



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Interacción y participación en respuesta al estrés biótico de las proteínas Factor Agregante de la β -Glucosidasa 1 (ZmBGAF1) y la Hexocinasa 4 (ZmHXK4).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB. Andrés Burgos Palacios

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Sobeida Sánchez Nieto.
Facultad de Química.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Xochitl Pérez Martínez.
Instituto de Fisiología Celular.

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra.
Facultad de Química.

Ciudad de México, Marzo 2021.



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.

Agradecimientos

El trabajo de tesis “*Interacción y participación en respuesta al estrés biótico de las proteínas Factor Agregante de la β -Glucosidasa 1 (ZmBGAF1) y la Hexocinasa 4 (ZmHXK4)*” realizado por Andrés Burgos Palacios fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y con la dirección técnica de la M. en C. Beatriz King Díaz en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo fue financiado por:

- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto A1-S-17269
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN225220.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgó una beca para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas, con número de beca: 957302.
- El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado otorgó un apoyo para asistir al XXI Congreso de la Rama de Bioenergética y Biomembranas en San Luis Potosí. 2019.

Se agradece también a los miembros del jurado: Dr. Roberto Coria Ortega, Dra. Aurora Lara Núñez, Dr. Manuel Gutierrez Aguilar, Dr. José Francisco Torrez Quiroz y Dr. Eleazar Martínez Barajas por sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL.

ABREVIATURAS.	6
RESUMEN.	7
INTRODUCCIÓN.	9
Hexocinasas	9
Factor agregante de la β -glucosidasa (BGAF1).	21
Las β -glucosidasas de maíz.	24
Infección de maíz por hongos del género <i>Fusarium</i> .	27
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Material Biológico	33
RESULTADOS	50
DISCUSIÓN.	78
CONCLUSIONES.	88
PERSPECTIVAS.	88
REFERENCIAS	89
ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Localización y función de la HXK de plantas en la canalización del ATP en el sitio activo de la enzima.....	12
Figura 2. Las múltiples funciones de las HXKs en plantas.....	14

Figura 3. Ensayo de interacción inmunoréplica tipo Far-Western entre ZmBGAF1 y ZmHXK4Δ30.....	20
Figura 4. Dominios característicos de ZmBGAF1.....	22
Figura 5. Modelo de la interacción que existe entre la ZmBGAF1 y la β-Glucosidasa 1.....	23
Figura 6. Vías de síntesis de Ácido salicílico y Ácido Jasmónico.	29
Figura 7. Esquema general del desarrollo experimental propuesto para lograr los objetivos del trabajo.	34
Figura 8. Crecimiento de <i>Fusarium verticilloides</i> MY3 y MY5 observación macroscópica.	50
Figura 9. Morfología microscópica de <i>Fusarium verticilloides</i>	51
Figura 10. Desarrollo de maíz tratado con <i>F. verticilloides</i> (MY3 y MY5) y 50 μM	53
Figura 11. Curvas estándar de expresión de <i>Zm18s</i> (A) y <i>ZmBGAF1</i> (B) en diferentes diluciones de cDNA.	55
Figura 12. Expresión relativa de <i>ZmBGAF1</i> y <i>ZmHXK4</i> con respecto a <i>Zm18s</i> en los diferentes tratamientos de estrés.	57
Figura 13. Expresión relativa de los genes <i>ZmAOS</i> , <i>ZmAOC</i> y <i>ZmPAL</i> con respecto a <i>Zm18s</i> en los diferentes tratamientos de estrés.	59
Figura 14. Comprobación de que los genes <i>ZmBGAF1</i> y <i>ZmHXK4</i> se encontraban en los vectores pDONR221-BGAF1 y pDONR221-HXK4Δ30.....	61
Figura 15. Comprobación de que el gen <i>ZmHXK4Δ30</i> se encontraba en el vector pUBC-nYFP y <i>ZmBGAF1</i> en el vector pUBN-cYFP.	62
Figura 16. Comprobación de la presencia de los genes <i>ZmBGAF1</i> y <i>ZmHXK4Δ30</i> en pEG103.....	63
Figura 17. Hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> infiltradas con <i>A. tumefaciens</i> ..	66
Figura 18. Efecto de la infiltración con solución de infiltración en la fluorescencia de la epidermis de las hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	67
Figura 19. Observación por microscopía de fluorescencia de la expresión transitoria de <i>ZmBGAF1-GFP</i> y <i>ZmHXK4Δ30-GFP</i> en las hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	68

Figura 20. Efecto de la co-expresión transitoria de ZmBGAF1-cYFP y ZmHXK-nYFP, ensayo BiFC, en las hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	69
Figura 21. Efecto de la co-infiltración de pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4Δ30-nYFP en el fenotipo de las hojas de maíz de 4 semanas de crecimiento.	72
Figura 22. Niveles de los transcritos de <i>ZmHXK4</i> y <i>ZmBGAF1</i> en las plantas que se infiltraron para expresar a ambas proteínas solas o en conjunto.	73
Figura 23. Efecto de la co-infiltración de los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4Δ30-nYFP en la fluorescencia de las hojas de maíz.....	74
Figura 24. Observación en microscopio de epifluorescencia de protoplastos de maíz objetivo 40X.	75
Figura 25. Fluorescencia de YFP no específica en protoplasto.	76
Figura 26. Ubicación de las secuencias promotoras en <i>ZmBGAF1</i> y <i>ZmHXK4</i>	83
Figura 27. Separación del RNA en un gel de agarosa.	103
Figura 28. Predicción <i>in silico</i> de la hibridación de los oligonucleótidos en <i>ZmBGAF1</i> y <i>ZmHXK4</i> y la longitud del producto de PCR de cada uno.	104
Figura 29. Curvas de disociación de los productos amplificados <i>ZmBGAF1</i> , <i>ZmHXK4</i> y <i>Zm18s</i>	105
Figura 30. Fluorescencia de los protoplastos de maíz que expresan a la ZmHXK4Δ30 unida a GFP.	106

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Ubicación de las HXKs en plantas y su posible función en la célula.	10
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR punto final y tiempo real de <i>ZmBGAF1</i> , <i>ZmHXK4</i> , <i>Zm18s</i> , <i>ZmAOS</i> , <i>ZmAOC</i> y <i>ZmPAL</i>	39
Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción de qPCR.	40
Tabla 4. Motivos en secuencias promotoras, su función y ubicación en <i>ZmBGAF1</i> y <i>ZmHXK4</i>	107

ABREVIATURAS.

ABA	Ácido abscísico.
AOC	Aleno Óxido Ciclasa.
AOS	Aleno Óxido Sintetasa.
BGAF1	Factor agregante de la Beta Glucosidasa 1.
BGlu	Beta Glucosidasa.
BiFC	Complementación de la Fluorescencia Bimolecular.
c.b.p.	Cuanto baste para.
ERBs	Cuerpos de Retículo Endoplásmico.
ETI	Inmunidad Activada por Efectores.
FB1	Fumonisina B1.
GFP	Proteína Verde Fluorescente.
Glu	Glucosa.
HXK	Hexocinasa.
HXL	Hexocinasas like.
JA	Ácido Jasmónico.
JLR	Lectinas Relacionadas con Jacalinas.
MeJA	Metil Jasmonato.
MV	Metil viológeno.
OPR	Ácido 12-oxofitodiénico Reductasa.
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PR	Proteína relacionada a la patogénesis.
PTI	Inmunidad Activada por Patrones
RE	Retículo Endoplásmico.
RPT5B	Partícula reguladora 19S de la subunidad del proteosoma.
SA	Ácido Salicílico.
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje.
VHA-B1	Subunidad B1 de la ATPasa Vacuolar.
YFP	Proteína Amarillo Fluorescente.

RESUMEN.

Las Hexocinasas (HXKs) son proteínas con capacidad de fosforilar hexosas, además de ser un sensor de abundancia de glucosa, capaz de formar complejos represores de genes fotosintéticos y también se ha observado su capacidad de fosforilar proteínas. Buscando nuevas proteínas que pudiesen interactuar con HXKs de maíz, en el grupo de trabajo se realizaron ensayos de “pull-down” usando a la ZmHXK4 Δ 30 recombinante como carnada y se sometió a la interacción con mitocondrias de coleoptilos de 72 h de germinación, infectados con y sin un hongo del género *Fusarium*, identificó en los eluatos la presencia de proteínas de respuesta a estrés y a la proteína Factor Agregante de la β -Glucosidasa 1 (BGAF1) solo cuando el maíz estaba contaminado. La interacción ZmHXK4-ZmBGAF1 de maíz se comprobó *in vitro*, mediante ensayos de Far Western. Dicha interacción podría ser un mecanismo novedoso de respuesta al estrés por patógenos.

ZmBGAF1 es una proteína con dos dominios, el dominio Dirigente, que pertenece a la familia de proteínas inducidas por la fitohormona ácido jasmónico (JA), y el segundo es el dominio de Lectina Relacionado con las Jacalinas (JRL) el cual se encarga de reconocer y unir a la β -glucosidasa 1 (BGLU1) de maíz, formando agregados insolubles de alto peso molecular. Dicha unión permite la protección de BGLU1 ante proteasas endógenas o de patógenos, pero no modifica su actividad. Las BGLU hidrolizan glucósidos para dar lugar a agliconas, compuestos tóxicos para microorganismos e insectos.

La infección con el hongo *Fusarium verticillioides*, principal hongo patógeno del maíz, causa pudrición de tallos, mazorcas y raíces. Se ha observado que induce los genes implicados en la síntesis de JA, así como el aumento en la concentración de JA. Puede ocasionar enfermedad en todos los estados de desarrollo del maíz, infectando principalmente las raíces, los tallos y los granos.

Por lo que el objetivo de este proyecto fue determinar la interacción de la ZmHXK4 y la ZmBGAF1 *in vivo* y evaluar su participación en las respuestas a estrés biótico.

Se analizaron los niveles de expresión de los genes que codifican para ambas proteínas en coleoptilos de maíz infectadas con *F. verticilloides* cepa MY3 (alta productora de FB1) y MY5 (baja productora de FB1) o tratados con MeJA, encontrándose un aumento en la transcripción de *ZmHXX4* en los tres tratamientos. Sin embargo *ZmBGAF1* solo aumentó en el tratamiento de MeJA y se redujo con cualquiera de las dos cepas de *F. verticillioides*, a pesar de que las cepas encendieron distintas vías de defensa. La producción de plantas sobreexpresoras de *ZmBGAF1* y *ZmHXX4* solas o en conjunto en versiones sencillas o unidas a un fragmento de la proteína amarillo fluorescente (YFP) o a la versión completa de GFP se logró mediante la agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* y por agroinfiltración con vacío en semillas de maíz.

Se observó un fenotipo de estrés en las plantas que sobreexpresaban en conjunto *ZmBGAF1* y *ZmHXX4*, bordes ondulados y hojas con pérdida de turgencia. Adicionalmente, la sobreexpresión de *ZmHXX4* en el sistema homólogo, mostró un fenotipo similar al de *AtHXX1*, con pérdida de clorofila y muerte celular.

Se observó la Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) en las hojas de las plantas que expresaban *ZmHXX4* Δ 30-nYFP y la *ZmBGAF1*-cYFP, aunque el acercamiento en los protoplastos mostró puntos de mayor fluorescencia, es necesario realizar otros controles para determinar que efectivamente hay interacción y determinar la localización sub-celular de *ZmBGAF1* y *ZmHXX4*.

El análisis de las regiones promotoras de ambas *ZmBGAF1* y *ZmHXX4*, mostró secuencias descritas para la regulación de proteínas de respuesta a estrés, tanto biótico como abiótico, por lo que en conjunto con los resultados experimentales, se sugiere realizar estudios posteriores para claramente establecer la interacción de ambas proteínas, así como determinar cuál es la función del complejo, en donde se localiza y los eventos moleculares que desatan la respuesta celular de la planta.

INTRODUCCIÓN.

Hexocinasas

Las hexocinasas (HXK) en plantas son proteínas multifuncionales, ya que además de estar involucradas en la fosforilación de hexosas, que es su función más conocida, también participan en la fosforilación de proteínas (Hu *et al.*, 2016), en la percepción de la abundancia de glucosa (Glu) y su transducción para modificar la expresión de genes (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2019; Kim *et al.*, 2013; Kristoffersen *et al.*, 2000). A continuación, se describen brevemente estas funciones.

Función catalítica de las hexocinasas

En las plantas, la HXK fosforila diferentes hexosas como la D-Glucosa, la D-fructosa, la D-manosa y la D-galactosa, utilizando como donador de fosfato preferentemente al ATP, aunque puede usar también GTP y UTP (Claeysen y Rivoal, 2007). Las hexosas-fosfato son un metabolito clave en varias vías metabólicas: glucólisis, vía oxidativa de las pentosas fosfato, síntesis de almidón, síntesis de ácidos grasos, formación de nucleótidos y sus productos contribuyen con los esqueletos para la síntesis de la pared celular (Kim *et al.*, 2013)

La familia de HXKs en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* es la más estudiada, está compuesta de 6 genes. Tres de ellos codifican para HXKs con capacidad catalítica, mientras que los otros tres genes codifican para proteínas estructuralmente similares a las HXKs, pero carecen de actividad catalítica, por lo que se les ha designado como proteínas HXK-like o HXL (Karve *et al.*, 2008). En *Zea mays* la familia se compone de 9 genes, 6 codifican para proteínas con capacidad catalítica comprobada y 3 genes que probablemente codifican para proteínas que carecen de actividad catalítica (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Adicionalmente, las HXKs no solo son diferentes en cuanto a su actividad catalítica sino también en su localización subcelular, misma que juega un papel importante en su función. La localización de las HXK en algunos de los compartimentos

subcelulares depende de la carencia o presencia de una secuencia localizada en su amino-terminal (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación de las HXKs en plantas y su posible función en la célula.

Isoforma HXK	Señal	Función	Referencia
Mitocondrial	Secuencia hidrofóbica de 24 aminoácidos, en el N-terminal, péptido de anclaje a la membrana externa mitocondrial. En algunas HXKs también se ha encontrado adyacente al péptido mitocondrial una secuencia señal de localización nuclear.	Sensora y metabólica	(Cho <i>et al.</i> , 2009)
Cloroplástica	Secuencia hidrofóbica 30 aminoácidos en el N-terminal, señal cloroplástica. Esencialmente se encuentra en dicotiledóneas.	Metabólica y en <i>Arabidopsis</i> HXK3 es también sensora	(Karve <i>et al.</i> , 2010)
Citosólica	No tiene secuencia señal y son HXKs citosólicas.	Metabólica y en algunos casos en monocotiledóneas también es sensora	(Nilsson <i>et al.</i> , 2011; Kim <i>et al.</i> , 2016; Morgado-Martínez, 2020)

Las HXKs citosólicas no tienen péptidos señal o aminoácidos hidrofóbicos que le sirvan para anclarse a la membrana, por lo que se encuentran en el citoplasma y están presentes en plantas monocotiledóneas como el maíz, sorgo, arroz y trigo, aunque también están presentes en el musgo *P. patens* (Nilsson *et al.*, 2011).

Se ha observado que dependiendo de si las plantas son monocotiledóneas o dicotiledóneas se presentan ciertas isoformas de HXKs (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017). Por ejemplo, en *Arabidopsis* que es una dicotiledónea no hay HXKs citosólicas, AtHXK1 y 2 son HXKs mitocondriales, mientras que AtHXK3 es una HXK cloroplástica. En *Z. mays* no hay cloroplásticas, tiene mitocondriales,

HXK4, 5, 6 y 9, además de las HXK7 y 8 que son citoplasmáticas (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Las **HXKs cloroplásticas** contienen una secuencia hidrofóbica de 30 aminoácidos en el extremo amino que codifica para una señal de localización de cloroplasto. Los métodos predictivos no identifican a este isoforma de HXK en maíz, sorgo y trigo por lo que se ha propuesto que estas no se encuentran en monocotiledóneas (Karve *et al.*, 2010). Sin embargo, recientemente se encontró mediante la comparación de más de 100 diferentes secuencias de aminoácidos de HXKs, que en arroz hay una que se predice que se encuentra en el cloroplasto (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Las **HXKs mitocondriales** presentan una secuencia que se predice es una hélice altamente hidrofóbica, formada por cerca de 24 aminoácidos y que tiene como función insertar a la proteína en la membrana externa mitocondrial. Algunas de estas proteínas también se han encontrado en el núcleo y se ha planteado que tiene que ver con otra de las funciones de la enzima que es la de ser sensora de la abundancia de Glu (Cho *et al.*, 2009), aunque se desconoce cuál es el mecanismo de traslocación de la HXK al núcleo. Adicionalmente, existe otra hexocinasa mitocondrial, la cual sólo se ha identificado en el musgo *Physcomitrella patens*, dicha HXK tiene una secuencia de anclaje a la mitocondria diferente a la de las plantas vasculares, aunque conserva la característica hidrofóbica de los aminoácidos (Nilsson *et al.*, 2011).

En mamíferos, la HXK se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, tiene contacto con el canal de aniones dependiente de voltaje o VDAC (Pastorino y Hoek, 2008). En plantas se ha encontrado que la enzima puede llevar a cabo el acoplamiento del uso del ATP mitocondrial para la síntesis de las hexosas-fosfato (Figura 1 y 2), sugerente de que la HXK tiene contactos con VDAC (Alcántar-Aguirre *et al.*, 2013). Por lo anterior, es muy factible que la HXK anclada a la membrana externa mitocondrial tenga una alta eficiencia para la fosforilación de hexosas puesto que tiene disponible cercanamente al ATP.

En maíz, se encontró que hay cuatro HXKs mitocondriales, HXK4, 5, 6 y 9. Solo ZmHXK9 presentó una actividad catalítica mínima (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019), aunque las cuatro son HXKs son HXK sensoras de la abundancia de glucosa (Morgado-Martínez, 2020). Además, el análisis filogenético de las HXKs de plantas, se distribuyen a los miembros en tres clados, 1 correspondiente al de las dicotiledóneas y dos que corresponden a las monocotiledóneas (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

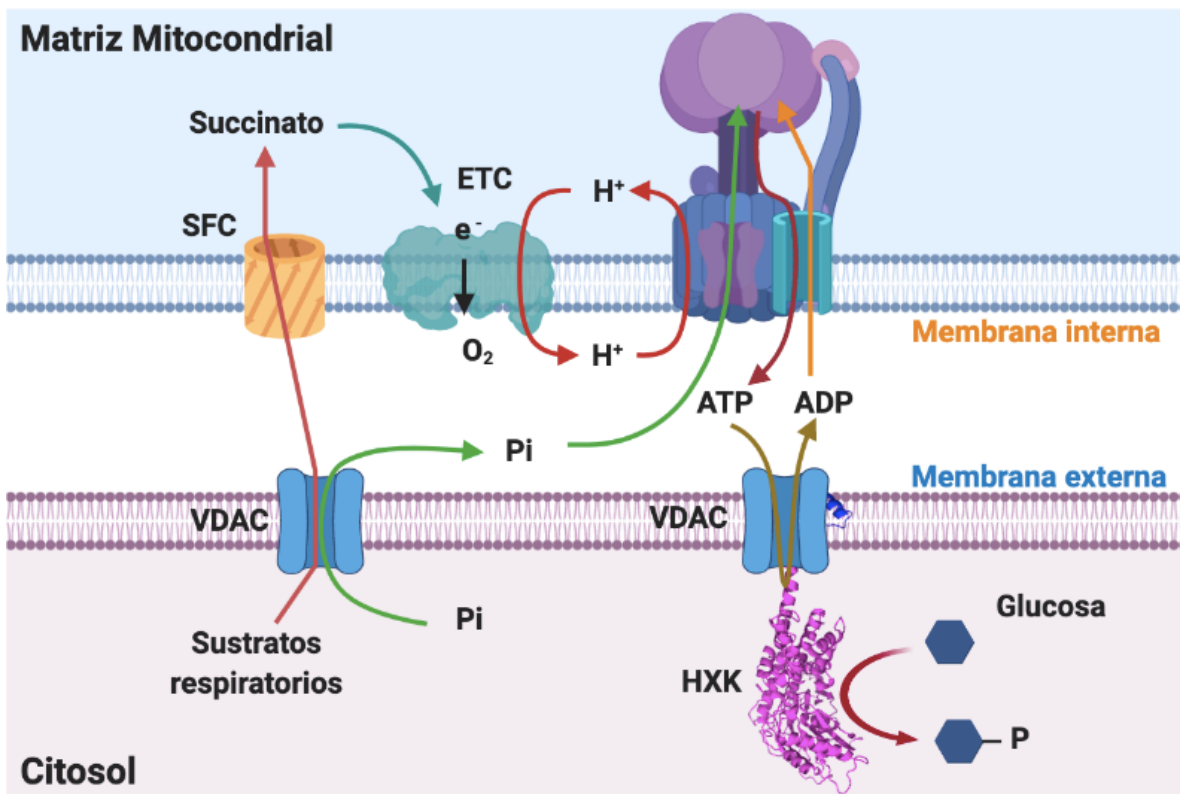


Figura 1. Localización y función de la HXK de plantas en la canalización del ATP en el sitio activo de la enzima.

La HXK unida a la membrana externa mitocondrial interacciona con el Canal Aniónico Dependiente de Voltaje (VDAC) quien le proporciona ATP que viene de la membrana interna mitocondrial a través del translocador de adenin-nucleótidos, al fosforilarse la hexosa el ADP producido regresa a la membrana interna mitocondrial y de allí a la ATPasa a través del mismo translocador de adenin nucleótidos. Modificado de Alcántar-Aguirre *et al.*, 2013.

Función sensora de la abundancia de glucosa.

La Glu y los intermediarios metabólicos de la vía glucolítica no solo modifican el flujo de las vías metabólicas, sino también pueden influir en el desarrollo de la planta, afectando la transcripción de algunos genes y por tanto el desarrollo, crecimiento y la respuesta a diferentes tipos de estrés. Una de las vías que responde a azúcares depende de la HXK (Rolland *et al.*, 2006).

Se ha demostrado en *A. thaliana* que la HXK1 es una proteína que puede responder a la abundancia de Glu y a hormonas, para controlar la expresión genética y el crecimiento de las plantas. Mutantes de HXK1 carentes de la capacidad de fosforilar a la Glu son capaces de percibir la señal de abundancia del azúcar, lo que permitió separar la función sensora de la catalítica (Moore *et al.*, 2003).

Análisis genéticos y de inmunoprecipitación, demostraron interacciones novedosas de las HXKs que permitieron explicar cómo afectan la expresión de genes (Figura 2). La HXK1 mitocondrial se encontró formando un complejo en el núcleo con proteínas no relacionadas con el metabolismo de la Glu, la subunidad B1 de la ATPasa Vacuolar (VHA-B1) y la partícula reguladora 19S de la subunidad del proteosoma (RPT5B) (Cho *et al.*, 2006). El complejo trimérico a su vez interactúa con dos factores de transcripción y modula negativamente la transcripción específica de la expresión de algunos genes fotosintéticos (Figura 2C), independientemente del metabolismo de Glu.

El mecanismo de translocación tanto de la HXK1 como de VHAB1 y RPT5B al núcleo se desconoce (Cho *et al.*, 2006). Aunque hay HXKs que presentan la señal de localización nuclear y que se han detectado en el núcleo, se desconoce si forman el complejo trimérico de represión (Cho *et al.*, 2006, Cho *et al.*, 2009). En maíz, la HXK6 contiene tanto la región de anclaje a la mitocondria o mTP como una secuencia putativa de tránsito al núcleo (NLS por sus siglas en inglés), ZmHXK6 es capaz de translocarse al núcleo tan solo con perder la región mTP (Hernández-

Loyola, 2019) y también es una HXK sensora (Morgado-Martínez, 2020), sin embargo, se desconoce si interactúa con VHAB1 y RTP5B.

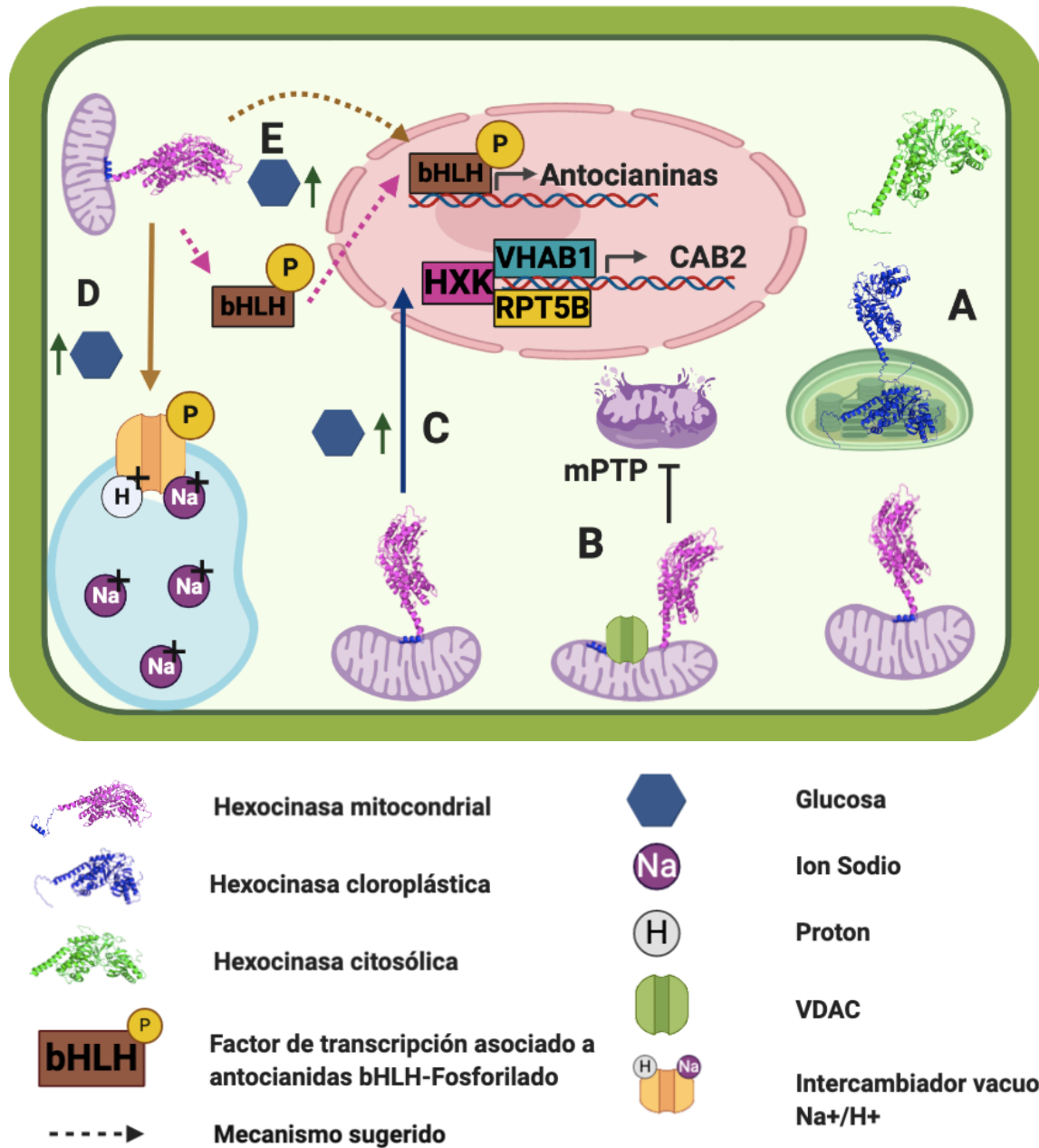


Figura 2. Las múltiples funciones de las HXKs en plantas.

A) Las hexocinasas se encuentran localizadas en diferentes sitios subcelulares, como el citosol (HXK en verde), cloroplasto (hexocinasa en azul), mitocondria y núcleo (HXK en púrpura). Aunque son las HXK mitocondriales las que han sido involucradas en funciones distintas a la fosforilación de hexosas: **B)** Al encontrarse en la membrana externa mitocondrial puede interactuar con VDAC, y se sugiere que al interactuar inhibe la formación de poro de transición de la permeabilidad y la muerte celular programada (Kim

et al., 2006; Godbole *et al.*, 2013). **C)** Cuando los niveles de glucosa suben, AtHXK1 se mueve de la mitocondria al núcleo para formar el complejo trimérico represor con VHA-B1 y RPT5B, el cual se une a factores de transcripción que reprimen la expresión del gen fotosintético CAB2 (Cho *et al.*, 2006). **D)** En manzana MdHXK1 contribuye a la tolerancia a la salinidad interactuando y fosforilando al intercambiador Na⁺/H⁺ que se encuentra en la vacuola (Sun *et al.*, 2018) y **E)** MdHXK1 fosforila al factor bHLH que se encuentra involucrado en la regulación de la biosíntesis de antocianinas (Hu *et al.*, 2016). A pesar de que no es claro como MdHXK1 y bHLH interactúan en el núcleo, la fosforilación de este último por la HXK aumenta la expresión de antocianinas. (Tomado de Rodríguez-Saavedra, Anexo 3)

La capacidad de percibir la glucosa se ensaya a través de las plantas mutantes de *Arabidopsis* incapaces de percibir glucosa, las denominadas gin 2-1. La mutación en las plantas se encuentra en la secuencia de nucleótidos de la HXK1, la cual produce un RNAm inestable que al final no es traducido a proteína (Moore *et al.*, 2003). Semillas de las *Arabidopsis* gin 2-1 germinadas en un medio adicionado con 6 % Glu y crecidas en un fotoperiodo continuo de luz, son capaces de crecer y desarrollar hojas verdaderas, contrario a las plantas silvestres de *Arabidopsis* quienes tienen un crecimiento reducido tanto de la raíz como de la parte aérea, sin aparición de la coloración verde en la parte aérea y en algunos casos llega a ser hasta violácea. Para demostrar que una HXK es capaz de ser sensora de la abundancia de Glu, se complementan las plantas gin 2-1 con la HXK de interés y se observa el desarrollo de la planta. En maíz se encontró que ZmHXK4, 5, 6 y 9 son proteínas que permiten restaurar la sensibilidad a Glu en las plantas gin 2-1 (Morgado-Martínez, 2020).

Múltiples respuestas se producen por efecto de la señalización de Glu mediada por la HXK, una de ellas implica un aumento en el contenido de ácido abscísico (ABA), pues se induce la síntesis de éste, además de la expresión de genes dependientes del mismo. A través de ABA se reduce la apertura estomatal lo cual impacta en la reducción de la tasa fotosintética, proceso independiente de la represión de los genes fotosintéticos (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017).

Adicionalmente, se ha demostrado que la vía de señalización dependiente de HXK interactúa de manera positiva con la vía dependiente de auxinas y de forma negativa

con la vía de señalización dependiente de citocinas. La primera es una fitohormona que está involucrada tanto en la promoción del crecimiento como en la inhibición del crecimiento, dependiendo del tejido y/o la concentración de Glu y la segunda es una citocina esencial que interviene en la actividad del meristemo de los brotes y en la formación de hojas, división celular, biogénesis y senescencia del cloroplasto (Hwang *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006).

Función reguladora de la HXK en la tolerancia al estrés salino.

La HXK1 de *Malus domestica* no solo es capaz de fosforilar hexosas sino también a MdbHLH3, que es un factor transcripcional (Hu *et al.*, 2016) y al intercambiador Na^+/H^+ de manzana, MdNHXK1 en respuesta a estrés salino (Sun *et al.*, 2018). Aunque es controversial la actividad de fosforilación de proteínas de MdHXK1, se conoce que la HXKII de mamíferos, una HXK mitocondrial, es fosforilada en la Thr43 (Roberts and Miyamoto 2015), lo cual favorece su asociación a la mitocondria. En levadura, la ScHXK2 que es citosólica, puede encontrarse en forma de monómero o dímero, la fosforilación de la proteína en la Ser15 favorece la formación del monómero, aumenta la actividad de la enzima, aunque aumenta su inhibición por ATP y modifica su localización subcelular (Behlke *et al.*, 1998, Golbik *et al.*, 2001, Fernández-García *et al.*, 2012).

La interacción entre MdNHXK1 y MdHXK1 fue demostrada mediante un ensayo de pull-down, utilizando como carnada a MdNHX1-His unida a una resina de afinidad por histidinas, y añadiendo a la columna a MdHXK1-GST (Glutación-S-Transferasa) al separar las fracciones eluidas en un gel de poliacrilamida-SDS y después de realizar la inmunoréplica tipo Western usando un anticuerpo anti-GST, encontraron que ambas proteínas se encontraban en la misma fracción (Sun *et al.*, 2018).

La interacción entre la HXK y las proteínas de manzana se corroboró mediante complementación de la fluorescencia bimolecular o BiFC (Hu *et al.*, 2006 y Sun *et al.*, 2018). El fundamento de BiFC es el revelado de un complejo fluorescente, como

resultado de la asociación de dos segmentos de una proteína fluorescente cuando están próximos (Kerppola, 2008).

La fosforilación de MdbHLH3 y MdNHXK1 por MdHXK1 ocasiona que las proteínas sean más estables. La fosforilación del intercambiador Na^+/H^+ por la HXK no solo mejora su estabilidad sino también su capacidad de transporte de Na^+ al interior de la vacuola (Figura 2D). En el caso de MdbHLH3 lleva a la inducción de la síntesis de antocianinas, todo ello como respuesta al estrés salino (Figura 2E). Las antocianinas por su capacidad antioxidante contienen con el estrés oxidativo que provoca el estrés salino, permitiendo la sobrevivencia de la planta ante estrés salino (Sun *et al.*, 2018).

Función reguladora de la HXK en la tolerancia al estrés biótico.

La expresión de NbHXK1, HXK de *Nicotiana benthamiana*, fue estimulada por el tratamiento de la planta con patógenos, con la fitohormona ácido salicílico (SA), involucrada en una de las respuestas de defensa de la planta y también con metil viológeno (MV). En respuesta al estrés oxidativo inducido por MV, las plantas silenciadas en NbHXK1 exhibieron una mayor susceptibilidad, mientras que las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban a las HXK1 y HXK2 tuvieron mayor tolerancia. Además, esas plantas mutantes mostraron una mayor resistencia al patógeno fúngico necrotrófico *Alternaria brassicicola* (Sarowar *et al.*, 2008)

La sobreexpresión de HXKs también protegió ligeramente a las plantas de *Arabidopsis* contra el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000, una respuesta que fue acompañada por un aumento en la producción de H_2O_2 y elevada expresión génica de PR1 (proteína relacionada a la patogénesis; Sarowar *et al.*, 2008). Las especies reactivas de oxígeno se producen durante la defensa del patógeno, y el H_2O_2 puede difundirse en las células vegetales y activar ciertas reacciones, incluida la expresión de los genes de defensa y la muerte celular programada (Baker y Orlandi, 1995; Neil *et al.*, 2002). Estos resultados demuestran que niveles más altos de HXK confieren una resistencia mejorada al estrés oxidativo

inducido por MV y a la infección por patógenos. Sin embargo, el mecanismo preciso subyacente al efecto protector de las HXKs contra los patógenos se desconoce (Jang *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000).

La relación factor agregante de la β -glucosidasa y la hexocinasa

Buscando nuevas proteínas que pudieran interactuar con las HXKs, pero en maíz, en nuestro grupo de trabajo en el laboratorio 102 de la Facultad de Química, se realizaron ensayos de “pull-down” (comunicación personal con la M en C. Beatriz King Díaz), como carnada se usaron a tres de las ZmHXKs mitocondriales, pero en versiones a las que se les removió la región de anclaje a la mitocondria puesto que esto las hace solubles (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019). Una de ellas la ZmHXK4 Δ 30-His unida a una resina de Ni²⁺, His-Tag (Roche), interacciona con varias proteínas que fueron obtenidas de la fracción mitocondrial de coleoptilos de semillas de maíz de 72 h de crecimiento, y que se encontraban infectadas con un hongo del género *Fusarium*. Encontrándose a VDAC y VHA-B1 como proteínas conocidas. Además, se encontraron otras proteínas, entre ellas la Factor Agregante de la Beta Glucosidasa 1 (BGAF1) y otras que se han estudiado en respuesta a estrés. Adicionalmente, dichas proteínas de respuesta a estrés incluyendo a la ZmBGAF1, no interactúan con la HXK cuando las semillas no están infectadas con el hongo (comunicación personal Carolina Rodríguez-Saavedra), lo que hace sospechar que la presencia del hongo favorece la interacción.

Por lo anterior, se realizaron ensayos para corroborar la interacción de ZmHX4 Δ 30 y ZmBGAF1, produciendo ambas proteínas en forma recombinante y realizando un ensayo *in vitro* de Far-Western (Burgos-Palacios, 2019). Para el ensayo de Far Western primero se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % a las dos proteínas recombinantes que presentaban etiquetas distintas, ZmBGAF1-V5 (etiqueta V5) y a ZmHXK4 Δ 30-HA (etiqueta Hemaglutinina). Se realizó la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de PVDF y se bloqueó con leche Svelty al 5 % durante 1 h, y después de los lavados, se llevó a cabo lo siguiente:

- 1) **CONTROL DE REACCIÓN DE ANTICUERPO ANTI-HA CON ZmH XK4-HA.**
Solo ZmH XK4 Δ 30-HA sería reconocida y no ZmBGAF1-V5, tal y como se observa en la Figuras 3A y 3B.
- 2) **ENSAYO FAR WESTERN.** Poner en contacto la membrana en donde se habían transferido ZmBGAF1-V5 y ZmH XK4 Δ 30-HA, con la mezcla de las fracciones que tienen enriquecida a ZmH XK4 Δ 30-HA, su incubación a temperatura ambiente durante 5 h y su posterior lavado. En esta membrana se darían las condiciones para que pudieran interaccionar ZmBGAF1-V5 y ZmH XK4 Δ 30-HA. La interacción se reveló al incubar la membrana con anti-HA. Se observa en la Figura 3C la aparición de una banda en aproximadamente 70 kDa en donde se había separado a ZmBGAF-V5
- 3) **CONTROL DE REACCIÓN DE ANTICUERPO ANTI-V5 CON ZmBGAF1-V5.**
Solo ZmBGAF1-V5 sería reconocida con el anti-V5. Como se observa en la Figura 3D se detectan cuatro proteínas, dos que se encuentran entre los pesos moleculares de 25 y 37 kDa, pero que son de baja intensidad, y otras dos bandas de pesos moleculares mayores y que tienen una intensidad alta, están entre los pesos de 50 y 70 kDa (Figura 3D). Hay que mencionar que no se logró la purificación de ZmBGAF1.

En la membrana incubada con ZmH XK4 Δ 30-HA y revelada con el anticuerpo HA, solo se encontró 1 banda de aproximadamente 70 kDa. Considerando, que ZmBGAF1 en forma monomérica podría encontrarse en los pesos moleculares entre 27 y 32 kDa, el que se encontrará reacción con el anticuerpo anti-V5 en un peso molecular cercano a los 70 kDa indicaba que ZmBGAF1 forma dímeros y que son estos los que están interaccionando fuertemente con la HXK. Para corroborar lo anterior se enviaron a secuenciar tres bandas 70 kDa, 65 kDa y 27 kDa a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI). Y se encontró que la banda de 70 kDa es la que presentó péptidos que corresponden a la ZmBGAF1, lo que sugiere que el dímero de ZmBGAF1 es el que tiene la capacidad de interaccionar con ZmH XK4. Debido a que, si interactúan *in vitro* ZmBFAF1 y ZmH XK4 se decidió continuar con el estudio, pero ahora realizando la determinación

in vivo y explorando si durante la infección con el hongo hay una inducción de la expresión de ambas proteínas.

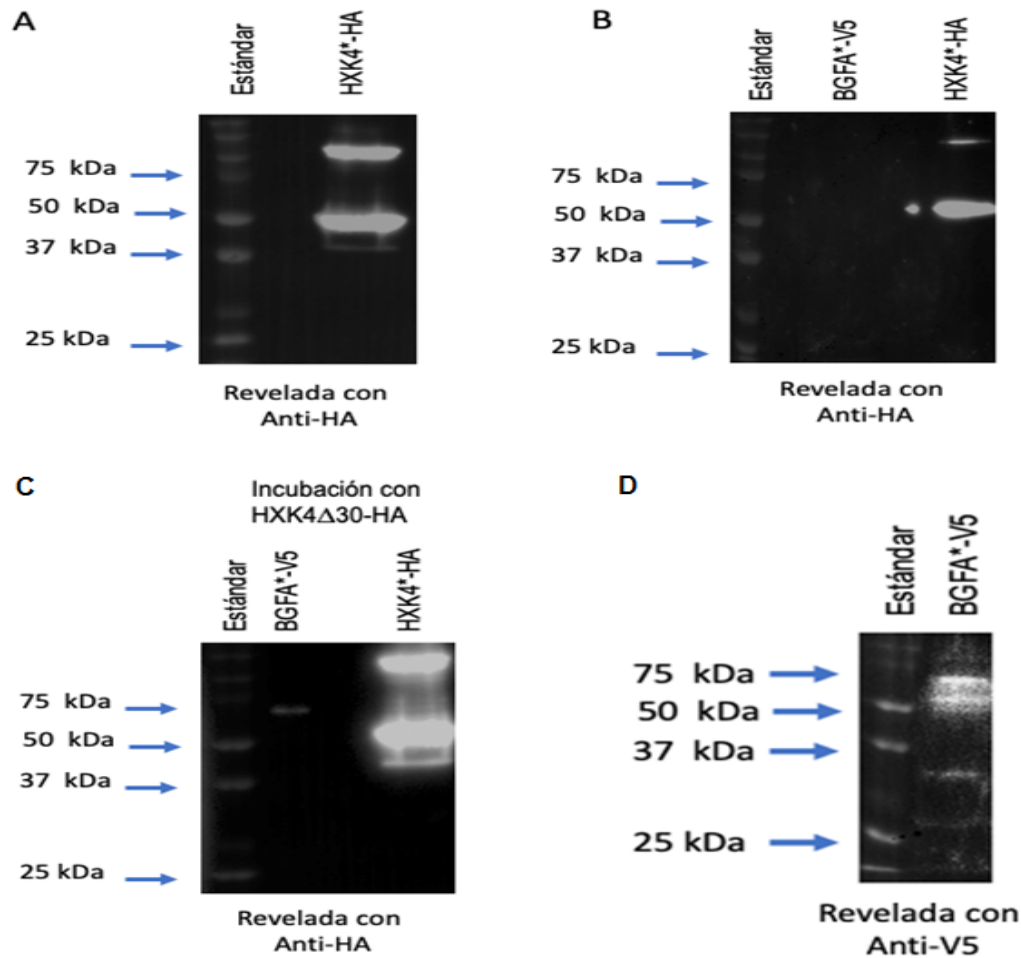


Figura 3. Ensayo de interacción inmunoréplica tipo Far-Western entre ZmBGAF1 y ZmHXXK4 Δ 30.

A. Se separó la fracción enriquecida en ZmHXXK4 Δ 30-HA en un gel de poliacrilamida SDS al 12 %, se transfirió la proteína a una membrana de PVDF y se reveló con el anticuerpo anti-HA. **B.** Se separó mediante un gel de poliacrilamida-SDS, el sobrenadante del lisado de células que produjeron a ZmBGAF1-V5 y a ZmHXXK4 Δ 30-HA purificada, y se realizó la transferencia a una membrana de PVDF, la membrana se reveló con el anticuerpo anti-HA. **C. Ensayo Far-Western,** se separó el sobrenadante del lisado de células que produjeron a ZmBGAF1-V5 y a ZmHXXK4 Δ 30-HA purificada mediante un gel de poliacrilamida-SDS y su posterior transferencia a una membrana de PVDF, la membrana fue incubada con ZmHXXK4 Δ 30-HA y posteriormente se reveló con el anticuerpo anti-HA. **D.** El sobrenadante del lisado del cultivo celular que produce ZmBGAF1 fue separado en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % y transferido a una membrana de PVDF, la membrana se hizo reacción con el anticuerpo anti-V5.

Factor agregante de la β -glucosidasa (BGAF1).

En maíz el ZmBGAF1 es una proteína que pertenece a la familia de lectinas, proteínas que contienen un dominio no catalítico pero que les permite selectivamente reconocer y unirse de manera reversible a glucanos específicos, que pueden encontrarse en forma libre o como parte de glicoproteínas y lípidos (Lannoo y Van Damme, 2014). En maíz, se unen de manera altamente específica a galactosa y manosa, teniendo una mayor preferencia por la primera, lo que hace que se clasifique dentro de la familia de las jacalinas (Kittur *et al.*, 2007; Tachibana *et al.*, 2006).

La mayoría de las lectinas se expresan de manera constitutiva en semillas y tejidos vegetativos. Aunque algunas se expresan de manera específica ante el estrés ambiental o por patógenos. Además, las lectinas conocidas de plantas suelen estar constituidas de 1 o más dominios de lectina acoplados a un dominio no relacionado de aerolisina, quitinasa, F-box, Kelch cinasa, LRR, TIR o dirigente (Lannoo y Van Damme, 2014).

ZmBGAF1 es una proteína modular estructuralmente caracterizada por contener dos dominios (Figura 4), el dominio de respuesta a patógenos o dirigente situado en el N-terminal (residuos 32-149) y el dominio de lectina relacionado con jacalina (JRL) localizado en el extremo C-terminal (residuos 174-304) (Blanchard *et al.*, 2000). La proteína presenta una estructura terciaria de 19 hojas beta (Figura 4^a). El dominio dirigente hacia el amino-terminal es una región muy desordenada mostrada en color azul en la Figura 4^a. El dominio de jacalinas se encuentra en la región carboxilo terminal de la proteína, es más estructurada y es en ella en donde se encuentra el sitio de unión a manosa (en color amarillo en la Figura 4^a).

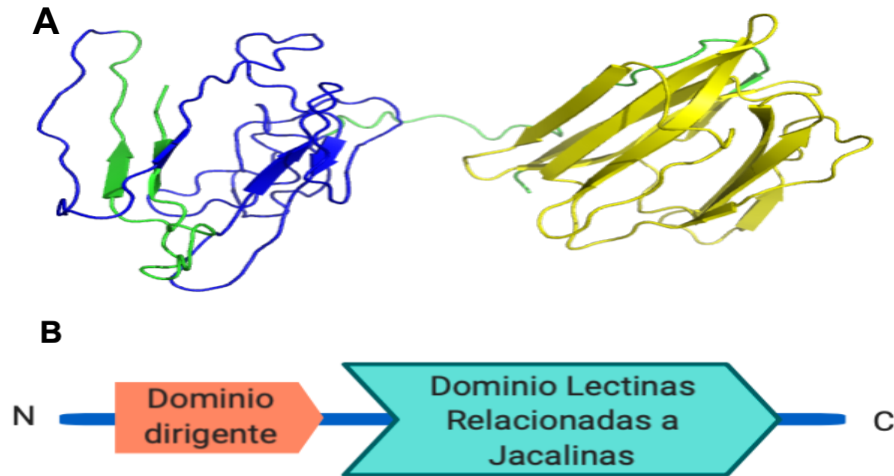


Figura 4. Dominios característicos de ZmBGAF1.

A. La predicción de la estructura terciaria de la proteína ZmBGAF1 obtenida a partir de la secuencia del gen reportado de maíz H95 (Burgos-Palacios, 2019). El modelo de la estructura terciaria de la proteína se obtuvo mediante la aplicación Zhanlab de la Universidad de Michigan (<https://zhanlab.ccmb.med.umich.edu>).

B. Representación de los dos dominios característicos de la ZmBGAF1.

ZmBGAF1 además de pertenecer a la familia de lectinas, también pertenece a la familia de proteínas inducidas por Ácido Jasmónico (JA; Blanchard *et al.*, 2000). Al bloquear la respuesta a la vía del JA se observan plantas más susceptibles a patógenos (McConn *et al.*, 1997). Recientemente, en arroz, se demostró que la sobreexpresión de una proteína quimérica que contenía el dominio dirigente asociado al dominio JRL, contribuye a la resistencia de un amplio espectro de patógenos como *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solanii* y *Xanthomonas oryzae*. La sobreexpresión de OsJAC1 y de sus ortólogos en trigo y avena, llevó también a la resistencia a la enfermedad del tizón en avena (revisado en Esch y Schaffrath, 2017). En sorgo, se observó que ZmBGAF1 es capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* (He *et al.*, 2017).

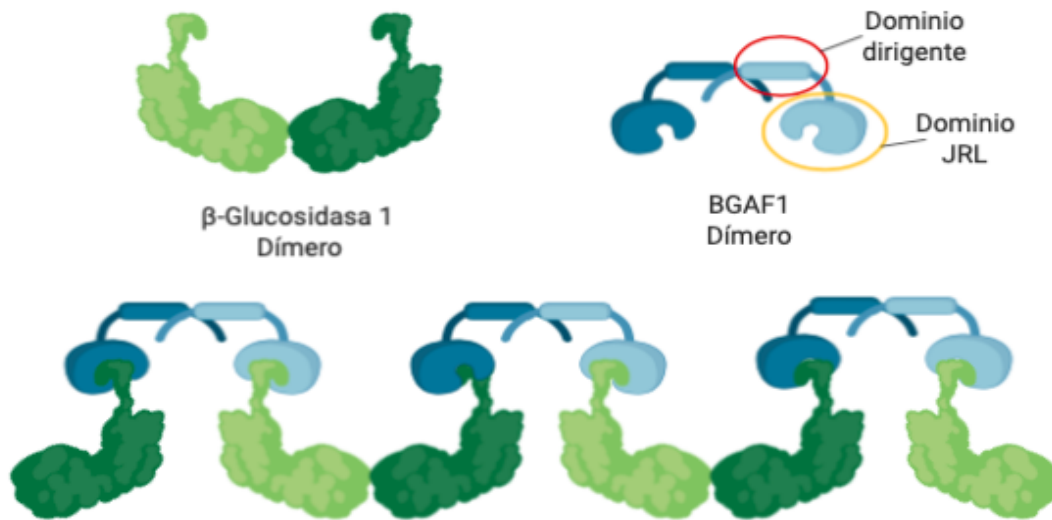


Figura 5. Modelo de la interacción que existe entre la ZmBGAF1 y la β -Glucosidasa 1.

Además de la asociación de ZmBGAF1 con azúcares, se ha demostrado que ésta es capaz de unirse a la Beta Glucosidasa (BGlu; Blanchard *et al.*, 2000) y que el dominio JLR parece estar relacionado con ambas actividades (Qing-Hu *et al.*, 2013). Se ha postulado que las repeticiones G(P/R)WGGSSG de la estructura primaria de la ZmBGAF1 están implicadas en el reconocimiento y unión con la BGlu (Blanchard *et al.*, 2001), lo que lleva a la formación de agregados insolubles de alto peso molecular (Figura 5).

La especificidad de la interacción entre la ZmBGAF1 y BGlu de maíz es muy alta ya que ZmBGAF1 no se une a las BGlu de hongos del género *Trichoderma* y *Aspergillus* y tampoco de plantas como almendra, cereza negra, sorgo, arroz y avena (Blanchard *et al.*, 2000). La agregación de BGlu con ZmBGAF1 ocurre cuando éste último forma un homodímero al interactuar entre los dominios dirigentes (Figura 5; Kittur *et al.*, 2007). Debido a que cada molécula de ZmBGAF1 tiene un sitio de unión a BGlu en el dominio JLR, un dímero de ZmBGAF1 se uniría a dos dímeros de BGlu, formando una cadena lineal en la que el dímero de ZmBGAF1 y el dímero de BGlu se alternan entre sí (Kittur *et al.*, 2007).

La interacción entre BGlu y ZmBGAF1 es estabilizada mediante interacciones no covalentes e hidrofóbicas. Se ha observado que ZmBGAF1 interactúa específicamente *in vivo* o durante su extracción con dímeros de BGlu nativos, lo que hace que se agreguen en formas multiméricas de 1.5×10^6 D o más de tamaño. Parece que la unión de ZmBGAF1 a la BGlu no tiene un efecto detectable sobre la actividad enzimática de la BGlu y sus parámetros cinéticos, lo que sugiere que la unión de ZmBGAF1 no bloquea estéricamente el sitio activo o no cambia la conformación para afectar la actividad enzimática (Blanchard *et al.*, 2000).

Una función plausible de la interacción ZmBGAF1-BGlu, es la protección de BGlu de las proteasas endógenas o provenientes de secreciones de patógenos invasores. Durante la interacción de ambas proteínas ZmBGAF1 protege, pero no modifica la actividad de BGlu y la mantiene en el sitio de la herida, evitando su difusión a otras partes de la planta en donde se ha demostrado que provoca efectos nocivos (Hopke *et al.*, 1994).

Las β -glucosidasas de maíz.

Las β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) han sido el foco de mucha investigación debido a los papeles clave que desempeñan en una serie de procesos biológicos y posibles aplicaciones biotecnológicas. Las BGlus vegetales se han implicado en la defensa contra las plagas, la activación de fitohormonas, la lignificación y el catabolismo de la pared celular. Las BGlus pueden tener diferentes funciones fisiológicas en diferentes especies de plantas, dependiendo de la naturaleza del resto aglicona de los sustratos (Cicek *et al.*, 2000).

La familia de las BGlus en maíz está compuesta de 26 miembros. A pesar de tener una función catalítica similar, la hidrólisis de los enlaces β -glicosídicos, las BGLU pueden diferir en su especificidad por sustratos o propiedades de unión y como ya se ha mencionado en su localización subcelular. En contraste con la col, la coliflor o el brócoli, las plantas de maíz no emplean conjugados de inolato-glucosa para la defensa de patógenos (Gomez-Anduro *et al.*, 2011).

En el maíz, la función principal de la ZmBGlu es la defensa contra el barrenador europeo del maíz y otras plagas, siendo específica para el corte del metabolito secundario 4-hidroxi-7-methoxi-3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina-2- beta-D-glucopiranosido también llamado DIMBOA-Glucosa. Hay dos isoenzimas conocidas de la enzima, Glu1 y Glu2, los cDNA correspondientes a ambas isoenzimas han sido clonados y secuenciados, y se descubrió que los productos de proteína deducidos compartían una identidad de secuencia del 90 %. La forma catalíticamente activa de las BGlus de maíz y sorgo es un homodímero de 120 kDa o sus multímeros. Las estructuras primarias de ambas enzimas contienen los motivos peptídicos TFNEP e ITENG, que se muestran altamente conservados y constituyen el sitio catalítico en todas las β -glucosidasas de la familia 1 (Cicek *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se conoce que algunas BGlu tienen el motivo YHMYKTDV, el cual permite la unión de la enzima con ZmBGAF1 (Yu *et al.*, 2009). Los aminoácidos lisina y treonina son clave dentro de esta secuencia para la unión a ZmBGAF1. En maíz, solo se conservan en BGlu1 (β -glucosidasa isoforma 1) y BGlu2, las otras BGlu, aunque presentan a la lisina, el motivo es distinto, YHRYKEDV. Por lo tanto, se sugiere que BGlu1 y BGlu2 pueden tener la capacidad de unirse a ZmBGAF1 (Gomez-Anduro *et al.*, 2011). El complejo BGlu y ZmBGAF1 como se mencionó anteriormente parece ser importante para la respuesta ante el estrés por patógenos (Nagano *et al.*, 2005).

En el retículo endoplásmico hay una red de estructuras complejas dispuestas en forma de surcos aplanados y túbulos interconectados entre sí, además compartimentos únicos que se desprenden del organelo, como vesículas de almacenamiento de proteínas específicas, uno de estos compartimentos son los llamados cuerpos de retículo endoplásmico o ERBs, por sus siglas en inglés (Kurokawa *et al.*, 2014; Hayashi *et al.*, 2001). Los ERBs presentan un alto contenido de BGlus, en *Arabidopsis* PYK10/BGLU23 es la más abundante. Estas proteínas, como ya se ha mencionado anteriormente, participan en la hidrólisis de glucósidos

para dar lugar a agliconas, compuestos tóxicos para microorganismos e insectos. Por ejemplo, *in vitro*, uno de los sustratos de PYK10 es la escopolina, una cumarina ampliamente distribuida en plantas que al ser hidrolizada por PYK10 produce escopoletina, que ejerce toxicidad contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Kurokawa *et al.*, 2014).

Estudios en los que se ha inducido la lisis de células de hojas de *Arabidopsis*, se ha visto que PYK10 forma un complejo proteico que contiene proteínas de diferentes compartimentos subcelulares: las JRL (de citosol), proteínas tipo lipasas GDSL (GLL; de vacuola) y proteínas con dominio MATH (de membrana plasmática). Formando este complejo proteico, PYK10 aumenta su actividad β -glucosidasa, lo que sugiere que las proteínas JAL y GLL funcionan como activadores. (Nagano *et al.*, 2008).

La expresión tejido-específica de los ERBs, aunada al tipo de proteínas que almacenan, ha ayudado a establecer que la funcionalidad de los ERBs tiene que ver con la respuesta inmune de la planta. Dado su enriquecimiento en la interfaz entre ésta y los patógenos se piensa que su función en esas regiones es protegerla de los patógenos y herbívoros que pudieran introducirse o alimentarse de ella. Esto se ha sugerido debido a que el daño por heridas en las hojas desencadena la formación local y sistémica de ERBs de forma dependiente de JA, una hormona que se induce durante la interacción de la planta con patógenos y herbívoros. Lo anterior, en conjunto con la evidencia de que la actividad de las BGlu almacenadas en los ERBs se activan con JALs y GLLs, sugiere que la función y sobreproducción de estos compartimentos derivados de RE se da cuando las células sufren daño por insectos herbívoros o por infección de patógenos, produciendo sustancias que tienen como blanco a dichos invasores (Matsushima *et al.*, 2002; Kurokawa *et al.*, 2014).

Infección de maíz por hongos del género *Fusarium*.

Fusarium verticillioides es un hongo hemibiótrofo que causa la pudrición de tallos, mazorcas y raíces. Durante sus dos fases de crecimiento, biotrófo y necrotrófo, produce micotoxinas que contribuyen a su virulencia y si estas se acumulan en el tejido vegetal, pueden resultar dañinas para diferentes animales cuando las consumen. Es el principal patógeno del maíz y limitante de la productividad y ocasiona pérdidas económicas cuantiosas (Rutherford *et al.*, 2002; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Fusarium verticillioides produce abundantes macronidios y micronidios. Los micronidios, pueden introducirse a la planta por heridas o aberturas naturales (estomas, tricomas) y moverse libremente dentro de la planta. La fuente de conidios aéreos se debe a los residuos que se encuentran de los cultivos contaminados, aunque la esporulación de los hongos en los estilos o pistilos también puede contribuir a la infección de los estigmas del maíz, las cuales igualmente logran infectarse por el aire o agua contaminada con conidios. El hongo puede ocasionar enfermedad en todos los estados del desarrollo del maíz, infectando principalmente las raíces, los tallos y los granos (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

La presencia de hongos del género *Fusarium* en los granos puede ser favorecida durante la época de sequía durante el período del llenado del grano. Dependiendo del grado de infección podrían o no ser visibles a simple vista, por lo que, al germinar estas semillas aparentemente sanas, llevan el crecimiento de una plántula o planta asintomática, pero que podría presentar signos de enfermedad o continuar con el ciclo de propagación del hongo en los siguientes cultivos (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

Los hongos del género *Fusarium* producen una variedad amplia de micotoxinas, una de las más abundantes es la Fumonisina B1 (FB1). La contaminación de granos con FB1 es usual y se ha relacionado con enfermedades en animales y humanos (Wan Norhasima *et al.*, 2009).

Son varios los blancos moleculares de la FB1 en plantas y ocasiona cambios fisiológicos distintos, a continuación, se describen brevemente estos blancos y/o efectos:

- a) **Inhibe a la ceramida sintasa.** La biosíntesis de los esfingolípidos complejos comienza con la formación de la base de cadena larga (BCL) en el RE a partir de la condensación de la serina con palmitoil-CoA, para formar la 3-cetoesfinganina. Esta molécula sufre una reducción y la esfinganina generada se acila con un ácido graso activado por CoA para producir ceramida. La esfinganina N-aciltransferasa, enzima blanco de la toxina FB1, cataliza la reacción. La inhibición causa la acumulación de BCL, principalmente esfinganina y fitoesfingosina, alterando las propiedades de la membrana (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).
- b) **Cambia la composición de esfingolípidos de la membrana.** Gutiérrez-Nájera y colaboradores (2020) demostraron que la adición de FB1 a los embriones de maíz causó un aumento de 7 veces de la esfinganina y una pequeña disminución de la glucosilceramida en la membrana plasmática, sin afectar los niveles de fitosfingosina o la composición de ácidos grasos. Lo anterior podría explicar la disminución en la fluidez de la membrana plasmática y el aumento la fuga de electrolitos de las células del embrión.
- c) **Inhibe a la ATPasa de protones de la membrana plasmática.** La FB1 inhibe *in vitro* alrededor de un 30 % la actividad de la ATPasa de H⁺, aislada de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz con 24 h de germinación (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005). La inhibición de esta enzima podría contribuir a acortar la elongación de la raíz y el tallo, observada en plantas infectadas con *F. verticillioides* o tratadas con FB1.
- d) **Inhibe la actividad de dos β -1,3-glucanasas básicas y aumenta la actividad de β -1,3-glucanasa ácida.** Las β -1,3-glucanasas son enzimas involucradas en la degradación de glucanos, polisacáridos que se encuentran en la pared celular fúngica (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012). La modulación de las β -1,3-glucanasas son un objetivo fisiológico relevante ya que FB1 podría contribuir a la colonización de *F. verticillioides*.

Las fumonisinas son consideradas factores de virulencia, ya que su producción se asocia con una mayor capacidad de infección de *F. verticillioides* en plántulas de maíz. Sin embargo, los niveles de producción de FB1 son muy variables entre las diferentes cepas de *F. verticillioides*. Por ejemplo, la cepa MY3 produce 1,699 µg/g mientras que la cepa MY5 genera 1.5 µg/g (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014; Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

Por su parte, la planta implementa diferentes estrategias para combatir la infección (Figura 6). Se ha observado la inducción de la expresión de genes implicados en la síntesis del JA en maíz infectado con *F. verticillioides*, como Aleno Óxido Sintetasa (AOS), Aleno Óxido Ciclasa (AOC) y ácido 12-oxofitodiénico reductasa (OPR) (Guzmán-Chávez, 2013). El JA y su éster metílico (metil jasmonato, MeJA) son compuestos a base de ciclopentanona derivados del ácido linolénico (LA) de amplia distribución en el reino vegetal. Su estructura molecular es similar a la de las prostaglandinas en animales (Creelman y Mullet 1997).

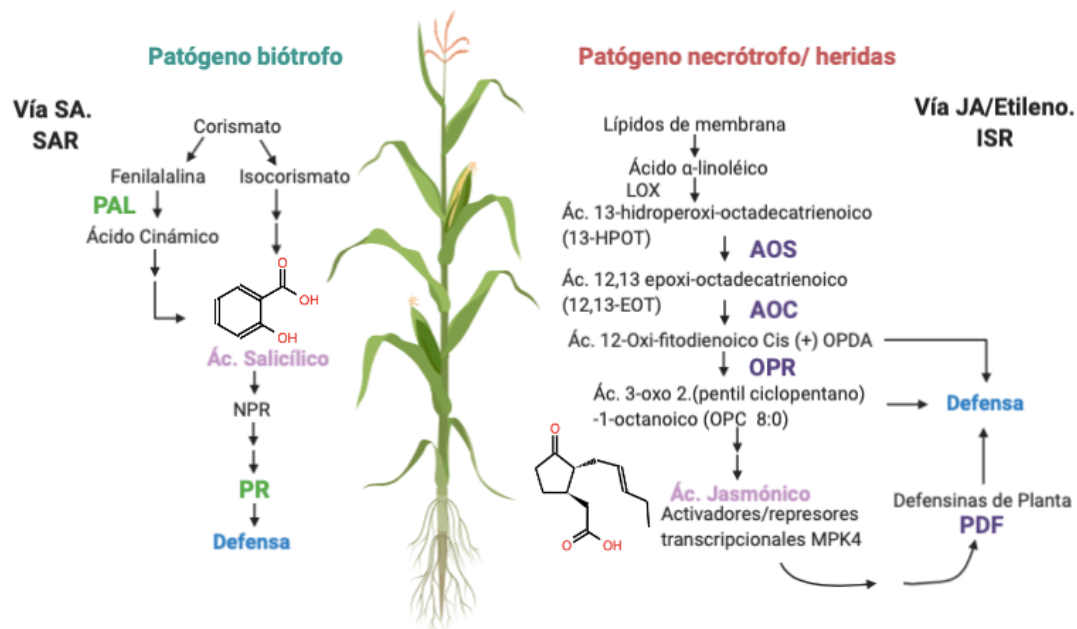


Figura 6. Vías de síntesis de Ácido salicílico y Ácido Jasmónico.

Los patógenos con estilo de vida biótrofo inducen la síntesis del ácido salicílico, fitohormona que induce entre otras respuestas la síntesis de proteínas de defensa o PR. Mientras que los patógenos necrótrofos inducen la síntesis de jasmónico, que a su vez induce la defensa de la planta con proteínas como las defensinas o PDF.

Entre los procesos de desarrollo en los que participan los jasmonatos están el crecimiento de la raíz, la tuberización, la maduración de frutos, senescencia, desarrollo del polen y enrollamiento de los tallos. En cereales, por ejemplo, el JA inhibe el crecimiento tanto de raíces como coleoptilos, su síntesis se induce ante las heridas (mecánicas o producidas por microorganismos biotrófos o insectos) y la exposición a ozono y sequía (Creelman y Mullet 1997; Lorenzo y Solano 2005).

Por su parte, el SA y sus derivados, son hormonas vegetales que pertenecen al grupo de los ácidos fenólicos, consisten en un anillo unido al grupo hidroxilo y carboxilo. En *Arabidopsis*, el SA es sintetizado probablemente en los cloroplastos, una vez sintetizado es glucosilado, metilado o conjugado con diferentes aminoácidos, para que pueda ser transportado, metabolizado o compartimentalizado (Dean *et al.*, 2005; Raskin *et al.*, 1990) Se les ha relacionado a distintos procesos, como la modulación de la respuesta de la planta a las condiciones de estrés biótico y abiótico, dentro de este último está la sequía, frío, calor, a los elementos pesados y sales, al aumentar la respuesta del sistema de resistencia adquirida o SAR (por sus siglas en inglés; Saleh y Abdulsattar 2019).

Uno de los efectos del ácido salicílico es estimular la floración, la producción de antioxidantes, la absorción de iones, la transferencia de nutrientes, controla el movimiento de apertura y cierre de estomas lo que lleva a aumentar la concentración del CO₂ y además incrementa la síntesis de proteínas (Saleh y Abdulsattar 2019).

Siendo *Fusarium* un hongo hemibiotrófo dependiendo del estado en el que se encuentre en la planta, podría encender la vía de defensa dependiente de JA, y también la síntesis del ácido 2,6-dicloroisonicotínico, análogo del SA, lo cual produce interferencia entre las vías hormonales de las plantas, la activación de la respuesta a SA podría suprimir la vía de señalización del JA que comúnmente se activa contra hongos necrotrofos (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012).

JUSTIFICACIÓN

Se conoce, ZmBGAF1 tiene el dominio dirigente, el cual pertenece a la familia de proteínas inducidas por JA, hormona relacionada con la respuesta a estrés por patógenos (Blanchard *et al.*, 2000; McConn *et al.*,1997). Mientras que la sobreexpresión de HXK en plantas contribuye a la resistencia a patógenos (Sarowar *et al.*, 2008). Por lo que la interacción de ZmBGAF1 y ZmHXK4, podría ser un mecanismo de regulación de la respuesta de la planta al estrés por patógenos.

Para confirmar lo anterior se pretende determinar si plantas de maíz que fueron expuestas al hongo *Fusarium verticillioides* encienden la vía de síntesis de JA y aumentan la expresión de ZmBGAF1 y ZmHXK4. Además, confirmar mediante estudios *in vivo*, la interacción entre ZmBGAF1 y ZmHXK4.

HIPÓTESIS

En respuesta a señales de Jasmonato o por infección por *Fusarium*, se induce la expresión de la ZmHXK4 y ZmBGAF1. La interacción de ambas proteínas entre sí, está relacionada con señales de respuesta a estrés biótico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la interacción *in vivo* de ZmHXK4 con ZmBGAF1 y su expresión en las respuestas de estrés biótico.

Objetivos particulares

1. Analizar los niveles de expresión de *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* en coleoptilos de plantas de maíz infectadas con *F. verticilloides* cepas MY3 y MY5.
2. Determinar la interacción de ZmHXK4 y ZmBGAF1 *in vivo* mediante el ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

- Semillas de *Z. mays* Variedad Sintética 535 (VS535).
- Cepas de *F. verticilloides* (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005):
 - a) MY3 la cual produce una alta concentración de fumonisina (1,699 $\mu\text{g/g}$)
 - b) MY5 con baja producción de fumonisina (1.3 $\mu\text{g/g}$).
- Plantas de 2 meses de crecimiento de *Nicotiana benthamiana*.

Estrategia experimental.

Para cumplir con los objetivos del trabajo se siguió la estrategia experimental planteada en la Figura 7 y que se dividió en dos partes. La primera fue para determinar la expresión relativa de la *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* en respuesta a estrés, por la infección con *Fusarium verticilloides* (cepas MY3 y MY5) y con tratamiento con metil jasmonato (MeJA), para lo cual se obtuvo el cDNA de coleoptilos de 72 h de germinación, se realizó el análisis por PCR tiempo real, usando como control de expresión el gen *18s* y como controles de respuesta a estrés biótico, a los genes *AOS* y *AOC* involucrados en la síntesis de JA y el gen *PAL* involucrado en la síntesis de SA.

Para corroborar la interacción *in vivo* de *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* se realizó el ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia o BiFC, para lo cual primero se obtuvieron los vectores pUBC-*ZmHXK4* Δ 30-nYFP y pUBN-*ZmBGAF1*-cYFP, después se transformaron las bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* con estos vectores y se observó la expresión transitoria de cada una de las proteínas fluorescentes en hojas de *Nicotiana benthamiana* y *Zea mays*.

Adicionalmente, como control de expresión y para determinar la co-localización de ambas proteínas se obtuvieron las clonas de *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* unidas a GFP

en vectores de expresión para plantas. Ambas clonas se expresarían en hojas de *Nicotiana benthamiana* y *Zea mays*. Se utilizaron los vectores pEarlyGarte103-BGAF1 o pEarlyGarte103-HXK4, debido a que las proteínas quedan unidas a una proteína fluorescente.

En el anexo 1 se encuentran el contenido de las soluciones que se usaron en este trabajo.

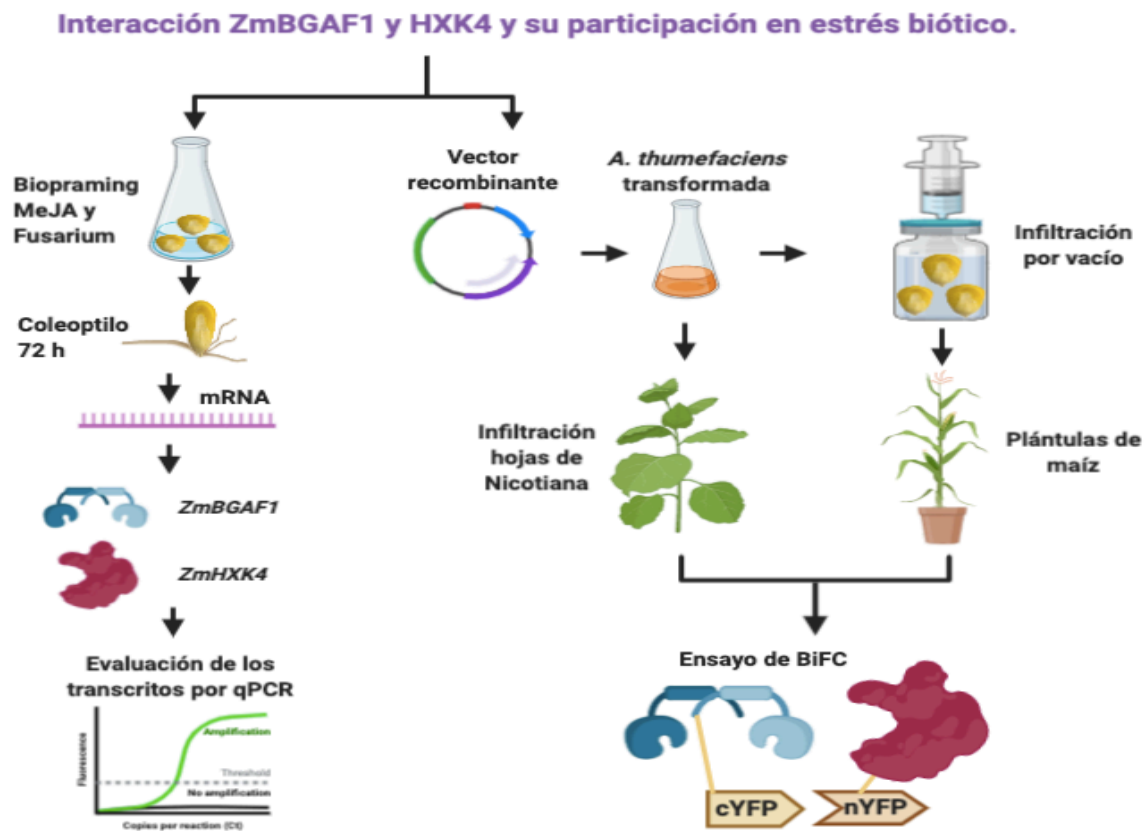


Figura 7. Esquema general del desarrollo experimental propuesto para lograr los objetivos del trabajo.

Obtención de una solución concentrada de *Fusarium verticillioides* (Tomado y adaptado de Guzmán-Chávez, 2010)

Crecimiento de las cepas de *Fusarium verticillioides*. Las cepas de *F. verticillioides* MY3 o MY5 fueron donadas amablemente por el Dr. Javier Plasencia, Facultad de Química, UNAM (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005). Los conidios de cada cepa se encontraban almacenadas en frascos viales con una mezcla 1:1 de Peat moss con arena más agua a -80 °C. Para propagar los hongos se tomó la punta de la espátula de cada vial y se inocularon en cajas de Papa-Dextrosa-Agar (PDA 1X; Anexo 1; Bioxon). Se crecieron a 29°C en ausencia de luz durante 2 semanas. Se cortaron cuadros de Agar con hongo de 0.5 cm X 0.5 cm y se sembraron en otras cajas con PDA 1X para continuar su propagación, durante 10 días.

Preparación del inóculo. En condiciones de esterilidad, se agregaron 5.0 mL de agua estéril desionizada a un cultivo de *F. verticillioides* (cepa MY3 o MY5) de 10 días de crecimiento a 29 °C, que se encontraba en una caja Petri con PDA al 1X. Se colocó en agitación menor a 50 rpm durante 15 min a 29 °C. Se recolectó el líquido resultante en tubos de microfuga estériles de 2.0 mL. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C.

Se desecharon las tres cuartas partes del sobrenadante y se resuspendieron los botones y se colocaron en un solo tubo de microfuga. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y, en condiciones de esterilidad, el botón se resuspendió en 1.0 mL de agua estéril desionizada, obteniendo así una suspensión concentrada de conidios.

Calibración del inóculo. En un tubo de microfuga no estéril de 1.5 mL se agregaron 990.0 µL de agua estéril desionizada y 10.0 µL de la suspensión concentrada de conidios de *F. verticillioides* (MY3 o MY5) se tomaron 100.0 µL para cargar la Cámara Neubauer y se realizó el conteo de conidios en cada uno de los cuadrantes con el microscopio óptico Olympus CH30. Con los datos obtenidos del conteo, se

calculó el volumen final necesario para obtener una solución concentrada de 20,000 conidios/ μ L.

Infección de las semillas de maíz VS535 por parte de *Fusarium verticilloides* y metil-jasmonato (tomado y adaptado de Guzmán-Chávez, 2013).

Desinfección de semillas de maíz. Lotes de 10 semillas (sin el pedicelo) se lavaron con una solución de NaClO al 0.12 % (Cloralex 2 %) por 2 min, y se enjuagaron al menos 3 veces con 50 mL de agua estéril desionizada, hasta que el olor del hipoclorito de sodio desapareció.

Biopriming de semillas de maíz. Las semillas desinfectadas, se inocularon con 20,000 conidios/ semilla (cepa MY3 o MY5) y 50 μ M de MeJA (392707 Sigma-Chemistry; Norastehnia *et al.*, 2007) en un volumen de 1 mL de agua destilada por semilla, esto se realizó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL para agitarse a 150 rpm a 28 °C durante 1.5 h. Las semillas con y sin el tratamiento de *Biopriming* se germinaron en cajas Petri de vidrio, en las cuales se colocaron dos círculos de papel filtro previamente esterilizado. Se agregaron aproximadamente 15 mL agua, lo suficiente para humedecer el papel, se colocaron y acomodaron las semillas y se cubrió con dos capas de papel filtro estéril, y se agregaron otros 15 mL de agua estéril, se cubrió la caja con papel aluminio y se incubó a 29 °C. Se obtuvieron los coleoptilos con 72 h de crecimiento.

Determinación de niveles de expresión de ZmBGAF1 y ZmHK4.

Extracción de RNA de coleoptilos. Se realizó la extracción del RNA total mediante el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, utilizando TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El reactivo de TRIzol está constituido por una disolución de isotiocianato de guanidina, en el cual los tejidos se lisan debido a la homogeneización, liberando el RNA e inactivando a las ribonucleasas. El RNA total es purificado selectivamente, se eliminan las proteínas, mientras que el DNA y otros

contaminantes son extraídos por ácidos orgánicos. El DNA y una porción de las proteínas quedan en la fase orgánica, mientras que el RNA permanece en la fase acuosa y es concentrado por precipitación con isopropanol, para posteriormente lavar con etanol (Barrón, 1997). En breve, los coleoptilos se molieron con nitrógeno líquido en un mortero estéril previamente congelado. Se tomaron aproximadamente 50-100 mg del polvo de tejido y se resuspendió en 1 mL de TRIzol (Ambion) en un tubo de microfuga estéril. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y después se agregaron 200 μ L de cloroformo y se agitó manualmente durante 15 s. La muestra se incubó 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugó por 15 min a 12,000 xg a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microfuga estéril, y se añadieron 0.4 mL de isopropanol para precipitar el RNA. La muestra se mezcló por inversión 5 veces y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Después se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se agregó 1 mL de etanol al 70 %, se mezcló en vórtex por 15 s y se centrifugó a 12,000 xg por 5 min a 4 °C. El lavado se repitió 2 veces. El botón se dejó secar al aire durante 5 min, después se disolvió en 40 μ L de agua estéril desionizada. El RNA se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Inc.).

Purificación del RNA, degradación del gDNA. Se realizó la reacción de la digestión del DNA genómico a las muestras de RNA extraídas en el punto anterior. Se siguió el protocolo establecido para la enzima RQ1 Rnase-Free DNase (Promega), que consiste en añadir en un tubo de microfuga, 1 μ g de RNA, 1 μ L de RQ1 Rnase-Free DNase 10X Buffer (Promega), 1 μ L de RQ1 Rnase-Free DNase (Promega) y c.b.p. 10 μ L de agua libre de nucleasas. Se incubó durante 10 min a 37 °C y posteriormente se agregó 1 μ L de RQ1 DNase stop solution y se incubó a 65 °C durante 10 min para inactivar a la DNasa. Se determinó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 7 % (Anexo 2).

Obtención del cDNA. La transcriptasa reversa es una enzima que tiene como función sintetizar una molécula de doble cadena (DNA) a partir de una molécula de cadena sencilla (RNA). El cDNA obtenido se utilizó en la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR). La reacción de PCR es un método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es amplificado, está delimitado por un par de cebadores que lo flanquean lo que lo hace específico para dicho segmento. Las copias del segmento se amplifican de forma exponencial a través de ciclos repetidos en presencia de una DNA polimerasa termoestable (Rodríguez y Barrera, 2004). Se realizó la reacción con 1 μ L de oligo DT 20 μ M, 1 μ g de RNA, H₂O libre de nucleasas c.b.p. 10 μ L. La mezcla se incubó a 70 °C por 5 min y posteriormente en hielo durante 5 min. Después se le añadieron 4 μ L de amortiguador ImProm 5x (Promega), 2.4 μ L de 25 mM MgCl₂, 1 μ L de 10 mM dNTPs (Promega), 1 μ L transcriptasa reversa (RT, Promega) y el agua libre de nucleasas c.b.p. 10 μ L. La reacción se realizó usando las siguientes condiciones: alineamiento a 25 °C durante 5 min, posteriormente extensión a 42 °C durante 1 h y por último desnaturalización a 70 °C durante 15 min. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Reacción de qPCR. Para obtener de manera cuantitativa el nivel de expresión de los genes que codifican para la ZmHXK4 y ZmBGAF1 bajo condiciones de infección por *F. verticilloides*, cepas MY3 y MY5 y 50 μ M de MeJA, se realizó la técnica de qPCR. También se utilizó como gen de referencia o endógeno el Zm18s. Se diseñaron los oligonucleótidos para la secuencia ZmBGAF1 mediante el programa Primer3PLUS, se buscó evitar la complementariedad entre ambos oligonucleótidos, además de evitar que formaran estructuras secundarias (Tabla 2). Los otros oligonucleótidos usados en este trabajo fueron reportados previamente (Tabla 2). En el anexo 4 se muestran las regiones de ZmBGAF1 y ZmHXK4 que fueron amplificadas por los oligonucleótidos. Adicionalmente se evaluó *in silico* en el programa SnapGene, la predicción de la longitud de los fragmentos amplificados, para el gDNA como para el cDNA (Anexo 4). Como genes control de que la infección estaba progresando se utilizaron ZmAOS y ZmAOC de la vía de síntesis de JA y ZmPAL de la biosíntesis del SA (Tabla 2). Para evaluar que los oligonucleótidos para ZmHXK4, ZmBGAF1 y Zm18s fueran específicos y que no forman dímeros a temperaturas de fusión menores a 80 °C, se realizó la reacción de amplificación y luego la curva de disociación del producto amplificado. En todos los casos se

observó un solo pico de amplificación (anexo 1). Las curvas de disociación para *ZmAOS*, *ZmAOC* y *ZmPAL* fueron obtenidas por (Guzmán Chávez, 2013).

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR punto final y tiempo real de *ZmBGAF1*, *ZmHXK4*, *Zm18s*, *ZmAOS*, *ZmAOC* y *ZmPAL*.

Transcrito amplificado (número acceso secuencia genómica y autor que diseño oligonucleótidos)	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del producto esperado (pb)
<i>ZmBGAF1</i> (ONM52669.1, Burgos-Palacios, este trabajo)	Sentido	5'-CTCGATTGCCTTCTCCTACG-3'	191
	Antisentido	5'-TGAGGCTTGTGACGAACTTG-3'	
<i>ZmHXK4</i> (Aguilera-Alvarado <i>et al.</i> , 2019)	Sentido	5'-GTGATCGAGGAGGTGAGAG-3'	173
	Antisentido	5'-AACAGCCCATGTTTCATCTCC-3'	
<i>Zm18s</i> (Sosso <i>et al.</i> , 2015)	Sentido	5'-CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT-3'	152
	Antisentido	5'-CCTGTGCGCCAAGGCTATATAC-3'	
<i>ZmAOS</i> (Guzman-Chávez 2013)	Sentido	5'-GTGGACGTGACAGAGTGTCC-3'	145
	Antisentido	5'-CAACATGCCATCCTGCATTA-3'	
<i>ZmAOC</i> (Guzman-Chávez 2013)	Sentido	5'-GCTACGAGGCCATCTACAGC-3'	160
	Antisentido	5'-GGGAAGACGATCTGGTTGAG-3'	
<i>ZmPAL</i> (Guzmán-Chávez 2013)	Sentido	5'-CATGTCGTCCACCTACATCG-3'	171
	Antisentido	5'-ATCAGCTCCTTCTCGCTGAA-3'	

La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 20 µL con los componentes indicados en la Tabla 3. La técnica de qPCR se llevó a cabo en un termociclador Mic PCR (biomolecular systems) y el análisis de datos se efectuó con el programa MicPCR software (biomolecular systems). Posteriormente se empleó el Método Comparativo de Ct para realizar la cuantificación relativa (Pfaffl, 2001).

El método comparativo de Ct emplea la siguiente fórmula:

$$ratio = \frac{(E_{problema})^{\Delta CP_{problema} (control-muestra)}}{(E_{referencia})^{\Delta CP_{referencia} (control-muestra)}}$$

La Eficiencia (E) se calcula como: $E = 10^{-[1/m]}$ la pendiente se obtiene de la curva de Ct (número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido). El grupo control es el tratamiento con agua y la muestra es el tratamiento con los conidios de *Fusarium* o con MeJA.

Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción de qPCR.

Reactivo	Volumen (μL)
SYB Green PCR Master Mix	10.0
Oligonucleótido sentido 10 μM	0.15
Oligonucleótido antisentido 10 μM	0.15
cDNA	2.0
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. 20 μL)	7.7

Determinación de la interacción *in vivo* de ZmHXXK4 y ZmBGAF1

I. Protocolo con *Nicotiana benthamiana*.

Crecimiento de plantas de *N. benthamiana*. Las plantas utilizadas para los ensayos de localización sub-celular y el BiFC fueron obtenidas a partir de semillas de *Nicotiana benthamiana* proporcionadas amablemente por el Dr. Felipe Cruz. Las semillas fueron colocadas en un recipiente de plástico de 10 x 15 x 5 cm, con aproximadamente 3 cm de Sunshine como sustrato, se adicionó agua solo para humedecer el sustrato, se cubrió el recipiente con plástico auto-adherible ligeramente perforado para evitar la pérdida de humedad, la envoltura fue retirada a la semana. A los 20 días se trasplantaron las plantas, en macetas de 5 x 5 x 8 cm con sustrato inerte Sunshine Mix (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canada Ltd), y se colocaron en condiciones de invernadero, luz natural, para su crecimiento durante 1 mes, se regó cada tres días. Por último, se trasplantaron nuevamente las plantas, pero ahora en macetas de 15 cm de diámetro y 10 cm de fondo, las cuales contenían Sunshine Mix (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canada Ltd), se colocaron en condiciones de invernadero con fotoperiodo natural por aproximadamente un mes. A los dos meses después de la germinación las hojas más jóvenes fueron usadas para la agroinfiltración.

Producción de los vectores de expresión para realizar el ensayo de fluorescencia biomolecular. Para determinar que ZmHXK4 y ZmBGAF1 interaccionan *in vivo* se generaron los vectores pUBC-ZmHXK4 Δ 30-nYFP y PUBN-ZmBGAF1-cYFP utilizando las sondas para realizar el BiFC, pUBC-nYFP y pUBN-cYFP (Grefen *et al.*, 2010).

Corroboración de las construcciones pDONR221-HXK4 Δ 30 y pDONR22-BGAF1. Se realizaron ensayos de restricción y de PCR punto final para corroborar la presencia de los vectores en las cepas de *E. coli* DH5 α . El ensayo de restricción para cada uno de los vectores se realizó con la enzima Mlu1 FastDigest (Thermo scientific) en un medio de reacción que contuvo 2 μ L de amortiguador Mlu1, 200 μ g del plásmido purificado, 1 μ L de la enzima Mlu1 y H₂O c.b.p. 20 μ L. Se incubó 10 min a 37 °C. Se llevó a cabo la separación electroforética de los fragmentos en un gel de agarosa 0.7 % con bromuro de etidio.

Una vez corroborada la presencia de cada gen en el sitio de recombinación, se evaluó mediante PCR punto final la presencia de ZmHXK4 y ZmBGAF1, usando los oligonucleótidos de la Tabla 2. Las condiciones de las tres etapas de la reacción de PCR fueron las siguientes: Etapa 1 o de Pre-desnaturalización 94 °C por 5 min. Etapa 2 o de alineamiento, desnaturalización a 94 °C por 40 s, templado a 53 °C por 40 s y extensión 72 °C por 1 min. Etapa 3 o de Extensión 72 °C por 7 min. Dichas condiciones fueron las mismas para todos los oligonucleótidos utilizados. Posteriormente, las muestras se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2 % y con bromuro de etidio (Anexo 1) utilizando como amortiguador de corrida TAE (Anexo 1).

Construcción de los vectores pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP y pUBC-BGAF1-cYFP. Al vector pDONR221-HXK4 Δ 30 se le realizó la recombinación con la enzima LR clonasa en el vector pUBC-nYFP, para lo cual en un tubo de reacción se agregaron 300 ng del vector pDONR221-HXK4 Δ 30 (vector de entrada), 300 ng del vector pUBC-nYFP (vector destino), 4 μ L de amortiguador 5X LR Clonasa (Invitrogen) y

amortiguador TE c.b.p. 16 μL , se mezcló con vortex por 5 s, después se agregaron 4 μL de la Enzima LR Clonasa (Invitrogen) y se incubó a 25 °C durante 60 min. Para detener la reacción se añadieron 2 μL de Proteinasa K (Invitrogen) y se incubó a 37 °C durante 10 min. Se realizó el mismo procedimiento para recombinar pDONR221-BGAF1 en pUBN-cYFP.

Células competentes de *Escherichia coli*. Se tomó una asada de la cepa *E. coli* DH5 α , se inoculó en 5 mL de medio LB, incubando toda la noche a 37 °C a 250 rpm. Se tomaron 2 mL de medio saturado y se inocularon 200 mL de LB, se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta que la densidad óptica fuera de 0.36 a 590 nm. Después se centrifugó el medio a 300 rpm por 7 min a 4 °C y se resuspendió en 2.5 mL de una solución de CaCl₂ 20 mM, glicerol 10 %. Al final se guardaron alícuotas de 100 μL cada una a -80 °C.

Transformación en *E. coli*. Los vectores pUBC-ZmHXK4 Δ 30 -nYFP y PUBN-ZmBGAF1-cYFP se utilizaron para transformar *E. coli* competentes. Para la transformación se tomó 1 tubo con 100 μL de células competentes y se mezcló con 1 μg de plásmido, se incubó 30 min en hielo, después por 2 min a 42 °C y luego se dejó otros 2 min en hielo. Después, se agregaron 900 μL de medio SOC (anexo 1) y se permitió la recuperación de las células a 37 °C durante 2 h y agitación constante. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se removió el sobrenadante para dejar 80-100 μL de medio. Se resuspendió el botón y se plaqueó en medio Luria-Bertani (LB; Anexo 1) suplementado con espectinomicina 100 μg / μL (1:1000). Se incubó a 37 °C durante toda la noche y se eligieron las colonias aisladas para llevar a cabo los experimentos posteriores. Se corroboró mediante PCR la presencia del vector en las colonias aisladas que crecieron en las cajas con medio selectivo. Las cepas se crecieron en 5 mL de medio LB adicionado con los antibióticos de selección, tras 14 h de crecimiento a 37 °C y 200 rpm, se obtuvieron alícuotas de 660 μL a las que se les adicionó 340 μL glicerol al 50 %, se guardaron en tubos de 1.5 mL a -70 °C hasta su uso.

Obtención del vector pUBC-HXK4Δ30-nYFP y pUBN-BGAF1-cYFP. Las bacterias *E. coli* con los vectores pUBC-HXK4Δ30-nYFP y pUBN-BGAF1-cYFP fueron crecidas de forma independiente en medio LB con espectinomicina 100 μg / μL (1:1000) a 37 °C, 150 rpm durante toda la noche, la posterior extracción del vector se realizó con el sistema de aislamiento Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para corroborar la presencia del inserto en el vector de interés, a ambos vectores se les realizaron ensayos de restricción con la enzima Xba1 FastDigest (Thermo scientific) en un medio de reacción que contuvo 2 μL de amortiguador Xba1, 200 μg del plásmido purificado, 1 μL de la enzima Xba1 y H₂O c.b.p. 20 μL. Se incubó 10 min a 37 °C. Adicionalmente, se realizaron ensayos de PCR a los vectores utilizando los oligonucleótidos previamente mencionados (Tabla 2). Los productos génicos provenientes tanto de la restricción como del PCR se observaron mediante separación electroforética en gel de agarosa con 0.5 μg / mL de bromuro de etidio. Para el ensayo de restricción la concentración de agarosa usada fue de 0.7 % y para el PCR fue de 1.5 %.

Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*. Se tomó una asada de la cepa, se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con rifampicina 100 μg/mL y espectinomicina 100 μg/mL incubando toda la noche a 28 °C a 250 rpm. Se tomaron 2 mL de medio saturado y se inocularon 250 mL de LB con los antibióticos de selección, se incubó por 18 h a 30 °C y 250 rpm. Finalmente se centrifugó el medio a 6000 x g por 15 min a 4 °C y se resuspende en una solución de CaCl₂ 20 mM, glicerol 10 %. Se guardaron alícuotas de 100 μL a -80 °C.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*. Los vectores pUBC-HXK4Δ30-nYFP y pUBN-BGAF1-cYFP se utilizaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. Para la transformación de células competentes de *A. tumefaciens* se tomó 1 tubo con 100 μL de células competentes y se mezcló con 1 μg de plásmido,

después se incubó por 5 min en nitrógeno líquido, posteriormente se incubó a 37 °C durante 25 min. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó por 28 °C en agitación a 225 rpm por 2 h. Se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 25 µL de medio LB, mismos que fueron plaqueados en los medios selectivos con rifampicina 100 µg/mL y espectinomicina 100 µg/mL. Las cajas se incubaron a 28 °C por 48 h y se eligieron a las colonias aisladas para llevar a cabo los experimentos posteriores. Se corroboró mediante PCR la presencia del vector en las colonias aisladas que crecieron en las cajas con medio selectivo. Las cepas se crecieron en 5 mL de medio LB adicionado con los antibióticos de selección, tras 2 días de crecimiento a 28 °C y 250 rpm, se obtuvieron alícuotas de 660 µL a las que se les adicionó 340 µL glicerol al 50 %, se guardaron en tubos de 1.5 mL a -70 °C hasta su uso, no se recomienda tener guardadas las cepas más de un mes.

Preparación de *A. tumefaciens* para agroinfiltración. Se inoculó una asada de *A. tumefaciens* transformada con el vector de interés, en 5.0 mL de medio LB suplementado con los antibióticos de selección y se dejó crecer a 28°C durante 48 h (agitación a 300 rpm). Se transfirió 1 mL del cultivo a 50 mL de LB suplementado con antibióticos de selección. Las bacterias se mantuvieron a 28 °C hasta alcanzar una DO a 600 nm de 1.0, aproximadamente 18 h, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min y el botón se resuspendió en 50 mL de MES 10 mM y MgCl₂ 10 mM. Las bacterias se mantuvieron a temperatura ambiente por al menos 3 h con agitación suave, al botón resuspendido después del proceso de agitación se le denominó solución de infiltración.

Agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana*. Para obtener mejores resultados y facilitar la infiltración, las plántulas deben mantenerse bajo luz débil al menos un día. En la mañana del día de la infiltración se regaron las plantas y se mantuvieron en la oscuridad, en la tarde las plántulas fueron infiltradas. En hojas grandes se realizaron varias infiltraciones en la misma hoja, de tal manera que las áreas de infiltración cubrieran la mayor parte de la hoja. La infiltración se llevó a cabo con una

jeringa de 1.0 mL sin aguja por el envés de la hoja. Se infiltraron varias hojas de la planta y varias plantas, se usó la solución infiltradora para cada uno de los vectores. Para la realización del BiFC, se mezclaron en una proporción de 1 a 1 cada una de las cepas en solución de infiltración. Las plantas se mantuvieron en el invernadero y las hojas infiltradas se colectaron a las 72 h después de la infiltración. Se congelaron a -70 °C. Se mantuvieron de esta manera hasta su procesamiento para obtener RNA total (Chen *et al.*, 2013).

Observación de la fluorescencia.

Las hojas de *N. benthamiana* que fueron infiltradas, se cortaron desde la base, con ayuda de pinzas metálicas de punta fina, se realizó la separación de la epidermis abaxial del resto de la hoja. Se colocó la fina capa de células sobre un portaobjetos de vidrio con 3 gotas de agua, se cubrió con un cubreobjetos y se analizó en el microscopio de epifluorescencia (Infinity EFT, Numak).

Determinación de la interacción *in vivo* de ZmHXK4 y ZmBGAF1

II. Protocolo en maíz.

Transformación de semillas por infiltración por vacío. Se cultivó 5 mL de cada cepa (con el vector de interés o control) de *Agrobacterium tumefaciens* (P6V2260/C58) durante la noche a 28 °C en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 100 mg/mL de rifampicina y el antibiótico de selección dependiendo el vector. Posteriormente, se inocularon 500 µL de cada cultivo nocturno en porciones de 20 mL de medio LB con antibióticos como anteriormente, y se cultivaron a 28°C hasta que alcanzaron una DO de 0.3 a 600 nm (*Agrobacterium* listas para infiltración al vacío). Las semillas de Maíz VS-535 se desinfectaron superficialmente sumergiéndose en una disolución de hipoclorito de sodio 2.5 % y Tween-20 0.1 % y se dejó en la solución durante 2 min, luego se enjuagaron cinco veces con agua desionizada estéril (Zhang *et al.*, 2017).

A las semillas de maíz desinfectadas se les hizo un ligero corte en la superficie, por el lado donde está el eje embrionario y se sumergieron en 5 mL de *Agrobacterium*

sin transformar o transformantes, en botellas de vidrio médico de 10 mL con tapones de goma, se agitaron y se sometieron a aproximadamente a una presión de vacío de 35 kPa generada al aspirar el aire usando una jeringa de 20 mL durante 30 s. Adicional a lo anterior, las semillas se añadieron a 10 mL de los cultivos y se incubaron a 150 rpm y 28 °C durante 16 h. Después las semillas se lavaron con agua estéril para eliminar las bacterias adsorbidas en la superficie.

Crecimiento de las plantas de maíz transformadas. La semillas de maíz infiltradas por vacío obtenidas previamente, se cultivaron en medio Sunshine Mix, se colocaron 5 semillas en una maceta de 20 cm de diámetro y 20 cm de profundidad. Se regaron constantemente manteniendo el sustrato húmedo, se dejaron crecer bajo condiciones de invernadero a 29 °C durante 2 a 6 semanas.

Extracción del RNA de hojas de maíz transformadas. Se realizó la extracción del RNA total, mediante el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, a las hojas de maíz transformadas previamente con agrobacterium mediante infiltración, las hojas se molieron con nitrógeno líquido en un mortero estéril previamente congelado. Se tomaron aproximadamente 50-100 mg del polvo de tejido y se resuspendió en 1 mL de TRIzol (Ambion) en un tubo de microfuga estéril. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y después se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó manualmente durante 15 s. La muestra se incubó 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugó por 15 min a 12,000 xg a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microfuga estéril, y se añadieron 0.4 mL de isopropanol para precipitar el RNA. La muestra se mezcló por inversión 5 veces y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Después se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min a 4 °C. El botón se resuspendió en 0.4 mL de H₂O estéril, libre de nucleasas. Con el objetivo de eliminar los carbohidratos y disminuir la interferencia de los mismos, se agregaron 0.4 mL de PPC (Fenol saturado de amortiguador de citratos) y cloroformo (1:1; Sigma). Se mezcló el contenido en vórtex y se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, al cuál se le añadió 0.4 mL de cloroformo, se mezcló en vortex y se centrifugó a 12,000 g durante 10

min, posteriormente el sobrenadante (aproximadamente 0.35 mL) se transfirió a otro tubo de microfuga. Se le añadieron 0.5 mL de acetato de sodio 3 M y 0.1 mL de etanol absoluto. Se mezcló por inversión de 5 a 8 veces y se incubó a -80 °C por 30 min, se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se agregó 1 mL de etanol al 70 %, se mezcló en vórtex por 15 s y se centrifugó a 12,000 xg por 5 min a 4 °C. El lavado se repitió 2 veces. El botón se dejó secar al aire durante 5 min, después se disolvió en 40 µL de agua estéril desionizada. El RNA se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Inc.).

Obtención de protoplastos de hojas de maíz transformadas. Se preparó la solución de enzimas 1 (Anexo 1) y se calentó de 50-55 °C durante 10 min en baño María. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se preparó la solución de enzimas 2 (Anexo 1). Se tomaron las hojas de maíz que presentaban mejor coloración y sin daños aparentes, se cortó la parte media de las hojas con navajas nuevas, las tiras eran pequeñas, aproximadamente 5 mm de largo y 0.5 mm de ancho. Se colocaron en una caja Petri de 10 cm de diámetro, con aproximadamente 15 mL de solución de enzimas 2. Se cortaron suficientes tiras como para cubrir la caja Petri.

Se colocó la caja Petri sin tapa y dentro de un desecador, se cubrió con aluminio y se aplicó vacío durante 30 min. Después la caja Petri con las hojas y la solución de enzimas se colocó en agitación constante y orbital durante 2 h a 40 rpm. Transcurrido dicho tiempo, se aumentó la agitación a 80 rpm durante 5 min. Se filtró la solución de enzimas con las hojas en malla de Nylon (Nylon mesh) 35 µm, se usan cuatro capas de filtro.

Se centrifugó a 150 x g en tubos de fondo redondo por 2 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en un volumen de aproximadamente 1 mL de solución W5 (Anexo 1).

Observación de la fluorescencia. Se colocó 1 mL de los protoplastos obtenidos en el punto anterior, en un portaobjetos con excavaciones, posteriormente se colocó

un cubreobjetos. Los protoplastos se analizaron en microscopio de epifluorescencia (Infinity EFT, Numak).

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ZmHXK4 Y ZmBGAF1

Para evaluar la localización subcelular de la ZmHXK4 y ZmBGAF1 en hojas de *Nicotiana benthamiana* y de maíz, se utilizaron los vectores pEarlyGate103-BGAF1 y pEarlyGate103-HXK4. El vector de clonación pEG103, es compatible con la tecnología Gateway, permite fusionar la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo carboxilo, el promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor confiere la capacidad de expresarse de forma constitutiva (Earley *et al.*, 2006)

Construcción de vectores pEG103-BGAF1 y pEG103-HXK4. Los vectores pEG103-BGAF1 y pEG103-HXK4 Δ 30 fueron producidos a partir de los vectores de entrada pDONR221-HXK4 Δ 30 y pDONR22-BGAF1 (Burgos-Palacios, 2019). Al vector pDONR221-HXK4 Δ 30 purificado, se le realizó la digestión con la enzima Mlu1, las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 0.7 % y se extrajo la banda que contenía al gen mediante el kit GenElute (NA1111-1KT, Sigma), utilizando el protocolo descrito por el fabricante, se le realizó la recombinación con la enzima LR clonasa, en el vector pEG103 siguiendo el protocolo establecido para la Tecnología Gateway (Invitrogen) descrito brevemente anteriormente.

Se transformaron las células competentes de la cepa DH5 de *E. coli* con el vector pEG103-HXK4 Δ 30, según se describió anteriormente. Las bacterias transformantes fueron crecidas en medio LB con kanamicina 100 μ g / mL (1:1000) a 37 °C, 150 rpm durante toda la noche, la posterior extracción del vector pEG103-HXK4 Δ 30 se realizó con el sistema de aislamiento Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research).

Para obtener el vector pEG103-BGAF1 se realizó la recombinación de la banda extraída posterior a la restricción del vector pDONR221-BGAF1 con la enzima Mlu1, (tal y cómo se hizo para extraer a ZmHXK4 Δ 30 de pDONR221-HXK4 Δ 30) en

pEG103, se siguió el mismo protocolo tanto en la recombinación, la transformación y la posterior extracción del plásmido con respecto a pEG103-HXK4Δ30.

A ambos vectores se les realizaron ensayos de restricción con la enzima Mlu1 FastDigest (Thermo scientific) en un medio de reacción que contuvo 2 μL de amortiguador Mlu1, 200 ng del plásmido purificado, 1 μL de la enzima Mlu1 y H₂O c.b.p. 20 μL. Se incubó 10 min a 37 °C. Adicionalmente se realizaron ensayos de PCR a los vectores utilizando los oligonucleótidos previamente mencionados (Tabla 2). Los productos génicos provenientes tanto de la restricción como del PCR se observaron mediante separación electroforética en gel de agarosa con 0.5 μg / mL de bromuro de etidio. Para el ensayo de restricción la concentración de agarosa usada fue de 0.7 % y para el PCR fue de 1.5 %.

RESULTADOS

Apariencia macroscópica y microscópica de *F. verticilloides* cepa MY3.

Para determinar el efecto de *F. verticilloides* en la expresión de ZmHXK4 y ZmBGAF1, se recuperaron las cepas de *F. verticilloides* MY3 y MY5 que se encontraban almacenadas a -80°C , en viales que contenían peat moss: arena. Se tomó una asada del vial y se inoculó cada una de las cepas en cajas Petri con PDA, después de 10 días de crecimiento se re-inoculó en cajas Petri con PDA y se incubó durante otros 10 días. La cepa MY3 presentó un crecimiento de color blanco y de tipo algodonoso por el anverso de la caja, mientras que en el reverso el color fue violáceo (Figura 8A y 8B). La cepa MY5 también presentó un crecimiento de color blanco tipo algodonoso por el anverso de la caja, sin embargo, a diferencia del color violáceo predominante en MY3, la coloración en la caja MY5 es anaranjada (Figura 8C y 8D).

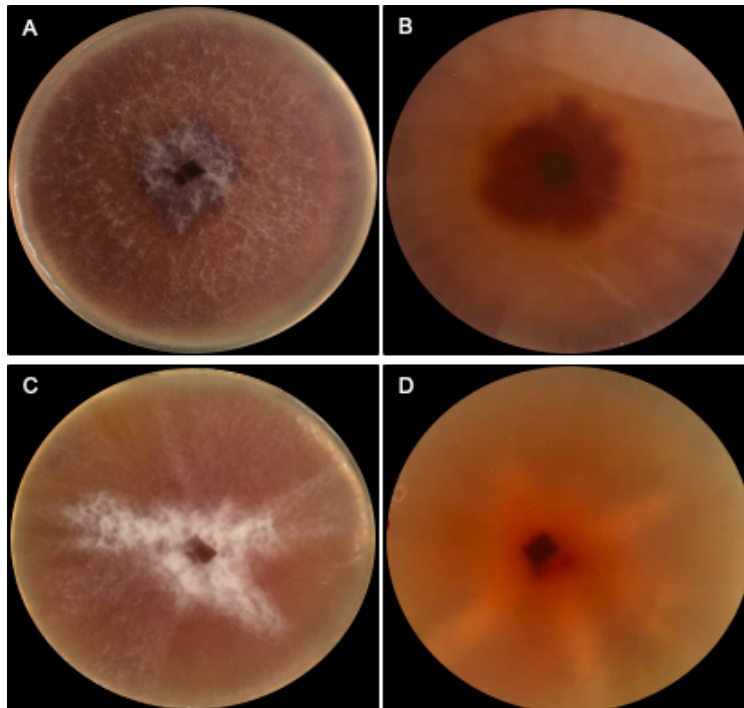


Figura 8. Crecimiento de *Fusarium verticilloides* MY3 y MY5 observación macroscópica.

Desarrollo de *F. verticilloides* MY3 en agar papa dextrosa posterior a 10 días de incubación a 29°C **A** Anverso y **B** Reverso. **C** y **D** muestran el anverso y reverso respectivamente de la cepa MY5 incubada bajo las mismas condiciones que MY3.

Se tomó una impronta del hongo y se tiñó con azul de lactofenol y se observó al microscopio. Se encontraron hifas y conidios de un solo tipo, por lo que el cultivo no está contaminado con otro microorganismo (Figura 9). Lo anterior se realizó no solo para la cepa MY3 sino también para la cepa MY5, la cual presentó las mismas características microscópicas (resultados no mostrados).

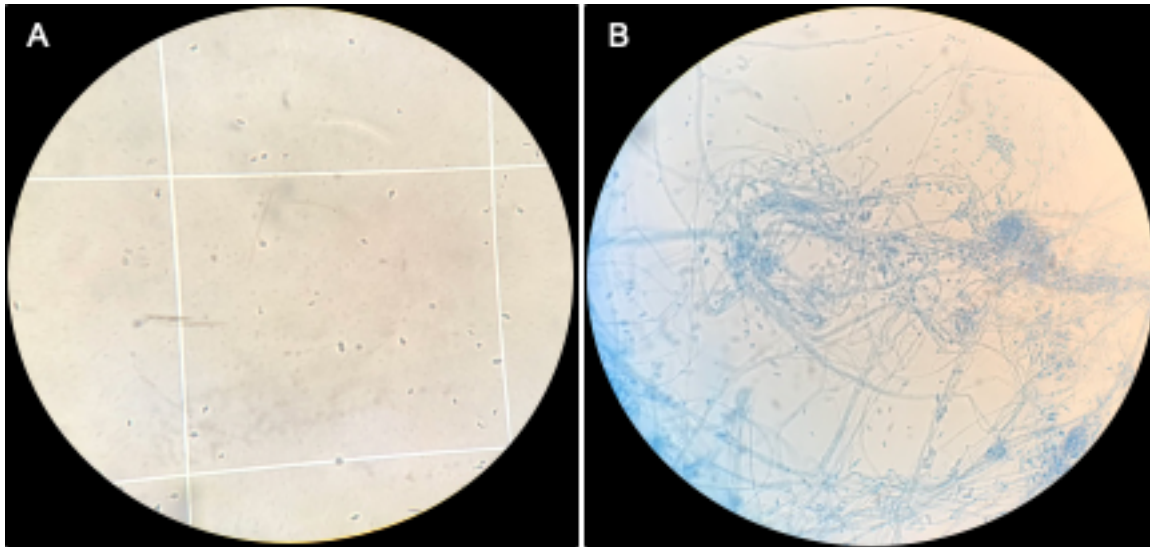


Figura 9. Morfología microscópica de *Fusarium verticilloides*.

A Conidios observados al microscopio con el objetivo 40X en la cámara de Neubauer.

B Impronta teñida con azul de lactofenol, observada al microscopio con objetivo 40X.

Una vez obtenidas ambas cepas, se procedió a obtener la solución concentrada de conidios para su posterior cuantificación y la infección de las semillas de maíz. Se escogieron ambas cepas debido a la diferencia que existe entre ellas en la producción de fumonisina, MY3 tiene la capacidad de producir una alta concentración (1699 $\mu\text{g/g}$) mientras que MY5 tiene una baja capacidad de producción (1.5 $\mu\text{g/g}$; Sánchez-Rangel *et al.*, 2005). Debido a que se ha sugerido que el nivel de fumonisina está relacionado con su virulencia se decidió trabajar con ambas y determinar su efecto en la expresión de ZmHXX4 y ZmBGAF1.

Efecto *F. verticilloides* y metil-jasmonato en el crecimiento de las plantas de maíz.

Debido a que la interacción de ZmHXK4 y ZmBGAF1 en los ensayos de “pull down” se encontró solamente en coleoptilos de 72 h de crecimiento que provenían de semillas que se encontraban infectadas con *Fusarium* (comunicación personal King-Díaz B y Rodríguez-Saavedra C), se decidió infectar a las semillas de Maíz VS535 a través de su remojo (bioprimering) en una solución de conidios. Se probaron varias concentraciones de conidios de *F. verticilloides*/semilla (Guzmán-Chávez, 2013), para que las plantas que se produjeran tuvieran los efectos del hongo, pero teniendo cuidado de que no se comprometiera la vida de la planta. La concentración de 20,000 conidios/semilla si permitió la obtención de plantas, en las cuales se podía observar conidios e hifas creciendo en la semilla, y el crecimiento de la raíz y el coleoptilo si se alcanzó. El desarrollo del coleoptilo fue similar tanto en las plantas control como con las infectadas con *F. verticillioides* cepa MY3 y MY5 (Figura 10B y 10C).

Por otra parte, debido a que una de las respuestas de la planta a la infección por *F. verticillioides* es la producción de JA (Guzmán-Chávez 2013; Christensen *et al.*, 2014), y también porque una ZmBGAF1 pertenece a la familia de las jacalinas que se conoce aumentan su expresión por JA (Blanchard *et al.*, 2000), se decidió dar un tratamiento con jasmonatos a las semillas de maíz. Se realizó un primer ensayo con 100 μ M MeJA, el cual inhibe por completo la germinación de la semilla, por lo que se decidió probar a la mitad de esa concentración. Se encontró que el tratamiento con 50 μ M MeJA produce un pobre desarrollo del coleoptilo y la raíz, no se aprecian pelos radicales (Figura 10D), similar a como ya se había encontrado previamente en el laboratorio (Carvente-García, 2012).

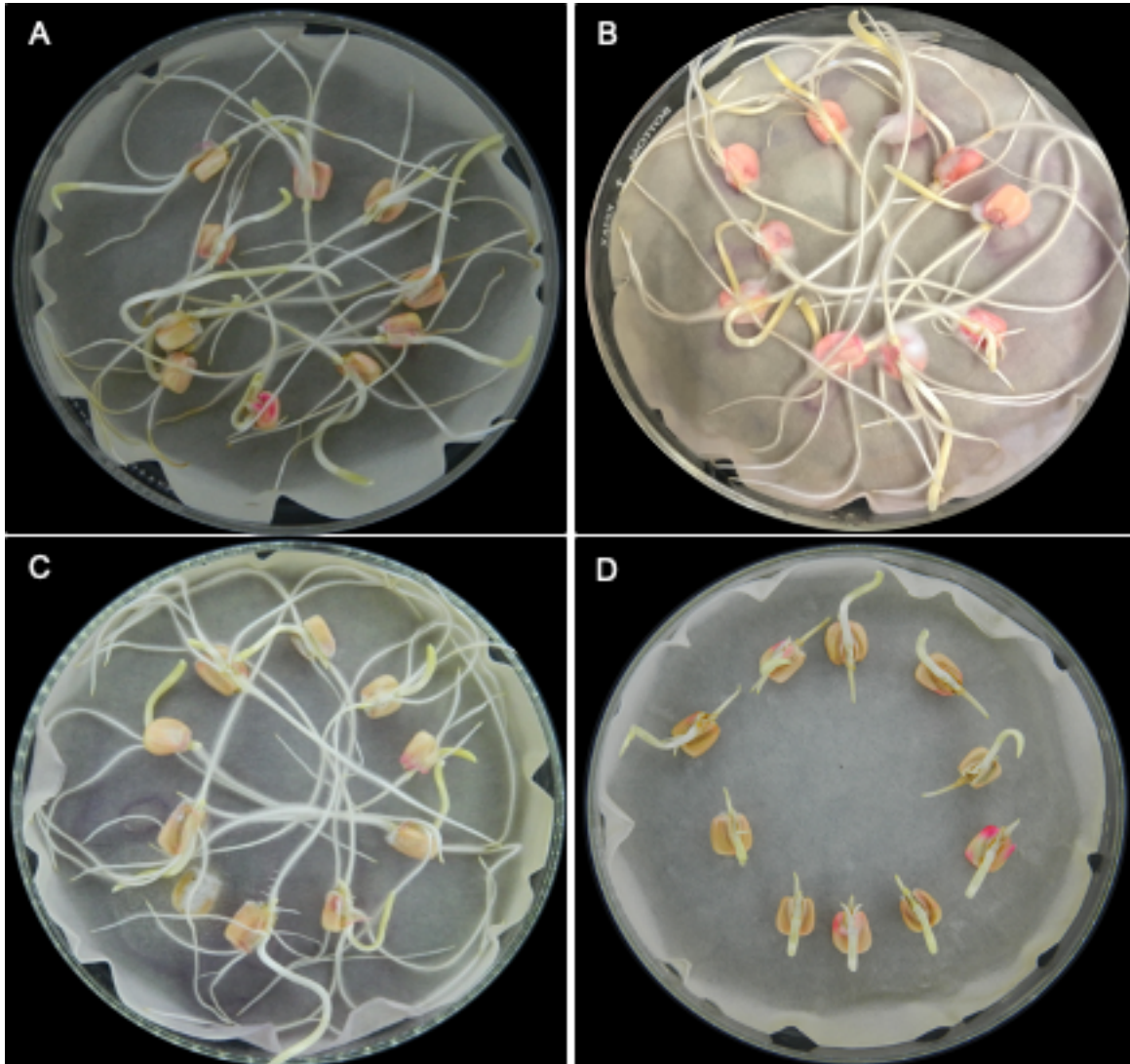


Figura 10. Desarrollo de maíz tratado con *F. verticilloides* (MY3 y MY5) y 50 μ M Metil-Jasmonato a 72 h de germinación.

Las semillas fueron primero desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0.12 %, el control (A) se remojó con agua destilada, mientras que los tratamientos fueron remojados en 20,000 conidios de *F. verticillioides* MY3 (B) o MY5 (C), o en una solución que contenía 50 μ M MeJA (D) para después ser germinadas en papel filtro estéril en condiciones de oscuridad por 72 h a 29 °C.

Análisis de la expresión de ZmBGAF1 y ZmHXX4 mediante PCR tiempo real.

Con el objetivo de evaluar si el estrés de tipo biótico induce cambios en los niveles de transcritos para ZmBGAF1 y ZmHXX4 durante la infección de las plantas con *F. verticillioides* MY3, MY5 y MeJA, era necesario primero evaluar la especificidad de los oligonucleótidos para ZmBGAF1. Los oligonucleótidos para la amplificación específica de ZmHXX4 y Zm18s ya habían sido probados anteriormente (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019). Las curvas de disociación se encuentran en el anexo 1. Para corroborar la reproducibilidad del método, se realizaron las curvas Ct (número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido) por triplicado (Figura 11).

La curva patrón obtenida para los oligonucleótidos de ZmBGAF1, diseñados y probados en el presente trabajo son confiables, ya que se obtuvo una pendiente de -3.43, que está dentro del intervalo considerado como aceptable (de -2.97 a -3.63), por otro lado, al evaluar la eficiencia del qPCR, los valores aceptables son entre el 90 % y 110 %, y se obtuvieron valores de 95% (Tichopad *et al.*, 2002). También se corroboró la curva patrón para los oligonucleótidos de Zm18s, la curva resulta similar a lo reportado previamente (Pfaffl, 2001; Sosso *et al.*, 2015).

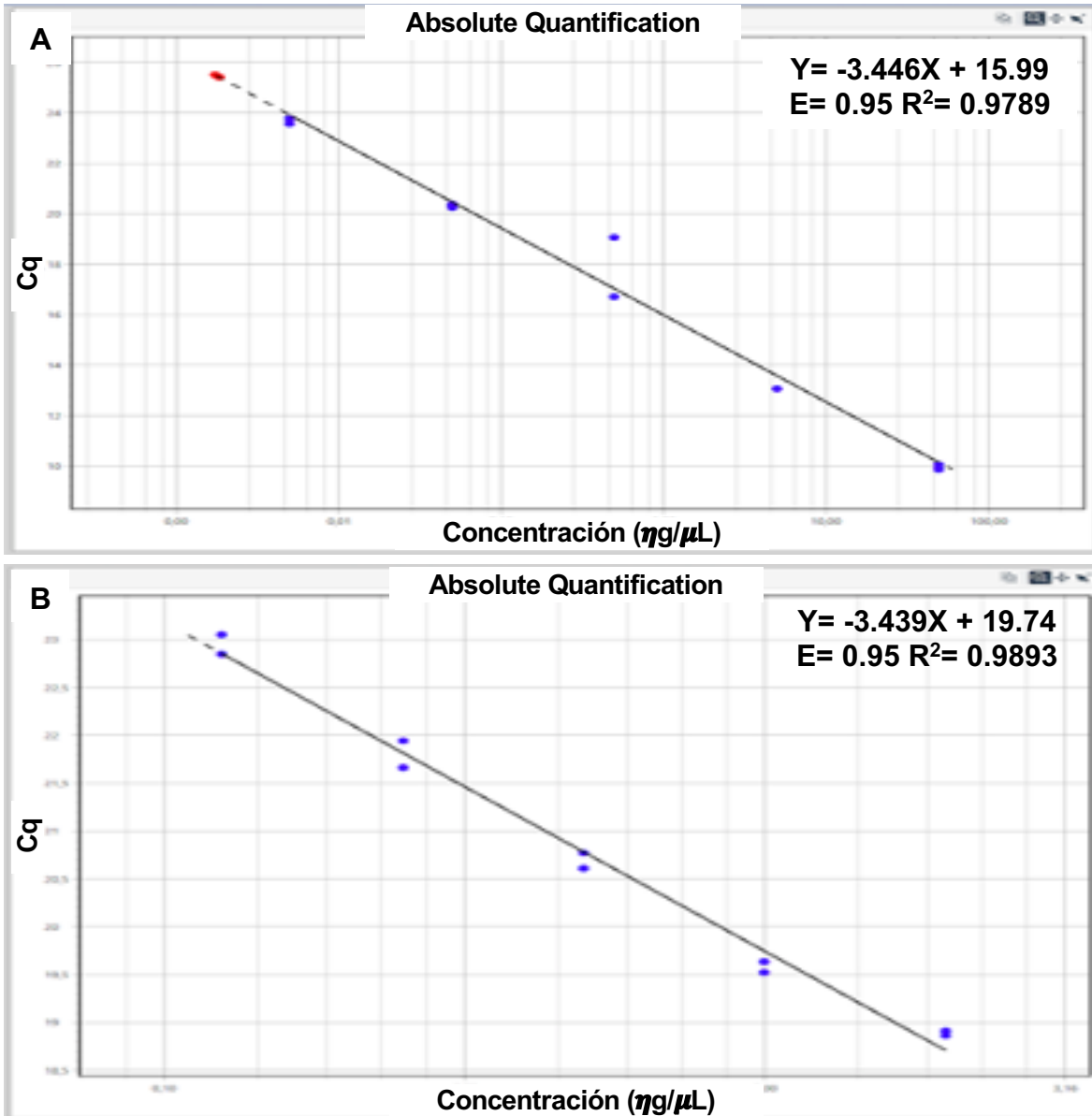


Figura 11. Curvas estándar de expresión de *Zm18s* (A) y *ZmBGAF1* (B) en diferentes diluciones de cDNA.

Se muestran los datos de regresión de cada una de las curvas estándar. Un valor de la pendiente entre -2.9 y -3.6 es el aceptable para la confianza y reproducibilidad de los resultados de la amplificación por qPCR.

Una vez obtenida la curva de calibración de los productos amplificados para *ZmBGAF1*, se realizó la reacción de qPCR. La abundancia de los transcritos para *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* se analizó con el programa MicPCR (Biomolecular systems) y se empleó el método comparativo de Ct para realizar la cuantificación relativa (Pfaffl, 2001). Los resultados fueron normalizados respecto al gen de referencia y también respecto a la expresión de los genes en una condición control (tratamiento de las semillas con agua destilada), en donde valores mayores a 1 representan un aumento en la expresión y lo opuesto en valores menores a 1.

Los niveles de *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* se determinaron en el cDNA que provenía de coleoptilos de 72 h de crecimiento sin tratamiento (control), tejido proveniente del tratamiento de las semillas con las dos cepas una con alta y otra con baja producción de fumonisinas, MY3 y MY5 respectivamente, la concentración de conidios empleada fue de 20,000 conidios/ mL/ semilla. Debido a que los hongos del género *Fusarium* inducen la síntesis de JA, y esta fitohormona a su vez enciende las respuestas de defensa de la planta, a un lote de semillas se les trató con 50 μ M MeJA (Cervante-García, 2012; Laredo-Alcalá *et al.*, 2017).

El tratamiento con MeJA induce la expresión de ambos genes (Figura 12). El aumento de la expresión de *ZmBGAF1* solo se encontró en el tratamiento con 50 μ M MeJA y fue opuesto al encontrado cuando el tejido fue tratado con *Fusarium* MY3 y MY5, ya que en estos casos se redujo su expresión, siendo significativamente diferente la expresión en los tres tratamientos.

Mientras que la expresión de la *ZmHXK4* aumentó en todos los tratamientos (MeJA, *Fusarium* MY3 y MY5), siendo el tratamiento con MeJA el que produjo el mayor aumento en la expresión y significativamente distinto a cuando el tejido fue infectado con *Fusarium* (Figura 12).

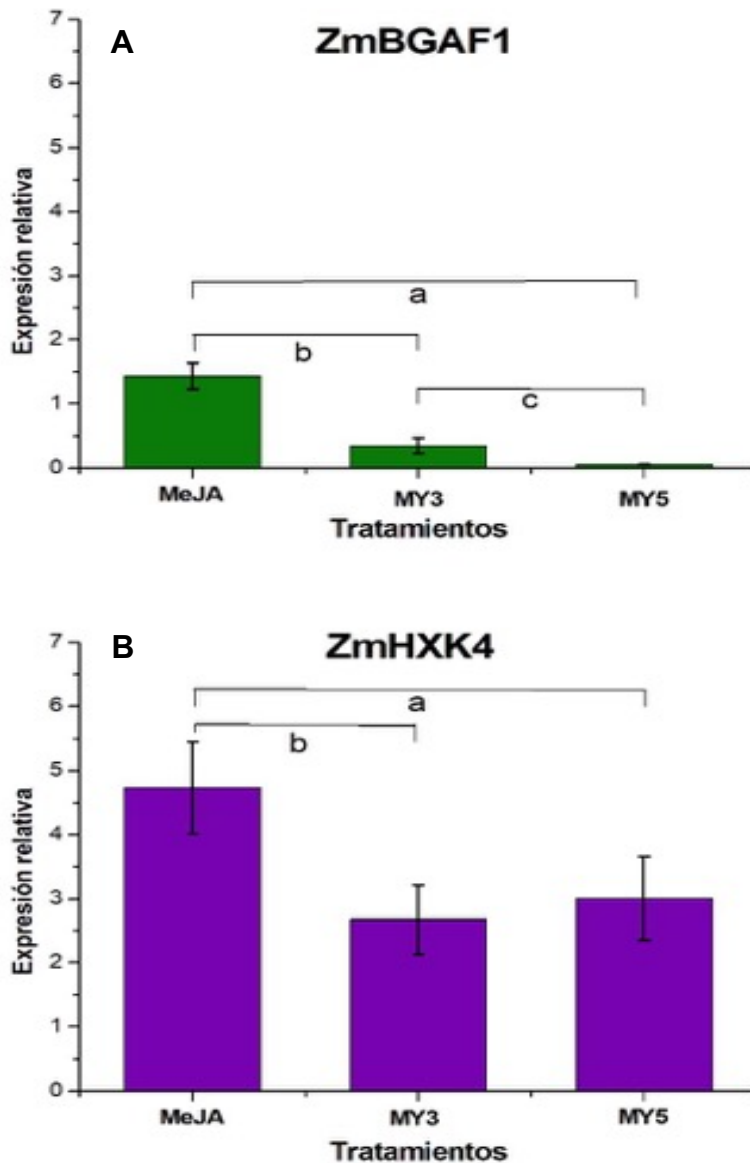


Figura 12. Expresión relativa de *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* con respecto a *Zm18s* en los diferentes tratamientos de estrés.

La expresión relativa se obtuvo al relacionar la expresión de **A.** *ZmBGAF1* o **B.** *ZmHXK4* en una condición control (tratamiento con agua) y el tratamiento (Infección con *Fusarium* o con MeJA), además de relacionarla con la expresión del gen constitutivo (*Zm18s*), de acuerdo con el modelo reportado por Pfaffl, 2001. Los datos de la expresión de los genes en coleoptilos de 72 h bajo los distintos tratamientos, se compararon mediante la prueba ANOVA de dos vías, las letras señaladas en minúscula indican diferencias significativas entre esos grupos $p < 0.05$. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$ réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una.

Adicionalmente, se evaluó la expresión relativa de los genes AOS y AOC involucrados en la síntesis de JA y de PAL implicado en la síntesis de SA, puesto que el género *Fusarium* puede encender ambas vías de defensa contra patógenos dependiendo de la etapa del ciclo de vida en donde se encuentra (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012).

Se observó un aumento en los transcritos de AOS en los tratamientos de MeJA y *F. verticillioides* MY5, pero no con la cepa MY3 (Figura 13). Aunque se encontró que los niveles de transcritos de AOC se redujo en todos los tratamientos. Es posible que los niveles de jasmonatos aumentaron no solo en presencia del MeJA sino también de la cepa de *F. verticillioides* MY5, ya que la vía de síntesis de jasmonatos se incrementa con la catálisis de los ácidos grasos hidroperóxidos, 13-HPOT (ácido 13S-hidroperoxi-(9Z,11E,15)-octadecatrienoico) a través de AOS, quién compete con otras seis enzimas (Yan *et al.*, 2011). Aunque es necesario llevar a cabo la determinación de los niveles de jasmonatos para asegurar lo anterior.

Por último, el transcrito que codifica para PAL aumenta considerablemente su expresión en el tratamiento con MY3, y se encuentra reducido en los tejidos tratados con MY5 y MeJA (Figura 13). Por lo que *F. verticillioides* cepa MY3 es una cepa que activa la vía del SA.

A pesar de que las cepas de *F. verticillioides* MY3 y MY5 encienden vías diferentes de señalización, no producen un efecto distinto entre ellas en los niveles de expresión de *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* (Figura 12), por lo que es posible que la producción de fumonisinas no sea uno de los posibles reguladores de la expresión de ambos genes. Aunque la presencia del hongo si modifica la expresión de las dos proteínas y el MeJA llevan a un aumento en la expresión de ambas proteínas (Figura 12). Es necesario llevar a cabo más estudios para determinar el papel de los jasmonatos en la expresión de ambas proteínas. Si bien hay estudios sobre la inducción por jasmonato de proteínas de la familia de la jacalina a la cual *ZmBGAF1* pertenece (Blanchard *et al.*, 2000).

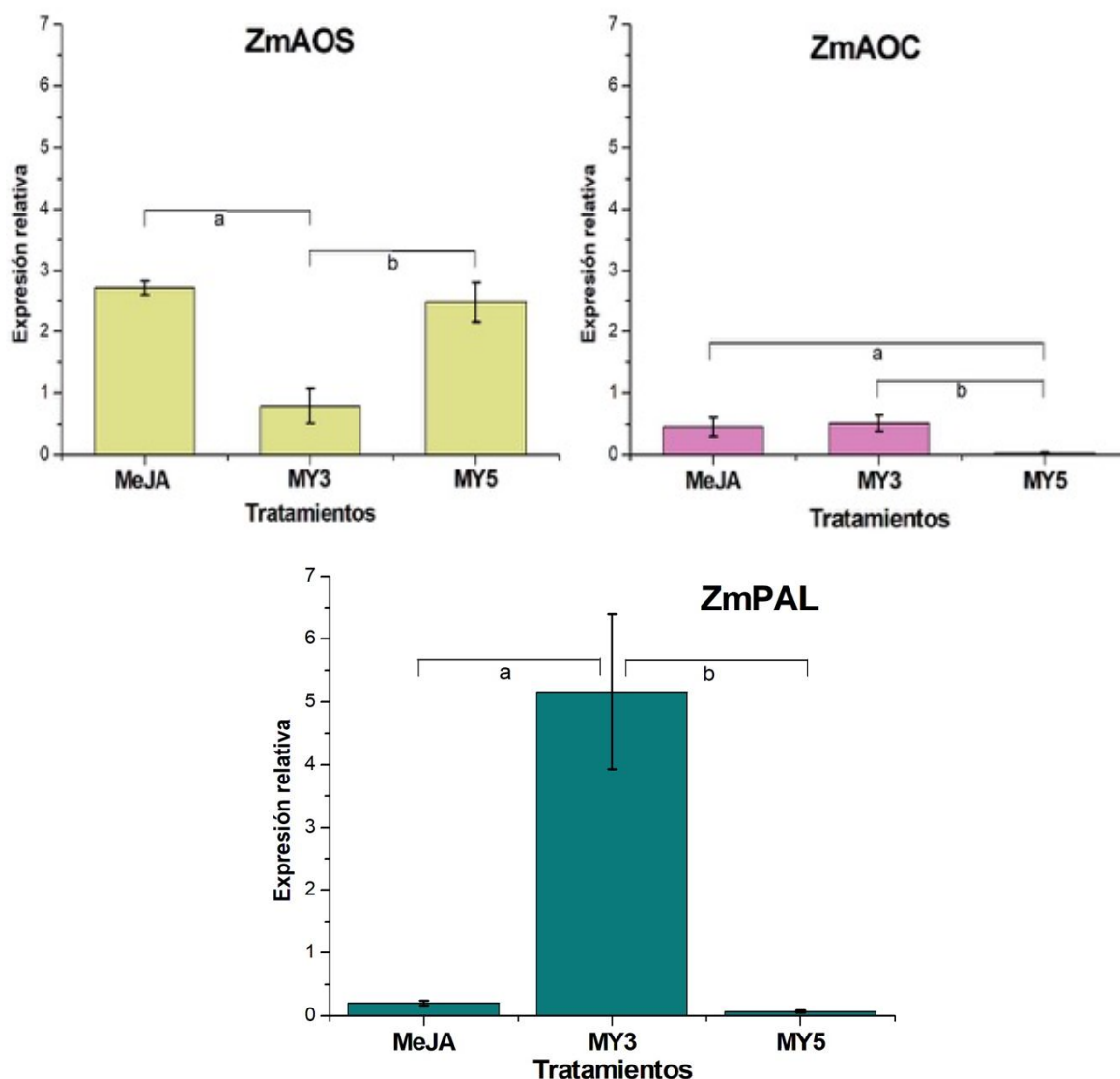


Figura 13. Expresión relativa de los genes ZmAOS, ZmAOC y ZmPAL con respecto a Zm18s en los diferentes tratamientos de estrés.

La expresión relativa se obtuvo al relacionar la expresión de *ZmAOS*, *ZmPAL* o *ZmAOC* en una condición control (tratamiento con agua) y el tratamiento (Infección con *Fusarium* o con MeJA), se comparó dicha expresión con la del gen constitutivo (*Zm18s*), de acuerdo al modelo reportado por Pfaffl, 2001. Los datos de la expresión de los genes en coleoptilos de 72 h bajo los distintos tratamientos, se compararon mediante la prueba ANOVA de dos vías las letras señaladas en minúscula indican diferencias significativas entre esos grupos $p < 0.05$. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$ réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una.

Producción de los vectores pUB para realizar los ensayos de interacción *in vivo*, BiFC, entre ZmBGAF1 y ZmHXX4.

El ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia permite determinar que dos proteínas interactúan *in vivo*. Lo anterior se debe a que cada una de las proteínas de interés se une a un fragmento no fluorescente de la porción amino o carboxilo de una proteína fluorescente, la proximidad de ambos fragmentos lleva a que se restituya la fluorescencia (Kerppola *et al.*, 2008).

Los vectores de expresión pUB(N/C)-(c/n)YFP son utilizados para la producción de proteínas recombinantes necesarios para realizar el análisis de BiFC (García-Valencia *et al.*, 2017), adicionalmente tienen los sitios de recombinación adecuados para el uso de la tecnología Gateway, que permite que, a partir de un vector de entrada (pDONR221), una recombinasa (LR) y el vector de expresión, obtener los genes en el vector adecuado para determinar la interacción de las proteínas de interés.

Los vectores pDONR221 que fueron producidos en un trabajo previo (Burgos-Palacios, 2019) fueron utilizados para obtener las nuevas clonas, pero primero se corrobó en ellos la presencia de los genes en el vector mediante PCR (Figura 14A) y ensayos de restricción (Figura 14B). El vector pDONR221 tiene tres sitios de corte con la enzima Mlu1, uno de los cuáles se encuentra en el sitio de recombinación, por lo que al insertar el gen de interés, suele perder el sitio de corte de la enzima, lo que genera que los plásmidos recombinantes, tengan sólo dos bandas producto de la reacción enzimática, tal y como se observa en la figura 14B.

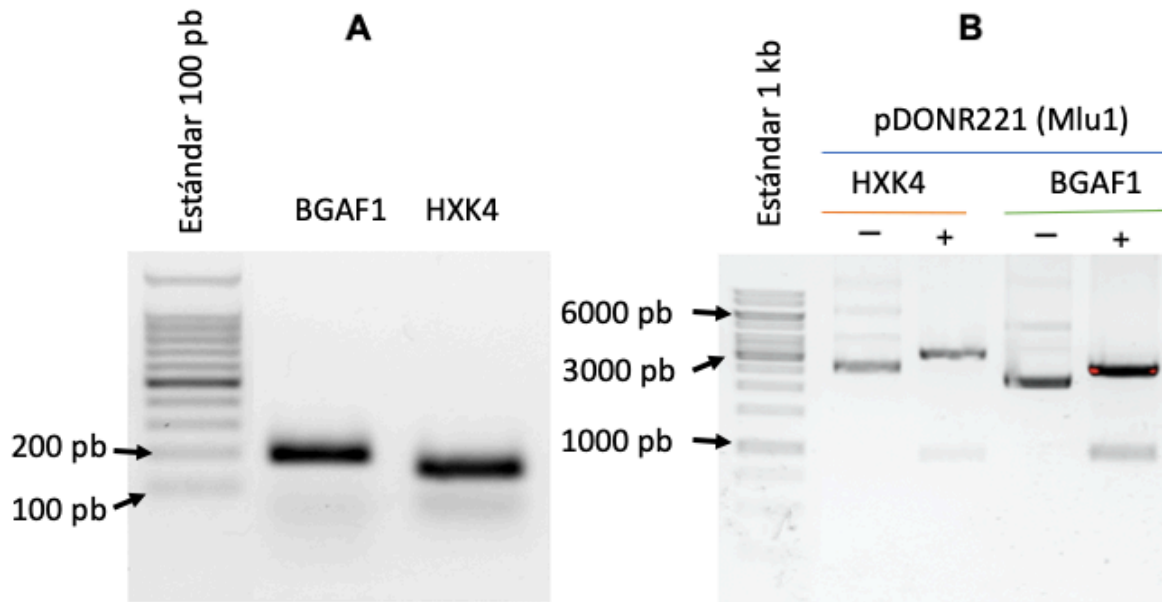


Figura 14. Comprobación de que los genes *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* se encontraban en los vectores pDONR221-BGAF1 y pDONR221-HXK4 Δ 30.

A) Producto de PCR obtenido con oligonucleótidos específicos para cada gen, se observa en el gel de agarosa un producto de 191 pb para *ZmBGAF1* y de 173 pb para *ZmHXK4* y **B)** mediante ensayos de restricción con la enzima *Mlu1*.

Posteriormente se obtuvieron los vectores de expresión pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP y pUBN-BGAF1-cYFP, a partir de la recombinación entre los vectores pDONR221-HXK4 Δ 30 y pDONR221BGAF1 (Burgos-Palacios, 2019; Figura 14), con los vectores pUBC-nYFP y pUBN-cYFP y con ayuda de la LR Clonasa (Invitrogen). Se transformaron *E. coli* DH5 α y se les permitió su recuperación. Se transfirió a caja petri con LB adicionado con espectinomicina 100 μ g/mL, y se aisló una colonia, la cual se inoculó en medio LB líquido con el mismo antibiótico a la misma concentración, y posteriormente se purificó el plásmido. Al cual se le realizaron ensayos PCR y de restricción para corroborar la inserción del gen de interés (Figura 15A). El vector vacío se digirió con *Xba1* produciendo 4 bandas, mientras que el vector con el gen de interés pierde un sitio de restricción (Figura 15B).

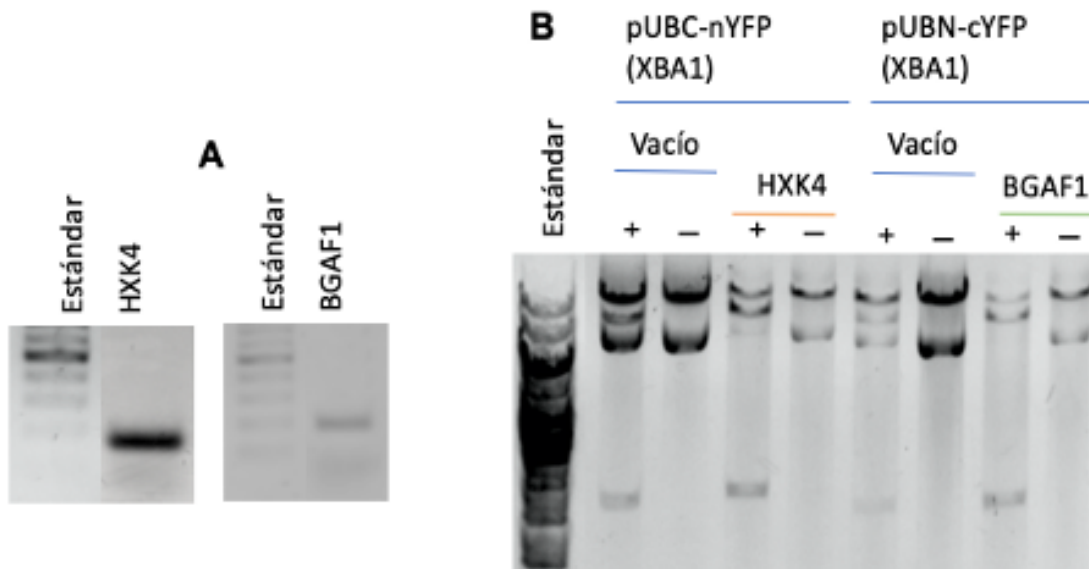


Figura 15. Comprobación de que el gen *ZmHXK4Δ30* se encontraba en el vector pUBC-nYFP y *ZmBGAF1* en el vector pUBN-cYFP.

A) Producto de PCR con los oligonucleótidos específicos para cada gen, de 191 pb para *ZmBGAF1* y de 173 pb para *ZmHXK4* y **B)** mediante ensayos de restricción con la enzima XbaI. Se observa que el vector vacío presenta tres cortes con la enzima de restricción, mientras que el vector con el gen de interés solo presenta dos, prueba de que el gen se encuentra insertado en el vector.

Adicionalmente a la producción de los vectores para el ensayo de complementación funcional también se produjeron los vectores para expresar tanto a *ZmHXK4Δ30* como a *ZmBGAF1* unidas a la proteína verde fluorescente, que pueden usarse como controles en el ensayo BiFC y también para localizar subcelularmente a las dos proteínas. Por lo que ambos fueron obtenidos de la recombinación de los vectores pDNOR221 para *ZmHXK4Δ30* como para *ZmBGAF1* con el vector de expresión de plantas pEarlyGate103, este vector contiene al promotor constitutivo del virus del mosaico del tabaco (CaMV 35S), el gene de la proteína verde fluorescente y confiere resistencia a dos antibióticos kanamicina y cloranfenicol.

Se purificó al vector vacío pEG103, y debido a que este y el pDONR221 confieren resistencia a kanamicina, se cortaron los vectores mediante el uso de dos enzimas de restricción Eco32I y NheI, las cuales quitan el sitio de origen de replicación del

plásmido pDONR221. Se separaron en un gel de agarosa al 0.7 % y se extrajo el material genético el cual fue recombinado con la LR clonasa al vector pEG103. Los vectores recombinantes fueron usados para transformar *E. coli* DH5 α . El vector fue analizado por PCR (Figura 16A) y por ensayos de restricción para corroborar la inserción del gen de interés (Figura 16B). El vector pEG103 tiene dos sitios de corte con la enzima Mlu1, uno de los cuáles se encuentra en el sitio de recombinación, por lo que al insertar el gen de interés, suele perder el sitio de corte de la enzima, lo que genera que los plásmidos recombinantes se linearicen, como se observa en la figura 16B.

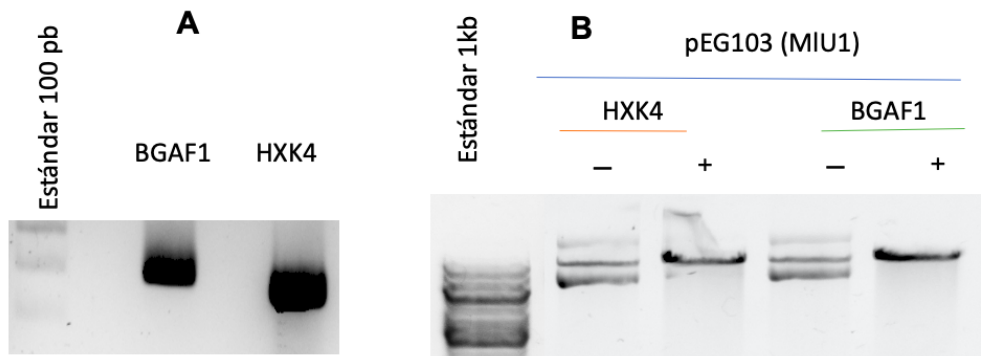


Figura 16. Comprobación de la presencia de los genes *ZmBGAF1* y *ZmHXK4Δ30* en pEG103.

A) Mediante PCR y su corrimiento en un gel de agarosa y **B)** mediante ensayos de restricción usando la enzima Mlu1.

Todos los vectores producidos fueron mantenidos en células de *E. coli* DH5 α y fueron usados para la transformación de *Agrobacterium* y la posterior agroinfiltración en las hojas de *Nicotiana benthamiana* o semillas de maíz.

La expresión transitoria conjunta de ZmHXK4 y ZmBGAF1 en las hojas de *Nicotiana benthamiana* induce la pérdida de agua.

Con la finalidad de determinar la interacción *in vivo* de ZmBGAF1 y ZmHXK4, se realizaron ensayos de interacción bimolecular de complementación de la fluorescencia o BiFC, el ensayo consistió en añadir la región amino de la YFP al extremo carboxilo de la ZmHXK4, mientras que la región carboxilo de la YFP está unida al extremo amino de la ZmBGAF1. La emisión de la fluorescencia de la YFP es posible al unirse la región amino y carboxilo, lo que implica la interacción de las proteínas a las cuáles está unida.

El ensayo BiFC se realizó primero en un sistema heterólogo, para lo cual se utilizaron los vectores de expresión pEG103-BGAF1 (producto proteico esperado ZmBGAF1-GFP), pEG103-HXK4 Δ 30 (producto proteico esperado ZmHXK4 Δ 30-GFP), pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP. Con estos vectores se transformaron *Agrobacterium tumefaciens*. Se corroboró que las bacterias eran transformantes mediante PCR de colonia (resultados no mostrados). Las cepas resultantes se crecieron en medio líquido con antibióticos de selección y posteriormente se guardaron con glicerol 3:1 a -80 °C, hasta su uso.

Para realizar la agroinfiltración fue necesario mantener las plantas bajo luz débil durante 24 h previo a la infiltración. En la mañana del día de la agroinfiltración se regaron las plántulas y se mantuvieron en la oscuridad hasta la infiltración. Las hojas recibieron los siguientes tratamientos: 1) control sin infiltrar, 2) control infiltrado con la solución de infiltración (MES 10 mM pH 5.7 y MgCl₂ 10 mM), 3) agroinfiltración con vector para expresar ZmHXK4 Δ 30-GFP, 4) agroinfiltración con vector para expresar ZmBGAF1-GFP y 5) agroinfiltración de la mezcla en relación 1:1 de dos *Agrobacterium* transformantes, que expresan ZmHXK4 Δ 30-nYFP o ZmBGAF1-cYFP. La infiltración se llevó a cabo con una jeringa de 1.0 mL sin aguja y por el envés de la hoja y se infiltraron varias hojas de la planta y varias plantas. Las plantas

se mantuvieron en condiciones de invernadero con fotoperiodo natural y las hojas se colectaron a las 72 h después de la infiltración (Figura 17).

Las hojas no infiltradas o infiltradas con la solución de infiltración presentaron una coloración verde y turgencia normal (Figuras 17 A y B), al igual que las hojas que fueron agroinfiltradas con los vectores de expresión para ZmHXK4 y ZmBGAF1 de manera independiente (Figura 17 C y D). Pero las hojas de *Nicotiana* agroinfiltradas con la mezcla de las dos cepas de *Agrobacterium* transformantes para los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP, la mayoría eran quebradizas y con sensación crujiente al tacto, aunque permanecieron pegadas a la planta y de color verde (Figura 17 E).

Aunque no se puede asegurar que dicho fenotipo sea ocasionado por la expresión de ZmBGAF1 y ZmHXK4 de forma conjunta en la hoja, la apariencia de esas hojas es muy diferente a la de los controles. Tampoco se observó un fenotipo similar a este cuando se infiltró la hoja con los dos vectores vacíos con la versión complementaria de la YFP, co-infiltración de pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-nYFP o pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP y pUBN-cYFP (resultados no mostrados).

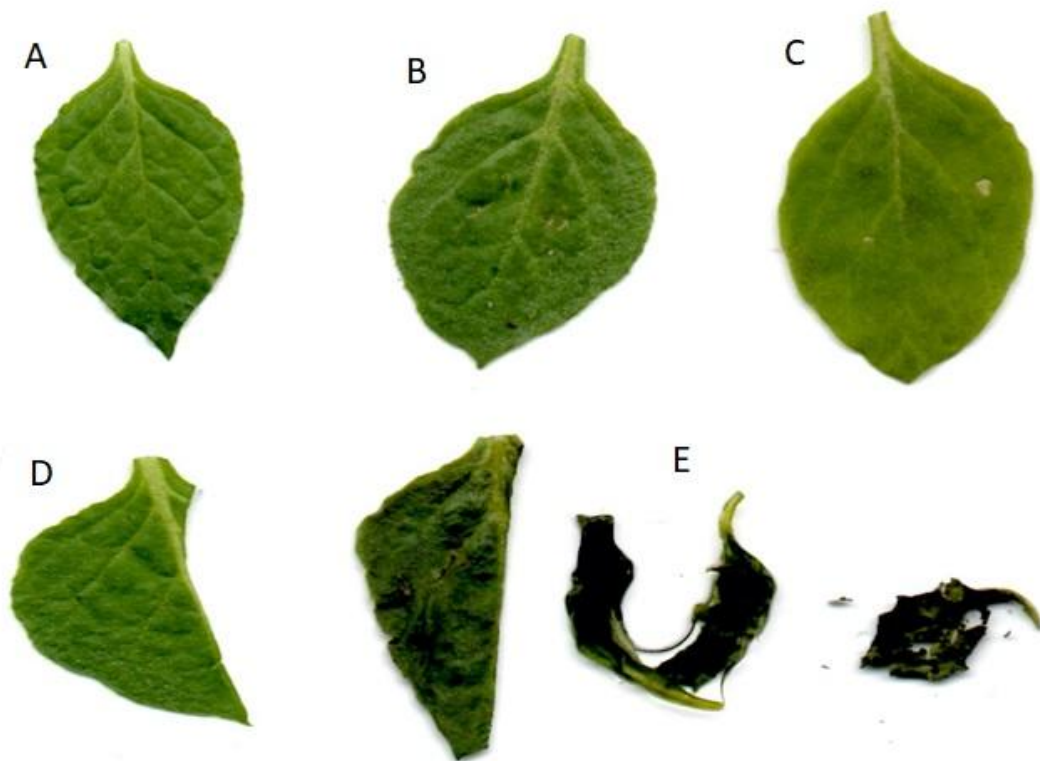


Figura 17. Hojas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con *A. tumefaciens*.

Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron a los 2 meses posteriores a la germinación. **A.** Hoja sin infiltrar. **B.** Hoja infiltrada con MES 10 mM y $MgCl_2$ 10 mM. **C.** Hoja infiltrada con *A. tumefaciens* transformada con el vector pEG103-HXK4 Δ 30. **D.** Hoja infiltrada con *A. tumefaciens* transformada con el vector pEG103-BGAF1. **E.** Hoja infiltrada con *A. tumefaciens* transformante para el vector pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP (BiFC). Las hojas se cortaron a las 48 h posteriores a la infiltración. Experimento representativo, n= 3.

ZmHXK4 y ZmBGAF1 interaccionan *in vivo*: Protocolo de BiFC en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Como se mencionó anteriormente para determinar la interacción *in vivo* de ZmHXK4 y ZmBGAF1 se utilizaron las hojas de *N. benthamiana* que fueron agroinfiltradas con los vectores de expresión descritos en la sección anterior. Las hojas con 72 h post-infiltración se cortaron desde la base y se realizó la separación de la epidermis abaxial del resto de la hoja. Se colocó la capa de células sobre un portaobjetos de vidrio con 3 gotas de agua, se cubrió con un cubreobjetos y se analizó en el microscopio de epifluorescencia. Los controles de emisión de fluorescencia fueron

las hojas que no fueron infiltradas o las infiltradas con la solución de infiltración (MES/MgCl₂), como se observa en la figura 18 hay fluorescencia intrínseca emitida por las hojas, la cual se les atribuye principalmente a las paredes celulares.

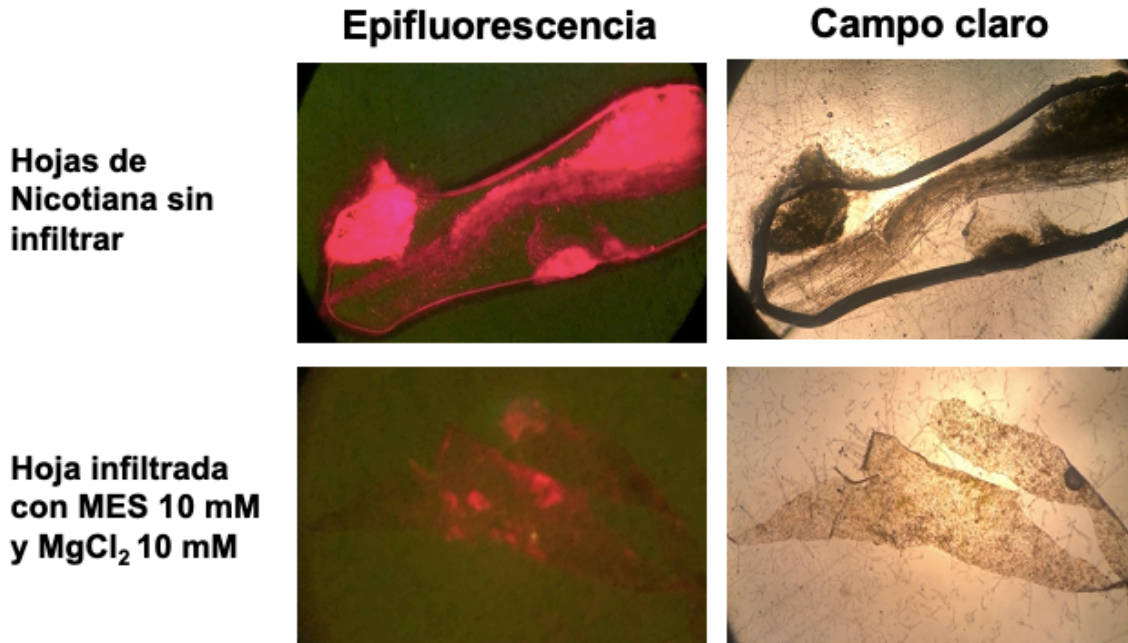


Figura 18. Efecto de la infiltración con solución de infiltración en la fluorescencia de la epidermis de las hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Las imágenes fueron tomadas de hojas de *Nicotiana* sin infiltrar e infiltradas con MES 10 mM y MgCl₂ 10 mM. **Observación de la epifluorescencia.** Se observaron bajo el filtro azul del microscopio de epifluorescencia, la fluorescencia emitida es la intrínseca de la célula. **Observación del campo claro.** Las hojas fueron cortadas desde la base, y se separó la epidermis abaxial del resto de la hoja. Todas las imágenes se observaron con el objetivo 10X.

En los epitelios de las hojas de *Nicotiana* que fueron agroinfiltradas con los vectores pEG103-HXK4Δ30-GFP y pEG103-BGAF1-GFP, se encontraron unos pequeños puntos de coloración amarilla-verde (Figura 19). Estos resultados sugieren que las células del epitelio de las hojas de *Nicotiana* si están produciendo a las proteínas recombinantes.

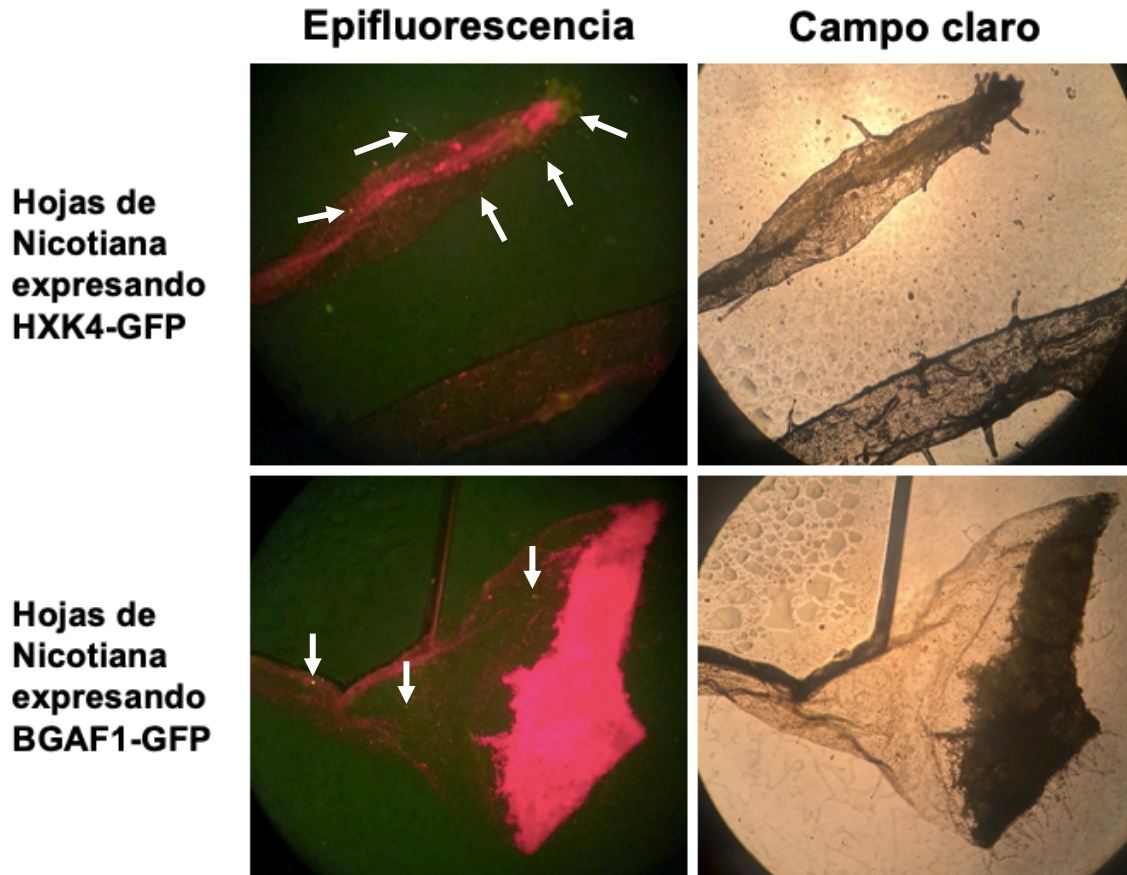


Figura 19. Observación por microscopía de fluorescencia de la expresión transitoria de ZmBGAF1-GFP y ZmHXK Δ 30-GFP en las hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Las imágenes fueron tomadas de hojas de *Nicotiana* agroinfiltradas con los vectores pEG103-BGAF1 y pEG103-HXK4 Δ 30. **Observación de la epifluorescencia.** Se observaron bajo el filtro azul del microscopio de epifluorescencia, los puntos de fluorescencia muestran la expresión de la proteína ZmBGAF1 y ZmHXK4 Δ 30 respectivamente, unida a GFP. **Observación del campo claro.** Las hojas se observaron en el microscopio después de 72 h de la agroinfiltración. Todas las imágenes se observaron con el objetivo 10X. Las flechas blancas señalan algunos de los puntos amarillos más intensos.

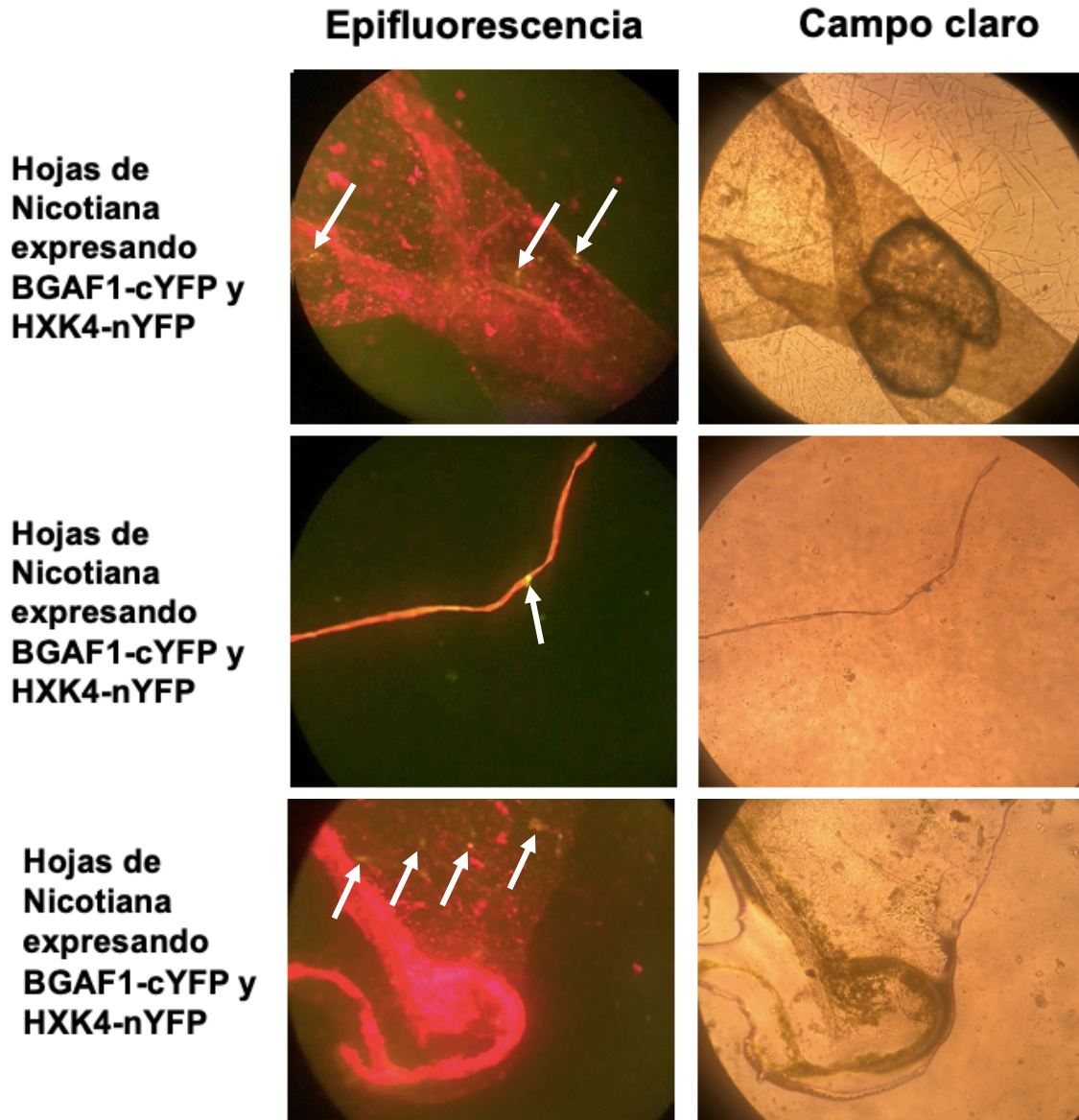


Figura 20. Efecto de la co-expresión transitoria de ZmBGAF1-cYFP y ZmHXK-nYFP, ensayo BiFC, en las hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se muestran tres réplicas de las imágenes tomadas de hojas de *Nicotiana* infiltradas con *A. tumefaciens* con los vectores pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP y pUBN-BGAF1-cYFP. **Observación de la epifluorescencia.** Se observaron bajo el filtro azul del microscopio de epifluorescencia, los puntos de fluorescencia muestran la posible interacción de ambas proteínas al complementar la proteína YFP a la que están unidas. **Observación del campo claro.** Las hojas se observaron en el microscopio después de 72 h posterior a la infiltración. Todas las imágenes se observaron con el objetivo 10X. Las flechas señalan los puntos más fuertes de fluorescencia.

Para determinar si la ZmHXK4 y ZmBGAF1 interactúan *in vivo* se observaron los epitelios de la hoja que fue agroinfiltrada con los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4-nYFP, bajo el microscopio de epifluorescencia. Los resultados muestran una señal de fluorescencia (Figura 20), la cual solo ocurriría si la ZmHXK4 y ZmBGAF1 estuvieran interactuando, puesto que cada proteína presenta solo la mitad complementaria de la proteína YFP.

Los resultados de la expresión de ambas proteínas nos indican que probablemente la ZmBGAF1 y ZmHXK4 están interactuando *in vivo* y que además están ocasionando un fenotipo de muerte.

La co-infiltración de los vectores de expresión para ZmHXK4 y ZmBGAF1 afecta la morfología de las hojas de maíz.

El ensayo BiFC en las hojas de *N. benthamiana* sugieren que ZmBGAF1 y ZmHXK4 interactúan *in vivo*, por lo que se decidió realizar el análisis de la interacción de ambas proteínas en el sistema homólogo, además se añadieron algunos controles, como adelante se muestra.

Para la transformación de las semillas de maíz se desarrolló un protocolo, estas primero se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio, después se les realizó un corte ligero en la superficie cercana al eje embrionario, se sumergieron en 5 mL de *Agrobacterium* transformantes, en botellas de vidrio médico de 10 mL con tapones de goma, se agitaron y se sometieron a aproximadamente a una presión de vacío de 20 kPa generada usando una jeringa de 20 mL durante 30 s de acuerdo a la metodología reportada por Grefen y colaboradores en 2010. Adicionalmente con la finalidad de mejorar la eficiencia de la transformación, las semillas se colocaron en los matraces con cultivo de *Agrobacterium* transformantes y se incubaron a 28 °C durante 16 h. Los tratamientos que se dieron fueron: Control de infiltración con medio de cultivo sin cepa transformante; pUBN-cYFP y pUBC-nYFP (vectores vacíos); pEG103-BGAF1-GFP; pEG103-HXK4 Δ 30-GFP; pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-nYFP; pUBC-HXK4-nYFP y pUBN-cYFP; BiFC usando

pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP. Las semillas de maíz se enjuagaron con agua y se crecieron en macetas en medio Sunshine Mix bajo condiciones de invernadero aproximadamente 27 a 29 °C durante 2 semanas.

Al analizar los fenotipos de las plantas transformadas se encontró que las plantas control (Figura 21A) y aquellas que fueron transformadas con los dos vectores vacíos pUB(N/C)-YFP por separado (Figura 21B), aquellas transformadas con pUBN-BGAF1-cYFP y el pUBC-nYFP (Figura 21D) y la transformada con pEG103-BGAF1 (resultados no mostrados) presentaban un fenotipo similar. Sin embargo, las plantas que fueron transformadas para expresar ZmHXK4 Δ 30-GFP presentaron hojas blancas, con un retraso en el crecimiento comparado con el control (Figura 21 C). Las plantas que fueron transformadas con alguno de los otros vectores para expresar a la ZmHXK4 presentaron un fenotipo de rugosidad en los bordes de las hojas y reducción en el tamaño (Figura 21E y F), siendo más evidente en las que fueron transformadas con la mezcla de las cepas de *Agrobacterium* que contenían a pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP (Figura 21F).

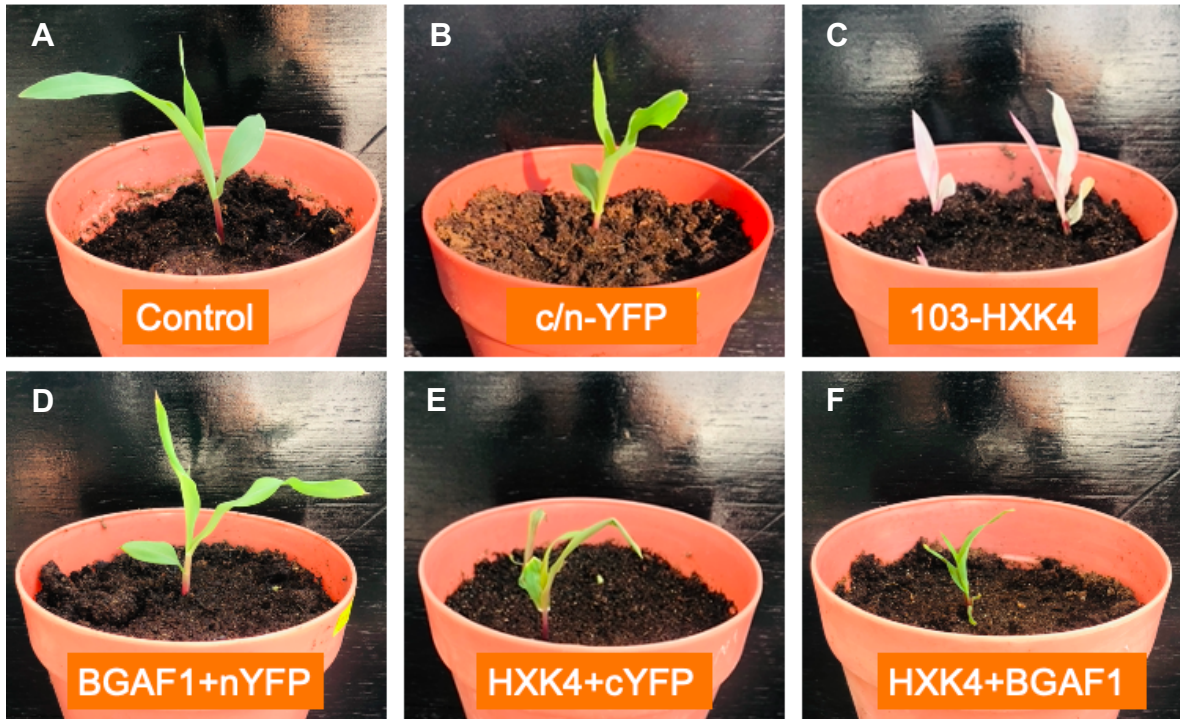


Figura 21. Efecto de la co-infiltración de pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP en el fenotipo de las hojas de maíz de 4 semanas de crecimiento.

Se observan los fenotipos de las plantas de maíz que fueron agroinfiltradas con los vectores: **A.** Control de infiltración. **B.** YFP (pUBN-cYFP y pUBC-nYFP) **C.** pEG103-HXK4. **D.** pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-nYFP **E.** pUBC-HXK4-nYFP y pUBN-cYFP **F.** BiFC (pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4-nYFP). Las plántulas B y D son muy parecidas entre sí y el fenotipo es idéntico al control de infiltración. Experimento representativo, n= 3.

La presencia de los transcritos para la ZmHXK4 y ZmBGAF1 en las plantas agroinfiltradas se corroboró mediante PCR punto final (Figura 22). Además se encontró que a pesar de que el aumento en los transcritos para la ZmHXK4 no son tan grandes como los observados para ZmBGAF1, las plantas que expresan más ZmHXK4 presentan cambios en su fenotipo (Figura 21C, E y F).

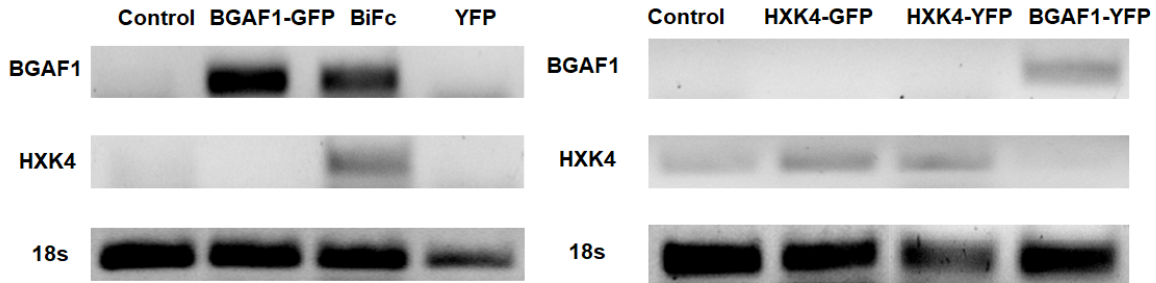


Figura 22. Niveles de los transcritos de *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* en las plantas que se infiltraron para expresar a ambas proteínas solas o en conjunto.

Se muestra la separación de los productos de PCR (30 ciclos) en un gel de agarosa al 0.7 % teñido con bromuro de etidio. El control fueron plantas no infiltradas, en los carriles se indican los genes que se espera expresen. Se marcó como BiFc a las plantas que fueron infiltradas con pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP. El carril de YFP corresponde a aquellas plantas infiltradas con pUBN-cYFP y pUBC-nYFP. Como control de carga se utilizó el *Zm18s*. Se observó que el nivel de expresión de ambos transcritos es bajo en las plantas control y que aumentó en las plantas agroinfiltradas de acuerdo a lo esperado.

Análisis de la interacción *in vitro* de *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* en maíz

Para determinar si *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* están interaccionando *in vivo*, las hojas de las plantas de maíz agroinfiltradas con los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP y que expresan ambas proteínas fueron cortadas transversalmente y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia. En estas hojas se observan puntos y manchas de coloración amarilla utilizando el filtro azul del microscopio. En las hojas no infiltradas no se observó la coloración amarilla. Lo que sugiere que las proteínas recombinantes se están complementando sugeriendo de que *ZmHXK4* y *ZmBGAF1* están interaccionando (Figura 23).

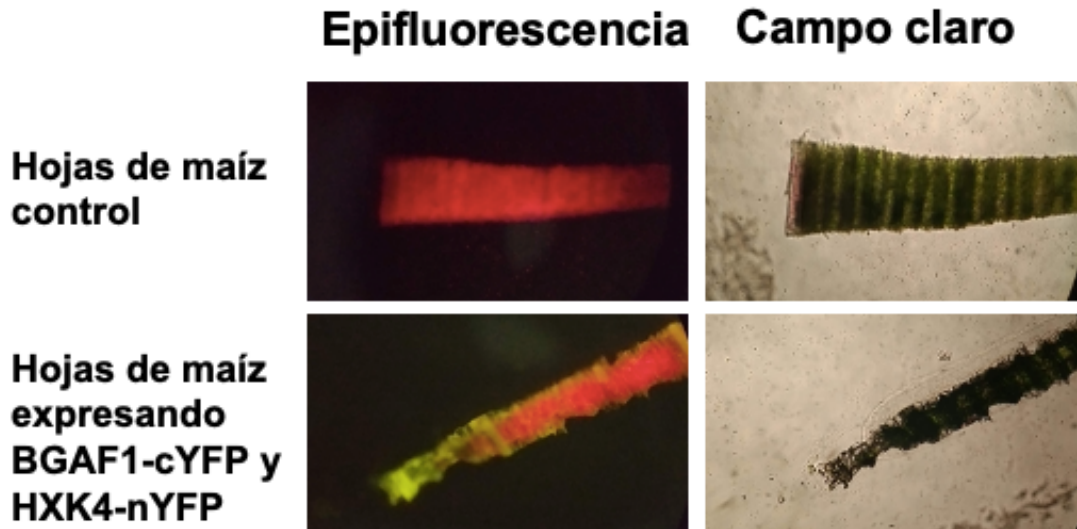


Figura 23. Efecto de la co-infiltración de los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP en la fluorescencia de las hojas de maíz.

Las imágenes fueron tomadas de hojas de maíz a las 2 semanas de crecimiento, con el objetivo de 10 X. Hoja de maíz control sin infiltración, se observa bajo el filtro azul del microscopio de epifluorescencia, la fluorescencia emitida es la intrínseca de la célula. Hoja de maíz agroinfiltrada por el protocolo de vacío, con los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP, se observa una coloración amarilla bajo el filtro azul del microscopio de epifluorescencia.

Para visualizar la fluorescencia de manera intracelular, se obtuvieron protoplastos de las hojas producto de los diferentes tratamientos. En las plantas control, es decir aquellas que no fueron infiltradas se observó una coloración roja que corresponde a la fluorescencia intrínseca de la clorofila (Figura 24). Mientras que en los protoplastos de las hojas de maíz que provenían de semillas agroinfiltradas con ambos vectores, pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP, es evidente la presencia de puntos con fluorescencia amarilla en los protoplastos, que podrían ser productos de la complementación de la fluorescencia y por tanto de la interacción *in vivo* de ZmBGAF1 y ZmHXK4.

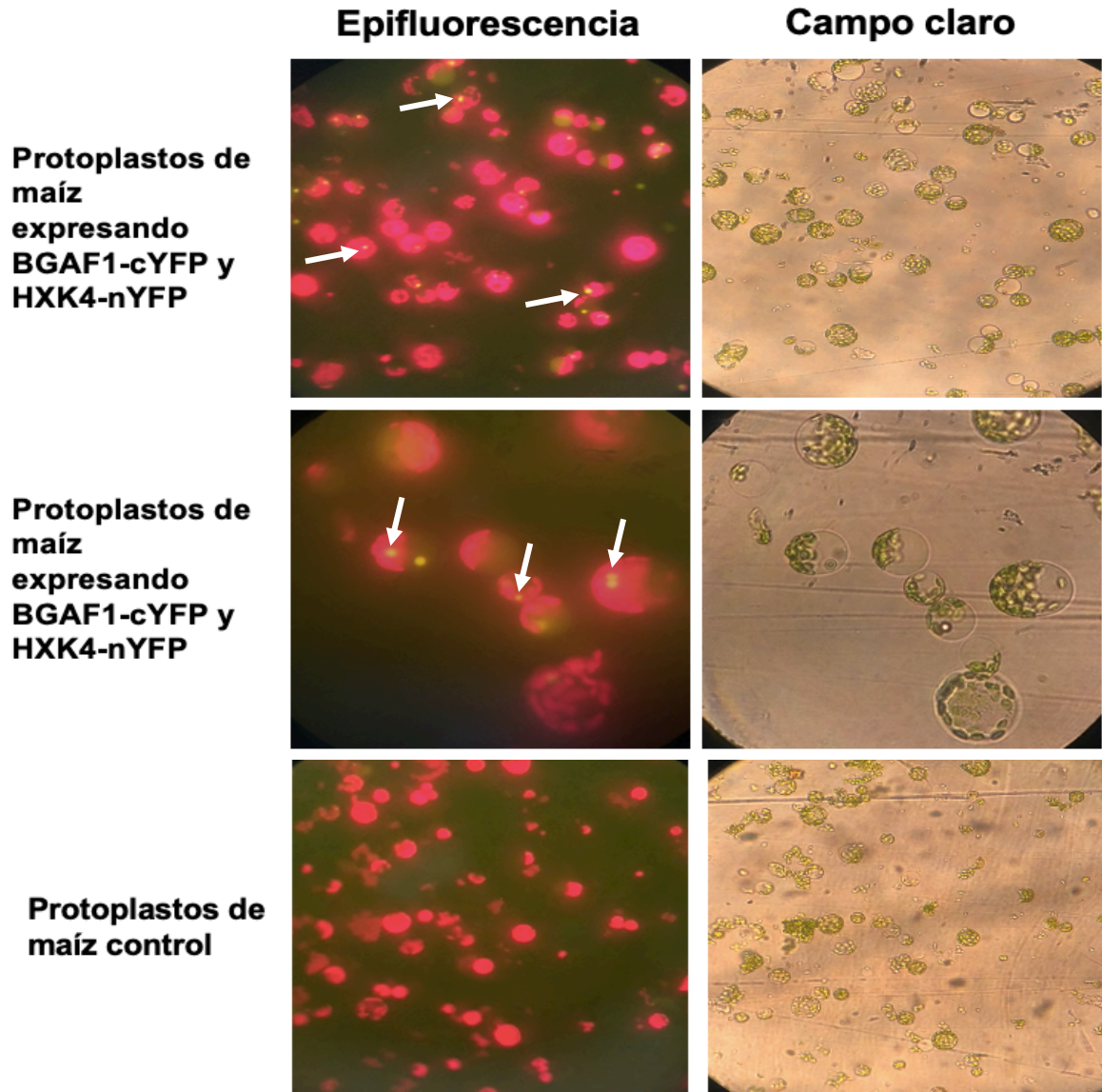


Figura 24. Observación en microscopio de epifluorescencia de protoplastos de maíz objetivo 40X.

Los protoplastos fueron obtenidos a partir de plantas de maíz a las 6 semanas de crecimiento, de semillas sin infiltrar (control) o infiltradas por el protocolo de vacío con las cepas de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores pUBN-BGAF1-cYFP y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP. Las dos imágenes mostradas en la parte superior y las dos de abajo corresponden a los campos observados con el objetivo 40X, mientras que las dos figuras intermedias corresponden a los campos observados con el objetivo 100X. Se observa la fluorescencia emitida por la YFP bajo el filtro azul del microscopio. Las flechas indican los puntos de mayor fluorescencia.

Para determinar la especificidad de la reacción de BiFC se co-infiltraron a las células con los vectores como sigue: pUBN-BGAF1-cYFP con pUBC-nYFP, y pUBC-HXK4 Δ 30-nYFP con pUBN-cYFP. Se encontró fluorescencia en los protoplastos, la señal de la fluorescencia de la clorofila se ve opacada por la fluorescencia amarilla producto de la expresión conjunta de los vectores que codifican para las versiones truncas de la YFP, la señal se observa dispersa en todo el protoplasto (Figura 25) y no en puntos como se observó cuando se expresaron ZmBGAF1 y ZmHXK4 en conjunto (Figura 24). Aún es necesario contar con un control en el que se tenga a una proteína que no interaccione con la ZmHXK4 o ZmBGAF1 o mutantes de ambas proteínas para corroborar que efectivamente ocurre una interacción específica.

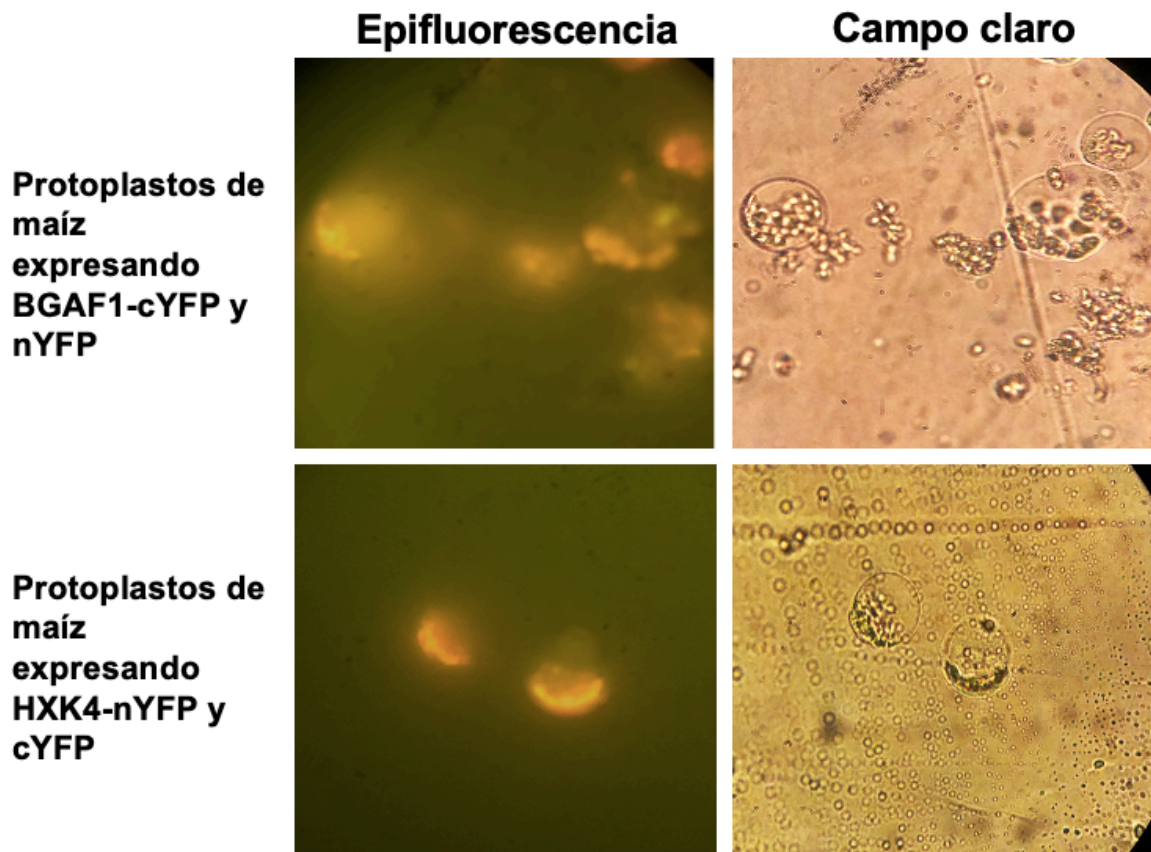


Figura 25. Fluorescencia de YFP no específica en protoplasto.

Los protoplastos fueron obtenidos a partir de plantas de maíz a las 6 semanas de crecimiento, se observa con el objetivo de 40 X. Las figuras superiores corresponden a aquellos que expresan ZmBGAF1-cYFP y nYFP, mientras que las inferiores corresponden a ZmHXK4 Δ 30-nYFP y cYFP. La señal de fluorescencia observada es difusa y parece estar en el citosol.

Los resultados indican que la técnica de infiltración por vacío de semillas de maíz, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con vectores de expresión en planta, permite la expresión de la proteína recombinante aún a las 6 semanas posterior a la infiltración. Sin embargo, a pesar de que se observan puntos discretos de la emisión de la fluorescencia en aquellos protoplastos coexpresan ZmBGAF1 y ZmHXK4 unidos a la mitad de la YFP cada uno, todavía no es posible asegurar que la interacción in vivo ocurre ya que se necesitan más controles, aun cuando las plantas que expresan ambas proteínas presentan un fenotipo distinto a las plantas control.

Adicionalmente, se observaron bajo el microscopio a los protoplastos de las hojas de las plantas que se infiltraron con pEG103-HXK4 Δ 30, las cuales expresan a la ZmHXK4 Δ 30 unida a GFP y que presentaban hojas de coloración blanca. Sin embargo, la mayoría de los protoplastos no conservaron su forma, se obtuvieron pocos y la mayoría carece de cloroplastos, por lo que solo se logran observar en campo claro (Anexo 6).

DISCUSIÓN.

Los niveles de transcritos para ZmH XK4 y ZmBGAF1 aumentan en las plantas de maíz con la señal de MeJA.

Las plantas han desarrollado dos mecanismos principales para contender de manera exitosa contra los patógenos. La primera es una respuesta general ante cualquier patógeno y ocurre tras la percepción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por un grupo de receptores localizados en la célula vegetal, lo cual induce la respuesta PTI (pattern-triggered immunity), en la que se induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el reforzamiento de la pared celular a través de incrementar los depósitos de callosa en el sitio de infección. Debido a que los patógenos secretan una gran cantidad y variedad de efectores hacia la planta, algunos de estos pueden interferir con la respuesta PTI. Por lo anterior, la planta tiene un segundo mecanismo de defensa, reconoce intracelularmente los efectores del patógeno a través de proteínas que tienen repetidos ricos en leucina (NLR, nucleotide binding-site leucine-rich repeat), resultando en la inmunidad inducida por efector o ETI. La ETI es una respuesta acelerada y amplificada de la PTI que resulta en la respuesta hipersensible de muerte celular en el sitio de la infección para evitar la propagación de la infección (Wang *et al.*, 2016; Han, 2019).

Durante la ETI se producen señales móviles que actúan como segundos mensajeros como SA, etileno y JA que son transportados a tejidos no infectados. SA activa su propia biosíntesis ante la presencia de patógenos biótrofos, mientras que etileno y JA son producidos en respuesta a heridas o bien ante patógenos necrótrofos (Pieterse *et al.*, 2009). Aunque en algunos casos las respuestas pueden ser simultáneas o más complejas (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Han, 2019).

En este trabajo se encontró que MeJA, una de las formas más activas del JA y que también es producida en plantas (Yan *et al.*, 2011), es capaz de inducir la expresión tanto de la *ZmH XK4* como de *ZmBGAF1* en los coleóptilos de maíz. *ZmBGAF1* es una proteína modular, que tiene un dominio que pertenece a la familia de proteínas

inducidas por JA (Blanchard *et al.*, 2000), por lo que se esperaba que aumentara su expresión. Mientras que la inducción de ZmHXX4 también era esperada debido a que en los ensayos de pull-down que fueron antecedente a este trabajo, predecían la interacción entre la ZmHXX4 y ZmBGAF1 solo cuando el tejido se encontraba infectado con un hongo del género *Fusarium*, que puede inducir la producción de JA. El aumento en los transcritos en ZmHXX4 podrían llevar a tener un incremento en los niveles de la proteína aumentando las posibilidades de interacción entre ZmHXX4 y ZmBGAF1.

Los hongos del género *Fusarium* son hemibiótrofos y son capaces de inducir la respuesta de defensa de la planta a través de las vías del SA y JA, dependiendo de su estado de desarrollo en la planta. En este trabajo se utilizó a *F. verticillioides*, que es uno de los principales hongos patógenos del maíz, el cual produce la pudrición de la planta a nivel de las hojas y tallos. El hongo produce diversas toxinas, pero de ellas se destacan las fumonisinas, no solo porque son las que produce en altas concentraciones, sino también por los efectos sobre diferentes enzimas y su relación con enfermedades en animales y humanos (Wan Norhasima *et al.*, 2009; Rutherford *et al.*, 2002; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014; Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2020).

Debido a que se ha planteado que los hongos del género *Fusarium* pueden presentar una virulencia distinta debido a su capacidad de producir fumonisinas, en este trabajo se usaron dos cepas que son capaces de producir concentraciones muy distintas de una de las fumonisinas que produce el hongo, la FB1, para determinar si tenían un efecto sobre los niveles de los transcritos de ZmHXX4 y ZmBGAF1. Se usaron las cepas *F. verticillioides* MY3 y MY5, que tienen la capacidad de producir una alta (1,699 $\mu\text{g/g}$) y una baja concentración de FB1 (1.5 $\mu\text{g/g}$), respectivamente (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005). La cepa MY3 activó la vía de defensa del SA (Shoresh *et al.*, 2005; Pieterse y Van Loon 1999), ya que incrementó los niveles de los transcritos para PAL, mientras que la cepa MY5 activó la vía del JA a través de la activación de la transcripción de AOS, el gen que codifica para la aleno óxido

sintasa y que permite que los productos de la lipoxigenasa se dirijan principalmente a la síntesis de JA, ya que hay otras 6 vías compitiendo por estos sustratos (Yan *et al.*, 2011).

A pesar de que ambos patógenos llevan a una respuesta distinta en las vías de defensa, ambos hongos redujeron la expresión de ZmBGAF1, contrario al efecto del MeJA. ZmBGAF1 como ya se ha mencionado es una proteína modular, contiene en el amino terminal un dominio de respuesta a patógenos, también denominado dirigente, mientras que en el carboxilo terminal tiene un dominio de lectina relacionado a las jacalinas. La mayoría de las lectinas, se producen de manera constitutiva y en grandes cantidades en semillas y algunos tejidos vegetales. Las lectinas generalmente se encuentran en las vacuolas, aunque pueden encontrarse en citosol o en la pared celular. Hay tres diferentes formas en las que las lectinas pueden interaccionar con moléculas fuera de la célula. Primero cuando las semillas secas son embebidas en agua, las membranas cambian de un estado muy ordenado y cristalino a un estado de gel, en la transición hay pérdida de agua y algunos solutos, las proteínas vacuolares en especial las lectinas se liberan en el agua en el que se embeben, lo cual lleva a que se encuentren en la zona cercana a la semilla y que pueda interactuar con patógenos potenciales. Segundo, las lectinas se liberan cuando las semillas o los tejidos vegetales son dañados por los patógenos o predadores. Las lectinas podrían entrar en contacto con las glicoproteínas que se encuentran en el tracto intestinal de los predadores, afectando la absorción de nutrientes. Tercero, la presencia de hifas creciendo en los tejidos de la planta pueden llevar a romper la célula y los diferentes compartimentos subcelulares, causando que las lectinas vacuolares se liberen e inhiban el crecimiento posterior de las hifas (Chrispeels y Raikhel, 1991).

La disminución de la expresión de la ZmBGAF1 por parte de la infección con cualquiera de las dos cepas de *Fusarium* podría deberse a que el hongo se encuentra en el inicio del proceso de la infección y las lectinas que originalmente tiene la semilla son suficientes para contender con la infección en esas primeras

etapas y ya que se conoce que durante el proceso de la germinación las lectinas son degradadas para utilizar ese carbono y nitrógeno para la síntesis de otros componentes celulares, su transcripción podría mantenerse o reducirse (Chrispeels y Raikhel, 1991). Adicionalmente, es probable que la cantidad de jasmonatos que se hayan producido en los tejidos infectados con la cepa MY5 sean todavía bajos para inducir la expresión de ZmBGAF1. Es necesario determinar la concentración de MeJA mínima para inducir la producción de ZmBGAF1 y la etapa de la infección de *F. verticillioides* en el que se produce más ZmBGAF1.

Por otra parte, independientemente de la cepa de *F. verticillioides* que se utilizó para infectar a las semillas, se encontró un aumento en los niveles de transcritos para ZmHXK4, aunque fue menor al compararlo con la expresión inducida con 50 μ M MeJA. Plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan AtHXK1 y 2 son más resistentes al hongo *Alternaria brassicicola*, observándose que se reduce su propagación y la muerte celular causada por el patógeno. También se observó que en estas plantas se reducían las unidades formadoras de colonia de *Pseudomonas syringae* y que la bacteria induce la expresión de la proteína relacionada con la patogénesis 1 o PR1, la cual es inducida por SA (Sarowar *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2012). Esto sugiere que el aumento en la expresión de la HXK responde a señales de estrés biótico.

Arabidopsis thaliana produce moléculas de glucosinolato alifático, las cuales en su forma activa son tóxicas para algunas plagas o patógenos, se ha demostrado que la biosíntesis de estos glucosinolatos alifáticos depende de la señalización por AtHXK1 a través de los factores de transcripción MYB, siendo MYB29, el que juega un papel importante en respuesta al JA y SA, mientras que MYB28 es vital en la señalización de la HXK ante la abundancia de glucosa (Miao *et al.*, 2013; Hirai *et al.*, 2007).

En animales, el MeJA tiene un efecto antitumoral, encontrándose que el MeJA rompe la interacción de la HXK2 de humano con VDAC en la mitocondria,

provocando la reducción del potencial de membrana y por ende la liberación del citocromo C y el factor inhibidor de la apoptosis, trayendo como consecuencia la apoptosis intrínseca (Li *et al.*, 2017). Sin embargo, no hay estudios previos en planta que relacionen directamente al JA y el efecto en la expresión de la HXK, ni tampoco sobre un posible cambio de localización subcelular de la HXK y que sería interesante de explorar puesto que se ha documentado en *Arabidopsis*, arroz y maíz que una HXK mitocondrial es capaz de encontrarse en el núcleo y efectuar una función moonlighting, aunque se desconoce el mecanismo de translocación al núcleo. (Cho *et al.*, 2006; Hernández-Loyola, 2019).

Para explicar el efecto del MeJA en la expresión de *ZmBGAF1* (GRMZM2G172204) y *ZmHXK4* (GRMZM2G058745) se buscaron motivos reguladores en ambas secuencias (Figura 26, Anexo 7). Se encontraron varios motivos que están relacionados con la respuesta a estrés de tipo biótico, por ejemplo, los motivos G-box (CACGTG), T-box (ACTTTG) y SORLIP (GCCAC) en *ZmHXK4*, quienes tienen una influencia positiva en la expresión de los genes que codifican para la síntesis de JA y los implicados en las respuestas al SA y al etileno y que a su vez impactan de manera negativa en la actividad fotosintética (Bilgin *et al.*, 2010). La secuencia TGA, que ha sido señalada como un regulador maestro de la SAR, controla la expresión de genes PR (Idrovo-Espin *et al.*, 2012). La secuencia RAV1-B que está implicada en la regulación debida a auxinas y a SA (Yamashi *et al.*, 2004). La presencia de estas secuencias sugiere que *ZmHXK4* es parte de las respuestas de la planta al estrés biótico, siendo susceptible tanto a la regulación por SA y JA, lo que explicaría el aumento en transcritos en tejidos infectados tanto con la cepa MY3 como la MY5, la primera tiene activa la vía del SA y la segunda del JA.

Adicionalmente, se encontró que tanto *ZmHXK4* como *ZmBGAF1* presentan una caja W-Box y WRKY71OS cuyas secuencias están descritas como sitios de unión para las proteínas WRKY, y reguladas por la familia MYC, proteínas que regulan la expresión de genes de respuesta al ataque por patógenos y de estímulo por JA (Eulgem *et al.*, 1999; Boter *et al.*, 2004). Desconocemos si efectivamente están dos

proteínas participan en la regulación de la expresión tanto de *ZmBGAF1* como de *ZmHXK4*, pero el aumento de transcritos para ambos genes en presencia de MeJA si ocurre, por lo que es necesario llevar a cabo un análisis más profundo para determinar si efectivamente esas proteínas están involucradas en la regulación de la expresión tanto de *ZmBAF1* como de *ZmHXK4*.

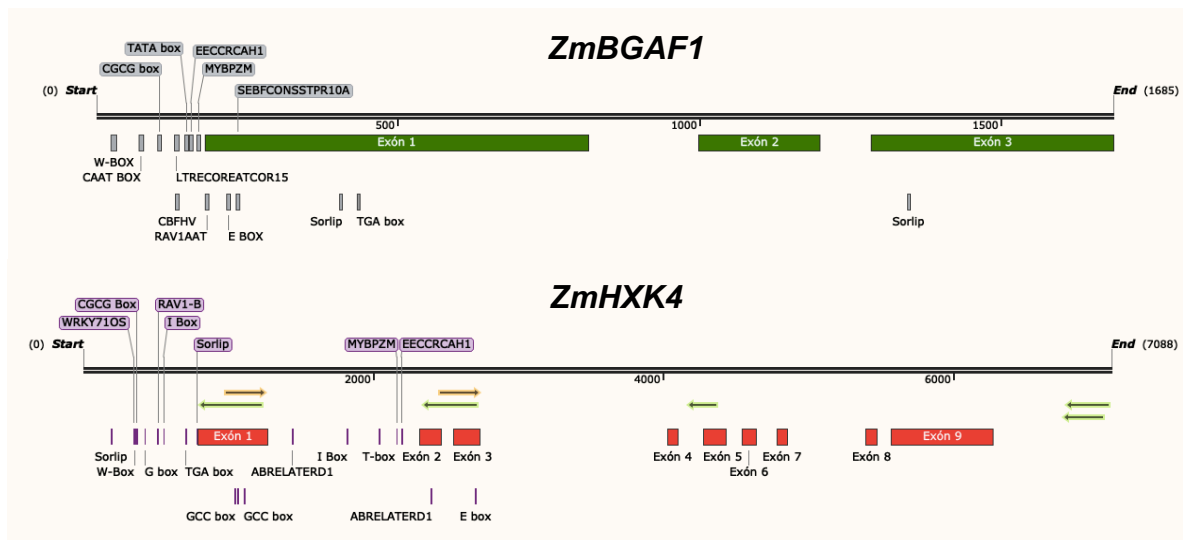


Figura 26. Ubicación de las secuencias promotoras en *ZmBGAF1* y *ZmHXK4*.

Otros elementos encontrados en ambas secuencias están relacionados con la regulación de la expresión en estrés de tipo abiótico, como CBFHV, que en cebada permite la unión a factores de transcripción tipo AP2, implicados en la activación de genes en respuesta a bajas temperaturas (Xue, 2002) la secuencia E, que está presente en los genes rd22 en respuesta a la deshidratación y represión de genes CBF ante estímulos de bajas temperaturas (Hartmann *et al.*, 2005). LTRECOREATCOR15 involucrada en la respuesta de genes de respuesta a estrés por frío y sequía (Kim *et al.*, 2002) y CAAT que forma parte del promotor de la subunidad gamma de la ATP sintasa en *Arabidopsis*, regulado por luz, citoquinina y el estado de los plastidios, ambas secuencias reguladoras sólo se encontraron *ZmBGAF1*. Por último, secuencias como la caja I, que está conservada en genes regulados por luz tanto en tomate como en *Arabidopsis*, además de estar presente en la región reguladora de la rbcS (ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa; Giuliano *et al.*,

1988) y la caja T, también encontrada en la transcripción activada por luz (Bilgin *et al.*, 2010), ambas encontradas en ZmHXK4. Un análisis posterior sería necesario para determinar la regulación de la fotosíntesis por la HXK en maíz.

Pese a que el JA está involucrado en las respuestas de defensa de la planta también participa en diversos procesos, en dicotiledóneas participa en el desarrollo, la germinación de las semillas, crecimiento vegetativo, fertilidad, maduración de frutos, senescencia, regulación del ciclo celular y síntesis de antocianinas (Wasternack y Parthier, 1997; Yan *et al.*, 2011). En monocotiledóneas se conoce que se requiere para la determinación del sexo, la iniciación y elongación de los brotes, senescencia de las hojas y pigmentación de tejidos (Yan *et al.*, 2011). Por lo que el JA podría modificar la expresión y la localización de la HXK en otros procesos fisiológicos o distintos a la interacción planta-patógeno.

Si bien se observó el cambio en la expresión de los transcritos para ZmHXK4 y ZmBGAF1, es necesario llevar a cabo diferentes estrategias experimentales para determinar la participación de ambas proteínas, por separado o a través de su interacción para vislumbrar su participación en las respuestas fisiológicas de las plantas, algunas son la producción de mutantes por sobreexpresión o delección y el análisis de la interacción *in vivo* de ambas proteínas.

La sobreexpresión de ZmHXK4 altera el fenotipo de las plantas de maíz.

Una forma de evaluar la participación de ZmHXK4 y ZmBGAF1 en la fisiología de la planta, así como determinar su función es a través de producir plantas sobreexpresoras o por delección. En este trabajo se produjeron plantas sobreexpresoras de diversas versiones de ZmHXK4 y ZmBGAF1 en maíz, utilizando un sistema de agroinfiltración por vacío, que permitió no sólo la expresión transitoria de la proteína, sino observar los efectos de la proteína desde la germinación hasta 6 semanas después del tratamiento. La metodología fue usada con éxito en el silenciamiento de genes en monocotiledóneas, en toda la planta, de forma rápida,

conveniente y eficiente (Zhang *et al.*, 2017), sin embargo, no se había utilizado para la sobreexpresión de genes en el sistema homólogo. La sobreexpresión permite realizar un estudio más profundo de la estructura y función de proteínas, pero además si se realiza en el sistema homólogo reduce la probabilidad de la formación de agregados de las proteínas y provee el sistema adecuado para el procesamiento postraduccional, de ensamble y de interacción con potenciales elementos de contacto o que favorecen la comprensión de la señalización intracelular.

La eficacia de la sobreexpresión de las proteínas de maíz se observó al encontrar los transcritos para ZmHXK4 y ZmBGAF1, así como la emisión de fluorescencia de las versiones unidas a proteína fluorescente, lo que demuestra que el sistema es robusto y que la expresión de las proteínas permite obtener materiales en los que se pueden observar los fenotipos, además fue posible introducir dos vectores recombinantes mediante *Agrobacterium* en una misma semilla, lo cual se traduce en un sistema mucho más simple y rápido para poder evaluar la interacción *in vivo* de proteínas en maíz.

Las plantas sobreexpresoras de ZmHXK4 Δ 30-GFP, mostraron un fenotipo con hojas blancas, con pocos cloroplastos y los protoplastos obtenidos de estas plantas fueron muy sensibles, ya que las preparaciones tenían pocos intactos y no mostraron fluorescencia (Anexo 6). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de AtHXK1 reduce el contenido de clorofila en sus hojas, la tasa fotosintética y la eficiencia cuántica fotoquímica de los centros de reacción del fotosistema II. Además, las plantas transgénicas experimentaron una senescencia rápida, lo que sugiere que la HXK también participa en la regulación de la senescencia (Dai *et al.*, 1999). Cabe mencionar que tanto AtHXK1 y ZmHXK4 son HXKs mitocondriales y que resultados de interacción *in vitro* usando como carnada a ZmHXK4 han permitido encontrar a varias de las proteínas que se conocen interaccionan con la AtHXK1, lo que se sugiere que la ZmHXK4 podría ser el isotipo que más se le parezca en función a AtHXK1, aún cuando en secuencia de aminoácidos ZmHXK9 es la ZmHXK que

presenta una similitud mayor a la de *Arabidopsis* (comunicación personal King-Díaz B y Rodríguez-Saavedra C; Cho *et al.*, 2006; Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Complementación de la fluorescencia bimolecular BiFC entre ZmHXK4 y ZmBGAF1.

La Complementación de la Fluorescencia Bimolecular (BiFC) es una técnica que permite la visualización de la interacción de proteínas *in vivo*, mediante la señal de una molécula capaz de emitir fluorescencia. Los vectores desarrollados por Grefen y su grupo de trabajo en 2010, permiten fusionar a la proteína de estudio, la región amino o carboxilo de la YFP, mientras que a la otra proteína se le fusiona la región complementaria de la YFP, si las proteínas de estudio interaccionan *in vivo*, permite que las regiones de la YFP complementen su estructura y por tanto puedan emitir la fluorescencia. Algunas consideraciones importantes para obtener resultados robustos es el producir las dos quimeras o versiones de la proteína de interés con el fragmento de la YFP es decir en el amino y en el carboxilo de la proteína, considerar hacer mutantes de las proteínas que interactúan para determinar los contactos específicos entre ambas proteínas, fusionar una proteína que no interaccione con uno de los fragmentos de la YFP para usarlo como control negativo (Kerppola, 2008). Es importante destacar que a pesar de que el sistema es bastante robusto, es necesario el uso de microscopía confocal que permita la disminución de la señal no específica emitida por la YFP (Walter *et al.*, 2004).

La señal obtenida del BiFC entre la ZmHXK4 y ZmBGAF1 en protoplastos de maíz, se encontró en puntos discretos dentro de estos, mientras que era difusa e intensa en los controles en donde se infiltraron al mismo tiempo los vectores de cada una de las proteínas unidas al fragmento de YFP y el vector que acarrea sólo al fragmento YFP. Es necesario reducir la alta expresión de las proteínas con los fragmentos YFP para poder asegurar que la interacción de ZmHXK4 y ZmBGAF1 es específica, lo cual se puede lograr reduciendo el tiempo de toma de la muestra después de la transformación, usar un promotor menos fuerte, ya que se usó el

promotor fuerte del virus de la coliflor, o bien utilizar un microscopio confocal que permita reducir la señal del fondo y localizar de manera específica en que compartimento subcelular hay más fluorescencia (Kerppola, 2008).

Tanto en las plantas de *N. benthamiana* y en las hojas de maíz se observó una señal intensa de fluorescencia en las hojas que fueron infiltradas con los vectores de cada proteína fusionada a los fragmentos de YFP, aunque debido a que también se observó fluorescencia en los controles, aunque difusa se hace necesario hacer los controles de reducción de la producción de proteína recombinante tanto en las transformaciones realizadas con las proteínas unidas a un solo fragmento de YFP como cuando se realiza la interacción BiFC, lo cual nos permitirá demostrar de manera inequívoca que ambas proteínas interaccionan.

El fenotipo que se observó de las plantas que expresaban tanto a ZmBGAF1 y ZmHXK4 fueron distintos al control, en las Nicotianas las hojas perdieron agua y se observaron crujientes al tacto, mientras que en el caso de las de maíz las hojas se enrollaban en los bordes, enrollamiento que también se ha descrito como un síntoma de falta de agua. Efecto opuesto al que ocasiona la sobreexpresión de AtHXK1 en las plantas de *Arabidopsis*, el cierre de los estomas que reduce la pérdida de agua. De manera paralela las plantas de *Arabidopsis* presentaron un aumento en la transcripción de los genes de la biosíntesis de ácido abscísico que tiene influencia en el cierre de los estomas (Kelly *et al.*, 2012, Kelly *et al.*, 2013, Lugassi *et al.*, 2015). Es necesario un análisis más profundo para determinar si hubo cierre estomatal, si ABA participó en este efecto y si ZmBGAF1 tiene un efecto en regular la actividad de la HXK de maíz.

A pesar de que se necesitan más controles, se observó que las plantas de maíz que expresan de manera conjunta a ZmBGAF1 y ZmHXK4 tienen claramente un fenotipo distinto a las plantas control y que la posible interacción de estas proteínas tiene una relevancia en la fisiología de la planta. Es necesario realizar estudios posteriores para claramente establecer la interacción de ambas proteínas, así como

determinar cuál es la función del complejo, en donde se localiza y los eventos moleculares que desatan para afectar la respuesta celular de la planta.

CONCLUSIONES.

La transcripción de ZmHXK4 responde ante el estrés biótico y su sobreexpresión produce alteraciones en la fisiología de la planta, pérdida de clorofila y muerte celular.

La expresión de ZmBGAF1 aumenta cuando los coleóptilos se tratan con MeJA pero no aumenta cuando se infectan con cualquier cepa de *F. verticilloides*.

Aunque no se logró demostrar de manera inequívoca la interacción de ZmBGAF1 y ZmHXK4, la co-expresión de ambas proteínas tanto en plantas de *Nicotiana* como de Maíz, genera un fenotipo de pérdida de turgencia y muerte celular.

PERSPECTIVAS.

Realizar los controles necesarios para asegurar que la interacción de ZmHXK4 y ZmBGAF1 ocurre.

Producir plantas de HXK por delección y determinar el papel de la interacción ZmBGAF1 con la HXK.

Evaluar los cambios en la expresión de la ZmHXK4 ante señales de estrés por patógenos biótrosos, utilizando SA.

Evaluar los mecanismos celulares que involucran al JA con las HXKs mitocondriales, determinar si es esta fitohormona la encargada de escindir la unión mitocondrial de manera similar a su efecto en células animales.

Determinar la importancia que tienen las plantas de maíz silenciadas con ZmHXK4 ante la respuesta al estrés y su crecimiento.

REFERENCIAS

- Aguilera-Alvarado GP, Guevara-García AA, Estrada Antolín SA, Sánchez-Nieto S. 2019. Biochemical properties and subcellular localization of six members of the HXK family in maize and its metabolic contribution to embryo germination. *BMC Plant Biology* 19 (1): 27. doi: 10.1186/s12870-018-1605-x.
- Aguilera-Alvarado GP, Sánchez-Nieto S. 2017. Plant Hexokinases are Multifaceted Proteins. *Plant & Cell Physiology* 58 (7):1151-1160.
- Alcántar-Aguirre FC, Chagolla A, Tiessen A, Délano JP, González de la Vara LE, 2013. ATP produced by oxidative phosphorylation is channeled toward hexokinase bound to mitochondrial porin (VDAC) in beetroots (*Beta vulgaris*). *Planta* 237: 1571-1583.
- Baker MA, Orlandi EW. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* 33: 299-321.
- Barrón D. 1997. RNAgents total RNA isolation system. *Promega Notes Magazine.* 61, 33.
- Behlke J, Heidrich K, Naumann M, Müller EC, Otto A, Reuter R y Kriegel T. 1998. Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of oligomeric structure by in vivo phosphorylation at serine-14. *Biochemistry.* 37:11989–11995.
- Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR, DeLucia EH. 2010. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes; *Wiley Blackwell Publishing, Inc; Plant, Cell and Environment*; 33; 10; 10; 1597-1613
- Blanchard DJ, Muzaffer C, Chen J, Esen A. 2000. A specific beta-glucosidase-aggregating factor is responsible for the beta-glucosidase null phenotype in maize. *Plant Physiol* 122: 563-572.
- Blanchard DJ, Muzaffer., Chen J, Esen A. 2001. Identification of β -glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on maize β -glucosidase. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 11895-11901.
- Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S. 2004. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes y Dev.* 18: 1577-1591.

- Boyle B, Brisson N. 2001. Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell* 13: 2525-2537.
- Burgos-Palacios A. 2019. Producción y purificación de BGAF1 y su interacción con la HXK4 de *Zea mays*. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
- Carvente García RD. 2012. Papel de las hormonas ácido salicílico, ácido abscísico y metil-jasmonato, en la regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos de embriones de maíz. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
- Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, y Dent M. (2013). Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Advanced techniques in biology & medicine*, 1 (1), 103.
- Cho J, Ryoo N, Eom JS, Lee DW, Kim HB, Jeong SW, Lee YH, Kwon YK, Cho MH, Bhoo SH, Hahn TR, Park Y, Hwang I, Sheen J, Jeon JS. 2009. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Planta Physiol.* 149: 745-759.
- Cho YH, Yoo SD, Sheen J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127 (3): 579-589.
- Chrispeels MJ y Raikhel NV. 1991 Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.* 3 (1):1-9. doi: 10.1105/tpc.3.1.1. PMID: 1824332; PMCID: PMC159974.
- Christensen SA, Nemchenko A, Park YS, Borrego E, Huang PC, Schmelz EA, Kunze S, Feussner I, Yalpani N, Meeley R, Kolomiets MV. (2014) The novel monocot-specific 9-lipoxygenase ZmLOX12 is required to mount an effective jasmonate-mediated defense against *Fusarium verticillioides* in maize. *27 (11):1263-76.*
- Cicek M, Blandchard D, Bevan DR, Esen A. 2000. The aglycone specificity-determining sites are different in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (maize β -glucosidase) and dhurrinase (sorghum β -glucosidase). *The Journal of Biological Chemistry.* 275 (26), 20002-20011.
- Claeysen E, Rivoal J. 2007. Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* 68 (6): 709-731.

- Creelman R, Mullet J. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355-381.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A y Granot D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. The Plant Cell Jul 1999, 11 (7) 1253-1266; DOI: 10.1105/tpc.11.7.1253
- De la Torre-Hernández ME, Sánchez-Rangel D, Galeana-Sánchez E, Plasencia-de la Parra J. 2014 Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 17(1):77-91.
- Dean JV, Mohammed LA. y Fitzpatrick T. 2005. The formation, vacuolar localization and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. Planta, 221, 287-296.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K y Pikaard CS. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J. Feb; 45(4):616-29. PMID: 16441352.
- Esch L, Schaffrath U. 2017. An Update on jacalin-like lectins and their role in plant defense. Int J Mol Sci 18 (7): 1592.
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE. 1999. Early nuclear events in plant defense signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. EMBO J. 18: 4689-4699.
- Fernández-García P, Peláez R, Herrero P y Moreno F 2012. Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. J. Biol. Chem. 287, 42151–42164.
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N y Dong X (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. Nature. 486 (7402): 228-32.
- García-Valencia LE, Bravo-Alberto CE, Wu HM, Rodríguez-Sotres R, Cheung AY, Cruz-García F. 2017. SIPP, a Novel Mitochondrial Phosphate Carrier, Mediates in Self-Incompatibility. Plant Physiol. 175(3):1105-1120. doi:

- 10.1104/pp.16.01884. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28874520; PMCID: PMC5664454.
- Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, y Cashmore AR. 1988. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (19), 7089–7093.
- Godbole A, Dubey AK, Reddy PS, Udayakumar M y Matthew MK. 2013. Mitochondrial VDAC and hexokinase together modulate programmed cell death. *Protoplasma*. 250:875-884.
- Golbik R, Naumann M, Otto A, Müller E, Behlke J, Reuter R, Hübner G y Kriegel TM. 2001. Regulation of phosphotransferase activity of hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by modification at serine-14. *Biochemistry* 40:1083–1090
- Gómez-Anduro G, Cenicerros-Ojeda EA, Casados-Vázquez LE., Bencivenni C, Sierra-Beltrán A, Murillo-Amador B, Tiessen A. 2011. Genome-wide analysis of the beta-glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). *Plant Molecular Biology* 77 (1-2): 159-183.
- Grefen C, Donald N, Schumacher K y Blatt MR 2010, A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* 64 (2): 355-365.
- Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B, Peterson T. 1994. The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543–553
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. y Gavilanes-Ruíz M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221, 589–596 doi.org/10.1007/s00425-004-1469-1
- Gutiérrez-Nájera NA, Saucedo-García M, Noyola-Martínez L, Vázquez-Vázquez C, Palacios-Bahena S, Carmona-Salazar L, Plasencia J, El-Hafidi M, y Gavilanes-Ruiz M. 2020. Efectos de los esfingolípidos en la membrana plasmática

- producida por la adición de fumonisina B1 a los embriones de maíz. *Plantas* (Basilea, Suiza), 9 (2), 150. doi.org/10.3390/plants9020150
- Guzmán-Chávez F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Guzmán-Chávez F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Han GZ. (2019), Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytol*, 222: 70-83. <https://doi.org/10.1111/nph.15596>
- Hartmann U, Sagasser M, Mehrten F, Stracke R, Weisshaar B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol*. 57: 155-171.
- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa N, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2001, A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 42 (9), 894–899.
- He X, Li L, Xu H, Xi J, Cao X, Xu H, Rong S, Dong Y, Wang C, Chen R, Xu J, Gao X, Xu Z. 2017. A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, OsJRL, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. *Plant Biol (Stuttg)* 19 (2): 257-267.
- Hernández-Loyola A. 2019. Función del dominio amino-terminal en la localización de HXKs en plantas. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H, Nishizawa OI, Shibata D y Saito K. 2007. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 104(15):6478-83
- Hopke J, Donath J, Blechert S, y Boland W. 1994. Herbivore-induced volatiles: The emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea*

- mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. FEBS Letters 352 (2): 146-150.
- Hu DG, Sun CH, Zhang QY, An JP, You CX, Hao YJ, 2016. Glucose sensor MdHXK1 phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple. PLoS Genet 12: e1006273
- Hudson ME. y Quail PH. 2003. Identification of Promoter Motifs Involved in the Network of Phytochrome A-Regulated Gene Expression by Combined Analysis of Genomic Sequence and Microarray Data. Plant Physiology. 133 (4) 1605-1616; DOI: 10.1104/pp.103.030437
- Hwang I, Sheen J. 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. Nature 413: 383-389.
- Idrovo-Espin FM, Peraza-Echeverria S, Fuentes G, Santamaría JM. 2012. In silico cloning and characterization of the TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors subfamily in *Carica papaya*, Plant Physiology and Biochemistry, Volume 54, Pages 113-122, doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.011.
- Jang JC, León P, Zhou L, Sheen J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell 9: 5-19.
- Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T. 1999. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. Nucleic Acids Res 27: 470-478.
- Karve A, Rauh BL, Xia X, Kandasamy M, Meagher RB, Sheen J, Moore B. 2008. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. Planta 228: 411-425.
- Karve R, Lauria M, Virnig A, Xia X, Rauh B, Moore BL. 2010. Evolutionary lineages and functional diversification of plant HXKs. Molecular Plant 3 (2): 334-346.
- Kelly G, David-Schwartz R, Sade N, Moshelion M, Levi A, Alchanatis V, Granot D. (2012) The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. Plant Physiol. 159: 47–51.

- Kelly G, Moshelion M, David-Schwartz R, Halperin O, Wallach R, Attia Z, Belausov E, Granot D. (2013) Hexokinase mediates stomatal closure. *Plant J.* 75: 977–988.
- Kerppola TK. 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys.* (37): 465-487.
- Kim HJ, Kim YK, Park JY, Kim J. 2002. Light signaling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29: 693-704.
- Kim M, Lim JH, Ahn CS, Park K, Kim GT, Kim WT y Pai HS. 2006. Mitochondrial-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell.* 18:2341-2355.
- Kim YM, Heinzl N, Giese JO, Koeber J, Melzer M, Rutten T, Von Wirén N, Sonnewald U, Hajirezaei MR. 2013. A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. *Plant Cell Environ* 36 (7): 1311-27.
- Kittur FS, Lalgondar M, Yu HY, Bevan DR, Esen A. 2007. Maize beta-glucosidase-aggregating factor is a polyspecific jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for beta-glucosidase aggregation. *The Journal of Biological Chemistry* 282(10):7299-311.
- Kurokawa K, Okamoto M, Nakano A. 2014. Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nat Commun* 5: 3653.
- Kusnetsov V. y Oelmüller R. 1999. The Assembly of the CAAT-box Binding Complex at a Photosynthesis Gene Promoter Is Regulated by Light, Cytokinin, and the Stage of the Plastids. *J Biol Chem.* 274: 50. 36009-36014.
- Lannoo N, Van Damme EJ. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci* 5: 397. doi: 10.3389/fpls.2014.00397
- Laredo-Alcalá EI, Martínez H JL, Iliná A, Guillen CL, Hernández FD. 2017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (8): 673-683.
- Li J, Chen K, Wang F, Dai W, Li S, Feng J, Wu L, Liu T, Xu S, Xia Y, Lu J, Zhou Y, Xu L, Guo C. (2017). Methyl jasmonate leads to necrosis and apoptosis in

- hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and represses tumor growth in mice. *Oncotarget*, 8 (28), 45965–45980. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17469>
- Lorenzo O, Solano R. 2005. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 532-540.
- Lugassi N, Kelly G, Fidel L, Yaniv Y, Attia Z, Levi A, Alchanatis V, Moshelion M, Raveh E, Carmi N, Granot D. (2015) Expression of *Arabidopsis* hexokinase in Citrus guard cells controls stomatal aperture and reduces transpiration. *Front. Plant Sci.* 6: 1114.
- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, y Hara-Nishimura I. 2002. An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 1807-1814.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *PNAS* 94 (10): 5473-5477.
- Miao H, Wei J, Zhao Y, Yan H, Sun B, Huang J y Wang Q. 2013. Glucose signaling positively regulates aliphatic glucosinolate biosynthesis. *J Exp Bot.* 64 (4):1097-109.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Chen WH, Yan-Xia L, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, hormonal signaling. *Science* 300 (5617): 332-336.
- Morgado-Martínez LE. 2020. Caracterización funcional de las hexocinasas de maíz en plantas de *arabidopsis* que expresan a ZmHXK4-6 y ZmHXK9. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
- Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2005. Activation of an ER-body-localized β -glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46 (7): 1140-1148
- Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2008;49(6):969-980. doi:10.1093/pcp/pcn075

- Neil S, Desikan R, Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395.
- Nilsson A, Olsson T, Ulfstedt M, Thelander M, Hans R. 2011. Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 11: 32. doi: 10.1186/1471-2229-11-32
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves; Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J Biol Chem*. 279: 55355-55361.
- Norastehnia A, Sjadi RH, Nojavan-Ashari M. 2007. Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in maize (*Zea mays*): Effect on α -amylase activity and ethylen production. *General and applied plant Physiology* 33, 13-23.
- Olsson T, Thelander M, Ronne H. 2003. A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem*. 278: 44439 - 44447.
- Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr*. 2008 Jun;40(3):171-82. doi: 10.1007/s10863-008-9148-8. PMID: 18683036; PMCID: PMC2662512.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29, 45.
- Pieterse C. M. J y Van Loon, L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science*. 4: 52-58.
- Pieterse C. M. J, León-Reyes, A. Van der Ent, S y Van Wees, S. C. M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5: 308-316.
- Qing-Hu M, Wei-Bo Z, Yun-Chao L. 2013. Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. *Biochimie* 95 (2): 359-365.
- Raskin I, Skubatz H, Tang W y Meeuse BJ D. 1990. Salicylic acid levels in thermogenic and non thermogenic plants. *Annals Bot*, 66, 369-373.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M y Jones JD. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev*

- Phytopathol. 49:317-43. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447. PMID: 21663438.
- Roberts DJ y Miyamoyto S. 2015 Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing the autophagy. Cell Death and Differentiation. 22:248-257.
- Rodríguez IP, Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 7, 323-335.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu Rev Plant Biol 57: 675-709.
- Rolland F, Moore B y Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. Plant cell, 14 (suppl) S185-S205.
- Rutherford RS, Van Antwerpen T, Conlong DE, Keeping MG, McFarlane SA, Vogel JL. 2002. Promoting plant health: potential for the use of plant-associated microorganisms in the biological control of pathogens and pests in sugarcane. Proceedings congress of the South African sugar technologists association 76: 289-300.
- Saleh A. y Abdulsattar I. 2019. Review on the Role of Salicylic Acid in Plants. IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.89107. Disponible en: <https://www.intechopen.com/online-first/review-on-the-role-of-salicylic-acid-in-plants>
- Sanchez-Rangel D, San Juan-Badillo A, Plasencia J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticilloides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect the potential toxigenic strains in grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 8565-8571.
- Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. 2012. Fumonisin B1 a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize B-1,3-glucanase activities involved in defense response. Planta 235: 965-978.
- Sarowar S, Lee JY, Ahn ER, Pai HS. 2008. A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. Journal of Plant Biology, 51 (5) 341-346.

- Shoresh M, Tedida I, Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathways in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Sosso D, Luo D, Li QB, Sasse J, Yang J, Gendrot G, Suzuki M, Koch KE, McCarty DR, Chourey PS, Rogowsky PM, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer WB. 2015 Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics* 47, 1489–1493.
- Sun MH, Ma QJ, Hu DG, Zhu XP, You CX, Shu HR, Hao YJ. 2018. The glucose sensor MdHXK1 phosphorylates a tonoplast Na⁺ /H⁺ exchanger to improve salt tolerance. *Plant Physiology* 176 (4): 2977-2990.
- Tachibana K, Nakamura S, Wang H, Iwasaki H, Tachibana K, Maebara K, Cheng L, Hirabayashi J, Narimatsu H. 2006. Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 16 (1): 46–53.
- Tichopad A, Dzidic A. y Pfaffl M.W. 2002 Improving quantitative real-time RT–PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnol. Lett.*, 24, 2053–2057.
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K. y Kudla J. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal*, 40: 428-438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x>
- Wan Norhasima WM, Abdulamir AS, Abu Bakar F, Son R, Norhafniza A. 2009. The Health and Toxic Adverse Effects of Fusarium Fungal Mycotoxin, Fumonisin, on Human Population. *American Journal of Infectious Diseases*. 5 (4); 273-281
- Wang Y, Zhou Z, Gao J, Wu Y, Xia Z, Zhang H y Wu J (2016) The Mechanisms of Maize Resistance to *Fusarium verticillioides* by Comprehensive Analysis of RNA-seq Data. *Front. Plant Sci.* 7:1654. doi: 10.3389/fpls.2016.01654
- Wasternack C y Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expresión. *Trends in Plant Science* 2, 302-307.

- Xiao W, Sheen J, Jang JC 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* 44: 451-454.
- Xue GP. 2002. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic acids research*, 30(15), e77. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf076>.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki, E., Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, y Yokoyama S. 2004. Solution structure of the B3 DNA binding domain of the *Arabidopsis* cold-responsive transcription factor RAV1. *The Plant cell*, 16(12), 3448–3459. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026112>
- Yan Y, Borrego E y Kolomiets MV. 2011. Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses. ItechOpen. DOI: 10.5772/52675. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/jasmonate-biosynthesis-perception-and-function-in-plant-development-and-stress-responses>
- Yang T, Poovaiah BW. 2002. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem*. 277: 45049-45058.
- Yoshioka S, Taniguchi F, Miura K, Inoue T, Yamano T, Fukuzawa H. 2004. The novel MYB transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene *Cah1*, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 16: 1466-1477.
- Yu HY, Kittur FS, Bevan DR, Esen A. 2009. Lysine-81 and threonine-82 on maize β -glucosidase isozyme Glu1 are the key amino acids involved in β -glucosidase aggregating factor binding. *Biochemistry* 48 (13): 2924-2932.
- Zhang J, Yu D, Zhang Y, Liu K, Xu K, Zhang F, Wang J, Tan G, Nie X, Ji Q, Zhao L, y Li C. 2017. Vacuum and Co-cultivation Agroinfiltration of (Germinated) Seeds Results in Tobacco Rattle Virus (TRV) Mediated Whole-Plant Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in Wheat and Maize. *Frontiers in plant science*, 8, 393.

ANEXOS

Anexo 1. Contenido y preparación de las soluciones.

AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES PARA GEL AGAROSA

Amortiguador de corrida TAE 50X (para 1L)

Tris free base pH= 8.0 242 g

Ac. acético glacial 57.1 mL

*EDTA disódico 100 mL

H₂O Destilada c.b.p 1 L

* 0.5 M EDTA: Agregar 186.1 g de sal de EDTA disódico en 800 mL de agua, ajustar el pH a 8 con NaOH, llevar al aforo a 1 L, agitar vigorosamente y esterilizar por autoclave.

Gel de agarosa 0.7 %

Agarosa 0.245 g

*Bromuro de etidio 35 µL

TAE 50X 750 µL

H₂O Destilada c.b.p 35 mL

* Se colocaron 50.0 µL de bromuro de etidio 10 mg/mL y 950 µL de agua estéril.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio SOC (Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito)

Triptona 2 %

Extracto de Levadura 0.5 %

NaCl 10 mM

KCl 2.5 mM

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Glucosa 20 mM

Medio Luria-Bertani o LB

Peptona 140 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl	5 g
H ₂ O	1 L

Agar Papa-Dextrosa PDA 1X.

Agar	15.0 g
Dextrosa	20.0 g
Infusión de papa	4.0 g
pH	5.6 ± 0.2
H ₂ O	1 L

AMORTIGUADORES PARA LA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.

Solución de enzimas 1.*

Celulosa R-10	0.45 g (1.5 %)
Macerozima R-10	0.09 g (0.3 %)
Manitol 1 M	18 mL (0.6 M)
MES pH 5.7 100 mM	3 mL (10 mM)
H ₂ O Destilada.	C.b.p. 30 mL

*La solución debe prepararse el mismo día de su uso.

Solución de enzimas 2.*

Solución de enzimas 1	30 mL
CaCl ₂ 1 mM	300 µL (0.1 mM)
β- Mercaptoetanol	10.71 µL (5 mM)
BSA	0.3 g (0.1%)

*Se filtra a través de un filtro de 0.45 µm

Solución W5.

NaCl 4M	0.77 mL (154 mM)
CaCl ₂ 1M	2.5 mL (125 mM)
KCl 1M	100 µL (5 mM)
MES 100 mM	400 µL (2 mM)
H ₂ O Destilada	C.b.p. 20 mL

Anexo 2. Corroboración de la integridad del RNA.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la expresión de los genes que codifican para ZmBGAF1 y ZmHXK4 se realizó la extracción de RNA de coleoptilos de plantas de maíz VS535 a 72 h de germinación. Se cuantificó y se realizó un gel de agarosa 0.7 % para determinar su integridad (Figura 27). Los RNAs que tenían un barrido no fueron usados para la obtención del cDNA.

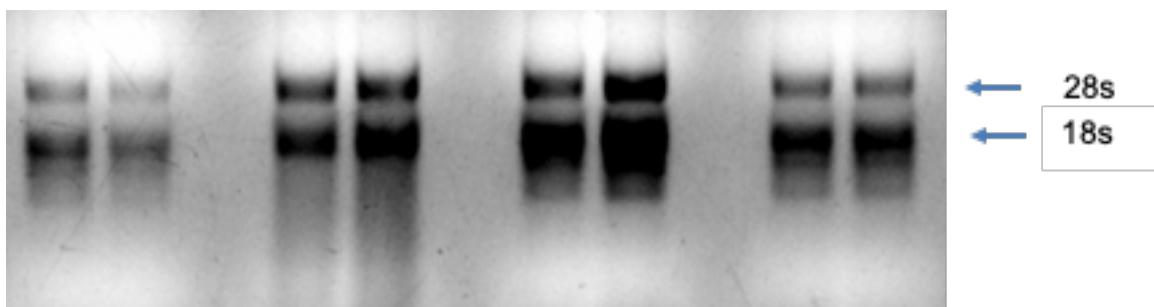


Figura 27. Separación del RNA en un gel de agarosa.

Se obtuvieron de la misma muestra varios tubos con RNA, se separaron los RNA de cada muestra y se buscó observar las 2 bandas que corresponden a los RNAs 28s y 18s.

Anexo 3. Artículos en proceso de publicación.

Rodríguez-Saavedra C, Morgado-Martínez LE, Burgos-Palacios A, King-Díaz B, López-Coria M, Sánchez-Nieto S. 2021. Moonlighting proteins: The case of the hexokinases. *Frontiers in Molecular Biosciences*.

Anexo 4. Análisis *in silico* de las regiones de *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* que son amplificadas por los oligonucleótidos diseñados.

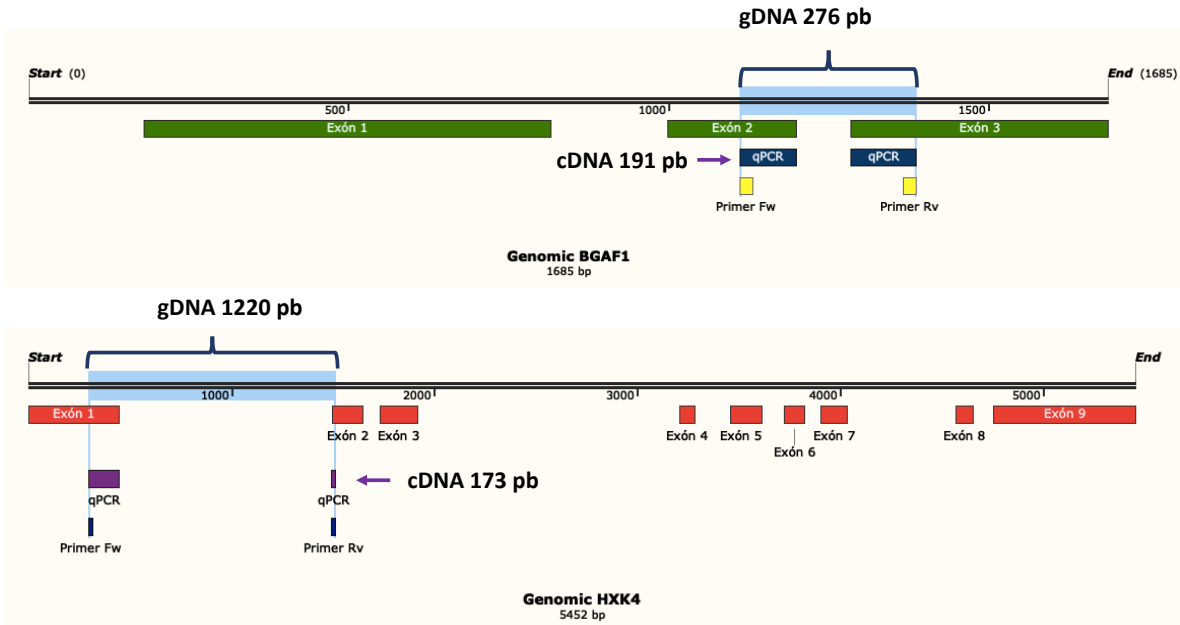


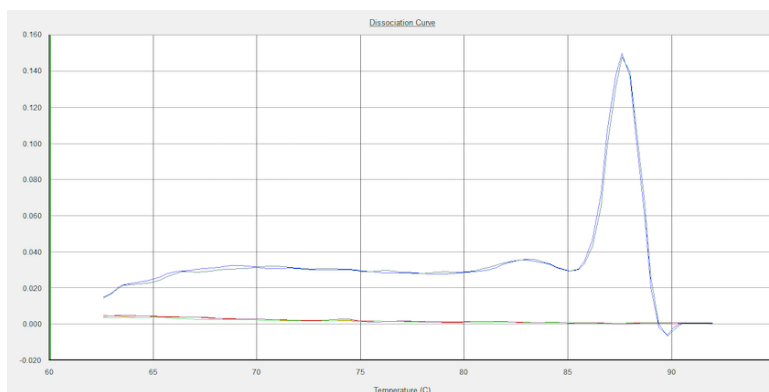
Figura 28. Predicción *in silico* de la hibridación de los oligonucleótidos en *ZmBGAF1* y *ZmHXK4* y la longitud del producto de PCR de cada uno.

La predicción de la longitud de los fragmentos producto de la PCR sobre cDNA y sobre gDNA, como se puede observar en la imagen, la longitud de los fragmentos varía dependiendo del material genético que se use como templado. La predicción se realizó en el programa SnapGene a partir de las secuencias obtenidas en el MaizeGDB para la *ZmBGAF1* (GRMZM2G172204) y la *ZmHXK4* (GRMZM2G058745).

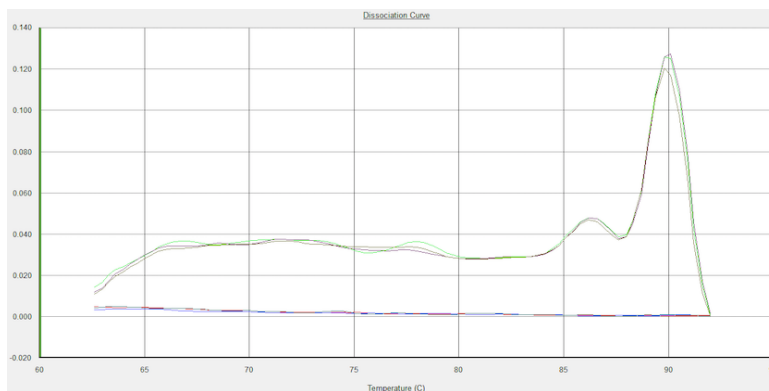
Anexo 5. Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos.

Se diseñaron oligonucleótidos para determinar la expresión de *ZmBGAF1*, *ZmHXK4* (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019) y *Zm18s* empleados en (Sosso *et al.*, 2015) (Figura 28). Para evaluar su especificidad y que no forman dímeros a temperaturas de fusión menores a 80 °C, se realizó la amplificación y luego la curva de disociación del producto amplificado, observando un pico de amplificación.

ZmBGAF1



ZmHXK4



Zm18s

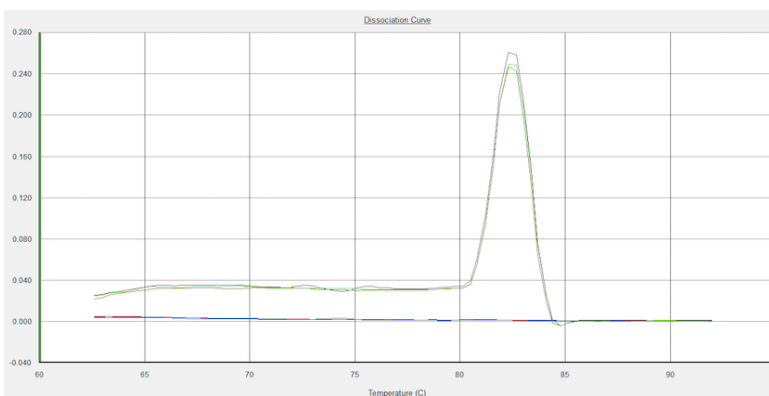


Figura 29. Curvas de disociación de los productos amplificados *ZmBGAF1*, *ZmHXK4* y *Zm18s*.

Anexo 6. Visualización de la fluorescencia de los protoplastos de hojas de maíz que expresan a la ZmHXK4 Δ 30-GFP

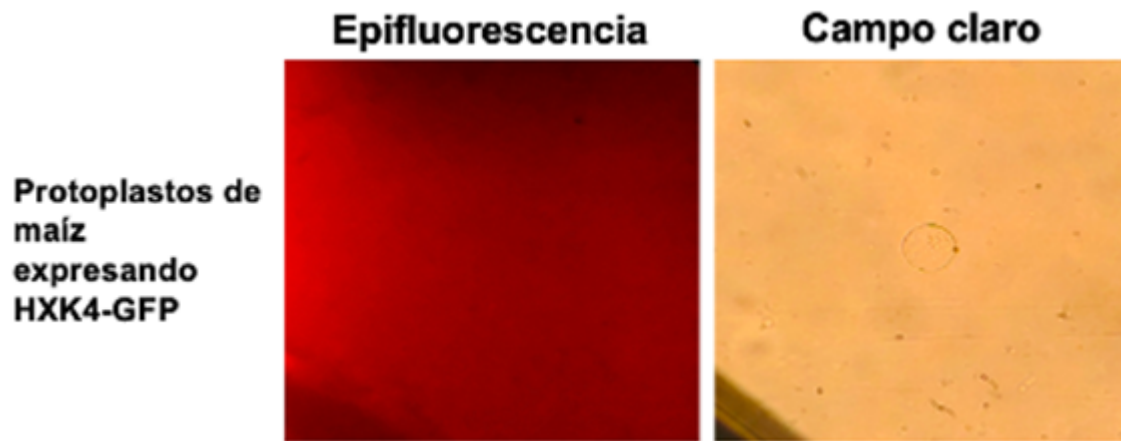


Figura 30. Fluorescencia de los protoplastos de maíz que expresan a la ZmHXK4 Δ 30 unida a GFP.

Los protoplastos fueron obtenidos a partir de plantas de maíz a las 6 semanas de crecimiento, se observa con el objetivo de 40 X. La fluorescencia se observó utilizando el filtro azul.

Anexo 7 Secuencias promotoras.

Tabla 4. Motivos en secuencias promotoras, su función y ubicación en *ZmBGAF1* y *ZmHXK4*.

Gen		Nombre	Secuencia	Función.	Referencia
<i>ZmBGAF1</i>	<i>ZmHXK4</i>				
-232	-617	W-Box	GACTGACCT	Sitio de unión del factor NtWRKYs que induce la expresión de genes en respuesta a daño en hojas de tabaco.	Nishiuchi <i>et al.</i> , 2004
-233, 176	-623	WRKY71OS	TGAC	Sitio de unión de factores de transcripción tipo WRKY, los cuales inducen la expresión de genes en respuesta a ataque por patógenos.	Eulgem <i>et al.</i> , 1999
-	-548	G Box	CACGTG	Secuencia regulada por la proteína MYC, que permite la respuesta a estímulo por Jasmonatos.	Boter <i>et al.</i> , 2004
-185	-	CAAT box	CAATCAAT	En Arabidopsis se encontró este elemento cis como parte del promotor de la subunidad gamma de la ATP sintasa, que está regulado por la luz, citoquinina y el estado de los plastidios.	Kusnetsov <i>et al.</i> , 1999
-154	-605	CGCG box	CCGCGC	Se ha encontrado en genes de respuesta a factores bióticos y abióticos. Se ha descubierto que este elemento cis es reconocido por proteínas llamadas AtSR, que cuentan con un dominio de unión a calmodulina, por lo que se ha propuesto que las AtSR pueden ser uno de los centros iniciadores de la cascada de señalización por respuesta a estímulos externos.	Yang <i>et al.</i> , 2002
-125	93	CBFHV	GCCGAC	Un posible sitio de unión a un factor de transcripción tipo AP2. En cebada activa genes en respuesta a bajas temperaturas.	Xue, 2002
-102	1,224	EECCRCAH1	GAGTTGC	Sitio de unión a un factor de transcripción tipo Myb, en algas este factor regula la expresión de genes inducibles a bajas concentraciones de CO ₂ .	Yoshioka <i>et al.</i> , 2004
-89	1,190	MYBPZM	CCTACC	Posible sitio de unión de un factor de transcripción a un homólogo de Myb en maíz, regula la expresión de genes involucrados directamente en la biosíntesis de flavonoides, aunque solo en la presencia de un co-activador, una proteína tipo bHLH.	Grotewold <i>et al.</i> , 1994
-75	-	RAV1AAT	CACAAC	Es un posible sitio de unión del factor de transcripción RAV1 encontrado en Arabidopsis, el cual está compuesto por dos dominios, cada uno puede reconocer un motivo diferente por lo que puede regular un set de genes.	Kagaya <i>et al.</i> , 1999
-40	1,773	E box	CAAGTG	Sitio encontrado en los promotores de los genes rd22 en respuesta a deshidratación y reprime la expresión de los genes CBF a bajas temperaturas.	Hartmann <i>et al.</i> , 2005
-25	-	SEBFCONSSTPR10A	GACAGA	Represor transcripcional encontrado en promotores de genes inducidos por patógenos. En <i>Solanum tuberosum</i> este elemento se encontró en la región promotora del gen PR-10a, el cual es activado en respuesta al ataque por patógenos, además es sitio de unión a un factor conocido como SEBF (silencing element binding factor) represor transcripcional.	Boyle y Brisson, 2001
-127	-	LTRECOREATCOR15	TGGCCGAC	Secuencia que responde a la señal de ABA, y el estrés por frío y la sequía	Kim <i>et al.</i> , 2002.
176	-262	TGA Box	TGACG	La mayoría de los TGA identificados en Arabidopsis interactúan con el regulador maestro de SAR, NPR1, que controla la expresión de genes PR.	Idrovo-Espin <i>et al.</i> , 2012
-147	-777, -189	Soriip	GCCAC	Se ha observado en varias secuencias que están sobreexpresadas en promotores inducidos por luz. En Arabidopsis esta secuencia está regulada por el Fitocromo A, proteína capaz de regular respuestas fototrópicas tanto en el núcleo como en el citoplasma.	Hudson y Quail, 2003
-	1068	T box	ACTTTG	Transcripción activada por luz.	Bilgin <i>et al.</i> , 2010
-	-459	RAV1-B	CACCTG	Secuencia que inducida por señales de Auxina y ácido salicílico, Transcripción regulada por la luz.	Yamasaki <i>et al.</i> , 2004
-	-418	I box	CTTATC	Secuencia conservada en genes regulados por luz, también se ha encontrado tanto en tomate como en Arabidopsis que forma parte de la secuencia promotora de la rbcS	Giuliano <i>et al.</i> , 1988