCTAGGGCCATGTCTCTCGCCTCAGGTCGTGGGTCTGC  
TGCTGCTGTTTCATTTCTGTTCTCGCGCATGGCTGCGCGCGTGTATTCATTTTAGTTAGCTACTTG  
TTGCCCGTCACCACCTTCGTTCCATGTAATAACAACAAAATATATATAAACATGGTCATCGTAAAG  
CAAAGGTTCCTTTTTATCAAATC

**Zm\_SWEET 15b**  
**GRMZM5G872392**

GACACAAAAGGGAGGCGGCATGCAAGGTGAGGGAATCCTCGATTACACAACATACACAGATCTA  
GAGACAGATAGAGAGCCAGCAGCAGCAGCTAGCTAGCCGTCTTCTTCAACTACCACAACCCAA  
CCAACCCTCTCTCGCTCGCACATTATCTCATCTCTCTCGCCGTTTCATCACACAGGCCAGTACG  
GCTGGCCCGTGGGTGCCAAGGCGCCGCTACTCGCCAAGGACCCGGCTACTTCCATCCCATCC  
CTTCTCTACGGGTGAGTCAACGGGAGGGACTGCATGCATGCAGGCAGTACATCTGGCCGCTG  
CTGTGCGGTAGCAGCAGCAGGCCCCCTTCTTGACTCGACAAATCTACTACTGATCGATATC  
GACTACTCTGCTATTACACTT**TAACCAACCTACGCCTCCACGGAAATGGCCATGTCGGGCTTG**  
**ATCGCCAGCTGCTCCGGCGGCCATGGGTCCAGGGACGCCGCCGTGGCCACGCCGGACG**  
**CATCTGCCCTGCTCCCGCAGCTGCCTCGGCGGCCGGCGCAGGTGACAGGCTCCACGTCC**  
**ACGTCGACGACCACGACCACCTGCGGCTCGTGCACCTCCTCCACCGCGCTGGCGTAGCTTCG**  
**ATGTCGATGTCG**ATGGGGTGCACCTCAGCACCGCAGCTCGCCCTGGCCTCGGCCGCCGCCG  
GGCCACCACCACCTCCTTGCGGTGCTCCGGCAGCTTCGCCTCCTCCACCGTCACCGCCGCGG  
GCTCCTTGTTCTGTACGCCATGTACAGCGCTATCTGCGCGACGCCGAAGACGAAGCCCAGCA  
CGTTGGGGAACGCCACGAACACGTCCCTCTTCAGCGCGCCGTACGCGAACCAGATCACGGCGC  
TCAGCACCGAAGAAGGAGAGCGAGATGGGCATGAACTCCACGCTCTTGGTCCGGACCACCT  
GCCGCATGATGCTGAGCGGCGCGGCGAATACGCTGAGCGCGACGCTGACGCAGATCCAGCCG  
AGCACGCGCACGCGGAGGCCGGCGCTGGAGACCACCATGGTGGCGAGCGCGGCGAGTCCAA  
AGACGCCGACGTTGAGCCCCAGCAGCATCTTGCCGTCAGCGCCCTGGCGGCCCTGGGGCGCG  
TACACCAGGTACGCGGCCAGGTACGCCGCCTCGATCACGCACCCGACGCCGTTGATGGTCACC  
AGCAGCTCGGCGCCGGACTTGAGCAGCGCGTAGAAGATCCACAGCATGCAGCTGAACAGCGTC  
ACCACGTACGGGTGACTGGAACCCCTCCGTGACTTCTTGCGGTACACGCGGTAGAACGTC  
GGCAGCGGCGAAAGGAACACCATCAGCGAGATTATGTTACCTAGGATACCGAAGGTGAAGGCC  
CAGGTCTGCTGCTCCATGTTGAGGAAAGCCATCTATCTCGATCGATCGATCGATCTCCTC  
CCCTCCTGGTCGTTCTCCCTCTCGCGCGCCGCGCTCTGGCTAGGTAAGGGTAGGCAGCGCGG  
GCGCGCGCAGTACTGGTGGAGCAGTCGTCACGGCGGTCTGTCAGCGGAGAAGGGGAGGCCA  
GGTGTGCAGAGGGGCAGAGGAGCTCGCTCGCTCGCTACCTGAGGAGGAGGAGGGAGCTAGCT  
CTCTCCGCTGCC



**Anexo 3.** Secuencias de los posibles transportadores SWEETs de hojas. SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 16, y localización de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR punto final.

**Zm\_SWEET1b**

**GRMZM2G153358**

CATCCATGTATCCATCCATCCACACACACAAACAGACAAGCATACAACACCGTTGCCATTTAGCT  
GTTCTTGCTAGGCAGTTGCGCGCTTACATTGAGCCGAGCTAGCTGTCTACTACGGCACA  
TCTCCTGCGCGCGTGCTCGATCGATCTGAAGGCCAGACCTGTGCCTGTCCAATTTTGCCTTGT  
CTACCCACCACACCAGTAGTCGAGAAGGT**TCCATATAAGCGCAAGCAGACAGCAGCAAAAGAG**  
**CTAAGGAGAGTCTGAGACAAGGTTTCAACAGATGGAGGATGTGGTGAAGTTTCGTCTTTGGAGTT**  
**TCCGGAAATGTCATCGCTCTCTTCTTCTTCTTCCCAGTGCCTACGTTCTG**GAGGATCATCAG  
GAGGAAGTCGACGGAGGATTTCTCGGGGGTGCCGTACAGCATGACACTCCTCAACTGCCTCTT  
GTCAGCTTGGTACGGGCTGCCGTTCTGTGCCCGAACACATGCTGGTGTGACGATCAACGG  
CGCGGGCGCGGCGATCGAGGCCGTGTACGTGGTGTCTTCTGGCGTTTCGCGTCCAGCCAGC  
GGACGCGGCTGCGGATGCTGGGCCTGGCGTGGCGGTCTCGGCGGGGTTTCGCGCCGTGGC  
GCTGGCGTTCGATGCTGGCGCTGCACGGACAGGGCCGGAAGCTCATGTGCGGCCTCGCCGCCA  
CCGTCTGCTCCATCTGCATGTACGCCTCGCCGCTCTCCATCATGAGGCTGGTGGTGAAGACCA  
GAGCGTGGAGTACATGCCGTTCTGCTGTGCGTGGCCGTGTTCTGTGCGGCACGTCTGGTT  
CGTCTACGGCCTGCTCGGCCGGGACCCCTTCGTGCGGATTCCCAACGGGTGCGGGAGCTTTCT  
GGGCGCAGTGCAGCTGGTCTTGTACGCCATCTACCGCGACAGCAACAGCGGCGGCAAGCAGC  
AGGCCGGCGACGACGTGGAGATGGCCTCCGACGCCAAGAGCAGCAAGAAGGTGCGCCGACGAC  
GTCGGCGGCAAGGAGGACCGCCTGGTCTAGCATGGAGCTAGCCACTTTCTCTTTGGTGCGCG  
AGCGTATGTTTCTCCCCCGTGATTGTGTGTGTGTGCATGTATACGAGAGTGCCTGCTGTACT  
GTACTACCTCTGCGTGTGTGCAATAATGTAAGTGGGTGTTTCATCTCGCAATGGGGTGTCTCTCT  
CCAAGCGGATTTGCTGGCCGTGCGGAGGCCAAGGTGGACGATAGGGATGCCGTAGTTTTCCGG  
CGCCGCTATGCTAGCTGTTACATGTTGCCGATCGGCGATCGTGTGAGCCACGGACGGAGTGCCT  
TCCAGGCCGCATGGCTGCTTCGCGGGGCCAGCCATA

**Zm\_SWEET4a**

**GRMZM2G000812**

ATCACTACCAAGAACCAGAGAGGAGCTTCATCAGCTCATTCAATTCTCGTTCCATCCCTCGTCT  
CTTGTGTCCCGCCTCCGTTCCATAATTCACCAGCGTCGTCTACCCATATCTCCCATCGTCTTCT  
CCCTCGCGCCATCAGCTTCCCAAGCCAGCGGCGACCATGATCTCCCCGGACACCATCCGCAC  
GGCCATCGGCGTCATCGGCAATGGAAGTGCACACTCGTGTCTTCTCTCCCAGTGCCTACGTTCT  
ATCCGCATCTGGAAGAAAGGGTCGGTGGAGCAGTACTCGCCGATCCCGTACGTGGCGACGCTG  
CTGAACTGCATGATGTGGGTGCTGTACG**GGCTGCCGGCGGTGCACCCGCACAGCATGCTGGT**  
**GATCACCATCAACGGCACCGGCATGGCGATCCAGC**TGACCTACGTGGCGCTCTTCTCTCTA  
CTCGGTGGGGGCTGCGCGGGCGAAGGTGGTCTGCTGCTGGCCGCGGAGGTGGGCTTCGTGCG  
GCGCCGTGCGCGCGCTGGTGTGCTCAGCCTGGCGCACACGCACGAGCGCAGGTCCATGGTGGTC  
GGCATCCTCTGCGTCTTCTCGGCACCGGCATGTACGCCGCCCGCTCTCCGTCATGAAAATG  
GTGATCCAGACAAAGAGCGTGGAGTACATGCCCTGTTCTGTGCGTGGCTTCCCTCGTGAATG  
GCATCTGCTGGACTGCTTACGCGCTCATCCGCTTCGACCTCTACATTACTATCCCCAACGGGCT  
GGCGTGTGTTTCGCGGTGGCGCAGCTGGTGTGCTGTACGCCATCTACTACAAGTCCACCCAGGA

GATCATCGAGGCGCGCAAGCGCAAGGCCGACCAGATCGCCATGACCGGGGTGGTCGTCGACG  
GCGGCAAGACCAACAACCAAGCCGGCGGGCCAATACTGACCGACGATCAAGTGACGATCGA  
CACCAATATGCTCAAGCAAGAAGCCAGCGGCAAATCAATTATGTCGCCGCTGGGTTTTATGTATT  
TTGTGATTCTATATGCACGCTGCTTGTCCGTCCCGCCAATGGAAAAAAGGGGGAAGAAAA  
ATGTCTGTGGTATATGTGTTCTCGCCGAATAACTCTCGCGCATAGCTAGCTGGTGGGGCTGAG  
TCACTGCCTTCGCTATATGTATACGTGCAAAAATTAGAGGTGGAGGGTTGTTTTAGCTAATCCCA  
CCTTAATTCCAAGGCAGAGTGACCTTTTTTTTTCTCCTTCTGTTTCGGCTAGGATTTTGTATAAT  
TGAGCAATTTAGCGCGACTTGTTATTGGTGTGGTGTGTCTCAATCAATAGTAAAATGTTCAATT  
TACTCTTCAATCGCATC

**Zm\_SWEET13a**  
**GRMZM2G173669**

GCCTATATAAAGCCACCCACAGCCCTGCCTATCATTGCAAGAGTTTGAGCCAACACACACAGAG  
AGAGGACAACCTCCTCACAACCTCTCCCTTCCCTCCTGTAGGGGCCAAAAGGGTTAGAGAGTAGGA  
GAAGTAGTTCCTAGCCCAACACAAGAAAAACAAGCTCGATCTCCTCATCACCCTAATCCAAGCA  
ACTGCTTTGTGTGTTGGGAAATTCTGTGACCCCTGTTATATTATTATCCGTGTAGCTACTAGCTT  
CATTCCCCCTTTGTACCCATCAATGGCTGGCATGTCTCTGCAACACCCCTGGGCGTTTTGCTTT  
CGGTCTACTAGGTAACGTCATCTCCTTCATGACCTTCTGGCCCCGATACCGACGTTCTACCGC  
ATCTACAAGAGCAAGTCGACGGAAGGCTCCAGTCGGTTCCTACGTGGTTGCCCTGTTCAAGC  
CCATGCTGTGGATCTTCTACGCACTGATCAAGTCCAACGAGACCTTCTCATACCATCAACGC  
CGCCGGCTGCGTCAT**CGAGACCATCTACGTCGTCATGTACTTCGTCTACGCGCCCAAGAAAGC**  
**CAAGCTGTTACGGCCAAGATCATGGTCCCTCAATGGCGGGCTCTTTGGGGTCATCCTCCTG**  
**CTCACCCCTTCTCCTCTTCAAGGGCAGTAAGCGCGTTGTGCTGCTTGGCTGGATCTGCGTCGGCT**  
**TCTCCGTCAGTGTCTTCGTGCGCCACTCAGCATCATGAGACGAGTGATCCAGACGAAGAGCG**  
TGGAGTACATGCCCTTCTCCCTCTCCCTCTCGCTCACCCCTCAGCGCCGTCGTCTGGTTCCTCTA  
CGGCCTCCTCATCAAGGACAAATACGTGCGGCTTCCAAACATCCTGGGGTTCACCTTCGGCGTG  
GTCCAGATGGTGTCTACGTGTTGTACATGAACAAGACGCCGGTGGCGGGGACTGCCGAGGGC  
AAGGATGCCGGCAAGCTTTCCTCAGCTGCAGACGAGCACGTCCTCGTCAACATCGCCAAGCTC  
AGCCCAGCCCTCCCGGAGAGGAGCTCCGGGGTGCACCCAGTCACCCAGATGGCGGGGCTTCC  
TGTCAGGAGCTGCGCTGCTGAAGCAACCGCGCCGGCGATGCTGCCCAACAGGGACGTGGTGC  
ACGTCTTCGTCAGCCGACACAGCCCCGCCGTCCACGTGGCATAGATTCTCGATCGATCGCGTG  
CATGGCCATGCATGCGCCCGCCACACGTACGCTAGCTTTTATATATTCGAAGGACGACTTGCT  
GCTGGTCGTGAGCATATATGATGGAGAAAATGATTAAGTAGTATATATAAGTAATTAAGTGC  
CATGCATGGAAGCTAGCTAATGGATGGAGGCAGAGGCCAGAACGATGAAGGGGGAAGCTATAC  
ATATATGTGTGTAATTAATATAGATATATGGGCTTTGTGTTTCATCTTTGCAGCTATGTATTAATTTG  
CATGGATATCTGTTATTCCTTTTTATGTGTAACGTCTTCTAATAAAAATGAATTGAACCCACACTAC  
TGTTGTTAGCTACCACAAGTTTCCC

**Zm\_SWEET13b**  
**GRMZM2G021706**

CAGAAACAACGCAGAGAACTCAGAGCTCTTCGTGCCCTCCTGCAAGCGCCAAGGAGGAAGAGA  
AGTGTGCGTACTGCGTAGTTCCATAGACCCGGACAAACCAGCGCCATCATACAACACCAGCAAC  
TGTTGGTTTAGTTGTATATCTGCCTTGCAGCCGTATTATCTGTATCACCCCTTTTTGTGTGCGGATG  
GCTGGCCTATCTTTGGAACATCCTTGGGCGTTCGCCTTCGGCCTCCTAGGCAACGTCATCTCCT  
TCATGACCTTCTAGCCCCGATACCGACGTTCTACCGCATCTACAAGAGCAAGTCGACGGAAGG  
TTTCCAGTCGGTTCCTACGTGGTAGCGCTGTTACGCGCCATGCTGTGGATCTTCTACGCACTG  
ATCAAGTCCAACGAGACCTTCCCTCATCACCATCAACGCCGCCGGCTGCGTTATCGAGACCATCT  
ACATCGTCATGTACTTCGTCTACGCGCCCAAGAAAGCCAAGCTGTTACGCGCCAAGATCATGGC  
CCTCCTCAATGGCGGCGTCTTTGGGGTCATCCTCCTGCTCACCCCTTCTCCTCTTCAAGGGTAGT  
AAGCGCGTTGTGCTGCTTGGCTGGATCTGCGTGGCTTCTCCGTCAGTGTCTTCGTCGCGCCA  
CTAAGCATCATGAGGCGCGTGATCCAGACGAAGAGCGTAGAGTACATGCCCTTCTCCCTCTCCC  
TCTCGCTCACCCCTCAGCGCCGTCGTCTGGTTCCTCTACGGCCTCCTCATCAAGG**ACAAATACGT**  
**CGCGCTACCAACGTCCTTGGGTTTCATCTTCGGCGTGGTCCAGATGGTGTCTACGTTCTAC**  
**ATGAACAAGACGCCGGTGGCGGCTGCCGTGGGCAAGGATGCCGGCAAGCTTCCCTCAGCTGC**  
**AGACGAGCACGTCCTCGTCAACATTGCCAAGCTCAACCCCCGCCCTCCCGGAGAGGACCTCCGG**  
**GATGCACCCAGTCACCCAGATGGCGGCCGTTCTGCCAGGAGCTGCGCTGCTGAAGCAATCGC**  
**GCCGGCGATGCTGCCCAACAGGGACGTGGTCGACGCTTTCGTCAGCCGACACAGCCCCGCTG**  
**TCCACGTGGTCTAGCTTCTCCATCATCGCAAGCAAGC**ATGAATCGAGTCGAGTCCGAACGCATA  
ATTAAGCACCCAATCTATTGGATATATAAATACGCGCGCCCCAACATGTGCGCCATATAGCCGTT  
TATTCCAACCCTTAGCTTTGTTAATTCTCAATATGCATTTGAAGTAATGTACTTTCATGCAACCA  
GGAATTCATTTTCCCCTCCAAAATAACCATAAGAATTTTCTATAGCACGTT

**Zm\_SWEET15a**  
**GRMZM2G168365**

AAGAGCCCAAGAAGGCAGCTAGCTGAGAGCCTCCAGCTCAGGTAGTGAGCGAGCTCCTCTCTG  
**CCCTGGCCTCTTCTTCGTTT**ATTCTTGTCCACTCGAGGACTGCCCGTTTGACGACTGCTCGAT  
**CAGTGTGCTAGCTAGCTAGAGCAAGAGAAGGGCTGTAAGCGAGG**AGATCGATCGAGATGGCTT  
TCCTCAACATGGAGCAGCAGACCTGGGCCTTACCTTTGGTATCCTAGGTAACATAGTCTCACT  
GATGGTGTTCCTTACCGCTGCCGACGTTCTACCGCGTGTACCGCAACAAGTCGACGGAGGG  
GTTCCAGTCGACGCCGTACGTGGTACGCTCTTCAGCTGCATGCTGTGGATCTTGTACGCCCTG  
CTCAAGCCCGGCGCCGAGCTGCTGGTACCATCAACGGCGTGGGCTGCGTCGTCGAGACCGT  
GTACCTGGCCATGTACCTGGTGTACGCGCCCAAGGCCGCCCGGGTGTGCGCGCCAAGATGC  
TGCTGGGGCTCAACGTCGCCGTCTTCGGCCTCGTCGCGCTCGTCACCATGCTTCTCTCCGACG  
CCGGCCTCCGCGTGCACGTGCTCGGCTGGATCTGCGTCAGCGTCTCGCTCAGCGTCTTCGCCG  
CGCCGCTCAGCATAATGCGGCAGGTGATCCGGACCAAGAGCGTGGAGTTCATGCCTATCTCGC  
TCTCCTTCTTCTGCTGCTCAGCGCGGTGGTCTGGTTCGCGTACGGCGCGCTGAAGAAGGACG  
TGTTCTGTTGGGTTCCCAACGTGCTGGGCTTCGTTCTCGGCCCTCGCGCAGATGGCGCTGTACA  
TGCGGTACAGGAAGCCCAGCGCGCGCTGGTGTATAACCGGAGCAGTCCAAGGAGGAGGTG  
GCCGAGGGCAAGGCAAGCTGCGGCGGCCGAGGTGCACCCCATCGACATCGCGGAGGTCCA  
CGACCTGCAGACCGTGGTGTGACGCTAGACGTGGAGCCTGTCACCTACGCCGCTGCGTCCG  
GTATGGTGCACGGCAGTGTGGAAGGCCTAGGGCGCCGAGGAGCTGGTGTATCAAGCCCGAC  
ATGGTCAACCGTCATTGCGGCGGAGGCGTAGGTTGGTTAAGTAGTAGCAGAGTGAGTCGATATC  
GATCTGCCTACCTACAGTACAGCCGCGGCCAGATGTACTGGCAGCGTTCATGCAGGCTCG  
TTGACTTGACCGGTGAGATGGTTGGAGTAGCCGGGCCGAGTAGCCCAGACGTAAGGCTGT  
GTCATGAACCGGCAAGCTGATAACGCGAGCGAGAGGGACGTTGGTTCATCACATTCAGAAGAC

GGCAAGCTGATAGTTTCTGTCTCTAGGTCTCTCTGTGTGTGTGTGTCTGTAATCGACTCCATCAG  
CTTGCCGCCTTTCTGTCTATTCTGATTGTTTTATCCATTGATGCCGTCGTCGCAGTAATAAAC  
TTGGAACGAACGATTCCACACTA

**Zm\_SWEET17a**  
**GRMZM2G106462**

GTCGGCCTCAGGCTGCTTCAAATATGCATTTACAGCGGTCCCTGGTGTCTCTCTCCCGCTCAAG  
GGCAGTAGAGACAGCAGCTGAGCTGACTGGATCTCGATCTACCGCTTTGCTTCCGTTTTGAGCC  
GCCAGCTGTGTGGCCTCCTGTCTGTCTGCCTATCTTGAACCTCCATGGATTCCACACTCTTCATC  
ATCGGCGTCATAGGCAACATCATCTCAGTTCTGGTCTTCATTTCTCCCATCAAGACGTTCTGGAG  
GATCGTGCGGAGCGGGTTCGACGGAGGAGTTCGAGCCGGCGCCGTACGTGTTACGCTGCTCA  
ACGCGCTGCTGTGGCTCTACTACGGCGCCACCAAGCCTGACGGGCTCCTCGTTGCCACCGTCA  
ATGGCTTTGGGGCTGCCATGGAGGCCATCTACGTCTCCTCTTCATCGTCTACGCCGCCAATCA  
**TGCCACAAGGGTTAAGACGGCGAAGCTGGCAGCAGCGTTGGACATCGGTGGCTTTGGAGTAG**  
**TGTTTGTGGCCACCACGTTCCGCATTAACGAATTAACATGAGAATCATGGTGATAGGGATGATA**  
**TGTGCCTGCCTCAACGTAATCATGTACGGGTCAACCCCTTGCTGCCATGAAAACGGTGATCACC**  
**CAAGAGCGTGGAGTTCATGCCGTTCTTCCTATCC**TTCTTCTCTTCTCAACGGAGGCATCTG  
GGCAACGTACGCGGTGCTTGACCGAGACATCTTCTTGGGATCCCCAATGGGATAGGCTTCATC  
CTCGGCACCATCCAGCTGATCATCTACGCGATCTACATGAACAGCAAGGTCTCCCAAAGCAGCA  
AAGAAATAGCGTCGCCTCTTCTAGCCTCTAGCCAGGAAGAAGCAGCTAGCCATGTCTGATGATG  
TTCGTCAGTGTGCTGGAGTTTTGTAGCAGTCCAAGCCAACGGTGAACACCTACCAATGCAAGAG  
ATTATCGATTTTCATTTTTAAGGAATGTAAAGTCTATATTTTTTATGAATATATATTTTTATATATAC  
CTTGAAATGCTCACGTCGATTTTGTTACGTTTTAGTGCCTCTTTTGGTACAACCTCATTAAATAAA  
GCAATCTGGGCAAATCTGGATTGAAATTTA

**Anexo 4.** Secuencias de nucleótidos de los posibles SWEETs de raíces de maíz. Secuencias de los cinco posibles SWEET2, 3, 12a, 12b y 14a de expresión en raíz.

**Zm\_SWEET2**

**GRMZM2G324903\_T01**

CCGAGAAGGAAAGCGCGAATTAAGCAGCACGGGCAACACGCCGAGCAAAACAGCGAAATCCT  
CAAATCCCACCCCGGCTGGTGACGGCGCCGCCCGCTGCTGCCTGCGGTCTGCTTCTGCT  
AATAGTAATAGGTATTCAGATTCGAGCAGAGCACTCCCGTGCTGCAGGCAAGGGAGGACGCAC  
CACCATGGATTGGGATGCTCCGGCATTGACGAGCTTCGTGCGCGACTTGTCCTTCCGCCACCTC  
TGCTGCTACGGGGCCGGAATCGCAGGGAACGCCTTCGCCTTCGTGCTCTTCGTCTCCCGCTC  
CCCACATTCAAGAGGATCGTCCGCAACGGATCCACGGAGCAGTTCTCGTGCACGCCGTACATCT  
ACTCGCTGCTCAACTGCCTCATCTGCATGTGGTACGGCCTCCCTTCGTCTCCTACGGCGTCGT  
CCTCGTCGCCACCGTCAACTCCATCGGCGCCGTGTTCCAGCTCGCCTACACCGCCGTGTTTCAT  
CGCCTTCGCCGACGCCAAGCAGAGGCTCAAGGTCTCTGCTCTCCTGGCCGCTGTCTTCTGGT  
GTTCCGACTGATTGTGTTTGTAGTCTGGCTTTGTTGGATCACAAAGCCCGGCAGGTGTTTCGTC  
GGATATCTCAGCGTCGCGTCCCTCGTATGCATGTTCCGCTCCCCATGTCAATCGTCAATCTGG  
TCATCCGGACGAAGAGCGTGAATACATGCCCTTCTACTTGTCAATATCCATGTTTCTGATGAGT  
GCATCCTTCGTATATACGGAGTGTGCTTGGTATGGCTTCATATATATTCCAAATGGCATTGG  
AACCATATTGGGTATCGTACAGTTGCTGCTGTATGCCTACATCAGAAAGGGATCAAGCGAGGAA  
GCCAAGCTGCCCTTACTAATCACACATACATGAGCATGCCAAAAGGGAAAAAAAACAAGGTTCCG  
CTGATAGGCTTCCCGAAATCCTGTCTCTGGTCAAACCTTCAGGTGATGTACTTGT**CCGAATTG**  
**TTTTGCTCCTGTGAAAAAGCATGCCGTTCTTTCGTTTTGTTACACGCGACGGGGATCGTAGTT**  
**TCGCTGTATATTCCATGGTAGATGCTCCAAGTTGTTGCTGGAGTCATTGTTTATGAGTGAGCGA**  
**AGCTTTGTATATAATATAGTAGTAGTAATGTGGTTCCGTGAACCTTCATCA**ACAGAGAGGACCAGC  
TGTATACACAAAGAAAAGCAATAAAAGGATGTTACTATATCATTATCAATAAAATAAAGTTTTGTTTC  
GCCATATT

**Zm\_SWEET3b**

**GRMZM2G060974**

TCGAGAATGGTTCAGATACAGTTCGTGTAGCAGTAGGAATCCTAGGAAATGCTGCTTCCATGC  
TCCTCTACACAACCCCTATACTGACGTTTCAGATGGGTGATAAGGAAGGGCAACGTGGAGGAATT  
CTCCTGCGTGCCAT**TACATCCTAGCGCTGCTCAACTGCCTGCTGTACACCTGGTACGGCCTCCC**  
**GGTGGTGAGCTCCGGGTGGGAGAACCTGCCCGTGGCCACCATCAACGGCCTGGGCATCCTGC**  
**TCGAGGTCGCCTTCATCGCCATACCTACGGTTCGCACCGGCGGAGAAGAAGAGGTTTGCTT**  
**TGCA**GCTGGTGTTCCTGCCCTGGCGCTGTTCCGCGCTGACGGCGGCCTTGTGAGCTTCGCGG  
CGCGCACGCACCGCTCGCGCAAGGCGTTCGTGGGCAGCGTCGGGCTGGTGGCTTCCGTGTCC  
ATGTACACCTCTCCAATGGTGGCCGCTAAGCGAGTCATCGCGACGAAGAGCGTGGAGTTCATG  
CCGTTCTCCCTCTCGCTCTTCTCCTTCCGTGTCAGCGCGCTCTGGATGGCGTACGGGCTGCTCG  
GCAGGGACCTCTTCATCGCGTCGCCGAACCTTCATCGGCGTCCCGGTGGGCGTCTTCAGCTGC  
TGCTGTACTGCATCTACAGGAGAGACCACGGGGCGGCAGCCGGTGCAGAGGCGCAAGCGCAT  
GGCCCTGCCGCGCCGCCGATCAGGAGAAGGGCATGAAGGCAGCGGCGCCGGTGGCCGTGC  
AGCCGCAGGAGAATCCCTTGTGCGTTGTGTCAGTCTGTGAAGTGAATGTTTCGTTATCTCCATCT  
GCGGCCAAAGCCCAACACCGAAGTGGACTCTCCAAGTGAATGAAATTGAAGGCTTGGCTCTTG  
GGCTGTACGGCCACATAGCAGCGACCCAACTGTTGAGAACTACGTATACGGATCAGCAGATCCA  
CTTATGGCGTGGTTGTTTATGAAGTCACTCTATACTTCATGA

**Zm\_SWEET12a**  
**GRMZM2G133322**

GGCGTGTGCGCAGTAGAGTGTGGCCTGAACTAGCGAAACAACAAGCTAGCTAGACAGGC  
GGCCCTGCTGCTTAGCTCTCGATCCTGTTGTTAGGCACCTATTGAGAGAGCTAGCTGAGCATT  
CAAGATGATTACTGTTGGGCACCCGGTGGTGTGGTGTGGGGATCCTAGGCAACATCTTATCA  
**TTCTTGGTCACCCTTGACCAGTGCCGACGTTCTACCGTGTTACAAGAAGAAGTCGACGGAGT**  
**CGTTCCAGTCGGTGCCGTACGTGGTGGCTCTGCTGAGCGCAATGCTGTGGCTCTACTACGCGC**  
**TGCTCAGCGTGGACCTCCTCCTCCTCCTCCATCAACACC**ATCGCCTGCGTCGTCGAGTCCGTCTA  
CCTCGCCATCTACCTCACCTACGCGCCCAAGCCCGCGATGGCTTTCACCCTCAAGCTGCTCTGC  
ACCATGAACATGGGGCTCTTCGGGGCCATGGTCGCCCTTCTGCAGTTCTACGTGACGGGCAG  
CGCCGCGTCTCCATCGCCGGCGGCGTGGCTCCGCCCTTCGCCCTTCGCCGTCTTCGTCGCTCCT  
CTCACCATCATCCGGCAAGTGATCAGGACCAAGAGCGTGGAGTTCATGCCCTTCTGGCTCTCCT  
TCTTCCTCACCGTCAGCGCCGTTGCCTGGTCTTCTACGGCCTCCTCATGAAAGATTTCTTCGTC  
GCGATGCCGAACGTGCTGGGCCTGCTGTTCCGCCCTGGCCAGATGGCCCTCTACTTCGTGTAC  
CGGAACCGGAACCCAAAGAAGAACGGCGCCGTGTCCGAGATGCAGCAGGCAGCGGCGGTGCA  
GGCCGACGCCGAGAAGGAGCAGCAGCTGCGGCAGGCCGACGCCGATGCCGACGCCGACGGG  
AAGGCTGCGACAACCGACGACGACGGGGGCCAGACCGCCGTCGTCGTCGACATCATGCCGCC  
ACCGCCACTGCTGCCAGCGGAGAGGGCCCCGCCGCTGCCGCTGCCCCGCATCCGGCGATGG  
TGATGACGACCGCGCATCAGACGGCCGTGGAGGTGGTCTGATCTATACATCGGCAGAGATTGA  
TCGATCGACACACACGCATGTTCCGGAGCTAGCTACATGCACGACTGACCTGACTATGATTGCT  
GCTCGATCATTACTTTACTTTGTGCTACTAGTATATGTATGCGTGTGGACGACCTATATGTGTAT  
CGCGCGCGGCACCACGGTACAAGTAGACGCGTATAGCTATAGTATATATAGAAGTAAGTACT  
GTACGTACGAATGAATGTCTCCTGTGGTGCCATATATGCGTATGTGTACTGTAAGGTCGTGTTA  
TCTCTTCTACCTATACACGTCTGTATCTTATGCCTGTTGCCTACATGCGCCTCTATCGTTCAACT

**Zm\_SWEET12b**  
**GRMZM2G099609**

ATGATCACTGTTGGGCACCCGGTGGCCTTTGCTGTGGGGATCCTAGGAAACATCCTGTCATTCC  
TGGTCATCCTTGACCAGTGCCGACGTTCTACCGCGTGTACGCGAAGAAGTCGACGGAGTCGT  
TCCAGTCGGTGCCGTACGTGGTGGCGCTGCTGAGCGCGACGCTGTGGCTCTACTACGCGCTGC  
TGAGCACGGACCTCC**TCCTCCTCCTCCATCAACACC**CGTCGCCTGCGTCGCCGAGTCCGTCTACC  
**TGCCCGTCTACCTCGCCTACGCGCCCGGGCCCGCAAGGCGTTCACGCTCAAGCTGCTGTGC**  
**GCCATCAACATGGGGCTCTTCGGCGCCATGGTCGCCCTTCTGCAGTTCTACGTGCTCGACA**CG  
CAGCGCCGCGTCTCCATCGCCGGCGGCGTGGCGCCGCCCTTCGCGCTCGCCGTCTTCGTCGC  
TCCTCTCGCCATCATCCGGCGAGTGATGAGAACCAAGAGCGTGGAGTTCATGCCCTTCTGGCTG  
TCCTTCTCCTCACCGTCAGCGCCGTTGTCTGGTCTTCTACGGCCTCCTCATCAAAGATTTCTT  
CGTCGCGATGCCGAACGTGCTGGGCCTGCTGTTCCGCCCTGGCCAGATGTTCTCTTCTTCGT  
GTACCGGAACCGGAACCCCAAGAAGAACGGCGCCGTGTCCGAGATGCAGCAGGCAGCGGCGGTGC  
AGGCCGACGCCGAGAAGGAGCGGCGGTCCCACGCCAACGCCGACGGGGAGGCCGACGTGAG  
AACCGTCATCGTCGACATCATGCCGCCGCCCTCCCGCGATGATGAGACACGCTGACAGAGAGGC  
GCGCGGCGGCGCGGGGACAGGGAGACGCGCGGCGGCGCGAGAACAGGGAGGCGCTCGGCG  
GCGCGAGGACAGGGAGGCGCTCGGCGGCGGTGGGATTTAGGGGAGGAGCATCGAGGAGGCG  
GCGGCGGCGCGGGGAAAGGGATGCGCGCGGCGGCGGCGGGGGGCTAGGAGGCGCGCGAAA  
ACGCCTGGGTGCTCGGCGGCG

Zm\_SWEET14b  
GRMZM2G015976

ACCATCAAGCTTTCAGGCAGGGCAAGCAACTCGAGTAGTAGTTGCCAGCCACACCTCCTGTCTT  
CCTTTTTCCTTCTCGCATTGTGGAGGAGAAGGATCAAGTGCTCATAAGCAAGCTAGCTTGACGAA  
GTATAGGAAATTAGGAATACAAATAAACTCATCCTCCTCATATATAAACGCTCGATCTCCAGATAT  
GGCCGGCCTGTCCCTGCTGCATCCCATGGCCTTCGCCTTCGGCCTCCTCGGCAACATCATCTC  
CTTCATGACCTACCTGGCCCCACTGCCGACGTTCTACCGGATCTACAAGAACAAGTCGACGGAG  
GGTTCCAGTCGGTGCCGTACGTGGTGGCCCTTTCAGCGCCATGCTGT**GGATCTACTACGGC**  
**CTGCTCAAGTCCAACGAGCTCCTGCTCATCACCATCAACTCCGCCGGCTGCGTCATCGAGACCC**  
**TCTACATCGCCATGTACCTCCTCTACGCGCCCAAGAAGGCAAAGCTGTT**ACGGCCAAGATCC  
TCCTCCTCCTCAACGTGGGCGTGTTCCGGGTCATCCTCCTCCTCACGCTGCTGCTCTCCGCCG  
GACAGCGCCGCGTCGTCGTCCTCGGCTGGGTCTGCGTCGCCTTCTCCGTTAGCGTCTTCGTCG  
CGCCGCTCAGCATCATCCGCCAGGTGGTGAGGACAAGGAGCGTCGAGTTCATGCCCTTCTCGC  
TCTCCCTCTCCCTCACCGTCAGCGCCGTCGTCTGGTTCCTCTACGGCCTCCTCATCAAGGACAA  
ATACGTCGCTCTGCCAAACGTCATCGGCTTCAGCTTCGGCGTGGTCCAGATGGGTCTCTACGCG  
CTCTACCGCAACGCGACGCCCAGGGTGCTGCCAAGGACGTGGCCGACGACGCCAGCAAGGA  
CAAGGCGCCCGGCGAACATGTGGTGGTCAACATTGCCAAGCTGACCGCGGCGACGACGGCAC  
CTGCAGCTGCCGTGGCGGAGGATCTTGTCAAGGTCCACGACGGCCACCCGGAGGAAGCAGCC  
AAGGGCGCCGCAAGCCGGCGGAGAACGGCGCGGGACGCAGCGACGCCGAGCAAGTCTAGA  
TTCCTCGCTCGATCAGATCAGAATTCATGAAGAAGAACATGCGTATGTATGTGTATCCGGTAGGT  
CGTAACATAACATAAATTAAGTGCGCATGCAGTTTGGCAACTCATGTTGTTTCATTCGTTCTCGC  
GCAATATGCGCATGTATTAATTTTAGATTGTCATTGTTGTAGTTCTTGCCTCCGATTATTATTAGT  
GTGTCCGTCACCTTCCATGTAATAACAAAAAATATATATAAATGGTCCTATTAAGCAAAAGCT  
AAAGTTCGTTTTTATGCCAAA

**Anexo 5.** Secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los transportadores SWEETs que fueron diseñados por Palacios Vargas, 2016 y por Delgado-Rubio.

Número de acceso EnsemblePlants	Nombre propuesto comparado con arroz	Datos de expresión (MaizeGDB)	secuencia de oligo nucleótidos	Peso Esperado
GRMZM2G153358_P01	Zm_SWEET1b	Coleóptilo, hoja madura	F5'tccataagcgcaagcagaca-3' R5'cagaacgtaggactgggg-3'	144
GRMZM2G324903	Zm_SWEET2	Raíz primaria	F5'-aggctcaaggctctgtctct-3' R5'tgacgattgacatgggggac-3'	163
GRMZM2G060974	Zm_SWEET3	Raíz primaria	F5'-caggagaatcccttgctgct-3' R5'-aacagttgggtcgtctat-3'	158
GRMZM2G000812	Zm_SWEET4a	Hoja de planta madura	F5'-gcctcccttggtagatggc-3' R5'aggaaggctggagcatgaaa-3'	70
GRMZM5G872141_P04	Zm_SWEET11b	NO DETERMINADO	<u>NO SE DISEÑARON OLIGONUCLEOTIDOS</u>	
GRMZM2G133322	Zm_SWEET12a	Raíz primaria	F5'-catgcacgactgacctgact-3' R5'-atatgggcaccacaggagac-3'	195
GRMZM2G099609	Zm_SWEET12b	Raíz primaria	F5'-gcatgatgagacacgctga-3' R5'-cctcgtgctctcccctaa-3'	145
GRMZM2G173669	Zm_SWEET13a	Hojas	F5'-cgagaccatctacgtcgtca-3' R5'-tgagacgagtgatccagacg-3'	232
GRMZM2G021706	Zm_SWEET13b	Hojas	F5'-aggaaggctggagcatgaaa-3' R5'-ccgttgacgactgctcgtat-3'	361
GRMZM2G015976	Zm_SWEET14b	Raíz primaria	F5'-gccatgtacctcctctacgc -3' R5'- tgaactcgacgctcctgtc -3'	232
GRMZM2G168365	Zm_SWEET15a	Base de las hojas y espiga	F5'-ccgttgacgactgctcgtat-3' R5'-ccggtacacctgccgattat-3'	107
GRMZM2G106462	Zm_SWEET16	Coleóptilo	F5'-tctaccgcttgcttccgtt-3' R5'-gcctatgacgccgagatga-3'	222
GRMZM2G107597	NO EXISTE	Semilla	<u>NO SE DISEÑARON OLIGONUCLEÓTIDOS</u>	
GRMZM2G179679	NO ES SWEET	Hoja de planta madura	<u>NO SE DISEÑARON OLIGONUCLEÓTIDOS</u>	