



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN, CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS
TRANSPORTADORES SWEET DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. EN C. MONTSERRAT LÓPEZ CORIA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. AURORA LARA NÚÑEZ

Facultad de Química

DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Agosto, 2020



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.

CGEP/PMDCBQ/513/20220

López Coria Montserrat
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 10 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Identificación, clonación y caracterización funcional de transportadores SWEET durante la germinación del maíz**", dirigida por el/la Dr(a). **Sánchez Nieto Sobeida**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	González Halphen Diego
VOCAL	Pérez Martínez Xochitl
VOCAL	Bernal Lugo Irma
VOCAL	Vázquez Santana Sonia
SECRETARIO	Plasencia de la Parra Francisco Javier

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de febrero de 2020



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
COORDINADORA

Agradecimientos

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece al comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto Facultad de Química, UNAM.

Dra. Aurora Lara Núñez Facultad de Química, UNAM.

Dr. Antonio Peña Díaz Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El proyecto fue apoyado por el financiamiento de DGAPA-PAPIIT (IN217214, IN225220) y PAIP (50009125).

Se agradece el financiamiento dado por el Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos y cursos:

2019. Curso Gene editing with CRISPR. Maryland, E.U.

2018. Congreso PanAmerican Plant Membrane Biology Workshop. Vancouver, Canadá.

2017 XX Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Puebla, México.

Así mismo, se agradece al CONACYT por la beca recibida durante los estudios de Doctorado número 429315.

Especiales agradecimientos al apoyo técnico de la M. en C. Beatriz King Díaz.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción	4
Germinación.....	4
Metabolismo de reservas energéticas durante la germinación del embrión.	8
Transporte de azúcares.....	12
Transportadores SWEET.	17
Relevancia fisiológica de los SWEETs.....	18
Hipótesis	27
Objetivo general.....	28
Objetivos particulares	28
Materiales y métodos.	28
Material vegetal.	28
Consumo de agua y oxígeno para la determinación de las fases de germinación.	28
Determinación de lípidos totales.....	29
Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.....	30
Cuantificación del contenido de almidón.	32

Determinación de la actividad de toma de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz.	32
Determinación de la expresión de SWEETs mediante RT-PCR.	35
Extracción de RNA total.	35
Cuantificación y calibración del RNA total.	36
Síntesis de cDNA.	37
Determinación de la expresión de <i>ZmSWEETs</i> y α -amilasa mediante RT-PCR.	38
Análisis de la expresión de <i>ZmSWEETs</i> , <i>Malato sintasa (MS)</i> , <i>Sacarosa fosfato sintasa (SPS)</i> y del <i>Transportador de sacarosa 1 (SUT1)</i> en escutelo y eje embrionario mediante RT-qPCR.	40
Clonación de <i>ZmSWEET4c</i> , <i>6b</i> , <i>11</i> , <i>14b</i> y <i>AtSWEET12</i>	45
Resultados	59
Determinación de las fases de germinación.	59
Durante la germinación, hay una interconversión de las reservas metabólicas por azúcares solubles.	60
La degradación de lípidos principalmente ocurre en el escutelo.	61
Durante la germinación aumentó la expresión de sacarosa fosfato sintasa SPS, enzima clave en la síntesis de sacarosa y de SUT1, el principal transportador de sacarosa en maíz.	63
El contenido de azúcares solubles cambia durante la germinación.	65
El almidón presente en los tejidos embrionarios no es la principal fuente de azúcares durante la germinación.	66
El transporte de azúcares durante la germinación en los tejidos embrionarios es principalmente difusional.	67

Diferentes SWEETs se expresan en el eje embrionario y el escutelo durante la germinación.	69
Caracterización funcional de los transportadores SWEETs expresados durante la germinación.	60
Clonación de SWEET4c, 6b, 11 y 14b y análisis <i>in silico</i> de las secuencias clonadas.	60
ZmSWEET4c, 6b, 11 y 14b se localizan en la membrana plasmática.	62
El ZmSWEET6b transporta glucosa y los ZmSWEET11 y 14b sacarosa.....	63
Discusión.....	82
Relación de las etapas de hidratación de la semilla con su metabolismo de carbono.	82
La disminución de lípidos en los tejidos embrionarios podría estar relacionada con la síntesis de carbohidratos.....	84
Contenido y movilización de carbohidratos solubles y almidón durante la germinación.	85
Los tejidos embrionarios tienen capacidad de transportar azúcares de manera difusional.....	88
La abundancia de los transcritos de los ZmSWEETs es diferencial a lo largo de la germinación.	90
Los ZmSWEETs 6b, 11 y 14b se encuentran en la membrana plasmática y transportan el primero hexosas y los dos últimos sacarosa.	93
Los SWEETs en la germinación.	93
Conclusiones.....	100
Perspectivas.....	101
Bibliografía.....	102
Anexos	102

Anexo I. Preparación de soluciones.....	102
Anexo II. Secuencias de oligonucleótidos.....	103
Anexo III. Secuenciación en sentido y antisentido de las clonas obtenidas en los vectores pGEMT-easy y pDNOR221. (ENSM secuencia anotada en la base de datos EnsemblPants (Kersey et al., 2018).....	107
Anexo IV. Análisis in silico de estructura secundaria de proteínas predichas de los ZmSWEETs clonados.	120

Resumen

Durante la germinación es necesaria la coordinación entre el metabolismo y la actividad de transporte de biomoléculas. Los tejidos fuente de la semilla de maíz -endospermo y escutelo- proveen nutrientes como azúcares, necesarios para sostener el metabolismo, crecimiento y desarrollo del tejido demanda -eje embrionario- durante la germinación.

El transporte de azúcares en las plantas puede ocurrir mediante conexiones citoplasmáticas entre células o a través del apoplasto. En esta última vía, los transportadores de membrana pueden movilizar los azúcares por transporte activo o difusional. Los transportadores SWEETs son una familia de proteínas de membrana, formados por siete cruces transmembranales, que facilitan el transporte bidireccional a favor del gradiente de concentración de hexosas y sacarosa (Sac). La participación de los SWEETs ha sido reportada en diferentes procesos fisiológicos como el cargado del floema, el llenado de la semilla y la secreción de néctar, sin embargo, se desconoce cuál es su papel en la germinación. Ya que el eje embrionario carece de transportadores activos de Sac, el transporte difusional a través de los transportadores tipo SWEETs podría ser importante para la nutrición el eje embrionario. Los tejidos embrionarios mostraron capacidad para transportar ^{14}C -glucosa y ^{14}C -sacarosa de manera difusional, lo que representó más del 50 % del transporte total de azúcares tanto en el escutelo como en el eje embrionario durante la germinación.

Desde el inicio de la germinación el escutelo mostró una rápida degradación de sus lípidos, aunado al aumento en la transcripción de tres genes importantes en la síntesis y acumulación de azúcares como la malato sintasa (*MLS*, enzima clave en el ciclo del glioxilato), la sacarosa fosfato sintasa (*SPS*) y el simportador sacarosa/ H^+ (*SUT1*), sin embargo, el escutelo mostró una baja

acumulación de Sac y hexosas. Por otra parte, el eje embrionario sí tuvo un incremento transitorio en Sac y hexosas durante la germinación. Además, el almidón encontrado en el eje embrionario no representó ser la principal fuente de azúcares para el tejido, ya que el almidón comenzó a hidrolizarse después de que la radícula emergió de la semilla, lo que se considera como un evento post-germinativo.

Por lo anterior, se evaluó la expresión de los SWEET durante la germinación mediante PCR tiempo real. Se encontró que los *ZmSWEET4c*, 6b, 11, 13a, 13b y 14b fueron altamente expresados. Los únicos SWEETs de maíz que ya han sido caracterizados son los *ZmSWEET4c*, *ZmSWEET13a* y 13b, el primero es un transportador de glucosa (Glu) y los últimos son transportadores de Sac.

Los *ZmSWEET6b*, 11 y 14b se clonaron y caracterizaron funcionalmente. El *ZmSWEET4c* (transportador de Glu) y el *AtSWEET12* (transportador de Sac) fueron clonados como controles. Todos los SWEETs clonados fueron localizados en la membrana plasmática, con preferencias distintas por los azúcares, el *ZmSWEET6b* transportó Glu y los *ZmSWEET11* y *ZmSWEET14b* transportaron Sac.

Los resultados obtenidos demuestran que durante la germinación los tejidos embrionarios (eje y escutelo) son capaces de tomar los azúcares de manera activa y difusional, y expresan de manera diferencial a los transportadores de azúcares. Esta diferencia entre los niveles de expresión de los tejidos embrionarios podría estar relacionadas a la demanda de azúcares requeridos para el metabolismo en cada uno de los tejidos durante la germinación.

Abstract

In germination is needed a coordinated metabolism and transport activity of biomolecules. The source tissues of maize seeds -endosperm and scutellum- provides nutrients like sugars to support the metabolism, growth, and development of the sink tissue -embryo axis- during the germination.

The sugar transport in plants can be through cell cytoplasmatic connections or through the apoplast. In the apoplast way, the transporters located in the plasmatic membranes allow the mobilization of sugars by active or diffusional pathways. SWEETs transporters are a family of membrane protein, are formed by seven transmembrane helices that facilitate the bidirectional transport down the concentration gradient of hexoses and sucrose (Suc). The SWEETs participation has been reported in different physiological processes like phloem loading, seed filling, and nectar secretion, not in germination. Since the embryo axis lacks active transporters of Suc, the diffusional transport due to SWEETs transporters could be important for embryo axis nourishment. The embryo tissues show able to transport ^{14}C -Glu and ^{14}C -Suc. The diffusional transport contributes more than 50% of total sugar transport in the scutellum as in the embryo axis during germination.

In the scutellum at the beginning of germination was observed a fast lipid degradation, besides it was an increase in the transcription of three keys genes to the synthesis and accumulation of sugars: the malate synthase (*MLS* glyoxylate cycle key enzyme), the sucrose phosphate-synthase (*SPS*) and the sucrose/ H^+ symporter (*SUT1*). However, the scutellum has a low accumulation of Suc in scutellum, but the embryo axis has a transitory increase in Suc and hexose content. Furthermore, the embryo axis starch was not the main source of sugars, since the starch started to

hydrolyze after the radicle emergence from seeds, a physiological event considered as post-germinative.

Taking this into account, the expression of SWEETs transporters was evaluated using real-time PCR. ZmSWEET4c, 6b, 11, 13a, 13b, and 14b were highly expressed during germination. The only maize SWEETs already characterized are the ZmSWEET4c, ZmSWEET13a, and 13b characterized, ZmSWEET4c is a glucose (Glu) transporter and ZmSWEET13a, and 13b are Suc transporters.

The ZmSWEET6b, 11, and 14b transporters were cloned and characterized to determine the role of SWEETs in germination. The ZmSWEET4c (Glu transporter) and AtSWEET12 (Suc transporter) were also cloned and used as controls. All the SWEETs cloned were localized in the plasmatic membrane and show different sugar preferences. ZmSWEET6b transported Glu, and ZmSWEET11 and 14b transported Suc.

The results suggest that during germination, the embryo tissues were able to take up the sugars by diffusional transport, maybe throughout SWEETs. The differences founded between levels of SWEET expression could be related to the sugar demand for the metabolism in the scutellum and the embryo axis during germination.

Introducción

Los azúcares solubles son la principal fuente de energía y de esqueletos de carbono para todos los organismos (Feng y Frommer, 2015). En las plantas, el disacárido Sac es el principal carbohidrato transportado desde los sitios de síntesis, los tejidos fuente como las hojas, hasta los tejidos de escasa o nula producción de carbohidratos, llamados tejidos demanda como las raíces y los frutos (Heldt y Heldt, 2005). En las semillas de los cereales existen dos tejidos fuente, el endospermo y el escutelo que nutrirán en momentos diferentes de la germinación al tejido demanda que es el eje embrionario, éste se desarrollará en la nueva planta (Figura 1).

El escutelo y el eje embrionario forman al embrión, que es capaz de formar una plántula sin necesitar la presencia del endospermo, ni una fuente externa de carbohidratos cuando se incuba en agar al 1% (Sánchez-Linares et al., 2012). Lo anterior indica que en el escutelo y en el eje embrionario hay suficientes reservas de nutrientes, actividad metabólica y de transporte para el desarrollo y transición de una planta autótrofa. Las reservas localizadas en el endospermo son utilizadas para el desarrollo de la plántula después de que el proceso de germinación termina.

Germinación.

La germinación es un proceso que comienza con la rehidratación de la semilla quiescente y termina con la protrusión de la radícula (Bewley y Black, 1994). Depende de varios factores ambientales como los niveles de humedad, luz y temperatura (Holdsworth et al., 1999). Asimismo, es regulado por fitohormonas como el ácido giberélico, el ácido abscísico, etileno y auxinas (Han y Yang, 2015).

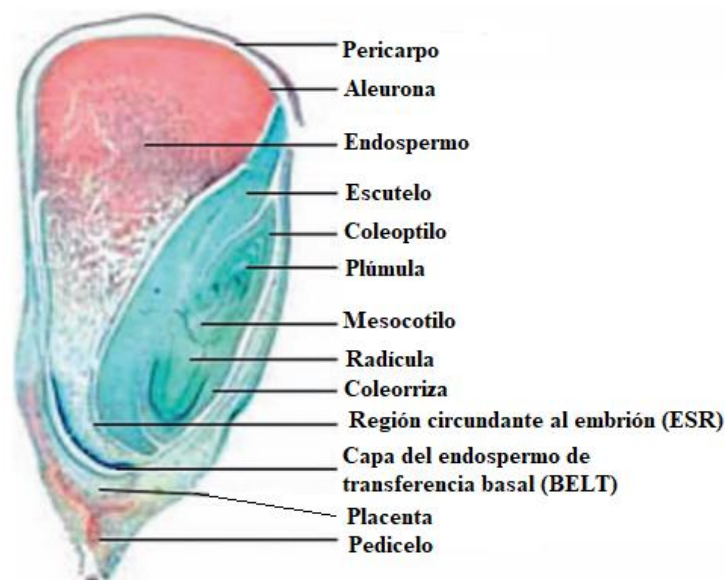


Figura 1. Corte sagital de una semilla de maíz. Se observan los tejidos que conforman al eje embrionario (coleóptilo, plúmula, mesocotilo, radícula y coleorriza), así como los tejidos que forman el embrión (eje embrionario y escutelo).

Tomado y modificado de (Scanlon y Takacs, 2009)

Los aspectos moleculares de la germinación han sido estudiados abundantemente en la planta dicotiledónea *Arabidopsis*, cuyas semillas poseen una estructura completamente diferente y un fondo genético distinto al de los cereales como el maíz y el trigo, plantas monocotiledóneas que en sus semillas almacenan mayor cantidad de almidón (Han y Yang, 2015).

Generalmente, la germinación de las semillas ocurre en tres fases marcadas por la toma de agua (Figura 2). La fase I también llamada de imbibición, se caracteriza por una rápida toma de agua debido a que las semillas secas tienen muy bajo potencial hídrico (Weitbrecht et al., 2011). La hidratación de los componentes de la semilla promueve el metabolismo y el transporte de solutos

y metabolitos, así como la disminución en la concentración de inhibidores de la germinación (Matilla et al., 2005; Han y Yang, 2015). El proceso de deshidratación durante la maduración de la semilla y la posterior hidratación en la germinación genera daños estructurales en las paredes celulares, organelos y en el DNA, los cuales deben ser rápidamente reparados desde las primeras horas de hidratación.

En la fase estacionaria o fase II, la absorción de agua se mantiene constante y es dirigida por el potencial osmótico y de presión (Taylor, 2020), también el consumo de oxígeno se mantiene constante lo que puede deberse a la impermeabilidad relativa de la testa de las semillas a la difusión del oxígeno (Mayer & Polijakoff-Mayber, 1982). La duración de la fase II puede ser muy variable entre especies (Weitbrecht et al., 2011) y es en ésta donde se presenta la mayor actividad metabólica, aumento en la expresión de genes y en los mecanismos de reparación del DNA (Han y Yang, 2015). De acuerdo con Rajjou et al. (2006) la síntesis *de novo* de proteínas ocurre durante esta fase en semillas de *Arabidopsis*. En maíz, dentro de las primeras proteínas en ser transcritas están las ribosomales (Beltrán-Peña et al., 1995). La transcripción en los tejidos con pocas horas de imbibición es posible ya que todos los componentes de la maquinaria de transcripción están almacenados en las semillas secas y son rápidamente activados debido a la imbibición (Kimura y Nambara, 2010).

Al final de la fase II, la testa de las semillas se rompe, sin embargo aún no se conoce claramente el papel del embrión, endospermo y capas de tegumentos en la ruptura de la testa (Weitbrecht et al., 2011) que comienza cerca del micrópilo en especies como tabaco y *Arabidopsis* (Leubner-Metzger, 2002).

La fase III es propiamente una etapa postgerminativa pues inicia cuando la radícula emerge de la semilla y las reservas acumuladas en el endospermo se hidrolizan (Weitbrecht et al., 2011; Sánchez-Linares et al., 2012; Han y Yang, 2015). La toma de agua aumenta en esta fase debido a la disminución del potencial osmótico, ya que las reservas se degradan en moléculas más pequeñas osmóticamente activas (Taylor, 2020). En esta fase la semilla se convierte en una plántula.

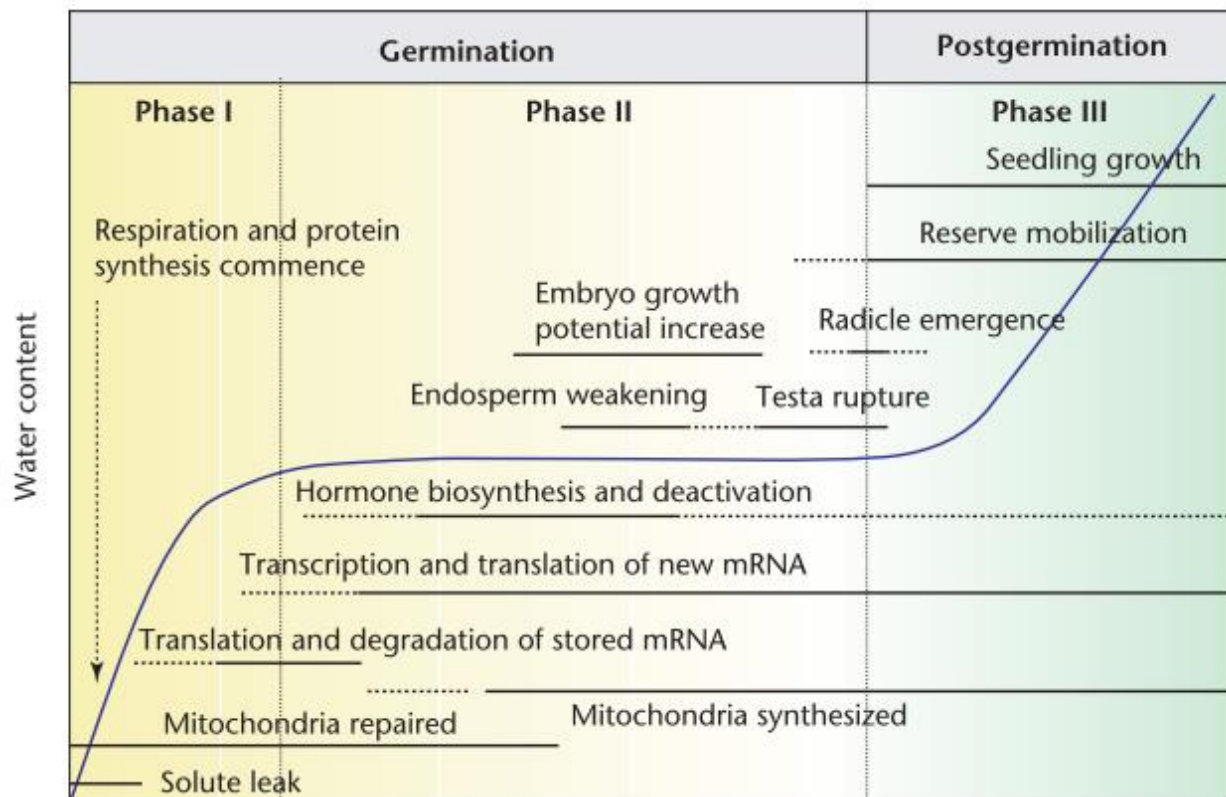


Figura 2. Procesos claves durante la germinación de una semilla y en el subsecuente desarrollo postgerminativo.

Tomado de Nonogaki (2008).

Metabolismo de reservas energéticas durante la germinación del embrión.

La actividad metabólica de los tejidos embrionarios se sostiene con las reservas de carbono presentes antes de la emergencia de la radícula. El escutelo, que es equivalente al cotiledón en los cereales, es la principal reserva de lípidos y proteínas. Durante las primeras horas de germinación del maíz, la cantidad de lípidos presentes en el escutelo disminuye (Sánchez-Linares et al., 2012) y se sabe que la hidrólisis de los triacilgliceroles precede a la movilización de las reservas de carbohidratos presentes en el endospermo (Oaks y Beevers, 1964).

Durante la germinación, en el escutelo ocurre la degradación de los lípidos almacenados en los glioxisomas, liberando ácidos grasos que son sujetos a la β -oxidación para obtener acetyl-CoA. La acetyl-CoA es sustrato de dos enzimas del ciclo del glioxilato, la citrato-sintasa y la malato-sintasa, y como productos del ciclo se obtienen al citrato y succinato. Ambos compuestos pueden ser sustratos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria. Entonces el carbono proveniente del glioxisoma (citrato) o de la mitocondria (malato) puede tener diferentes destinos: 1) permanecer en la mitocondria o ser convertidos a oxalacetato en el citoplasma, el cuál será metabolizado por la vía gluconeogénica para producir azúcares, 2) por transaminación producir alanina, 3) ser exportados al apoplasto (Ma et al., 2016; Penfield et al., 2006) (Figura 3).

Existen datos contradictorios sobre la cantidad de azúcares que se obtienen a partir del ciclo del glioxilato en la germinación del maíz. Se ha utilizado el acetato marcado radiactivamente (^{14}C -acetato) el cual es convertido a ^{14}C -acetyl-CoA para trazar la síntesis de azúcares en las semillas. En un estudio clásico se reportó que el 60% del ^{14}C fue recuperado como Glu en el escutelo (Oaks y Beevers, 1964). Sin embargo, también se ha reportado que sólo una cantidad pequeña del acetato

exógeno es utilizado para la síntesis de carbohidratos, la mayor proporción se detectó en aminoácidos y ácidos orgánicos (Igamberdiev y Rodionova, 1991). Estos datos indican que el ciclo del glioxilato en cereales podría ser la fuente de sustratos para la síntesis de aminoácidos y acidificación del endospermo a través de los ácidos orgánicos que resulta en la reducción de pH necesaria para la hidrólisis del almidón en el endospermo y la relajación de las paredes celulares (Ma et al., 2016).

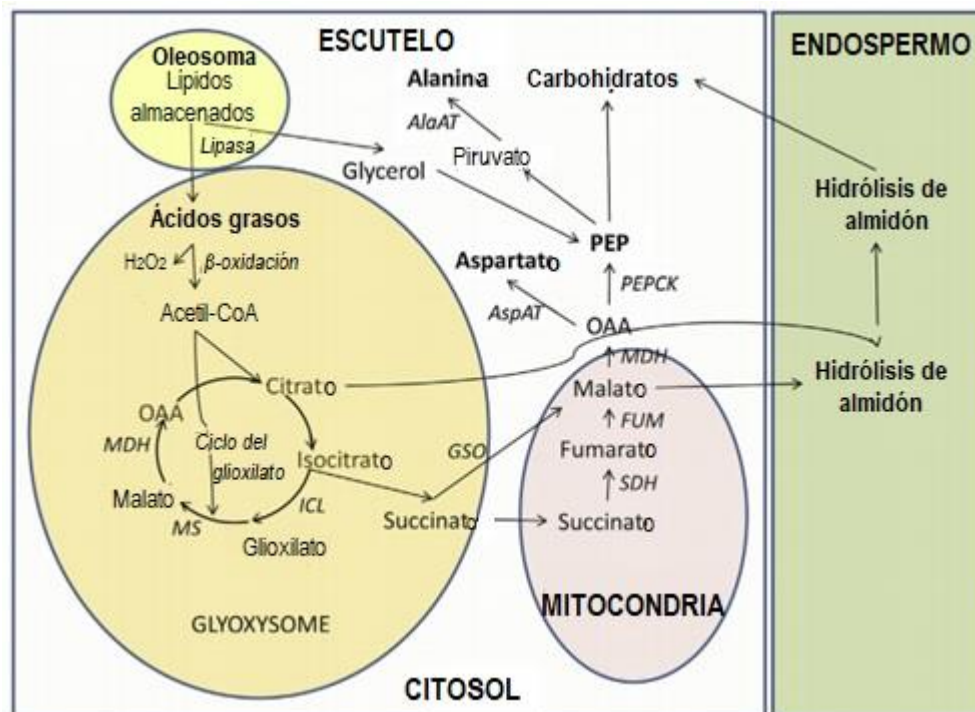


Figura 3. Esquema del proceso metabólico en semillas de cebada durante la germinación. AlaAT, alanina aminotransferasa; AspAT, aspartato aminotransferasa; FUM, fumarasa; GSO, glioxisomal succinato oxidasa putativa; ICL, isocitrato liasa; MDH, malato deshidrogenasa; MS, malato sintasa; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxicinasas; SDH, succinato deshidrogenasa. Tomado de Ma et al., 2016.

Además de lípidos, el embrión del maíz contiene azúcares. Se ha reportado que en el embrión seco de la variedad Chalqueño, el principal tipo de azúcar soluble es la Sac y que el escutelo contiene cerca de 10 veces más Sac que el eje embrionario (Figura 4A y 4B. Sánchez-Linares et al., 2012). La Sac endógena, tanto del eje embrionario como del escutelo son metabolizados durante la germinación y sus niveles se reducen en las primeras horas.

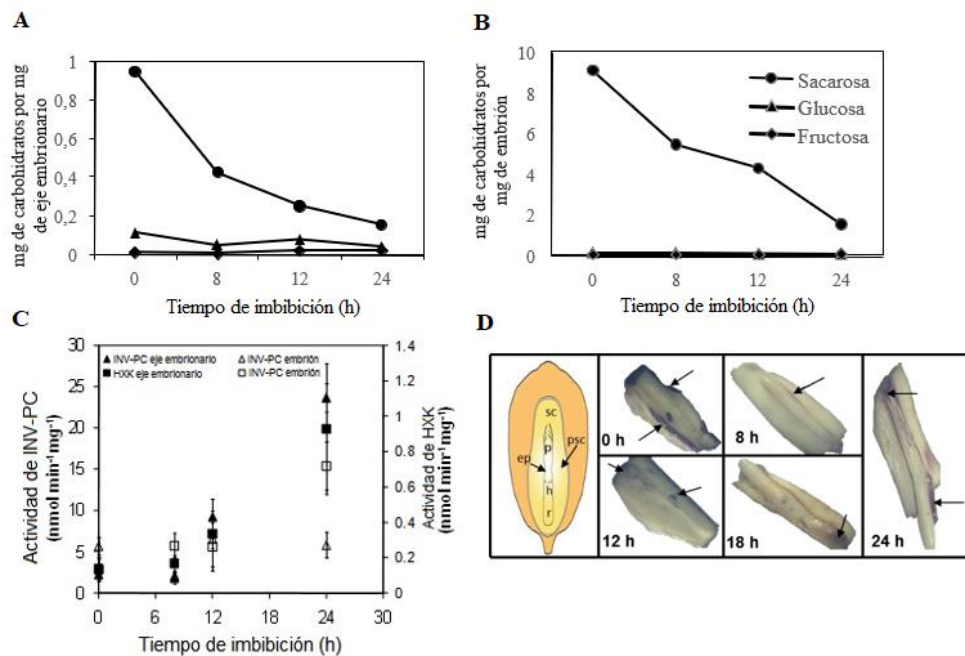


Figura 4. Metabolismo y localización de carbohidratos en tejidos embrionarios durante la germinación del maíz. A) Contenido de carbohidratos en el eje embrionario y B) en el embrión de maíz a diferentes tiempos de incubación. Gráficas construidas a partir de datos de Sánchez-Linares et al. (2012). C) Actividad de invertasa de la pared celular (INV-PC) y de hexocinasa (HXK) en el eje embrionario y el embrión. D) Localización de Sac en embriones de maíz a diferentes tiempos de imbibición en agar 1%. La localización de Sac se hizo mediante un ensayo enzimático con la consecuente reducción del nitroazul de tetrazolio. Se muestra un esquema de la semilla de maíz donde se señalan los tejidos: sc, escutelo; p, región de la plúmula; psc, células del parénquima escutelar; ep, epiblasto; h, hipocotilo; r, región de la radícula. Regiones donde se acumula Sac en el embrión a tiempos de imbibición diferentes están marcadas con flechas. Tomado de Sánchez-Linares et al. (2012).

Los azúcares son usados probablemente en el eje embrionario para sostener el metabolismo previo a la emergencia de la radícula, mientras que es posible que en el escutelo la Sac sea utilizada tanto para su metabolismo como para su exportación. La propuesta anterior es apoyada por las siguientes observaciones: 1) el escutelo tiene la capacidad de sintetizar Sac a partir de lípidos o de la glucosa que le llega del endospermo (tejido fuente); 2) el eje embrionario carece de la capacidad de sintetizar Sac; 3) el escutelo es un tejido que sintetiza enzimas y nutrientes. Por ello, la exportación de Sac desde el escutelo hacia el eje embrionario sería necesaria (Sánchez-Linares et al., 2012), el decremento de Sac en el escutelo es probablemente debido a su transporte. En la zona que rodea al escutelo y junto al eje embrionario se puede distinguir que hay Sac a diferentes tiempos de imbibición (Figura 4D, Sánchez-Linares et al., 2012). Sin embargo, a pesar de la alta actividad de invertasas, no se registró incremento en la cantidad de hexosas a lo largo de la imbibición lo que puede deberse a que las hexosas son rápidamente introducidas a las células del eje embrionario y metabolizadas mediante la vía glucolítica. Una evidencia de lo anterior es la actividad alta de la hexocinasa, la enzima principal en la vía metabólica (Figura 4C).

Al medir la actividad de toma de Sac y hexosas del embrión, se encontró que el eje embrionario tiene la mayor actividad de toma de ambos carbohidratos y que la glucosa es incorporada mayoritariamente. La actividad de toma de azúcares se midió en embriones completos y en ejes embrionarios aislados germinados en agar, por lo que no hubo la contribución de señales hormonales o de los carbohidratos provenientes del endospermo que podrían afectar el tipo de transporte que se lleva a cabo (Figura 5, Zurita-Villegas, 2011).

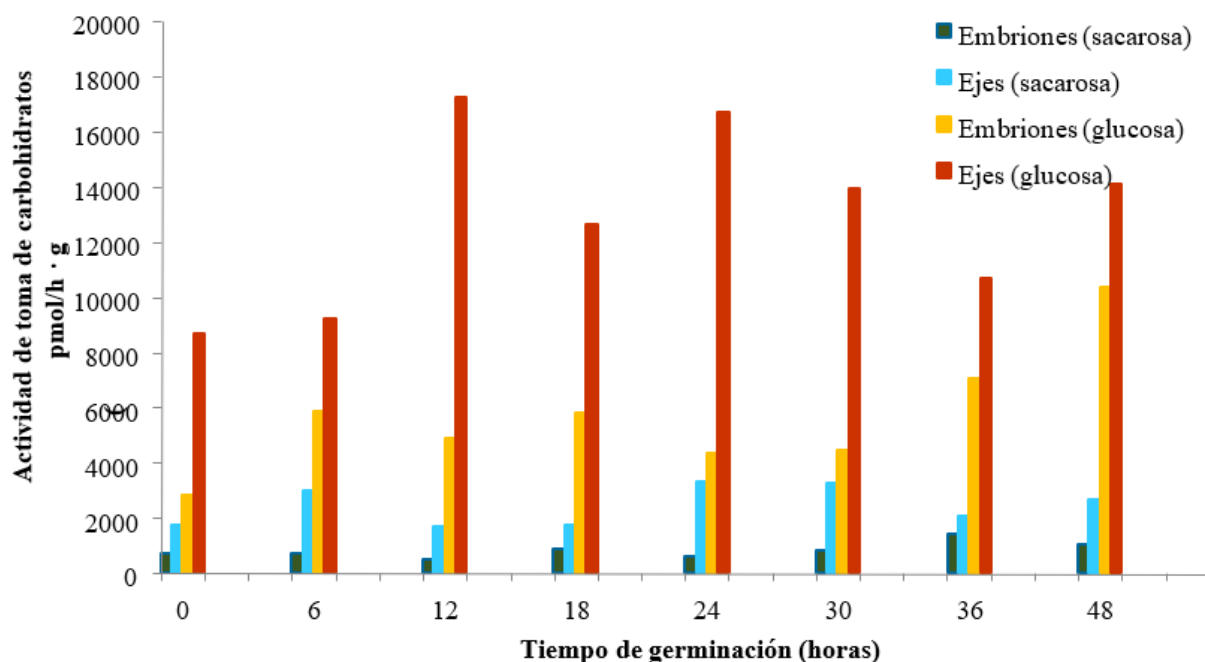


Figura 5. Toma de ^{14}C -Sac y ^{14}C -Glu durante la germinación de embriones y ejes embrionarios de maíz. Tomado de Zurita-Villegas, 2011.

Transporte de azúcares.

En una planta adulta, el transporte de carbohidratos entre los tejidos fuente y los tejidos demanda es a través del floema, por el cual también se transportan aminoácidos y hormonas. El floema está compuesto de células alargadas conocidas como elementos del tubo criboso, que presentan acomodo vertical y se conectan entre sí mediante paredes celulares diagonales con poros, llamadas placas cribosas (Figura 6). Los elementos del tubo criboso contienen algunas mitocondrias, plastidios y retículo endoplasmático, sin embargo, carecen de núcleo, aparato de Golgi y vacuolas (Holbrook y Knoblauch, 2018). La actividad celular de los elementos del tubo criboso es complementada por células parenquimáticas que contienen dichos organelos, denominadas células acompañantes.

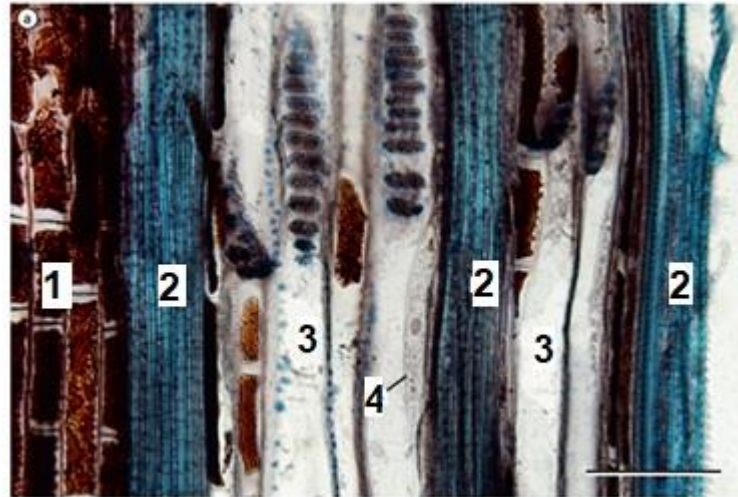


Figura 6. Floema del tallo de *Vitis vinifera* (uva). Parénquima (1), fibras (2), elementos del tubo criboso (3) y células acompañantes (4). Barra de escala= 50 μ m. Tomado de Crang et al. (2018).

Las células acompañantes se encuentran conectadas a los elementos del tubo criboso a través de conexiones citoplasmáticas denominadas plasmodesmos. Éstos son poros compuestos de membrana celular y retículo endoplásmico, que conecta los citoplasmas de las células atravesando la pared celular lo que permite el paso de moléculas y comunicación celular.

En una planta fotosintéticamente activa, la Sac es formada en el citoplasma de las células del mesófilo, mediante la acción de las enzimas UDP-glucosa fosforilasa y la sacarosa fosfato sintasa (Heldt y Heldt, 2005). La Sac sintetizada puede ser movilizada hacia el floema mediante dos vías distintas (Figura 7): la primera es a través de los plasmodesmos, que pueden encontrarse entre las células del mesófilo y células contiguas como las células acompañantes, sin embargo, no todas las células del mesófilo de todas las plantas tienen plasmodesmos.

La segunda vía de transporte es a través de las paredes celulares y/o espacios intercelulares conocida como la vía apoplástica. En esta vía los transportadores membranales se encargan de importar o exportar los azúcares. Por ejemplo, la Sac se mueve desde las células del mesófilo o desde células unidas a las células del mesófilo (células del haz de la vaina) hacia el apoplasto y de ahí, el azúcar puede ser transportado hacia las células acompañantes para el cargado o llenado de Sac en el floema (Eom et al., 2015).

Se ha propuesto que la acumulación de azúcares se debe al importe de los carbohidratos desde el apoplasto hacia el citoplasma de las células del floema, mediante los simportadores azúcar-protón. Un simpotador es una proteína que permite el paso de dos moléculas, una en contra del gradiente de concentración. Se encuentran los simportadores para hexosas STPs (*Sugar Transport Protein*) y los simportadores para Sac SUTs (*SUCrose Transporters*). Ambas proteínas presentan 12 cruces transmembranales y transportan el azúcar acompañado con un protón (Chen et al., 2015a).

En el 2010, Chen y colaboradores describieron una nueva familia de transportadores de carbohidratos llamados SWEET (Sugars Will Eventually be Exported), que principalmente exportan azúcares de la célula y participan en el cargado del floema. A diferencia de los transportadores SUT y STPs, los SWEETs son transportadores difusionales bidireccionales de 7 cruces transmembranales.

En la semilla de maíz, los simportadores SUTs, capaces de transportar Sac y maltosa, se expresan sólo en el escutelo, como ocurre en los tejidos fuente de nutrimentos o acumuladores de carbono, pero no se encuentran en el eje embrionario (Sánchez-Linares et al., 2012). En semillas de trigo, TaSUT también se localizó en las células del escutelo a los 7 días de germinación (Aoki

et al., 2006). Resultados similares se encontraron en la germinación del trigo, donde la proteína SUT, se expresa en células de la aleurona y en el escutelo en trigo y arroz (Matsukura et al., 2000; Aoki et al., 2006).

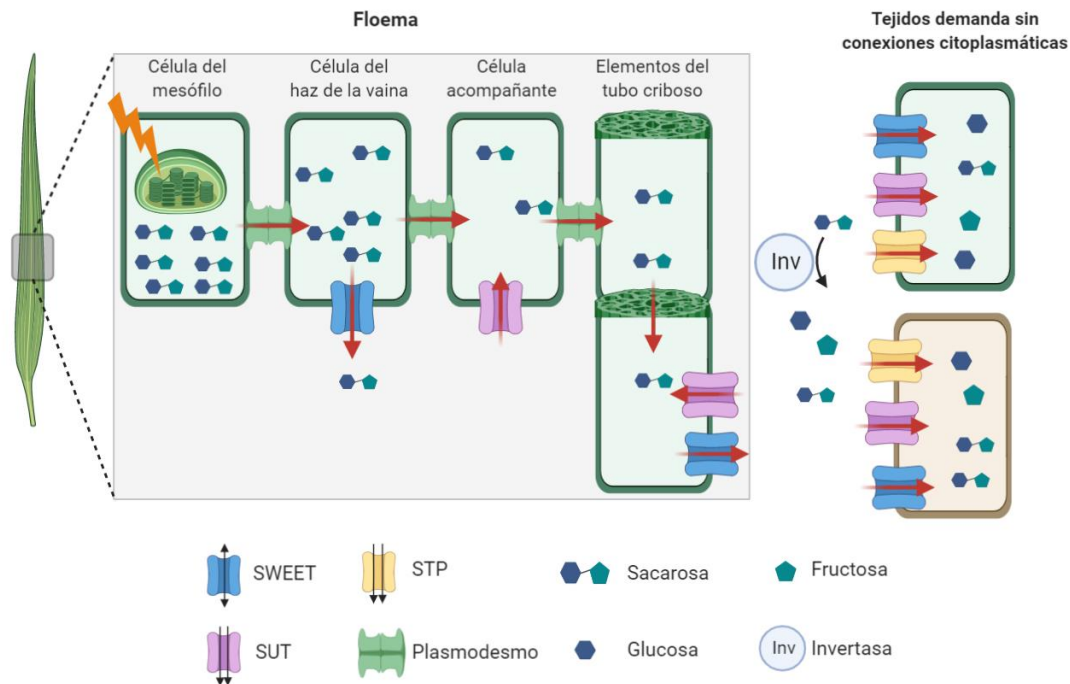


Figura 7. Composición del floema. Se muestra el proceso de llenado y la descarga de Sac del floema a través de las vías simplástica y apoplástica. Las conexiones plasmodesmata permiten la difusión de azúcares u otras moléculas. Las flechas rojas señalan el flujo de Sac desde el tejido fuente hacia los tejidos demanda que pueden o no tener conexiones citoplasmáticas. Transportador difusional SWEET; Transportadores dependientes del gradiente de protones: STPs transportadores de monosacáridos; SUT transportador de Sac; INV invertasa.

Los datos anteriores señalan que el eje embrionario no podría importar Sac porque el tejido vascular que conecta al escutelo con el eje embrionario no está completamente desarrollado al inicio de la germinación (Negbi, 1984), tampoco tiene la capacidad de sintetizar Sac a partir de

hexosas, por lo que es posible que estén involucrados transportadores de membrana plasmática en el movimiento de azúcares hacia el eje embrionario durante la germinación.

Se desconoce el transportador que se encarga de exportar la Sac del escutelo, así como también del que se encarga de la toma de Sac o hexosas al eje embrionario para nutrirlo. Debido a que los transportadores tipo SWEET tienen propiedades difusionales, son candidatos para cubrir ambas funciones (Figura 8).

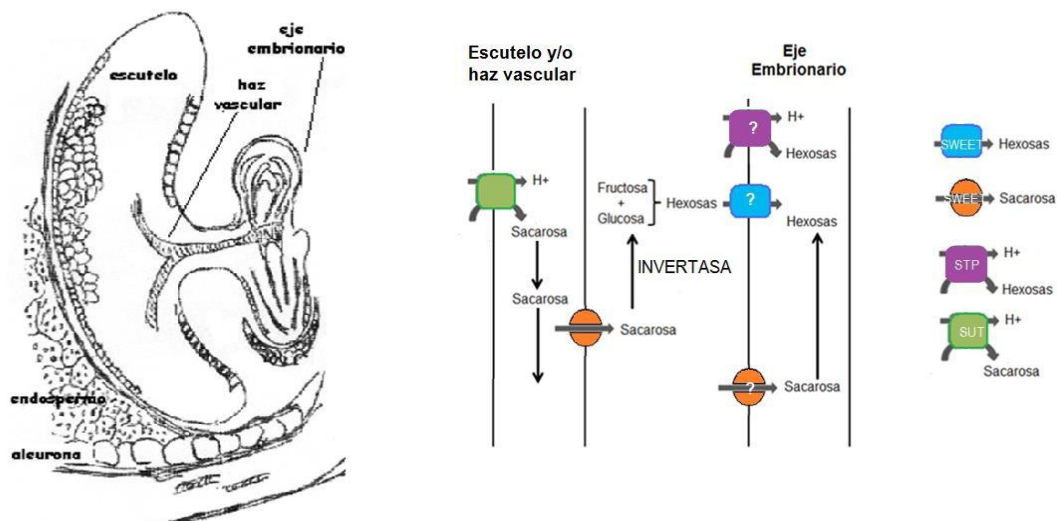


Figura 8. Modelo propuesto sobre el flujo de azúcares entre el escutelo y el eje embrionario de maíz mediado por transportadores. El escutelo expresa simportadores Sac/H⁺ en las membranas del escutelo y haz vascular, pero no en el eje embrionario. Para que el eje embrionario continúe su crecimiento es necesario el aporte de nutrientes del escutelo que puede ser a través de Sac o hexosas. Se desconoce cómo se transporta la Sac desde el escutelo, pero podría ocurrir a través de un transportador difusional tipo SWEET, mientras que el importe de azúcares al escutelo podría ser a través de un simportador de hexosas/H⁺ o bien a través de SWEETs que tengan capacidad de importar Sac o hexosas. Aunque a tiempos cortos de la germinación la pobre cantidad de hexosas en ese tejido podría sugerir que el transportador SWEET sería el que podría introducir hexosas a la célula del eje embrionario. Tomado de

Zurita-Villegas (2011).

Transportadores SWEET.

Las proteínas SWEET facilitan la difusión de azúcares (Sac o hexosas) a través de las membranas celulares de acuerdo con el gradiente de concentración (Baker et al., 2012). Son proteínas de 33 kDa con 7 cruces transmembranales ordenados en 2 paquetes de tres hélices (Triple Helix Bundle. Figura 9), cada uno contiene un motivo MtN3/saliva (CL0141) característico de los SWEET. Posiblemente se originaron por la duplicación del gen SemiSWEET presente en bacterias, que da lugar a una proteína formada por un solo THB, y la adición de un cruce transmembranal (cruce 4) que reorienta la segunda mitad de la proteína (Tao et al., 2015).

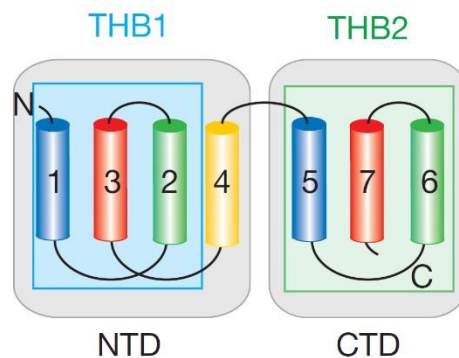


Figura 9. Topología en la membrana del OsSWEET2b. La región N-terminal (NTD) es formada por el THB1 y la hélice 4, mientras que la región del C-terminal (CTD) es formada por el THB2. Por los sitios posibles de fosforilación, la orientación de la región del carboxilo terminal es hacia el citoplasma. Tomado de Tao et al. (2015).

En la estructura cristalográfica de la isoforma 2b del SWEET de arroz, se observó a los SWEET formando trímeros, lo que sugiere un mecanismo de transporte cooperativo del trímero, ya que cada monómero es capaz de transportar el carbohidrato (Tao et al., 2015).

En los genomas de las plantas se han identificado secuencias putativas de transportadores SWEET que varían entre especies. En la base de datos Aramemnon (Schwacke et al., 2003) se

encuentran anotados 18 parálogos en *A. thaliana*, 32 en *Solanum lycopersicum*, 23 en *O. sativa* y 22 en *Zea mays*. Los SWEETs de diferentes organismos se han agrupado en 4 clados, sin embargo, la pertenencia a los clados no predice el proceso fisiológico en el que cada SWEET está involucrado, pero es posible que esté relacionada con la selectividad del transportador entre monosacáridos y disacáridos (Baker et al., 2012). Así el clado I y II contiene a los SWEETs que transportan hexosas, el clado III contiene aquellos que transportan principalmente Sac, mientras que los SWEET de *Arabidopsis* que pertenecen al clado IV parecen tener mayor afinidad por la fructosa (Fru) (Baker et al., 2012; Feng y Frommer, 2015). Los residuos que son importantes para el transporte de Sac están altamente conservados (Tao et al., 2015).

Relevancia fisiológica de los SWEETs.

Como se mencionó anteriormente, la Sac sintetizada en los tejidos fuente es transportada hacia los tejidos demanda como son las raíces, frutos y semillas (Baker et al., 2012). El movimiento de los fotosintatos puede ser vía simplástica o bien apoplástica. En esta última vía se desconocía el transportador involucrado en el transporte de Sac hacia el apoplasto, hasta el descubrimiento de los transportadores SWEET (Chen et al., 2012).

Los SWEETs están involucrados en procesos del desarrollo que requieren de un alto flujo de carbohidratos. Por ejemplo, los SWEET11 y 12 de *Arabidopsis* se localizan en la membrana plasmática de las células del parénquima, están involucrados en el cargado del floema ya que exportan Sac hacia el apoplasto (Fig. 10. Chen et al., 2012) La Sac presente en el apoplasto es importada por las células acompañantes y elementos del tubo criboso mediante los simportadores de influjo tipo SUT. La acumulación de Sac en los elementos de la savia produce un gradiente de

presión hidrostática que resulta en el flujo en masa de Sac a través del conducto continuo de los elementos del tubo criboso hacia los tejidos demanda (Lalonde et al., 2003). Mutantes en SWEET11 y 12 acumulan almidón en las hojas, lo que sugiere que la movilización de Sac depende grandemente de ambos SWEETs (Chen et al., 2012).

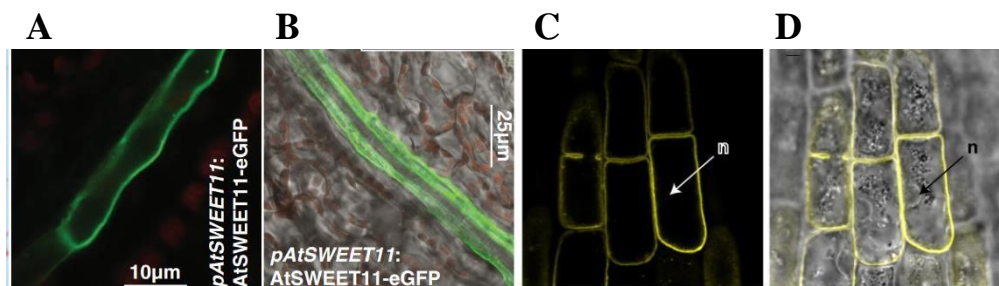


Figura 10. Localización de AtSWEET11 y 12. A y B) Imágenes de microscopía confocal de la fluorescencia de eGFP en células del haz vascular del sépalo de plantas de *Arabidopsis* expresando AtSWEET11-eGFP bajo control de su propio promotor. C y D) Localización celular específica de AtSWEET12 en raíces de una línea transgénica estable que expresa 35S:AtSWEET12-eYFP. n núcleo. Modificado de Chen et al. (2012).

En maíz, se reportaron los ZmSWEET13a, b y c como los parálogos más expresados en el tejido vascular de las hojas maduras y están involucrados en el cargado del floema. La planta triple mutante que carece de estos transportadores muestra acumulación de azúcares solubles y almidón en las hojas, ya que no es capaz de exportar la Sac hacia el espacio apoplástico del floema (Figura 11; Bezruczyk et al., 2018).

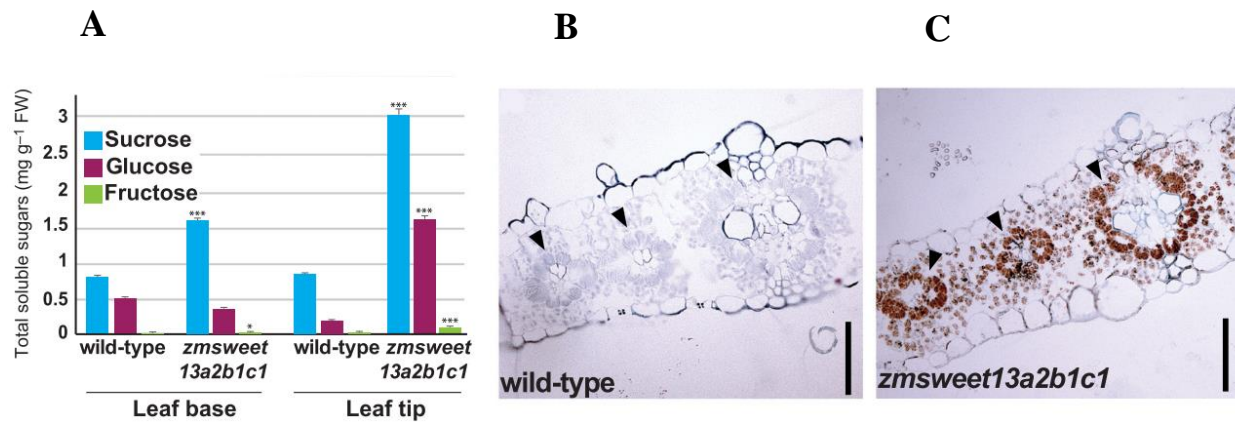


Figura 11. Acumulación de azúcares solubles y almidón en hojas de maíz mutantes en SWEET13a, b y c. Contenido de Sac, glucosa y Fru en dos zonas de hojas de maíz maduras (A). Corte transversal de hojas silvestres (B) y mutantes (C) teñidas con lugol después de finalizar el periodo de oscuridad, se observa la acumulación de almidón en las células del mesófilo, vaina del haz vascular y en los elementos del tubo criboso. Tomado y modificado de Bezruczyk et al. (2018).

Por otra parte, se ha descrito que el SWEET9 es esencial para la secreción de néctar en angiospermas como *A. thaliana*, *Brassica rapa* y *Nicotiana attenuata* (Figura 12. Lin et al., 2014). El néctar contiene una concentración alta y variada de azúcares, esencial para la atracción de polinizadores. Los autores proponen que la Sac sintetizada en el parénquima de los nectarios es secretada hacia el espacio extracelular vía SWEET9, en donde la Sac es hidrolizada por invertasas (Lin et al., 2014).

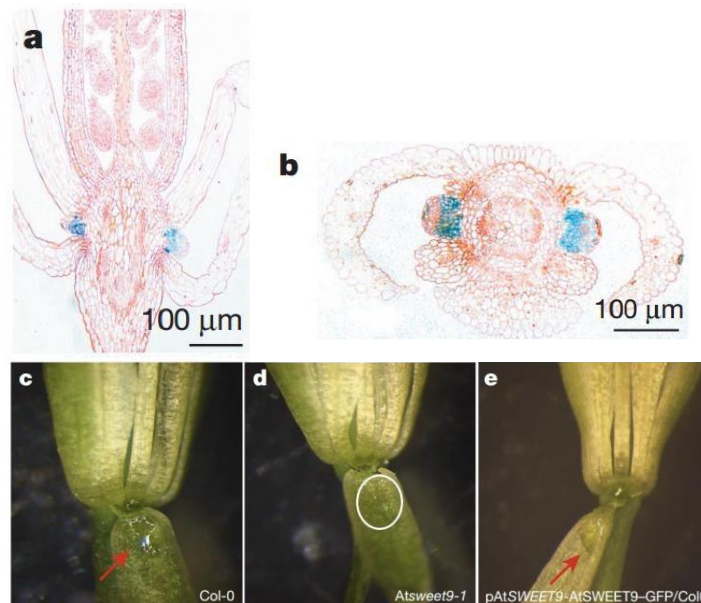


Figura 12. Localización del AtSWEET9. a y b) Análisis histoquímico de GUS en flores de *Arabidopsis* expresando la fusión de GUS con AtSWEET9 bajo su propio promotor. Corte longitudinal (a) y transversal (b). c) Gota de néctar secretada bajo el sépalo de la flor de *Arabidopsis* en plantas control. d) No se observa la secreción de néctar en plantas mutantes en *Atsweet9-1*. e) Incremento en la secreción de néctar de plantas que tienen copias extras de AtSWEET9-GFP. Tomado de Lin et al. (2014).

Los SWEETs también están involucrados en la interacción planta-microorganismo. En arroz los SWEET11, 13, y 14 así como el SWEET10a de la yuca (*Manihot esculenta*) son importantes en la respuesta a patógenos. Algunos patógenos bacterianos son capaces de introducir efectores proteicos que funcionan como factores transcripcionales, como los efectores TAL (Transcription Activator factor-Like), controlan la transcripción de algunos genes en la planta, entre éstos los SWEETs que podrían funcionar para proveer los azúcares al microorganismo en el apoplasto (Chen et al., 2012; Streubel et al., 2013; Cohn et al., 2014).

En el proceso de desarrollo del polen, los AtSWEET8 y 13, están involucrados en la formación de primexina, que es la pared primordial del polen y está formada de microfibras de celulosa, la cual formará posteriormente a la exina o pared externa del polen, importante para la protección y dispersión del polen, así como para el reconocimiento especie-específico del polen en los estigmas (Sun et al., 2013).

Otro de los procesos de alta demanda de carbohidratos es la embriogénesis. No se conocía el proceso de liberación de Sac de los tejidos maternos para nutrir a los tejidos del embrión en formación. El embrión de *Arabidopsis* tiene tres bordes apoplásticos que requieren transportadores de membrana: 1) el espacio entre el tegumento externo e interno, 2) entre el tegumento interno y el endospermo y 3) entre el endospermo y el embrión (Chen et al., 2015b). Al respecto se ha reportado que AtSWEET11, 12 y 15 son importantes en el llenado de semilla en *Arabidopsis*, ya que la triple mutante mostró un desarrollo retardado del embrión, reducción del peso y del contenido de lípidos en la semilla (Chen et al., 2015b).

Durante la embriogénesis de *Arabidopsis* (Figura 13), se observó que el SWEET11 y 12 se expresan principalmente en el endospermo y la cubierta de la semilla durante el estado linear del cotiledón (estado torpedo) y en el estado final de maduración. Además, el SWEET12 es más abundante en el suspensor y el micrópilo de la cubierta de la semilla en el estado globular, estado en el que el suspensor degenera y pierde las conexiones citoplasmáticas con el embrión. El SWEET15 es detectado en el estado globular y de maduración final (Chen et al., 2015b).

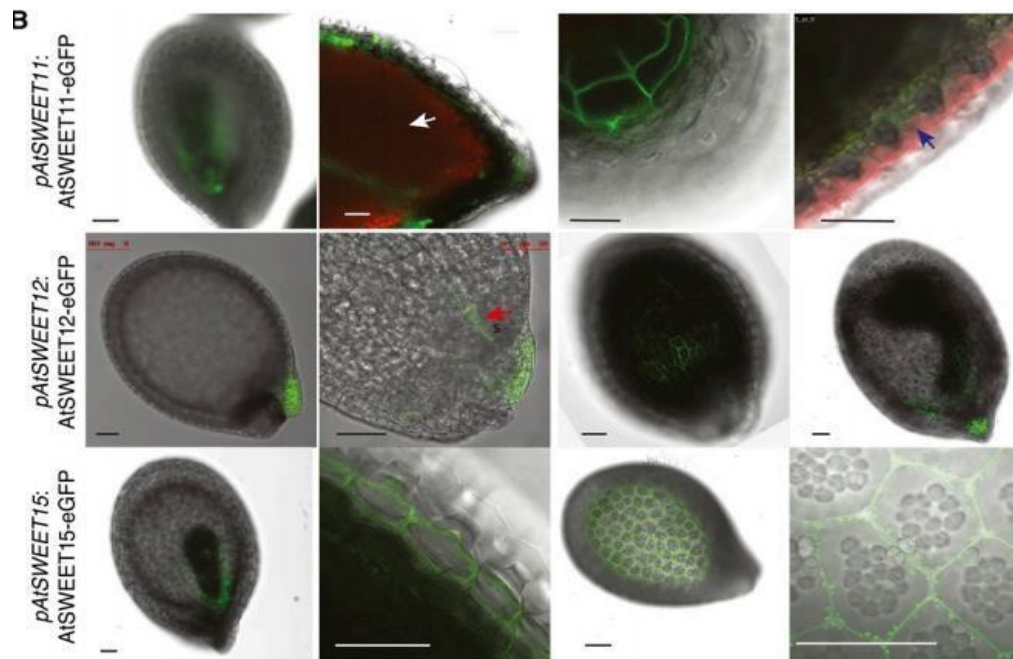


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de eGFP en *Arabidopsis* de AtSWEET11, 12 y 15 fusionados a eGFP bajo la expresión del promotor nativo. La flecha blanca señala la auto fluorescencia del cotiledón, la flecha azul señala la tinción de las células de la pared con yoduro de propidio, la flecha roja señala el suspensor. Tomado de Chen et al. (2015).

Las semillas de los cereales poseen una estructura completamente diferente y un fondo genético distinto que favorece la acumulación de reservas en forma de almidón, comparados con géneros como *Arabidopsis* en las cuales la mayor cantidad de reservas es de naturaleza lipídica (Han y Yang, 2015).

Como ya se mencionó, hay reportadas 22 secuencias putativas codificantes de SWEETs en maíz pertenecientes a los cuatro clados. Sin embargo, sólo dos tipos de SWEETs han sido caracterizados, el ZmSWEET4c y la familia de los SWEET13. La expresión de la isoforma 4c del SWEET se incrementa a los 17 días después de la polinización, lo que coincide con la importación

masiva de azúcares en el desarrollo del embrión. El ZmSWEET4c lleva a cabo el transporte de hexosas en la capa basal de transferencia del endospermo o BETL (Sosso et al., 2015). Esta capa de células es el único punto de unión de la semilla al tejido materno y carece de conexiones citoplasmáticas con el tejido madre (Chourney y Hueros, 2017). Las semillas de maíz y arroz mutantes en este transportador tienen endospermo más pequeño que las semillas silvestres, lo que sugiere que el transporte de hexosas desde los tejidos madre a la semilla en formación es esencial para el llenado de la semilla (Figura 14).

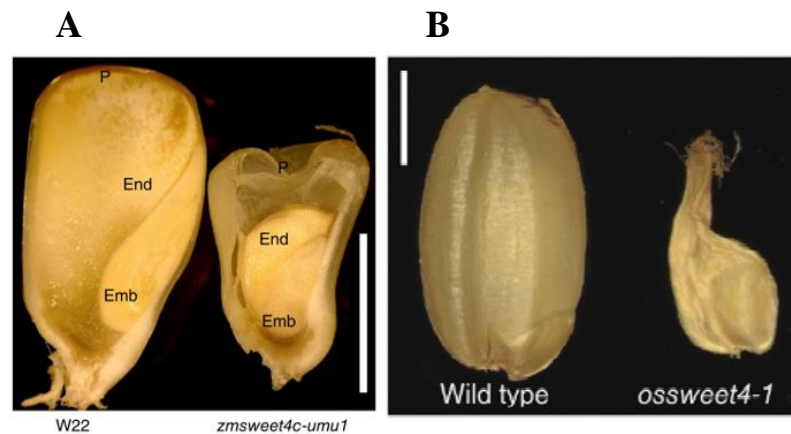


Figura. 14. Semillas de maíz (A) y arroz (B) mutantes en el SWEET4. Barra= 0.5 cm en A y 2 cm en B.

Tomado y modificado de Sosso et al. (2015).

La embriogénesis puede ser vista como el proceso opuesto a la germinación, ya que en la primera el endospermo y el escutelo funcionan como tejidos demanda acumulando las reservas, mientras que en la germinación se movilizarán las reservas de carbono almacenadas en estos tejidos para proporcionar nutrientes al eje embrionario, el cual se desarrollará en la nueva planta. Al momento se desconoce si el ZmSWEET4c también tiene un papel en la germinación. Además, otros miembros de la familia SWEET podrían ser esenciales durante este proceso.

En este mismo escenario, considerando que el tejido vascular que une al escutelo con el eje embrionario no se encuentra maduro, es posible que el transporte apoplástico entre el escutelo y el eje embrionario sea vuelva esencial, así los transportadores SWEETs podrían estar involucrados en la movilización de azúcares durante la germinación.

Justificación

Los transportadores SWEET participan en diferentes procesos fisiológicos en los que se requiere la movilización de altas cantidades de azúcares como el cargado del floema, la secreción del néctar y el llenado de semillas durante la embriogénesis, sin embargo, se desconoce si participan en la germinación, proceso en el cual, las reservas metabólicas presentes en la semilla son movilizadas hacia la plántula en desarrollo.

En el caso particular de la semilla de maíz, hay dos tejidos fuente que nutren al eje embrionario, el escutelo y el endospermo, en momentos diferentes durante la germinación. El primero en hacerlo es el escutelo, el cual es abundante en lípidos y es capaz de sintetizar azúcares a partir de ellos. El escutelo rodea al eje embrionario, sin embargo, la red de conexiones citoplasmáticas entre los tejidos no es madura al inicio de la germinación, por lo que la presencia de proteínas transportadoras de azúcares es necesaria para su movilización. Dentro de los transportadores de azúcares ya descritos se encuentran los simportadores de sacarosa SUT dependientes del gradiente de protones, sin embargo, el eje embrionario carece de SUT por lo que es posible que un transportador SWEET cumpla la función de importe de sacarosa en el eje embrionario.

En el caso particular del maíz, sólo se han descrito los SWEETs 4c y los SWEET13 a, b y c de las 22 secuencias putativas anotadas. El SWEET4c es importante en el llenado de la semilla y permite el transporte de Glu, mientras que los SWEET13 están implicados en el llenado de floema en plantas adultas.

Con este trabajo se pretende determinar el contexto metabólico referente azúcares durante la germinación del escutelo y eje embrionario de maíz VS-535 así como la capacidad de transporte difusional de ambos tejidos que podría estar relacionada a los *SWEETs*. Se busca conocer cuáles *SWEETs* putativos se expresan en los tejidos embrionarios del maíz durante la germinación, su localización subcelular y el azúcar que transportan como indicadores de funcionalidad a nivel de proteína.

Hipótesis

Durante la germinación diferentes SWEETs serán expresados en los tejidos embrionarios y podrían estar relacionados con la nutrición de la nueva plántula en crecimiento.

Objetivo general

Identificar, clonar y caracterizar funcionalmente los SWEETs de maíz más expresados en los tejidos embrionarios durante el proceso germinativo.

Objetivos particulares

- Evaluar si la expresión de los presuntos SWEET en eje embrionario y escutelo se modifican en los estadios de germinación determinados.
- Analizar el contenido y capacidad de absorción de carbohidratos solubles en los tejidos embrionarios.
- Clonar los SWEET que sean más abundantes y presenten patrones de expresión diferentes en los estadios de germinación.
- Determinar la localización intracelular de los SWEET clonados en levaduras y en lígulas de maíz.
- Caracterizar la actividad de transporte de carbohidratos de los SWEET clonados en un sistema heterólogo de levadura.

Materiales y métodos.

Material vegetal.

Se utilizaron semillas de maíz de la variedad sintética VS535 que fueron tratadas previamente por el proveedor con el insecticida deltametrina y el fungicida interthiram. Las semillas se lavaron con una solución al 2 % de cloro de uso doméstico en agitación por 2 min y después se enjuagaron con agua estéril desionizada 5 veces, hasta que no se percibió olor a cloro. Las semillas se sembraron en cajas de plástico de 20x20 cm con 50 mL de agar al 1.0 % y se incubaron a 29°C en oscuridad. Se aislaron los embriones (eje y escutelo) de las semillas germinadas a diferentes horas de manera manual con una navaja de afeitar. El tejido usado para el análisis a tiempo 0 de germinación se obtuvo de semillas secas.

Consumo de agua y oxígeno para la determinación de las fases de germinación.

Los embriones se aislaron de semillas incubadas en agar por 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 h y se determinó su peso fresco. Para registrar el consumo de oxígeno, 10 embriones de cada tiempo de imbibición se sumergieron en 10 mL de agua destilada en agitación constante en un vaso de precipitados de 25 mL. El consumo de oxígeno fue monitoreado por 4-5 min en un oxímetro YSI 5300 (Yellow Springs Instrument Co., Inc. OH, USA) con un electrodo de Clark. Para calcular la pendiente de la curva, se trazó una recta sobre el registro del oxímetro, y en el punto donde se encontró una intersección con la cuadrícula del papel de registro, se trazó una línea perpendicular a la curva. Se midió la distancia entre las dos rectas trazadas a partir de 1 cm de la intersección (Figura 15).

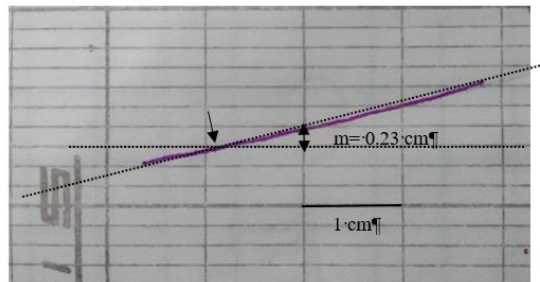


Figura 15. Registro obtenido del oxímetro. Se muestra la intersección y la pendiente.

El consumo de oxígeno se calculó según la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{1200 \text{ nM } O_2}{20 \text{ cm}}\right) \left(\frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}}\right) \left(\frac{y}{1 \text{ min}}\right) \left(\frac{1}{\text{mg de tejido}}\right) = \text{nM } O_2 \text{ h}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

Donde:

20 cm = medida del papel del registrador.

y = pendiente medida en el trazo

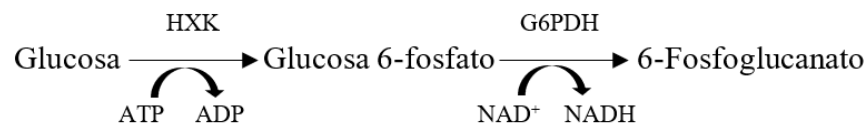
Determinación de lípidos totales.

Para la determinación de lípidos se siguió el método reportado por Ramírez-Pimentel et al., 2015. Resumiendo, se utilizó 1 g de tejido molido con N₂ líquido al cual se le añadió una mezcla CHCl₃:MetOH (2:1, v/v) fría. La mezcla se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 3500 g durante 5 min. La fase orgánica se trasladó a microtubos previamente pesados y el cloroformo se evaporó hasta sequedad. El contenido de lípidos se determinó por peso.

Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.

Se molió tejido con N₂ líquido. En un microtubo de 2 mL, se añadieron 200 mg de escutelo o eje embrionario, 1 mL de etanol 80 % a 80° C y 1 mL de agua desionizada en ebullición. Se mezcló en un vórtex y se centrifugó a 10000 g por 10 min. El botón, que contiene el almidón de los tejidos, se almacenó a -20°C hasta su uso. Por otra parte, el sobrenadante se incubó a 60°C y se secó completamente. La muestra seca se resuspendió en 300 µL de agua desionizada y se almacenó a -20° C hasta su uso.

El contenido de Glu, Fru y Sac se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la producción de NADH usando el reactivo de ensayo de Glu, GAR (Sigma), que contiene NAD⁺, ATP, hexocinasa y G6PDH. En la reacción, el contenido de Glu es equivalente a la cantidad de NAD⁺ que es reducido a NADH:



La cantidad de Glu se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{mg Glu} \cdot \text{g tejido}^{-1} = \frac{\text{ABS} \cdot 0.00614 \cdot \text{FD} \cdot \text{Vol. sus}}{\text{Vol. muestra} \cdot \text{g tejido}}$$

Donde:

ABS= Absorbancia a 340 nm.

FD= Factor de dilución de la muestra.

Vol. sus= Volumen en que se resuspendió la muestra (300 μL).

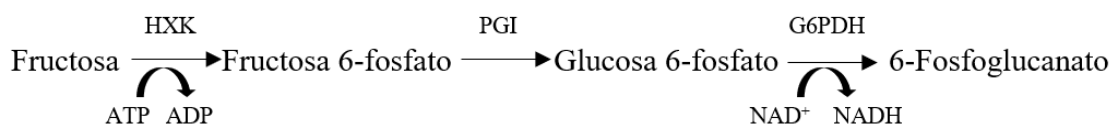
Vol. muestra= Volumen de la muestra ocupada por reacción (12 μL máximo).

g tejido= Gramos de tejido usados en la extracción etanólica (100 μL).

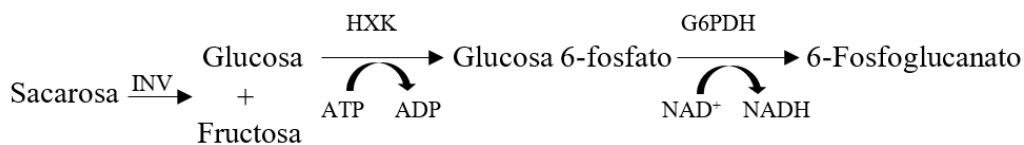
0.00614= Factor que considera la masa molécula de la Glu, el coeficiente de extinción del NAD^+ y el volumen total de la reacción.

La reacción se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos donde se mezclaron 200 μL de GAR (Sigma), y hasta 12 μL de muestra. Se incubó a 25° C durante 20 min con intervalos de agitación suave y se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro MULTISKAN GO (ThermoFisher).

Para determinar la cantidad de Fru, a la reacción anterior se le agregaron 2 μL de 1.2 U/mL fosfoglucosa isomerasa (PGI, Sigma). Se incubó por 5 min a 25° C y se registró la absorbancia a 340 nm. En esta segunda reacción, el contenido de NADH es directamente proporcional al contenido de Fru:

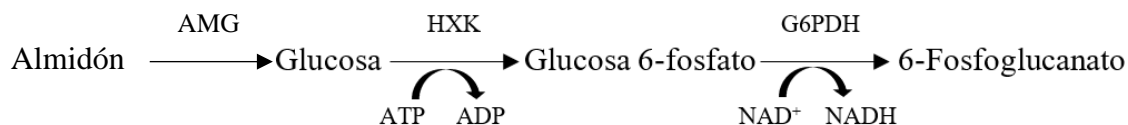


Para la medición de Sac, a 12 μL del extracto etanólico se le añadieron 4 μL de invertasa de levadura (Sigma 80 mg/mL disuelta en acetato de magnesio 100 mM pH 4.5.). La reacción se incubó a 37°C por 2 h. Después se determinó la Glu producida.



Cuantificación del contenido de almidón.

Se solubilizó el botón obtenido en la centrifugación del extracto etanólico con 1 mL de agua a 90° C durante 4 h. Se le agregó un volumen de 14 mg/mL de amiloglucosidasa disuelta en amortiguador de acetatos 0.2 M, pH 4.2 (Anexo I. Preparación de soluciones.) que puede hidrolizar las ramificaciones $\alpha - 1 \rightarrow 6$, así como los enlaces poliméricos $\alpha - 1 \rightarrow 4$ del almidón. La reacción se dejó incubando toda la noche en agitación constante a 37°C. Después se centrifugó a 10000 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. La Glu presente en el sobrenadante se midió como se mencionó anteriormente.



Determinación de la actividad de toma de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz.

Para obtener la actividad de toma de azúcares de los tejidos de maíz, se midió la toma de azúcares marcados con ^{14}C mediante centelleo líquido, en donde el líquido de centelleo actúa como transductor de energía transformando la energía de decaimiento del ^{14}C en luz. La luz es captada

en fotomultiplicadores que generan pulsos eléctricos los cuales son analizados en un contador de centelleo.

Los ejes embrionarios y escutelos se aislaron de semillas con diferentes horas de germinación. La medición de toma de carbohidratos se hizo siguiendo el protocolo de Zurita-Villegas (2011). Brevemente, aproximadamente 100 μg de tejido se colocaron en 500 μL del medio de reacción que contenía Sorbitol 330 mM, HEPES 50 mM pH 6.0, Glu o Sac fría -sin marca radiactiva- 10 mM, KCl 5 mM, ^{14}C -Glu 1 μL o ^{14}C -Sac 13 μL .

El tejido se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se desechó el medio de reacción y se añadieron 200 μL de medio de lavado (sorbitol 330 mM, HEPES 50 mM pH 6, Glu o Sac fría 100 mM, KCl 5 mM) durante 5 min. Después el tejido se secó en papel filtro por 5 min.

El tejido seco se sumergió en 500 mL de medio de lisis $\text{H}_2\text{O}_2:\text{HClO}_4$ (2:1, v/v) y se incubaron durante toda la noche. Después se tomaron 300 μL del medio de lisis, se procuró no absorber fragmentos de tejido. Los 300 μL se añadieron en viales con 3 mL de líquido de centelleo (0.3g 2,5-Difenil-oxazol PPO, 3.7 mL etilenglicol, 10.6 mL etanol, 25.7 mL Tritón X-100, 60 mL xilol).

Las muestras se leyeron en un contador de centelleo Multi-Purpose Scintillation Counter LS 6500 Beckman Coulter, para cuantificar ^{14}C con un tiempo de lectura de 3 min. Las mediciones se hicieron por triplicado de muestras independientes.

Para obtener la actividad de transporte de Glu debido a transporte difusional se adicionó al medio de reacción 100 μM del protonóforo CCCP (Carbonil Cianuro-m-CloroFenilhidrazona) ya

que este reactivo equilibra las concentraciones de protones en ambos lados de la membrana plasmática inhibiendo el transporte debido a un simportador azúcar/H⁺. La cuantificación de ¹⁴C se hizo como se describió anteriormente.

Por otra parte, para conocer la actividad de transporte difusional de Sac se añadieron 2.5 mM de PCMBS (p-CloroMercuri-Bencen-Sulfónico) al medio de reacción. El PCMBS es modificador de grupos sulfhidrilo y se ha utilizado clásicamente como un inhibidor del transportador SUT (Lichtner y Spanswick, 1981) a través de la modificación de sus cisteínas (Pelleschi et al., 1997). La cuantificación de ¹⁴C se hizo como se describió anteriormente y la concentración utilizada fue la probada por Zurita-Villegas (2011).

Para determinar la actividad de toma de Glu, primero se calcularon las cuentas por minuto (cpm) de 1 μCi del azúcar. La solución de Glu está a una concentración de 310 mCi/mmol o bien, 0.1 mCi/mL, por lo tanto, en 1 μL hay 1 μCi. Se agregó 1 μL de la Glu marcada a 3 mL del líquido de centelleo y se midió en el Contador de Centelleo durante 3 min. Se obtuvo una cuenta de 0.1 μCi = 226210.4 cpm.

Se obtuvo la actividad de toma de Glu con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{0.1 \mu Ci}{226210.4 \text{ cpm}}\right) \left(\frac{\text{cpm de la muestra}}{1}\right) \left(\frac{310000 \mu Ci}{1 \text{ mmol glucosa}}\right) \left(\frac{1 \times 10^3 \text{ pmol glucosa}}{1 \text{ mmol glucosa}}\right) \left(\frac{1}{g \text{ tejido}}\right) \left(\frac{1}{0.17 \text{ h}}\right) = \text{pmol glucosa} / g \text{ de tejido} \cdot h$$

En donde:

cpm= cuentas por minuto de la muestra

g tejido= peso del tejido lisado

0.17 h = tiempo de incubación en presencia de la Glu marcada.

Para el cálculo de Sac marcada, se sustituyó la cantidad de μCi en la fórmula anterior por la concentración correspondiente de la solución de Sac marcada.

$$\left(\frac{0.1 \mu\text{Ci}}{18008.13 \text{ cpm}}\right) \left(\frac{\text{cpm de la muestra}}{1}\right) \left(\frac{401000 \mu\text{Ci}}{1 \text{ mmol sacarosa}}\right) \left(\frac{1 \times 10^9 \text{ pmol sacarosa}}{1 \text{ mmol sacarosa}}\right) \left(\frac{1}{\text{g tejido}}\right) \left(\frac{1}{0.17 \text{ h}}\right) = \text{pmol sac/ g de tejido} \cdot \text{h}$$

Determinación de la expresión de SWEETs mediante RT-PCR.

Extracción de RNA total.

Se obtuvo RNA total de los tejidos seleccionados mediante la extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Trizol, Thermo Fisher). Se molieron 200 mg de tejido con N_2 líquido en un mortero frío y estéril. El tejido se colocó en un microtubo estéril y se le agregó 1 mL de Trizol, se mezcló con un vórtex hasta homogenizar y se incubó por 5 min a temperatura ambiente.

Para la separación de fases, a la mezcla anterior se añadieron 200 μL de cloroformo y se agitó el tubo vigorosamente durante 15 s. Después se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 15 min a 12,000 g a 4°C . Se formaron tres fases, que de acuerdo con el fabricante del Trizol, la fase clara superior acuosa contiene el RNA, la interfase y la fase inferior roja orgánica contiene el DNA y proteínas.

La fase acuosa se recuperó en un microtubo y se le añadieron 0.5 mL de isopropanol para precipitar el ARN. Se mezcló por inversión 15 veces y se incubó por 10 min a temperatura

ambiente. Después se centrifugó a 12 000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 400 μ L de agua estéril.

Para eliminar los carbohidratos residuales se añadieron 400 μ L de PCC (fenol saturado con amortiguador de citratos, (Anexo I. Preparación de soluciones) y cloroformo 1:1 v/v. Se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12 000 g 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un microtubo y el RNA se precipitó al añadir 50 μ L de 3 M acetato de sodio y 100 μ L de etanol absoluto. Se mezcló por inversión 15 veces y se incubó a -80°C por 30 min. Después, se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el botón (RNA) con 1 mL de etanol al 70 %. El tubo se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C. El lavado se repitió 3 veces. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el botón por 5 min a temperatura ambiente. El botón se disolvió en 40 μ L de agua libre de nucleasas. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

Cuantificación y calibración del RNA total.

La cuantificación del RNA total se realizó en el espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific Inc.). De cada muestra se tomó el volumen necesario para 1 μ g de RNA y se mezcló con 2 μ L de amortiguador de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega) y el agua libre de nucleasas necesaria para completar 10 μ L. La muestra de RNA se resolvió en un gel de agarosa al 2 % a 80 V durante 45 min en amortiguador TAE 1x (Tris acetato EDTA, Anexo I. Preparación de soluciones). La imagen se obtuvo en el transiluminador CHEMIDOC MP System (Bio-Rad Laboratories Inc.) y se realizó el análisis densitométrico con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Para los análisis posteriores, sólo se usaron las muestras de RNA con un índice de

absorbancia 260/280 igual a 2 ± 0.1 y con bandas íntegras observadas en el gel de agarosa (Figura 16).

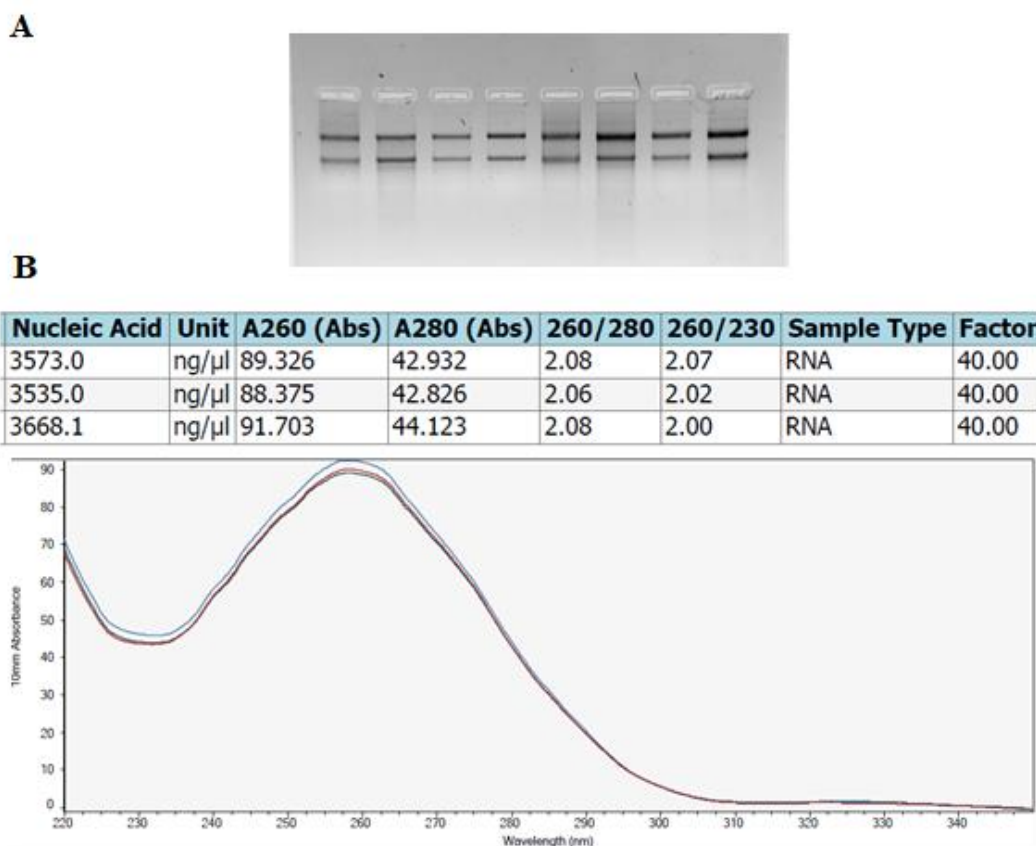


Figura. 16. Integridad y pureza del RNA total usado para la síntesis de cDNA. A) Integridad de RNA. Gel de agarosa 2 %, las bandas corresponden a las subunidades 28s y 18s del rRNA. No se observa contaminación con gDNA. B) Datos representativos de la cuantificación de muestras de RNA.

Síntesis de cDNA.

Se sintetizó cDNA mediante la enzima transcriptasa reversa, la cual sintetiza una molécula de cDNA a partir de cada RNA mensajero poliadenilado. Se mezcló el volumen necesario de cada muestra para obtener 1 μ g de RNA, 1 μ L de 20 μ M oligo dT y la cantidad necesaria de agua libre

de nucleasas para un volumen total de 10 μL . La mezcla se incubó a 70°C durante 5 min y después se incubó en hielo por 5 min.

A cada tubo se le añadieron 4 μL de amortiguador ImProm 5x (Promega), 2.4 μL de 25 mM MgCl_2 , 1 μL de 10 mM dNTP's (Promega), 1 μL de RT (Promega) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para obtener el volumen total de 10 μL .

Las condiciones para la retrotranscripción fueron: alineamiento a 25 °C por 5 min, seguido de la extensión a 42 °C por 1 h, después la desnaturalización a 70 °C por 15 min. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Determinación de la expresión de *ZmSWEETs* y α -amilasa mediante RT-PCR.

Todos los oligonucleótidos usados en este estudio se diseñaron en el portal Primer3Plus (Untergasser et al., 2012) usando como molde la secuencia anotada de *Zea mays* B73_Ref_Gen_v4 de la base de datos EnsemblPlants (Kersey et al., 2018) para amplificar regiones de exones (Figura 17). Se usaron las herramientas de análisis Nucleotid-BLAST y PRIMER-BLAST para determinar la especificidad de cada par de oligonucleótidos usados. También se analizó cada oligonucleótido en el portal OligoAnalyzer Tool de IDT; se predijo que ninguno de ellos formaba homodímeros, heterodímeros o estructuras secundarias.

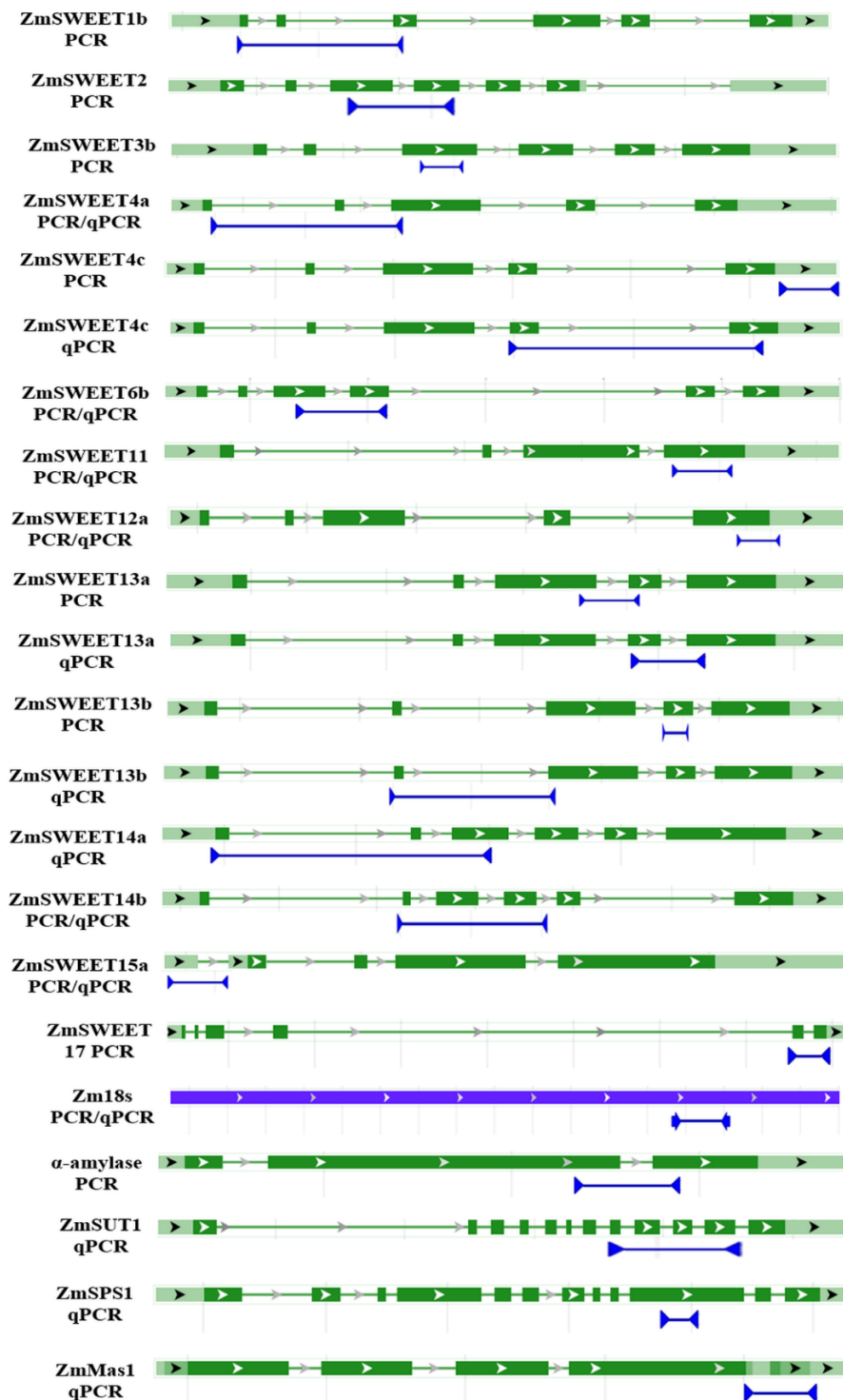


Figura 17. Análisis BLAST de los oligonucleótidos usados. Se muestran los exones en cajas verdes y el producto de amplificación en líneas azules. Se muestra la aplicación (PCR o qPCR) de los pares de oligonucleótidos

El análisis de los niveles de transcrito de los ZmSWEETs, α -amilasa y 18s se hicieron a partir de tres muestras biológicas independientes. Se mezclaron en hielo 2 μ L de cDNA, 0.5 μ L de oligonucleótido sentido 20 μ M, 0.5 μ L de oligonucleótido antisentido 20 μ M, 12.5 μ L PCR Master Mix (Promega) y 9.5 μ L agua libre de nucleasas. Las condiciones de la reacción fueron: pre-desnaturalización 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización 94 °C 40 s, alineamiento 57 °C 1 min, extensión 72 °C 40 s, y extensión final de 72 °C 7 min. Los productos de la PCR fueron mezclados con amortiguador de carga Blue/Orange (Promega) 1x concentración final y se corrieron en un gel de agarosa 1.5% bajo las condiciones descritas anteriormente. Se obtuvo la imagen del gel y se hizo el análisis densitométrico con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Las secuencias de oligonucleótidos usados se muestran en el Anexo II. Secuencias de oligonucleótidos.

Análisis de la expresión de *ZmSWEETs*, *Malato sintasa (MS)*, *Sacarosa fosfato sintasa (SPS)* y del *Transportador de sacarosa 1 (SUT1)* en escutelo y eje embrionario mediante RT-qPCR.

Para asegurar la veracidad de la determinación de la abundancia de los transcritos de los genes, previo a la cuantificación, se analizó la amplificación de los oligonucleótidos diseñados con el objetivo de evitar aquellos diseños que amplificaran productos inespecíficos o que formaran dímeros. Para ello, se hizo la reacción de PCR en tiempo real en el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La mezcla de reacción fue de 10 μ L SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.15 μ L oligonucleótido sentido, 0.15 μ L oligonucleótido antisentido, 2 μ L cDNA, 7.7 μ L H₂O libre de DNAsas. Las condiciones de la reacción fueron: *fase de espera* 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; *fase cíclica* 40 ciclos a 95 °C 15 s y

60 °C 1 min; *fase de curva de disociación* continua a 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s. La colección de datos se programó en los pasos de 60 °C 1 min de la fase cíclica y en 95° C 15 s de la fase curva de disociación. Se eligieron sólo los pares de oligonucleótidos con los que se obtuvo un solo pico de amplificación en la curva de disociación (Figura 18). Como control negativo de amplificación se utilizó agua libre de nucleasas como sustituto del cDNA en la reacción de RT-qPCR (NTC *no template control*).

Se calculó la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos mediante la elaboración de una curva estándar a partir de una muestra de cDNA diluidas en serie (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) por triplicado. La curva de calibración se obtuvo con el valor de Ct (número de ciclos en el que la fluorescencia supera el nivel de fluorescencia por encima de la línea base de señal y entre la región exponencial de la curva de amplificación) en función del logaritmo de la concentración de cDNA. Sólo se aceptaron las curvas cuya pendiente estuviera dentro del rango -2.8 a -3.32 (Figura 19). La eficiencia de amplificación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$E = 10^{1/m}$$

Donde: E= eficiencia; m=pendiente

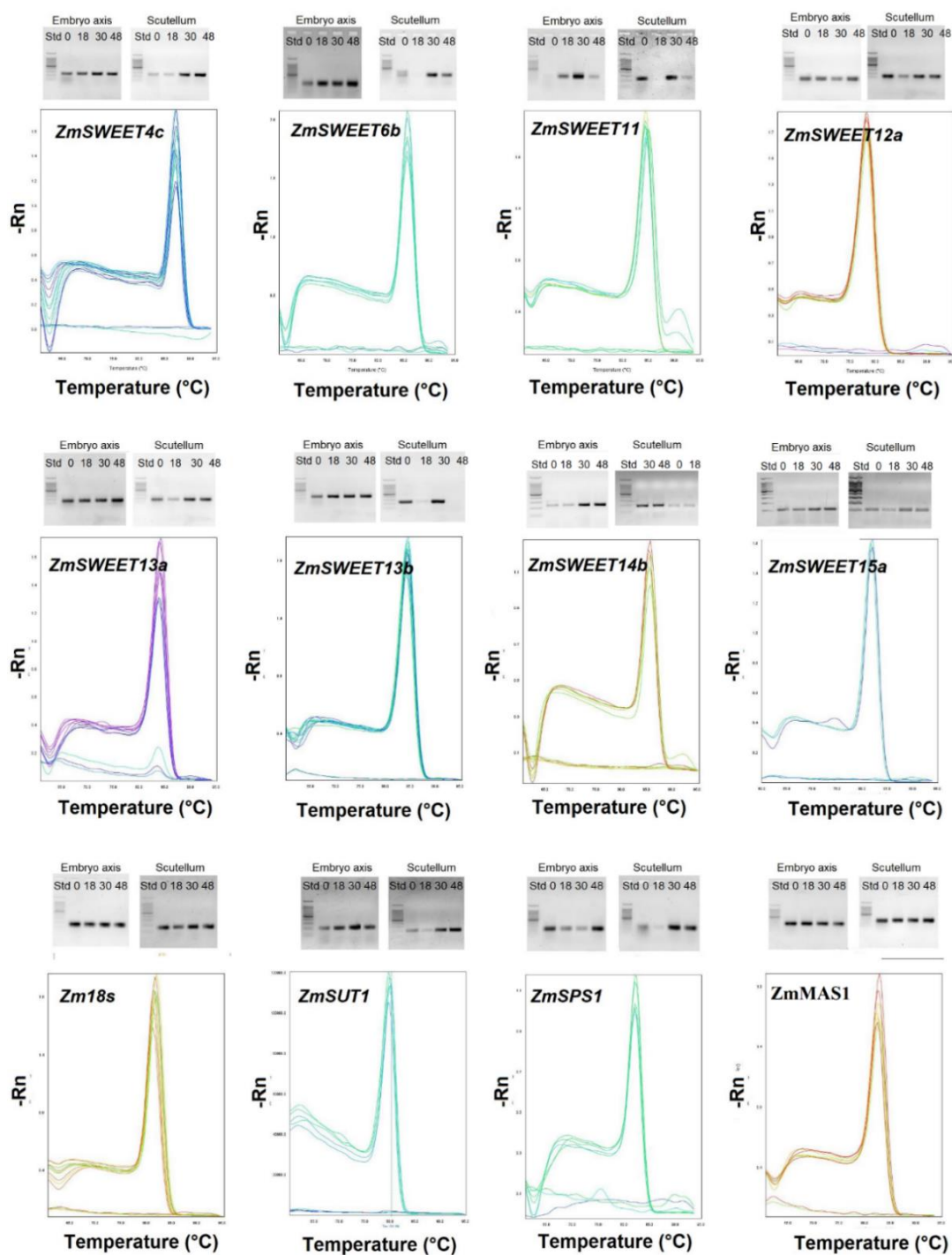


Figura. 18. Amplificación específica obtenida con los oligonucleótidos diseñados para los genes de interés. Se muestran los productos de amplificación obtenidos y las curvas de disociación.

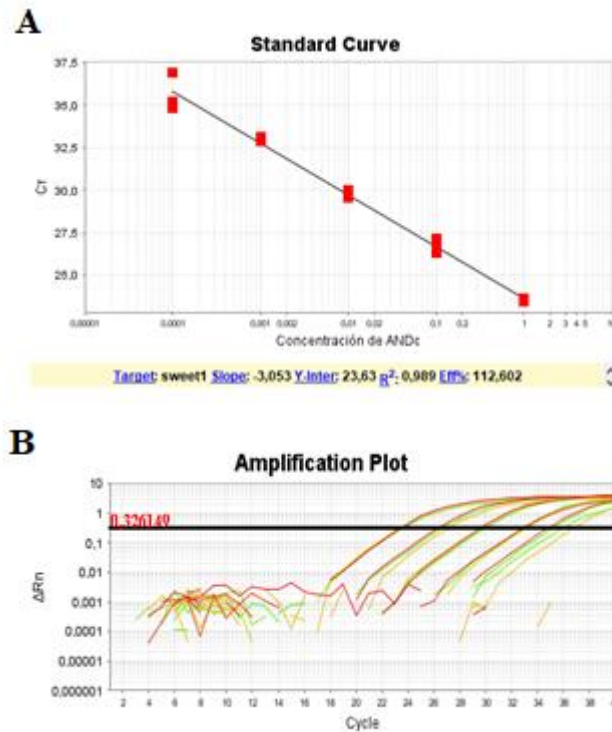


Figura. 19. Ejemplo de curva de calibración para los oligonucleótidos usados en el análisis por qPCR. A) Curva estándar que muestra la pendiente y el coeficiente de correlación. B) Curvas de amplificación correspondientes a las diferentes concentraciones de cDNA usadas en la reacción. Se muestra la línea del umbral calculada automáticamente por el programa 7500 System Software v 2.0.6 (Applied Biosystems).

Para analizar el nivel de transcrito de los tejidos a diferentes horas de germinación se usó cDNA de dos muestras biológicas independientes como templado en la reacción de qPCR. Las muestras se analizaron por duplicado. Se consideró el tiempo 0 de germinación como control. Los Ct obtenidos se recalcularon ajustando el nivel de umbral registrado en la curva de calibración para

cada uno de los genes analizados (Anexo III). Como genes de referencia se utilizaron el gen 18s y ubiquitina.

El nivel de transcrito se calculó con la fórmula reportada en Pfaffl, 2001:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta Ct_{\text{blanco}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct_{\text{referencia}}(\text{control-muestra})}}$$

Donde:

E_{blanco} = Eficiencia de amplificación de ZmSWEET o de un gen blanco.

$\Delta Ct_{\text{blanco}}$ = La diferencia de Ct entre: Ct a tiempo 0 y Ct en otro tiempo del gen blanco.

$E_{\text{referencia}}$ = Eficiencia de amplificación del gen de referencia (Zm18s).

$\Delta Ct_{\text{referencia}}$ = La diferencia de Ct entre: Ct a tiempo 0 y Ct en otro tiempo de germinación del gen de referencia.

El método de Pfaffl (2001) permite considerar las diferencias en la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos. Otros métodos como Livak y Schmittgen, 2001 requieren que la eficiencia de amplificación sea cercana al 100 % y que no difieran más del 5 % entre la eficiencia del gen de referencia y el gen blanco.

Ambos genes de referencia (Zm18s y ubiquitina) mostraron un índice de amplificación constante en ambos tejidos a las diferentes horas de tratamiento (Ct cercanos a 18 ciclos). Se obtuvieron los índices de expresión de los diferentes SWEETs normalizados con ambos genes de referencia y se obtuvieron resultados similares. Por ello, en la sección de resultados solo se muestra la expresión relativa de los SWEETs normalizados con Zm18s.

Adicionalmente, se hizo un control usando las muestras de RNA como templado en la reacción de PCR de tiempo real (control no-RT), para determinar si había contaminación de gDNA en las muestras de los tejidos, que pudiera alterar la señal de amplificación. Se encontró que hubo amplificación en todas las muestras control no-RT, pero estas señales de amplificación fueron de 5 ciclos o más respecto a los Ct registrados en las muestras problema (Anexo III), únicamente se encontró una diferencia de Ct menor a 5 de las 96 mediciones totales, donde cada medición corresponde al duplicado de dos muestras biológicamente independientes (n=4).

Clonación de ZmSWEET4c, 6b, 11, 14b y AtSWEET12.

Amplificación de la región codificante.

Para amplificar por PCR la región codificante de los SWEETs reportadas en la base de datos EnsemblPlants para la línea de maíz B73 (B73_RefGen_v4. Kersey et al., 2018) se diseñaron oligonucleótidos sobre las regiones UTR 5' y 3' (Anexo II. Secuencia de oligonucleótidos). Se usó una polimerasa de alta fidelidad (Advantage HD Clontech, Takara). La mezcla de la reacción de 25 μ L contenía: Amortiguador Advantage HD 5x 5 μ L; dNTPs 2.5 mM 2 μ L; cDNA 2 μ L; oligonucleótido sentido 10 μ M 0.75 μ L; oligonucleótido antisentido 10 μ M 0.75 μ L; polimerasa HD Advantage 0.25 μ L; agua libre de nucleasas 14.25 μ L. Las condiciones de la reacción de PCR

fueron: desnaturalización inicial a 98 °C 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C 10 s, alineamiento a 60 °C 5 s y extensión a 72 °C 2 min; extensión final a 72 °C 10 min.

El producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 0.7 %. La banda obtenida en el peso esperado se cortó manualmente con una navaja y se procesó con el sistema comercial MiniElute Gel Extraction (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA recuperado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Adenilación del producto de la PCR

La polimerasa Advantage HD no genera adenilaciones en los extremos, por lo que el producto recuperado del gel se adeniló mezclando: amortiguador Taq-KCl+MgCl₂ 10x (Thermo Scientific) 1 μL, Taq DNA pol 5 U/ μL (Thermo Scientific) 1 μL, dATP 0.2 mM 0.4 μL, amplicón PCR 2 μL, MgCl₂ 1.5 mM 0.6 μL y agua libre de nucleasas 5 μL. La mezcla se incubó a 70°C durante 30 min.

Ligación al plásmido pGEM-T easy

El vector prelinearizado pGEM-T easy (Promega) contiene una timina 3' en sus extremos que permite ligar el producto de la PCR adenilado. El sitio de la ligación se encuentra dentro de la región codificante para el péptido α de la proteína β -glucosidasa. La inactivación de la β -glucosidasa por la inserción permite la identificación de colonias transformadas, que en el medio de selección (LB 25 g·L⁻¹, ampicilina 100 mg·L⁻¹, IPTG 0.5 mM, X-Gal 80 mg·L⁻¹, agar 1 %) presentarán una coloración blanca. Esto debido a que la β -glucosidasa será incapaz de hidrolizar el reactivo X-Gal, el cual tiñe a las colonias de azul al ser hidrolizado.

Para hacer la ligación se mezclaron: Rapid ligation buffer 2x (Promega) 5 μL , pGEM-T easy 50 ng 1 μL , amplicón adenilado 2 μL , T4 DNA ligasa 3U/ μL (Promega) 1 μL , agua libre de nucleasas 1 μL . La mezcla se incubó por 14 h a 4 $^{\circ}\text{C}$ o por 1 h a temperatura ambiente.

Se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α con el vector ZmSWEET-pGEM-T Easy. Para ello se mezclaron 50 μL de células *E. coli* competentes con 5 μL del amplicón ligado al plásmido. Se aplicó choque térmico de 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 50 s y de inmediato se incubó en hielo por 2 min. Se agregaron 950 μL de medio SOC (100 mL de Medio Hannahans Broth 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ suplementado con 1 mL de Glu 2 M). El cultivo se incubó por 1.5 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación constante. Después se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 50 μL del mismo medio. Los 50 μL se sembraron en placas de medio LB-agar/ampicilina/IPTG/X-gal. Las placas se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se eligieron 2 colonias blancas y se sembraron en 6 mL de medio LB adicionado con ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se incubó toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$ en agitación constante.

Se purificó el plásmido con el sistema comercial Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo un ensayo de digestión para comprobar que el inserto se ligó al plásmido. Los plásmidos se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT, UNAM. La secuencia se hizo en ambos sentidos empleando los oligonucleótidos universales T7 (5'-TAATAC GACTCA CTATAG GG-3'), y m13/PUC REVERSE (5'-TTGTGA GCGGAT AACAAAT TTC-3'). En el anexo IV se muestran los resultados de las secuenciaciones.

Subclonación de los SWEETs en el plásmido donador y de expresión.

Para determinar la localización subcelular y la especificidad por el azúcar que transporta cada SWEET es necesario subclonar los genes en diferentes vectores. La clonación se llevó a cabo mediante la tecnología GATEWAY, en la que primero se generó una clona de entrada y posteriormente se subclonó en los vectores de expresión apropiados. La tecnología Gateway está basada en el proceso de recombinación sitio específica del bacteriófago lambda que facilita la integración de su genoma en el cromosoma de *E. coli*.

La recombinación se produce en dos reacciones, la reacción BP que facilita la recombinación de un sustrato que presenta terminaciones attB (obtenido como un producto de PCR) con su sustrato attP (vector donador) para crear una clona de entrada attL. Esta reacción se cataliza por la mezcla de enzimas BP Clonasa. La segunda reacción es la LR que recombina los sitios attL con los sitios attR del vector de expresión, generando la clona de expresión (Figura 20).

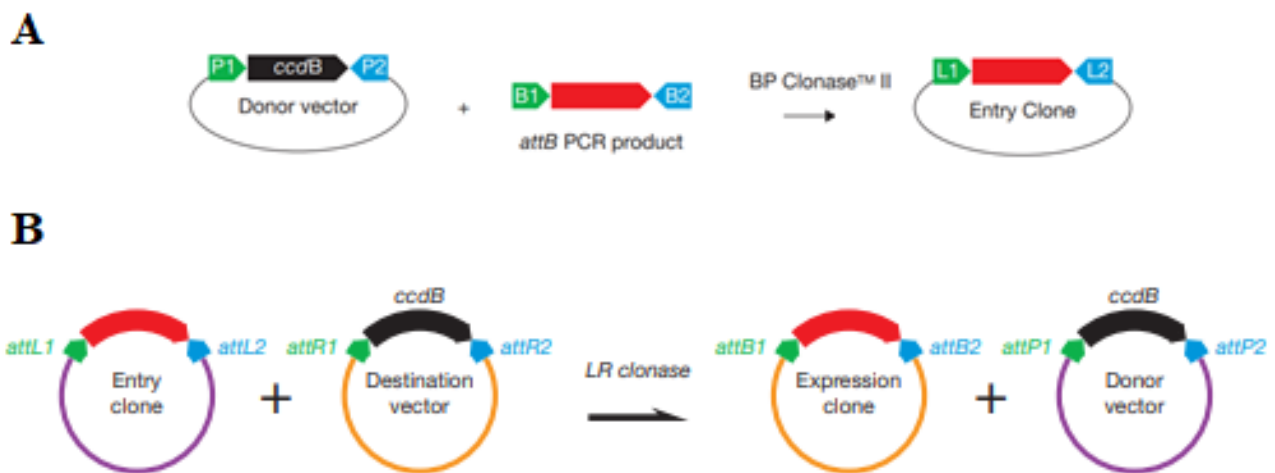


Figura 20. Reacciones de recombinación del sistema Gateway (Invitrogen). A) Reacción BP para la generación de la clona de entrada en un vector donador. B) Reacción LR para la generación de la clona de expresión. Tomado y modificado de: Gateway® cloning technology. The easy-to-use choice for everyday cloning. Thermofisher. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cloning/pdfs.par.1129.file.dat/CO33187%20Gateway%20brochure.pdf>

Para generar los sitios attB en el transcrito de los ORF de los SWEETs fue necesario realizar dos rondas de PCR. En la primera ronda se utilizaron oligonucleótidos que contienen una parte de la secuencia del sitio attB y una región homóloga para los extremos 5' y 3' de los SWEETs. En la secuencia antisentido, se eliminó el codón de paro del ORF de los SWEETs (Anexo II. Secuencia de oligonucleótidos). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 98 °C por 2 min, 35 ciclos a 98 °C por 10 seg, 60 °C por 5 seg y 72 °C por 2 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. El producto del PCR se resolvió en un gel de agarosa al 0.7% y se recuperó el DNA del gel como se mencionó anteriormente.

En la segunda ronda se empleó otro juego de oligonucleótidos que contienen la secuencia de la región attB faltante (F5'-GGG GAC AAG TTTGTA CAA AAA ACG AGG CTT C-3'. R5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3'), así se obtuvo el transcrito ORF de los SWEETs con las regiones attB 5' y 3' completas. Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización inicial a 98 °C por 2 min, 35 ciclos a 98 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg y 72 °C por 2 min. El producto del PCR se resolvió en un gel de agarosa al 0.7 % y se recuperó el DNA del gel como se mencionó anteriormente.

Los productos de PCR attB-ZmSWEET-attB purificados se insertaron en el vector donador pDONRTM221 mediante una reacción de recombinación: 150 ng del producto de PCR, 150 ng del vector pDNOR221, amortiguador 5x BP clonase 2 µL y amortiguador TE pH 8.0 c.b.p. 10 µL. Se mezcló en un vórtex y se le añadieron 2 µL de la mezcla de enzimas BP clonase (Invitrogen). La reacción se incubó por 2 h a 25 °C. Después de la incubación, se agregó 1 µL de proteinasa K (Invitrogen) y se incubó por 15 min a 37°C.

De la reacción anterior, se tomaron 5 μL para transformar *E. coli* DH5 α mediante choque térmico como se mencionó anteriormente. Las bacterias se sembraron en medio selectivo LB 24 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, kanamicina 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, agar 1% y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron dos colonias y se inocularon por separado en 6 mL de medio LB/kanamicina. Se obtuvo el plásmido como se describió anteriormente. Se comprobó la inserción de la secuencia de los SWEETs mediante ensayos de restricción y secuenciación con los oligonucleótidos universales M13 Forward y M13 Reverse.

Recombinación de SWEET-pDONR con los vectores de expresión.

Se utilizaron los siguientes vectores de expresión: para levadura: pAG426GPD-ccdb-EGFP y pDRF1-GW; para expresión en planta pEarleyGate103. Para ello se hizo la reacción LR con la clona de entrada. Se mezclaron 50 ng de vector de expresión, 2 μL de amortiguador LR Clonase (Invitrogen), amortiguador TE pH 8 c.b.p. 8 μL . La mezcla se agitó en un vórtex y se le agregaron 2 μL de la enzima LR clonaseTM II (Invitrogen). La reacción se incubó por 2 h a 25 °C y después se le agregó 1 μL de Proteinasa K (Invitrogen) para detener la reacción. La mezcla se incubó por 15 min a 37 °C.

Se tomaron 5 μL para transformar DH5 α como se describió anteriormente y las células transformadas se sembraron en medios selectivos de agar + antibiótico de selección según la resistencia de cada vector. El plásmido fue purificado como se mencionó anteriormente y se hizo un ensayo de restricción para verificar la presencia de la secuencia SWEET de interés.

Determinación de la localización de los SWEETs en levadura Saccharomyces cerevisiae W303.

Para la transformación de las diferentes cepas utilizadas en este trabajo se siguió el protocolo descrito por Agatep et al. (1998). De un cultivo fresco en caja Petri se inoculó una colonia en 5 mL de medio YP (yeast extract-peptone) adicionado con Glu estéril al 2% (YPG. Ver Anexo I. Preparación de soluciones). Se incubó toda la noche en agitación constante a 29 °C.

Al siguiente día se determinó el título del cultivo, para lo cual se hizo una dilución 1:10 del mismo cultivo en agua y se estimó la DO a 600 nm. Se calculó el número de células del cultivo tomando en cuenta que 1×10^6 células tendrían 0.1 DO.

En un matraz de 125 mL con 12 mL de medio YPG se inoculó el volumen necesario del primer cultivo para agregar 6.25×10^7 células. Se incubó a 29 °C en agitación constante hasta que la DO fue de 0.2 (aproximadamente 4.5 h). Se colectaron las células por centrifugación a 3500 g 10 min. El botón se lavó dos veces con 6 mL de agua estéril desionizada. El botón lavado se resuspendió en 1 mL de agua estéril desionizada y se centrifugó a 10,000 g 1 min. Finalmente, el botón se resuspendió en 1 mL de agua estéril desionizada.

Para la transformación, se preparó la mezcla de transformación T-mix (240 μ L de PEG 3500 50 %, 36 acetato de litio 1 M, 50 μ L DNA de esperma de salmón acarreador SSDNA 2 mg/mL. (Ver: Anexo I. Preparación de soluciones). El ssDNA se desnaturalizó previamente durante 10 min en baño maría con agua en ebullición y 5 min en hielo antes de agregarlo al T-mix. El T-mix se debe conservar en agua-hielo y ser mezclado en el vórtex antes de tomar una alícuota. Se agregaron

326 μL de T-mix en un microtubo que contenía 750 ng de DNA plasmídico disuelto en 34 μL de agua libre de nucleasas.

A cada microtubo con de T-mix+DNA plasmídico se le agregaron 100 μL de las levaduras resuspendidas y se mezcló por inversión 8 veces. Los microtubos se incubaron a 42 °C por 45 min, y cada 10 min se mezclaron por inversión 8 veces.

Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 10,000 g y el botón se resuspendió en 100 μL de agua estéril desionizada y se sembró en cajas Petri con medio sintético sin uracilo y Glu 2 %. (Ver: Anexo I: Preparación de soluciones) suplementado con maltosa estéril 2 %.

La construcción SWEET-pAG426GPD-cldb-EGFP se utilizó para determinar la localización de los SWEET en la levadura *S. cerevisiae* W303, una cepa silvestre. Las levaduras transformadas presentan auxotrofía por uracilo y pueden crecer en presencia de Glu por lo que se sembraron en un medio sintético adicionado con Glu. Las levaduras se transformaron como se explicó anteriormente y se incubaron de 3 a 4 días a 29 °C. Se seleccionaron 5 colonias y se inocularon en el medio selectivo líquido (medio sin agar). Se incubaron toda la noche a 29 °C en agitación constante. Como control de localización se utilizó al AtSWEET1 y la acuaporina 2 de maíz (PIP2), ambas proteínas de membrana plasmática que ya se habían clonado anteriormente en el laboratorio.

Al día siguiente, se tomó 1 mL del cultivo en un microtubo y se le agregó 10 μL de una solución de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del colorante de membranas FM464 (Thermo Fisher Scientific), este colorante a tiempos cortos tiñe membranas plasmáticas y a tiempos largos la vacuola. Se dejó incubando en

hielo por 5 min protegido de la luz. Se tomaron 10 μL que se pusieron en un portaobjeto y la preparación fue observada en el microscopio confocal con una $\lambda_{\text{ex}}=425$ y $\lambda_{\text{em}}=500$ para detectar la señal de GFP y de $\lambda_{\text{ex}}=558$ y $\lambda_{\text{em}}=734$ para detectar la señal del colorante FM464. Se tomaron 20 fotografías en Z y las imágenes se procesaron en el programa FV10-ASW 3.0 Viewer (Olympus Europa SE y Co.).

Ensayo de complementación para la caracterización del transporte de hexosas.

La construcción SWEET-pDRF1-Gw se usó para transformar levaduras EBY4000, las cuales carecen de transportadores de hexosas (Wieczorke et al., 1999). Las levaduras transformadas con el vector son capaces de crecer en medio selectivo sin uracilo adicionado con maltosa al 2 %, solamente aquellas levaduras que fueron complementadas con un SWEET que transporta específicamente Glu o Fru, crecerán en presencia de este azúcar. Se tomaron cinco colonias transformadas aisladas del medio sintético y se crecieron por separado en 5 mL del mismo medio líquido. Se incubaron toda la noche a 29 °C en agitación constante.

Al día siguiente, se inocularon 500 μL del cultivo en 2 mL y se incubaron hasta que llegaron a una $\text{DO}=0.5$ a 29 °C en agitación constante. Se hicieron diluciones seriadas en agua destilada de 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} . Se inocularon 10 μL de cada dilución en cajas Petri cuadradas con 30 mL de medio sintético sin uracilo y agar adicionado con maltosa 2 % como control de crecimiento, Glu 2 % y Fru 2 %. Las cajas se incubaron 3 días a 29 °C.

Ensayo de complementación para la caracterización del transporte de sacarosa.

Con los vectores SWEET-pDRF1-Gw se transformaron las levaduras SEY6210. Esta cepa carece de transportadores de Sac y de invertasas extracelulares (Robinson et al., 1988). Cuando es transformada con el vector pDRF1-Gw es capaz de crecer en el medio sintético sin uracilo adicionado con 2 % de Glu. Sólo las levaduras que fueron transformadas con un SWEET que transporta Sac crecieron en el medio selectivo adicionado con Sac.

Se aislaron levaduras transformadas del medio selectivo con Glu 2 % y se inocularon en medio selectivo líquido. Se hizo el ensayo de complementación como se describió anteriormente usando medio selectivo con Glu al 2 % como control de crecimiento, y otro con Sac 2 %.

Determinación de la localización de los SWEETs en hoja de maíz.

Para determinar la localización de los SWEETs en un sistema homólogo se transformaron secciones de lígula de maíz con el vector SWEET-pEarleyGate103 que permite la fusión de la secuencia de la proteína GFP en el extremo 5' del gen de interés. La transformación se hizo mediante biobalística siguiendo el protocolo reportado por (Kirienko et al., 2012) con modificaciones.

Para obtener las secciones de lígulas se sembraron semillas de maíz en peat-moss y se crecieron en condiciones de invernadero bajo fotoperiodo natural. Las plantas se cosecharon cuando tuvieron 6 hojas. Se cortaron las láminas y se extendió la parte de la hoja más próxima al tallo, correspondiente a la lígula. Las lígulas tienen la ventaja de presentar células con vacuolas pequeñas lo que facilita su transformación mediante biobalística (Kirienko et al., 2012).

Se cortaron manualmente secciones de 0.1x0.1 cm de lígula y se colocaron en cajas Petri de 5 cm de diámetro sobre medio MS 0.5 % agar, con el haz hacia arriba. Las cajas se incubaron en la obscuridad a temperatura ambiente durante una hora antes del bombardeo.

Para el bombardeo se usaron balas de Tungsteno M-10 Bio-Rad M10. Se prepararon de acuerdo con Kirienko et al., 2012 y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para el bombardeo, en condiciones de esterilidad, las balas se agitaron en el vórtex por 5 min para romper los aglomerados, se tomaron 50 µL, aproximadamente 5×10^7 balas, y se pusieron en el fondo del microtubo que se colocó de manera horizontal. En la pared del microtubo, se colocaron 6 µL del DNA plasmídico a una concentración de 1 mg/µL. Próximo al DNA se pusieron 50 µL de MgCl₂ 2.5 M. Al final se agregaron 20 µL de espermidina 0.1 M, con la gota de espermidina se arrastró el MgCl₂ y el DNA hacia las balas. La preparación se mezcló por pipeteo y se agitó en el vórtex por 1 min. Después se dejaron incubar por 5 min a temperatura ambiente.

La mezcla se enjuagó con 140 µL etanol: agua desionizada estéril 70:30 % por pipeteo, se centrifugó en una minifuga durante 3 min y se desechó el sobrenadante. Después se agregaron 140 µL de etanol absoluto, se resuspendió por pipeteo y se centrifugó por 3 min. El lavado con etanol absoluto se repitió dos veces. Se desechó el sobrenadante y las balas se resuspendieron en 50 µL de etanol absoluto.

Se colocaron 8 µL de la preparación anterior en los discos de bombardeo estériles (Bio-Rad) cuidando que se distribuyeran uniformemente y se dejaron secar a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad.

El bombardeo se realizó en un sistema de bombardeo PDS-100/HE (BioRad) con discos de ruptura de 1100 psi. Las cajas Petri con los tejidos se pusieron a una distancia de 12 cm del disco de bombardeo. La presión del vacío se llevó a 10000 psi para el disparo. Después del bombardeo, los tejidos se incubaron por 48 h en la oscuridad a temperatura ambiente.

Los tejidos transformados se observaron el microscopio confocal a una $\lambda_{ex}=425$ y $\lambda_{em}=500$ para detectar la señal de GFP. Se tomaron 20 fotografías en Z y las imágenes se procesaron en el programa FV10-ASW 3.0 Viewer (Olympus Europa SE y Co.). Para la captura de las imágenes se restó la señal de autofluorescencia de las paredes celulares ($\lambda_{ex}=350$ y $\lambda_{em}=550$) y de la clorofila ($\lambda_{ex}=620$ y $\lambda_{em}=800$).

Resultados

Duración de las fases de germinación de las semillas de maíz VS-535.

Las fases de germinación ocurren en diferentes tiempos de imbibición en cada tipo de semilla. En este estudio se utilizaron semillas de maíz variedad sintética VS535. La primera fase de la germinación se identificó entre las 0 y 18 h de incubación, en la cual se registró un incremento rápido en la ganancia de peso fresco y consumo de oxígeno. La segunda fase culmina con la protrusión de la radícula alrededor de las 30 h de incubación (Figura 21). Después de que la radícula emergió de la semilla, comenzó la etapa post-germinativa caracterizada por un incremento en el peso y en el consumo de oxígeno.

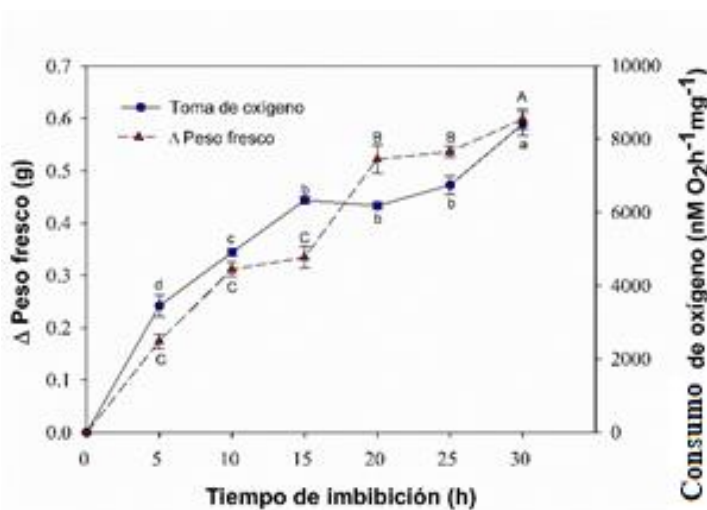


Figura 21. Curvas de toma de agua y consumo de oxígeno de embriones aislados de semillas incubadas en agar a diferentes tiempos. Los valores representan el promedio de tres muestras biológicas independientes \pm desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Los tiempos de incubación elegidos fueron 0 y 18 h para la fase I de germinación, 30 h para la fase II y 48 h para obtener muestras de la etapa de desarrollo post-germinativo (Figura 22). En todos estadios se determinaron el contenido de algunos metabolitos, la abundancia de los transcritos de los SWEETs y enzimas importantes en el metabolismo de carbono.



Figura. 22. Fotografías representativas de semillas en diferentes fases de germinación usadas en este estudio.

Durante la germinación, hay una conversión de reservas metabólicas por azúcares solubles.

Debido a la hidratación de la semilla, se restablece su actividad metabólica y las reservas de biomoléculas se movilizan hacia el eje embrionario para permitir su desarrollo. Para determinar cuáles eran los cambios que se producían en los tejidos embrionarios y poderlos relacionar con la abundancia de transcritos de los SWEETs, se compararon las variaciones de lípidos, almidón y azúcares solubles entre el escutelo y el eje embrionario en las tres etapas germinativas.

Degradación de lípidos en el escutelo.

El escutelo contiene lípidos como principal reserva, con alrededor de 30 a 40 % de su peso y que puede metabolizarse a azúcares, por lo que fue necesario determinar si su contenido cambiaba. Se observó que conforme avanza la germinación, el contenido de lípidos totales disminuye tanto en el eje embrionario como en el escutelo, aunque de manera diferente (Figura 23). En el eje embrionario se registró una disminución paulatina, con la reducción (35%) más acentuada entre 1 h y 3 h de imbibición. En cambio, en el escutelo ocurrió una reducción del 58 % a 1 h de imbibición, y a tiempos posteriores la cantidad de lípidos presentes en el escutelo permaneció constante hasta las 30 h de imbibición.

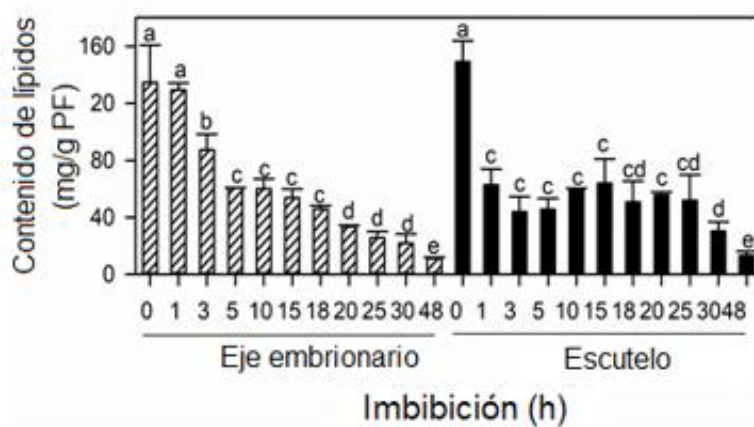


Figura 23. Contenido de lípidos totales en el eje embrionario y en el escutelo de semillas incubadas a diferentes tiempos. Las barras representan el promedio de triplicados de dos muestras biológicamente independientes \pm DS.

Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

La acetil coenzima A producto de la degradación de lípidos en la semilla puede metabolizarse a través del ciclo del glioxilato, ruta metabólica esencial en la obtención de carbohidratos a partir de lípidos. Existen dos enzimas claves del ciclo del glioxilato: la isocitrato-liasa (ICL EC 4.1.3.1)

que forma succinato y glioxilato a partir del isocitrato, y la malato sintasa (MLS EC 4.1.3.2) que condensa al glioxilato con acetil-coA para formar malato. El succinato y el malato pueden exportarse del glioxisoma y ser utilizados en el ciclo de Krebs, mientras que el oxaloacetato formado se puede convertir en carbohidratos mediante la gluconeogénesis (Penfield et al., 2006; Tan-Wilson y Wilson, 2012; Ma et al., 2016).

Para saber si de manera paralela a la degradación de lípidos observada en los tejidos se activaba el ciclo del glioxilato, se evaluó la expresión de la *MLS1* en diferentes horas de germinación. Se observó que aumentó el nivel de transcritos para la enzima principalmente en el escutelo desde las 18 h de imbibición, mientras que, en el eje embrionario, no hubo cambios significativos en la expresión a lo largo de la germinación (Figura 24). Lo anterior podría estar relacionado a una activa síntesis de carbohidratos a partir de reservas lipídicas en el escutelo que podrían ser exportados hacia el eje embrionario como nutrientes. No hubo cambios significativos en la expresión de *MLS* en el eje embrionario.

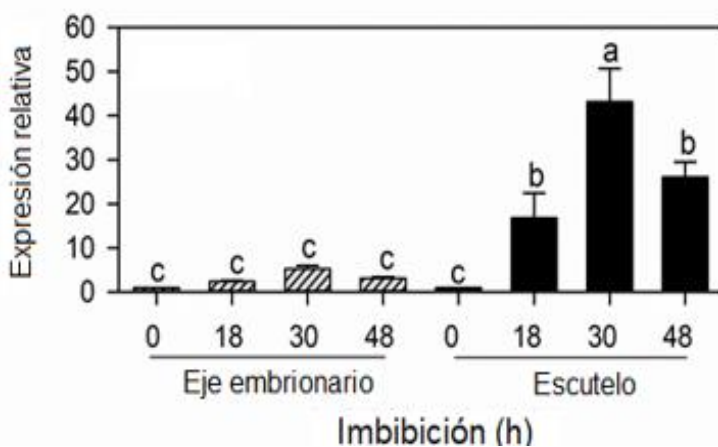


Figura. 24. Expresión relativa de *MLS* en eje embrionario y escutelo de semillas incubadas a diferentes tiempos determinada por RT-qPCR. Las barras representan el promedio de triplicados de dos muestras biológicamente independientes \pm DS. La expresión de los genes se normalizó con el gen constitutivo 18s y se tomó como control el nivel de expresión en el tejido a 0 h de germinación. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Durante la germinación aumentó la expresión de sacarosa fosfato sintasa SPS y del transportador de sacarosa *SUT1*.

Debido al aumento en la expresión de *MLS*, es posible que también hubiera un incremento en la actividad de síntesis de sacarosa, para evaluar esta posibilidad se determinaron los niveles de transcrito de la SPS, enzima clave en la síntesis de sacarosa, que produce Sac 6-fosfato a partir de UDP-Glu. La SPS, además de ser abundante en tejidos fotosintéticos, también presentan actividad en los tejidos no fotosintéticos, como las semillas de maíz (Im, 2004). Encontramos que en el escutelo la transcripción del gen es significativamente mayor a la observada en el eje embrionario y que su expresión aumenta con el progreso de la germinación (Figura 25). Probablemente el aumento en los niveles de transcritos para la SPS en el escutelo fue en respuesta a la necesidad de sintetizar más Sac en ese tejido a partir de las reservas de lípidos presentes en la semilla, para sostener el metabolismo y señalización de la plántula en desarrollo.

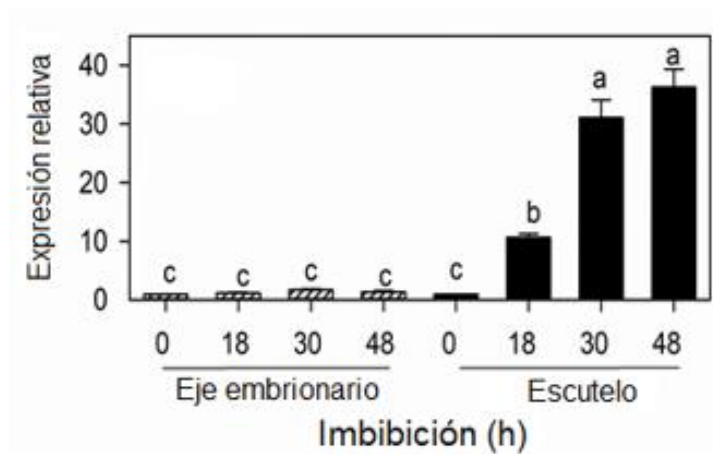


Figura. 25. Expresión relativa de *SPS* en eje embrionario y escutelo de semillas incubadas a diferentes tiempos determinada por RT-qPCR. Las barras representan el promedio de triplicados de dos muestras biológicamente independientes \pm DS. La expresión de los genes se normalizó con el gen constitutivo 18s y se tomó como control el

nivel de expresión en el tejido a 0 h de germinación. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

La Sac es considerada como la principal forma de carbohidrato que es traslocada en semillas de cereales (Im, 2004), por lo que se esperaba que hubiera una mayor cantidad de transportadores de este disacárido en los tejidos del embrión. Uno de los transportadores que se ha identificado en los tejidos embrionarios en la germinación son los simportadores Sac/H⁺, en maíz el más abundante y con mayor actividad es el SUT1 (Sánchez-Linares et al., 2012). El análisis de la expresión de ZmSUT1 mostró un incremento en los transcritos del gen en el eje embrionario en la fase III de la germinación, mientras que, en el escutelo el incremento en la expresión fue gradual desde la fase II de la germinación (Figura 26). Estas diferencias podrían estar relacionadas a la presencia de azúcares disponibles para ser transportados entre los tejidos de la semilla.

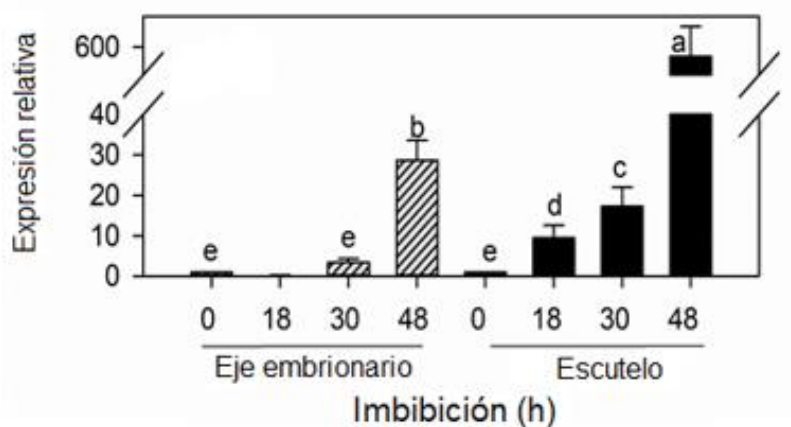


Figura. 26. Expresión relativa de *SUT* en eje embrionario y escutelo de semillas incubadas a diferentes tiempos determinada por RT-qPCR. Las barras representan el promedio de triplicados de dos muestras biológicamente independientes \pm DS. La expresión de los genes se normalizó con el gen constitutivo 18s y se tomó como control el nivel de expresión en el tejido a 0 h de germinación. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Cambio en el contenido de azúcares solubles durante la germinación.

Para evaluar el perfil de carbohidratos solubles presentes en los tejidos del embrión se determinó la cantidad de Glu, Fru y Sac. Se obtuvo que el principal azúcar acumulado en los tejidos es la Sac (Figura 27A). El contenido de Sac disminuyó conforme avanzó la germinación, y esta reducción también se observó en el escutelo, pese a que aumentó la transcripción de las enzimas *MLS* y *SPS*, claves en el ciclo del glioxilato y en la síntesis de sacarosa respectivamente. Se esperaba que debido a la disminución en la cantidad de Sac en el escutelo hubiera un incremento proporcional en la cantidad de hexosas, sin embargo, se observó que tanto la Glu como la Fru se mantuvieron en niveles similares durante el periodo germinativo y sólo posterior a las 30 h la cantidad de ambas hexosas disminuyó notablemente (Figura 27B). Por el contrario, en el eje embrionario se encontró que el contenido de hexosas aumentó a las 18 y 30 h y luego se redujo a las 48 h.

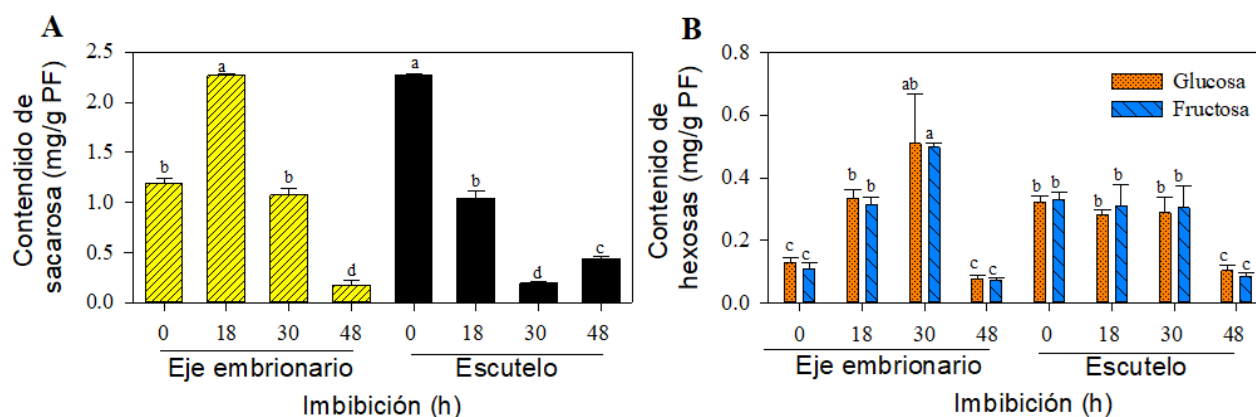


Figura 27. Contenido de azúcares solubles en eje embrionario y escutelo de semillas incubadas a diferentes tiempos.

Las barras representan el promedio de triplicados de dos muestras biológicamente independientes \pm DS. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Contenido de almidón en los tejidos del embrión durante la germinación.

El incremento en el contenido de hexosas y sacarosa en el eje embrionario se podría explicar por un aumento en la degradación del almidón, puesto que los tejidos embrionarios de maíz contienen gránulos de almidón (Zhao et al., 2018). Para probar si este almidón es utilizado durante la germinación, analizamos la abundancia de los transcritos para la α -amilasa y el contenido de almidón a las diferentes horas. Observamos que la transcripción de α -amilasa aumentó en las horas correspondientes a la fase III de germinación, cuando la radícula emergió de la semilla (Figura 28A) y corresponde a la disminución de almidón detectado a las 48 h de imbibición (Figura 28B). Por lo tanto, el incremento de hexosas en las primeras horas de imbibición en el eje embrionario está relacionado con la disponibilidad de Sac y su metabolismo en los tejidos embrionarios y no con la degradación de las reservas de almidón presentes.

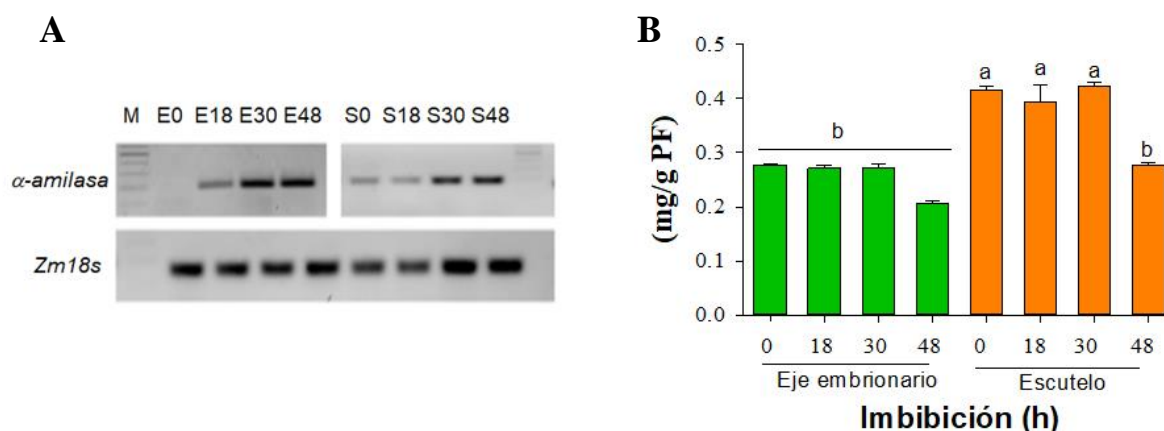


Figura 28. Expresión de α -amilasa (A) y contenido de almidón en los tejidos embrionarios (B). A) Se muestran los transcritos de α -amilasa y del gen de referencia 18s en el eje embrionario E, o escutelo S a diferentes horas de incubación. B) Las barras representan el promedio del contenido de almidón por triplicado de dos muestras biológicamente independientes. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Transporte de azúcares durante la germinación en los tejidos embrionarios.

Para que los azúcares lleguen al tejido demanda, pueden usar dos vías de transporte, la simplástica y la apoplástica. En la primera vía, se requieren conexiones citoplasmáticas entre las células para permitir el paso de moléculas, mientras que en la segunda vía es necesaria la presencia de proteínas transportadoras en la membrana plasmática. Durante la germinación se espera un movimiento masivo de azúcares, por lo que la actividad de los transportadores difusionales de la membrana plasmática puede ser fundamental.

Se observó que, en presencia de los inhibidores, la toma de azúcares disminuyó, lo cual sugiere que, en ambos tejidos del embrión, tanto los transportadores activos como los difusionales contribuyen a la toma de carbohidratos (Figura 29). Después de añadir los inhibidores del transporte activo, la toma de Glu y Sac difusional representó más del 50 % del total de la toma de azúcares en el eje embrionario y en el escutelo, excepto en la toma de Sac en el eje embrionario a 0 y 30 h y en el escutelo a las 30 h (Figura 29B). El eje embrionario mostró mayor actividad de toma de Glu y Sac que el escutelo. La actividad de toma difusional más alta fue a las 18 h de imbibición, lo que coincide con el contenido de Sac del tejido (Figura 29D).

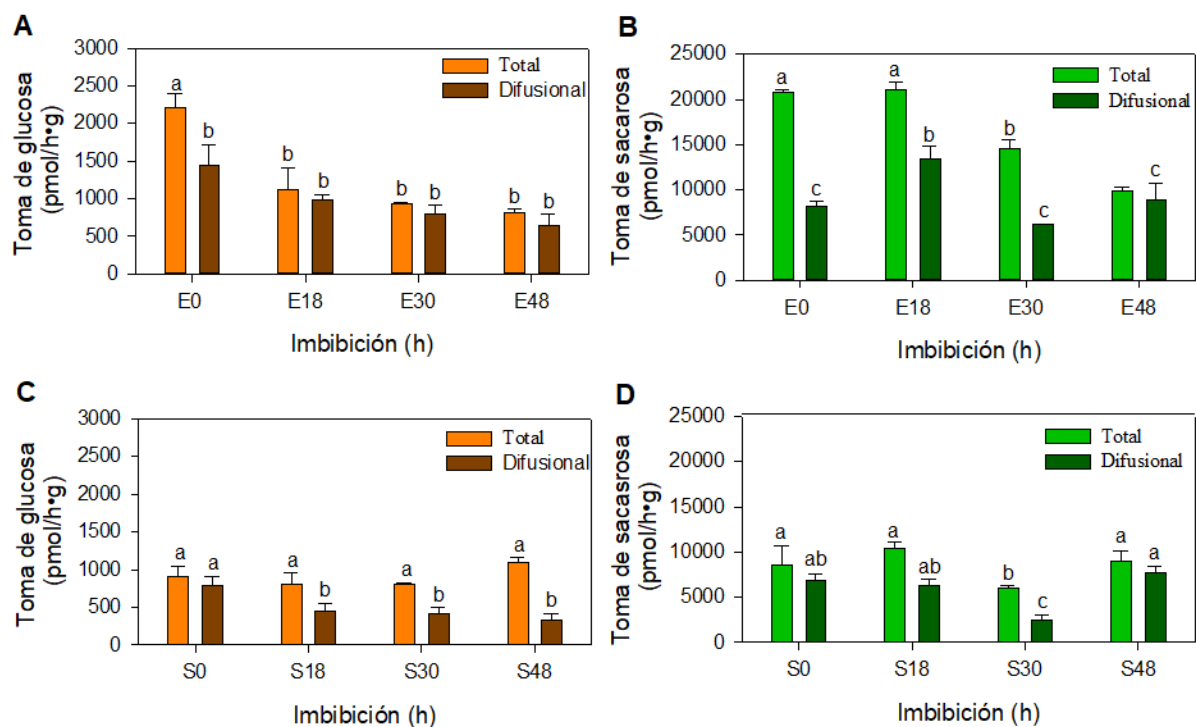


Figura. 29. Actividad de toma de azúcares de eje embrionario (E) o escutelo (S) de semillas incubadas a diferentes tiempos. Las barras claras representan la toma total de Glu (A y C) y toma de Sac (B y D), mientras que las barras oscuras muestran la toma de azúcares en presencia de inhibidores de transportadores activos, por lo que corresponden a la toma difusional de azúcares. Nótese las escalas de los ejes Y entre las gráficas. Los valores mostrados representan el promedio de tres muestras independientes. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Expresión de diferentes SWEETS el eje embrionario y el escutelo durante la germinación.

Una de las vías por donde el azúcar se puede mover de manera difusional es a través de las conexiones citoplasmáticas plasmodesmata que representa un continuo citoplasmático intercelular. La otra vía es a través de los transportadores difusionales de membrana plasmática tipo SWEETs.

Se determinó la expresión mediante RT-PCR de 14 de las 22 isoformas de ZmSWEETs en ejes y escutelos disectados de semillas germinadas a diferentes tiempos. De acuerdo con el patrón de la intensidad de las bandas, los *ZmSWEETs* se clasificaron en tres grupos:

- 1) *ZmSWEETs* que muestran un incremento de su expresión durante la germinación: 3b, 4b, 4c, 6b, 11, 12a, 13a, 13b y 14a (Figura 30).

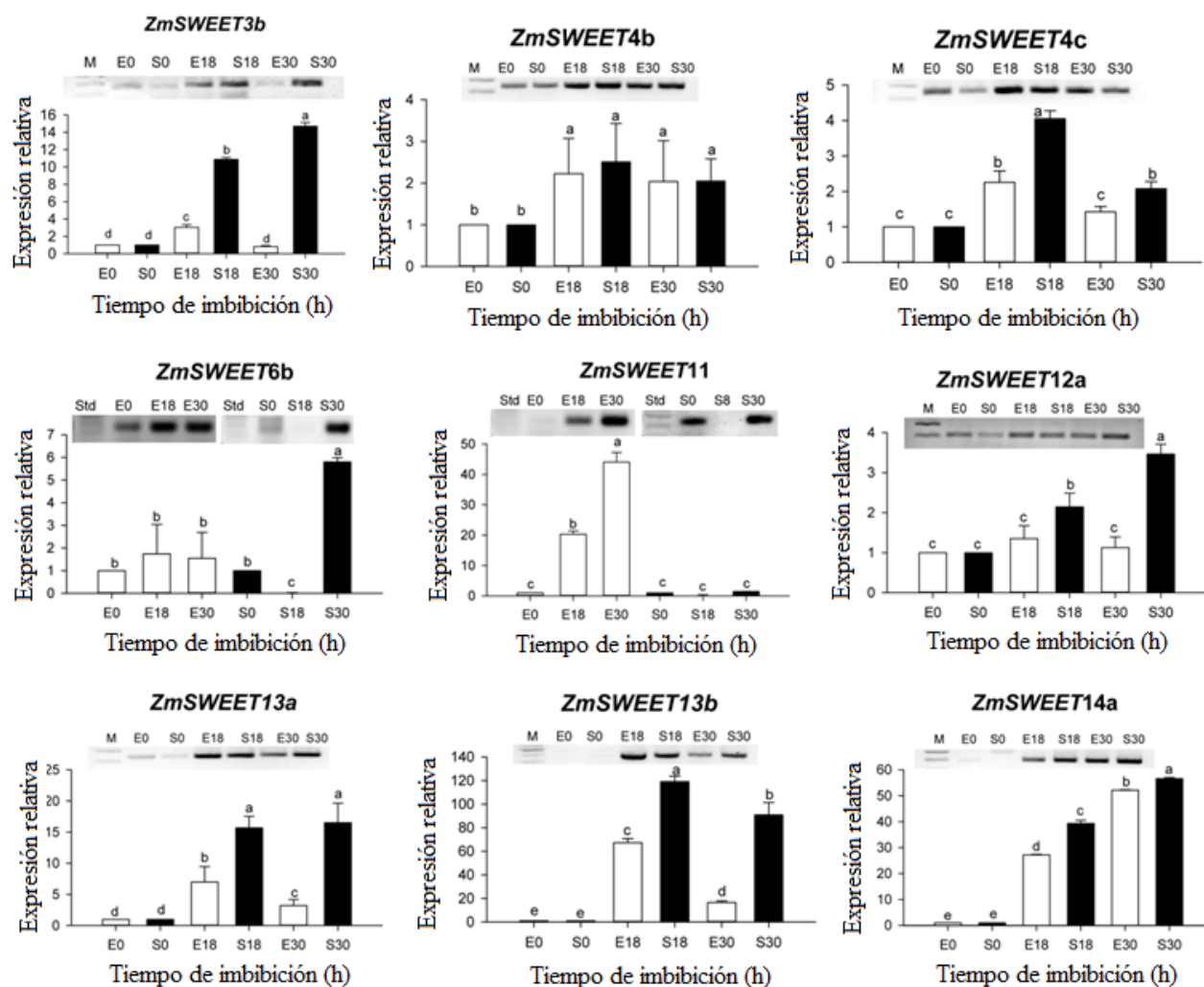


Figura. 30. Densitometría de expresión de *ZmSWEETs* por RT-PCR en eje embrionario (E) o escutelo (S) de semillas incubadas a diferentes tiempos. Los valores de densitometría fueron normalizados con el tiempo 0 de cada tejido. Las barras representan el promedio de tres muestras biológicas independientes. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

- 2) *ZmSWEET*s que sólo se expresan en etapas post-germinativas: *ZmSWEET14b* (Figura 31).

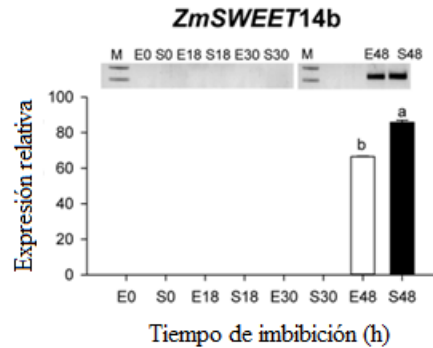


Figura 31. Densitometría de expresión en eje embrionario (E) o escutelo (S) de semillas incubadas a diferentes tiempos. Los valores de densitometría fueron normalizados con el tiempo 0 de cada tejido. Las barras representan el promedio de tres muestras biológicas independientes. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

- 3) *ZmSWEET*s sin cambios durante la germinación: 1b, 2, 15a y 17 (Figura 32).

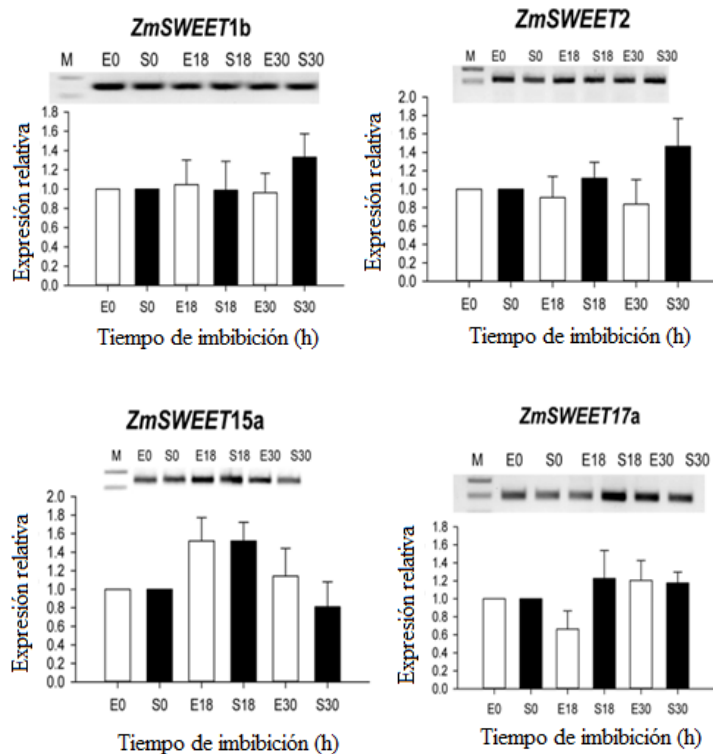


Figura 32. Densitometría de expresión en eje embrionario (E) o escutelo (S) de semillas incubadas a diferentes tiempos. Los valores de densitometría fueron normalizados con el tiempo 0 de cada tejido. Las barras representan el promedio de tres muestras biológicas independientes. No se encontraron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Se seleccionaron genes de cada grupo para analizar su expresión mediante RT-qPCR: *ZmSWEET*4c, 6b, 11, 12a, 13a, 13b, 14b y 15a (Figura 33). Los *SWEET*s más expresados en el eje embrionario y en escutelo fueron los *ZmSWEET*4c y 13a.

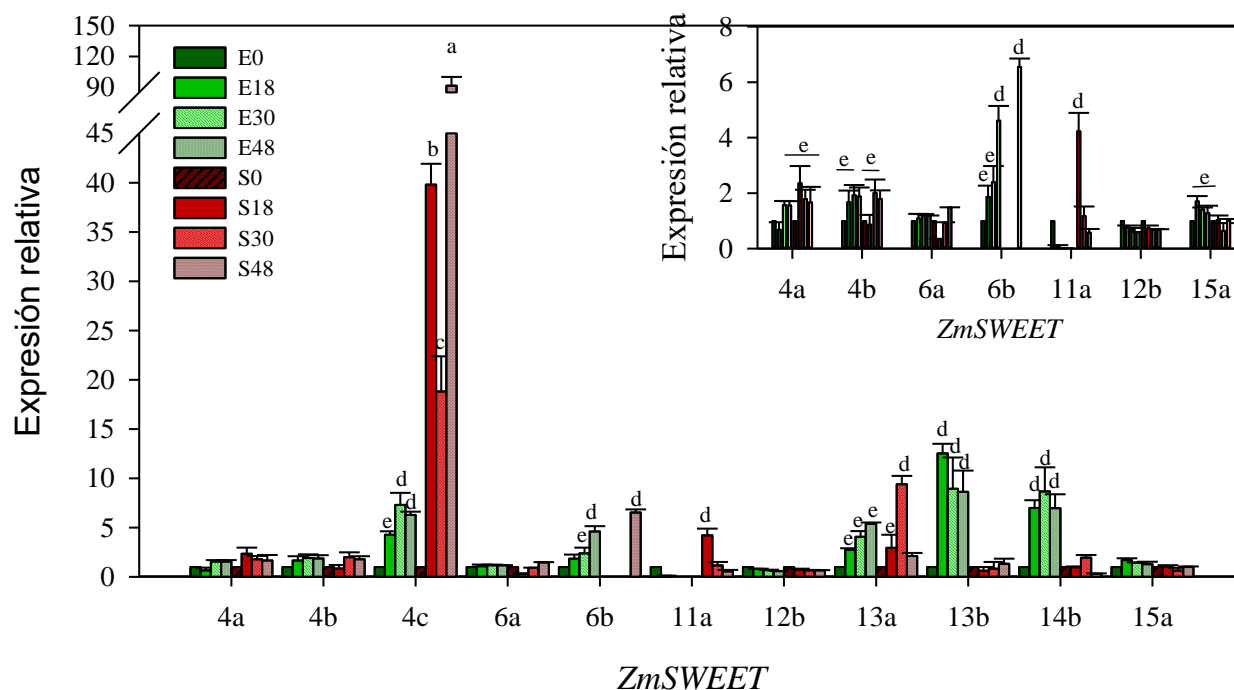


Figura. 33. Expresión de *ZmSWEET*s medido por RT-qPCR en eje embrionario E (en verde) o escutelo S (en rojo) de semillas incubadas a diferentes horas. Las barras representan el promedio del triplicado de dos muestras biológicas independientes. Para el cálculo de la expresión se utilizó al gen de referencia 18s y el tiempo 0 de incubación se tomó como control. Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$. El gráfico insertado muestra un acercamiento de los *ZmSWEET* con menor expresión que no se aprecian en el gráfico principal.

Se encontraron diferencias en los patrones de expresión entre los tejidos. En el eje embrionario, los *ZmSWEET*s muestran tendencia a incrementarse, con excepción del 12b. Por otra parte, en el escutelo los *SWEET*s mostraron una tendencia variable. Se encontró expresión diferencial, como

el *ZmSWEET6b* que se expresó en el eje embrionario durante la germinación y post-germinación, pero no así en el escutelo, en donde se detectó una alta expresión sólo a las 48 h. Un comportamiento similar se observó en el *ZmSWEET11*, sus transcritos fueron muy abundantes en el eje embrionario y no así en el escutelo. Los genes de *ZmSWEETs* analizados pertenecen a los clados II y III, lo que sugiere que podrían participar en el transporte de Glu o Sac en ambos tejidos embrionarios.

Caracterización funcional de los transportadores SWEETs expresados durante la germinación.

En maíz han sido caracterizados únicamente los *ZmSWEET4c* y 13a, b y c. El *ZmSWEET4c* es un transportador de Glu localizado en la membrana plasmática y su participación es necesaria en el llenado de la semilla durante la embriogénesis del maíz (Sosso et al., 2015). Los parálogos de *ZmSWEET13*, también localizados en la membrana plasmática, transportan Sac y junto al *ZmSUT1*, son importantes para el cargado del floema del maíz (Bezruczyk et al., 2018a; Braun y Slewinski, 2009).

Clonación de *SWEET4c*, 6b, 11 y 14b y análisis *in silico* de las secuencias clonadas.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de los *SWEETs* se seleccionaron los *ZmSWEET6b* y 14b por su patrón de expresión en el escutelo y a *ZmSWEET11* por su abundancia y expresión en el eje embrionario. Se clonaron los respectivos cDNAs de estos genes para investigar su localización subcelular, así como su capacidad de transportar hexosas o Sac. Como controles de localización y transporte se clonaron los *ZmSWEET4c* (transportador de membrana

plasmática de Glu) y AtSWEET12 (transportador de membrana plasmática de Sac), además se usó el AtSWEET1 (transportador de membrana plasmática de Glu) que ya se había obtenido en el laboratorio anteriormente.

Con la finalidad de determinar si las secuencias clonadas codificaban para un posible transportador SWEET, las secuencias de aminoácidos predichas se analizaron contra la base de datos Pfam (Finn et al., 2014) para determinar si las secuencias tenían los motivos MtN3 característicos de los SWEETs (Ver Anexo V. Análisis de secuencias *in silico*). En todas las secuencias predichas se identificaron los dos motivos MtN3. Además usando el servidor TMHMM (Krogh et al., 2001) se predice que los transportadores SWEETs tienen 7 cruces transmembranales. Mediante el servidor I-Tasser (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008) se obtuvo la predicción de la estructura terciaria de los SWEETs usando como molde la estructura cristalográfica del AtSWEET13, código PDB 5XPD (Figura 34), por lo que es posible que las secuencias clonadas efectivamente codifiquen proteínas transportadoras de azúcares.

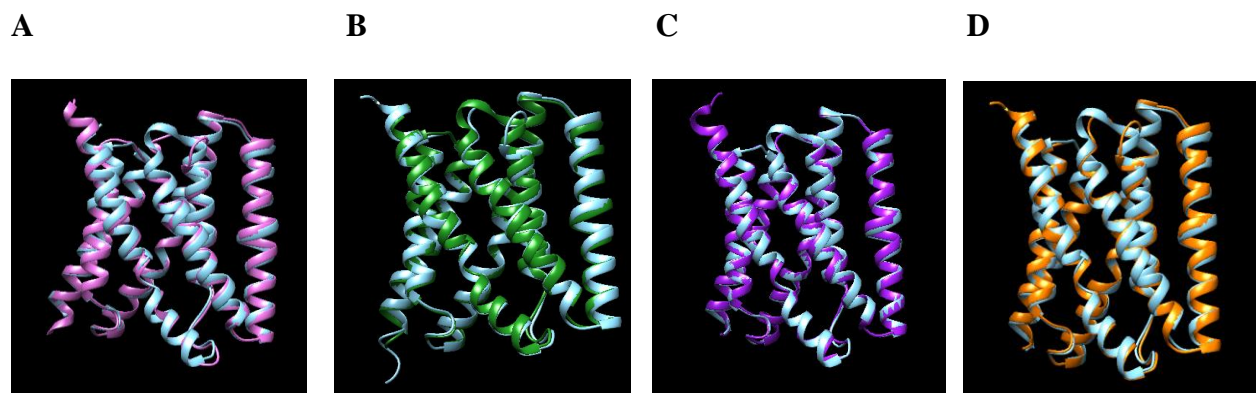


Figura 34. Comparación entre las estructuras terciarias predichas de los ZmSWEETs clonados en este trabajo, modeladas sobre la estructura cristalográfica del AtSWEET13, que aparece sobrepuesta en color cian en todos los modelos.

ZmSWEET4c, 6b, 11 y 14b se localizan en la membrana plasmática.

Para determinar la localización subcelular de los SWEETs elegidos, se obtuvieron los ZmSWEET fusionados con la proteína GFP en el carboxilo terminal. Se observó la co-localización de la señal de GFP con el colorante de membrana en las levaduras transformadas (Figura 35). Los controles AtSWEET1 y 12 y la acuaporina *PIP2*, tuvieron la localización esperada en la membrana plasmática.

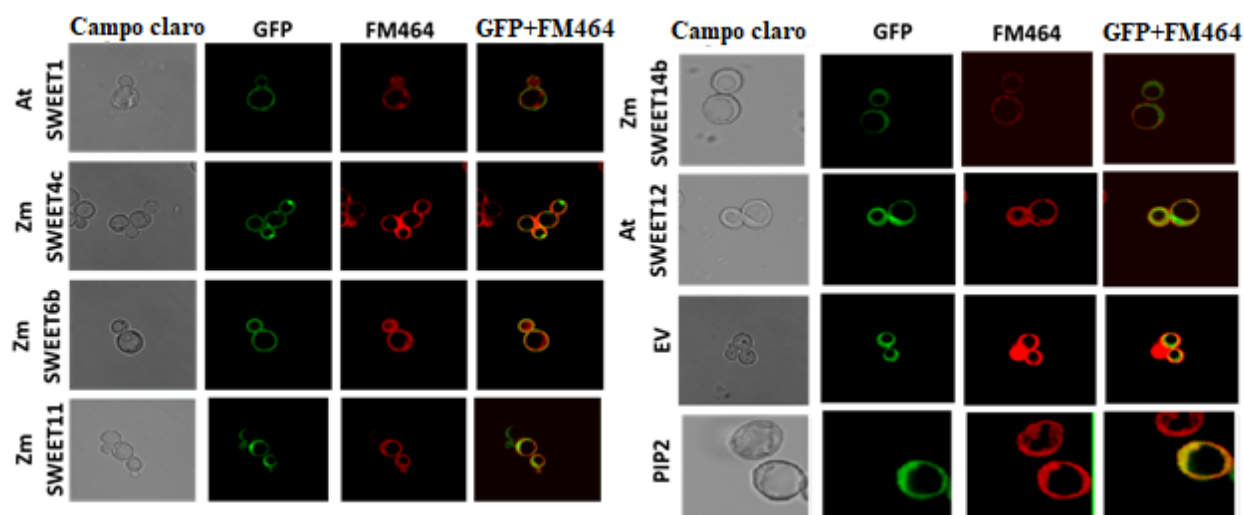


Figura. 35. Localización de los ZmSWEETs en levaduras W303. Para cada construcción se presenta el campo claro, la fluorescencia emitida por GFP (emisión = 509 nm), la fluorescencia emitida por FM-464 (emisión= 630 nm) y la sobreposición. EV= vector vacío, PIP2= acuaporina 2.

La localización en la membrana plasmática se corroboró usando el sistema homólogo, tejido de lígulas de maíz, que es la parte de la hoja que está próxima al tallo de la planta. Se transformaron secciones de lígulas mediante biobalística En las lígulas transformadas con los SWEETs de maíz

se observó un patrón de GFP similar al del SWEET12 de *Arabidopsis* usado como control de localización (Figura 36).

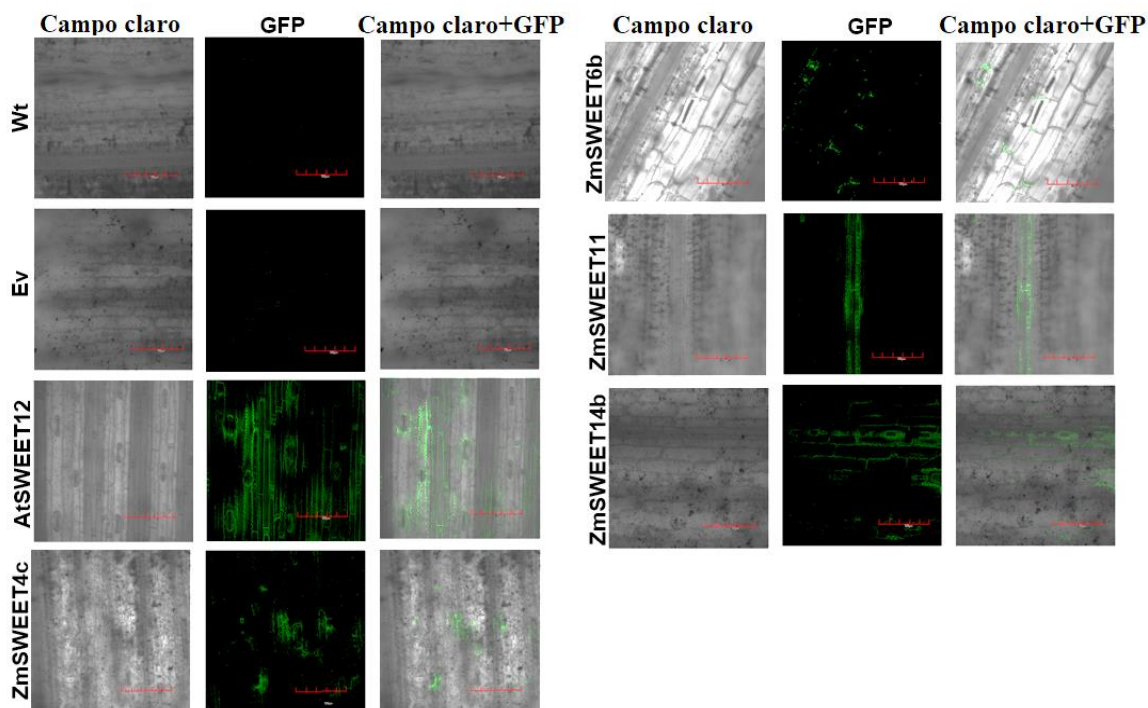


Figura 36. Localización de ZmSWEET4c, 6b, 11, 14b y AtSWEET12 en la membrana plasmática de lígulas de maíz. WT tejido silvestre, Ev vector vacío pEarley-Gate 103. Todas las proteínas estaban fusionadas a GFP en la región carboxilo terminal.

El ZmSWEET6b transporta glucosa y los ZmSWEET11 y 14b sacarosa.

Con los SWEETs clonados, se transformó la cepa de levadura mutante EBY4000, la cual carece de transportadores de hexosas de membrana plasmática por lo que es incapaz de crecer en presencia de Glu o Fru como fuente de carbono, al menos que alguno de los SWEETs complemente esta función. Las levaduras que expresaron el AtSWEET1, ZmSWEET4c y 6b crecieron en

presencia de Glu, y el ZmSWEET4c también permitió el crecimiento en Fru. Los ZmSWEET11, AtSWEET12 y ZmSWEET14b no complementaron la función de transporte de hexosas (Figura 37).

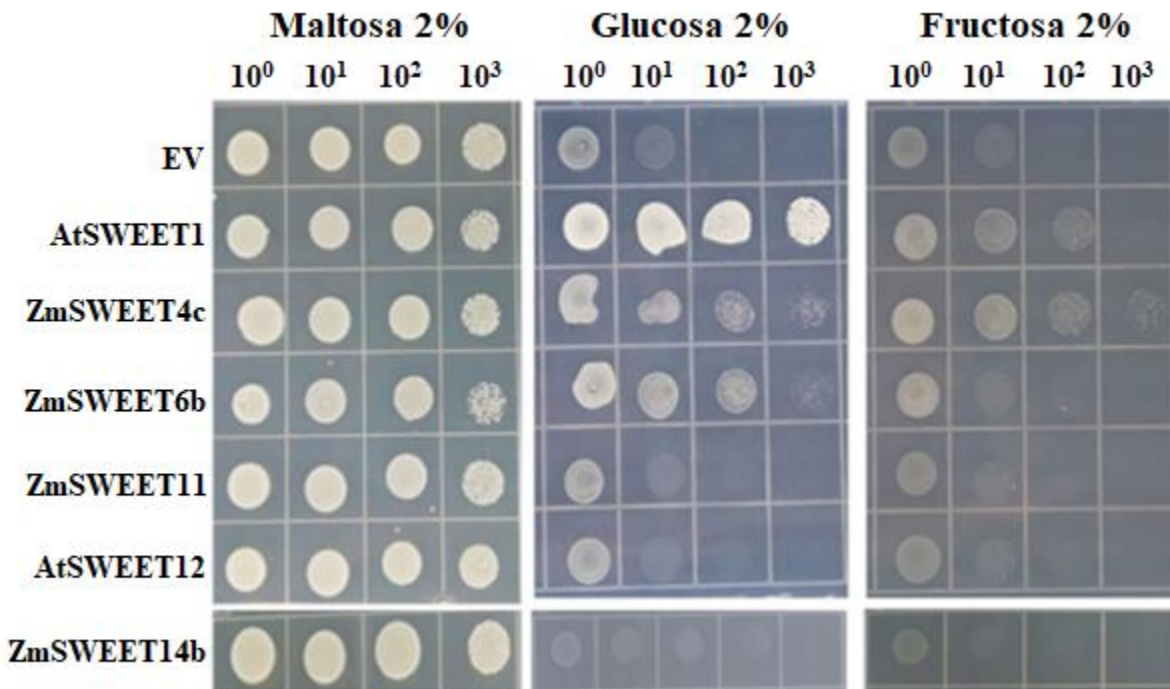


Figura 37. Ensayo de complementación de levaduras EBY4000 con SWEETs. EV vector vacío pDRF1-GW. Fotografías de cultivos de 72 h.

El transporte de Sac se estudió en la cepa de levadura SEY6210, la cual carece de transportadores de Sac localizados en la membrana plasmática y también carecen de la invertasa extracelular, por lo que la levadura no puede crecer en presencia de Sac como fuente de carbono. Las levaduras que expresaron al ZmSWEET4c y ZmSWEET6b no crecieron en presencia de este

carbohidrato, pero los ZmSWEET11, 14b y AtSWEET12 si permitieron el crecimiento, por lo que concluimos que estos SWEETs transportan Sac (Figura 38).

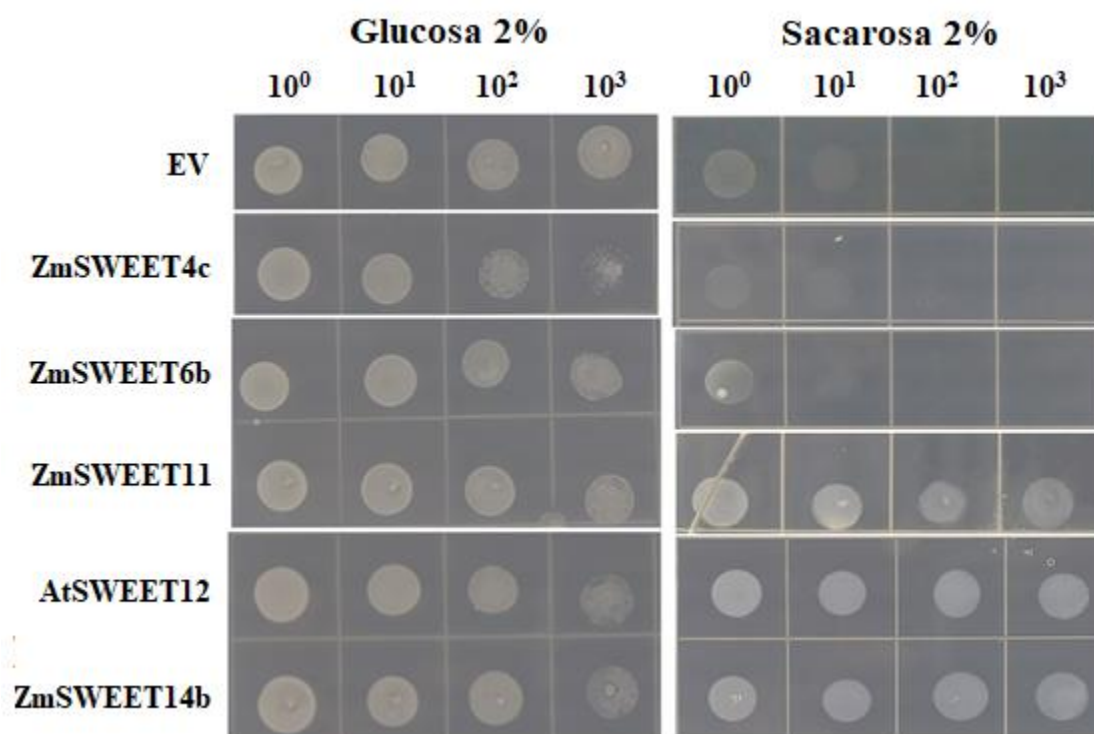


Figura 38. Ensayo de complementación de levaduras SEY6210 con SWEETs. EV vector vacío pDRF1-GW.

Fotografías de cultivos de 72 h.

En resumen, los SWEETs más abundantes en ambos tejidos embrionarios fueron el 4c y algunos miembros de la familia 13, el 13a y 13b. El primero es un transportador de glucosa de membrana plasmática (Sosso et al., 2015) y los segundos son transportadores de sacarosa de la membrana plasmática (Bezruczyk et al., 2018). También hubo otros transcritos abundantes, en el eje embrionario, como el SWEET11, transportador de sacarosa encontrado en la membrana plasmática. En contraste, en el escutelo hay un nivel abundante de transcritos de SWEET6b y 14b, el primero transportador de hexosas y el segundo de sacarosa, ambos de membrana plasmática.

Discusión

Relación de las etapas de hidratación de la semilla con su metabolismo de carbono.

Durante la germinación se requiere de una gran cantidad de energía para sostener los procesos fisiológicos, y debido a la falta de un aparato fotosintético o un sistema que permita la absorción de minerales, la germinación de las semillas depende de la movilización de sus reservas (Yu et al., 2014).

En sentido estricto la germinación abarca la fase I y II de la curva de hidratación de la semilla (Bewley y Black, 1994), antes de la emergencia de la radícula. Las diferencias morfológicas de las semillas propias de cada especie impactan en la germinación, así como las características particulares de los distintos genotipos dentro de una especie. Por esto fue necesario determinar los tiempos de imbibición adecuados correspondientes a las etapas de germinación del genotipo de maíz utilizado en este trabajo. Se trazó la curva de absorción de agua y consumo de oxígeno de las semillas durante la germinación y estimamos que la fase I de absorción de agua por el embrión se encuentra entre las 0 y 18 h de imbibición, mientras que la fase II ocurre entre las 18 y 30 h. Los valores fueron diferentes a los observados por Sánchez-Linares et al. (2012), en donde estudiaron la germinación de embriones aislados de la raza de maíz Chalqueño en el cual, la transición entre la fase II y III fue a las 18 h. Las diferencias en tiempo pueden deberse a las características propias de cada genotipo de maíz, como la impermeabilidad de la testa, la composición del pericarpio y de las reservas, ya que son las principales barreras físicas para la absorción del agua y para la emergencia de la radícula (Nonogoki, 2008, Sánchez-Linares et al., 2012). Se ha reportado que la germinación del embrión de maíz Chalqueño termina a las 24 h y la semilla completa del maíz

Chalqueño germina en 60 h (Sánchez-Linares et al., 2012), mientras que semillas de las líneas B73 y Mo17 germinan en 36 h (Feenstra et al., 2017). Con los resultados obtenidos de la toma de agua y de consumo de oxígeno se escogieron los tiempos de germinación 0, 18, 30 y 48 h que fueron usados para análisis posteriores.

En los embriones hubo un incremento en la respiración a las 5 h de imbibición. De acuerdo con reportes anteriores, el incremento en la respiración encontrado durante las primeras horas de imbibición de las semillas es debido a la ganancia de funciones mitocondriales (Rosental et al., 2014). Si bien las mitocondrias extraídas de semillas secas, son capaces de oxidar sustratos como el succinato y NADH y producir ATP (Rosental et al., 2014), la ganancia de actividad mitocondrial depende de la síntesis activa de proteínas (Logan et al., 2001) y contribuye al incremento de metabolitos pertenecientes al ciclo de ácidos tricarboxílicos. Por ello el consumo de oxígeno es un indicador importante del inicio de la actividad metabólica. Sin embargo, en diferentes especies de plantas el metabolismo de las reservas metabólicas y por lo tanto su movilización comienza en diferentes tiempos y órganos durante la germinación (Sreenivasulu et al., 2008). En trigo, la expresión de genes relacionados a vías del metabolismo energético como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena de transporte de electrones, se incrementa a las 36 horas de imbibición, indicando la actividad respiratoria y mitocondrial (Yu et al., 2014).

Para promover la germinación, las semillas de las plantas monocotiledóneas, incluidos los cereales, tienen umbrales de oxígeno más bajos en comparación con las semillas de plantas dicotiledóneas, además la tasa de germinación de este tipo de semillas no está relacionada con el consumo de oxígeno (Rosental et al., 2014). Para explicar la obtención de energía en este escenario

se han propuesto vías alternas como la fermentación y la vía Perl. A partir de la fermentación es posible obtener ATP, sin embargo, la obtención de energía es poca, mientras que la vía Perl explica las altas cantidades de ATP que se encuentran en semillas en imbibición, ya que a partir de malato se sintetiza oxaloacetato mediante la malato deshidrogenasa (MDH), después el oxaloacetato es metabolizado por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK) a fosfoenolpiruvato, el cual es convertido en piruvato por la piruvato cinasa. La actividad de las enzimas MDH y PEPCK aumenta dramáticamente durante las primeras horas de imbibición y decrece a tiempos posteriores (Revisado por Rosental et al., 2014).

Debido al contenido limitado de oxígeno, otra fuente importante de energía es la vía glucolítica (Yu et al., 2014). En cereales se ha reportado que los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como al ácido málico y el ácido cítrico son pobremente representados, pero se encontró una mayor producción de azúcares fosforilados en el embrión como Glu-6-fosfato, Fru-6-fosfato y xilosa-5-fosfato, además de ácidos orgánicos y Fru, lo que indica que la energía requerida es obtenida a través de la glucólisis y las vías que se entrecruzan con ella, como la fermentación a lactato y la vía de las pentosas (Han et al., 2017).

Relación de los lípidos con la síntesis de carbohidratos en el embrión.

Se ha reportado en semillas de cereales que las reservas de lípidos se empiezan a metabolizar desde el inicio de la hidratación (Pritchard et al., 2002; Sánchez-Linares et al., 2012; Sreenivasulu et al., 2008; Yu et al., 2014), los genes involucrados en la β -oxidación y varias fosfolipasas se sobreexpresan en el embrión (Yu et al., 2014) así como en la aleurona y el endospermo (Sreenivasulu et al., 2008). Observamos que el contenido de lípidos totales disminuyó

significativamente en el escutelo de semillas embebidas durante una hora, mientras que en el eje embrionario la disminución fue significativa a las 3 h (Figura 24).

En semillas *Arabidopsis*, cebada, arroz y trigo, la principal fuente de Sac durante la germinación proviene de la degradación de los lípidos (Pritchard et al., 2002; Sreenivasulu et al., 2008; He et al., 2011; Yu et al., 2014) a través del ciclo del glioxilato. Nuestros resultados sugieren que en maíz los lípidos del escutelo también podrían ser metabolizados por esta vía en tiempos cortos de germinación, ya que se observó el aumento de los transcritos de la enzima MS. lo que podría estar relacionado a la acumulación de Sac en el eje embrionario a las 18 h de imbibición (Figura 28A).

En el tejido seco, el contenido de lípidos entre el eje embrionario y el escutelo, por gramo de tejido fue similar. Sin embargo, los lípidos en el eje embrionario no se pueden utilizar como sustrato glucogénico (Gianinetti et al., 2018) ya que el tejido carece de actividad de las enzimas ICL y MS (Holtman et al., 1994), por lo que los lípidos son utilizados como sustrato respiratorio para la obtención de energía o pueden ser fuente de ácidos grasos para la síntesis de lípidos de membrana (Gianinetti et al., 2018). Sin embargo, nosotros si observamos transcritos de *MS* en el eje embrionario, por lo que se deben hacer estudios para saber si la actividad de la enzima también está presente en este tejido.

Contenido y movilización de carbohidratos solubles y almidón durante la germinación.

En las plantas los carbohidratos son transportados desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda y en el embrión: el escutelo es el primer tejido fuente que proporcionará los carbohidratos

al eje embrionario, mientras que este último es el que necesitará del aporte de nutrientes, comportándose como tejido demanda. El embrión es capaz de germinar aún en ausencia del endospermo (Sánchez-Linares et al., 2012). A pesar de que el endospermo es tejido que constituye la principal reserva de carbono para el crecimiento de la plántula, la cantidad de reservas presentes en el embrión es suficiente para sostener el metabolismo del tejido durante la germinación.

Se encontró que, en ambos tejidos embrionarios, eje y escutelo, la cantidad de Fru y Glu se mantuvo a niveles similares durante la germinación. Este comportamiento también fue observado en el maíz variedad Chalqueño (Sánchez-Linares et al., 2012), los autores determinaron que había una alta actividad de invertasas, y a pesar de ello, la cantidad de hexosas no se incrementó, lo anterior sugiere que las hexosas son rápidamente metabolizadas mediante la vía glucolítica. Como era de esperarse, la actividad de hexocinasa es alta en los tejidos embrionarios (Sánchez-Linares et al., 2012).

Al igual que lo propuesto para semillas de arroz y maíz Chalqueño (Matsukura et al, 2000; Aoki, et al, 2006; Sánchez-Linares et al., 2012), en el presente trabajo se encontró que en el tejido embrionario la Sac está presente en mayor cantidad en comparación con las hexosas. En particular, el escutelo tuvo el mayor contenido de Sac, hecho que apoya la propuesta sobre el flujo de carbohidratos desde el tejido fuente (escutelo), al tejido demanda (eje embrionario). La concentración de oxígeno en el embrión tiene efecto sobre la vía por la que la Sac puede ser hidrolizada, las condiciones hipóxicas resultan en la inhibición de las invertasas ácidas y en la activación de la Sac sintasa SUSY (Gorim y Asch, 2017). La Glu y Fru producto de la hidrólisis de la Sac por la enzima SUSY, pueden ser metabolizadas a través de la vía glucolítica. Se ha

reportado en trigo que la isoforma SUSY4 se expresa en el embrión durante la germinación (Yu et al., 2014).

En embriones de maíz se he reportado una actividad baja de invertasas de pared celular durante las primeras 8 h de germinación, pero a las 24 h, el eje embrionario mostró un incremento de 10 veces comparado con la actividad a las 0 h, mientras que el escutelo mostró una menor actividad durante la germinación, lo cual refleja que el eje embrionario como tejido demanda, es alimentado con hexosas obtenidas por la hidrólisis de la Sac que viene del escutelo (Sánchez-Linares et al., 2012), aunque no se descarta que la Sac no hidrolizada también sea capaz de ser importada por el eje embrionario.

Otra fuente de azúcares presentes en el embrión es el almidón. Un embrión maduro de maíz contiene aproximadamente 0.580 μg de almidón por mg embrión (Boehlein et al., 2018). Nuestros resultados sugieren que el almidón presente en los tejidos del embrión no representa una fuente importante de carbono durante la germinación, ya que observamos que su contenido se mantiene constante (Figura 29B) y la expresión de la enzima α -amilasa se enriquece hacia el final de la germinación. Sin embargo, en trigo la expresión de α -amilasa aumenta a las 12 h de imbibición, lo que indica que la movilización de almidón ocurre 12 h antes de la protrusión de la radícula (Yu et al., 2014).

Los productos de la degradación del almidón pueden entrar a la glucólisis por dos vías: 1) mediante la liberación directa de la glucosa por la actividad de las amilasas o 2) por la acción de la almidón-fosforilasa que convierte el almidón en Glu-1-fosfato (Yu et al., 2014), ambos

productos serán metabolizados mediante la glucólisis. Sin embargo, para poder ser metabolizados, estos azúcares tienen que ser transportados entre tejidos.

Los tejidos embrionarios tienen capacidad de transportar azúcares de manera difusional.

Durante la germinación ocurren procesos de movilización de mono- y disacáridos, estas moléculas se difunden muy poco a través de la membrana, por lo que el movimiento de los azúcares puede ser mediante conexiones simplásticas entre el tejido vascular del escutelo que se conecta con el floema en maduración del eje embrionario (Humphreys, 1987). Sin embargo, estas conexiones no se encuentran completamente maduras (Liu et al., 2013, Lafon-Placette y Köhler, 2014.).

Otra vía posible para el movimiento de los azúcares es la vía apoplástica, en la cual es necesaria la participación de diferentes transportadores de membrana. Se sugiere que particularmente el maíz en su etapa madura usa predominantemente la vía apoplástica para el cargado del floema (Bezruczyk et al., 2018) y así mueve los azúcares de los tejidos fuente a los tejidos demanda.

Determinamos que los ejes y escutelos aislados de semillas secas y embebidas tienen la capacidad de tomar Glu y Sac a través de un transporte activo y/o difusional (Figura 30). Dentro de los transportadores de tipo activo, se han reportado los STP transportadores de hexosas y los SUT transportadores de Sac. Las proteínas STP son una familia de simportadores membranales que muestran diferentes afinidades por varios sustratos, incluyendo Glu, xilosa, galactosa (Kong et al., 2019), manosa y arabinosa (Rottmann et al., 2018). En maíz se han identificado 22

secuencias de genes (Kong et al., 2019) cuyos productos proteicos podrían estar involucrados en el transporte de azúcares. La Sac extracelular puede ser hidrolizada en Glu y Fru por las invertasas, y los STPs podrían transportar la Glu hacia las células demanda. En mutantes de *Arabidopsis stp1* se observó una reducción del 60 % del transporte de Glu durante la germinación (Sherson et al., 2003).

Por otra parte, los SUT son simportadores Sac-protón de membrana plasmática, con una estequiometría 1:1 que usa la energía del gradiente de H^+ establecida por la actividad de la H^+ -ATPasa (Sánchez-Linares et al., 2012). Los SUT se localizan en la epidermis de las células del escutelo, en las células del parénquima y en el tejido vascular del embrión, pero con poca expresión en la zona de la plúmula y de la radícula del eje embrionario (Sánchez-Linares et al., 2012). En arroz aumenta la expresión del *OsSUT1* en el tejido vascular del escutelo (Scofield et al., 2007) y el *OsSUT4* es expresado en la aleurona (Chung et al., 2014), lo que resalta las diferencias temporales y espaciales en la expresión de genes SUT durante la germinación (Jameson et al., 2016). En este trabajo encontramos que la expresión del *SUT1* aumenta significativamente desde las 18 h de germinación en el escutelo, mientras que en el eje embrionario la expresión se mantiene sin cambios hasta su incremento a las 48 h (Figura 27). El transporte de Sac entre el escutelo y el embrión era esperado, ya que es conocido que durante la movilización de reservas, éstas son inicialmente convertidas a Sac tanto en el endospermo como en la aleurona, la Sac puede ser importada al escutelo a través de un SUT (Shannon, 1972). Sin embargo, el eflujo de Sac desde el escutelo en maíz no depende del gradiente de protones (Humphreys, 1987) por lo que un transportador difusional como el SWEET podría cumplir esta función.

Abundancia diferencial de los transcritos ZmSWEETs durante la germinación.

Se predice que la familia de los transportadores SWEET en maíz está formada por 22 miembros (Eom et al., 2015; Li et al., 2018), algunos de los cuales podrían estar relacionados a funciones vitales durante la germinación.

Uno de los SWEETs más expresados en los tejidos embrionarios fue el ZmSWEET4c, particularmente en el escutelo. Se ha reportado que el ZmSWEET4c está involucrado en el transporte de azúcares durante la formación de la semilla y la embriogénesis, probablemente a través de la capa basal de transferencia en el endospermo, capa celular conocida como BELT. Esta capa es el punto de entrada de los nutrimentos que provienen de los tejidos maternos hacia los tejidos hijos (Sosso et al., 2015). Este SWEET no mostró actividad de transporte de Sac que es la principal forma de azúcar presente en el embrión, por lo que la actividad de invertasas podría ser necesaria para permitir el flujo de carbono hacia los tejidos demanda o bien, la presencia de un transportador de Sac.

El ZmSWEET4c pertenece al clado II que reúne a transportadores de hexosas. Un miembro de este clado que ha sido estudiado es el AtSWEET4 capaz de importar Glu (Chen et al., 2010) y Fru (Liu et al., 2016), en plántulas de 7 días de germinación AtSWEET4 se expresa en el cilindro vascular de la raíz primaria y en los cotiledones (Liu et al., 2016). Lo anterior concuerda con lo observado en nuestros experimentos, donde se aprecia un aumento de expresión a lo largo de la germinación probablemente debido al crecimiento y desarrollo de los tejidos embrionarios como la radícula y el coleóptilo. Por otra parte, en plantas maduras de *Arabidopsis*, la sobreexpresión aumentó el tamaño de la planta e incrementó la acumulación de Glu y Fru en los tejidos que más

expresan al SWEET, el estele de las raíces, los haces vasculares de las hojas y flores (Liu et al., 2016), mientras que el fenotipo de plantas mutantes *knock-down* por RNAi, fue de plantas pequeñas con poca acumulación de Glu y Fru (Liu et al., 2016).

Otro SWEET del cual su expresión aumentó principalmente en el escutelo fue el ZmSWEET13a, perteneciente al clado III. En estudios RNA-seq (Sekhon et al., 2013) se encontró que la expresión aumenta después de la germinación en la radícula y coleóptilo de maíz, alcanzando un nivel máximo de expresión en las hojas maduras. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, durante la imbibición las radículas y coleóptilos se elongan por la propia elongación celular lo que lleva a la protrusión de los tejidos a través de la semilla, por lo que se espera un aumento en la expresión de los transportadores SWEET. Otro transportador de este clado es el OsSWEET14 de *Oriza sativa* está involucrado en la susceptibilidad a patógenos. Chen et al. (2010) describieron que los efectores TAL AVR_{Xa7} (con actividad de factores transcripcionales) se unen al promotor Xa17 del *OsSWEET14*, y bajo condiciones de infección con *Xantomonas oryzae*, el SWEET muestra actividad de transportador de eflujo de Sac (Chen et al., 2012).

Por el contrario, el ZmSWEET13b aumentó su expresión en el eje embrionario, mientras que en el escutelo no se observaron cambios significativos en su expresión. El gen ortólogo AtSWEET12, así como el parólogo cercano AtSWEET11, tienen actividades notables de eflujo de Sac y se localizan en la membrana plasmática de las células del parénquima de las venas de las hojas (Baker et al., 2012). Plantas de *Arabidopsis* mutantes en cada gen, no muestran fenotipos visibles, pero en condiciones de alta luminosidad, plantas doble mutantes tienen un crecimiento lento y desarrollo de clorosis, así como gran acumulación de almidón y azúcares en hojas, por lo

que se propone que AtSWEET12 y 11 tienen un papel importante en el flujo de Sac desde las células del parénquima del floema, hacia el apoplasto, donde la Sac será transportada hacia otros tejidos de la planta (revisado por Baker et al., 2012). Además, AtSWEET12 está involucrado en la finalización de la dormancia de la semilla (Eom et al., 2015), la etapa previa a la germinación, por lo que ZmSWEET13b podría participar en la cascada de señales que resulta en el fin de la dormancia de la semilla y su posterior germinación.

Mutantes de maíz carentes de los SWEET13a, b y c muestran severos defectos en el crecimiento y acumulación de azúcares y almidón en las hojas, ambos fenotipos sugieren que el cargado del floema está limitado en las plantas mutantes, lo que impide la traslocación de azúcares a los tejidos demanda (Bezruczyk et al., 2018).

Al igual que el ZmSWEET13b, el 14b mostró un incremento en la expresión de los transcritos en el eje embrionario. Se ha reportado la participación de los parálogos de ZmSWEET13b y 14b en *Arabidopsis* (AtSWEET 13 y 14) en la germinación, semillas mutantes *sweet13 sweet14* germinaron aún en presencia de paclobutrazol, inhibidor conocido de la biosíntesis de giberelinas, hormona que promueve la germinación (Kanno et al., 2016). En ese estudio, se relaciona a los SWEETs como transportadores transmembranales de giberelinas. Aunque aquí demostramos que el de maíz es un transportador de azúcares. Por otra parte, el SWEET14 ha sido estudiado en arroz, y se sabe que el efector TAL de *Xanthomonas oryzae*, AvXa7, se une al promotor Xa17, el cual es promotor del OsSWEET14, porque es considerado un gen de susceptibilidad a patógenos (Chen et al., 2010).

Los ZmSWEETs 6b, 11 y 14b como transportadores de la membrana plasmática de hexosas y Sac.

Entre los SWEETs que se transcribían de manera abundante en los tejidos embrionarios y de los cuales se desconocía si tenían la capacidad de transporte, su especificidad por el azúcar y su localización subcelular. eran ZmSWEET6b, 11 y 14b, por lo que en este trabajo se caracterizaron a través del modelaje tridimensional, ensayos de complementación en levaduras y expresión de los SWEETs fusionados a GFP en levaduras y lígulas. Los resultados mostraron que los ZmSWEETs 6b, 11 y 14b se encuentran en la membrana plasmática. Además, hasta la fecha no se había reportado la localización del ZmSWEET4c en la misma planta de maíz, lo cual se consiguió mediante la transformación de lígulas.

El ZmSWEET6b que pertenece al clado I, complementó la función de transporte de Glu y Fru al igual que los transportadores previamente caracterizados AtSWEET1 (Chen et al., 2010) y el ZmSWEET4c (Sosso et al., 2015).. El clado I agrupa a los transportadores que son afines principalmente a la Glu (Eom et al., 2015). Los ZmSWEET11 y 14b que pertenecen al clado III el cual agrupa a los SWEETs afines a Sac principalmente (Eom et al., 2015), complementaron el crecimiento de la levadura en presencia de Sac, al igual que el control positivo AtSWEET12 (Chen et al., 2012).

Los SWEETs en la germinación.

En este trabajo encontramos que no sólo los transportadores activos están involucrados en el transporte de azúcares durante la germinación, sino que el transporte difusional también es

importante para permitir el flujo de azúcares entre los tejidos. Esta aseveración se basa en que los transcritos de diversos transportadores difusionales tipo SWEET se expresan de manera diferencial durante la germinación y entre los tejidos eje embrionario y escutelo.

Cabe señalar que además del movimiento de la Sac y hexosas sintetizadas en el escutelo y transportadas hacia el eje embrionario, el escutelo también tiene la capacidad de absorber los azúcares y otros nutrimentos provenientes del endospermo y dirigirlos hacia el eje embrionario (Weitbrecht et al., 2011). Debido a esto, resulta relevante el haber encontrado una alta expresión de algunos SWEETs en este tejido. Años antes de que los SWEETs fueran descritos como transportadores bidireccionales de azúcares, Aoki et al. (2006) reportaron que, de acuerdo con mediciones de azúcares en radícula, coleóptilo, endospermo y escutelo de semillas de trigo (*Triticum aestivum*), las hexosas producto de la degradación del almidón del endospermo son convertidas a Sac en el escutelo. Lo anterior puede explicar el contenido de Sac en el escutelo en comparación con el eje embrionario. Además, si el endospermo exporta hexosas hacia el apoplasto, éstas podrían ser ingresadas al escutelo mediante los SWEETs, muy probablemente a través del ZmSWEET4c, ya que fue el transportador de hexosas más expresado en este tejido.

En el eje embrionario se incrementó la expresión de los ZmSWEET4c, 11, 13a, 13b y 14b conforme avanzó el tiempo de germinación. El incremento de los transcritos de estos SWEETs coincidió con el aumento de azúcares solubles presentes en el eje embrionario a las 18 h de imbibición. Era esperado encontrar de manera abundante a los transcritos del SWEET4c, ya que es altamente expresado durante la embriogénesis (Sosso et al., 2015) y podría ayudar al influjo de hexosas al eje embrionario antes de que la semilla entre en desecación. Adicionalmente, otro

transportador de hexosas, el SWEET11, se expresa durante la germinación en los tiempos cercanos a la salida de la radícula y el desarrollo de la planta, donde el metabolismo ya está cambiando y la hidrólisis del almidón se activó.

A pesar de que se conoce que hay una actividad alta de la invertasa de pared celular, es posible que haya Sac que no se hidrolice, esto podría explicar porque también se encontraron de manera abundante transcritos para transportadores de Sac. La familia SWEET13 está formada de miembros transportadores de Sac (Bezruczyk et al., 2018a) y se demostró en este trabajo que también el SWEET14b muestra afinidad por la Sac y se encuentra presente en los ejes embrionarios a lo largo de la germinación. Por lo tanto, la presencia de los SWEET13a, b y SWEET14b podrían explicar el incremento de la Sac en el eje embrionario observado a las 18 h ya que este tejido no es capaz de sintetizar Sac, tampoco expresa a los transportadores SUT.

Conclusiones

- Se observaron cambios en el contenido de reservas metabólicas como almidón y azúcares solubles en los tejidos embrionarios en diferentes etapas de la germinación.
- Se identificaron transcritos de los SWEETs cuya abundancia fue diferente entre los tejidos embrionarios como entre los tiempos de germinación.
- La variación entre la abundancia de transcritos puede estar relacionada a la actividad de toma de glucosa y sacarosa en el escutelo y el eje embrionario y sugiere que, junto a transportadores activos como el SUT, los transportadores de membrana plasmática tipo SWEETs participan en la nutrición del eje embrionario.
- Los ZmSWEETs más expresados fueron los ZmSWEET4c, 13a y 13b, así como los ZmSWEETs 6b, 11 y 14b que se caracterizaron en este trabajo.
- El ZmSWEET6b se identificó como un transportador de glucosa localizado en la membrana plasmática.
- Los ZmSWEET11 y ZmSWEET14b se identificaron como transportadores de sacarosa localizados en la membrana plasmática.

Perspectivas

Para evaluar si la abundancia de los transcritos se traduce en la cantidad de proteína en la membrana de los tejidos embrionarios, es necesario producir anticuerpos específicos para los SWEETs y analizar por inmunoréplica tipo Western y por inmunohistoquímica su presencia en esos tejidos.

Para determinar el papel esencial de los transportadores SWEETs en la germinación es necesario obtener mutantes para cada uno de los SWEETs, así que el montaje de la técnica de CRISPR/Cas sería una herramienta necesaria para poder asignarle ese papel a los SWEETs.

Bibliografía

- Agatep, R., Kirkpatrick, R. D., Parchaliuk, D. L., Woods, R. A., & Gietz, R. D. (1998). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Technical Tips Online*, 3(1), 133–137. [https://doi.org/10.1016/s1366-2120\(08\)70121-1](https://doi.org/10.1016/s1366-2120(08)70121-1)
- Aoki, N., Scofield, G. N., Wang, X.-D., Offler, C. E., Patrick, J. W., & Furbank, R. T. (2006). Pathway of Sugar Transport in Germinating Wheat Seeds. *Plant Physiology*, 141(4), 1255–1263. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082719>
- Baker, R. F., Leach, K. A., & Braun, D. M. (2012). SWEET as sugar: New sucrose effluxers in plants. *Molecular Plant*, 5(4), 766–768. <https://doi.org/10.1093/mp/sss054>
- Beltrán-Peña, E., Ortíz-López, A., & de Jiménez, E. S. (1995). Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Molecular Biology*, 28(2), 327–336. <https://doi.org/10.1007/BF00020251>
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Seeds. Physiology of Development and Germination. In *Seeds* (2nd edition). <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8>
- Bezruczyk, M., Hartwig, T., Horschman, M., Char, S. N., Yang, J., Yang, B., Frommer, W. B., & Sosso, D. (2018a). Impaired phloem loading in zmsweet13a,b,c sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*. *New Phytologist*, 218(2), 594–603. <https://doi.org/10.1111/nph.15021>
- Boehlein, S. K., Shaw, J. R., Boehlein, T. J., Boehlein, E. C., & Hannah, L. C. (2018). Fundamental differences in starch synthesis in the maize leaf, embryo, ovary and endosperm. *Plant Journal*, 96(3), 595–606. <https://doi.org/10.1111/tpj.14053>
- Braun, D. M., & Slewinski, T. L. (2009). Genetic Control of Carbon Partitioning in Grasses: Roles of Sucrose Transporters and Tie-dyed Loci in Phloem Loading. *Plant Physiology*, 149(1), 71–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.108.129049>
- Chen, Li Qing, Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F.,

- Somerville, S. C., Mudgett, M. B., & Frommer, W. B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, *468*(7323), 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., & Frommer, W. B. (2012). Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, *335*(6065), 207–211. <https://doi.org/10.1126/science.1213351>
- Chen, L. Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W., & Frommer, W. B. (2015a). Transport of Sugars. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(1), 865–894. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033904>
- Chen, L. Q., Lin, I. W., Qu, X. Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londoño, A., Samuels, A. L., & Frommer, W. B. (2015b). A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the Arabidopsis Embryo. *The Plant Cell*, *27*(3), 607–619. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134585>
- Chourney, S. P., & Hueros, G. (2017). The Basal Endosperm Transfer Layer (BETL): Gateway to the Maize Kernel. In B. Larkins (Ed.), *Maize Kernel Development* (pp. 56–67). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781786391216.0000>
- Chung, P., Hsiao, H. H., Chen, H. J., Chang, C. W., & Wang, S. J. (2014). Influence of temperature on the expression of the rice sucrose transporter 4 gene, OsSUT4, in germinating embryos and maturing pollen. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*(1), 217–229. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1403-x>
- Cohn, M., Bart, R. S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., Hou, B. H., Frommer, W. B., Lahaye, T., & Staskawicz, B. J. (2014). *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector - Mediated induction of a SWEET sugar transporter in Cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(11), 1186–1198. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0161-R>
- Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). Phloem. In R. Crang, S. Lyons-Sobaski, & R. Wise (Eds.), *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants* (pp.

- 247–275). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77315-5_8
- Eom, J. S., Chen, L. Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, I. W., Qu, X. Q., Braun, D. M., & Frommer, W. B. (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology*, 25(May) 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.005>
- Feenstra, A. D., Alexander, L. E., Song, Z., Korte, A. R., Yandea-Nelson, M. D., Nikolau, B. J., & Lee, Y. J. (2017). Spatial Mapping and Profiling of Metabolite Distributions during Germination. *Plant Physiology*, 174(4), 2532–2548. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00652>
- Feng, L., & Frommer, W. B. (2015). Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.005>
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J., & Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D222–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>
- Gianinetti, A., Finocchiaro, F., Bagnaresi, P., Zechini, A., Faccioli, P., Cattivelli, L., Valè, G., & Biselli, C. (2018). Seed dormancy involves a transcriptional program that supports early plastid functionality during imbibition. *Plants*, 7(2), 35. <https://doi.org/10.3390/plants7020035>
- Gorim, L., & Asch, F. (2017). Seed Coating Increases Seed Moisture Uptake and Restricts Embryonic Oxygen Availability in Germinating Cereal Seeds. *Biology*, 6(31). <https://doi.org/10.3390/biology6020031>
- Han, C., & Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, 15(10), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400375>
- Han, Caixia, Zhen, S., Zhu, G., Bian, Y., & Yan, Y. (2017). *Comparative metabolome analysis of wheat embryo and endosperm reveals the dynamic changes of metabolites during seed germination*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.013>
- He, D., Han, C., Yao, J., Shen, S., & Yang, P. (2011). Constructing the metabolic and regulatory

- pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics*, *11*(13), 2693–2713. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000598>
- Heldt, H.-W., & Heldt, F. (2005). *Plant Biochemistry* (3rd edition). Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1038/168004a0>
- Holbrook, M., & Knoblauch, M. (2018). Editorial overview: Physiology and metabolism: Phloem: a supracellular highway for the transport of sugars, signals, and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, *43*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.013>
- Holdsworth, M., Kurup, S., & Kibbin, R. M. (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Science*, *4*(7), 275–280. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01429-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01429-6)
- Holtman, W. L., Heistek, J. C., Mattern, K. A., Bakhuizen, R., & Douma, A. C. (1994). β -oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. *Plant Science*, *99*(1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90119-8)
- Humphreys, T. E. (1987). Sucrose efflux and export from the maize scutellum. *Plant, Cell and Environment*, *10*(3), 259–266. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11602277>
- Igamberdiev, A., & Rodionova, M. (1991). Role of the glyoxylate cycle in metabolism of acetate and other organic acids in scutella of germinating maize seeds. *Fiziologija Rastenij*, *38*(3), 492–498.
- Im, K.-H. (2004). Expression of sucrose-phosphate synthase (SPS) in non-photosynthetic tissues of maize. *Molecules and Cells*, *17*(3), 404–409.
- Jameson, P. E., Dhandapani, P., Novak, O., & Song, J. (2016). Cytokinins and expression of SWEET, SUT, CWINV and AAP genes increase as pea seeds germinate. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms17122013>
- Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshihara, T., Kamiya, Y., Ueda, M., & Seo, M. (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nature Communications*, *7*, 1–11.

<https://doi.org/10.1038/ncomms13245>

- Kersey, P. J., Allen, J. E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B. J., Carvalho-Silva, D., Christensen, M., Davis, P., Grabmueller, C., Kumar, N., Liu, Z., Maurel, T., Moore, B., McDowall, M. D., Maheswari, U., Naamati, G., Newman, V., Ong, C. K., ... Yates, A. (2018). Ensembl Genomes 2018: An integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D802–D808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1011>
- Kimura, M., & Nambara, E. (2010). Stored and neosynthesized mRNA in Arabidopsis seeds: Effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibition. *Plant Molecular Biology*, *73*(1–2), 119–129. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9603-x>
- Kirienko, D. R., Luo, A., & Sylvester, A. W. (2012). Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experimental study. *Plant Physiology*, *159*(4), 1309–1318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199737>
- Kong, W., An, B., Zhang, Y., Yang, J., Li, S., Sun, T., & Li, Y. (2019). Sugar Transporter Proteins (STPs) in Gramineae Crops: Comparative Analysis, Phylogeny, Evolution, and Expression Profiling. *Cells*, *8*(6), 560. <https://doi.org/10.3390/cells8060560>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. . (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes11Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, *305*(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Lafon-Placette, C., & Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, *17*, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008>
- Leubner-Metzger, G. (2002). Seed after-ripening and over-expression of class I β -1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta*, *215*(6), 959–968. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0837-y>
- Li, X., Si, W., Qin, Q., Wu, H., & Jiang, H. (2018). Deciphering evolutionary dynamics of SWEET genes in diverse plant lineages. *Scientific Reports*, *8*(1), 13440.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31589-x>

- Lichtner, F. T., & Spanswick, R. M. (1981). Electrogenic sucrose transport in developing soybean cotyledons. *Plant Physiology*, *67*(4), 869–874. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16661771
- Lin, I. W., Sosso, D., Chen, L. Q., Gase, K., Kim, S. G., Kessler, D., Klinkenberg, P. M., Gorder, M. K., Hou, B. H., Qu, X. Q., Carter, C. J., Baldwin, I. T., & Frommer, W. B. (2014). Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature*, *508*(7497), 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature13082>
- Liu, W. Y., Chang, Y. M., Chen, S. C. C., Lu, C.-H., Wu, Y. H., Lu, M.-Y. J., Chen, D. R., Shih, A. C. C., Sheue, C.-R., Huang, H.-C., Yu, C.-P., Lin, H.-H., Shiu, S.-H., Ku, M. S.-B., & Li, W.-H. (2013). Anatomical and transcriptional dynamics of maize embryonic leaves during seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 3979–3984. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301009110>
- 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. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24563>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-C_T} Method. *Methods* *25*, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, Z., Marsolais, F., Bernards, M. A., Sumarah, M. W., Bykova, N. V., & Igamberdiev, A. U. (2016). Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Science*, *248*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.04.007>
- Matilla, A., Gallardo, M., & Puga-Hermida, M. I. (2005). Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. *Seed Science Research*, *15*(2), 63–76. <https://doi.org/10.1079/ssr2005203>

- Matsukura, C., Saitoh, T., Hirose, T., Ohsugi, R., Perata, P., & Yamaguchi, J. (2000). Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiology*, *124*(1), 85–93. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.85>
- Mayer, A. M., & Polijakoff-Mayber, A. (1982). *The Germination of Seeds* (3rd edition). Pergamon Press.
- Negbi, M. (1984). The structure and function of the scutellum of the Gramineae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *88*(3), 205–222. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1984.tb01571.x>
- Oaks, a, & Beevers, H. (1964). The Glyoxylate Cycle in Maize Scutellum. *Plant Physiology*, *39*(3), 431–434. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=550098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pelleschi, S., Rocher, J.-P., & Prioul, J.-L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment*, *20*(4), 493–503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-89.x>
- Penfield, S., Pinfield-Wells, H. M., & Graham, I. A. (2006). Storage Reserve Mobilisation and Seedling Establishment in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, *4*, e0100. <https://doi.org/10.1199/tab.0100>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 2002–2007. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pritchard, S. L., Charlton, W. L., Baker, A., & Graham, I. A. (2002). Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *31*(5), 639–647. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01376.x>
- Ramírez-Pimentel, G. J., Covarrubias-Prieto, J., Chablé-Moreno, F., Chávez-Muñoz, A., García-Rodríguez, J., Aguirre-Mancilla, L. C., & Raya-Pérez, J. C. (2015). Extraction and comparison of carbohydrates, proteins and lipids content in corn. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria México*. *3*(2), 20–29.

- Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M., & Emr, S. D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Molecular and Cellular Biology*, 8(11), 4936–4948. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.11.4936>
- Rosental, L., Nonogaki, H., & Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1017/S0960258513000391>
- Rottmann, T., Klebl, F., Schneider, S., Kischka, D., Rüscher, D., Sauer, N., & Stadler, R. (2018). Sugar Transporter STP7 Specificity for l-Arabinose and d-Xylose Contrasts with the Typical Hexose Transporters STP8 and STP12. *Plant Physiology*, 176(3), 2330–2350. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01493>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725–738.
- Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V., Zurita-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*, 63(12), 4513–4526. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers130>
- Scanlon, M. J., & Takacs, E. M. (2009). Kernel Biology. In J. L. Bennetzen & S. C. Hake (Eds.), *Handbook of Maize* (pp. 121–143). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1>
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I., & Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiology*, 131(1), 16–26. <https://doi.org/10.1104/pp.011577>
- Scofield, G. N., Aoki, N., Hirose, T., Takano, M., Jenkins, C. L. D., & Furbank, R. T. (2007). The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and

- development of rice plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 483–495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl217>
- Sekhon, R. S., Briskine, R., Hirsch, C. N., Myers, C. L., Springer, N. M., Buell, C. R., de Leon, N., & Kaeppler, S. M. (2013). Maize Gene Atlas Developed by RNA Sequencing and Comparative Evaluation of Transcriptomes Based on RNA Sequencing and Microarrays. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061005>
- Shannon, J. C. (1972). Movement of ¹⁴C-Labeled Assimilates into Kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiology*, 49(2), 198–202. <https://core.ac.uk/display/3432704>
- Sherson, S. M., Alford, H. L., Forbes, S. M., Wallace, G., & Smith, S. M. (2003). Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 525–531. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg055>
- Sosso, D., Luo, D., Li, Q. B., Sasse, J., Yang, J., Gendrot, G., Suzuki, M., Koch, K. E., McCarty, D. R., Chourey, P. S., Rogowsky, P. M., Ross-Ibarra, J., Yang, B., & Frommer, W. B. (2015). Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics*, 47(12), 1489–1493. <https://doi.org/10.1038/ng.3422>
- Sreenivasulu, N., Usadel, B., Winter, A., Radchuk, V., Scholz, U., Stein, N., Weschke, W., Strickert, M., Close, T. J., Stitt, M., Graner, A., & Wobus, U. (2008). Barley grain maturation and germination: Metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology*, 146(4), 1738–1758. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111781>
- 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*, 200(3), 808–819. <https://doi.org/10.1111/nph.12411>
- Sun, M. X., Huang, X. Y., Yang, J., Guan, Y. F., & Yang, Z. N. (2013). Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at

- the late reproductive stage. *Plant Reproduction*, 26(2), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00497-012-0208-1>
- Tan-Wilson, A. L., & Wilson, K. A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 140–153. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01535.x>
- Tao, Y., Cheung, L. S., Li, S., Eom, J. S., Chen, L. Q., Xu, Y., Perry, K., Frommer, W. B., & Feng, L. (2015). Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature*, 527(7577), 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature15391>
- Taylor, A. G. (2020). Seed Storage, Germination, Quality and Enhancements. In H. C. Wien & H. Stützel (Eds.), *The Physiology of Vegetable Crops* (2nd edition). CABI. https://books.google.es/books?id=MnIDwAAQBAJ&dq=germination+phase+II+&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Weitbrecht, K., Mü Ller, K., & Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3289–3309. <https://doi.org/10.1093/jxb/err030>
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., & Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 464(3), 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01698-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01698-1)
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., & Poisson, J. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12, 7–8.
- Yu, Y., Guo, G., Lv, D., Hu, Y., Li, J., Li, X., & Yan, Y. (2014). Transcriptome analysis during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. *BMC Plant Biology*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-20>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

Zhao, L., Xu, A., Zhang, L., Yin, Z., & Wei, C. (2018). Spatiotemporal accumulation and characteristics of starch in developing maize caryopses. *Plant Physiology and Biochemistry*, *130*, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.032>

Zurita-Villegas, V. (2011). Efecto de *Fusarium verticilloides* en el transporte de carbohidratos en la germinación de tejido embrionario de maíz. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Anexos

Anexo I. Preparación de soluciones.

Amortiguador de acetatos 0.2 M, pH 4.2.

Solución A: 1.2 mL de ácido acético CH_3COOH en 100 mL de agua desionizada.

Solución B: 2.7 g de acetato de sodio $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ en 100 mL de agua desionizada.

Para 100 mL, mezclar 73 mL de la solución A y 27 mL de la solución B.

Fenol saturado con citratos.

Solución A: citrato de sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.1 M, ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.1 M ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1.1348 g y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 1.3529 g en 100 mL de agua desionizada).

Saturar fenol con la solución A.

Amortiguador TAE 50X pH 8.

Para 1 L:

En 500 mL de agua desionizada disolver 242.8 g de Tris Base, 57.1 mL de ácido acético CH_3COOH y 100 mL de EDTA 0.5 M (186.1 g de EDTA disódico en 100 mL de agua).

Ajustar el pH con NaOH y aforar a 1 L con agua desionizada. Esterilizar en autoclave.

PEG 3500 50%.

Disolver durante al menos 4 h a temperatura ambiente 50 g de PEG en 30 mL de agua.

Aforar a 100 mL y esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Acetato de litio 1.0 M.

Disolver 5.1 g de acetato de litio dihidratado en 50 mL de agua desionizada. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

ssDNA acarrador

Disolver 200 mg de esperma de salmón en 100 mL de amortiguador TE estéril. Agitar por 12 h a 4°C . Hacer alícuotas en microtubos estériles. Almacenar a -20°C . LA solución del microtubo puede desnaturalizarse sucesivamente hasta por tres veces.

Medio sintético selectivo

Para una caja Petri de 10 cm de diámetro: disolver 0.036 g de “Yeast synthetic Drop-out medium supplement without uracil” (Sigma), 0.201 g de “Yeast nitrogen base without aminoacids” (Sigma), 0.6 g de agar en 27 mL de agua desionizada. Esterilizar a 1.5 lb por 15 min exactos. Enfriar a temperatura ambiente. Antes de que el agar se solidifique, agregar 3 mL de una solución al 20% del azúcar deseado previamente esterilizada por filtración

Anexo II. Secuencias de oligonucleótidos.

Gen	Aplicación	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño del producto esperado	Resultado del BLAST contra el genoma de maíz B73_Ref_Gen_v4.	E value	% identidad	Número de acceso NCBI
ZmSWEET1b GRMZM2G153358	RT-PCR	F 5'-ACCATATAAGCGCAAGCAGACA R 5'-CAGAACGTAGGCACTGGGG	151 bp	Zea mays uncharacterized LOC100281296 (LOC100281296), mRNA gene_synonym="GRMZM2G153358"	0.003	100%	NM_001367193.1
ZmSWEET2 GRMZM2G324903	RT-PCR	F 5'- AGGCTCAAGGTCTCTGCTCT R 5'- TGACGATTGACATGGGGGAC	163 bp	Zea mays uncharacterized LOC100279636 (LOC100279636), mRNA gene_synonym="GRMZM2G324903"	0.039	100%	NM_001152631.1
ZmSWEET3b GRMZM2G060974	RT-PCR	F 5'- CAGGAGAATCCCTGTGCGT R 5'- AACAGTTGGGTCGCTGCTAT	158 bp	PREDICTED: Zea mays bidirectional sugar transporter SWEET3b (LOC103649564), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G060974"	0.066	100%	XM_008675300.3
ZmSWEET4c GRMZM2G137954	RT-PCR	F 5'-CAGCAAGCAAAAGCCACATA R 5'-AGCAACAAGACAGCAGCAGA	218 bp	Zea mays uncharacterized LOC100273706 (LOC100273706), mRNA gene_synonym="GRMZM2G137954"	0.039	100%	NM_001148118.2
ZmSWEET4c GRMZM2G137954	RT-qPCR	F 5'-CCAGACAAAGAGCGTGGAAT R 5'-CATCATGGTTGACTGCTGGT	234 bp	Zea mays uncharacterized LOC100273706 (LOC100273706), mRNA gene_synonym="GRMZM2G137954"	0.039	100%	NM_001148118.2
ZmSWEET6b GRMZM2G416965	RT-PCR y RT-qPCR	F 5'-GTCGTCCACCCTAACAGCAT R 5'-ATCATCGAGCCGAAAATGAC	244 bp	Zea mays seven-transmembrane-domain protein 1 (LOC100284352), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G416965"	0.039	100%	NM_001157247.1
ZmSWEET11 GRMZM2G368827	RT-PCR y RT-qPCR	F 5'-AGGCATCGTCTGCTAGT R 5'-GTTGACACGGCGTACGTAGA	221bp	Zea mays uncharacterized LOC100282584 (LOC100282584), mRNA gene_synonym="GRMZM2G368827"	0.034	100%	NM_001155492.2

ZmSWEET12a GRMZM2G133322	RT-PCR y RT-qPCR	F 5'-GACCTGACTATGATTGCTGC R 5'-GCGTCTACTTGTACCGTGGT	114 bp	Zea mays uncharacterized LOC100217087 (LOC100217087), mRNA gene_synonym="GRMZM2G133322"	0.040	100%	NM_001143456.1
ZmSWEET13a GRMZM2G173669	RT-PCR	F 5'-CGAGACCATCTACGTCGTCA R 5'-CGTCTGGATCACTTCGTCTCA	232 bp	Zea mays SWEET13a (LOC100282708), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G173669"	0.038	100%	NM_001155615.2
ZmSWEET13a GRMZM2G173669	RT-qPCR	F 5'-CGTGGAGTACATGCCCTTCT R 5'-CACGTAGAGCACCATCTGGA	150 bp	Zea mays SWEET13a (LOC100282708), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G173669"	0.039	100%	NM_001155615.2
ZmSWEET13b GRMZM2G021706	RT-PCR	F 5'-ACAAATACGTCGCGCTACCA R 5'-GCTTGCTTGCGATGATGGAG	361 bp	Zea mays SWEET13b (LOC100273779), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G021706"	0.043	100%	NM_001148182.1
ZmSWEET13b GRMZM2G021706	RT-qPCR	F 5'-GACCTTCTAGCCCCGATAC R 5'-GAACAGCTTGGCTTTCTTGG	254 bp	Zea mays SWEET13b (LOC100273779), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G021706"	0.040	100%	NM_001148182.1
ZmSWEET14a GRMZM2G094955	RT-PCR	F 5'-AAATGGCTGGCCTGTCTCTA R 5'-TGATGAGCAGGAACCTCGTTG	240 bp	Zea mays sugars will eventually be exported transporter14a (LOC100194326), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G094955"	0.039	100%	NM_001139364.1
ZmSWEET14b GRMZM2G015976	RT-PCR y RT-qPCR	F 5'-GTCATCGAGACCCTCTAC R 5'-ACGAAGACGCTAACGGAGAA	200 bp	Zea mays mtN3-like protein (LOC100192602), mRNA gene_synonym="GRMZM2G015976"	0.036	100%	NM_001137817.1
ZmSWEET15a GRMZM2G168365	RT-PCR y RT-qPCR	F 5'-CCCTGGCCTCTTCTTCGTTC R 5'-CCTCGTTACAGCCCTTCTC	107 bp	Zea mays uncharacterized LOC100282648 (LOC100282648), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G168365"	0.039	100%	NM_001371874.1
ZmSWEET17a GRMZM2G106462	RT-PCR	F 5'-TCATGCCGTTCTTCCTATCC R 5'-GAGGCGACGCTATTTCTTTG	195 bp	PREDICTED: Zea mays bidirectional sugar transporter SWEET17 (LOC103650117), mRNA gene_synonym=" GRMZM2G106462"	0.041	100%	XM_008675772.3
Zm18S ribosomal RNA XR_002748750.1	RT-PCR y RT-qPCR	F 5'-CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT R 5'-CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC	152 bp	PREDICTED: Zea mays Eukaryotic 18S ribosomal RNA (LOC111589664),	0.001	100%	XR_002748750.1
Zm α -amylase GRMZM2G138468	RT-PCR	F 5'- GTCACGTTTCGTCGACAAC R 5'-TTGACCTCACCGCAGACA	270 bp	Zea mays alpha-amylase (LOC542522), mRNA	0.41	100%	NM_001112069.2

ZmSUT1 GRMZM2G034302	RT-qPCR	F 5'-TCCTCTGGCTCCACAAACAAC R 5'-ACGAGCTGAATCCTAGAACGA	463 bp	Zea mays sucrose transporter 1 (LOC541615), transcript variant 1, mRNA	0.012	100%	NM_001111370.3
ZmSPS1 GRMZM5G875238	RT-qPCR	F 5'-TGAGAAGAGCTCGCTGAACA R 5'-GCAGTCCACAGCTATGACGA	202 bp	Zea mays sucrose phosphate synthase 1 (LOC542711), mRNA	0.039	100%	NM_001112224.2
ZmMas1 GRMZM2G102183	RT-qPCR	F 5'-CACCGTGCAAGCTCTGAATA R 5'-CCCAGAGTTCAACAGAAGC	236 bp	PREDICTED: Zea mays malate synthase 1 (mas1), transcript variant X1, mRNA	0.039	100%	XM_008670416.3

Secuencia de oligonucleótidos para amplificar la región ORF de los *SWEET*s.

Gen	Secuencias de oligonucleótidos	Peso esperado
ORF ZMSWEET4c	F5'- TACATTTCTCGTACATCGCTCTC R5'- GAGATCGGAATCGGAACAAC	1061 bp
ORF ZmSWEET6b	F5'- TGCAACCACCTTCCCAAAT R5'- ACTACTATTGCTAAAGTACGTCTCGTC	923 bp
ORF ZmSWEET11	F5'- ACACACAAACACATCAGCATTTC R5'- CGTACCGACCAAGACCATCA	1481 bp
ORF ZmSWEET14b	F5'- TAGTTGCCAGCCACACCTC R5'- TTGTTATTACATGGAAGGTGACG	1263 bp
ORF AtSWEET12	F5'- CACACACTTCCCTTGTTTCATTTC R5'-- CGTGGACAATGGTGATTGAT	1263 bp

Secuencias de oligonucleótidos para añadir los adaptadores attB y eliminar el codón de paro.

Gen	Secuencias de oligonucleótidos
ORF ZMSWEET4c	F5'- AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTCTCGGCCGATACCATCCGT R5'- AGAAAGCTGGGTGTCTGTAGCCGTTGCCGCCGCCGCC
ORF ZmSWEET6b	F5'-AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGATCTCTCCGGATGCAGCCC R5'- AGAAAGCTGGGTGAACGTATCGCTCGACGCTGACGGTG
ORF ZmSWEET11	F5'- AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCAGGAGGCTTCTTCTCCATG R5'-AGAAAGCTGGGTGTCTCACCGCGGCCGGCGGGGAC
ORF ZmSWEET14b	F5'- AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCCGGCCTGTCCTGCTGCAT R5'- AGAAAGCTGGGTGCTAGACTTGCTCGGCCTCGCTGCG
ORF AtSWEET12	F5'- AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCTCTCTTCGACACTCATAAC R5'--AGAAAGCTGGGTGTCTAGTAGTTGCAGCACTGTTTCT

Secuencias de oligonucleótidos universales para complementar el adaptador attB.

Secuencias de oligonucleótidos
F5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAACGAGGCTTC R5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Anexo III. Valores de Ct de los genes analizados en los tejidos embrionarios. (E=Eje embrionario, S=escutelo) a diferentes horas de germinación (0, 18, 30 and 48 h). Se muestran los valores Ct del control no-RT (RNA como templado) y los Ct de las muestras problema Ct-RT (cDNA como templado).

	Ct Control no-RT						Ct-RT						
Zm18s													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Δ Ct (no RT-RT)
E0	21.884	21.886	20.562	20.377	21.177	0.821	13.478	13.624	14.458	13.324	13.721	0.506	7.456
E18	21.546	21.413	20.824	20.768	21.138	0.399	13.180	14.839	12.709	13.554	13.571	0.914	7.567
E30	23.545	23.289	22.681	21.510	22.756	0.906	14.242	14.521	14.369	14.032	14.291	0.207	8.465
E48	19.658	19.532	21.430	21.337	20.489	1.035	13.234	14.517	13.404	13.956	13.778	0.581	6.711
S0	21.023	21.074	20.475	20.282	20.713	0.395	12.562	12.525	12.588	12.995	12.668	0.220	8.046
S18	20.602	20.364	19.701	19.628	20.074	0.483	12.021	12.054	11.971	11.876	11.981	0.078	8.093
S30	22.690	22.554	23.293	23.142	22.920	0.354	14.614	14.569	14.608	13.998	14.447	0.300	8.473
S48	20.098	19.890	19.429	19.350	19.692	0.361	14.273	14.266	14.443	14.565	14.387	0.144	5.305
ZmSWEET4c													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Δ Ct (no RT-RT)
E0	38.945	38.990	39.358	39.221	39.129	0.195	32.169	32.374	32.756	32.922	32.555	0.345	6.573

E18	35.318	35.294	33.123	35.223	34.739	1.078	26.181	26.048	27.259	26.898	26.597	0.578	8.143
E30	29.641	29.475	31.054	31.679	30.462	1.077	23.195	22.858	24.788	24.772	23.903	1.022	6.559
E48	38.342	38.454	38.916	38.049	38.440	0.360	24.032	24.228	24.862	25.109	24.558	0.510	13.883
S0	39.635	38.330	39.704	39.035	39.176	0.639	37.313	37.121	26.214	37.133	34.445	5.488	4.731
S18	35.325	37.629	34.149	34.827	35.482	1.510	22.283	22.425	28.569	27.437	25.179	3.295	10.304
S30	34.000	32.575	34.176	34.266	33.754	0.794	24.441	25.274	20.859	23.520	23.524	1.915	10.231
S48	31.856	32.183	32.008	31.493	31.885	0.293	17.277	18.392	20.298	18.663	18.658	1.247	13.227
ZmSWEET6b													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	33.378	39.222	38.317	36.074	36.748	2.607	31.383	31.612	31.823	31.602	31.605	0.180	5.143
E18	38.897	38.300	38.458	38.699	38.589	0.263	30.524	30.633	30.739	ND	30.632	0.108	7.957
E30	32.242	32.135	38.143	38.701	35.305	3.606	29.918	30.076	30.227	30.071	30.073	0.126	5.232
E48	39.839	34.969	38.495	38.487	37.947	2.085	29.476	29.171	28.850	29.156	29.163	0.256	8.784
S0	36.387	35.319	34.821	32.802	34.832	1.503	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	34.832
S18	35.489	33.497	28.176	28.586	31.437	3.625	ND	ND	ND	ND	0.000	0.000	31.437
S30	32.650	31.080	33.768	32.649	32.537	1.105	ND	ND	ND	ND	0.000	0.000	32.537
S48	38.265	38.790	38.615	39.583	38.813	0.558	28.462	28.607	28.741	ND	28.603	0.140	10.210

ZmSWEET11a													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	39.499	38.949	39.857	39.024	39.332	0.426	32.654	33.151	35.978	34.278	34.015	1.474	5.317
E18	34.608	36.454	35.228	34.460	35.187	0.907	27.812	27.732	28.769	28.746	28.265	0.570	6.923
E30	38.562	38.239	37.998	37.221	38.005	0.572	23.234	23.451	23.007	22.677	23.092	0.331	14.913
E48	39.632	38.453	39.405	38.102	38.898	0.737	22.879	21.648	21.872	21.784	22.046	0.563	16.852
S0	35.193	34.767	35.208	35.130	35.075	0.208	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S18	39.174	39.400	39.302	39.146	39.255	0.118	37.421	37.299	35.836	38.973	37.382	1.282	1.873
S30	39.522	39.463	39.834	39.866	39.672	0.208	32.751	34.187	30.564	30.458	31.990	1.806	7.682
S48	39.814	39.567	39.329	38.954	39.416	0.366	31.597	31.287	35.283	37.067	33.809	2.831	5.607
ZmSWEET12a													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	35.121	35.344	35.103	35.037	35.151	0.133	20.428	21.039	20.925	20.906	20.824	0.271	14.327
E18	33.986	34.001	33.472	34.384	33.961	0.374	23.241	24.085	24.457	24.438	24.055	0.569	9.906
E30	35.463	35.215	35.211	34.757	35.162	0.294	24.574	25.854	23.440	23.825	24.423	1.064	10.738
E48	35.053	35.419	35.149	34.804	35.106	0.254	27.479	27.802	27.778	28.147	27.802	0.273	7.305

S0	34.202	32.688	34.321	34.344	33.889	0.803	22.634	22.730	23.576	23.378	23.080	0.468	10.809
S18	32.425	35.701	35.238	33.601	34.241	1.509	26.377	26.460	31.072	31.769	28.919	2.902	5.322
S30	34.296	34.871	35.998	35.883	35.262	0.819	27.985	28.204	27.584	27.822	27.899	0.262	7.363
S48	35.919	36.167	34.984	35.634	35.676	0.510	28.121	28.779	29.971	28.961	28.958	0.766	6.718
ZmSWEET13a													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Δ Ct (no RT-RT)
E0	34.662	32.192	38.868	38.956	36.170	3.324	28.770	28.830	28.480	28.630	28.678	0.156	7.492
E18	38.828	28.907	27.259	26.827	30.455	5.653	23.600	23.540	23.660	23.830	23.658	0.125	6.798
E30	39.172	35.142	37.087	29.631	35.258	4.096	20.490	20.900	21.590	21.630	21.153	0.554	14.105
E48	39.699	39.604	39.090	38.183	39.144	0.694	19.850	19.960	19.840	19.940	19.898	0.061	19.246
S0	37.545	37.958	37.631	37.903	37.759	0.202	30.510	34.990	31.990	31.520	32.253	1.927	5.507
S18	38.752	38.261	36.696	36.223	37.483	1.214	27.415	28.530	24.930	28.880	27.439	1.785	10.044
S30	32.105	32.943	32.260	32.322	32.408	0.368	22.530	24.020	20.150	20.110	21.703	1.915	10.705
S48	30.762	35.230	35.753	32.001	33.436	2.436	19.060	18.970	27.600	28.140	23.443	5.117	9.994
ZmSWEET13b													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Δ Ct (no RT-RT)

E0	38.692	37.586	38.435	38.104	38.204	0.477	30.826	31.515	31.776	31.187	31.326	0.412	6.878
E18	28.421	29.387	28.844	27.610	28.566	0.750	19.243	18.722	22.630	22.683	20.820	2.132	7.746
E30	36.167	32.800	30.451	30.978	32.599	2.583	19.132	18.961	20.692	20.781	19.891	0.979	12.708
E48	39.763	36.978	32.453	37.947	36.785	3.111	18.965	17.821	17.960	17.823	18.142	0.552	18.643
S0	39.343	32.975	34.925	35.977	35.805	2.666	21.692	22.206	22.294	22.445	22.159	0.327	13.646
S18	30.199	35.267	28.598	28.799	30.715	3.117	21.879	21.301	26.351	25.308	23.710	2.496	7.006
S30	39.357	37.263	37.117	38.547	38.071	1.071	25.133	24.848	19.236	19.369	22.146	3.286	15.925
S48	37.968	37.481	37.190	34.946	36.896	1.339	17.669	17.828	19.915	21.917	19.332	2.004	17.564
ZmSWEET14b													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	39.091	39.487	39.763	39.039	39.345	0.343	37.031	36.221	36.373	35.284	36.227	0.720	3.118
E18	35.639	34.597	35.675	37.546	35.864	1.228	25.231	27.805	26.510	26.305	26.463	1.056	9.402
E30	38.545	38.443	37.902	34.989	37.470	1.678	24.768	26.458	25.758	25.847	25.708	0.700	11.762
E48	36.836	36.095	36.066	35.273	36.068	0.638	34.838	35.015	25.759	26.040	30.413	5.214	5.655
S0	36.642	36.954	38.687	38.866	37.787	1.152	26.261	27.002	27.471	27.928	27.165	0.711	10.622
S18	36.519	35.355	38.121	35.488	36.371	1.277	27.931	27.912	28.076	27.771	27.923	0.125	8.448
S30	34.563	34.102	33.993	34.042	34.175	0.262	24.600	24.441	24.600	24.145	24.446	0.215	9.729

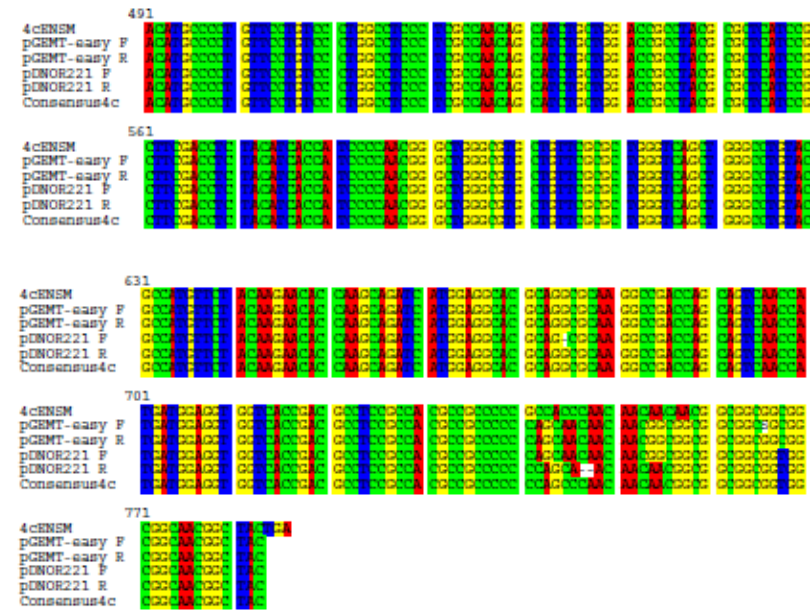
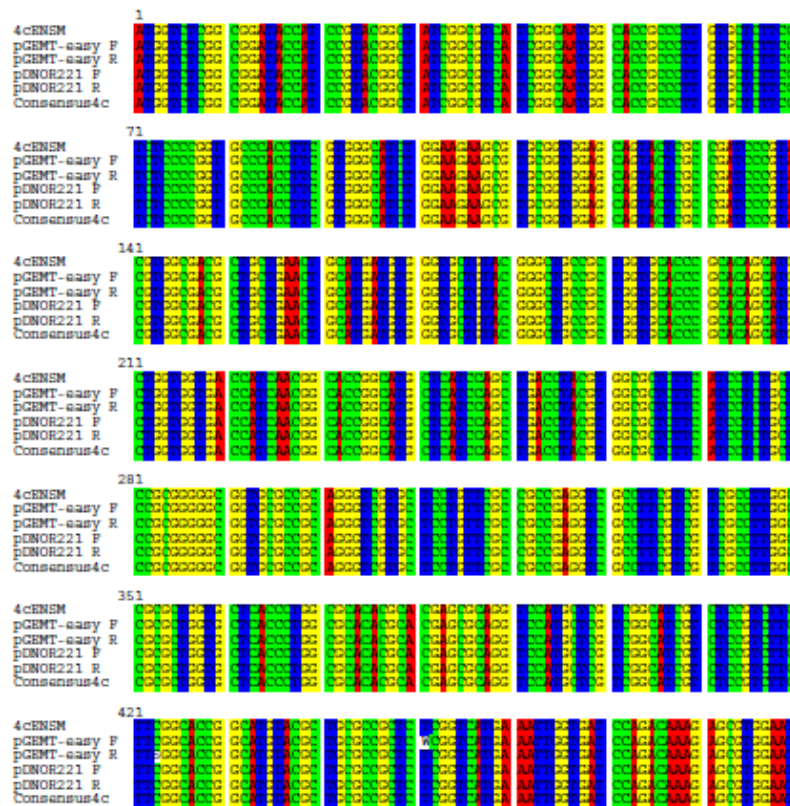
S48	34.795	34.748	32.976	36.841	34.840	1.580	25.406	25.075	33.400	33.092	29.243	4.626	5.597
ZmSWEET15a													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	39.211	39.455	39.159	39.129	39.238	0.148	30.518	32.402	31.157	31.051	31.282	0.797	7.957
E18	36.364	34.606	31.829	32.236	33.759	2.125	24.795	24.892	26.106	25.850	25.411	0.664	8.348
E30	35.414	36.674	36.620	32.301	35.252	2.052	24.715	24.846	25.930	25.688	25.295	0.605	9.957
E48	34.993	39.223	39.515	36.206	37.484	2.235	29.712	28.439	25.428	26.023	27.401	2.017	10.084
S0	32.357	31.884	32.638	34.421	32.825	1.109	25.119	25.702	24.984	25.550	25.339	0.342	7.486
S18	33.771	32.831	32.734	32.849	33.046	0.485	23.654	24.004	25.975	27.184	25.204	1.669	7.842
S30	38.606	39.642	39.635	37.907	38.947	0.847	32.489	34.247	25.058	25.803	29.399	4.648	9.548
S48	37.233	37.151	32.961	35.531	35.719	1.998	24.048	23.895	24.784	25.126	24.463	0.588	11.256
ZmSUT1													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	38.864	39.198	38.698	38.584	38.836	0.267	28.978	27.766	27.745	27.642	28.033	0.633	10.803
E18	28.584	28.765	28.917	28.200	28.616	0.309	20.905	20.829	21.653	21.829	21.304	0.511	7.313
E30	29.220	29.406	29.010	28.803	29.110	0.261	17.319	17.067	17.643	17.403	17.358	0.238	11.752

E48	27.899	28.318	28.204	28.871	28.323	0.406	16.581	16.317	16.494	16.378	16.442	0.118	11.880
S0	39.148	39.606	39.007	39.708	39.368	0.342	33.640	33.730	36.702	34.975	34.762	1.430	4.606
S18	36.757	36.400	38.479	38.302	37.485	1.059	31.311	30.675	23.912	23.162	27.265	4.323	10.219
S30	31.412	31.467	31.738	33.534	32.038	1.008	29.334	28.512	16.472	16.963	22.820	7.058	9.217
S48	28.672	28.262	28.922	28.798	28.664	0.286	14.334	14.775	24.872	25.750	19.933	6.223	8.731
ZmSPS1													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	37.985	37.054	37.964	37.062	37.516	0.529	26.766	26.848	29.108	29.230	27.988	1.365	9.528
E18	35.341	36.868	35.889	37.820	36.479	1.094	30.778	30.510	31.983	30.924	31.049	0.646	5.431
E30	33.651	34.333	32.290	34.474	33.687	0.998	28.471	28.370	28.760	28.587	28.547	0.168	5.140
E48	34.197	33.136	35.413	33.460	34.051	1.010	27.798	28.130	29.365	29.227	28.630	0.783	5.421
S0	39.448	39.568	36.621	39.557	38.798	1.453	30.635	31.981	31.310	31.304	31.307	0.549	7.491
S18	39.346	39.406	38.921	39.815	39.372	0.366	34.186	34.307	34.246	34.247	34.247	0.049	5.126
S30	35.869	35.865	36.841	35.612	36.047	0.543	39.711	30.886	26.392	26.553	30.885	6.241	5.161
S48	34.830	34.910	34.693	34.665	34.775	0.115	26.370	26.248	31.394	30.879	28.723	2.795	6.052

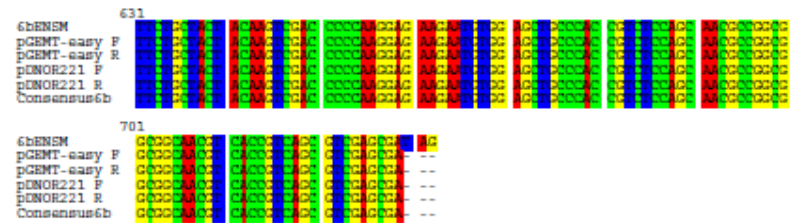
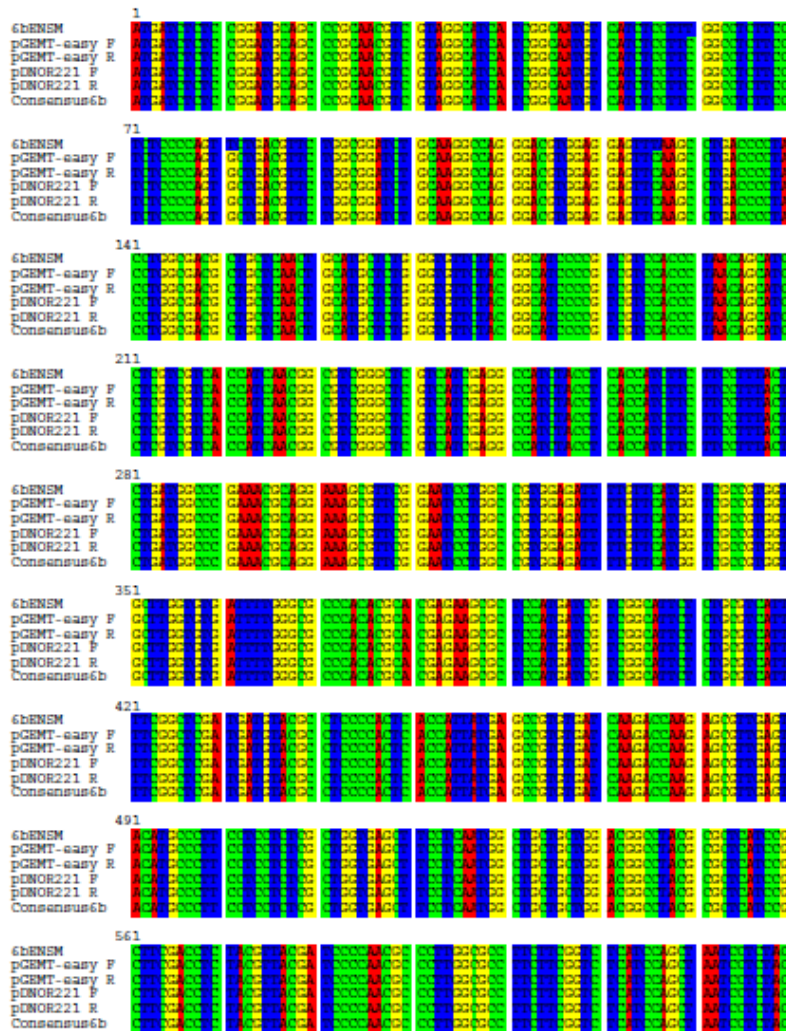
ZmMAS1													
Tejido	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	Muestra biológica 1		Muestra biológica 2		Promedio	Cv	ΔCt (no RT-RT)
E0	37.840	37.456	38.596	37.534	37.856	0.520	20.438	20.444	20.364	20.623	20.467	0.110	17.389
E18	38.067	35.631	38.247	38.466	37.603	1.325	18.923	19.051	19.091	19.019	19.021	0.072	18.582
E30	36.625	36.435	34.753	36.199	36.003	0.851	16.828	16.920	17.263	17.061	17.018	0.190	18.985
E48	38.121	37.421	38.326	37.312	37.795	0.504	17.767	17.832	17.990	18.268	17.964	0.223	19.831
S0	37.515	37.786	36.928	37.027	37.314	0.406	26.355	26.106	20.495	21.206	23.541	3.121	13.773
S18	37.711	36.910	37.956	37.775	37.588	0.464	28.653	28.575	36.711	26.691	30.158	4.462	7.430
S30	32.564	34.648	35.790	32.886	33.972	1.519	13.930	14.007	13.867	13.849	13.913	0.071	20.059
S48	39.291	38.726	38.147	38.051	38.554	0.575	14.984	15.017	18.740	18.739	16.870	2.159	21.684

Anexo IV. Secuenciación en sentido y antisentido de las clonas obtenidas en los vectores pGEMT-easy y pDNOR221. (ENSM secuencia anotada en la base de datos EnsemblPants (Kersey et al., 2018)).

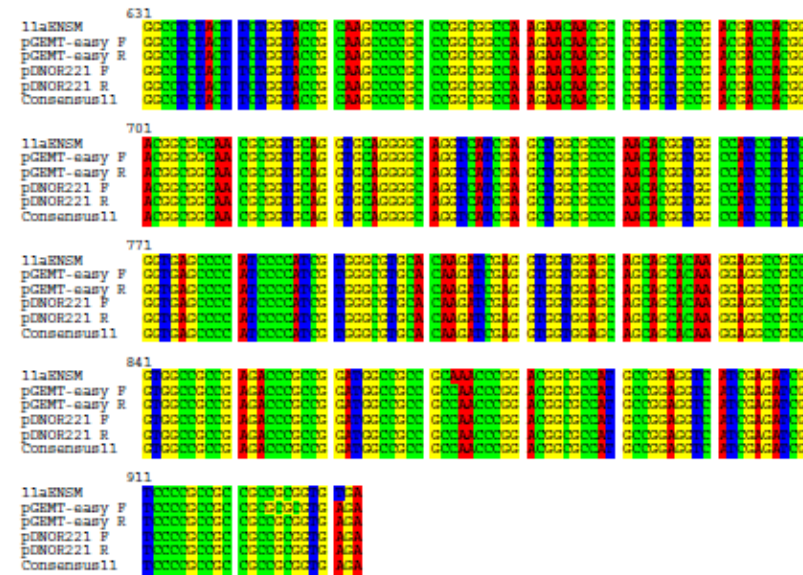
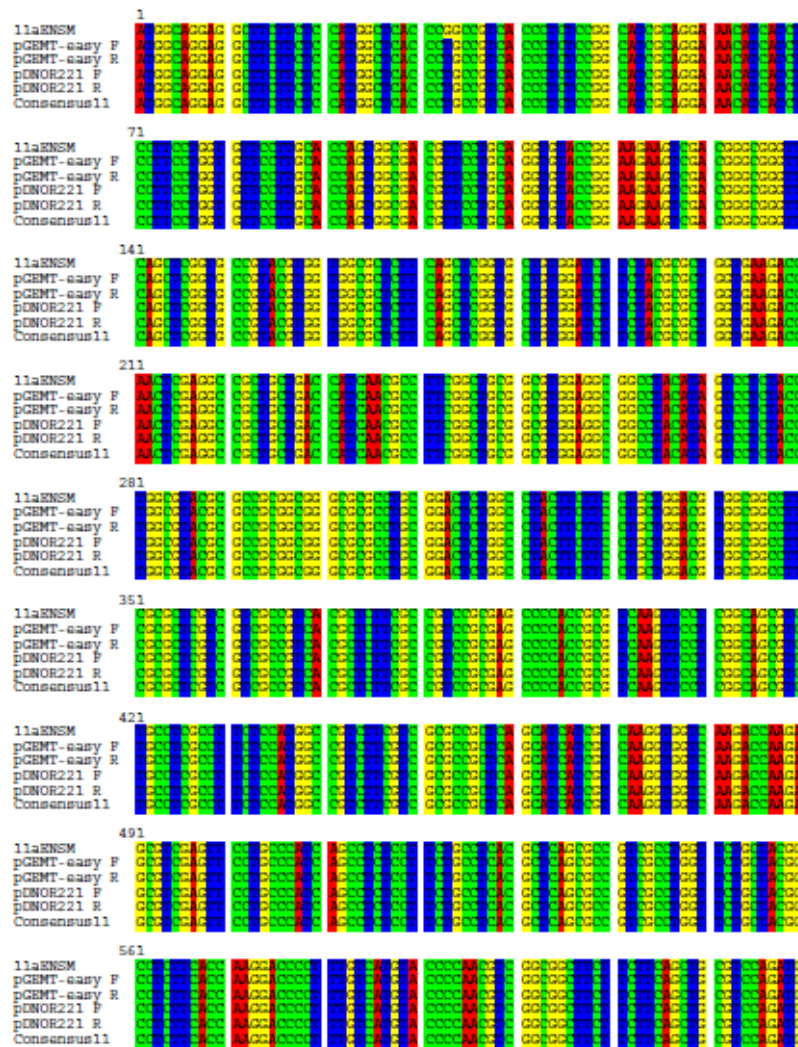
Secuenciación de la ORF del ZmSWEET4c



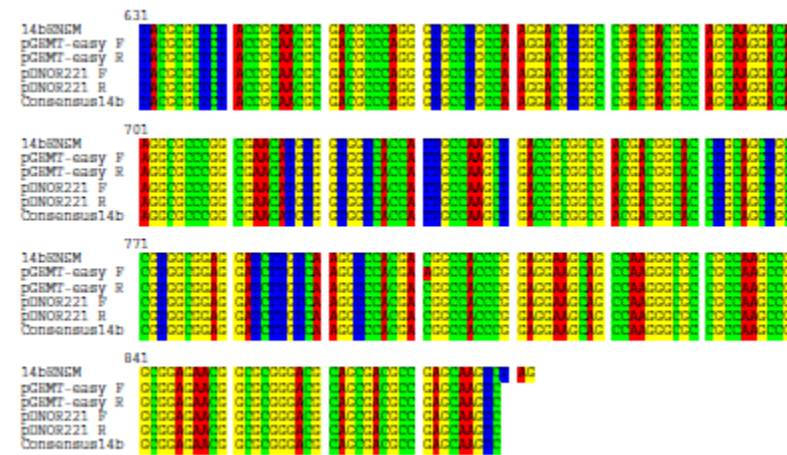
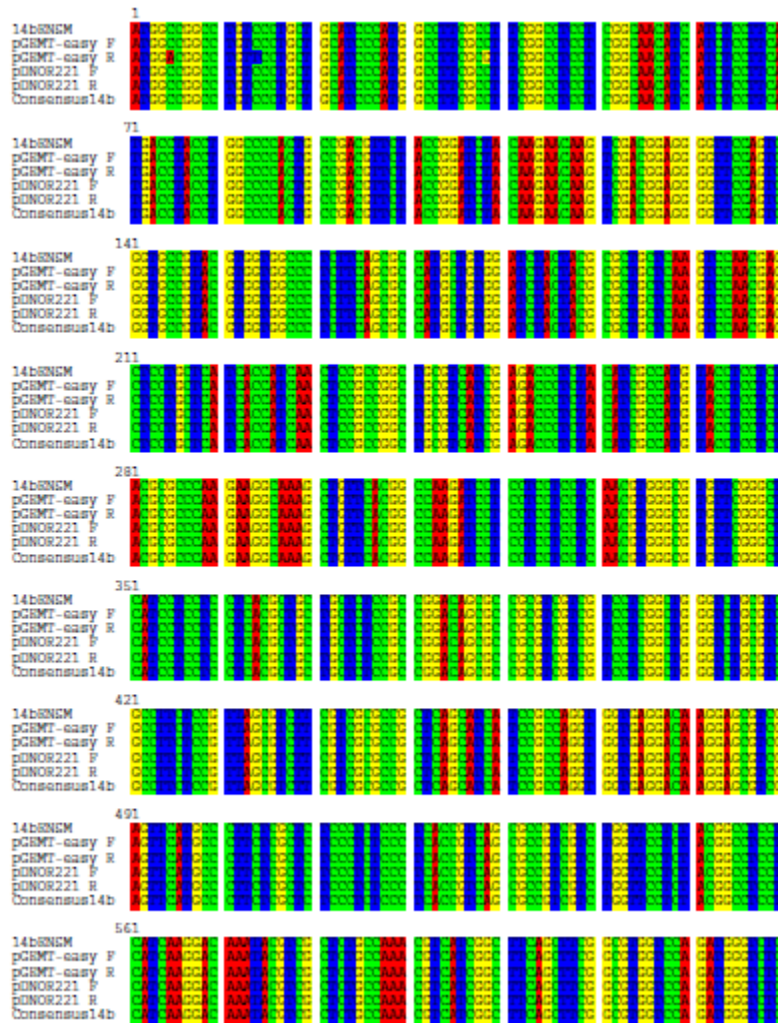
Secuenciación de la ORF del ZmSWEET6b.



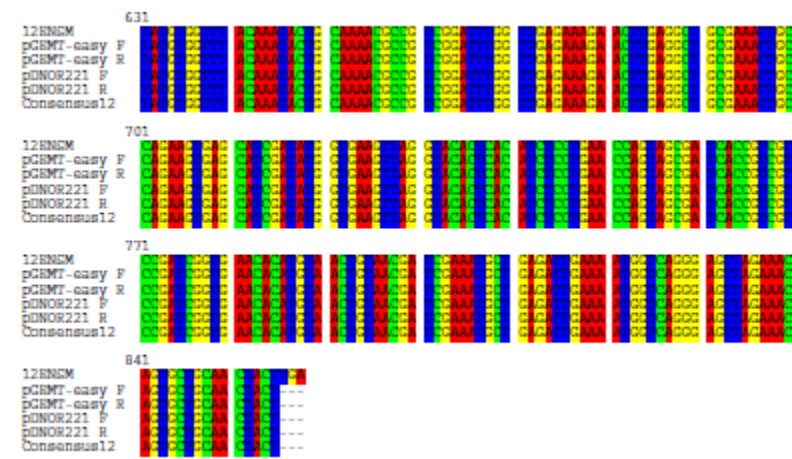
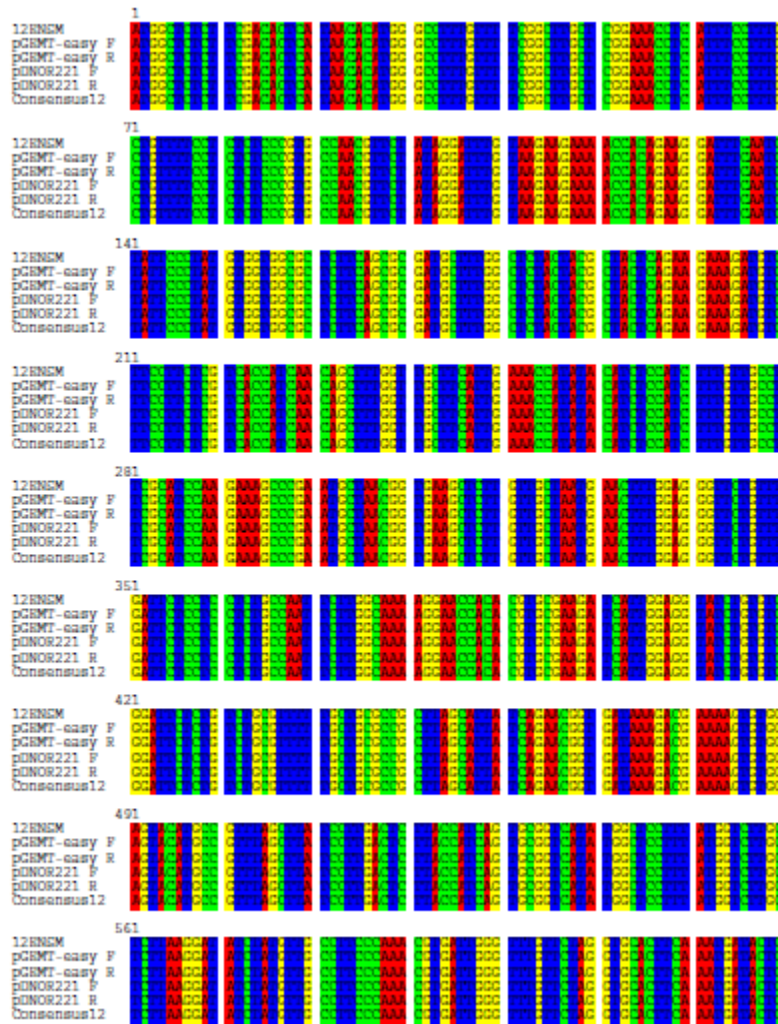
Secuenciación de la ORF del ZmSWEET11



Secuenciación de la ORF del ZMSWEET14b

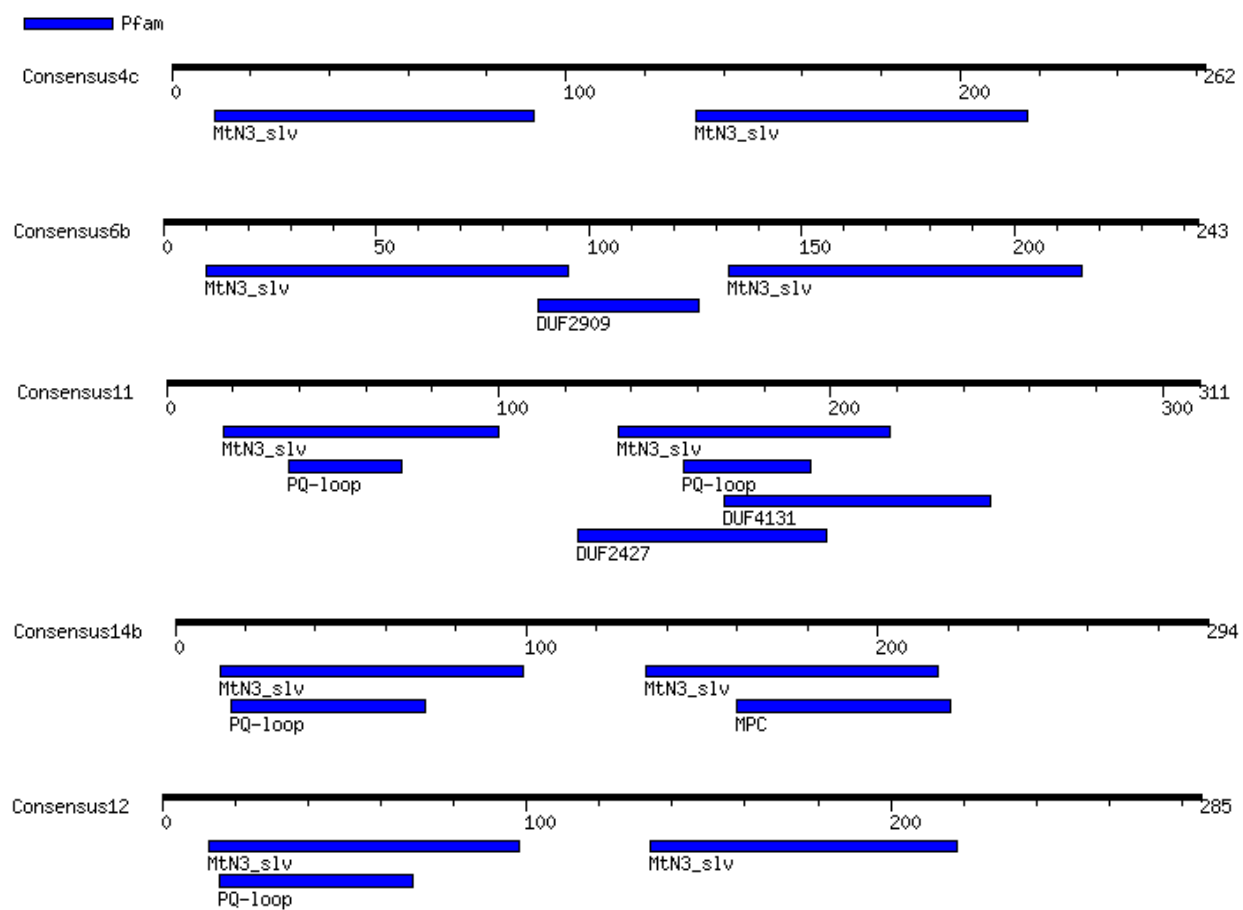


Secuenciación de la ORF del AtSWEET12.



Anexo V. Análisis in silico de estructura secundaria de proteínas predichas de los ZmSWEETs clonados.

Predicción de motivos MtN3-slv.



Otros motivos identificados:

DUFs= Protein unknown function.

PQ-loop= PQ repeat.

MPC= mitochondrial piruvate carriers.

Predicción de cruces transmembranales.

