



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**PAPEL DE LA UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS Y LA ACUMULACIÓN
DE TREHALOSA EN LA RESPUESTA HIDROTRÓPICA DE RAÍCES DE
MAÍZ (*Zea mays* L.)**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

CLAUDIA PUENTES BÁEZ

**DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ
DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE 2020

**PAPEL DE LA UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS Y LA ACUMULACIÓN DE
TREHALOSA EN LA RESPUESTA HIDROTRÓPICA DE RAÍCES DE MAÍZ
(*Zea mays* L.)**

Tesis realizada por **Claudia Puentes Báez** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Título académico, nombre completo

Codirector de tesis: Dra. Gladys Iliana Cassab López

Título académico, nombre completo

Revisor: Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Título académico, nombre completo

Revisor: Dr. José Fernando Lledías Martínez

Título académico, nombre completo

Revisor: Dra. María del Rayo Sánchez-Carbente

Título académico, nombre completo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a este gran país por darme la oportunidad de superarme profesionalmente durante los últimos años. Agradecer a Conacyt por la beca otorgada durante este periodo (No. 715161), sin esa ayuda el proceso habría sido ciertamente más difícil. Al Ceib y el IBt por aceptarme como estudiante, así como a todos los profesores con los que tuve el placer de compartir. Especialmente a la Dra. Gladys y al Dr. Ramon por abrirme las puertas de sus laboratorios para formarme en esta etapa. Muchas gracias por sus consejos y enseñanzas desde lo profesional y hasta lo personal. A los miembros del comité tutorial por sus correcciones y comentarios al proyecto desde el inicio para alcanzar la calidad requerida y llevarlo a feliz término.

A mis compañeros de generación (mis niñas Cyn y Vicky) y a los del laboratorio (Mery, Marce, Maru, Miguel, Jesús y otros) que estuvieron siempre para apoyarme y darme ánimos. A Fer por todos los tips para los western y Ariadna y al Dr. Augusto por su apoyo con el HPLC, consejos que no olvidaré. Quisiera agradecer además al CIMMyT por proporcionarnos todas la semillas que necesitamos y al CCG (en particular a Ivette) por el apoyo para el revelado de todas las membranas.

A mi familia, los pilares que me sostienen, mi tesoro más preciado, a Uds. GRACIAS. Por la confianza y la paciencia, por el apoyo incondicional aun estando en la distancia, por ser parte cada día de mis logros y retrocesos durante esta etapa. En especial mis padres que siempre han estado para apoyarme con el cariño más puro. A mi magnifico esposo, José Manuel, que ha aprendido y crecido conmigo, que me ha enseñado a echar adelante y sonreír cada día. Gracias a todos por acompañarme en esta aventura.

DEDICATORIA

A mi Mami que es una guerrera y mi Samu

ABSTRACT

High temperatures, flooding and drought are very highly stressful conditions for plants. Drought is one of the major causes of crop yield reduction, which causes substantial losses to the economy by increasing poverty and malnutrition. Roots are the first organ to detect this stress and use tropic responses to explore and direct growth to favorable conditions of water and nutrients. Differential root growth in response to a soil moisture gradient is defined as hydrotropism. Maize roots with a robust hydrotropic response ($> 40^\circ$ of curvature, NVOL) can maintain root biomass production as well as grain yield under drought. Under this condition, it is essential to ensure the stability of cell membranes, as well as macromolecules inside the cell. Proteins are especially sensitive to denaturation and cells have a system to degrade them using the proteasome and enzymes responsible for protein ubiquitination (UPS). It was previously reported that during stress conditions the UPS system works to solve damaged protein as key to tolerance response. Another factor previously related to drought tolerance is trehalose content. This molecule is capable of maintaining an adequate solvating layer around proteins and lipids preventing denaturalization. The high content of this sugar has also been related to its osmoprotective role or signal molecule during stress. Root traits are also modified during stressful conditions. Root changes during the early phase of hydrotropic response has not been reported. In this work, we studied protein ubiquitination changes, trehalose content and morphological changes during the hydrotropic response of maize lines strains provided by the Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) with a robust and weak hydrotropic response. During hydrotropic stimulation, the UPS response in seedlings roots with robust hydrotropic response differs from those with weak hydrotropic response, suggesting an early detection of stress which might be crucial for conferring drought tolerance. Changes in composition and concentration of soluble sugars, particularly a significant accumulation of trehalose in roots with a robust hydrotropic response that indicates an osmoprotective role. Roots with a with a weak hydrotropic response ($>39-10^\circ$ of curvature, SNLP) maintain its growth, which suggests that this line is unable to detect the stressful condition or keep growing to the zone with higher water availability. The difference between lines might be crucial for conferring drought tolerance.

Keywords: Hydrotropism, Maize, Drought stress, Ubiquitin, Trehalose, Morphological changes.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE CUADROS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1. Maíz	13
2.1.1 Características morfológicas	13
2.1.2 Usos	14
2.1.3 Cultivo	15
2.2. Estrés en plantas	15
2.2.1 Efectos de la sequía	16
2.2.2 Mecanismos para evitar la sequía	18
2.3. Sistema para la degradación de proteínas	22
2.4. Cambios morfológicos en la raíz asociados a estrés.	26
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVOS	29
5.1 OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Esquema de trabajo	30
6.2 Material Vegetal	30
6.3 Ensayo hidrotrópico:	30
6.3 Extracción de proteínas para ensayo de ubiquitinación	31
6.4 Cuantificación del contenido de trehalosa en raíces	32
6.5 Análisis histológico de las raíces	33
6.6 Análisis estadístico	33
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1 Cuantificación de proteínas ubiquitinadas, subunidades reguladoras del proteasoma y centro catalítico	34
7.2 Cuantificación de azúcares	45
7.3 Cambios morfológicos	50
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. PERSPECTIVAS FUTURAS	58
X. LITERATURA CITADA	59

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1	Anticuerpos primarios y secundarios empleados.
Tabla 2	Determinación de la concentración de proteínas totales ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) extraídas de raíces de ambas líneas después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (H_2O) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3).
Tabla 3	Determinación de la concentración de proteínas totales ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) extraídas de fragmentos de raíces de ambas líneas después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (H_2O) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3).
Tabla 4	Determinación de la concentración de azúcares solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) extraídos de raíces de NVOL después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (H_2O) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3).
Tabla 5	Determinación de la concentración de azúcares solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) extraídos de raíces de SNLP después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (H_2O) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3).
Tabla 6	Determinación de la concentración de azúcares solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) extraídos de fragmentos de raíces de NVOL luego de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones de reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) (1: Ápice y 2: Zona de Elongación).
Tabla 7	Determinación de la concentración de azúcares solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) extraídos de fragmentos de raíces de SNLP después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones de reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) (1: Ápice y 2: Zona de Elongación).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las partes de una planta de maíz (tomado de la web).
Figura 2	Esquema representativo de los diferentes tropismos descritos en plantas (tomado de la web)
Figura 3	Esquema representativo de la vía ubiquitina-proteasoma para la degradación de proteínas (tomado de Gomes, 2013).
Figura 4	Esquema representativo de los componentes del proteasoma 26S (tomado de Murata <i>et al.</i> , 2009).
Figura 5	Porcentajes de germinación de las líneas robusta (A) y débil (B) después de 3 d a 26 ° C en la oscuridad.
Figura 6	Patrón de proteínas totales extraídas de raíces completas 3 d después de la imbibición de las semillas de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (NVOL) y débil (SNLP). (A): Gel SDS-PAGE y (B): membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau. Cada carril corresponde a una raíz completa. PPM: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron 10µg/µL de proteínas totales.
Figura 7	Patrón de proteínas totales extraídas de raíces completas de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (NVOL) (A-F) y débil (SNLP) (G-L) expuestas a reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) por 6 h (A, B, G y H), 12 h (C, D, I, J) y 24 h (E, F, K, L). Cada carril corresponde a una raíz completa. PPM: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron 10µg/µL de proteínas totales.
Figura 8	Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotrópica robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de 3 d de la imbibición de la semilla (NVOL carriles 1-8) (SNLP carriles 9-16).
Figura 9	Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de 6 h en condiciones control (agua) y en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃).
Figura 10	Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de 12 h en condiciones control (agua) y en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃).
Figura 11	Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de 24 h en condiciones control (agua) y en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃).
Figura 12	Patrón de proteínas totales extraídas de fragmentos de raíz de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A y B) y débil (C y D) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) (1 : Ápice, 2 : Zona de Elongación, G : germinación, C : Control, R : reto hidrotrópico). (A y C): Gel SDS-PAGE y (B y D): membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau. PPM: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron 10µg/µL de proteínas totales.
Figura 13	Perfil de proteínas ubiquitinadas en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) (1 : Ápice, 2 : Zona de Elongación, G : germinación, C : Control, R : reto hidrotrópico)
Figura 14	Perfil de subunidades α del centro catalítico del proteasoma 20S en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) (1 : Ápice, 2 : Zona de Elongación, G : germinación, C : Control, R : reto hidrotrópico).
Figura 15	Perfil de la subunidad Rpn10 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) (1 : Ápice, 2 : Zona de Elongación, G : germinación, C : Control, R : reto hidrotrópico).
Figura 16	Perfil de la subunidad Rpn1 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) (1 : Ápice, 2 : Zona de Elongación, G : germinación, C : Control, R : reto hidrotrópico).
Figura 17	Análisis semicuantitativo por densitometría de las subunidades α del proteasoma 20S y las subunidades Rpn1 y Rpn10 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea robusta después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K ₂ CO ₃) 1 :(Ápice) 2 : (Elongación).

Figura 18	Análisis semicuantitativo por densitometría de las subunidades α del proteasoma 20S y las subunidades Rpn1 y Rpn10 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea débil después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) 1: (Ápice) 2: (Elongación).
Figura 19	Perfil cromatográfico del estándar empleado para la cuantificación de azúcares por HPLC (izq.) y tiempos de retención obtenidos para cada uno (der).
Figura 20	Cambios en la biomasa de raíces de la línea robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=3).
Figura 21	Cambios en la biomasa de fragmentos de raíces de la línea robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) (1: ápice, 2: zona de elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotópico).
Figura 22	Comparación de los niveles de concentración de trehalosa en raíces con respuesta hidrotópica robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=3) (* p<0.05, ** p<0.01).
Figura 23	Comparación de los niveles de concentración de trehalosa en fragmentos de raíces con respuesta hidrotópica robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones de reto hidrotópico (solución de K_2CO_3).
Figura 24	Análisis morfológico de raíces de línea robusta (NVOL) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) que muestra la ausencia de diferencias significativas entre la condición control y reto después de 6 h y el aumento del área total, el área de la estela y el área de la corteza en las raíces sometidas a reto hidrotópico después de 24 h en comparación con el corte transversal de una planta crecida en condiciones control. C: (agua) R: (solución de K_2CO_3) 1: (Ápice) 2: (Elongación).
Figura 25	Análisis morfológico de raíces de línea débil (SNLP) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) que muestra la ausencia de diferencias significativas entre la condición control y reto después de 6 h, el aumento del área total, el área de la estela y el área de la corteza en las raíces sometidas a reto hidrotópico después de 12 h y la disminución significativa del área total, el área de la estela y el área de la corteza en las raíces sometidas a reto hidrotópico después de 24 h en comparación con el corte transversal de una planta crecida en condiciones control. C: (agua) R: (solución de K_2CO_3) 1: (Ápice) 2: (Elongación).
Figura 26	Comparación del área total en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).
Figura 27	Comparación del área de la corteza en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).
Figura 28	Comparación del área de la estela en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).
Figura 29	Comparación de la relación área de la corteza/área de la estela en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).
Figura 30	Comparación de la relación área de la estela/área total en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).
Figura 31	Comparación del número de células corticales en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).

Figura 32	Comparación del número de filas de células corticales en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotropico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$).
-----------	---

I. INTRODUCCIÓN

La poca disponibilidad de agua en el suelo es una de las mayores causas de disminución en el rendimiento de los cultivos. Las raíces usan las respuestas trópicas para explorar eficientemente el suelo y por lo tanto dirigen el crecimiento hacia condiciones favorables de agua y nutrientes. El crecimiento diferencial de la raíz en respuesta a una condición ambiental tal como un gradiente de humedad en el suelo se define como hidrotropismo (Takahashi y Scott, 1991). La respuesta hidrotrópica de la raíz de plántulas de maíz puede clasificarse como robusta (con ángulo mayor a 40°) o débil (con ángulo de 10-39°) (Eapen *et al.*, 2017), siendo las robustas capaces de mantener la producción de biomasa, así como la producción de grano, en condiciones de poca disponibilidad de agua en el suelo (Eapen *et al.*, 2017). Bajo condiciones de estrés tales como: sequía, altas o bajas temperaturas, elevada salinidad, etc., resulta clave asegurar la estabilidad de las membranas celulares, así como de las macromoléculas en el interior celular. Las proteínas son especialmente sensibles a desnaturalización bajo condiciones de estrés, lo que resulta en la pérdida de su función. La célula cuenta con un sistema para degradar proteínas dañadas. En este sistema un componente fundamental es el proteasoma y las enzimas encargadas de la ubiquitinación de proteínas (Goldberg, 2007). Estudios recientes por mapeo de QTLs (**Quantitative Trait Loci**) identificaron genes relacionados con la vía de degradación del proteasoma a la respuesta hidrotrópica en plántulas de maíz. Entre ellos se encontraron: RPN7, subunidad reguladora del proteasoma 26S; TPA, enzima deubiquitinante y; E2, enzima conjugadora de ubiquitina. Ensayos preliminares muestran que, durante la germinación, plántulas de maíz bajo condiciones óptimas el patrón de ubiquitinación de proteínas es similar; sin embargo, al ser sometidas a reto hidrotrópico, muestran patrones de ubiquitinación distintos. Sin embargo, no se conoce que zonas de la raíz, son las más susceptibles a la ubiquitinación. Por otra parte, se desconoce el patrón de ubiquitinación en plántulas con respuesta hidrotrópica débil. Una respuesta común de las plantas para evitar el daño celular es la síntesis de osmoprotectores. La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa. Aunque usualmente se considera un metabolito de reserva, también ha sido reportado como osmoprotector y como molécula protectora contra otros tipos de estrés ya que protege la estructura terciaria de las proteínas (Lins *et al.*, 2004). Resultados reportados por Miranda y cols. (2007) en plantas *Arabidopsis thaliana* sobre-expresoras de las enzimas trehalosa sintasa y trehalosa 6 fosfatasa (TPS-TPP) en condiciones de

sequía, salinidad y bajas temperaturas, sugieren que la tolerancia puede deberse a que el metabolismo de la trehalosa juega un rol regulatorio en la expresión de genes durante el desarrollo y de la respuesta a condiciones ambientales. En plantas de alfalfa transformadas con la construcción bifuncional de las enzimas TPS-TPP bajo un promotor inducible por estrés, se observó un aumento en la tolerancia a la sequía (Suárez *et al.*, 2009). En este caso el aumento en la producción de biomasa (62%) en las líneas transformadas se relacionó con un incremento en la acumulación de trehalosa. Sin embargo, no se conoce la concentración de este azúcar en las raíces de maíz sometidas a reto hidrotópico ni su posible relación con los tropismos. Finalmente, la determinación de trehalosa en raíces con respuesta hidrotópica robusta y débil nos permitirá vislumbrar si este azúcar juega un papel como una chaperona química de proteínas en raíces sometidas al reto hidrotópico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Maíz

La región mesoamericana constituye el centro de origen y diversidad de numerosas especies vegetales, pero una de sus contribuciones más importantes es el maíz. Este es la forma cultivada del género *Zea* y los investigadores involucrados en su estudio han reconocido en el teocintle su ancestro, con base en la teoría de la evolución progresiva del mismo (Kato *et al.*, 2009). El género *Zea* pertenece a la familia Poaceae; particularmente este género en la región de México y Centroamérica está representado por cinco especies. La especie domesticada conocida es *Zea mays* L., su pariente silvestre más cercano es el teocintle de las subespecies *parviglumis* y *mexicana* (Kato *et al.*, 2009). Con relación a la domesticación y diversificación del maíz existen dos teorías alternativas. La primera propone que tuvo un origen multicéntrico a partir de diferentes poblaciones de teocintle hace unos 8,000 años. La segunda es la teoría del evento único de domesticación (unicéntrica) que propone que las poblaciones del teocintle de la raza Balsas o subespecie (ssp.) *parviglumis* localizadas en el centro de la cuenca del Balsas dieron origen al maíz.

2.1.1 Características morfológicas

El maíz es una planta de porte robusto, hábito anual y rápido desarrollo. El tallo es simple, erecto, con nudos y entrenudos más o menos distantes y de longitud elevada, alcanzando alturas de 2 a 6 metros (Figura 1). Las hojas alargadas nacen en los nudos de manera alterna, se encuentran abrazadas al tallo, presentan un ancho y tamaño variable, la nervadura es paralelinervia, tienen borde áspero, finamente ciliado y ligeramente ondulado. El número de hojas depende de la variedad, la época de siembra, entre otros factores; aunque, usualmente está relacionado con el potencial productivo.

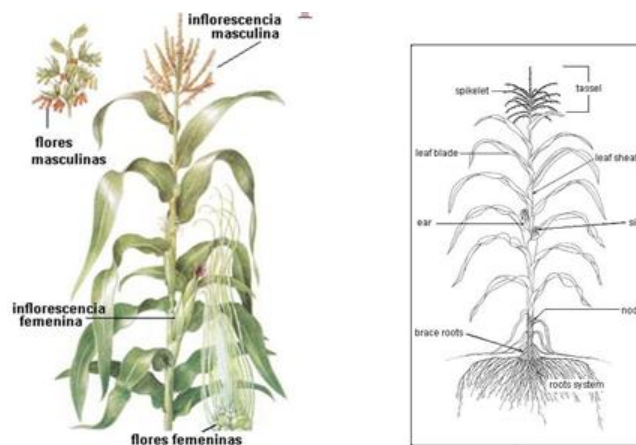


Figura 1. Esquema de las partes de una planta de maíz (Foto tomada de http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema5/5_1sexualidad.htm).

El maíz es una planta monoica con flores masculinas y femeninas separadas espacialmente. Las flores masculinas se encuentran como inflorescencia terminal estaminada y tienen forma de panícula. Las flores femeninas se sitúan a mediana altura, en una ramificación lateral cilíndrica envuelta por brácteas o espatas (Figura 1). Los estilos de cada flor sobresalen formando sedas y cada flor fecundada dará lugar a un grano dentro de la mazorca. Como resultado de esta separación de mazorca y panícula, y del fenómeno llamado protrandia en la floración, el maíz es una especie alógama (de polinización cruzada) y su tipo de inflorescencia ha permitido la producción de híbridos con alto potencial de rendimiento y amplia adaptación. El sistema radicular del maíz consta de raíces que se forman durante la embriogénesis y otras que se forman posteriores al desarrollo embrionario. El sistema que se forma durante la embriogénesis consiste en una raíz primaria y numerosas raíces seminales; mientras que el post-embrionario consta de raíces adventicias y otras que emergen del periciclo. La raíz primaria emerge del polo basal de la semilla y es esencial durante las primeras etapas del desarrollo. Por su parte las raíces seminales tienen también un origen embrionario. El número es controlado por gran cantidad de genes y es altamente variable entre genotipos. Las raíces seminales junto con la raíz primaria son las determinantes del vigor de las plántulas.

2.1.2 Usos

El maíz es el cultivo más representativo de México por su importancia económica, social y cultural. Todas las partes de la planta son utilizadas de alguna manera y con diferentes propósitos. Las raíces y horcones se emplean como abono o combustible, el tallo se emplea en la construcción, así como en la artesanía. También ha servido como medicina para curar males del cuerpo y en ritos religiosos para curar el alma. Las hojas se emplean como envoltura de tamales, para objetos rituales o artesanales, para amarrar manojos de hierbas y especias. El corazón de la mazorca se usa como combustible y alimento para animales, como herramienta para desgranar mazorcas, pulir la madera o como tapón de recipientes. Actualmente en la industria se utiliza como forraje en la alimentación animal y en la obtención de compuestos químicos que son comercializados en alimentos, medicinas y cosméticos: miel de maíz, azúcar de maíz, dextrosa, almidón o fécula, aceite, color caramelo, dextrina, malto dextrina, ácido láctico y sorbitol. Adicionalmente se puede obtener etanol, un alcohol derivado de la fermentación del almidón, que se utiliza principalmente como combustible de automóviles por lo que se considera además un recurso energético renovable (Esteva, 2003). Su principal uso está

relacionado con el consumo para la alimentación humana y animal. Según los datos de SAGARPA la producción de maíz en grano se divide en blanco y amarillo; siendo el primero empleado principalmente en el consumo humano, mientras que el segundo se emplea en la producción pecuaria o la industria. El consumo promedio *per cápita* en México es de 196.4 Kg al año, usualmente se consume como tortillas y representa el 20.9% del gasto total en alimentos, bebidas y tabaco de las familias mexicanas.

2.1.3 Cultivo

El maíz se adapta a una amplia variedad de suelos donde puede producir buenas cosechas, si se emplean los cultivares adecuados y técnicas de cultivo apropiadas. Los suelos idóneos para su cultivo son los de textura media, fértiles, bien drenados, profundos y con elevada capacidad de campo. El factor que más afecta la producción es la disponibilidad de agua, especialmente durante la época de floración, la cual es especialmente sensible al estrés hídrico porque de esto depende el desarrollo, polinización y llenado de los granos. Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos durante el año 2018 se estima una disminución del 3.31% en la producción de maíz a nivel mundial respecto al 2017 debido a la sequía.

2.2. Estrés en plantas

Las plantas se encuentran en constante interacción con factores ambientales (bióticos y abióticos) durante su ciclo de vida. Estos factores van a modular por tanto el crecimiento y desarrollo de estas e incluso su supervivencia. Cuando un factor ambiental produce una afectación en el desarrollo de un organismo se considera a este factor un estrés. Entre los factores abióticos que tienen efectos devastadores sobre las producciones agrícolas se encuentran: la sequía, la disponibilidad de nutrientes, la alta salinidad y las temperaturas extremas (Ahmad y Prasad, 2012). La sequía es el estrés más devastador; entre sus efectos se encuentran: a nivel celular y molecular la reducción de la tasa de división y expansión celular. Esta reducción en la división y expansión celular provoca que a nivel de organismo ocurra la reducción en el área foliar, la reducción en la elongación del tallo y las raíces. Por su parte a nivel fisiológico ocurren cambios en la conductancia estomática y como consecuencia en la concentración y absorción de nutrientes (Lambers *et al.*, 2008). Debido a que las precipitaciones no alcanzan los niveles adecuados, actualmente más del 35% de la superficie agrícola en el mundo es considerada árida o semiárida (Díaz-López *et al.*, 2012). Las regiones afectadas por sequía experimentan pérdidas en la productividad por encima del 50% comparadas con zonas no afectadas (<http://www.fao.org/nr/water/issues/scarcity.html>). Se estima que

para el año 2025, 1800 millones de personas estarán viviendo en regiones con absoluta escasez de agua (menos de 500 m³ al año *per cápita*), y dos tercios de la población mundial estarán bajo condiciones de estrés hídrico. Según estimaciones de la FAO, para el año 2050 la producción de alimentos debe incrementarse en un 60% para poder garantizar la seguridad alimentaria global y para lograrlo deberán incrementarse y conservarse los recursos naturales como el agua. Actualmente, las reservas de agua del planeta han disminuido de manera significativa debido principalmente al cambio climático, lo que implica la necesidad de su uso racional y óptimo.

México es un país vulnerable a la sequía debido a que el 52% de su territorio está catalogado como árido o semiárido. Catorce de sus estados se consideran sitios con baja precipitación pluvial, lo que provoca que los periodos de sequía se presenten de manera recurrente. La sequía de los últimos años en México ha afectado grandes extensiones de tierra. En el año 2010 el director de CONAGUA señaló que la tercera parte del país sufría desabastecimiento de agua y para ese entonces se calculaba una pérdida de 700,000 hectáreas. Sin embargo, los años 2011 y 2012 fueron los más secos de los últimos 70 años y afectaron más del 80% del territorio nacional, causando pérdidas en la agricultura que sobrepasaron los 16 billones de pesos (Ortega-Gausin *et al.*, 2016). De esta cantidad, 9000 millones correspondieron a los cultivos perdidos de maíz y 6000 millones a los de frijol.

2.2.1 Efectos de la sequía

En respuesta a condiciones de estrés abiótico se inducen cambios morfológicos, fisiológicos y anatómicos, desde el nivel celular y hasta a nivel del individuo (Ahmad y Prasad, 2012). Estos cambios conllevan un costo energético que tiene un efecto negativo en el crecimiento, la productividad, el perfil metabólico y el potencial nutricional. Entre los cambios más frecuentes se encuentran: disminución del crecimiento, de la conductancia estomática y de la absorción de nutrientes.

- Disminución del crecimiento y la productividad

El crecimiento se define como el incremento en tamaño o volumen que incluye división, elongación y diferenciación celular, siendo los dos primeros afectados por la presión que ejerce el agua sobre la membrana plasmática y la pared celular denominada: turgencia celular. Usualmente en condiciones de sequía disminuye el contenido relativo de agua en la planta y como consecuencia disminuye el volumen celular, se pierde la turgencia y se concentran los solutos en el interior. Esta reducción en la turgencia resulta en una

disminución de la expansión foliar y de la elongación de las raíces (Taiz y Zeiger, 2010). La disminución en el crecimiento usualmente se mide en función de la biomasa que es capaz de acumular una planta en un periodo de tiempo. Díaz-López y col. (2012) estudiaron el crecimiento de plantas de *Jatropha curcas* bajo condiciones de sequía y observaron que el peso seco de hojas, tallo y raíces disminuía gradualmente con el aumento en la intensidad y duración del estrés. Sin embargo, los cambios más drásticos en la acumulación de biomasa se observaron en las raíces. En plantas de maíz con diferentes tratamientos de irrigación se observó que la altura, el diámetro del tallo y el área foliar disminuyó considerablemente con el aumento de la sequía (Anjum *et al.*, 2011). Adicionalmente se observó una reducción significativa en componentes del rendimiento como producción de granos, tamaño del grano, número de filas en la mazorca e índice de cosecha (Anjum *et al.*, 2011a).

- Conductancia estomática

El déficit de agua en el suelo provoca que aumente la concentración de ácido abscísico (ABA). Esta hormona, específicamente en las células oclusivas de los estomas provoca eflujo de K^+ y aniones, remoción de sacarosa, entre otros, lo que disminuye la presión de turgencia e inducen el cierre estomático (Fujii *et al.*, 2014). Al cerrarse los estomas se disminuye la tasa de transpiración para evitar la pérdida de agua. Como consecuencia, disminuye la tasa fotosintética y por lo tanto la tasa de crecimiento de la parte aérea. Consecuentemente ocurre mayor translocación de foto-asimilados hacia las raíces para asegurar el crecimiento de estas hacia las capas más profundas del suelo donde hay mayor disponibilidad de agua por lo que se afecta la proporción raíz/parte aérea. En experimentos realizados con plantas de *Jatropha curcas*, con suspensión de riego, se observó que se limitaba la apertura estomática y el intercambio gaseoso debido a que la tasa de asimilación neta de CO_2 disminuyó a medida que aumentaba el estrés por sequía (Díaz-López *et al.*, 2012). En este caso la disminución se relacionó con una respuesta adaptativa para evitar los daños ocasionados en ambientes áridos. Kim y van Lersel en 2011, plantearon que para asegurar la supervivencia en condiciones de poca disponibilidad de agua era necesario reducir el uso de agua para incrementar la señalización por ABA demostrando que la hipersensibilidad potencia la tolerancia a la sequía. Xiao y col. en 2009 transformaron plantas de arroz con la construcción *HVA22P:LOS5* empleando un promotor inducible por deshidratación y de esta forma demostraron que la hipersensibilidad a ABA favorece la mayor productividad en

condiciones de estrés por sequía.

- Absorción y asimilación mineral

La sequía tiene efectos importantes en la adquisición de nutrientes en la raíz y su transporte hacia la parte aérea, debido a que la limitación en la disponibilidad de agua en el suelo resulta en una limitación en la toma de nutrientes (Rouphael *et al.*, 2012). Cuando el suelo se encuentra bien abastecido de agua la planta mantiene sus estomas abiertos y la alta tasa de transpiración mantiene el flujo pasivo de agua y solutos de bajo peso molecular como iones, ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares por difusión y flujo de masa (Taiz y Zeiger, 2010). El nitrógeno es uno de los nutrientes que se requiere en mayor cuantía pues forma parte de numerosos componentes celulares como aminoácidos y ácidos nucleicos. La sequía puede disminuir la disponibilidad de nitrógeno y por tanto su absorción a través de las raíces debido a reducción en la mineralización del suelo (Rouphael *et al.*, 2012). Kirnak *et al.* (2002) demostraron que los tratamientos de sequía en plantas de melón reducían significativamente la concentración de macronutrientes en las hojas, especialmente de nitrógeno. Otro de los nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal es el fósforo, que forma parte de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas y nucleótidos que almacenan energía. Bajo condiciones de estrés por sequía se afecta la formación de las semillas, se favorece la senescencia prematura de hojas y retraso en el inicio de la floración (Rouphael *et al.*, 2012). Desde el punto de vista nutricional, la disminución en la toma de fósforo afecta la calidad de frutas y vegetales disminuyendo su contribución a la dieta. Esta disminución representa una afectación en el 11% del total de fósforo requerido en la dieta humana. El potasio es otro macronutriente requerido para procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la activación de enzimas, la síntesis de proteínas, el mantenimiento de la turgencia, entre otros. Bajo condiciones de sequía intensa disminuye su movilidad y se afecta la calidad de las frutas. Entre las afectaciones más frecuentes en tomates y pimientos se encuentran aumento en la acidez y el contenido de licopenos, afectación en el tamaño y coloración, así alteraciones en la maduración (Rouphael *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que las frutas y vegetales contribuyen en un 35% al total de potasio requerido en la dieta, podemos decir que la disminución en su contenido causada por sequía tiene un efecto negativo desde el punto de vista nutritivo.

2.2.2 Mecanismos para evitar la sequía

La supervivencia en ambientes hostiles involucra el desarrollo de mecanismos de

tolerancia o resistencia a condiciones de estrés. La tolerancia consiste en sobrevivir el estrés sin tener daños; mientras que la resistencia implica ajustar el ciclo de vida a los periodos de ausencia de estrés. Un mecanismo que permite la tolerancia a la sequía es la acumulación de solutos osmóticamente activos en el interior celular (Mohammad y Heidari, 2008). Esta acumulación permite que disminuya el potencial de agua en la planta con respecto al potencial de agua del suelo y por tanto facilita la toma de agua por la raíz. Entre los solutos que aumentan su concentración están: azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y iones como el potasio. Estos solutos compatibles no interfieren en la actividad de las enzimas y adicionalmente son capaces de servir como osmoprotectores de membranas celulares y proteínas (Mohammad y Heidari, 2008). Aunque los mecanismos de ajuste osmótico han sido mejor descritos en las hojas, las raíces también son capaces de variar su contenido de solutos para obtener más agua del suelo (Díaz-López *et al.*, 2012).

Las raíces de la planta son el sitio primario de toma de agua y nutrientes. Estas tienen la capacidad de detectar y responder a cambios fisicoquímicos del suelo ajustando su crecimiento y sus sistemas de transporte de agua. El crecimiento, la proliferación, densidad y distribución de las raíces son factores claves en la respuesta de las plantas a la sequía (Rouphael *et al.*, 2012). Un ejemplo de esto son las plantas de coliflor, luego de 50 días de sequía las raíces alcanzaron una longitud de 90 cm mientras que bajo condiciones de buena irrigación la longitud era de 70 cm (Rouphael *et al.*, 2012). En particular las alteraciones anatómicas y morfológicas inducidas por sequía, resultan en modificaciones de la habilidad de exploración del suelo debido a cambios en parámetros como la formación de raíces laterales o cambios en la tasa y dirección del crecimiento de la raíz hacia condiciones favorables de agua y nutrientes (Rouphael *et al.*, 2012).

2.2.2.1 Acumulación de solutos osmóticamente activos

Bajo condiciones de estrés resulta clave asegurar la estabilidad de las membranas celulares, así como de las macromoléculas en el interior celular. Las proteínas son especialmente sensibles a desnaturalización bajo condiciones de estrés, lo que resulta en la pérdida de su función. La síntesis de solutos compatibles tiene como función principal el mantenimiento de la turgencia celular y la toma de agua, aunque también se han relacionado con la eliminación de radicales libres o como chaperonas químicas en la estabilización de membranas y proteínas (Wang *et al.*, 2003; Mohammad y Heidari, 2008). La sobreexpresión de estos solutos en plantas transgénicas puede resultar en un incremento de la tolerancia al estrés (Pilon-Smits *et al.*, 1998). Un gran número de rutas

de síntesis o de transporte de solutos como la prolina, la glicina-betaina y la trehalosa han sido blanco de modificaciones genéticas para aumentar su concentración y así generar resistencia (Kavi-Kishor *et al.*, 1995; Garg *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2008). Los azúcares tienen un rol protector importante contra diversas condiciones estresantes ya que pueden actuar como moléculas señal (Sami *et al.*, 2016). La trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unido por enlaces 1-1 (α -D-glucopiranosil1-1, 1- α -D-glucopiranósido), este tipo de enlace le confiere la característica particular de ser un azúcar no reductor. Este azúcar se encuentra ampliamente distribuido y presenta diversas funciones, tales como carbohidrato de reserva, molécula de señalización y de osmoprotección en muchos organismos (Arguelles, 2014; Fernández *et al.*, 2010). Esta molécula es capaz de inhibir la actividad de la enzima hexoquinasa y de esa forma redireccionar el metabolismo de azúcares en plantas (Wingler 2002; Grennan 2007). La manipulación genética de las enzimas involucradas en las vías de síntesis o degradación de solutos compatibles en plantas no siempre llevan a la acumulación de los mismo, por lo que no se pueden asociar únicamente con su función como osmoprotectores. Esta acumulación puede estar relacionada a brindar protección contra especies reactivas de oxígeno o con actividad como chaperonas químicas. Ha sido demostrado que la trehalosa 6 fosfato induce la producción de enzimas antioxidantes en presencia de metales pesados (Keunen *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014; Mostofa *et al.*, 2015). En presencia de altos niveles de trehalosa, plantas de arroz creciendo con metales pesados tales como el Cu^{2+} lograron disminuir la toma de este, así como regular los sistemas antioxidantes (Mostofa *et al.*, 2015). Haoyue y col. (2019) encontraron altos niveles de transcrito de seis genes que codifican para la trehalosa sintasa y la trehalosa fosfato fosfatasa en una especie de *Viola* tolerante a Cd^{2+} . Cuando compararon con otra especie no tolerante encontraron menores niveles de transcrito, lo que implica que la trehalosa tiene un papel esencial en las diferencias fenotípicas de tolerancia a Cd^{2+} (Haoyue *et al.*, 2019). Además, la trehalosa ha sido reportada como protector antiestrés abiótico en plantas de la resurrección (*Selaginella lepidophylla*) debido a su acumulación como soluto compatible (Iturriaga *et al.*, 2009) y a su capacidad para mantener una adecuada capa de solvatación en las proteínas (Lins *et al.*, 2004).

En plantas de arroz transformadas para sobre-expresar las enzimas TPS-TPP involucradas en la síntesis de trehalosa se observó tolerancia a múltiples condiciones de

estrés (Garg *et al.*, 2002). Un modesto incremento en los niveles de trehalosa resultó en una mayor capacidad fotosintética y en la simultánea disminución en el daño oxidativo, lo que pareciera indicar su función como osmoprotector (Garg *et al.*, 2002). Suárez y cols. (2009), sobre-expresaron la construcción bifuncional de las enzimas para la síntesis de trehalosa de *S. cerevisiae* en alfalfa (*Medicago sativa*), bajo un promotor constitutivo y otro inducible por estrés. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de biomasa en las líneas bajo el promotor inducible, así como una mayor tolerancia a diferentes condiciones de estrés abiótico como deshidratación, salinidad y bajas temperaturas, en comparación con las plantas silvestres. En plántulas de maíz sometidas a un tratamiento con polietilenglicol (PEG) se observó un aumento en la concentración de azúcares solubles en tallo y raíz que se relacionó con el aumento en la tolerancia (Mohammad y Heidari, 2008). Además, estudios en algas sometidas a condiciones de deshidratación y rehidratación mostraron que los niveles de transcrito de trehalosa sintasa, así como la actividad de esta aumentaron significativamente durante las primeras horas de deshidratación (1-4 h) (Fierro *et al.*, 2017).

2.2.2.2 Tropismos

Las respuestas trópicas consisten en el movimiento de curvatura que se produce como consecuencia de un crecimiento diferencial en respuesta a un estímulo externo, ya sea movimiento hacia o en dirección opuesta al mismo (Taiz y Zeiger, 2010). Se han definido varios tipos de tropismos en plantas, entre ellos el fototropismo, el gravitropismo y el tigmotropismo (Figura 2).

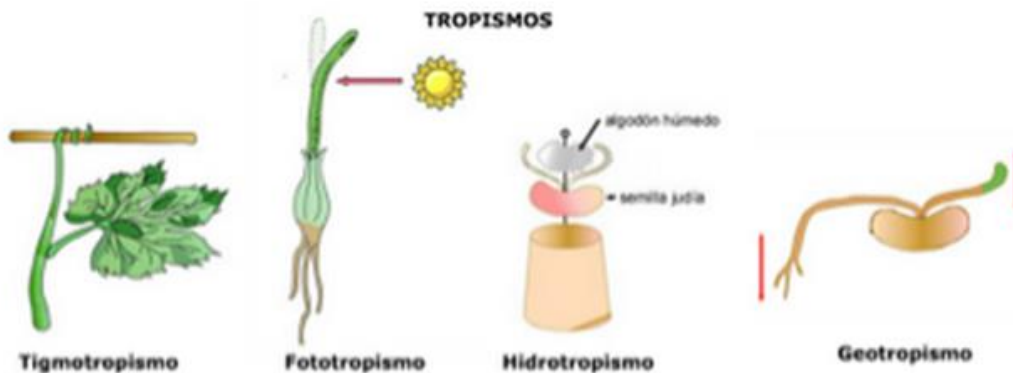


Figura 2. Esquema representativo de los diferentes tropismos descritos en plantas. (Foto tomada de <https://revolucion.news/cienciaro.mx/no-camino-pero-me-muevo-movimiento-en-plantas/>).

El crecimiento diferencial de la raíz en respuesta a un gradiente de humedad en el suelo se define como hidrotropismo (Takahashi y Scott, 1991). Aunque resulta difícil desligar la

curvatura hidrotópica de otras respuestas como las gravitópicas, Eapen y col. en 2005 modificaron el sistema planteado por Takahashi y Scott en 1991 con este fin. El sistema consiste en una cámara acrílica conteniendo una solución sobresaturada de K_2CO_3 en el fondo y dos hidroestimulantes localizados en las paredes de la cámara. Dicho sistema permitió estudiar la respuesta hidrotópica en plántulas de maíz y clasificar a las mismas en función del ángulo de curvatura en dos categorías. Cuando el ángulo de curvatura es menor que 40 grados se clasifican como plántulas con respuesta hidrotópica débil y cuando el ángulo es mayor que 40 grados se dice que la respuesta hidrotópica es robusta (Eapen *et al.*, 2017). Muchas plantas usan la respuesta hidrotópica como un mecanismo para evitar el estrés hídrico. Experimentos de campo realizados por Eapen y col. con las plántulas previamente clasificadas como débiles y robustas reforzaron la hipótesis de que las segundas son más resistentes a condiciones de sequía. En condiciones de riego lateral, así como de falta de riego, las plantas con respuesta hidrotópica robusta fueron capaces de mantener la producción de biomasa y granos, mientras que las débiles fueron afectadas (Eapen *et al.*, 2017). Estudios recientes por mapeo de QTLs han identificado en plántulas de maíz con respuesta hidrotópica robusta genes relacionados con la vía de degradación de proteínas mediada por el proteasoma. Entre estos se encuentran RPN7: subunidad reguladora del proteasoma 26S, TPA: enzima deubiquitinante y E2: enzima conjugadora de ubiquitina (resultados no publicados).

2.3. Sistema para la degradación de proteínas

Para hacer frente al estrés, las plantas activan un gran conjunto de genes que conducen a la acumulación de proteínas específicas asociadas al estrés como las proteínas de choque térmico y las de embriogénesis tardía. La disfunción de enzimas y proteínas ocurre durante condiciones de estrés, por lo tanto, mantenerlas en sus conformaciones funcionales y prevenir la agregación de proteínas resulta particularmente importante para la supervivencia celular (Wang *et al.*, 2003). Se ha demostrado que algunas de estas actúan como chaperonas moleculares responsables de la síntesis, direccionamiento y maduración y en caso de no poder devolverlas a su conformación entonces favorecen su degradación. La célula cuenta con un sistema para degradar proteínas dañadas, el proteosoma (Liu *et al.*, 2011). En este sistema un componente fundamental son las enzimas encargadas de la ubiquitinación de proteínas, molécula que se utiliza como

señal de degradación (Goldberg, 2007). La ubiquitina es una proteína pequeña compuesta por 76 aminoácidos. La presencia de un residuo de Glicina en el C-terminal resulta clave para la conjugación a otras moléculas de Ub y al sustrato (Stewart *et al.*, 2006). El proceso de ubiquitinación se lleva a cabo en tres etapas. Durante la primera etapa se activa la molécula de ubiquitina por la enzima E1. La segunda etapa es la transferencia de la ubiquitina activada con la consecuente formación de un intermediario E2-Ub y es llevado a cabo por la enzima E2 o enzima conjugadora de ubiquitina. La tercera etapa consiste en la transferencia de la ubiquitina desde el intermediario al sustrato o molécula blanco y es llevada a cabo por la E3 o Ub-ligasa (Liu *et al.*, 2011) (Figura 3).

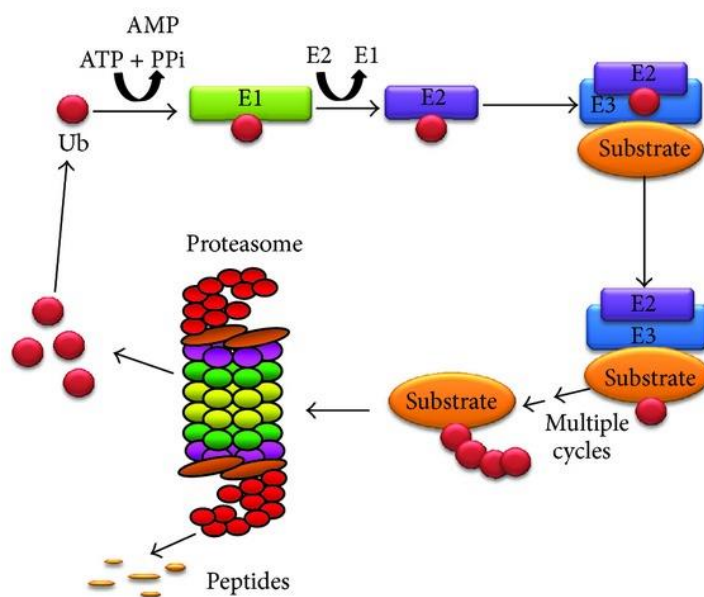


Figura 3. Esquema representativo de la vía ubiquitina-proteasoma para la degradación de proteínas (tomado de Gomes, 2013).

La modificación covalente de adición de ubiquitina es dependiente de ATP (Smalle *et al.*, 2003). El número de moléculas de ubiquitina, así como la topología de la cadena poli-ubiquitinada determina su función particular. La cadena de ubiquitina se forma por unión covalente de la ubiquitina en residuos de glicina o lisina en las posiciones 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63; lo que está conservado entre especies. Los polímeros de ubiquitina compuestos por más de cuatro moléculas generalmente son degradados por el proteasoma 26S, mientras que las proteínas mono-ubiquitinadas generalmente alteran su actividad y transporte (Yu *et al.*, 2016).

El proteasoma 26S es un complejo multimérico de aproximadamente 2.4 MDa formado

por un centro con actividad proteasa (20S) de una masa molecular aproximada de 750 kDa y de forma cilíndrica, cubierto en uno o sus dos extremos por una partícula reguladora (19S) con una masa aproximada de 700 kDa (Yang *et al.*, 2004; Konstantinova *et al.*, 2008; Murata *et al.*, 2009; Tanaka, 2009). El centro catalítico 20S está formado por cuatro anillos de siete subunidades cada uno; siendo los dos exteriores subunidades alfa y los internos conformados por unidades beta. Las subunidades beta son las que tienen actividad hidrolítica tipo caspasa, tripsina y quimiotripsina. Estas actividades aseguran cortes en el extremo C-terminal de aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos respectivamente. Dicha actividad se debe a las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ (Moreno, 2009; Kish-Trier y Hill, 2013).

La partícula reguladora (19S) asiste en el reconocimiento de los sustratos ubiquitinados, el desplegamiento de la proteína blanco, la remoción de Ub y la apertura de las subunidades alfa para la entrada del polipéptido al poro catalítico (Yang *et al.*, 2004; Palma *et al.* 2002). La partícula reguladora 19S está formada por al menos 17 subunidades que debido a su actividad ATPasa se conocen como Rpt (regulatory particle of triple-ATPase) y otras Rpn (regulatory particle non-ATPase) por la ausencia de actividad (Moreno, 2009). Dentro de las subunidades del 19S, Rpn 11 es una metaloproteasa involucrada en la liberación de la marca de ubiquitina por el extremo proximal. Rpn 6 por su parte, es esencial para el correcto ensamblaje de la “tapa” pero su efecto una vez ensamblado el proteasoma es pequeño. Las subunidades Rpt del 1 al 6 interactúan directamente con los anillos externos del 20S y son necesarias para desplegar el sustrato e introducir las proteínas. Mientras que las Rpn 1, 2, 10 y 13 funcionan para el anclaje y reconocimiento de la cadena de ubiquitina.

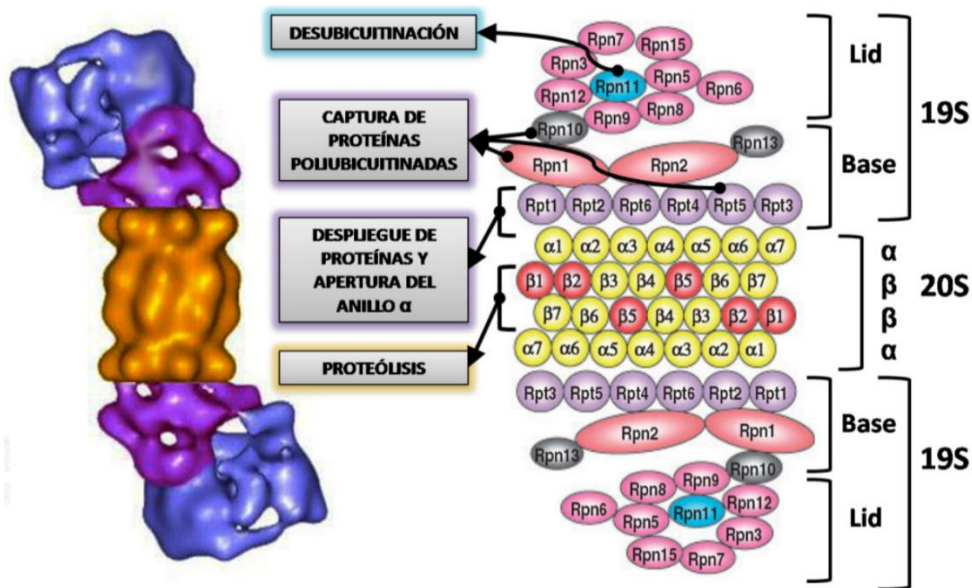


Figura 4. Esquema representativo de los componentes del proteasoma 26S (tomado de Murata *et al.*, 2009).

El proteasoma en su conformación 26S es capaz de degradar proteínas que han sido previamente marcadas con ubiquitina y que antes de entrar al centro catalítico son desplegadas de su estructura nativa. Puede encontrarse flanqueado por una o dos partículas reguladoras 19S (19S-20S-19S o 19S-20S). Existen otros complejos reguladores involucrados en la degradación de proteínas no ubiquitinadas, los que han sido identificados en mamíferos como PA28 (también conocido como 11S) y PA200 y en levadura Blm10 (análogo de PA200) (Aritzabal *et al.*, 2019). Las proteínas intrínsecamente desordenadas o las proteínas oxidadas por su parte pueden internalizarse en el centro catalítico y ser degradadas por el proteasoma en su conformación 20S (Davies, 2001; Tanaka, 2009). Las evidencias obtenidas sugieren que el tipo de complejo regulatorio o su ausencia, determina el tipo de sustrato que será degradado, la actividad del centro catalítico y los oligopéptidos que se obtengan de la degradación. La capacidad de ensamblaje y desensamblaje del proteasoma 26S, así como los complejos regulatorios diferentes al 19S, en un contexto fisiológico determinado responden a las necesidades catalíticas celulares (Aritzabal *et al.*, 2019). Es por ello que resulta interesante conocer cuales conformaciones del proteasoma se encuentran presentes durante la respuesta hidrotópica. Estudios en algas tolerantes a deshidratación sometidas a condiciones de deshidratación y rehidratación mostraron que los niveles de ubiquitina aumentaron después de dos horas de deshidratación alcanzando valores máximos a las cuatro horas (Fierro, 2017) y fueron considerados uno de los factores involucrados en conferir tolerancia. Experimentos con

mutantes de la enzima E3 ligasa en *Arabidopsis thaliana* sometidas a déficit hídrico durante 15 días y luego reabastecidas, exhibieron una alta tasa de supervivencia comparadas con el tipo silvestre (46.1% y 10.9%, respectivamente); además, éstas son hipersensibles a ABA y tolerantes a sequía (Liu *et al.*, 2011). Estudios de transcriptómica y proteómica en varias especies, muestran que el sistema ubiquitina-proteasoma puede ser activado adicionalmente por metales pesados como Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} . Un ejemplo de esto fue la fuerte estimulación de genes de poliubiquitinación en frijol y arroz por altas concentraciones de Hg y bajas concentraciones de Cd (Oono *et al.*, 2016). El análisis del transcriptoma en dos especies de *Viola*, una planta tolerante hiperacumuladora de Cd^{2+} y la otra no tolerante, mostraron que los niveles de transcrito de genes de la vía de degradación mediada por el proteasoma en tallos y raíces eran mayores en la especie tolerante, lo que sugiere que la tolerancia a metales puede estar mediada por la degradación de proteínas anormales (Haoyue *et al.*, 2019).

2.4. Cambios morfológicos en la raíz asociados a estrés.

Las plantas han desarrollado una serie de estrategias evolutivas para lidiar con situaciones de estrés como la modificación en la expresión de acuaporinas para modificar la conductancia estomática, la pérdida de hojas para limitar la transpiración, el ajuste osmótico, entre otros. Uno de los cambios morfológicos que suceden en la raíz como consecuencia del estrés causado por inundación, es la formación de aerénquima por muerte celular o lisis de las células corticales. El aerénquima favorece el intercambio de gases y por tanto la supervivencia de los cultivos ante estas condiciones. Sin embargo, la formación de aerénquima no resulta una respuesta exclusiva a condiciones de inundación sino también a condiciones de sequía. La formación de aerénquima reduce la tasa respiratoria y aumenta la sobrevivencia como consecuencia de la reducción en el costo metabólico. Esto se debe a que la reducción en el costo metabólico permite el crecimiento de la raíz y la toma de agua en suelos secos. La reducción en el costo metabólico no está ligada únicamente a la formación de aerénquima sino también a la disminución en el número de filas de células corticales o al incremento en la talla de estas (Gao y Linch, 2016) así como a la disminución en la densidad de raíces laterales. La importancia de balancear el costo metabólico es esencial y para ello, las raíces han generado diferentes adaptaciones para una mayor y más eficiente adquisición de nutrientes, para fomentar la fotosíntesis y optimizar la producción de grano. Esto se debe a que el costo metabólico de la exploración del suelo por parte del sistema radicular puede alcanzar aproximadamente el 50% de la ganancia fotosintética diaria (Lambers *et*

al., 2002).

La formación de aerénquima cortical en la raíz (RCA) permite un aumento del crecimiento hasta del 70% bajo condiciones deficientes de fósforo y agua y por tanto favorece que las raíces exploren y absorban eficazmente los nutrientes y agua del suelo (Zhu *et al.* 2010, Postma y Lynch, 2011). Por otro lado, el aumento en la talla de las células corticales se ha asociado a la reducción de la tasa respiratoria y por tanto al enraizamiento, lo que permite una captura efectiva del agua y los nutrientes del suelo en zonas más profundas (Lynch, 2015). De igual forma la reducción en el número de filas de células corticales constituye un rasgo adaptativo para tolerar la sequía y mantener la producción de grano bajo estrés hídrico (Chimungu *et al.*, 2014). Zhu y colaboradores (2010) reportaron que en condiciones de estrés por sequía en líneas de maíz susceptibles se inducía la formación de aerénquima en raíces seminales y nodales de 5 y 8 semanas de edad respectivamente.

III. JUSTIFICACIÓN

Los cambios climáticos que suceden de manera drástica como incremento en la temperatura del planeta, en las precipitaciones, y la sequía, entre otros factores, constituyen situaciones estresantes para las plantas. Estas condiciones, específicamente la sequía, son factores limitantes en la producción agrícola lo que provoca pérdidas cuantiosas. El estudio de líneas de maíz con respuesta hidrotónica robusta empleando técnicas de genética y bioquímica podría ayudar a dilucidar los mecanismos que permiten la tolerancia y por tanto buscar estrategias que ayuden a aumentar la tolerancia en otros cultivos. Dentro de las moléculas descritas que permiten tolerancia a condiciones adversas son los osmoprotectores como la trehalosa, un disacárido que ayuda en la contención del estrés debido a su capacidad de proteger las membranas y proteínas. Considerando su papel como protector, en el presente trabajo compararemos la concentración del disacárido en plantas con respuesta débil y robusta durante el reto hidrotónico.

Otro de los sistemas que se activan en respuesta a estrés es el sistema ubiquitina-proteasoma. En respuesta a condiciones estresantes ha sido descrito que las enzimas y proteínas pueden perder su función y acumularse como agregados que pueden afectar negativamente la supervivencia celular. La respuesta fenotípica de robustez o debilidad en plántulas de maíz podría tener como base el funcionamiento diferencial del sistema de degradación de proteínas mediado por el proteasoma, aunque no se conoce con exactitud si ocurre nivel de expresión o actividad. El posterior análisis de los genes involucrados en esta respuesta podría brindar alternativas para mejorar la resistencia en plantas de interés económico. Teniendo en cuenta su relación con la tolerancia al estrés en el presente trabajo también cuantificaremos las proteínas ubiquitinadas y la subunidad reguladora del proteasoma en plántulas de maíz con respuesta hidrotónica débil y robusta.

IV. HIPÓTESIS

Las raíces de plántulas de maíz con respuesta hidrotrópica robusta acumulan mayores concentraciones de trehalosa y presentan menor cantidad de proteínas ubiquitinadas que aquellas con respuesta hidrotrópica débil.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

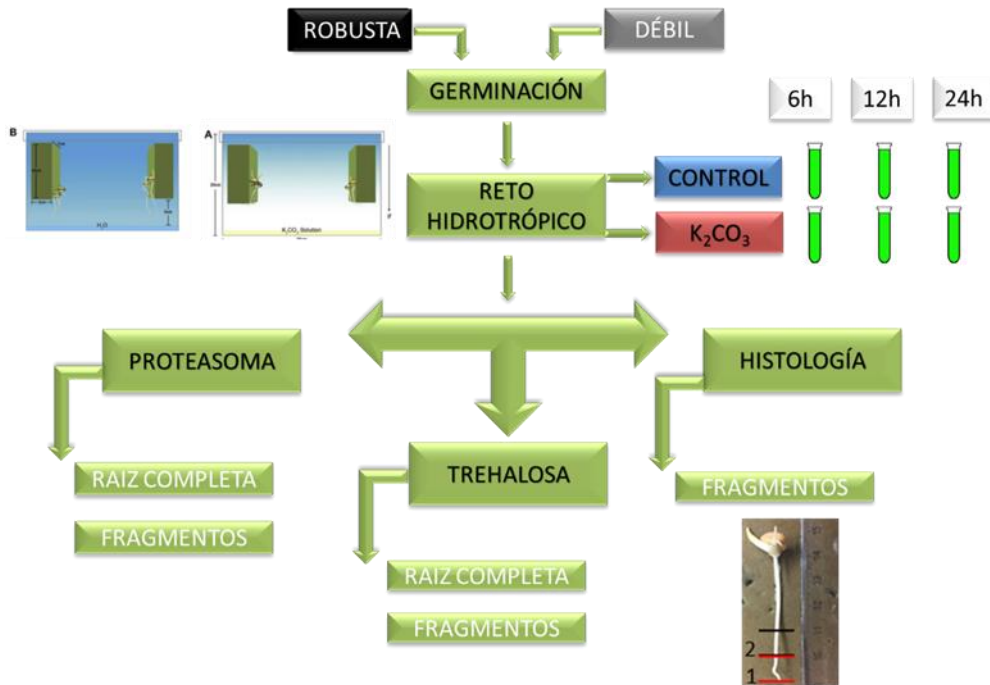
Determinar el papel del proteasoma y de la acumulación de trehalosa en la respuesta hidrotrópica de la raíz del maíz.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar los niveles de trehalosa en plántulas de maíz con respuesta hidrotrópica débil y robusta.
- Analizar y cuantificar proteínas ubiquitinadas, las subunidades reguladoras del proteasoma y la región 20S.
- Evaluar cambios morfológicos asociados a la respuesta hidrotrópica.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Esquema de trabajo:



6.2 Material Vegetal:

Se emplearon semillas de las líneas NVOL46 y SNLP17 proporcionadas por el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). Estas fueron previamente clasificadas en función de la respuesta hidrotópica como robusta y débil respectivamente (resultados no publicados). Las semillas se esterilizaron durante tres minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 15% (v/v). Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, un minuto cada enjuague. Las semillas se pusieron a germinar (imbibición) en charolas conteniendo papeles toalla humedecidos con 200 mL de agua destilada estéril. Se incubaron en un cuarto de cultivo por 3 d con las charolas en un ángulo de inclinación entre 25 y 30 grados, en condiciones de oscuridad y una temperatura de 26 ± 2 grados.

6.3 Ensayo hidrotópico:

Luego de tres días de incubación se tomaron las semillas germinadas con una longitud de raíz primaria entre tres y cinco centímetros y se colocaron en reto hidrotópico. Se emplearon esponjas florales previamente humedecidas con agua destilada que se colocaron dentro de una caja acrílica a una altura de seis cm. Las plántulas se colocaron en la esponja empleando alfileres de forma tal que el ápice de la raíz coincida con el borde de esta. Se emplearon dos condiciones: i) 200 mL de solución saturada de K_3CO_2 en el fondo de la caja para crear un gradiente de humedad y ii) 400 mL de agua destilada

en el fondo de la caja como control (Eapen *et al.*, 2005). Se sometieron al reto durante periodos de 6, 12 y 24 h. Adicionalmente se tomaron semillas al momento de la germinación como tiempo cero. Transcurrido ese tiempo se colectó la raíz completa y por fragmentos (10 fragmentos), siendo el primer fragmento de 1 cm correspondiente a la zona apical y el fragmento siguiente también de 1 cm, correspondiente a la zona de elongación. Las muestras se almacenaron en frío (-80°) para su posterior análisis.

6.3 Extracción de proteínas para ensayo de ubiquitinación:

La extracción de proteínas totales para los ensayos de ubiquitinación se realizó tomando una muestra de todo el órgano en las diferentes condiciones, para el ensayo en raíz completa, replicado 8 veces. Por otra parte, para el ensayo por fragmentos se tomaron 10 segmentos de cada zona de la raíz. El protocolo de extracción empleado fue el siguiente:

1-Agregar 400 mL de buffer de extracción Laemmli 1X y homogenizar con pistilo (Martinez-García *et al.*, 1999).

2-Incubar durante 10 min a 95° en un thermomixer.

3-Centrifugar durante 30 min a 14000 rpm y recuperar el sobrenadante.

4-Precipitar las proteínas del sobrenadante en una mezcla de Metanol-Cloroformo (480/160 v/v) y agua (640 mL) (Wessel y Flügge, 1984).

5-Añadir 300 µL de metanol, centrifugar durante 10 min a 14000 rpm y desechar el sobrenadante.

6-Secar el precipitado durante 30 min

7-Resuspender el precipitado de proteínas en 50 µL de buffer de extracción e incubar a 95 grados por 10 min.

Una vez extraídas las proteínas se cuantificaron por colorimetría para validar que la extracción fue exitosa. Se empleó el método de Bradford (Tsaffrir y Selinger, 1996) y los ensayos se realizaron por triplicado. La absorbancia se midió a 595 nm de longitud de onda.

Posteriormente se verificó por electroforesis SDS-PAGE el 15% que las proteínas no se hubieran degradado y se tiñó el gel con Coomasie blue (Laemmli, 1970). Una vez verificada la integridad, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa empleando un buffer de lavado de Western blot (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% isopropanol) durante 60 min a 360 mA. Finalmente, esta membrana se tiñó con rojo

Ponceau (0.2% p/v Ponceau S en 5% (v/v) ácido acético) durante 5 min para validar la transferencia y luego de desteñirla aplicar solución fijadora durante 1 h.

Para realizar la detección con anticuerpos, la membrana se bloqueó durante 1 h para posteriormente aplicar el anticuerpo primario por una hora a 4C. Luego se lavó la membrana con buffer TBST para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa (Tabla 1). Finalmente, se reveló la membrana utilizando sustrato concentrado y un tiempo de exposición de 5 min en un equipo QUIMI 4.2. Para la detección del 20S, Rpn10 y Rpn 1 se siguió el protocolo anteriormente descrito pero el revelado se realizó con el sustrato diluido 1:5, 1:10, 1:10 respectivamente. Una vez obtenidas las imágenes mediante ImageJ se cuantificó la presencia de las proteínas de interés.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados.	
Anticuerpos Primarios (1:10000)	Anticuerpo Secundario (1:5000)
Mouse-anti-Ubiquitin antibody (Cat. Sc-9133, Santa Cruz Biotechnology)	HRP-goat-anti-mouse IgG (H+L) (Cat. 12-349, Zymed)
Rabbit-anti-20S antibody	HRP-goat-anti-rabbit IgG (H+L)
Rabbit-anti-Rpn10 antibody	
Rabbit-anti-Rpn1 antibody (Cat. 98865)	

6.4 Cuantificación del contenido de trehalosa en raíces

Para la extracción de trehalosa en raíz completa se emplearon 200 mg de tejido fresco de raíz (correspondientes a 5 individuos) que se maceraron en nitrógeno líquido y se resuspendieron en 1 mL de Etanol 80% (v/v). Posteriormente se incubaron a 80°C durante 5 min y se centrifugaron a 14000 rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se secó en un Savant y posteriormente se resuspendió en 250 µL de agua estéril grado HPLC y se filtró empleando filtros de nylon de 0.2 µm (Vázquez-Ortiz y Valenzuela-Soto, 2006). Las muestras se analizaron empleando una columna Supelcosil LC-NH2 (Sigma Aldrich) con una fase móvil de acetonitrilo:agua (80:20 v/v) y un flujo de 1mL/min. Se realizó un estándar a 5 mg/mL de los azúcares: Glucosa, Fructosa, Sacarosa, Maltosa, Galactosa, Trehalosa, Arabinosa y Manosa. Para la construcción de la curva de calibración se tomaron 3, 6, 9 y 12 µL de volumen de esta mezcla. Las determinaciones se realizaron por triplicado empleando un volumen de inyección de 10 µL. El precipitado obtenido de la extracción se secó a 40° durante 24 h y se determinó el peso seco. Para la cuantificación de azúcares por fragmentos se emplearon igualmente 200 mg de tejido fresco correspondientes a las diferentes zonas de la raíz de una aproximado entre 30 y 40 individuos.

6.5 Análisis histológico de las raíces

Para el análisis histológico, se colectaron raíces y se cortaron en dos secciones de un centímetro cada una, correspondientes al ápice y la zona de elongación. Cada sección se cortó completamente de forma transversal y se fijó durante 48 h en refrigeración en una solución de Etanol: Ácido Acético (1:1 v/v). Una vez fijadas las muestras se tiñeron con azul de Toluidina al 0.05% (p:v), que presenta gran afinidad por los componentes ácidos, durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron para eliminar el exceso de colorante con agua destilada abundante (Parker *et al.*, 1982). Todas las muestras se montaron en un portaobjetos y se observaron al microscopio con un aumento de 4x. Se tomaron fotografías de cada corte y posteriormente se analizaron empleando el programa RootScan (versión 2.4). De todos los parámetros obtenidos se tomaron en cuenta solamente ocho que previamente han sido relacionados con condiciones estresantes por sequía o deshidratación:

- Área sección transversal
- Área cortical total
- No. de filas de células corticales
- Área estela
- Área xilema
- Área estela/Área total
- Área estela/Área cortical

De los parámetros inicialmente seleccionados se descartó el área del xilema del análisis por mostrar valores idénticos en ambas líneas.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron transferidos a una base de datos de Excel y posteriormente calculadas las medias y desviaciones estándares correspondientes. El análisis estadístico se realizó en el programa R (versión 3.6.1) y las gráficas se construyeron con el programa Excel. Se comprobó en todos los casos la normalidad y homogeneidad de varianza para determinar si los análisis serían paramétricos o no. Para las comparaciones entre líneas se empleó una prueba t de Student y para las comparaciones múltiples se emplearon ANOVA. En todos los casos se tuvo en cuenta un nivel de significancia mayor a 0.05.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de las dos líneas analizadas tienen porcentajes elevados de germinación (NVOL: 69.4% y SNLP: 90%). La línea débil ($\leq 39^\circ$), mostró tiempos medios de germinación mayores que NVOL (4 y 3 d, respectivamente) (Figura 5). Esto pudo deberse al hecho de que el almacenamiento de las semillas durante tiempos prolongados provoca disminución del vigor, así como retraso en la germinación (Simic *et al.*, 2007).

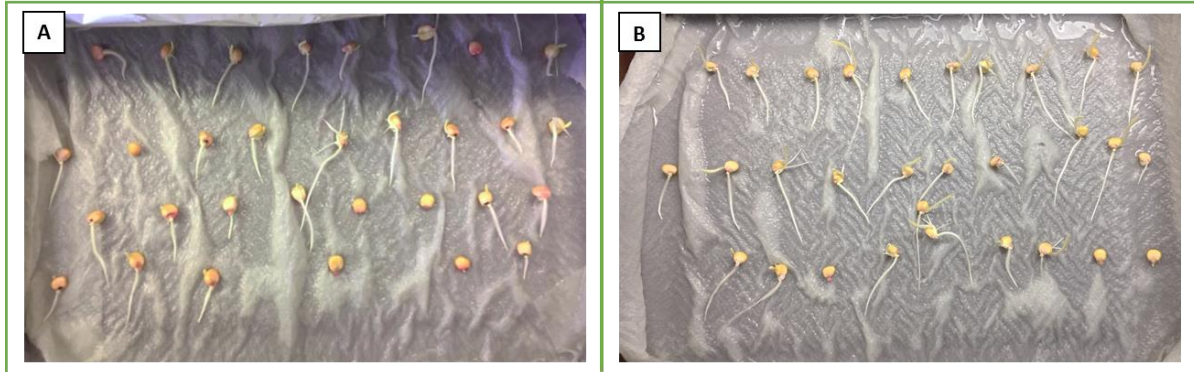


Figura 5. Porcentajes de germinación de las líneas robusta (A) y débil (B) después de 3 d a 26 ° C en la oscuridad.

7.1 Cuantificación de proteínas ubiquitinadas, subunidades reguladoras del proteasoma y centro catalítico.

Una parte de las semillas germinadas se colectaron y el resto se colocaron en el sistema para inducir en el reto hidrotrópico por 6, 12 y 24 h. Luego de esos tiempos se cortaron las raíces con una navaja y se extrajeron proteínas totales que fueron posteriormente cuantificadas (Tabla 2).

Robusta						
Germinación	6 h Control	6 h K ₂ CO ₃	12 h Control	12 h K ₂ CO ₃	24 h Control	24 h K ₂ CO ₃
13.59	28.26	25.12	24.09	21.85	27.01	29.38
30.92	31.01	30.88	20.90	20.56	26.15	30.19
31.14	26.62	22.06	21.63	17.85	34.24	26.41
30.75	20.30	25.85	24.90	23.23	35.61	29.20
40.26	26.49	32.73	25.29	27.70	32.99	31.74
28.90	28.77	31.87	20.84	25.16	26.67	28.86
30.92	28.82	30.11	16.77	23.01	36.86	32.09
34.49	20.60	29.46	28.17	20.65	30.58	29.12
Débil						
Germinación	6 h Control	6 h K ₂ CO ₃	12 h Control	12 h K ₂ CO ₃	24 h Control	24 h K ₂ CO ₃
17.89	16.43	19.40	22.32	19.14	28.77	24.95
16.39	9.59	22.80	21.81	23.83	20.17	17.98
16.00	19.87	25.51	19.01	21.94	21.42	22.24
14.54	19.14	19.35	23.10	20.47	25.20	25.43
16.04	18.92	18.97	21.08	22.58	30.45	20.69
10.88	19.23	14.75	20.47	16.34	22.24	22.28
13.55	17.25	13.42	18.80	16.90	20.13	18.28
22.80	22.54	19.05	18.49	20.26	19.05	19.40

Una vez que fue determinada la concentración de proteínas, se verificó el patrón de proteínas totales entre líneas y en los tratamientos. Posteriormente se transfirieron las muestras a una la membrana de nitrocelulosa. Se pudo observar que el patrón general de proteínas totales se mantiene y que existen pocas variaciones entre las dos líneas y tratamientos (reto hidrotópico con solución de K_2CO_3 y condición control con agua) (Figura 7). Las ligeras diferencias observadas pueden ser atribuidas a variaciones individuales intrínsecas.

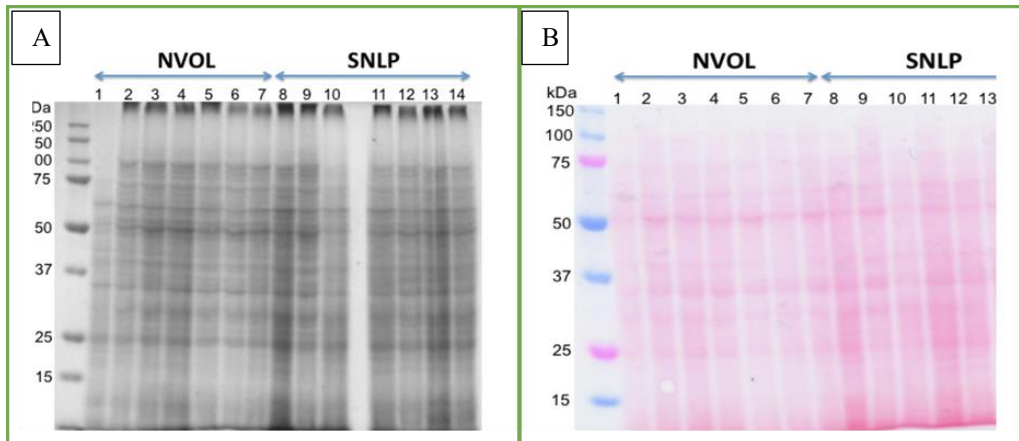


Figura 6. Patrón de proteínas totales extraídas de raíces completas 3 d después de la imbibición de las semillas de la línea con respuesta hidrotópica robusta (NVOL) y débil (SNLP). (A): Gel SDS-PAGE y (B): membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau. Cada carril corresponde a una raíz completa. PPM: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totales.

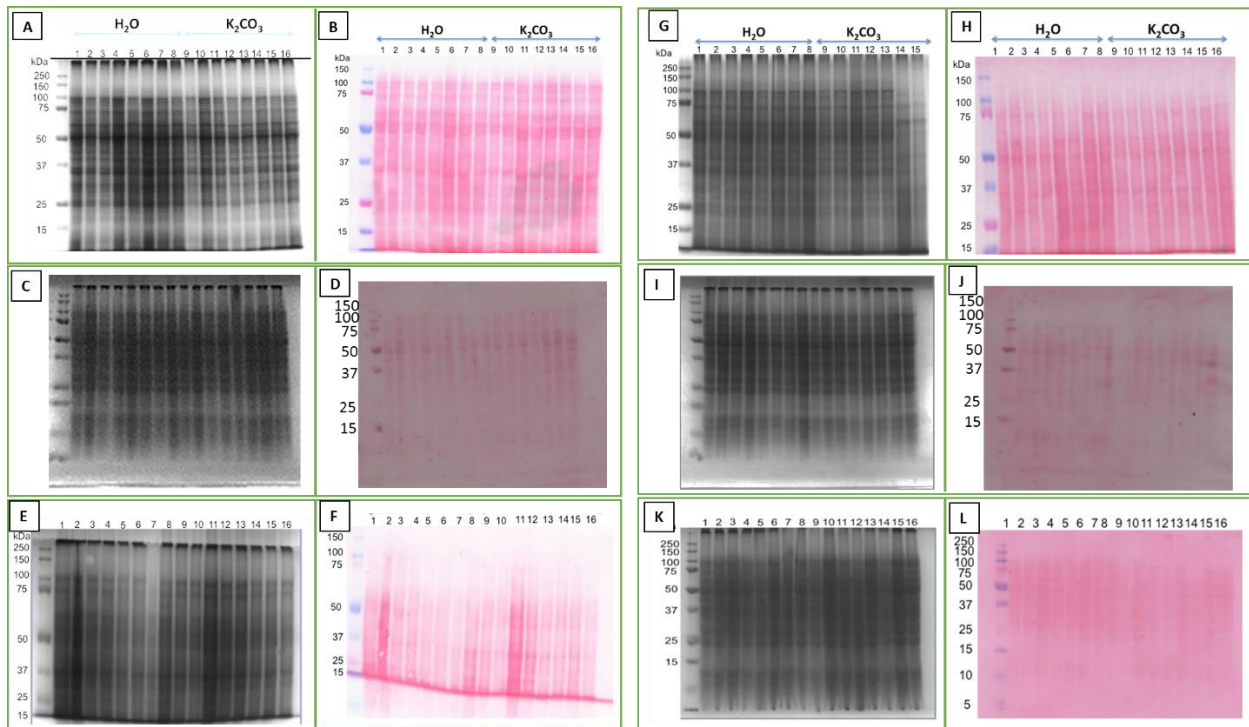


Figura 7. Patrón de proteínas totales extraídas de raíces completas de la línea con respuesta hidrotópica

robusta (NVOL) (A-F) y débil (SNLP) (G-L)) expuestas a reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) por 6 h (A, B, G y H), 12 h (C, D, I, J) y 24 h (E, F, K, L). Cada carril corresponde a una raíz completa. PPM: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totales.

Se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección utilizando anticuerpos contra ubiquitina para las muestras de ambas líneas 3 días después de la imbibición (Figura 8). Es posible apreciar que ambas líneas presentan patrones similares con un gran número de proteínas poli-ubiquitinadas. Eso sugiere que durante la germinación no existen diferencias apreciables entre ellas.

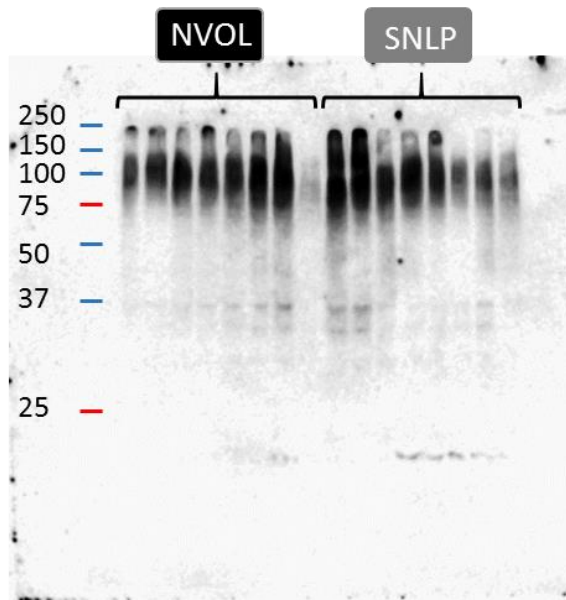


Figura 8. Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotópica robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de 3 d de la imbibición de la semilla (NVOL carriles 1-8) (SNLP carriles 9-16).

El ensayo de Western-blot luego de 6 h de reto hidrotópico mostró diferencias entre ambas líneas, siendo NVOL el que presenta mayor grado de ubiquitinación a este tiempo. Sin embargo, no existen diferencias en el patrón de ubiquitinación de las plántulas de la misma línea en condiciones control (con agua) respecto a la condición con K_2CO_3 (Figura 9). Es posible apreciar que, en comparación con los datos observados en raíces a 3 d de la imbibición, desaparecen algunas proteínas altamente poli-ubiquitinadas en ambas líneas, por lo que si se observan cambios quizás se debe a la manipulación de las plántulas al someterlas a los tratamientos (reto hidrotópico o control).

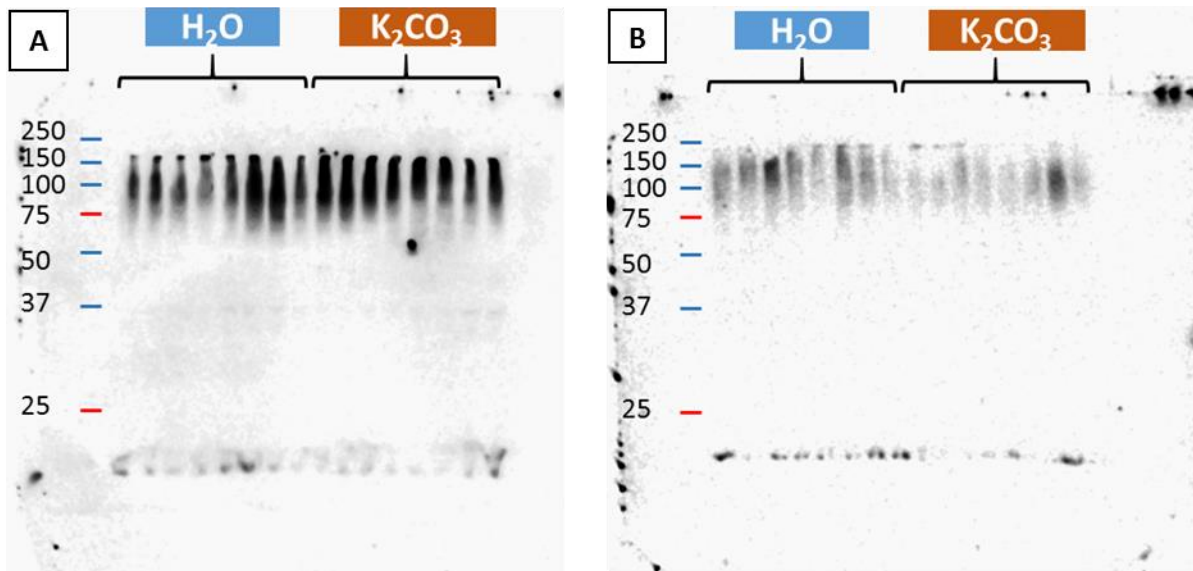


Figura 9. Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotónica robusta (A) y débil (B) después de 6 h en condiciones control (agua) y en reto hidrotónico (solución de K_2CO_3).

Luego de 12 horas de reto los cambios más apreciables se observaron en SNLP donde aparecen proteínas con un alto grado de ubiquitinación que estaban ausentes a las 6 h. No obstante, no se observan diferencias entre aquellas sometidas a reto o en condiciones control (Figura 10).

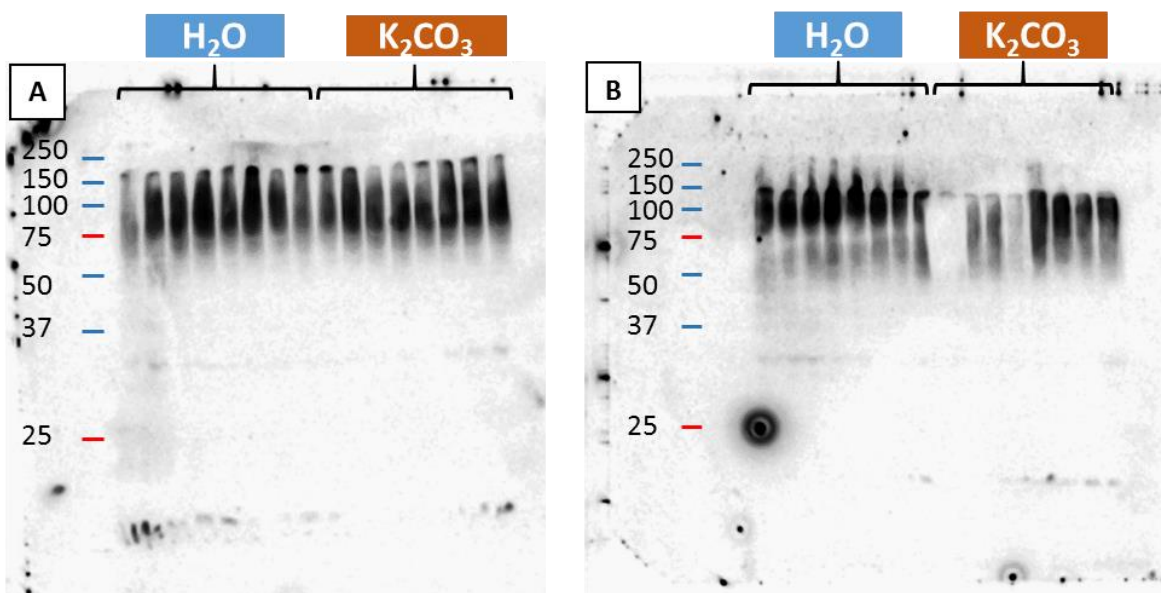


Figura 10. Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotónica robusta (A) y débil (B) después de 12 h en condiciones control (agua) y en reto hidrotónico (solución de K_2CO_3).

K₂CO₃).

Los ensayos de Western-blot realizados después de 24 h mostraron que el aumento en el tiempo de exposición al reto hidrotrópico causa una disminución en la cantidad de complejos de poli-ubiquitina (Figura 11), esta diferencia se reafirma con los controles de cargas de la membrana teñida con Ponceau (Figura 7). Esto sugiere que el sistema para la degradación de proteínas mediado por el proteasoma 26S podría activarse como consecuencia de un aumento en los tiempos de exposición al estrés. Sin embargo, no se detectan diferencias entre ambas condiciones (agua y solución de K₂CO₃).

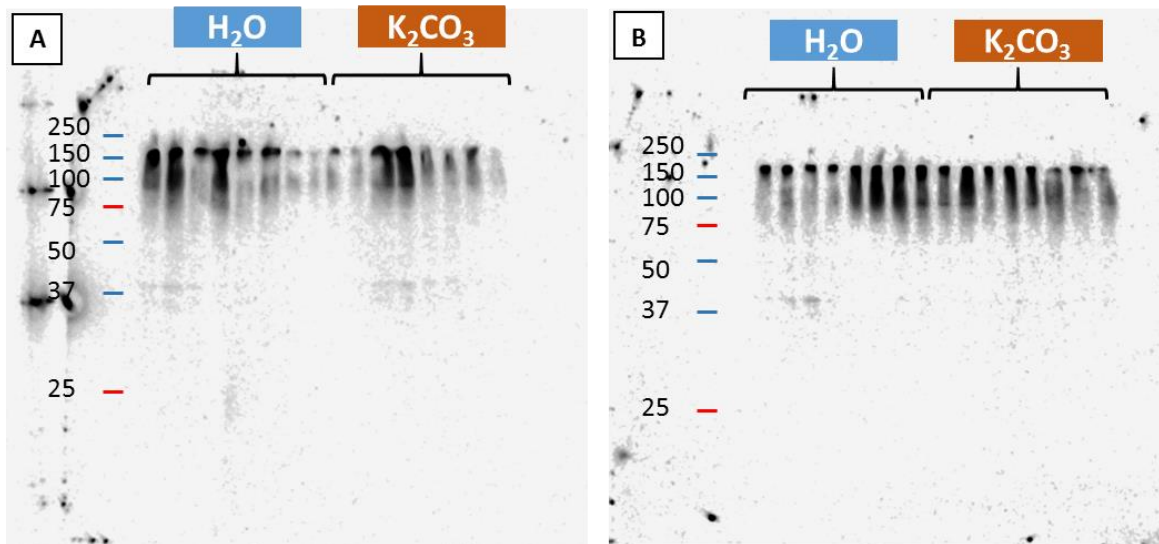


Figura 11. Perfil de proteínas ubiquitinadas en la raíz completa de las líneas con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de 24 h en condiciones control (agua) y en reto hidrotrópico (solución de K₂CO₃).

La ausencia de diferencias entre condiciones fisiológicas puede deberse al hecho de que se tomó la raíz completa para la extracción de proteínas totales y no secciones correspondientes a diferentes zonas. Por esta razón se procedió a realizar los ensayos dividiendo la raíz en secciones correspondientes al ápice/cofia (1. primer centímetro de raíz) y zona de elongación (2. segundo centímetro). De igual forma se cuantificaron las proteínas totales y se realizaron la electroforesis y transferencia a membrana (Tabla 3 y Figura 12).

Tabla 3. Determinación de la concentración de proteínas totales ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) extraídas de fragmentos de raíces de ambas líneas después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (H_2O) y reto hidrotrópico (solución de K_2CO_3).							
Robusta							
Zona	Germinación	6 h Control	6 h K_2CO_3	12 h Control	12 h K_2CO_3	24 h Control	24 h K_2CO_3
Ápice	45.94	29.94	42.54	40.09	42.97	29.76	36.73
Elongación	28.00	21.76	21.29	20.22	22.84	18.28	16.73
Débil							
Zona	Germinación	6 h Control	6 h K_2CO_3	12 h Control	12 h K_2CO_3	24 h Control	24 h K_2CO_3
Ápice	29.16	39.53	28.47	33.25	35.91	32.73	30.75
Elongación	18.67	21.72	17.08	19.53	20.60	16.82	17.94

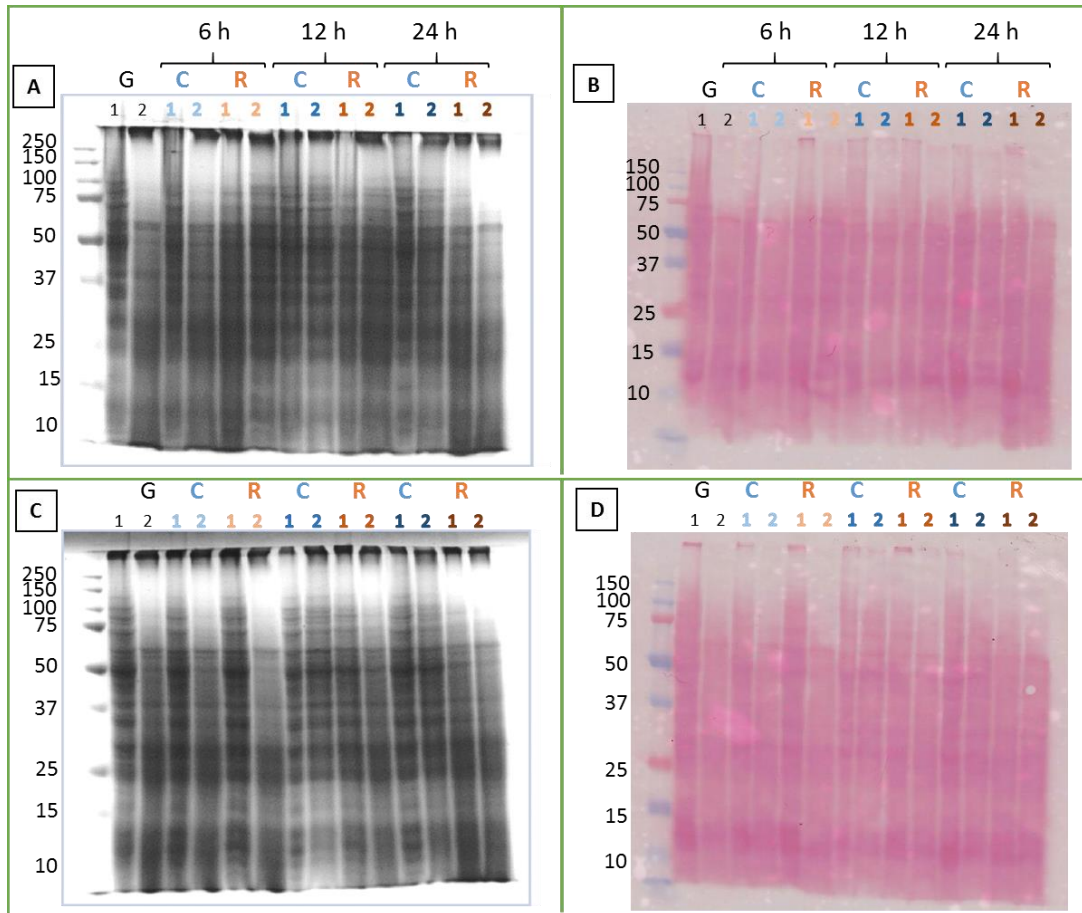


Figura 12. Patrón de proteínas totales extraídas de fragmentos de raíz de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A y B) y débil (C y D) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución de K_2CO_3) (1: ápice, 2: zona de elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotrópico). (A y C): Gel SDS-PAGE y (B y D): membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau. PPM: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories). Se cargaron $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totales.

El ensayo de Western blot utilizando segmentos de distintas partes de la raíz muestra diferencias entre condiciones experimentales que al analizar la raíz completa no eran apreciables (Figura 13). Ambas líneas mostraron ubiquitinación dependiente del fragmento; siendo el fragmento correspondiente al ápice (1) mayoritariamente ubiquitinado en complejos de alto peso molecular mientras que el fragmento

correspondiente a la zona de elongación (2) ubiquitinado en proteínas de alto y mediano peso molecular. En el caso de la línea robusta (Figura 13A) los cambios más contrastantes entre condiciones experimentales se dan luego de 6 h de exposición a K_2CO_3 mostrando que la zona de elongación presenta mayor grado de ubiquitinación que el ápice, contrario a lo que sucede en agua.

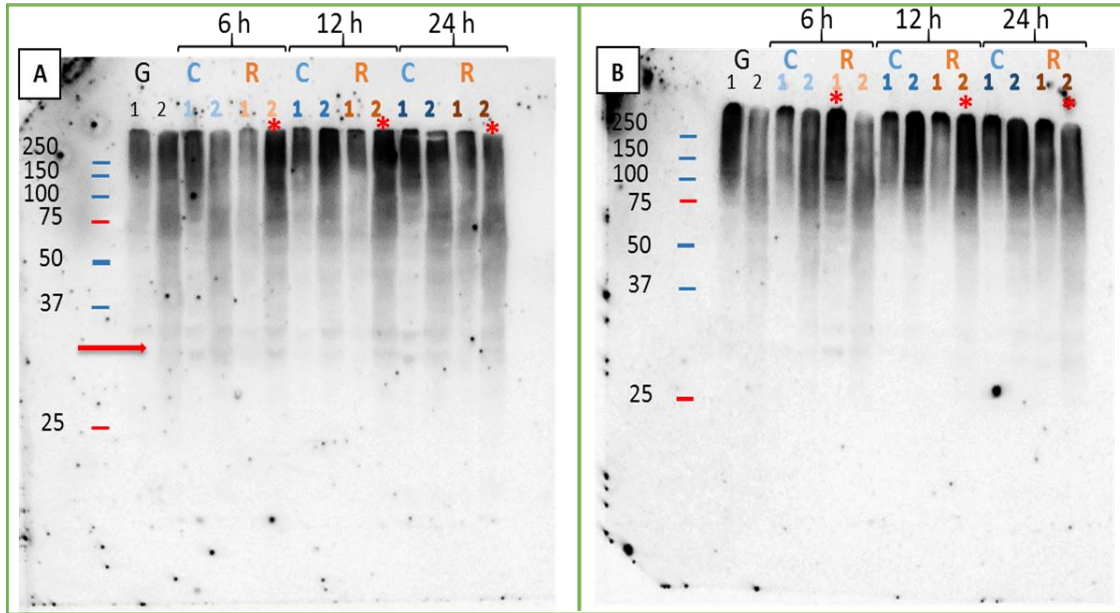


Figura 13. Perfil de proteínas ubiquitinadas en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) (1: Ápice, 2: Zona de Elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotópico).

Luego de 12 h de exposición el fragmento 2 presenta igualmente mayor grado de ubiquitinación y en el fragmento correspondiente al ápice se observan complejos de ubiquitina de alto peso molecular que no eran evidentes después de 6 h. Tras 24 h las diferencias entre condiciones ambientales no son tan apreciables. En todos los casos se observa una banda entre 37 y 25 KDa. En el caso de la línea débil (Figura 13B), contrario de lo que sucede con la robusta a 6 h de exposición, se pudo observar que en presencia de K_2CO_3 las proteínas del ápice se ubiquitan preferencialmente, mientras que a 12 y 24 h de exposición se pudo observar un patrón similar al descrito anteriormente para la robusta. En el caso de la línea débil solo se observa la banda entre 37 y 25 KDa para el fragmento correspondiente al ápice después de 6 h de reto.

Una vez obtenidos los patrones de ubiquitinación era necesario analizar la presencia el centro catalítico de proteasoma para verificar si efectivamente el sistema para la degradación de proteínas mediado por el proteasoma se estaba activando como consecuencia de los tiempos de exposición. El ensayo mostró que para ambas líneas el

fragmento correspondiente al ápice muestra mayor activación del 20S que la zona de elongación, siendo estas diferencias más marcadas en los primeros tiempos (germinación y 6 h). Adicionalmente, el aumento en los tiempos de exposición efectivamente provoca mayor activación ya que a partir de 12 h no se observan diferencias entre fragmentos; sin embargo, para la línea débil existe mayor activación que para la robusta (Figura 14).

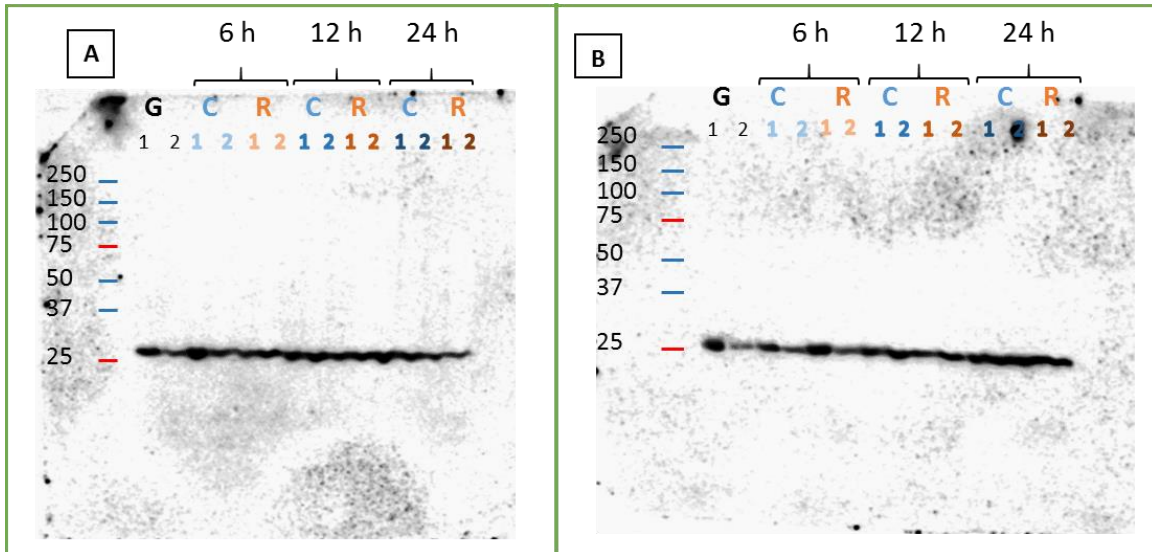


Figura 14. Perfil de subunidades α del centro catalítico del proteasoma 20S en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) (1: Ápice, 2: Zona de Elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotópico).

El hecho de que en la línea robusta no existan diferencias después de 24 h de reto con respecto a las 12 h pudiera indicar que el mecanismo de degradación de proteínas mediado por el 20S no es necesario ya que las plántulas están evitando el estrés debido a la eficiente curvatura de la raíz hacia condiciones de disponibilidad de agua. Por su parte, la incapacidad de la línea débil para curvar sus raíces provoca la constante exposición a condiciones estresantes y por tanto el aparente daño a las macromoléculas como proteínas y su marcaje para degradación por el 20S. Se ha demostrado que en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés por patógenos elicitores ocurre una acumulación rápida del 20S, específicamente de las subunidades $\beta 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 6$ (Suty *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando son sometidas a 150 mM de NaCl los análisis de microarreglos mostraron una regulación negativa de la expresión del 20S y el 19S, aunque positiva de enzimas tipo E3 y de 7 de los 8 genes de síntesis de trehalosa (Jiang y Deyholos; 2006).

Luego de obtener los perfiles de proteínas ubiquitinadas y de la expresión de subunidades del centro catalítico del proteasoma, consideramos analizar si el sistema para la degradación que estaba interviniendo durante la respuesta hidrotrópica era el 26S. Por esa razón se evaluaron algunas subunidades de la partícula reguladora 19S tales como Rpn10 y Rpn1 involucradas en la captura de sustratos ubiquitinados.

Se pudo observar que para la subunidad Rpn10 existen diferencias entre líneas, que son más fuertes después de 6 h y 24 h en reto hidrotrópico (Figura 15). Aunque desde el momento de la germinación se observa una señal más fuerte para la línea robusta, ambas líneas muestran mayor señal de Rpn10 en el fragmento correspondiente al ápice. No obstante, después de 6 h este patrón cambia para la línea robusta sometida a reto hidrotrópico donde se observa mayor intensidad de la señal en la zona de elongación (Figura 15A). Esto pudiera ser indicativo de una detección temprana de la señal de estrés y por tanto de un alto en el crecimiento y mayor protección de la zona de elongación. Por su parte la línea débil (SNLP) no muestra cambios en comparación al control después de 6 h, lo que puede sugerir una detección tardía de la condición de estrés (Figura 15B). Después de 12 h la línea débil sigue manteniendo un comportamiento similar al control, mientras que la robusta mantiene marcadas diferencias entre condiciones y fragmentos. Después de 24 h de reto hidrotrópico la señal prácticamente desaparece en la línea robusta mientras que en la línea débil se hace más intensa, especialmente el fragmento correspondiente al ápice probablemente como resultado de una detección tardía de la condición de estrés y de daño en la zona de detección de la señal.

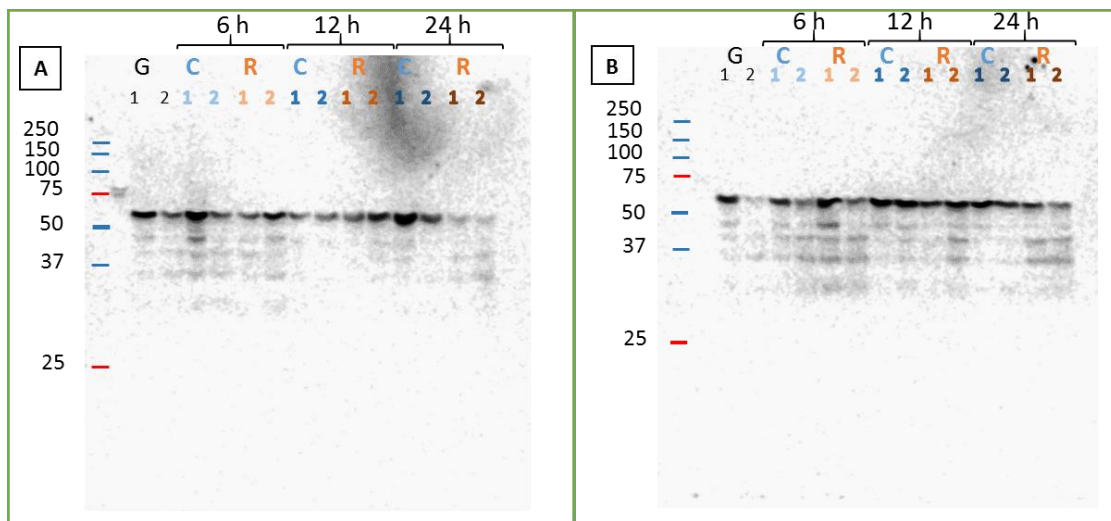


Figura 15. Perfil de la subunidad Rpn10 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto

hidrotrópico (solución de K_2CO_3) (1: ápice, 2: zona de elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotrópico).

Adicionalmente, se analizó el perfil de la subunidad Rpn1 también involucrada en la captura de sustratos ubiquitinados. En este caso la mayor intensidad de la señal se observó en la línea robusta en comparación con la débil; sin embargo, en ambos casos se verificó un patrón de alternancia de señales donde la mayor intensidad se presentó en el fragmento correspondiente a la zona de elongación (Figura 16), aunque después de 24 h de reto hidrotrópico en la línea robusta dicha señal disminuyó (Figura 16A). El cambio en la señal de Rpn1 observada en la zona de elongación de la línea robusta a los dos diferentes tiempos analizados (6 y 24 h) podría deberse a que después de 6 h de reto hidrotrópico los procesos de captura de proteínas ubiquitinadas son más importantes, ya que a podrían participar activamente en los procesos de adaptación al estrés junto con el desarrollo de la curvatura hidrotrópica. Cabe mencionar, que en la mayoría de las líneas Drought Tolerant Maize for Africa (DTMA), la curvatura hidrotrópica se observa por lo general después de 6 h de hidroestimulación. Además, para clasificar la respuesta en robusta o débil decidimos tomar la curvatura después de 24 h de reto hidrotrópico, ya que algunas líneas débiles se tardaban entre 8-24 h en alcanzar la curvatura final. De ahí que después de 12 h, tanto en condiciones control como de reto hidrotrópico, los niveles de Rpn1 son similares, lo que pudiera reflejar que la raíz hidroestimulada de la línea NVOL ya se adaptó a las condiciones de estrés y fue competente para desarrollar una curvatura robusta. Dicho patrón no se observa después de 6 h de reto en la línea SNLP con respuesta hidrotrópica débil.

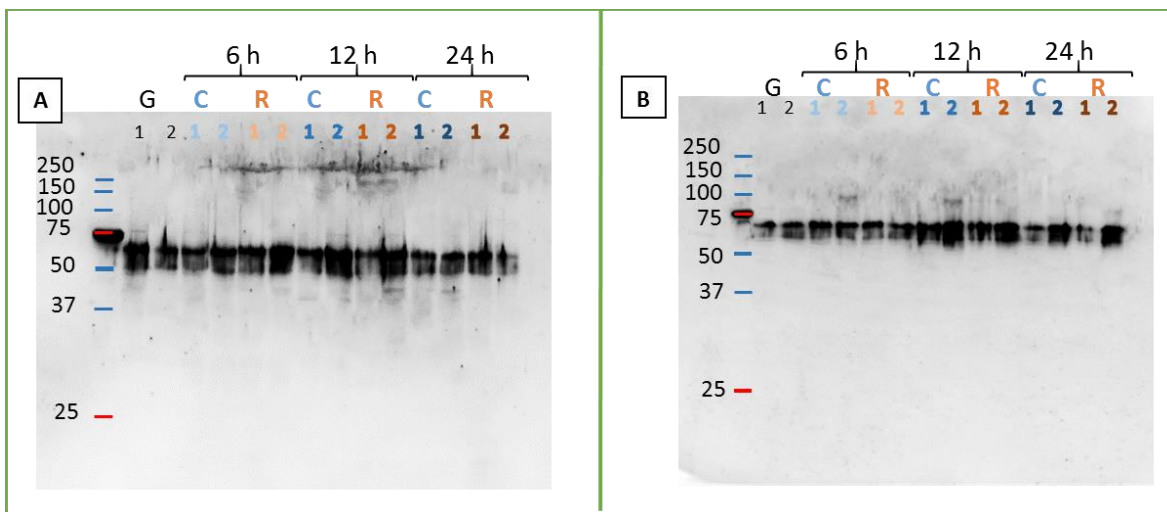


Figura 16. Perfil de la subunidad Rpn1 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea con respuesta hidrotrópica robusta (A) y débil (B) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrópico (solución

de K_2CO_3) (1: ápice, 2: zona de elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotrofico).

Con el objetivo de conocer cuál sistema para la degradación estaba funcionando durante la respuesta hidrotrofica y adicionalmente si existían diferencias teniendo en cuenta la zona de la raíz, se cuantificó la señal obtenida por Western blot empleando el programa Image J (Figuras 17 y 18).

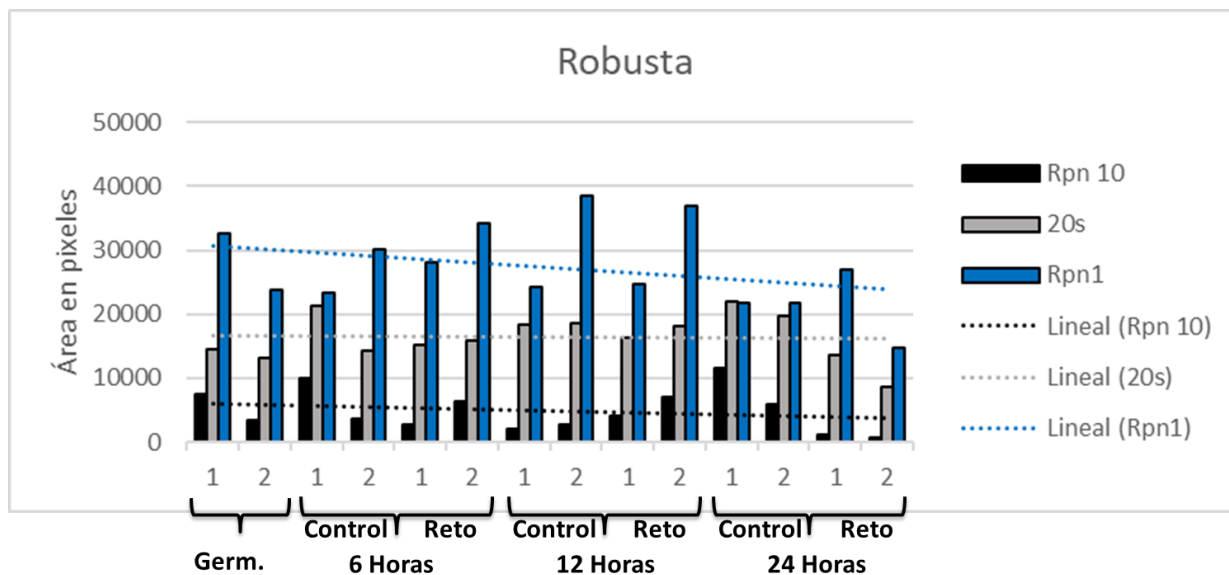


Figura 17. Análisis semicuantitativo por densitometría de las subunidades α del proteasoma 20S y las subunidades Rpn1 y Rpn10 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea robusta después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrofico (solución de K_2CO_3) 1:(Ápice) 2: (Elongación).

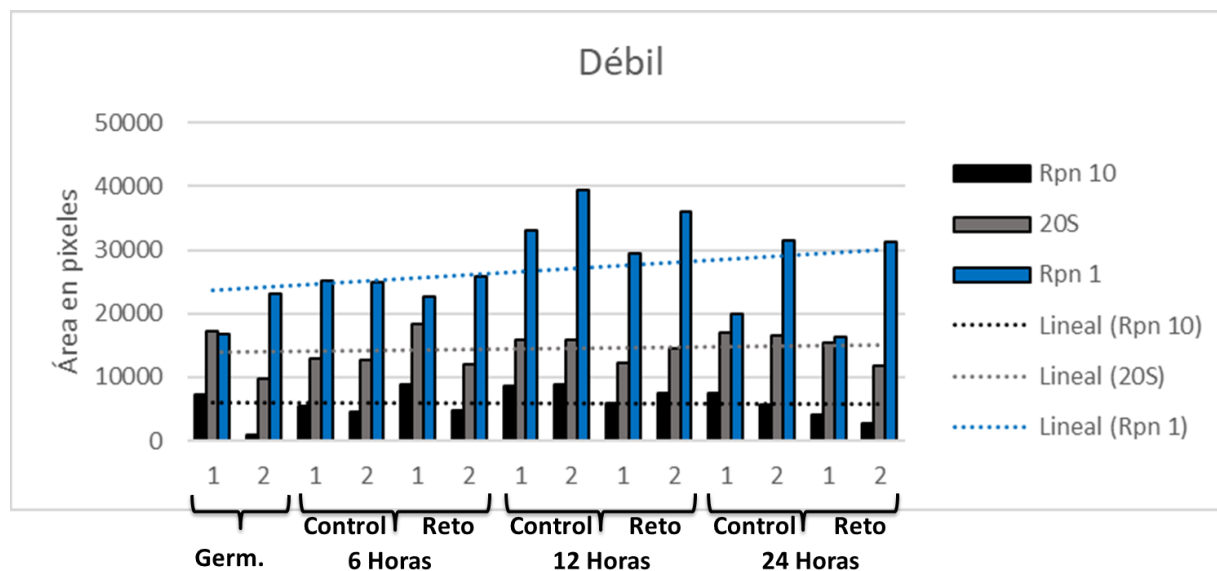


Figura 18. Análisis semicuantitativo por densitometría de las subunidades α del proteasoma 20S y las subunidades Rpn1 y Rpn10 del complejo 19S en fragmentos de raíces de la línea débil después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotrofico (solución de K_2CO_3) 1:(Ápice) 2: (Elongación).

Para conocer con certeza si existe un acoplamiento del 26S en cada una de las zonas

de la raíz sería necesario realizar electroforesis nativas. Sin embargo, este análisis nos permitió saber qué sistema se encontraba activado y si preferentemente estaba ocurriendo bajo las condiciones impuestas, la degradación de proteínas ubiquitinadas o de proteínas oxidadas. Aparentemente en ambas líneas la conformación 26S es la que se encuentra presente y por tanto pudiera sugerir la degradación de proteínas marcadas con ubiquitina. Esta conformación pudiera estar constituida por una o dos subunidades 19S en los extremos.

7.2 Cuantificación de azúcares

La cuantificación de azúcares se realizó empleando HPLC y los tiempos de retención de los diferentes azúcares fueron los mostrados en la Figura 19 (der); a partir de estos se identificaron los que estaban presentes en las muestras.

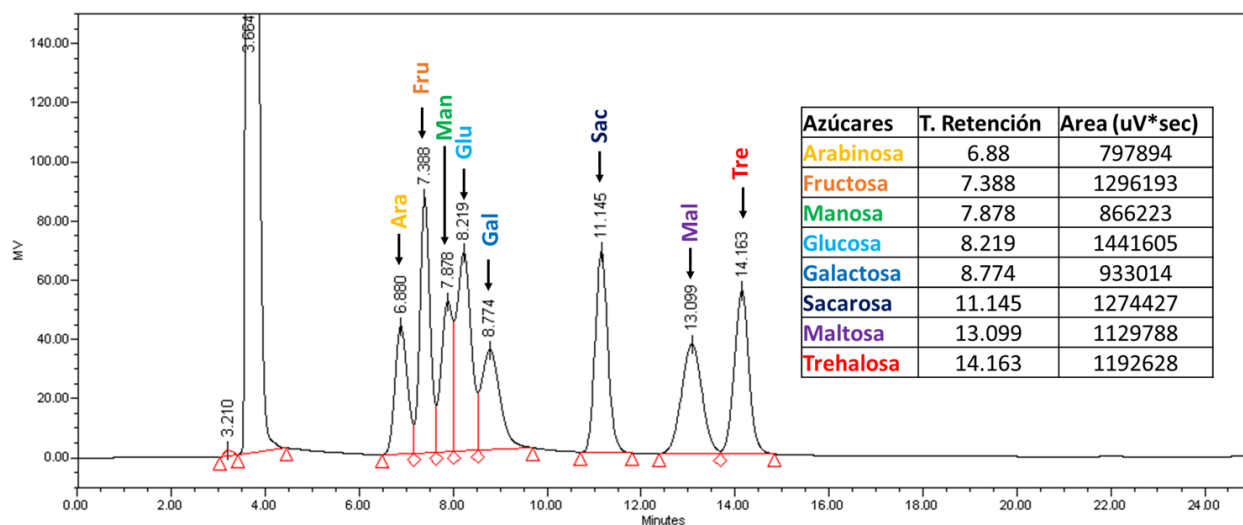


Figura 19. Perfil cromatográfico del estándar empleado para la cuantificación de azúcares por HPLC (izq.) y tiempos de retención obtenidos para cada uno (der).

Adicionalmente se analizaron los valores de peso seco de las muestras de raíz completa (Figura 20) y por fragmentos (Figura 21) y los valores de concentración de azúcares se expresaron en función de estos.

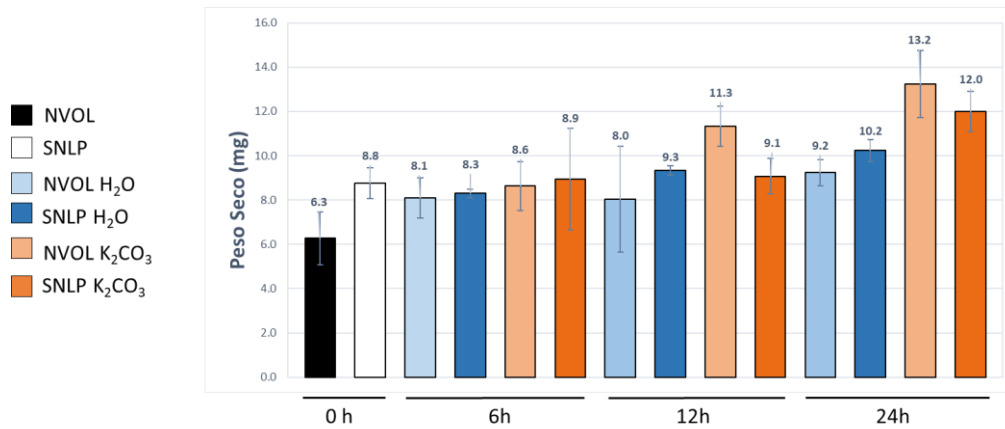


Figura 20. Cambios en la biomasa de raíces de la línea robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K₂CO₃). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=3).

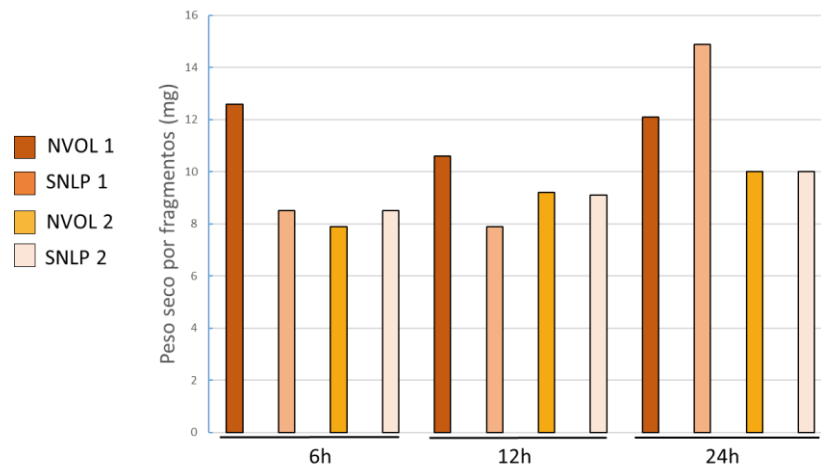


Figura 21. Cambios en la biomasa de fragmentos de raíces de la línea robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de 6 h, 12 h y 24 h en reto hidrotópico (solución de K₂CO₃) (1: ápice, 2: zona de elongación, G: germinación, C: Control, R: reto hidrotópico).

El análisis de estos datos nos permitió observar que el aumento en los tiempos de exposición provoca la deshidratación de los tejidos siendo más fuerte esta respuesta en la línea débil (Figura 20). Al analizar los fragmentos independientes pudimos notar que el aporte más significativo a esta variación era del ápice de la raíz (Figura 21) probablemente porque esta es la zona de percepción del estrés.

El contenido de azúcares entre líneas varía no solamente en concentración sino en composición debido a que en la línea con una respuesta débil no fue posible detectar fructosa en ninguno de los tiempos analizados. Adicionalmente, el contenido de arabinosa y maltosa mostraron comportamientos inversos siendo que para ambos azúcares la concentración en la línea robusta disminuye mientras que para la débil aumenta (Tablas 4 y 5).

Azúcares	Germinación	Control 6h	K_2CO_3 6h	Control 12h	K_2CO_3 12h	Control 24h	K_2CO_3 24h
Arabinosa	9.01	0.29	5.67	0.44	0.45	0.43	0.59
Fructosa	0.16	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	1.86
Sacarosa	2.35	3.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Maltosa	28.02	15.74	0.75	0.58	0.64	0.65	0.69

Azúcares	Germinación	Control 6h	K_2CO_3 6h	Control 12h	K_2CO_3 12 h	Control 24h	K_2CO_3 24 h
Arabinosa	0.69	0.83	0.88	0.77	1.01	1.99	2.16
Sacarosa	0.16	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.19
Maltosa	0.87	0.78	0.83	0.74	1.07	0.77	0.68

Al analizar la concentración de trehalosa pudimos observar que la condición de reto hidrotrópico favorece el aumento en la concentración de este azúcar para ambas líneas. Sin embargo, los valores más altos se encontraron en la línea con una respuesta robusta (NVOL) que después de 24 h mostró un aumento de 10 veces en la concentración (Figura 22).

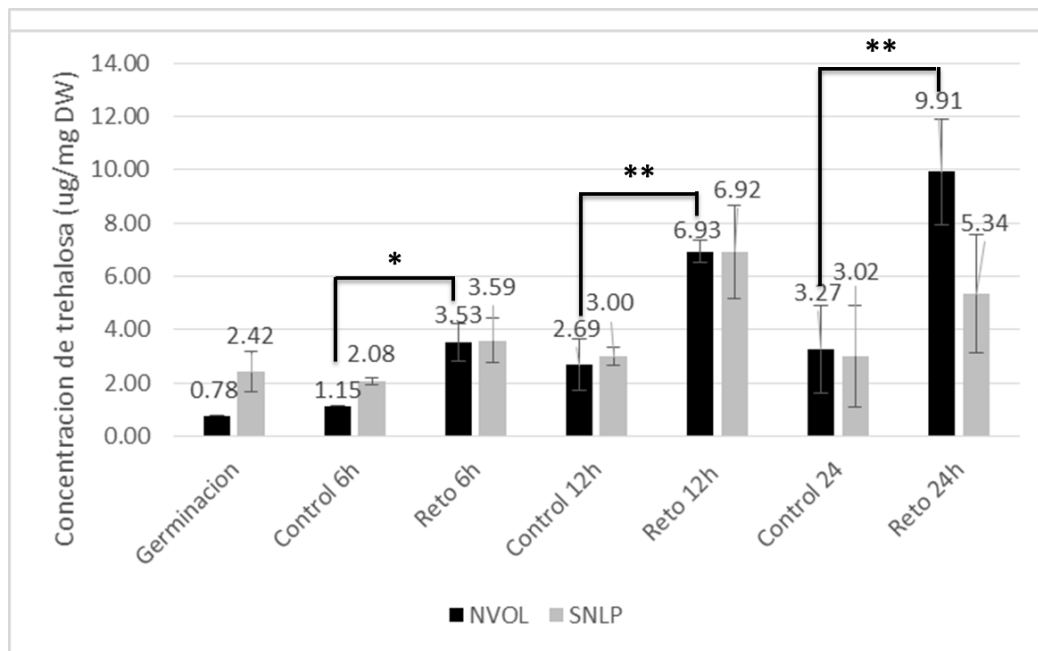


Figura 22. Comparación de los niveles de concentración de trehalosa en raíces con respuesta hidrotrópica robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de la germinación, 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotrópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar ($n=3$) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Este resultado indica que si existe una relación entre la respuesta hidrotrópica y la concentración de trehalosa que puede estar involucrada en la capacidad de conferir tolerancia a condiciones de gradiente de humedad y de sequía. Si comparamos los valores obtenidos en nuestras líneas con los reportados en plantas de resurrección como *S. lepidophylla* se podría decir que son bastante discretos; no obstante, teniendo en cuenta la poca abundancia de este azúcar en otras plantas cultivadas podemos afirmar que la trehalosa favorece la tolerancia. Al compararlos con otras especies de plantas tolerantes como *Sporobolus atrovirens* podemos notar que nuestros valores son tres veces mayores que los reportados por Iturriaga *et al.* 2000 (3.18 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW). Velázquez-Márquez *et al.* (2015) estudiaron los niveles de este azúcar en líneas de maíz tolerantes a condiciones extremas de sequía (30 $\mu\text{mol}/\text{g}$ FW en -1,5 MPa de potencial hídrico en el suelo) y obtuvieron un aumento de tres grados de magnitud respecto al valor inicial. En este caso los valores obtenidos aumentaron 8 veces respecto al momento de la germinación y tres veces respecto al control para ese tiempo (24 h).

Tabla 6. Determinación de la concentración de azúcares solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) extraídos de fragmentos de raíces de NVOL luego de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones de reto hidrotrópico (solución de K_2CO_3) (1: Ápice y 2: Zona de Elongación).

Azúcares	1 6h K_2CO_3	2 6h K_2CO_3	1 12h K_2CO_3	2 12h K_2CO_3	1 24h K_2CO_3	2 24h K_2CO_3
Arabinosa	0.78	0.30	0.33	0.11	0.15	0.00
Fructosa	0.00	0.00	0.00	8.18	16.01	7.86
Manosa	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Glucosa	0.00	0.00	0.00	29.35	33.34	27.11
Sacarosa	0.00	0.00	0.00	1.46	9.15	3.41
Maltosa	0.00	0.00	0.00	0.71	1.69	0.78

Tabla 7. Determinación de la concentración de azúcares solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) extraídos de fragmentos de raíces de SNLP después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones de reto hidrotrópico (solución de K_2CO_3) (1: Ápice y 2: Zona de Elongación).

Azúcares	1 6h K_2CO_3	2 6h K_2CO_3	1 12h K_2CO_3	2 12h K_2CO_3	1 24h K_2CO_3	2 24h K_2CO_3
Arabinosa	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.09
Fructosa	15.57	6.09	10.35	2.35	8.39	3.15
Manosa	0.00	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00
Glucosa	30.99	22.16	24.95	14.04	20.70	14.90
Sacarosa	0.70	0.60	8.67	2.56	11.61	3.93
Maltosa	1.31	0.72	1.32	0.64	1.46	0.55

Al observar los valores de concentración de azúcares por fragmentos observamos que el ápice, el cual está involucrado en la percepción de la señal, acumula mayor cantidad de azúcares en comparación con el fragmento 2 (zona de elongación) en la línea con una respuesta débil (Tabla 7), mientras que para la línea con respuesta robusta esto se observa hasta las 6 y 24 h, aunque no a las 12 h de exposición al reto hidrotópico (Tabla 6). Estos cambios en la concentración pudieran estar relacionados con una respuesta de crecimiento que favorece la curvatura hacia las zonas de mayor gradiente de humedad.

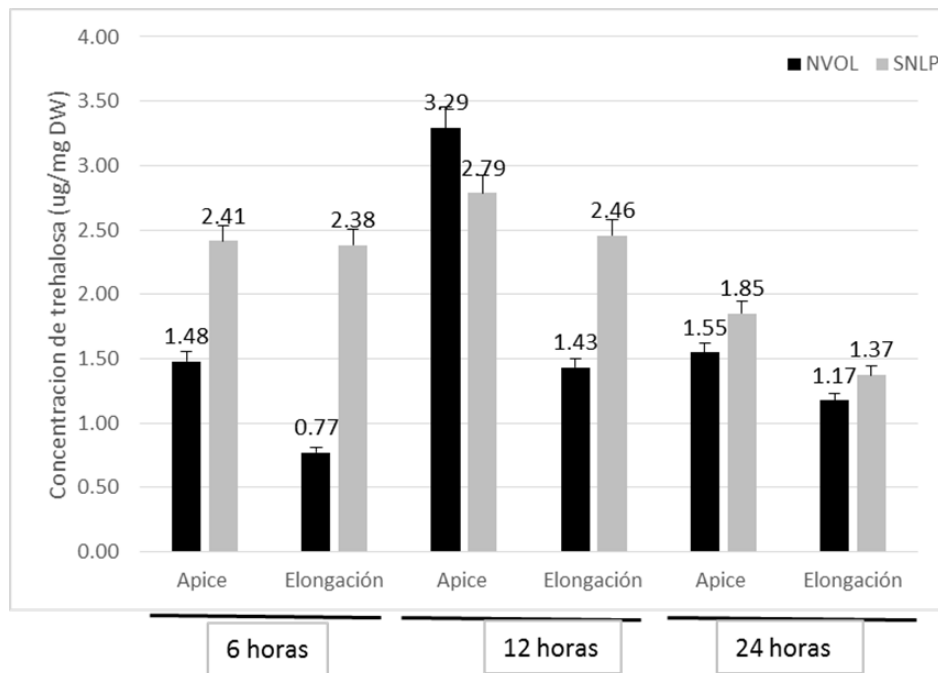


Figura 23. Comparación de los niveles de concentración de trehalosa en fragmentos de raíces con respuesta hidrotópica robusta (NVOL) y débil (SNLP) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones de reto hidrotópico (solución de K_2CO_3).

Si analizamos los niveles de trehalosa por fragmentos podemos observar que igualmente el fragmento involucrado en la percepción presenta niveles mayores de concentración de trehalosa que los de la zona de elongación lo que podría apuntar que la función de este azúcar es la de osmoprotector durante el reto hidrotópico. La mayor concentración en la línea con una respuesta débil podría deberse a la manipulación mayor de estas muestras en comparación a cuando se trata la raíz completa. Sin embargo, este análisis debería repetirse con el fin de validar los resultados obtenidos.

7.3 Cambios morfológicos

Al observar los datos obtenidos de las variables inicialmente evaluadas, se decidió descartar el área del xilema ya que los valores eran exactamente iguales entre líneas, tratamiento y tiempos. Con relación al aerénquima, no se observó en ninguna de las líneas ni en ningún tiempo evaluado. La formación de aerénquima ha sido previamente relacionada con condiciones de estrés. Especialmente, bajo condiciones de estrés por sequía se induce la muerte celular programada de las células corticales como mecanismo para disminuir el costo metabólico. Ensayos previos habían descrito que en líneas con respuesta hidrotónica robusta el porcentaje de formación de aerénquima en raíces coronarias era mucho mayor que en líneas con respuesta hidrotónica débil (Resultados no publicados). Por esta razón esperábamos encontrar resultados similares durante nuestros experimentos; sin embargo, no se observó formación de aerénquima en ninguna de las condiciones evaluadas. Esto puede deberse al hecho de que los fragmentos evaluados, así como el tiempo fenológico de nuestras plántulas era insuficiente para la formación de aerénquima. Según Leite y *cols.* (2017) en caña de azúcar bajo condiciones de estrés por sequía la formación de aerénquima ocurre 5 cm después de la cofia de la raíz. Yamauchi y colaboradores (2020) demostraron que en arroz la formación de aerénquima es dependiente de la edad de la planta y de la distancia desde la cofia ya que ocurre después de 24 h y a 20 mm del ápice de la raíz.

El análisis morfológico mostró un comportamiento contrastante entre ambas líneas (Figuras 24 y 25). Fue posible observar que después de 24 h de hidroestimulación la línea con una respuesta débil muestra una afectación severa del crecimiento (Figura 25), mientras que en la línea robusta se observa un aumento del mismo respecto al control posiblemente como consecuencia de una adecuación a condiciones estresantes (Figura 24).

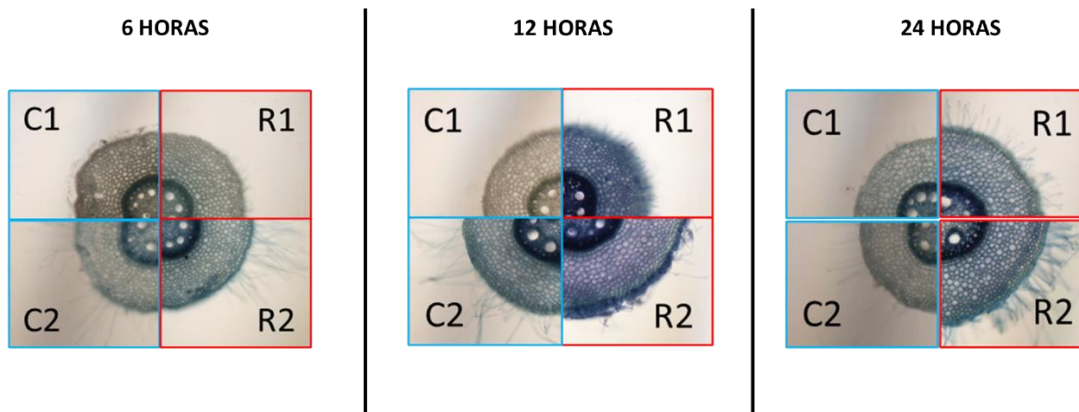


Figura 24. Análisis morfológico de raíces de línea robusta (NVOL) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) que muestra la ausencia de diferencias significativas entre la condición control y reto después de 6 h y el aumento del área total, el área de la estela y el área de la corteza en las raíces sometidas a reto hidrotópico después de 24 h en comparación con el corte transversal de una planta crecida en condiciones control. **C:**(agua) **R:**(solución de K_2CO_3) **1:**(Ápice) **2:** (Elongación).

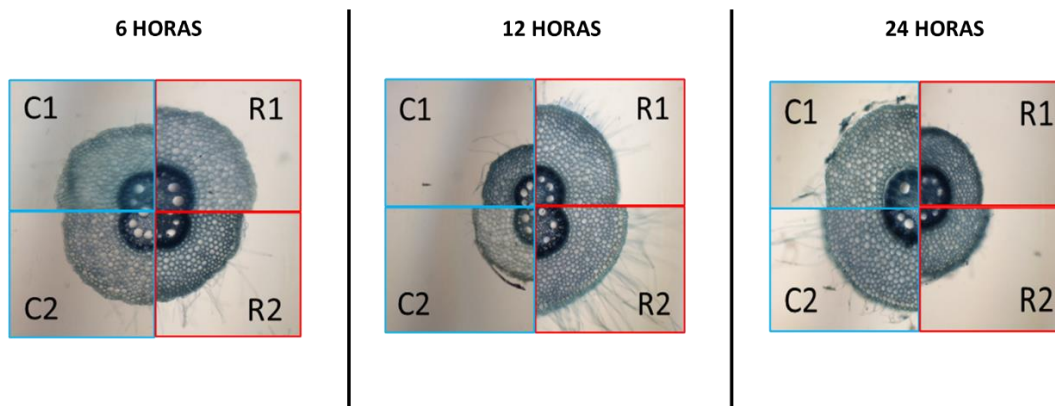


Figura 25. Análisis morfológico de raíces de línea débil (SNLP) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3) que muestra la ausencia de diferencias significativas entre la condición control y reto después de 6 h, el aumento del área total, el área de la estela y el área de la corteza en las raíces sometidas a reto hidrotópico después de 12 h y la disminución significativa del área total, el área de la estela y el área de la corteza en las raíces sometidas a reto hidrotópico después de 24 h en comparación con el corte transversal de una planta crecida en condiciones control. **C:**(agua) **R:**(solución de K_2CO_3) **1:**(Ápice) **2:** (Elongación).

El análisis estadístico del área total de la raíz mostró que en la línea robusta se observan diferencias significativas entre tejidos después 12 h de hidroestimulación, las cuales son más contrastantes para el control que para el reto (Figura 26A). Después de 24 h de hidroestimulación, se mantienen las diferencias entre tejidos, aunque en este caso solo para el reto con mayor afectación para el ápice. Adicionalmente, se hacen evidentes

diferencias entre tratamientos con una disminución significativa del área total en condiciones control para ambas zonas de la raíz (Figura 26A). Por su parte en la línea débil después de 6 h, existen diferencias en la zona del ápice sometida a condiciones de reto hidrotropico donde se observó un aumento en el área total. Estas diferencias se acentuaron después de 12 h de reto y se extendieron además a la zona de elongación. Sin embargo, después de 24 h para ambas zonas de la raíz se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, aunque esta vez con una disminución del área total de las plántulas sometidas a reto respecto al control (Figura 26B). El comportamiento anteriormente descrito para el área total se mantiene para el área de la corteza en ambas líneas (Figura 27).

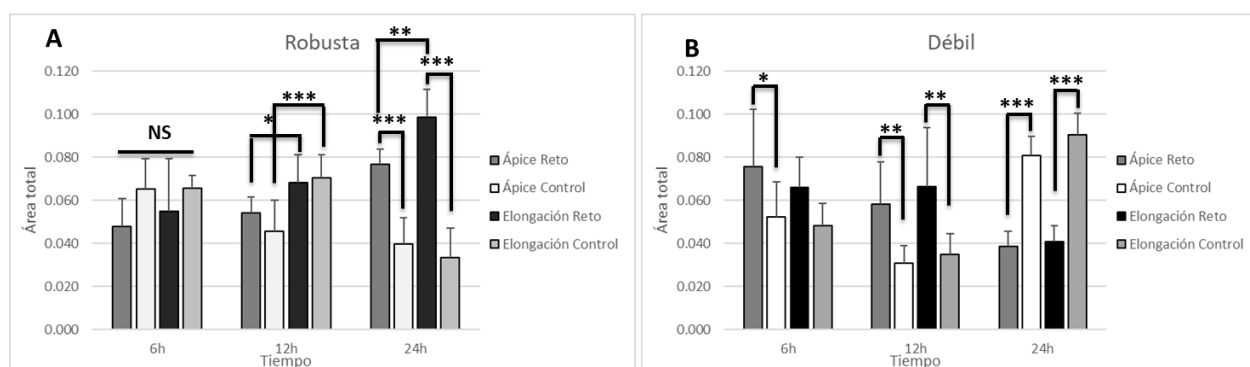


Figura 26. Comparación del área total en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotropico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

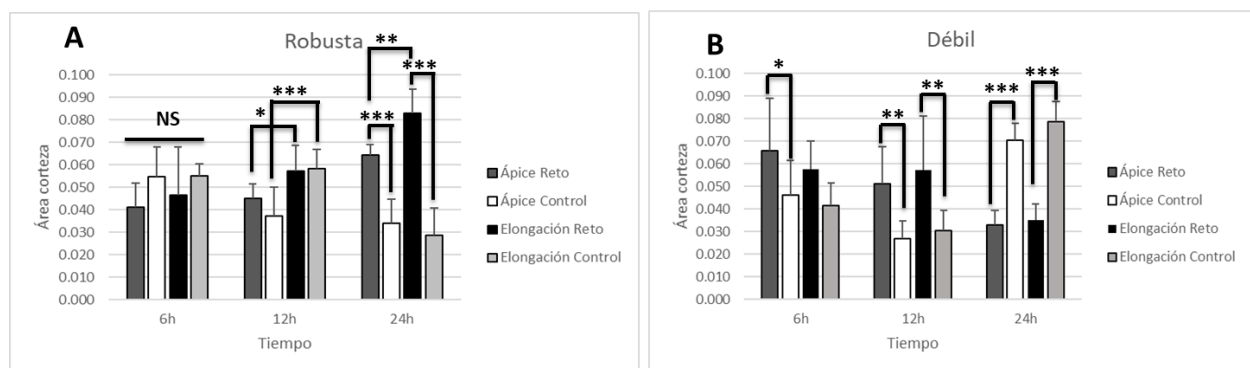


Figura 27. Comparación del área de la corteza en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotropico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Para el área de la estela la línea robusta mostró diferencias significativas entre condiciones después de 6 h con una disminución de la misma en raíces sometidas a reto. Después de 12 h se observaron diferencias entre las zonas de la raíz sometidas a

condiciones control siendo mayor el área del estele para la zona de elongación. Después de 24 h de hidroestimulación se mantienen las diferencias entre las dos zonas, aunque para aquellas sometidas al reto hidrotópico se observa el aumento más significativo en la zona de elongación. Adicionalmente, se observaron diferencias entre tratamientos altamente significativas relacionadas en el aumento del área del estele en ambas zonas de la raíz sometidas a reto hidrotópico (Figura 28A).

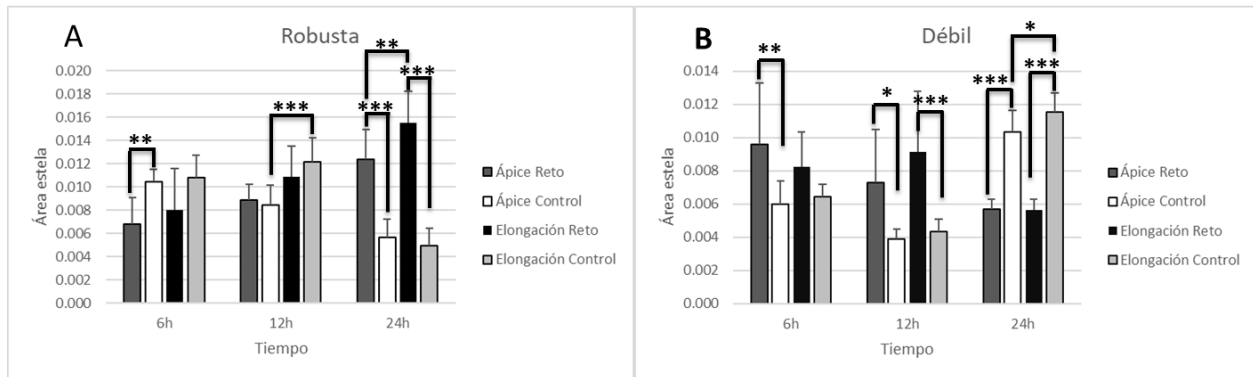


Figura 28. Comparación del área de la estela en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001).

En el caso de la línea débil se observó un aumento significativo del área de la estela para el ápice sometido a reto hidrotópico por 6 h. Este comportamiento se mantuvo después de 12 h y se extendió a la zona de elongación con diferencias altamente significativas. Después de 24 h de reto se observó una disminución de este parámetro en ambas zonas de la raíz (Figura 28B).

Para todos los parámetros mencionados anteriormente se pudo observar que la línea débil mantiene el crecimiento del ápice y la zona de elongación durante las primeras 12 h aun estando en reto hidrotópico y por tanto en condiciones de estrés. Esta respuesta evidencia una vez más la incapacidad para la detección temprana de la señal y por tanto la no adecuación del crecimiento a las nuevas condiciones estresantes. Después de 24 h de hidroestimulación ya el daño ocasionado es muy grande y por tanto ocurre la disminución drástica de los parámetros respecto al control. Esta respuesta contrastante puede deberse a la pérdida de turgencia y por tanto a la incapacidad de mantener el crecimiento celular. Esta pérdida de turgencia podría deberse al menor contenido de trehalosa en esta línea después de 24 h en comparación con la línea robusta. Por su parte la línea robusta pareciera detener su crecimiento en las etapas tempranas del estrés probablemente como consecuencia de la detección temprana y por tanto es capaz

de ajustar crecimiento y después de 24 h mostrar diferencias respecto al control. Para esta línea se puede notar que el ápice pareciera ser la zona más afectada con respecto al crecimiento de la raíz en comparación con la zona de elongación, lo que indica que, al reducirse el meristemo de la raíz, ésta ya no pueda crecer por división celular.

En cuanto a la relación área de la corteza/área del estele, se observó un comportamiento diferente entre ambas líneas debido a que para la línea robusta después de 6 h de exposición se observó un aumento significativo de esta relación para la zona del ápice en reto; mientras que, para la línea débil se observaron diferencias después de 24 h en la zona del ápice con una disminución del parámetro en aquellas raíces sometidas a reto (Figura 29). Para los otros tiempos no se observaron diferencias estadísticas significativas.

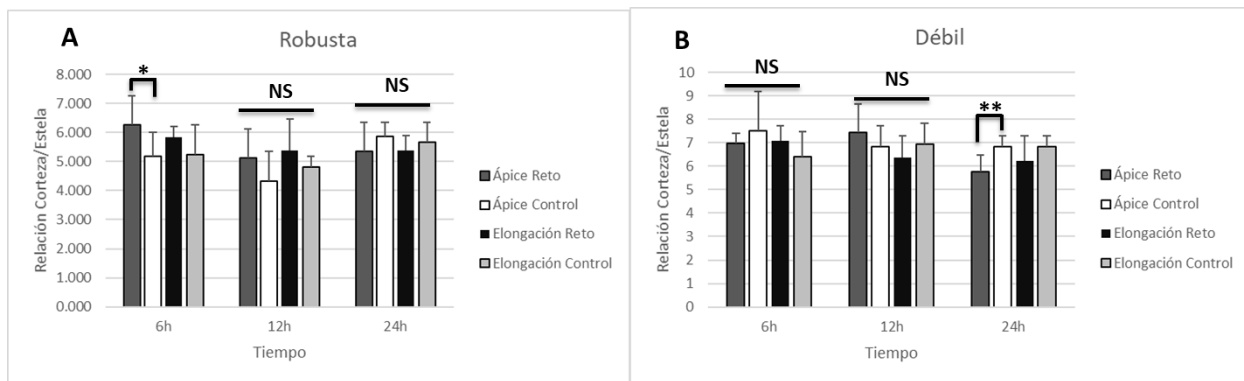


Figura 29. Comparación de la relación área de la corteza/área de la estela en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar ($n=10$). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$).

Para la relación área del estele/área total se encontraron diferencias estadísticas significativas solamente entre condiciones para el ápice de la línea robusta después de 12 h de hidroestimulación (Figura 30A). Para el resto de los otros tiempos evaluados, así como para la línea débil, no se observaron diferencias estadísticas significativas (Figura 27).

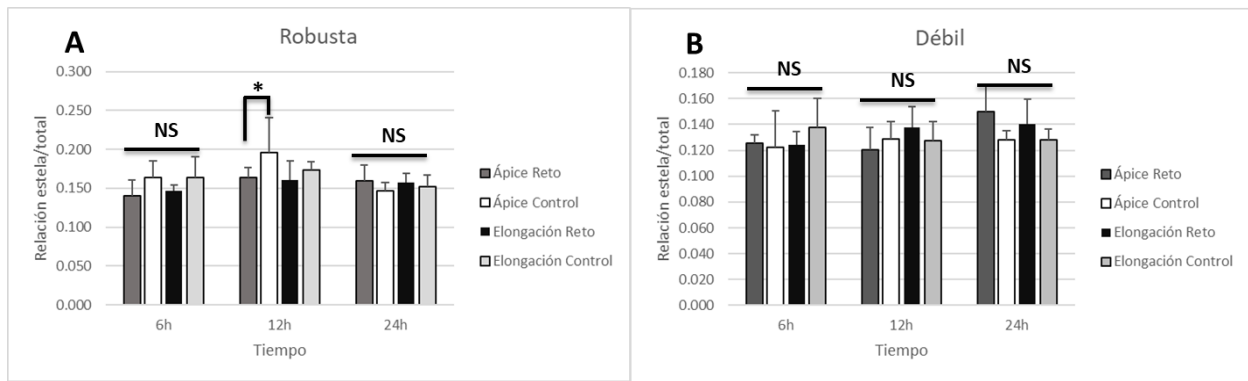


Figura 30. Comparación de la relación área de la estela/área total en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotropico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

En el caso del número de células corticales después de 6 h para la línea robusta no se observaron diferencias significativas; sin embargo, para la línea débil se observó un aumento significativo en este parámetro para el ápice en reto respecto al control. Después de 12 h aumentó significativamente el número de células corticales en la zona del ápice de la línea robusta y para ambas zonas en la línea débil mientras estaban sometidas a reto hidrotropico. Adicionalmente, para la línea robusta se observaron diferencias entre la zona del ápice y la de elongación sometidas a condiciones control. Después de 24 h, se observó un comportamiento antagónico entre las líneas debido a que para la robusta los mayores valores se observaron en ambas zonas sometidas a reto mientras que para la línea débil el mayor tiempo de exposición provocó una disminución significativa del número de células corticales en ambas zonas de la raíz sometidas a reto hidrotropico (Figura 31).

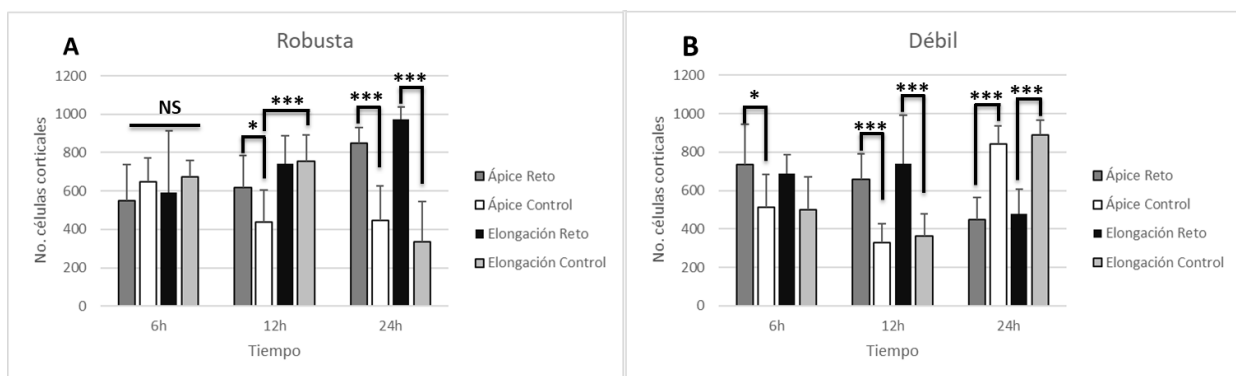


Figura 31. Comparación del número de células corticales en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotropico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

En el caso del número de filas de células corticales para la línea robusta se encontraron

diferencias significativas entre zonas de la raíz siendo la zona de elongación la que presentó mayor número de filas de células corticales después de 6 h de reto hidrotópico. Además, se observaron diferencias entre condiciones solamente para la zona de elongación. Después de 24 h se distinguieron diferencias significativas entre las dos condiciones siendo favorecido el aumento del número de filas de células corticales en ambas zonas de la raíz sometidas al reto hidrotópico (Figura 32A). La línea débil por su parte presenta un aumento significativo de este parámetro en la zona de elongación después de 6 h de exposición. Después de 12 h se acentuaron las diferencias encontradas entre las dos condiciones fisiológicas para la zona de elongación, así como para el ápice de la raíz (Figura 32B). No se encontraron diferencias significativas en la línea robusta y débil en los tiempos 12 y 24 h, respectivamente.

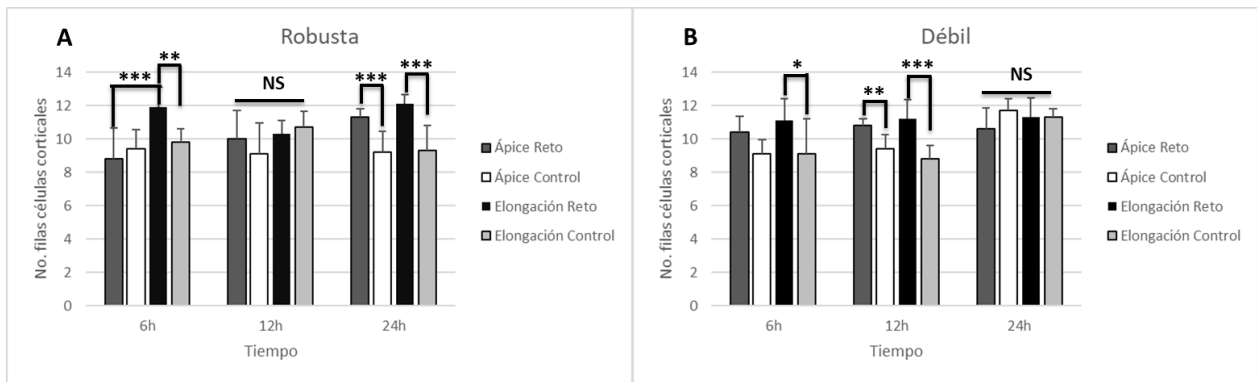


Figura 32. Comparación del número de filas de células corticales en fragmentos de raíces con respuesta robusta (A) y débil (B) después de 6 h, 12 h y 24 h en condiciones control (agua) y reto hidrotópico (solución de K_2CO_3). Las barras representan la media y la desviación estándar (n=10). Los * indican diferencias estadísticas significativas (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$).

VIII. CONCLUSIONES

- La línea con respuesta hidrotópica robusta presenta después de 6 h una eficiente detección de la señal de estrés y por tanto activación del sistema para la degradación de proteínas dañadas.
- Entre la línea robusta y débil las diferencias encontradas en el patrón de proteínas ubiquitinadas y los elementos del proteasoma 26S son la base de la respuesta diferencial ante condiciones de reto hidrotópico.
- En la línea robusta, la trehalosa se encuentra en altas concentraciones durante el reto hidrotópico, actuando como osmoprotector y señalizador.
- El crecimiento de la raíz primaria en la línea robusta muestra mayor capacidad de respuesta al estrés durante las primeras horas del reto hidrotópico, mientras que en la línea débil el crecimiento en las primeras 12 h de reto hidrotópico se altera, reflejando una respuesta tardía al estrés.

IX. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar la cuantificación por dot-blot de las proteínas ubiquitinadas durante el reto hidrotópico.
- Identificar si existen proteínas preferentemente marcadas entre líneas con respuestas contrastantes.
- Cuantificar el contenido de trehalosa y otros azúcares solubles en diferentes fragmentos de la raíz para entender mejor su papel en cada zona de crecimiento.
- Realizar ensayos de inmunolocalización de proteínas marcadas para degradación por el proteasoma.

X. LITERATURA CITADA

- Ahmad P. & M.N.V. Prasad (2012): Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability. Springer N.Y. Dordrecht Heidelberg London. (473-510).
- Anjum S.A, X. Xie 1, L. Wang, M.F. Saleem, C. Man, W. Lei (2011): Morphological, physiological, and biochemical responses of plants to drought stress. **African J.of Agricultural Res.** 6(9) (2026-2032).
- Anjum S.A, L.C. Wang, M. Farooq, M. Hussain, LL. Xue, C.M. Zou (2011a): Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. **J. Agron. Crop Sci.** 197(3): (177-185).
- Arguelles J.C. (2014): Why can't vertebrates synthesize trehalose? **J. of Mol. Evol.** 14 (9645-9).
- Aristizábal D., V. Rivas, G.I. Cassab, F. Lledías (2019): Heat stress reveals high molecular mass proteasomes in *Arabidopsis thaliana* suspension cells cultures. **Plant Physiology and Biochemistry.** 140 (78–87).
- Chimungu JG, Brown KM, Lynch JP. (2014b): Reduced root cortical cell file number improves drought tolerance in maize. **Plant Physiology.** 166, (2166–2178).
- Davies, K.J. (2001): Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie** 83 (301–310).
- Díaz-López L., V. Gimeno, I. Simón, V. Martínez, W.M. Rodríguez-Ortega, F. García-Sánchez (2012): *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. **Agricultural Water Management.** 105 (48–56).
- Eapen D., M.L. Barrosos, G. Ponce, M.E. Campos, G.I. Cassab (2005): Hydrotropism: root growth responses to water. **T. Plant Sci.** 10(1) (44-55).
- Eapen D., J. Martínez-Guadarrama, O. Hernández-Bruno, L. Flores, J. Nieto-Sotelo, G.I. Cassab (2017): Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. **Plant Science.** 265 (87–99).
- Esteva G. (2003): Los árboles de las culturas mexicanas. En: Esteva, G. y C. Marielle (eds). Sin maíz no hay país. CONACULTA. Museo Nacional de las Culturas Populares. México. (17-28).

- Fernández O, L. Bethencourt, A. Quero, S. SangwanRajb, C. Clement (2010): Trehalose and plant stress responses: friend or foe? **T. Plant Sci.** 15 (409–417).
- Fierro C., C. López-Cristoffanini, A. Meynard, C. Lovazzano, F. Castañeda, E. Guajardo, L. Contreras-Porcía (2017): Expression profile of desiccation tolerance factors in intertidal seaweed species during the tidal cycle. **Planta.** 245 (1149–1164).
- Fujii H. (2014): Abscisic Acid Implication in Plant Growth and Stress Responses. In: Tran LS., Pal S. (eds) **Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications.** Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0491-4_2
- Gao Y. & J.P Lynch (2016): Reduced crown root number improves water acquisition under water deficit stress in maize (*Zea mays* L.) **Journal of Experimental Botany**, 67 (15): (4545–4557).
- Goldberg A.L (2007): Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. **Biochemical Society Transactions.** (35) 1.
- Gomes, Aldrin. (2013). Genetics of Proteasome Diseases. **Scientifica.** (637629. 10.1155/2013/637629.)
- Garg A.K, K. Ju-Kon, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y.D. Choi, L.V. Kochian, R.J. Wu (2002): Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99 (15898-15903).
- Grennan A.K. (2007): The role of trehalose biosynthesis in plants. **Plant Physiol.** 144 (3–5).
- Haoyue S, Jun Z, Fuye L, Chao B, Jieliang L, Jiaqi L, Weihe L, Zhiliang L., Wensheng S., Jintian L., Qiong S., and Bin L. (2019): Comparative Transcriptomic Studies on a Cadmium Hyperaccumulator *Viola baoshanensis* and Its Non-Tolerant Counterpart *V. inconspicua*. **Int. J. Mol. Sci.** 20, (1906).
- Iturriaga G, R. Suárez, B. Nova-Franco (2009): Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. **Int. J. Mol Sci.** 10 (1422-0067).
- Jiang Y. y M.K Deyholos (2006): Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. **BMC Plant Biology.** 6:25 (<https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-25>).
- Kato T.A., C. Mapes, L.M. Mera, J.A. Serratos, R.A. Bye. (2009): Origen y

diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, **Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. (116).

- Khan M.S, X. Yu, A. Kikuchi, M. Asahina, K.N. Watanabe (2008): Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. **Plant Biotechnol.** 26 (125–134).
- Kavi-Kishor P.B, Z Hong, G Miao, C-A. Hu, D.S. Verma (1995): Overexpression of Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. **Plant Physiol.** 108 (4) (1387-1394).
- Keunen, E.; Peshev, D.; Vangronsveld, J.; Van, D.E.W.; Cuypers, A. (2013): Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. **Plant Cell Environ.** 36 (1242–1255).
- Kim J. y M.W van Lersel (2011): Abscisic acid drenches can reduce water use and extend shelf life of *Salvia splendens*. **Scientia Horticulturae** 27(3) (420-423).
- Kirnak H., I. Tas, C. Kaya, D. Higgs (2002): Effects of deficit irrigation on growth, yield, and fruit quality of eggplant under semi-arid conditions. **Aust J Agric Res.** 53 (1367–1373).
- Kish-Trier, E., Hill, C.P. (2013): Structural biology of the proteasome. **Annu. Rev. Biophys.** 42 (29–49).
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature.** 227 (680–685).
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL (2008): *Plant Physiological Ecology*, **2nd ed. Springer, New York.**
- Lambers H, Atkin OK & Millenaar FF. (2002): Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. In: **Waisel Y, Eshel A, Kafkaki K, eds.** *Plant roots: The hidden half*, 3rd edn. New York: Marcel Dekker, (521–552).
- Leite D, A. Grandis, E. Tavares, A. Piovezani, S. Pattathil, U. Avci, A. Rossini, A Cambler, A.P De Souza, M.G. Hahn, M.S. Buckeridge (2017): Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots. **Ann Bot.** 120(5) (693-708).
- Lynch, J.P. (2015): Root phenes that reduce the metabolic costs of soil exploration: opportunities for 21st century agricultura. **Plant, Cell and Environment.** 38 (1775–1784).

- Lins R.D, C.S. Pereira, P.H. Hunenberger (2004): Trehalose-protein interactions in aqueous solution. **Proteins**. 55 (177-186).
- Liu Y., Ch. Subhash, J. Yan, Ch. Song, J. Zhao, J. Li. (2011): Maize leaf temperature responses to drought: Thermal imaging and quantitative trait loci (QTL) mapping. **Environ. Exp. Bot.** 71 (158–165).
- Martínez-García JF, Monte E, Quail PH (1999): A simple, rapid, and Quantitative method for preparing Arabidopsis protein extract for immunoblot analysis. **Plant J.** 20(2): 251-257.
- Martins, L.L.; Mourato, M.P.; Baptista, S.; Reis, R.; Carvalheiro, F.; Almeida, A.M.; Fevereiro, P.; Cuypers, A. (2014): Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (AtTPS1). **Acta Physiol. Plant.**, 36 (755–765).
- Miranda JA, Avonce N, Suárez R, Thevelein JM, Van Dijck P, Iturriaga G (2007): A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic Arabidopsis. **Planta**. 226 (1411–1421).
- Mohammad H. y R. Heidari (2008): Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. **World Appl. Sci. J.** 3(3) (448-453).
- Moreno D. (2009): AMPK, Ubicuitinación y Proteasoma. **Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Farmacia**. Universidad de Valencia
- Mostofa, M.G.; Hossain, M.A.; Fujita, M.; Tran, L.S. (2015): Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. **Sci. Rep.** 5, 11433.
- Ortega-Gaucin D., M. López Pérez, F.I. Arreguín-Cortés (2016): Drought risk management in Mexico: progress and challenges. **Int. J. of Safety and Security Eng.** 6 (2).
- Oono, Y., Yazawa, T., Kanamori, H.; Sasaki, H.; Mori, S.; Handa, H.; Matsumoto, T. (2016): Genome-Wide Transcriptome Analysis of Cadmium Stress in Rice. **BioMed Res. Int.** (1–9).
- Palma J.M., L.M. Sandalio, F.J. Corpas, M.C. Romero-Puertas, I. McCarthy, L.A. del Río (2002): Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiol. Biochem.** 40 (521–530).

- Parker A.J.; E.F. Haskins; I. Deyrup-Olsen (1982): Toluidine Blue: A Simple, Effective Stain for Plant Tissues. **The American Biology Teacher**. 44 (8): (487–489).
- Pilon-Smits E.A.H, N. Terry, T. Sears, H. Kim, A. Zayed, S. Hwang, K. van Dun, E. Voogd, T.C. Verwoerd, R.W.H.H. Krutwagen and O.J.M. Goddijn (1998): Trehalose producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. **Journal Plant Physiol**. 152 (525-532).
- Postma J.A. & Lynch J.P. (2011): Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. **Plant Physiology**. 156 (1190–1201).
- Rouphael Y., M. Cardarelli, D. Schwarz, P. Franken, G. Colla (2012): Effects of Drought on Nutrient Uptake and Assimilation in Vegetable Crop. In: Aroca R, (ed) Plant responses to drought stress. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer. (171–195).
- Sami, F.; Yusuf, M.; Faizan, M.; Faraz, A.; Hayat, S. (2016): Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiol. Biochem**. 109, (54–61).
- Simic B. I. Liovic, I. Kalinovic, V. Rozman, J. Cosic (2007): Influence of storage condition on seed quality of maize, soybean, and sunflower. **Stored Grain Losses**.
- Suárez R, C. Calderón, G. Iturriaga (2009): Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. **Crop Science**. 49 (1791–1799).
- Stewart H. Lecker, Alfred L. Goldberg, William E. Mitch (2006): Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **JASN**, 17 (7) 1807-1819.
- Suty L., J. Lequeu, A. Lançon, P. Etienne, A-S. Petitot, J-P. Blein (2003): Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of “plant defense proteasomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. (35) 5: (637-650).
- Taiz, L. & E. Zeiger (2010): Plant Physiology, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Takahashi H. and T.K. Scott (1991): Hydrotropism and Its Interaction with Gravitropism in Maize Roots. **Plant Physiol**. 96 (558-564).
- Tanaka K (2009): The proteasome: overview of structure and functions. **Proc Jpn**

Acad Ser B Phys Biol Sci. 85 (1) (12-36).

- Tsaffrir Z. y Z. Selinger (1996): Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. **Analytical Biochemistry.** 236 (2) (302-308).
- Vázquez-Ortiz F.A y E.M. Valenzuela-Soto (2006): HPLC determination of trehalose in *Selaginella lepidophylla* Plants. **Journal of Liquid Chromatography & Related technologies.** 27(12) (1937-1946).
- Wang W., B. Vinocur, A. Altman (2003): Plant responses to drought, salinity, and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta.** 218 (1–14).
- Wessel D and Flügge U.I (1984): A procedure for precipitating proteins from solution, including detergent solution. **Anal Biochem.** 138 (141-143).
- Wingler A (2002): The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry.** 60 (437–440)
- Xiao BZ, X. Chen, C.B. Xiang, Ning Tanga, Qi-Fa Zhanga, Li-Zhong Xionga (2009): Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. **Mol. Plant.** 2 (73-83).
- Yamauchi T., M. Nakazono, Y. Inukai, N. Tsutsumi (2020): Distance-to-Time Conversion Using Gompertz Model Reveals Age-Dependent Aerenchyma Formation in Rice Roots. **Plant Physiology**, Vol. 183 (1424–1427)
- Yu F., Y. Wu and Q. Xie (2016): Ubiquitin–Proteasome System in ABA Signaling: From Perception to Action. **Mol. Plant.** 9 (21–33).
- Zhu JM, Brown KM, Lynch JP. (2010): Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant, Cell & Environment.** 33 (740–749).

PÁGINAS DE INTERNET CITADAS

http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema5/5_1sexualidad.htm

<https://revolucion.news/cienciaro.mx/no-camino-pero-me-muevo-movimiento-en-plantas/>

<http://www.fao.org/nr/water/issues/scarcity.html>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 14 de septiembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Director CEIB-UAEM)

Dra. Gladys Iliana Cassab López (Co-director IBT-UNAM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José Fernando Lledías Martínez (IBT-UNAM)

Tesis: **Papel de la ubiquitinación de proteínas y la acumulación de trehalosa en la respuesta hidrotrópica de raíces de maíz (*Zea mays* L.)**

Alumno que lo presenta a revisión: **Claudia Puentes Báez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2020-09-18 20:23:06 | Firmante

IFripve/LJza0ozYxKABe+hKRlaX027cBhNxxFZxA66IAT6Qjfte2PJ31MC9LTbndT9jldaRDSWjm4iFL+1hL8eTCQ6Fm2hjfiT33DKTYUz85PJsutpWraYzeochSSJD6iEZozvr/eSoVO3TtDVQ+OAi+ffJKZZcLiifXBGSzzN/DXOvqz4uZ82oiuaBT7pv9sbwkSaAIFCoYO+7HsmKboe/XugHPC4XKIIQqkeMIEm9OoUZIJZTYmu/RHQ1NYNPMijk+7WHIhl2kZABij3yMbRyYLUmW2UccBxallm6axT5g4uJ+jv00Q2eH/ho94uARf5db9j+0VqnVtuFAbnKQg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[W5Omg0](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JqNsLGaOgXI6DBv288zh6Fzw5AFLnLHe>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 14 de septiembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Director CEIB-UAEM)

Dra. Gladys Iliana Cassab López (Co-director IBT-UNAM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José Fernando Lledías Martínez (IBT-UNAM)

Tesis: **Papel de la ubiquitinación de proteínas y la acumulación de trehalosa en la respuesta hidrotrópica de raíces de maíz (*Zea mays* L.)**

Alumno que lo presenta a revisión: **Claudia Puentes Báez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ | Fecha:2020-09-18 13:07:07 | Firmante

ddUoYHVHSG5W79nWAI9b4fMKeyhPDK3rUYCZDKL0203qcYJkvFrD1catBTT2PZdQ0ej/8EoL61rtUe6CSqyABke+LkV9wKxsgdIRGjeoMxVqNTb0r1nFUGNHsTt9/0t/iFIEWLQuAfkIo/AMW8+LC8EvevblpeJfglPRI57pfJQI7Nm0iR8FGNgkdzyrbUi8vs8DeOdQs4cdthOK9MiqWxGIYmizGVP3YF0iXv/TTq/UckMh3iM2Twhlpn5enscF0o/DV585OSGg3WuQNbN P8VMPtxTFQVRlqsKA+WsyO NURXcrKs+aYIDQQDrcONfJagc5nhvzclhXASJwkaP+WaA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[FyoEwH](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gXQyTzFPySpHgguvnVPzpwihrEkDE1kO>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 14 de septiembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Director CEIB-UAEM)

Dra. Gladys Iliana Cassab López (Co-director IBT-UNAM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José Fernando Lledías Martínez (IBT-UNAM)

Tesis: **Papel de la ubiquitinación de proteínas y la acumulación de trehalosa en la respuesta hidrotrópica de raíces de maíz (*Zea mays* L.)**

Alumno que lo presenta a revisión: **Claudia Puentes Báez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2020-09-18 14:09:18 | Firmante

O+CZ/pkGehzKDpTkZR9Uc4kUn1vUf34qtjxm2jbcic0UPIsHSys9rzAHhxOVb2v7TN9RAM3QjTs95rLnJQe1A65KDkqJhdq58VVaBFZAoDbVE4xSgo/+kwT9T3GK7cp0uX5NXIrGddQpXLk2n0DyEfBWFfZHmyzVeqYZCzeZDdeo9gA4K233WDi9mG6xrqKWnG3eaQszqd6OfxvOMDBeXeJck96IQEGW+O3TMDfogg5azuji70o6hpwHoZFapErep5IMEiqVxcFyqN3Xo+ky1r7A+JegnMr/cQnRu5QldsunGRQ5N7jjlwdSRrwejEW3oRstKRLBHHjmK0OPRhi6KQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



alfyqL

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/p5s0007FcVcx01sATl9rXfeeqVE21pN7>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 14 de septiembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Director CEIB-UAEM)

Dra. Gladys Iliana Cassab López (Co-director IBT-UNAM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José Fernando Lledías Martínez (IBT-UNAM)

Tesis: **Papel de la ubiquitinación de proteínas y la acumulación de trehalosa en la respuesta hidrotrópica de raíces de maíz (*Zea mays* L.)**

Alumno que lo presenta a revisión: **Claudia Puentes Báez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ FERNANDO LLEDÍAS MARTÍNEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSÉ FERNANDO LLEDIAS MARTINEZ | Fecha:2020-10-22 13:04:41 | Firmante

R/vrsAIfZCVSmbPrvSfeexYpHw43dQO5rPsSAZv3d/VjJLa1VG8L22GoPuNIB2TxQY60Jnl70T4rt9KsfZ5vU6PohETRDgD5+OfkWSZTiEoYwqt9T/6WfizGNSRnpfYggf9aYD8pa
anibdMw/If5BblrVx4Y3u0UGOZHk5iA10ZEMTLjszxe6nnhWsQgitZZBRBuKrOa953i25OL5GaZc9BPJSnkRH3ugHWcfGz3X5RGxy2zydxhTH7Q7ILR23nYp9rW5omPTaXdqOFY
NxGfvt7pfUmTxDIKujTW4VLSobfPVgKCe2RsuqE047bgNZ2vgdAWSwU0z5AMXPsx7g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SDPxke](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pZwpmakXoPqkVEFJ3C2744j8gvmZDG6T>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 14 de septiembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Director CEIB-UAEM)
Dra. Gladys Iliana Cassab López (Co-director IBT-UNAM)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)
Dr. José Fernando Lledías Martínez (IBT-UNAM)

Tesis: **Papel de la ubiquitinación de proteínas y la acumulación de trehalosa en la respuesta hidrotrópica de raíces de maíz (*Zea mays* L.)**

Alumno que lo presenta a revisión: **Claudia Puentes Báez**
Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-10-26 22:33:37 | Firmante

hG/91fQ7tbiG3q9CCYXKV4yR8/zMsZCDaxXijU9tTzBpW1URBfgnj6l44azzVy26PP4ybbgLaRgwb9Q95iewlf7MR//R4U29HTChXIGt6lYOdcnYK/stxiUTyJMt6YDJDgs4foBWWHX
k8E3bDPxeGhhQtvtahh1zfs6N7DH8sjVFfn1glVK9MKcllWoYziRhLQEybf2a/VQ9GoYqWKclHFhHMc5NN3oliagLNDB9MaArPWUISovFPoyUulx9gLitT9ZnWA9d7qNM3z//Jty1
7q8F3t15mKjI9bPZyvBaMguEmjadPcUi0u7gNle664L/Hlo2unbh+Bwz/kcrFlw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



cEU200

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sbE0QNqm5ymNw8WrRiMO9EBvVbuoKKFL>

