



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS  
BÁSICAS Y APLICADAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR  
ÁREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR.**

**“Identificación del desordoma, asociado con el  
hidrotrópismo del maíz (*Zea mays* L.)”**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA:**

**MAYRA ALEJANDRA SALLAS BARRETO**

**Tesis para obtener el grado de:  
LICENCIADO EN CIENCIAS**

**Director: Dr. José Fernando Lledías Martínez  
IBt, UNAM**

**Cuernavaca, Morelos.**

**2021, octubre**

Este proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. José Fernando Lledías Martínez en el laboratorio 21 de la Dra. Gladys Cassab, el cual pertenece al departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para mi mamá y mi Quinty, mis grandes maestras de la vida.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincera gratitud a cada ser humano que estuvo involucrado en el proceso de este proyecto, ya sea indirecta o directamente. Al CIDC por ser mi hogar durante esta etapa profesional, a todos los profesores que me dieron clase y contribuyeron a que llegara hasta el final.

A mi tutor de tesis, Dr. Fernando Lledías, te agradezco cada enseñanza que me has dado en el laboratorio, la orientación y paciencia a pesar de tener las condiciones en contra.

A la Dra. Gladys Cassab, quien me abrió las puertas de su laboratorio, que ha confiado en mí, me ha alentado y guiado en este largo camino.

A mi comité sinodal, por los comentarios, el tiempo y apoyo que me otorgaron.

A Maru, gracias de todo corazón por estar al pendiente de mí, de darme la bienvenida al grupo, responder mis dudas y ser una segunda mamá en el laboratorio. A mis compañeras de laboratorio; Mery, te agradezco la compañía, las risas, los consejos, tu ayuda y el gran tiempo juntas. Clau, Ale y Viri, por ayudarme en laboratorio y darme ánimos.

Quiero darle un agradecimiento especial a Valeria (Nyx), no hay palabras que logren expresar lo agradecida que estoy por tu amistad. Gracias por ser uno de mis apoyos en los momentos más difíciles y en los felices. Por creer en mi en todo momento y no dejarme sola.

A mis amigas y amigo de generación, Clau, Ceci, Ulises, Regi y Andy. Por los 5 años de amistad, convivencia, risas y llanto, que quedaran impregnados en mi memoria como una gran y preciosa etapa.

A la mujer más importante de mi vida y a quien le debo todo lo que soy. Mami, gracias por cuidar de mí sin importar que, apoyarme en cada uno de mis pequeños pasos, ser mi todo y mi pilar en esta vida.

Leo, mi pequeño hermano quien llegó a hacerme compañía en esta vida y a enseñarme varias lecciones.

A mi Quintita y mi abuelo Jero, quienes ya no están conmigo, pero sé que estarían muy orgullosos de mí.

A Dulce, Viole, mi papá Jero y mi demás familia. Gracias por su apoyo, regaños, lecciones, por ser parte de mi vida y no dejarme.

Muchas gracias por ser parte de mi historia.

1. Índice	
<b>1. Índice</b>	<b>5</b>
<b>2. Lista de tablas</b>	<b>7</b>
<b>3. Lista de figuras</b>	<b>8</b>
<b>4. Planteamiento del problema</b>	<b>10</b>
4.1 Resumen	10
4.2. Hipótesis.	12
4.3. Justificación.	13
4.4. Objetivo General.	14
4.5. Objetivos específicos.	15
<b>5. Fundamentación teórica.</b>	<b>16</b>
5.1. Antecedentes.	16
5.2. Marco teórico.	19
5.2.1 Origen y domesticación del maíz.	19
5.2.2 Maíz.	22
5.2.2.1 Taxonomía.	22
5.2.3. El maíz como cultivo.	24
5.2.4. Sequía.	25
5.2.5. Tropismos.	26
5.2.5.1. Fototropismo.	28
5.2.5.2. Tigmotropismo	30
5.2.5.3. Gravitropismo	30
5.2.5.4. Hidrotrópismo	31
5.2.6. Proteínas Intrínsecamente Desordenadas	33
5.2.6.1. Clasificación de IDP/IDPR	33
5.2.6.2. Características de las IDP/IDPR	34
<b>6. Metodología.</b>	<b>36</b>
6.1. Material vegetal.	36
6.2. Esterilización y germinación de semillas.	36
6.3. Sistema para determinar la respuesta hidrotópica.	37
6.4. Procesamiento de IDPs/IDPR.	38
6.4.1. Enriquecimiento de IDPs/IDPR	38
6.4.2. Visualización de IDPs/IDPR.	38
6.4.2.1. Precipitación de IDPs/IDPR.	38
6.4.2.2. Preparación y Cuantificación de IDPs/IDPR.	39
6.4.2.3. Perfil del desordoma.	40
6.4.2.4. Tinción por plata.	40
6.5. Espectrometría de masas.	40

6.6. Análisis de los resultados de espectrometría de masas.	41
<b>7. Resultados y discusión.</b>	<b>42</b>
<b>7.1. Perfil de proteínas.</b>	<b>42</b>
<b>7.1.1. Geles SDS/PAGE.</b>	<b>42</b>
7.2.2. Espectrometría de masas	45
7.2.2.1 Pared celular	51
7.2.2.2. Señalización	52
7.2.2.3. Factores de transcripción y/o unión a DNA o RN	53
7.2.2.5. Respuesta a Ácido abscísico (ABA)	56
7.2.2.6. Respuesta a estrés.	57
7.2.2.7. Respuesta a estrés oxidativo	59
7.2.2.8. Metabolismo	61
7.2.2.9. Síntesis de proteínas de novo	63
7.2.2.10. Función desconocida.	65
7.2.3. Análisis del grado de desorden.	66
<b>8. Conclusiones.</b>	<b>68</b>
<b>9. Perspectivas.</b>	<b>69</b>
<b>10. Referencias.</b>	<b>70</b>
<b>11. Páginas consultadas.</b>	<b>74</b>

## **2. Lista de tablas**

Tabla 1. Comparación del porcentaje de desorden en los genomas y proteomas, de distintas plantas

Tabla 2. Producción de maíz en el mundo por países

Tabla 3. Línea de maíces utilizadas y su respuesta al hidrotropismo.

Tabla 4. Lista de grupos de proteínas obtenidas por espectrometría de masas.

### 3. Lista de figuras

Figura 1. Códice Fejerváry Mayer. Ehécatl el hombre sentado representa la planta de maíz doblada.

Figura 2. Esquema de la planta de maíz.

Figura 3. Producción de maíz en el mundo por países.

Figura 4. Producción nacional de maíz por variedad.

Figura 5. Interacción de tropismos.

Figura 6. Generación de la curvatura fototrópica.

Figura 7. Modelo y sincronización de los primeros pasos de señalización que conducen al fototropismo.

Figura 8. Cilindro colgante realizada por Sachs.

Figura 9. Representación gráfica del sistema hidrotrópico.

Figura 10. Curva de BSA.

Figura 11. Gel SDS/PAGE con tinción de plata del perfil de las proteínas.

Figura 12. Diagrama de Venn de la categoría de pared celular.

Figura 13. Diagrama de Venn de la categoría de señalización.

Figura 14. Diagrama de Venn de la categoría de factores de transcripción y/o unión a DNA o RNA.

Figura 15. Diagrama de Venn de la categoría de degradación de proteínas.

Figura 16. Diagrama de Venn de la categoría de respuesta a ABA (ácido abscísico).

Figura 17. Diagrama de Venn de la categoría de respuesta a estrés.

Figura 18. Diagrama de Venn de la categoría de estrés oxidativo.

Figura 19. Diagrama de Venn de la categoría de metabolismo.



Figura 20. Diagrama de Venn de la categoría de síntesis de proteínas.

Figura 21. Diagrama de Venn de la categoría de función desconocida.

Figura 22. Gráfica del porcentaje de desorden de cada categoría.

## 4. Planteamiento del problema

### 4.1 Resumen

México se caracteriza por ser uno de los principales países consumidores de maíz, siendo un cultivo que no sólo tiene importancia agrícola, alimentaria y económica, también ha formado parte de la cultura mexicana a lo largo del tiempo. Fue la base de varias civilizaciones prehispánicas, quienes tomaron al maíz como fuente de conocimiento y mitología, estructurando todo un sistema de creencias y política alrededor de esta planta, bien está dicho que somos hijos del maíz, gracias al mito del origen del hombre (Carrillo, 2009).

La convivencia entre el hombre y el maíz llevó a que hubiera una intervención directa sobre la planta, domesticándola. Como producto de la domesticación se han seleccionado variedades de maíz, capaces de responder a diferentes retos ambientales, tales como la sequía, la salinidad del suelo, exceso de luz solar, etc. (Kato *et al.*, 2009).

El cambio climático es hoy, uno de los principales problemas que afectan a la humanidad, por sus efectos ambientales y, sobre todo, porque su principal factor es el incremento de los gases de efecto invernadero, resultantes de las actividades humanas. El efecto invernadero es responsable del incremento de la temperatura global (Useros, 2012). Debido a los cambios de temperatura y presión en el aire, se generan desequilibrios hídricos en el suelo, y como resultado, un exceso o insuficiencia de agua. La falta de agua o sequía es una deficiencia que tenemos muy presente en la actualidad en la vida cotidiana y en la agricultura. El déficit de agua es un fenómeno que afecta directamente el crecimiento y desarrollo de la planta, en consecuencia, hay una baja productividad de su semilla, ocasionando un problema económico y alimenticio a nivel, no sólo nacional, sino mundial. Sin embargo, la planta tiene mecanismos para evitar esta condición ambiental, entre ellos destaca el redireccionamiento de las raíces hacia una zona de mayor humedad, fenómeno conocido como hidrotrópismo (Cassab y Eapen, 2012). El hidrotrópismo ha sido poco estudiado y lo que se sabe hasta el momento es que, la

raíz primaria es la primera en responder al estímulo del gradiente de humedad y algunos genes que participan en el mecanismo, como *MIZ1* y *MIZ2* (Kobayahi *et al.*, 2007; Miyazawa *et al.*, 2009). Sin embargo, no hay registros de este mecanismo a nivel proteómico en la literatura.

Muchas proteínas tienen grandes segmentos no estructurados y otras, carecen completamente de una estructura terciaria definida. Estas proteínas se denominan, proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs por sus siglas en inglés: Intrinsically Disordered Proteins) o proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDPR por intrinsically disordered proteins regions) y se estima que constituyen el 30% del proteoma eucariota (Tsvetkov *et al.*, 2012).

Las proteínas intrínsecamente desordenadas, parecen tener un papel importante en mecanismos de respuestas a estrés, y se sabe de algunas que participan en varios procesos fundamentales de las plantas, pues gracias a su estructura desordenada se les atribuyen una diversidad de funciones celulares esenciales (Uversky, 2013). Uno de los ejemplos más estudiados, son las proteínas LEA (Late embryogenesis abundant) que se analizaron en maíz, en donde se encontró que están presentes en respuesta a estrés por déficit de agua y tolerancia a congelamiento (Amara, 2012). Sin embargo, no hay análisis sobre IDP/IDPR en la respuesta hidrotropica en raíces de maíz.

Por lo anterior, el presente proyecto se llevó a cabo con la finalidad de analizar las IDP/IDPR, presentes durante el desarrollo de la respuesta hidrotropica del maíz con la finalidad de tener un panorama más amplio del mecanismo a nivel proteómico de este tropismo.

## **4.2. Hipótesis.**

Las IDP o IDPR están presentes en la respuesta hidrotropica de ambas líneas de maíz.

Los perfiles de las IDP/IDPR en líneas de maíz con respuesta hidrotropica robusta y débil, en condiciones de reto hidrotropico y favorables, serán distinguibles.

### **4.3. Justificación.**

El maíz es una planta de suma importancia para la agricultura y consumo humano en todo el mundo. La falta de agua afecta la productividad, crecimiento y desarrollo de la planta, trayendo consigo graves problemas económicos y sociales.

El análisis del desordoma de las raíces primarias del maíz, nos ayudará a tener un panorama más amplio de los mecanismos de regulación de la respuesta hidrotrópica.

#### **4.4. Objetivo General.**

Identificar el perfil de las IDP e IDPR de las raíces primarias de líneas de maíz con respuesta hidrotropica débil y robusta.

#### **4.5. Objetivos específicos.**

1. Obtener una muestra enriquecida de IDP e IDPR de las raíces de líneas de maíz con una respuesta hidrotónica débil y robusta, en condiciones de crecimiento óptimo y bajo reto hidrotónico.
2. Analizar por geles desnaturizantes los perfiles de IDP/IDPR obtenidas.
3. Identificar las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas para comparar los perfiles en la respuesta hidrotónica robusta y débil.

## 5. Fundamentación teórica.

### 5.1. Antecedentes.

Las plantas son organismos frágiles, que están expuestos frecuentemente a distintos tipos de estrés. Por estrés nos referimos a condiciones que afectan de una manera negativa al crecimiento, desarrollo y reproducción de la planta. Entre las condiciones más relevantes está el déficit de agua, mejor conocido como sequía. La disminución de la disponibilidad de agua dulce aumenta la frecuencia y la gravedad del estrés hídrico de los cultivos, causando una pérdida significativa del rendimiento (Buchanan *et al.*, 2000).

Las raíces de las plantas son responsables de la adquisición de agua y son un componente significativo de la tolerancia a la sequía. Las plantas con raíces más largas y profundas tienen un mejor acceso a los recursos hídricos disponibles en profundidad y, por lo tanto, son más frecuentes entre las especies que se encuentran en ambientes secos (Buchanan *et al.*, 2000).

El hidrotropismo es el mecanismo por el cual, la raíz cambia la dirección de su crecimiento hacia la presencia de agua y esa raíz primaria es la primera en responder al estímulo del gradiente de humedad. En el maíz se conocen dos tipos de respuestas al hidrotropismo; una robusta (R) o una débil (D). Esto basado en el ángulo de curvatura hidrotropica, siendo débil cuando la curvatura es inferior a 40 grados y robusta cuando la curvatura es superior a 40 grados. En experimentos donde las raíces de las plántulas muestran una respuesta hidrotropica robusta, se ha demostrado que se adaptan mejor a la sequía y muestran un sistema radicular más abundante en relación con los respondedores débiles (Eapen *et al.*, 2017). Otros estudios sobre el hidrotropismo son a nivel genético y han encontrado mutantes hidrotropicos en *Arabidopsis thaliana*, que arrojan algunos conocimientos sobre cómo el hidrotropismo permite que las raíces crezcan hacia una fuente de agua. Los dos mutantes que sobresalieron son *miz1* y *miz2*, que son deficientes en hidrotropismo. MIZ1 codifica una proteína de función desconocida, que se expresa en la tapa de la raíz y en la estela, y su sobreexpresión aumenta la respuesta hidrotropica de las raíces de *A. thaliana* (Kobayashi *et al.*, 2007).



El hidrotropismo en las plantas con MIZ1OE, dio una respuesta más fuerte que en las plantas de tipo silvestre, lo que indica que el hidrotropismo desempeña un papel crucial en el desarrollo del sistema de raíces en el suelo y contribuye a evitar la sequía (Miyazawa *et al.*, 2012). La mutante de MIZ2 afecta al locus de GNOM que codifica para la proteína ARF-GEF que funciona como factor de intercambio GDP/GTP en el tráfico vesicular. Por otro lado, la hormona vegetal ABA (ácido abscísico) parece jugar un papel importante en la tolerancia a sequía y muy estrechamente coordinado con el estrés hídrico (Eapen *et al.*, 2005). Sin embargo, hay pocos registros sobre las proteínas que contribuyen o están implicados en este tropismo. Los pocos datos que existen son acerca de las proteínas intrínsecamente desordenadas, las cuales se distinguen por carecer de una estructura nativa definida, tener una alta flexibilidad que les da la habilidad de interactuar con varias moléculas a las cuales se unen con baja afinidad, pero conservando una alta especificidad, lo cual representa una gran ventaja desde el punto de vista biológico y evolutivo (Cuevas-Velázquez y Covarrubias, 2011). Se ha encontrado que el maíz es una planta con un desorden más desordenado en comparación con las otras plantas (Tabla.1) (Mouna *et al.*, 2019).

**Tabla 1.** Comparación del porcentaje de desorden en los genomas y proteomas, de distintas plantas (Tabla adaptada de Mouna *et al.*, 2019).

<b>Organismos</b>	<b>% desorden de genoma</b>	<b>% de regiones desordenadas en dominios SCOP</b>	<b>Tamaño del proteoma</b>
<b><i>O. sativa</i></b>	22.58	12.64	48,913
<b><i>B. distachyon</i></b>	19.54	18.7	44,786
<b><i>S. bicolor</i></b>	20.34	16.32	41,380
<b><i>Z. mays</i></b>	21.75	17.33	99,374
<b><i>A. thaliana</i></b>	17.46	19.52	39,380

Las IDPs de las especies que se analizaron, incluyendo el maíz, parecen estar involucradas en el metabolismo de biopolímeros como, el almidón y la sacarosa, en la biosíntesis de metabolitos secundarios que son importantes para las respuestas de las plantas hacia diversos estímulos ambientales. Además, participan en la biosíntesis de antibióticos, en el metabolismo de compuestos aromáticos, en el metabolismo de aminoácidos, en la biosíntesis de lípidos y en las vías de biogénesis de componentes celulares. De ahí que, las IDPs en cereales parecen estar involucrados en el control de las respuestas al estrés y en la adaptación a las limitaciones ambientales (Mouna *et al.*, 2019).

Las hidrofílicas, mejor conocidas como las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), son una de las IDPs más estudiadas que se acumulan en tejidos vegetativos sometidos a déficit hídrico como en sequía, salinidad y congelamiento. Las proteínas LEA están presentes en respuesta a tratamientos exógenos con ácido abscísico (ABA), que es conocido como la hormona del estrés por ser una de las responsables de desencadenar una de las cascadas de señalización que dan lugar a la expresión de proteínas de respuesta que conllevan a la adaptación, junto con la tolerancia al estrés (Cuevas-Velázquez y Covarrubias, 2011). Sin embargo, en la literatura no hay estudios acerca de las IDPs involucradas en la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria en maíz.

El análisis del Desordoma, nos podría mostrar aquellas IDP/IDPR relevantes, dándonos un amplio panorama del mecanismo hidrotrópico que ocurre en la raíz primaria.

## 5.2. Marco teórico.

### 5.2.1 Origen y domesticación del maíz.

Mesoamérica se considera el centro de domesticación de diversas plantas que han tenido una gran relevancia en el mundo. Una de las plantas más sobresalientes es el maíz, alrededor del cual crecieron diferentes civilizaciones a lo largo de la historia (Carrillo, 2009). México y la religión mesoamericana fueron el centro de origen y diversificación del maíz, comprobándose gracias a las representaciones de dicha planta en esculturas, pinturas, mitos, ceremonias, etcétera (Kato *et al.*, 2009). Las excavaciones arqueológicas ayudaron a estructurar la historia evolutiva del maíz, analizando los primeros asentamientos agrícolas y culturales de toda la zona. Gracias a este análisis de los vestigios, se sabe que el maíz surge entre los años 8000 a 6000 A.C, el cual se convirtió, no sólo en el alimento principal de los pobladores, sino también en la fuente principal de su cultura (Bedoya, 2010).

Una de las primeras representaciones que recorrió todo Mesoamérica fue el dios Olmeca del maíz, que parece haber florecido entre los años 1500 y 3000 A.C (Kato *et al.*, 2009). La representación que le daban al dios era antropomorfa, donde incluían en su cuerpo rasgos humanos y vegetativos, siendo una manera de mostrar que el dios poseía las características más importantes de la planta, como su aparato reproductor o sus características físicas (Figura.1). Dándole un significado, para las culturas de ese tiempo, de fertilidad, renacimiento, abundancia, riqueza y vitalidad cósmica (Florescano, 2003).



**Figura 1.** Códice Fejervary Mayer. Ehécatl el hombre sentado representa la planta de maíz doblada. BMNAH. C. L. (Kato *et al.*, 2009).

Por otro lado, los mitos regían el comportamiento y pensamiento del pueblo, guiándolos en su día a día, en sus decisiones políticas o en sus creaciones artísticas. Y justo uno de sus grandes mitos era el del origen del hombre, descrito en el libro Popol Vuh. El Popol Vuh es un documento Maya en donde, de una manera muy poética, se cuenta que los dioses decidieron, después de varios intentos fallidos, formar a los seres humanos. Con mazorcas color amarillo y blanco, hicieron nueve diferentes bebidas creando la sangre y carne del primer hombre y la primera mujer. Según el mito, eran criaturas maravillosas que se convirtieron en el primer padre y madre de la tierra, poblando al mundo para que alabaran y ofrendaran a los dioses (Kato *et al.*, 2009).

Así mismo, la convivencia con este tipo de plantas tan importantes culturalmente hablando, llevaron a que el humano interviniera sobre ésta directamente. Como consecuencia, crearon un conocimiento sobre las características que tenía, su crecimiento en diferentes tipos de suelo, la cantidad de agua que necesita para crecer, las temperaturas que soporta y otros fenómenos. La observación de estas características llevó a seleccionar a aquellas plantas con fenotipos específicos que satisfacían las necesidades del hombre, como tener un mejor sabor, granos más grandes o mayor resistencia a ciertas condiciones ambientales, descartando las plantas que no las cumplían. Estas pequeñas intervenciones, seleccionaron al maíz como la planta que conocemos hoy en día (Carrillo, 2009).

Una de las principales características que distinguen al maíz es su variabilidad. El maíz es una planta que no se autopoliniza, sino que las flores de una planta polinizan a la otra, proporcionándole una gran diversidad genética. Ésta es una particularidad que permite hacer una selección más minuciosa sobre los rasgos que posee el maíz. Su enorme variabilidad hizo que se convirtiera en una planta omnipresente en Mesoamérica ocupando muchos tipos de suelo, clima y altitudes (Carrillo, 2009).

Los estudios arqueológicos demostraron cómo fue el proceso evolutivo del maíz, por medio de las modernas técnicas como el análisis genómico, espectrometría de masas e isótopos de Carbono 14, han expuesto que, no solo hubo una zona de

domesticación, sino que existieron varios centros de propagación del teocintle desde hace 8000 años (Kato *et al.*, 2009).

Una de las teorías, que a lo largo de los años se ha mantenido y sustentado, es que el teocintle es el único ancestro y progenitor del maíz actual y, como se expuso anteriormente, por la domesticación fue evolucionando hasta ser lo que hoy conocemos (Acosta, 2009).

Dos descubrimientos importantes que fundaron la teoría de que teocintle es el ancestro del maíz fueron:

1. La acumulación de evidencia genética donde se demostró que el maíz surgió del teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*).
2. Los resultados de los análisis de espectrometría de masas y de Carbono 14, reafirmaron – como se comentó anteriormente- las zonas de origen.

La conclusión fue que el teocintle fue domesticado al sur de México y de ahí, se fue dispersando a todo el mundo (Bedoya, 2010).

Aun contando con estas evidencias, quedan muchas preguntas sobre la mesa que no son posibles de resolver al cien por ciento, como por ejemplo ¿Cómo es que una planta tan sencilla y sin ningún asomo de poder llegar a ser algo más complejo, fue el ancestro? ¿Sólo fue un tipo de teocintle o fueron varias especies que lograron llegar a tan importante resultado? Estas preguntas quedan por contestar. Sin embargo, lo que sí sabemos es que el maíz es el resultado de la cooperación entre el ser humano y la naturaleza, proceso conocido como domesticación.

## **5.2.2 Maíz.**

### **5.2.2.1 Taxonomía.**

Nombre científico (género y especie): ***Zea mays* L.**

Reino: Plantae

Clase: Angiosperma

Orden: Poales

Familia: Poaceae

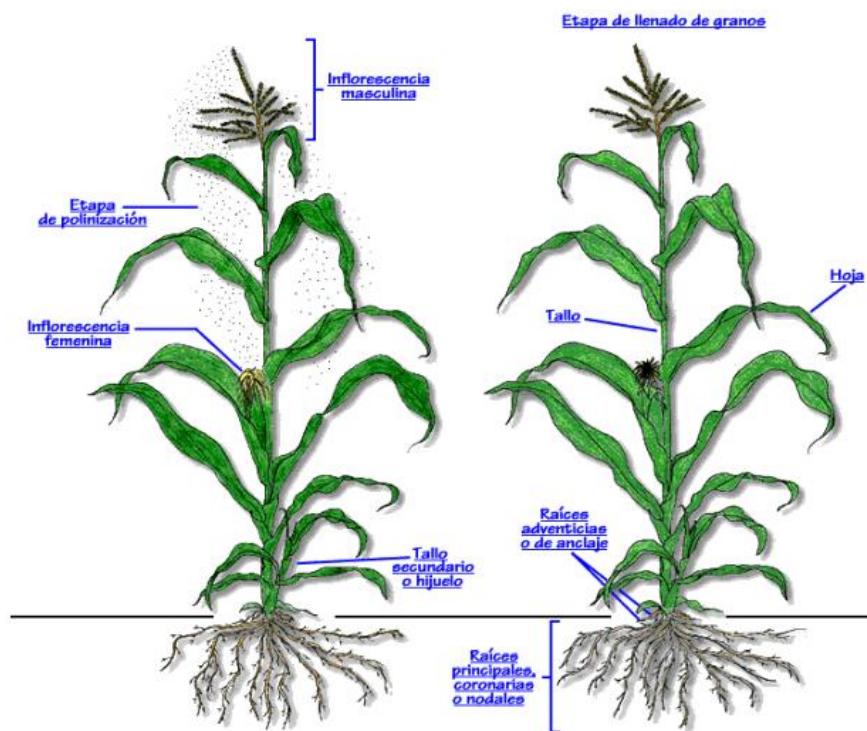
### **5.2.2.2. Características de la planta.**

El maíz es una monocotiledónea anual que contiene inflorescencias masculinas y femeninas dentro de la misma planta (Sánchez, 2014) (Guacho, 2014). La inflorescencia masculina, denominada también espigón, está compuesta por florecillas amarillas y cada flor se compone de la panícula que tiene 3 estambres en donde se desarrolla el polen. El espigón contiene entre 20 y 25 millones de granos de polen (Doebley, 1980; Guacho, 2014). La flor femenina, a diferencia de la masculina, desarrolla menos cantidad de polen. Cuando la inflorescencia femenina ha sido fecundada con el polen de la flor masculina, se desarrolla lo que conocemos como mazorca, que es donde se encuentra la semilla (granos del elote). La mazorca tiene un penacho color amarillo oscuro que forma los estilos. La cubierta de la semilla es el pericarpio, que en su interior tiene el endospermo. El grano constituye alrededor del 42% del peso seco de la planta (Doebley, 1980; Guacho, 2014; Sánchez, 2014).

El tallo es totalmente recto, sin ramificaciones, se puede decir que es un tallo sencillo y robusto que mide de 2 a 6 metros de altura, dependiendo de la raza de maíz (Sanchez, 2014; Doebley, 1980). Las hojas están abrazadas al tallo, son

alargadas, de gran tamaño, con pequeñas vellosidades en el haz y sus extremos tienden a ser afilados y cortantes (Guacho, 2014).

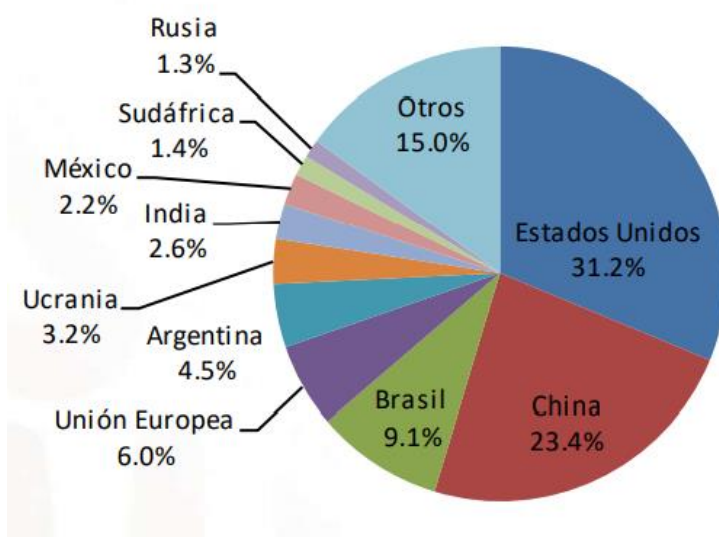
Su sistema radicular es complejo, voluminoso y fibroso. La raíz primaria y raíces seminales se desarrollan endógenamente en el embrión. Estos dos tipos de raíces son las primeras en captar agua, nutrientes y son aquellas que se anclan al suelo para darle estabilidad a la planta. Las raíces que aparecen después de la germinación, como las secundarias y de abrazadera (o nodales en el aire y en el suelo) continúan creciendo y expandiéndose, conformando una amplia red en la planta adulta. El sistema radicular constituye cerca del 52% de la planta, siendo su principal función la absorción de agua, el anclaje en el suelo y la captación de nutrientes (Sánchez, 2014; Doebley, 1980).



**Figura 2.** Esquema de la planta de maíz. (Imagen recuperada de Martínez, 2019).

### 5.2.3. El maíz como cultivo.

El maíz es, por mucho, uno de los cultivos agrícolas más importantes a nivel mundial, desde el punto de vista alimentario, económico, social y político (Miramontes, 2012). Son muchos los países que se dedican a la siembra de esta planta, entre los más importantes se encuentran, Estados Unidos, China, Brasil, México y Argentina (Tabla 2; Figura 3) (Sánchez, 2014).



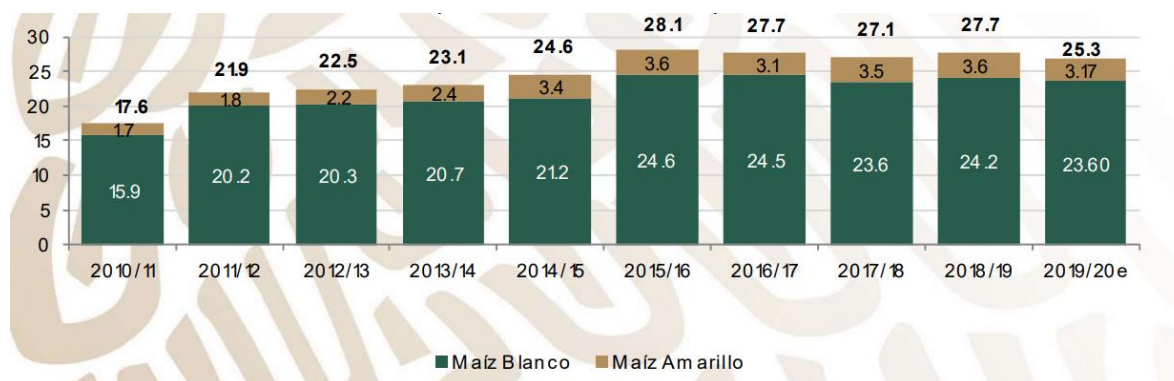
**Figura 3.** Producción de maíz en el mundo por países (Imagen recuperada de SADER, 2020).

El maíz es sembrado en aproximadamente 7.4 millones de hectáreas en el mundo, más de la mitad del total de todos los demás cultivos juntos. Actualmente se siembran diferentes tipos de maíz, en diferentes tipos de suelo; sin embargo, las variedades perfeccionadas requieren un suelo arcilloso, con suficiente humedad y un clima cálido (Kato *et al.*, 2009) (Miramontes, 2012).

Como el maíz es una planta tan cultivada, también se convierte en una fuente de empleo. Prácticamente 3 millones de personas trabajan en el cultivo del maíz, eso equivale al 40% de la fuerza laboral del sector agrícola y en México representa cerca del 8% (Nadal y Wise, 2004). Por esto, el maíz es el cultivo más importante de México. El maíz blanco es más cultivado que el maíz amarillo (Figura 4). El maíz blanco se utiliza generalmente para la elaboración de tortillas y tamales, aunque



también se obtienen aceites e insumos para la fabricación de diversos productos. Mientras que el maíz amarillo no se destina para consumo humano, la mayoría se ocupa para el ganado y la producción de almidón. En general, se estima que 93% de la producción del año 2019/20 corresponde a maíz blanco.



**Figura 4.** Producción nacional de maíz por variedad (millones de toneladas) (Imagen recuperada de SADER, 2020).

#### 5.2.4. Sequía.

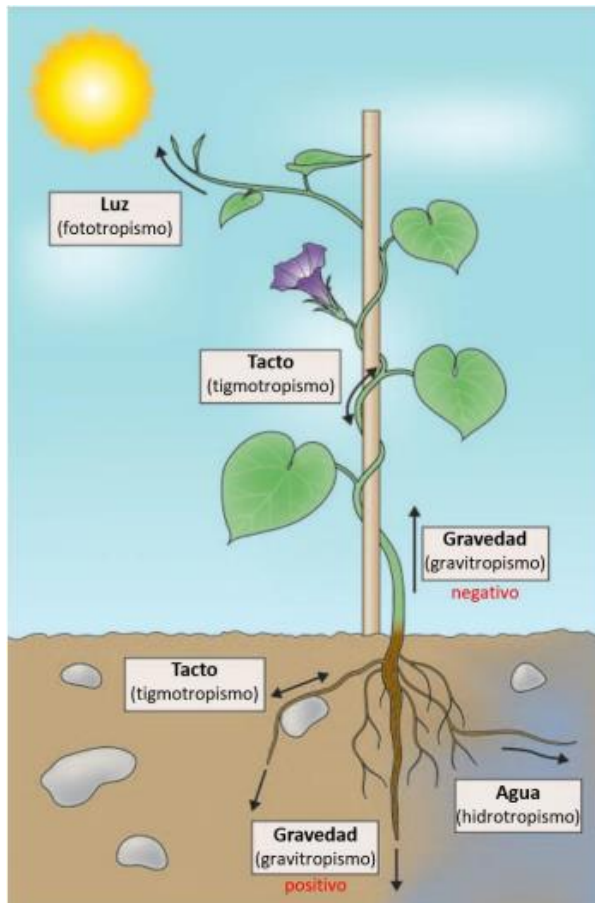
La sequía es un fenómeno climático que se caracteriza por la reducción de humedad en el suelo, o por déficit de lluvias (Ortega, 2013). Desde tiempos inmemorables, la sequía ha sido causante de migraciones masivas, hambrunas y guerras por carencia en recursos alimentarios. Hoy en día, sigue afectando a la población humana de manera económica y alimenticia. En México, que es un país en vías de desarrollo, donde la agricultura es una fuente principal de empleo y de ingresos económicos, la sequía es un grave problema. En las últimas décadas a falta de lluvias ha afectado, grandes extensiones agrícolas; las tierras se salinizan reduciendo la fertilidad del suelo, ocasionando que se utilice el 70% del agua fresca para los cultivos (Ortega, 2013). Desafortunadamente, los episodios de sequía continúan en aumento, puesto que en la década de los 70's había un 15% de terreno afectado y en la actualidad, alcanza a ser el 30%, y sigue en aumento (Gallardo, 2018).

Las plantas son sistemas complejos y existen factores que perturban su desarrollo, crecimiento y producción, es la sequía uno de ellos. Este factor hace que la materia

orgánica del suelo disminuya, haciendo que el suelo se haga infértil y con menor capacidad de retener humedad. El agua funciona como un disolvente, agente enfriador y reactiva en las células de la planta ya que, sin ella, las células comienzan a colapsar, dañándose principalmente sus membranas, desnaturalizando sus proteínas, eliminando funciones celulares y exteriormente, marchitando la planta (Cassab y Sánchez, 2008).

### **5.2.5. Tropismos.**

A diferencia de los animales, las plantas, generalmente están sujetas al suelo, sin poder huir de las condiciones ambientales a las que están expuestas. Motivo por el cual, han desarrollado diferentes sistemas de respuesta y percepción a los cambios en el ambiente. Algunos de estos estímulos ambientales conllevan a una respuesta que implica algún tipo de movimiento. Estos movimientos dirigidos pueden afectar órganos de la planta, como hojas, tallos, brotes, raíces, etc., que al cambiar su dirección varían también su posición en el espacio. Los tropismos son aquellos movimientos de curvatura de los órganos, estimulados por condiciones ambientales. Hay varios tipos de tropismos, por ejemplo: fototropismo, gravitropismo, tigmotropismo e hidrotropismo (Sotelo, 2015). Los tropismos son nombrados de acuerdo con el estímulo al cual los órganos orientan su crecimiento y están regulados por diferentes mecanismos de respuesta ya sean fisiológicos y/o moleculares (Martínez, 2019).



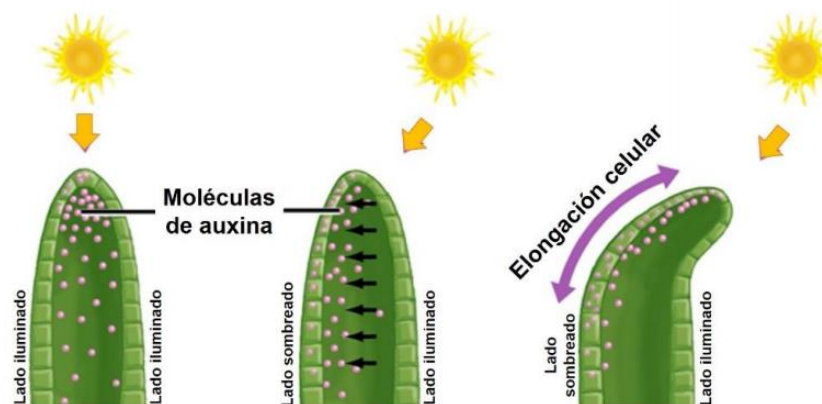
**Figura 5.** Interacción de tropismos. En esta imagen se muestra cómo los tropismos interactúan en conjunto para determinar el crecimiento de las plantas. En rojo se señala el efecto de la gravedad, que puede ser positivo (crecimiento hacia el vector de la gravedad en el sistema radicular) o negativo (crecimiento en contra del vector de la gravedad en la parte aérea). Imagen modificada de Jones et al. (2012). (Imagen recuperada de Martínez, 2019).

### 5.2.5.1. Fototropismo.

El fototropismo es un ejemplo clásico de una respuesta adaptativa en donde la planta altera su crecimiento para optimizar la captura de luz y aumentar su productividad fotosintética (Fankhauser y Christie, 2015).

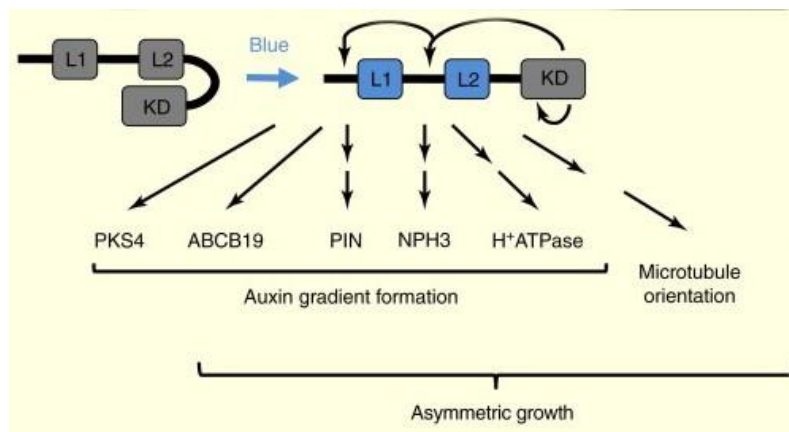
La luz, además de ser una fuente de energía esencial para las plantas, les proporciona una variedad de señales para un crecimiento y desarrollo adecuados (Pedmale *et al*, 2010). La percepción de la luz está mediada por fotorreceptores llamados fitocromos, criptocromos y fototropinas, que responden en función del estímulo que los excita, y así, desencadenar distintas respuestas en la planta (Martínez, 2019). En condiciones de luz azul las plantas presentan un fototropismo positivo, mientras que, en longitudes de luz roja o infrarrojo, muestra una respuesta fototrópica negativa, que quiere decir que se aleja de la luz (Pedmale *et al*, 2010).

Uno de los datos reportados en la literatura hizo notar que la hormona vegetal auxina, tiene una mayor concentración en el lado que no tiene un estímulo lumínico, lo que induce la elongación celular, resultando en la reorientación del tallo en dirección a la luz (Figura 6).



**Figura 6.** Generación de la curvatura fototrópica. La mayor concentración de auxinas se acumula en el lado que no recibe la luz directamente) de los tallos fotoestimulados, lo cual genera la reorientación y crecimiento en dirección de la luz (Imagen recuperada de Martínez, 2019)

Las fototropinas tienen dominios LOV (Light, Oxígeno or Voltage) y un dominio cinasa en el C-terminal. Al incidir luz en este complejo induce cambios conformacionales que inician una cadena de fosforilación que produce la señalización de ABCB19 (ATP-binding cassette B19) y de PKS4 (Phytochrome kinase substrate 4) que participan en el transporte de auxinas (Figura 7). El cambio conformacional induce la activación de otras vías de señalización, como la de las proteínas PINS (Pins-formed), NPH3 (Non-phototropic hypocotyl 3) y la ATPasa. Aun es desconocido el mecanismo por el cual estos complejos se activan (Fankhauser y Christie, 2015; Martínez, 2019).



**Figura 7.** Modelo y sincronización de los primeros pasos de señalización que conducen al fototropismo. (Imagen Recuperada de Fankhauser y Christie, 2015)

### **5.2.5.2. Tigmotropismo**

El tigmotropismo es la respuesta de la planta al contacto con un objeto, animal, otra planta o incluso el viento. Algunas plantas necesitan la percepción y respuesta a estímulos táctiles para su desarrollo y crecimiento. Un buen ejemplo son las plantas trepadoras que dependen de un estímulo físico para crecer hacia lugares que le brinden soporte y estén lejos de depredadores (Raven y Johnson, 2004).

En el momento en el que algún órgano de la planta entra en contacto, las células epidérmicas especializadas perciben el estímulo y promueven el crecimiento desigual, haciendo que el órgano se enrolle alrededor del objeto. Según parece, tanto la auxina como el etileno (otra hormona vegetal), están involucrados en este mecanismo y se ha identificado que se expresan los genes Touch (TCH) en *A. thaliana*, así como también especies reactivas de oxígeno (ROS), sin embargo, sigue sin comprenderse el mecanismo de acción (Raven y Johnson, 2004; Martínez, 2019).

### **5.2.5.3. Gravitropismo**

El gravitropismo es el crecimiento en dirección al vector de la gravedad de una planta, puesto que, al emerger tanto la parte aérea como las raíces, crecen en favor de algún vector de la gravedad (Martínez, 2019).

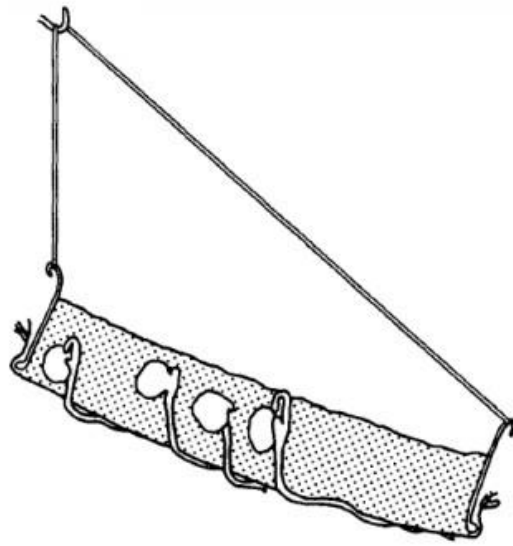
La parte aérea se dice que tiene una respuesta gravitrópica negativa porque crece en contra de la gravedad. A diferencia de las raíces que crecen en favor de la gravedad, por lo que tiene una respuesta gravitrópica positiva. El gravitropismo parece estar regulado por diferentes mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentra el transporte polar de auxinas, la concentración intracelular de calcio, etileno, Inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3), pH extracelular y óxido nítrico (Sato *et al.*, 2015; Martínez, 2019).

#### **5.2.5.4. Hidrotropismo**

El hidrotropismo se define como el crecimiento dirigido de las raíces hacia la disponibilidad de agua, gracias a la capacidad de percibir un gradiente de humedad. Debido a la evolución, la raíz ha desarrollado respuestas únicas y complejas para sobrellevar, contener y percibir los distintos tipos de estrés, también es un órgano fundamental de la planta, ya que es la principal fuente de captación de agua y nutrientes (Cassab y Sánchez, 2008). La raíz primaria del maíz es la primera en captar el gradiente de humedad mediante las células de cofia, la raíz se ancla al suelo, penetrando hasta lo más profundo para llegar a zonas con una mayor humedad. No se conoce con exactitud el mecanismo que se desencadena en la célula para que se inicie una respuesta hidrotropica en la raíz. Sin embargo, se sabe que el hidrotropismo es crucial para el establecimiento del sistema radicular y, por lo tanto, tiene un rol crucial para que la planta sobreviva en condiciones de escasas de agua (Eapen et al., 2005) (Cassab y Eapen, 2012).

##### **5.2.5.4.1. Estudios de hidrotropismo en raíces**

Knight en 1811 fue el primero en demostrar el hidrotropismo en raíces, pero no fue hasta después que Sachs realizó un experimento para observar el fenómeno. Colocó varias semillas dentro de un cilindro colgante de malla (Figura 8) que en su interior contenía aserrín húmedo y al colocar el cilindro inclinado, observó que en un principio las raíces crecían con una respuesta gravitropica positiva y después, la raíz se curvaba en dirección al sustrato húmedo (Takahashi, 1997; Martínez, 2019). Más adelante, se concluyó que el grado de interacción entre el hidrotropismo y el gravitropismo, va a depender de la intensidad de ambos estímulos. Así como la capacidad de la planta para detectar el estímulo y responder a este.



**Figura 8.** Cilindro colgante realizada por Sachs para demostrar la respuesta hidrotropica en raíces de diferentes plantas (Imagen recuperada de Martínez, 2019)

A nivel genético, se han encontrado algunos genes involucrados en este tropismo. *MIZ1* es uno de los primeros genes relacionados con la respuesta hidrotropica. *MIZ1* (*Mizu-kussei 1*) fue encontrado en *A. thaliana* y su principal característica es la ausencia de la respuesta hidrotropica. *MIZ1* codifica para una proteína de función desconocida y se ha visto que tiene una alta expresión en la cofia de la raíz y estela. También, se reporta que su sobreexpresión aumenta el hidrotropismo en raíces de *A. thaliana*. *MIZ2* es otro de los genes encontrados en este tropismo que al igual que *MIZ1* no presenta respuesta hidrotropica y codifica para la proteína ARF-GEF (GNOM) que está activa en la regulación del hidrotropismo y en diferentes aspectos del desarrollo de la planta incluida la respuesta gravitropica (Kobayashi *et al.*, 2007; Eapen *et al.*, 2017).

A nivel de fitohormonas, el ABA, juega un papel importante en la tolerancia a sequía y está muy relacionado a respuesta a estrés hídrico, puesto que, se ha visto que un cambio en la homeostasis de ABA puede suceder bajo un estímulo de déficit hídrico. Se tiene la hipótesis que ABA podría ser un regulador del transporte de auxinas en la respuesta hidrotropica de la raíz (Eapen *et al.*, 2005).



### **5.2.6. Proteínas Intrínsecamente Desordenadas**

Uno de los principios bases de la bioquímica es que la función de las proteínas está determinada por su estructura tridimensional, y como consecuencia, conocer la estructura de las proteínas de interés, conlleva a conocer su función en la célula (Ward *et al.*, 2004). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado varias proteínas con una estructura total o parcialmente indefinidos, teniendo una o varias funciones en la célula. Éstas fueron denominadas, proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, por sus siglas en inglés) o proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDPR, por sus siglas en inglés). Estas proteínas tienen una menor complejidad en secuencia de aminoácidos, dando como resultado la carencia de una estructura terciaria estable en condiciones fisiológicas y representan el 50% de las proteínas asociadas a las vías de señalización celular, la regulación celular, donde el plegamiento y la unión de complejos proteicos es un mecanismo común. (Chen *et al.*, 2020; Iakoucheva, 2002).

#### **5.2.6.1. Clasificación de IDP/IDPR**

En algunos estudios se indicó que las proteínas intrínsecamente desordenadas, pueden agruparse de una manera algo burda en dos clases principales de desorden; desorden compactado o colapsado, en donde se presenta en forma globular “fundido” (Lieutaud *et al.*, 2016). Esto quiere decir que las IDP/IDPR funcionales pueden ser mayor o menormente compactos y al mismo tiempo poseer una mayor o menor estructura secundaria o terciaria flexible (Uversky, 2013). La segunda clasificación es el desorden extendido que se presenta en las IDP como espiral o glóbulo pre-fundido (Lieutaud *et al.*, 2016). Las proteínas o regiones que son extendidas no representan una identidad uniforme estable (Uversky, 2013).

### 5.2.6.2. Características de las IDP/IDPR

Se ha señalado que las IDP tienen una secuencia de aminoácidos con redundancia y de baja complejidad (Uversky, 2013). Las IDP/IDPR parecen contener pocos residuos hidrofóbicos, y muchos residuos cargados. Se realizó una comparación más detallada de las secuencias de aminoácidos que reveló que, comparado con proteínas o dominios ordenados, las IDP/IDPR contienen significativamente menor número de aminoácidos promotores de orden. Y en cambio, están enriquecidos con residuos que promueven el desorden, (Ala, Arg, Gly, Ser, Glu, Lys y Pro). Por esto, las secuencias de las IDP tienen residuos más diversificados que las proteínas con estructura nativa (Uversky, 2013). Sin embargo, las diferencias entre proteínas ordenadas y desordenadas, va más allá de su composición de aminoácidos. Se concluyó que puede discriminar a las proteínas y regiones desordenadas y ordenadas con atributos como hidropatía, carga neta, índice de flexibilidad, propensiones a formar una hélice, etc. (Dunker *et al.*, 2001).

Las proteínas con una estructura nativa se pliegan para formar su estructura tridimensional y después se unen a sus socios para realizar alguna función en específico. En el caso de las IDP/IDPR, no se pliegan y aunque algunas pueden obtener alguna estructura secundaria, no se forma de manera espontánea puesto que requieren de socios específicos para obtener una estructura más ordenada. Esto quiere decir que no tienen un código de plegado que defina la capacidad de las proteínas para plegarse (Uversky, 2013). Estos argumentos sugieren que una IDP puede cambiar de estructura muy fácilmente dependiendo del ambiente e interacciones con otras moléculas (Hsu *et al.*, 2012). Estas características le proporcionan una plasticidad conformacional de tener un amplio espectro de ventajas estructurales, sobre las proteínas nativas. Algunas de ellas son tener una mayor velocidad de interacción con socios, regulación eficiente por una rápida degradación, capacidad de unión a diferentes socios, plasticidad de unión, alta accesibilidad en los sitios destinados a modificaciones postraduccionales, etc. (Dunker, A *et al.*, 2008). Estas ventajas permiten que las IDP/IDPR estén presentes en múltiples mecanismos celulares. Por ejemplo, pueden ser proteínas de andamio,

muchas de ellas son factores de transcripción, específicamente regulación de la transcripción, regulación de vías celulares, como interruptores moleculares para encender y/o apagar una cascada de señalización, etc. (Uversky, 2013). Además, pueden funcionar como receptores de membrana, proteínas de andamiaje, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción y receptores nucleares de hormonas (Cuevas-Velázquez y Covarrubias, 2011).

La mayoría de las investigaciones sobre este tipo de proteínas están relacionadas con descifrar su secuencia y sus propiedades químicas para conocer el grado de desorden de la proteína de interés. También se ha encontrado que varias de estas proteínas están relacionadas con alguna patología, como el cáncer y trastornos neurodegenerativos (Tsuetkou *et al.*, 2012). La naturaleza dinámica y desordenada de estas moléculas es un desafío para la caracterización de su estructura, teniendo que buscar distintas metodologías. Generalmente para el análisis de su estructura se necesitan herramientas como resonancia magnética nuclear (RMN), dispersión de rayos X, transferencia de energía de resonancia Förster y espectrometría de masas (Chen *et al.*, 2020).

## 6. Metodología.

### 6.1. Material vegetal.

En este proyecto se utilizaron dos líneas de maíz, de las cuales se tenía el conocimiento del tipo de respuesta hidrotrópica.

**Tabla 3.** Línea de maíces utilizadas y su respuesta al hidrotropismo.

Línea de maíz	Respuesta Hidrotrópica
Zacualpan (ZAC)	ROBUSTA
ASH	DEBÍL

### 6.2. Esterilización y germinación de semillas.

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se colocaron las semillas con 50-40 mL de agua destilada estéril y se mantuvo en agitación por 10 minutos. Posteriormente se desechó el agua y se le agregó una solución al 15% (v/v) de hipoclorito de sodio agitando constantemente por cuatro minutos. Pasado el tiempo se desechó y se hicieron tres lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito que pudieron haber quedado.

Se esterilizó una charola de peltre flameándola, después se le colocaron tres pliegos de papel absorbente con 200 mL de agua destilada estéril. Las semillas previamente esterilizadas, se acomodaron en la bandeja y se cubrieron con un pedazo de papel aluminio.

La bandeja se colocó con una leve inclinación en una cámara de crecimiento sin luz a temperatura controlada de 28°C por tres días.

El procedimiento de esterilización de las semillas se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

### 6.3. Sistema para determinar la respuesta hidrotrópica.

El sistema se conformó de una caja de acrílico transparente con dimensiones de 20 x 25 x 10 cm, con tapa. En la cual, en cada uno de los costados se colocó una esponja floral (10 x 7 x 3 cm) saturada en agua por osmosis. La función de la esponja fue ser la única fuente de agua, actuando como un hidroestimulante, ya que al fondo de la caja se coloca una solución saturada de carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) que al ser higroscópico, genera un gradiente de humedad en el fondo de la caja y 8 cm arriba de ésta.

Tres días después de la germinación, las semillas presentaron una raíz primaria de aproximadamente 2 a 3 cm. La plántula se posicionó y sujetó con alfileres en la esponja floral saturada de agua, de manera que la raíz quedó al borde de la esponja. La esponja se colocó a los dos lados de la caja, dejando suspendida la raíz 8 cm arriba de 200 mL de la solución higroscópica.

Una vez instalado del sistema, se colocaron en una charola 800 mL de agua y se llevó a un cuarto de crecimiento con una temperatura de  $28^\circ C$  ( $2 \pm$ ). Los sistemas en las charolas se cubrieron con una tela negra y se almacenaron por 24 h.

Como control positivo se colocó el mismo sistema, aunque en lugar de verter la solución higroscópica, se le agregaron 400 mL de agua destilada estéril.

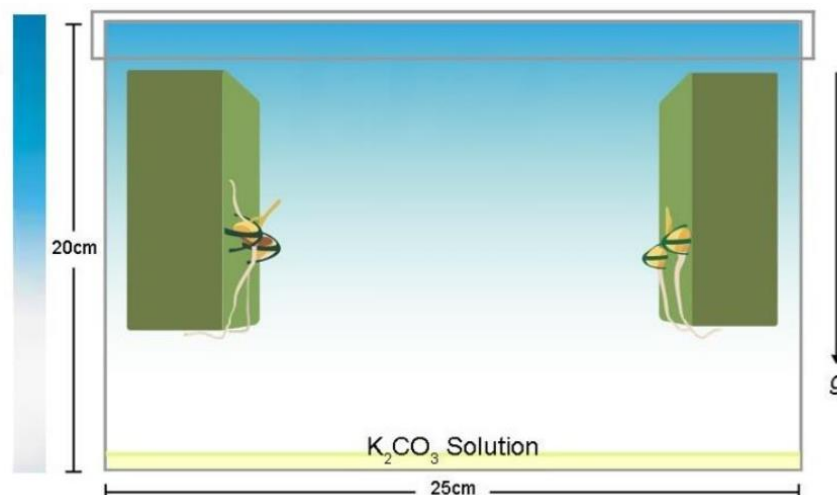


Figura 9. Representación gráfica del sistema hidrotrópico (Recuperada de Eapen *et al.*, 2017)

El reto se colocó en dos tiempos, a 6 horas y 24 horas. Pasado ese tiempo, se recolectó la raíz primaria de cada una y se congeló con nitrógeno líquido, para guardarlas a -70°C.

## **6.4. Procesamiento de IDPs/IDPR.**

### **6.4.1. Enriquecimiento de IDPs/IDPR.**

Las raíces se pulverizaron con nitrógeno líquido y se agregaron a tubos de 1.5 mL hasta donde el tubo marca 1 mL y se añadieron 400 µL de Buffer de extracción (Tris-HCl 20mM a pH 7.2, NaCl 0.5M, DTT 2mM y PMSF 1X).

Los tubos se agitaron en un vortex hasta que la muestra se homogeneizó y luego se centrifugaron por 5 minutos a 10000 g. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos y se calentaron a 95°C por 5 minutos con agitación constante.

Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron por 10 minutos a  $20 \times 10^3$  g. El sobrenadante se recuperó en tubos de 1 mL nuevos y se guardaron a -70°C.

### **6.4.2. Visualización de IDPs/IDPR.**

#### **6.4.2.1. Precipitación de IDPs/IDPR.**

La precipitación se hizo con Metanol/Cloroformo. Por cada 800 µL de muestra, se añadieron 480 µL de Metanol y 160 µL de Cloroformo. Una vez agregados los disolventes, se mezclaron y centrifugaron por 5 minutos a 20 000 x g.

El sobrenadante fue eliminado sin tocar la interfaz y se adicionaron 300 µL de Metanol. Nuevamente fueron mezclados y se centrifugó por 10 minutos a 20 000 x g. Posteriormente se decantó la fase líquida, y se conservó el precipitado.

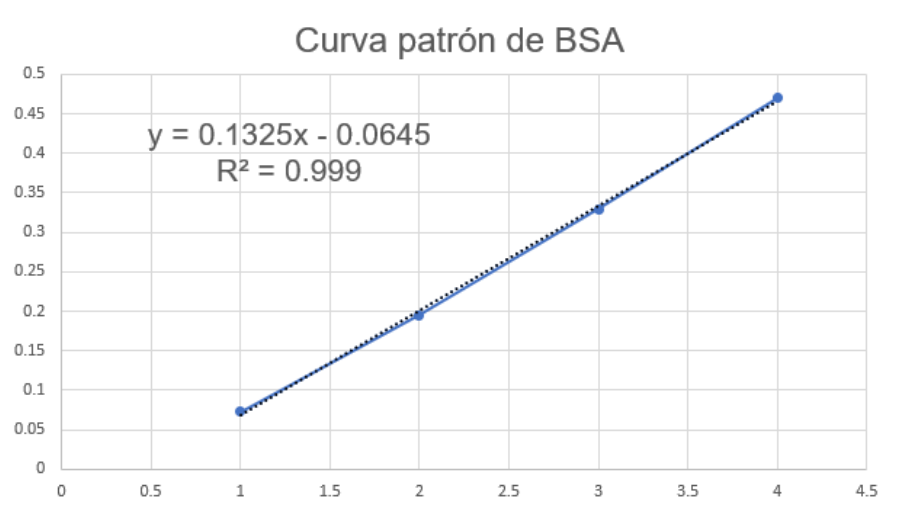
### 6.4.2.2. Preparación y Cuantificación de IDPs/IDPR.

Al precipitado se le añadió Buffer Lameli 1X y se calentó a 95°C por 5 minutos. Después se centrifugó a 20 000 x g por 5 minutos.

En una celda para espectrofotómetro se agregaron 400 µL de agua de osmosis, 2 µL de muestra y 200 µL de solución de Bradford. Se midió en el espectrofotómetro a 595 nm. Con el resultado que se obtuvo, se calculó la cantidad de proteína que se cargaría en los geles de poliacrilamida.

0.3 absorbancia..... 3 µL de muestras.

También, se realizó una curva de proteína patrón de albumina de suero bovino (BSA) para determinar la proteína total obtenida.



**Figura. 10.** Curva patrón de proteína albumina de suero bovino (BSA)

#### **6.4.2.3. Perfil del desordoma.**

Se realizaron diluciones seriadas de las IDPs, dependiendo del resultado de la cuantificación por Bradford. Estas diluciones se precipitaron y corrieron en un gel SDS/PAGE y se tiñó con plata. Estos datos son para saber cuánto material se necesita para usar en el ensayo de degradación y para que eventualmente las muestras puedan ser analizadas por espectrometría de masas.

#### **6.4.2.4. Tinción por plata.**

El gel se sacó de los vidrios poniéndolo en agua caliente por 2 minutos. Y se colocó en un recipiente con la solución Fijadora (Ácido acético 10%, Etanol 30%) por al menos una hora, después se desechó la solución Fijadora y se le agregó la solución de enjuague (Etanol 20%) por 20 minutos. Pasado ese tiempo se tiró la solución de enjuague y se adicionó agua MiliQ por 10 minutos, se desechó el agua MiliQ y se añadió la solución Sensibilizadora (sodio trifosfato 0.02%) por 1 minuto. Una vez pasado el tiempo se retiró la solución Sensibilizadora y se hicieron tres lavados de 20 segundos con agua MiliQ, para agregarle la solución de Nitrato de plata al 0.2% por 45 minutos. Se retiró el Nitrato de plata y hizo un lavado de entre 5-10 segundos con agua MiliQ. Posteriormente se añadió la solución Reveladora (Carbonato de sodio 3%, Formaldehído 0.025%, Sodio trifosfato 10 mgm/L) hasta que las bandas aparecieran. Cuando las bandas fueron claras, retiró el revelador y se añadió la solución Fijadora para detener la reacción (Blum *et al.*, 1986).

#### **6.5. Espectrometría de masas.**

Las muestras enriquecidas con IDP/IDPR de las raíces con las diferentes condiciones, fueron enviadas a espectrometría de masas para conocer el perfil de proteínas en las respuestas hidrotropicas robusta y débil, en condición de reto hidrotropico y control. En la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, la identificación de proteínas es por LC-MS/MS con el espectrómetro de masas LTQ-ETD de la marca Thermo Scientific.



## **6.6. Análisis de los resultados de espectrometría de masas.**

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas se analizaron por el programa Scaffold, en el cual se utilizaron los siguientes parámetros: Protein Threshold: 99.9%; Min # Peptides: 1; Peptide Threshold: 95%. Estos parámetros fueron los más altos que nos permite el programa y, por lo tanto, los criterios más estrictos, de manera que la probabilidad de que las proteínas que nos resulten sean altas. Cada grupo de proteínas se consultó en la base de datos de UniProt. Para ver el grado de desorden de cada una de las proteínas encontradas, se analizaron por medio del programa IUPredA2 con el parámetro; IUPred2 long disorder (default). Con las gráficas resultantes de IUPredA2, se sacó el porcentaje del nivel de desorden presente en cada grupo de proteína.

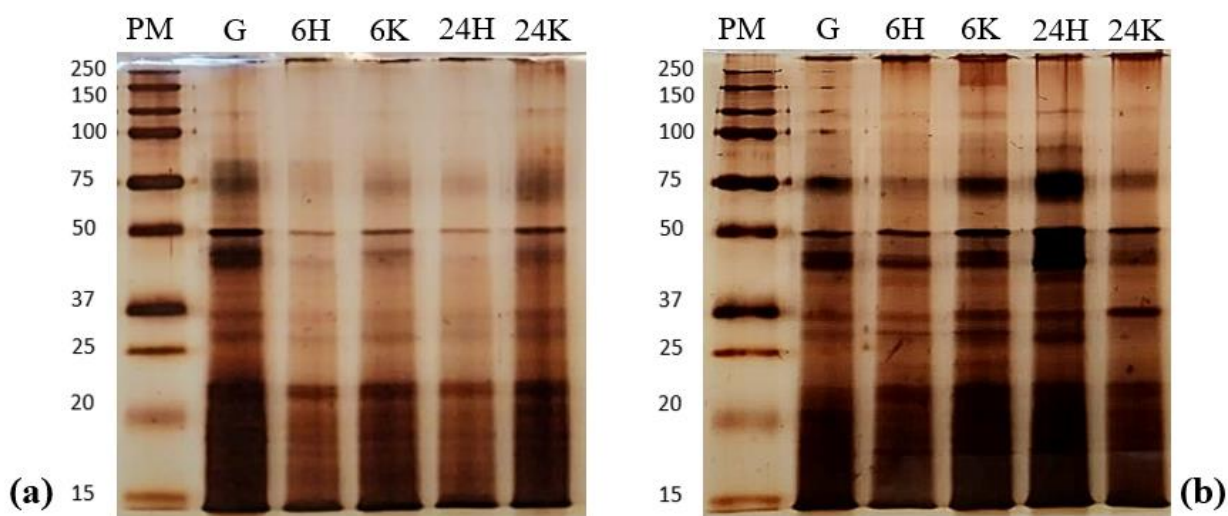
## 7. Resultados y discusión.

### 7.1. Perfil de proteínas.

#### 7.1.1. Geles SDS/PAGE.

Para visualizar la calidad de las proteínas obtenidas por los ensayos de enriquecimiento, las muestras se cuantificaron por el método de Bradford y se analizaron por medio de geles SDS/PAGE (Figura 11) que se tiñeron con plata.

La cuantificación de Bradford es una metodología que nos arrojó un resultado ambiguo por la naturaleza de las proteínas, puesto que al visualizar las proteínas en el gel SDS/PAGE, se vio que había una mayor cantidad de proteína. Inicialmente se tiñó el gel con azul de Coomassie; sin embargo, las proteínas no se tiñeron y, por ende, no se lograron visualizar en el gel. Por el contrario, con la tinción de plata si se tiñeron las proteínas, logrando ver el patrón de proteínas y notar que teníamos mayor concentración de proteínas de lo que la cuantificación por Bradford nos proporcionó.



**Figura 11.** Gel SDS/PAGE con tinción de plata del perfil de proteínas. **(a)** ASH G (ASH 3ddg); ASH 6/H (ASH 6 horas en agua); ASH 24/H (ASH 24 horas en agua); ASH 6/K (ASH 6 horas en  $K_2CO_3$ ); ASH 24/K (ASH 24 horas en  $K_2CO_3$ ). **(b)** ZAC G (ZAC 3 ddg); ZAC 6/H (ZAC 6 horas en agua); ZAC 24/H (ZAC 24 horas en agua); ZAC 6/K (ZAC 6 horas en  $K_2CO_3$ ); ZAC 24/K (ZAC 24 horas en  $K_2CO_3$ ).

Los geles mostraron que obtuvimos una buena cantidad de proteína en cada una de las líneas de maíz y en las condiciones probadas. Al mismo tiempo, se comprobó que la calidad de las muestras era buena, puesto que no mostró un barrido de bajo peso molecular que indicaría la degradación de las proteínas. A pesar de que todos los carriles se cargaron con la misma cantidad total de proteínas de acuerdo con el ensayo de Bradford, se observó mayor contenido de proteínas teñidas con plata en ZAC que en ASH. En general, el patrón del perfil de proteínas de todas las muestras parece compartir ciertas bandas muy específicas, sin importar la línea, condición, ni tiempo.

En el gel que muestra los patrones de la línea ASH (Figura. 11 **(a)**) se puede ver claramente como el carril que tiene solo el patrón de las proteínas de raíces de tres días después de la germinación (ddg), contiene una mayor concentración de proteína en comparación con las otras cuatro condiciones, e inclusive, las bandas que comparten en ASH (G) se ven más marcadas que en cualquiera de las otras columnas. Las muestras control, ASH 6/H y ASH 24/H, son los carriles que menos tienen proteína. Lo que tienen en común es que son proteínas que se extrajeron de las raíces de la condición control (agua). Caso contrario, ASH 6/K y ASH 24/K muestran una mayor abundancia de proteínas en comparación con las condiciones control y concuerdan con los cálculos que se mostraron anteriormente. En el gel de la línea con respuesta hidrotópica débil (ASH), no se notan bandas exclusivas de una condición o bandas que no estén en una condición en específico. Lo que nos podría indicar es que hay en las proteínas extraídas de raíces de ASH una mayor o menor expresión de IDPs o IDPR, dependiendo del tratamiento a las que se sometió.

En el gel de la línea robusta (Figura 11 **(b)**), no se observa una diferencia marcada en cuanto a mayor o menor cantidad de proteína; sin embargo, si existen diferencias entre los perfiles. En el carril de la ZAC (G), las proteínas tienen un patrón muy parecido a los otros 4 carriles, aunque si lo comparamos con los carriles de 6/K y 24/H, parece tener menor concentración de proteínas al final de la columna y en las

bandas que tienen un peso molecular 50kDa. Las muestras de ZAC 6/H y 24/H, también tienen una clara diferencia puesto que ZAC 24/H en los pesos moleculares de 50kDa y entre 27kDa y 25kDa, hay una concentración mayor de proteína. En ZAC 6/K y 24/K, parecen tener casi el mismo perfil, aunque en ZAC 24/K parecen desaparecer o atenuarse ciertas bandas que están bien marcadas en ZAC 6/K. La que más se nota es la segunda banda alrededor de 20kDa, que no está presente en ZAC 24/K, y está en las otras 4 muestras. Parece ser que ZAC 24/K y ZAC 6/H son las que tienen menor concentración de proteínas.

Al comparar el perfil de las líneas robusta y débil parecen ser distintas. En ASH las muestras que se sometieron a estrés con  $K_2CO_3$ , son las que tienen más proteína y en ZAC la que tiene una mayor concentración es ZAC 24/H.

Se ha visto que la respuesta hidrotropica en maíz comienza a darse 6 horas después de que se ha colocado en el estímulo, que en este caso es creado por el carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ). A las 24 horas, la raíz ya ha desarrollado la curvatura hacia donde hay una mayor concentración de agua, que en el sistema diseñado por Eapen *et al.* (2015) es hacia la esponja floral saturada de agua. Eso quiere decir que cuando la raíz detecta el estímulo a las seis horas, comienza a responder activando sus mecanismos celulares para contender el estrés y al mismo tiempo a desarrollar la respuesta hidrotropica (crecimiento diferencial de la raíz hacia la zona de mayor humedad relativa). Probablemente, en la línea ASH 6/K después de seis horas de hidroestimulación se extraigan más proteínas en comparación con la condición control, puesto que las funciones celulares y mecanismos de la respuesta hidrotropica son realizados por proteínas.

## 7.2.2. Espectrometría de masas

Para conocer el perfil de proteínas presentes en la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz, se enviaron a espectrometría de masas los extractos de cada muestra obtenida con la metodología descrita anteriormente. El análisis realizado por espectrometría de masas de las muestras enviadas resultó en una lista de 94 grupos de proteínas presentes en ASH seis horas en K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ASH 6h/K) y ASH control (ASH 6h/H). La lista se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Lista de grupos de proteínas obtenidas por espectrometría de masas

<b>Proteína Identificada</b>	<b>Accession Number</b>	<b>ASH 6HRS/K</b>	<b>ASH 6HRS/H</b>
<b>16.9 kDa class I heat shock protein 1</b>	B6UGR5_MAIZE	presente	no
<b>40S ribosomal protein S18</b>	B4G286_MAIZE	Presente	no
<b>60S ribosomal protein L12</b>	A0A3L6F2P9_MAIZE (+2)	presente	presente
<b>Aconitate hydratase *</b>	A0A1D6PUK7_MAIZE (+3)	presente	no
<b>Acylphosphatase</b>	A0A3L6D9W0_MAIZE (+1)	presente	no
<b>AIR12</b>	A0A1D6KJM7_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Benzoxazinone synthesis9</b>	A0A1R3M158_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Calcium-binding EF hand family protein</b>	A0A1D6JMK6_MAIZE (+17)	presente	no
<b>Chaperonin, chloroplastic</b>	A0A3L6DGR1_MAIZE (+1)	presente	no
<b>Chaperonin, mitochondrial</b>	A0A3L6E8J2_MAIZE	presente	no

<b>Chaperonin2</b>	A0A1D6KTZ2_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Chitin elicitor-binding protein</b>	A0A3L6E046_MAIZE	presente	no
<b>Cold shock protein 1</b>	A0A3L6F9M6_MAIZE (+5)	presente	presente
<b>Cysteine protease XCP2</b>	A0A3L6DR64_MAIZE	presente	no
<b>Cytochrome c</b>	A0A3L6DK68_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Dehydrin COR410</b>	A0A3L6EYU6_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Dirigent protein</b>	A0A1D6HR40_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>DREPP2 protein</b>	B6TK17_MAIZE	presente	presente
<b>DUF1421 domain-containing protein</b>	A0A3L6FPC5_MAIZE (+3)	presente	no
<b>Elongation factor 1-beta</b>	A0A3L6DVP0_MAIZE	presente	no
<b>Elongation factor 1-beta</b>	A0A1D6IJJ1_MAIZE (+3)	presente	no
<b>Endoglucanase</b>	A0A1D6HJQ2_MAIZE (+1)	presente	no
<b>Enolase_N domain-containing protein</b>	A0A1D6LUX6_MAIZE (+1)	presente	no
<b>ER luminal binding protein</b>	B4FW90_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Fasciclin-like arabinogalactan protein 16</b>	A0A317Y6Q3_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Fructose-bisphosphate aldolase</b>	A0A3L6FKA3_MAIZE	presente	no
<b>Glutaredoxin-C6</b>	A0A3L6D6Y0_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Glycine-rich protein 2b</b>	B6SP06_MAIZE (+1)	presente	no

<b>Glycine-rich RNA-binding protein 2, mitochondrial</b>	A0A3L6DSK5_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Glycine-rich RNA-binding, abscisic acid-inducible protein</b>	A0A317YFL0_MAIZE (+4)	presente	no
<b>Histone H2A</b>	A0A3L6G308_MAIZE	presente	presente
<b>Histone H2A</b>	A0A3L6DBE6_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Histone H2B</b>	A0A1D6PDG6_MAIZE (+23)	presente	presente
<b>Histone H3.3</b>	A0A3L6EN73_MAIZE	presente	no
<b>KH domain-containing protein</b>	A0A1D6PX58_MAIZE (+3)	presente	no
<b>L-ascorbate peroxidase</b>	A0A1D6ILX2_MAIZE	Presente	Presente
<b>Leucine aminopeptidase 2 chloroplastic</b>	A0A1D6HN61_MAIZE (+1)	presente	no
<b>Malate dehydrogenase</b>	A0A3L6FDC0_MAIZE	presente	presente
<b>Midasin</b>	A0A0B5JQQ8_MAIZE (+3)	presente	no
<b>Multifunctional fusion protein</b>	A0A3L6ETN5_MAIZE	presente	no
<b>Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein</b>	A0A1D6K370_MAIZE (+9)	presente	no
<b>Nascent polypeptide-associated complex subunit beta</b>	A0A3L6ELM4_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Nascent polypeptide-associated complex subunit beta</b>	A0A317YHU5_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein with RNA binding (RRM-RBD-RNP motifs) domain</b>	A0A1D6H8Q2_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Pathogenesis-related protein 1</b>	B6TR52_MAIZE (+1)	Presente	no
<b>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase *</b>	A0A3L6E9S4_MAIZE	presente	no

<b>Peptidylprolyl isomerase</b>	B4FUK2_MAIZE	presente	no
<b>Peroxidase</b>	A0A3L6EK87_MAIZE	presente	presente
<b>Peroxidase</b>	A0A1D6FP28_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Peroxidase</b>	B6T4Q8_MAIZE	presente	presente
<b>Peroxidase</b>	A0A3L6DLS2_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Peroxidase</b>	A0A1D6LYW3_MAIZE (+6)	presente	no
<b>Peroxidase</b>	A0A3L6FVS5_MAIZE	Presente	Presente
<b>Peroxidase</b>	A0A1D6F4C8_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Peroxiredoxin</b>	A0A3L6E0A7_MAIZE (+3)	presente	no
<b>Phenylalanine ammonia-lyase</b>	A0A1D6E5Y8_MAIZE (+1)	presente	no
<b>Phenylalanine ammonia-lyase</b>	A0A3L6EGK9_MAIZE (+1)	presente	no
<b>Phenylalanine ammonia-lyase</b>	A0A3L6EVE4_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Phosphopyruvate hydratase</b>	A0A1D6NVW3_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Plant UBX domain-containing protein 4</b>	K7TTX0_MAIZE	presente	no
<b>Plasma membrane-associated cation-binding protein 1</b>	A0A1D6MEZ6_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Protein binding protein</b>	B6TZ81_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Protein BTR1</b>	A0A1D6HPW4_MAIZE (+10)	presente	no
<b>Protein CHUP1, chloroplastic</b>	A0A3L6E6L8_MAIZE	presente	no



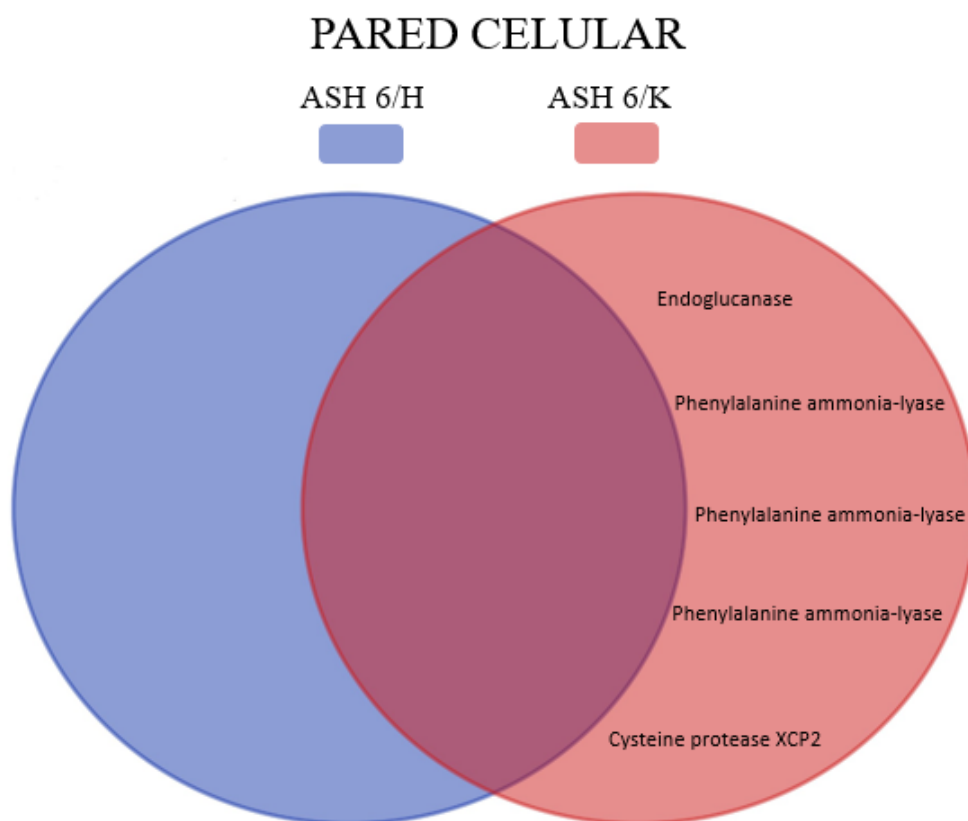
<b>Protein disulfide-isomerase</b>	A0A1D6LZ74_MAIZE (+2)	presente	presente
<b>Protein translation factor SUI1</b>	A0A3L6E898_MAIZE	presente	no
<b>Protein Z</b>	B6SJS2_MAIZE	Presente	no
<b>Proteinase inhibitor</b>	B8QVS2_ZEAMP (+6)	presente	presente
<b>Protein-serine/threonine phosphatase</b>	A0A3L6F0H9_MAIZE	presente	no
<b>Putative cystatin</b>	Q4FZ47_MAIZE	presente	presente
<b>Putative mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e</b>	A0A3L6FMN3_MAIZE	presente	no
<b>Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial</b>	A0A3L6G0M8_MAIZE (+2)	presente	no
<b>Putative steroid-binding protein 3</b>	A0A3L6EL42_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Putative translation elongation factor family protein</b>	A0A1D6GCC4_MAIZE (+3)	presente	presente
<b>Reactive Intermediate Deaminase A, chloroplastic</b>	A0A3L6DW79_MAIZE	presente	presente
<b>RING-type E3 ubiquitin transferase</b>	A0A3L6EGK2_MAIZE	presente	no
<b>RNase III domain-containing protein</b>	A0A3L6EQS4_MAIZE (+1)	presente	no
<b>Stem glycoprotein</b>	A0A3L6EDY7_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B</b>	B6SGY0_MAIZE	Presente	Presente
<b>Subtilisin-like protease SBT1.4</b>	A0A3L6EX33_MAIZE	presente	presente
<b>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</b>	P93801_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</b>	B1PEY4_MAIZE (+4)	presente	no
<b>Survival protein SurE-like phosphatase/nucleotidase *</b>	A0A1D6HVN7_MAIZE (+2)	presente	no

<b>tr A0A3L6EME8 A0A3L6EME8_MAIZE-DECOY Dehydrin COR410</b>	A0A3L6EME8_MAIZE-DECOY (+2)	presente	no
<b>Transaldolase</b>	A0A1D6N2K9_MAIZE (+3)	presente	no
<b>Ubiquitin (Fragment)</b>	A0A3L6DUH5_MAIZE	presente	presente
<b>Uncharacterized protein</b>	A0A1D6IWL0_MAIZE	no	presente
<b>Uncharacterized protein</b>	C0PKR6_MAIZE	presente	no
<b>Uncharacterized protein</b>	B4FA63_MAIZE	presente	presente
<b>Uncharacterized protein</b>	A0A317Y2W3_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Uncharacterized protein</b>	A0A3L6E2M9_MAIZE (+2)	presente	presente
<b>Uncharacterized protein YsfE</b>	A0A317YJF2_MAIZE (+1)	presente	presente
<b>Vesicle transport v-SNARE 13 *</b>	A0A3L6DL64_MAIZE	presente	No
<b>VOC domain-containing protein</b>	A0A317YDL9_MAIZE (+3)	presente	presente

Se analizó cada grupo de proteínas para conocer la funcionalidad y datos de cada grupo de proteínas reportadas en el ensayo de espectrometría de masas, con el programa UniProt (<https://www.uniprot.org>). Con base en la información obtenida por UniProt, se hicieron 10 categorías utilizando como criterios su funcionalidad y/o procesos celulares en los que están involucrados; metabolismo; síntesis de proteínas; estrés oxidativo; degradación de proteínas; respuesta a ABA; respuesta a estrés; factores de transcripción y/o unión a DNA o RNA; señalización; relacionadas a pared celular y proteínas desconocidas. Al mismo tiempo, se analizó el desorden de las proteínas y se calculó el porcentaje de desorden de cada grupo. Para la representación de cada categoría utilizamos diagrama de Venn en el cual se comparan las proteínas que están presentes o no, en las dos condiciones.

analizadas: ASH 6h/K (color rosa), ASH 6h/H (color azul) y proteínas que comparten color morado.

### 7.2.2.1 Pared celular



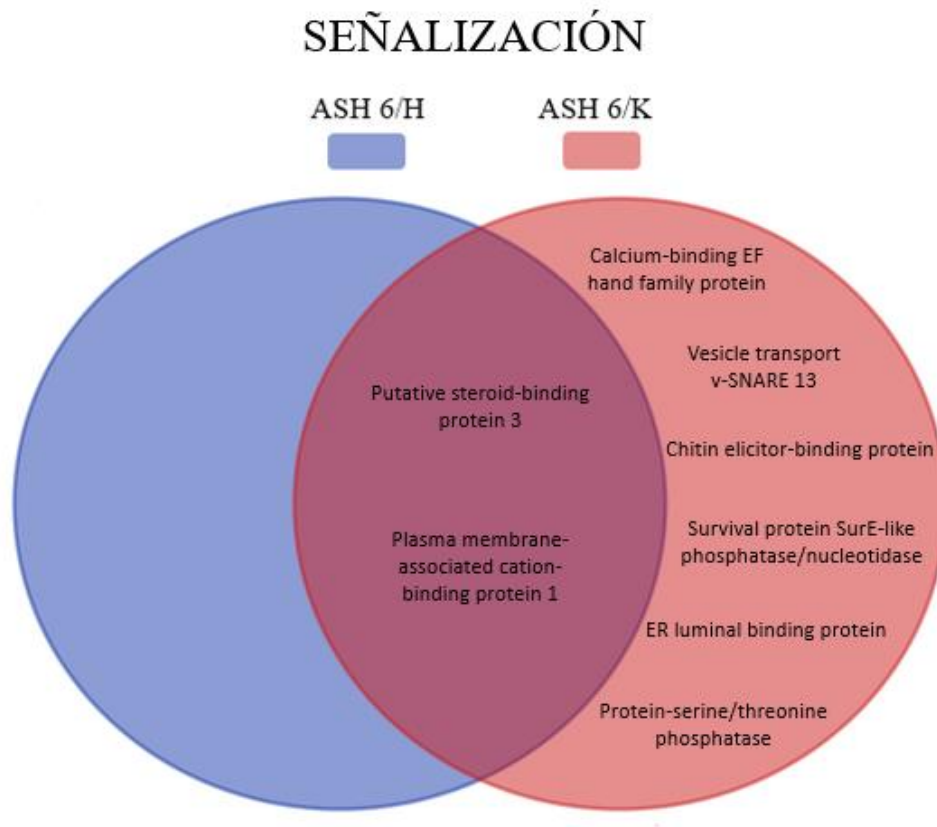
**Figura 12.** Diagrama de Venn de la categoría de pared celular.

La pared celular tiene como función ser mediadora de todas las relaciones del ambiente exterior, actúa como compartimento celular, soporta las fuerzas osmóticas y de crecimiento. El análisis de espectrometría de masas reveló un total de cinco grupos de proteínas relacionadas con pared celular, de las cuales, las cinco están únicamente presentes en la condición ASH 6h/K (Figura 12).

Los grupos de proteínas presentes en esta categoría tienen relación con el crecimiento y elongación de órganos de la planta. La endoglucanase, según las funciones descritas en UniProt, está involucrada en el catabolismo de la celulosa, que hace referencia a crecimiento vegetal. La phenylalanine ammonia-lyase está

presente en el proceso de síntesis de lignina que evita que la planta tenga una pérdida de agua. Y la cysteine protease es importante en el desarrollo, crecimiento, senescencia y muerte celular programada, en la acumulación de proteínas de almacenamiento como en las semillas, pero también en la movilización de proteínas de almacenamiento. Además, también se la ha implicado que participan en vías de señalización en respuesta a estrés abiótico y biótico (Grudkowska y Zagdańska, 2004). Nuestros datos sugieren que los cambios en la pared celular son un mecanismo importante en la respuesta hidrotropica

### 7.2.2.2. Señalización



**Figura 13.** Diagrama de Venn de la categoría de señalización.

Para que la célula tenga una respuesta a estímulos externos o internos, utiliza moléculas de señalización que inducen una respuesta específica. La señalización celular es importante para el crecimiento, funcionamiento celular normal y responder ante algún estímulo. Los resultados de espectrometría de masas nos revelaron ocho grupos de proteínas involucradas en el proceso de señalización, de las cuales sólo dos están presentes en ambas condiciones (Figura 13). En ASH 6h/K están presentes seis proteínas, que son exclusivas de esta condición, mientras que no hay grupos de proteínas únicas de ASH 6/H. Los resultados expuestos anteriormente indican que en las plántulas expuestas a estrés (ASH 6/K), hay una activación de señalización molecular para iniciar una respuesta ante el estímulo. La proteína calcium-binding se ha reportado como reguladora del gen *MIZ1*, que es uno de los genes relacionados a hidrotropismo en *A. thaliana* (Shkolnik *et al.*, 2018).

### 7.2.2.3. Factores de transcripción y/o unión a DNA o RN

#### FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y/O UNIÓN A RNA O DNA

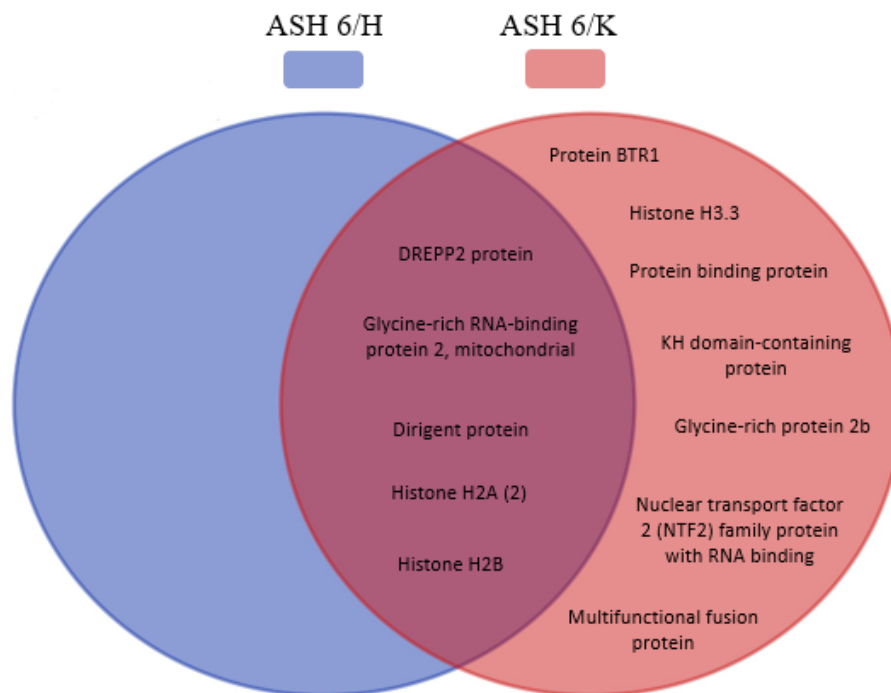
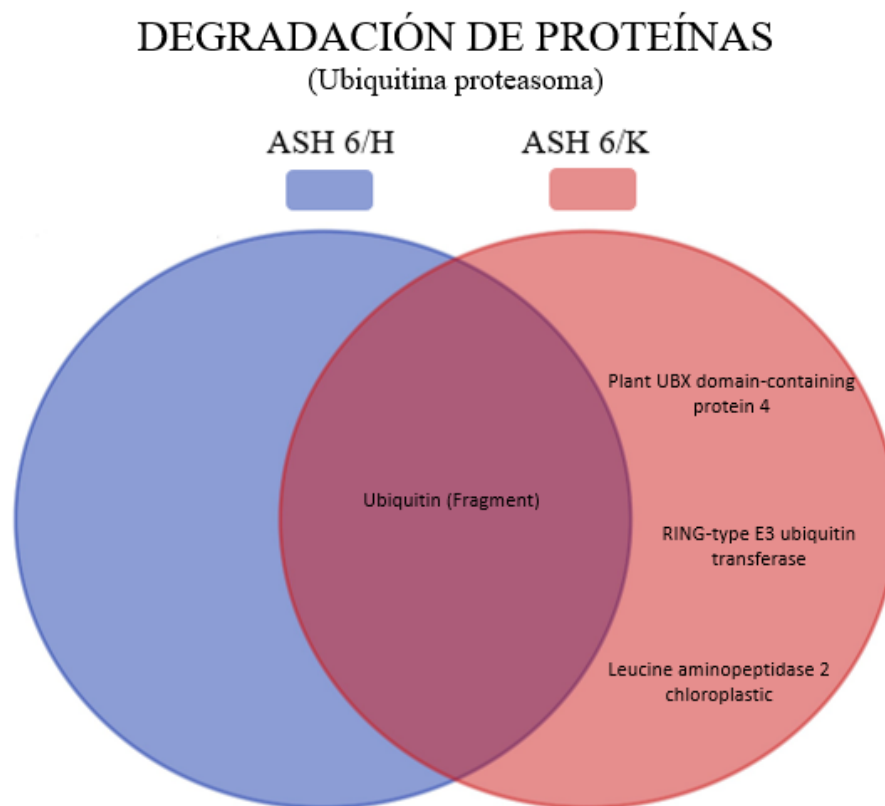


Figura 14. Diagrama de Venn de la categoría de factores de transcripción y/o unión a RNA o DNA.

Un factor de transcripción (a veces llamado factor de unión a una secuencia específica de ADN) es una proteína que se une a secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción de la información genética de ADN. Los factores de transcripción promueven o silencian el reclutamiento de la RNA polimerasa a genes específicos. Las proteínas de unión al ADN o RNA incluyen factores de transcripción que modulan el proceso de transcripción, varias polimerasas, nucleasas que cortan y degradan moléculas de ADN e histonas que participan en el empaquetamiento cromosómico y en el proceso de transcripción en el núcleo celular.

El análisis de espectrometría de masas reveló que 13 grupos de proteínas son factores de transcripción o proteínas de unión a DNA o RNA, de las cuales ocho se encuentran exclusivamente en ASH 6h/K y comparte con la condición ASH 6h/H, las seis restantes (Figura 14).

#### 7.2.2.4. Degradación de proteínas



**Figura 15.** Diagrama de Venn de la categoría de degradación de proteínas.

El sistema de degradación de proteínas por ubiquitina se encarga de la degradación de proteínas que han sufrido daños estructurales y ya no son funcionales, o aquellas proteínas que ya no son necesarias en la célula, puesto que ya cumplieron su función. Siendo un punto de control en los diversos procesos biológicos dentro de la célula. El resultado del análisis de espectrometría de masas indicó que cuatro de los grupos de proteínas estaban involucrados en la vía de degradación de proteínas por ubiquitina (Figura 15). Tres de los cuales solo están presentes en ASH 6h/K, compartiendo solo una con la condición control. Se ha visto que la vía de degradación por ubiquitina está presente en la respuesta hidrotrópica del maíz, se vio que a las 6 h hay eficiente detección de la señal de estrés y por tanto activación del sistema para la degradación de proteínas dañadas (Puentes, 2020).

### 7.2.2.5. Respuesta a Ácido abscísico (ABA)

## RESPUESTA ÁCIDO ABSCÍSIKO



**Figura.16.** Diagrama de Venn de la categoría de respuesta a ABA (ácido abscísico).

El ABA se conoce como la fitohormona del estrés, ya que media mecanismos para contener diferentes tipos de estímulos negativos. Se ha mencionado que ABA parece estar implicada en la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y los resultados arrojados por el análisis de espectrometría de masas revelaron que tres grupos de proteínas están relacionadas con ABA. Dos de ellas, glycine-rich RNA-binding, abscisic acid-inducible protein, que tiene función a RNA que es inducible por ABA, y pathogenesis-related protein 1 que está involucrado en la vía de señalización activada por ABA y en unión a esta hormona. Los resultados podrían estar indicando que la presencia de estas moléculas está relacionada con la respuesta hidrotópica de la raíz primaria en maíz (Figura 16).



### 7.2.2.6. Respuesta a estrés.

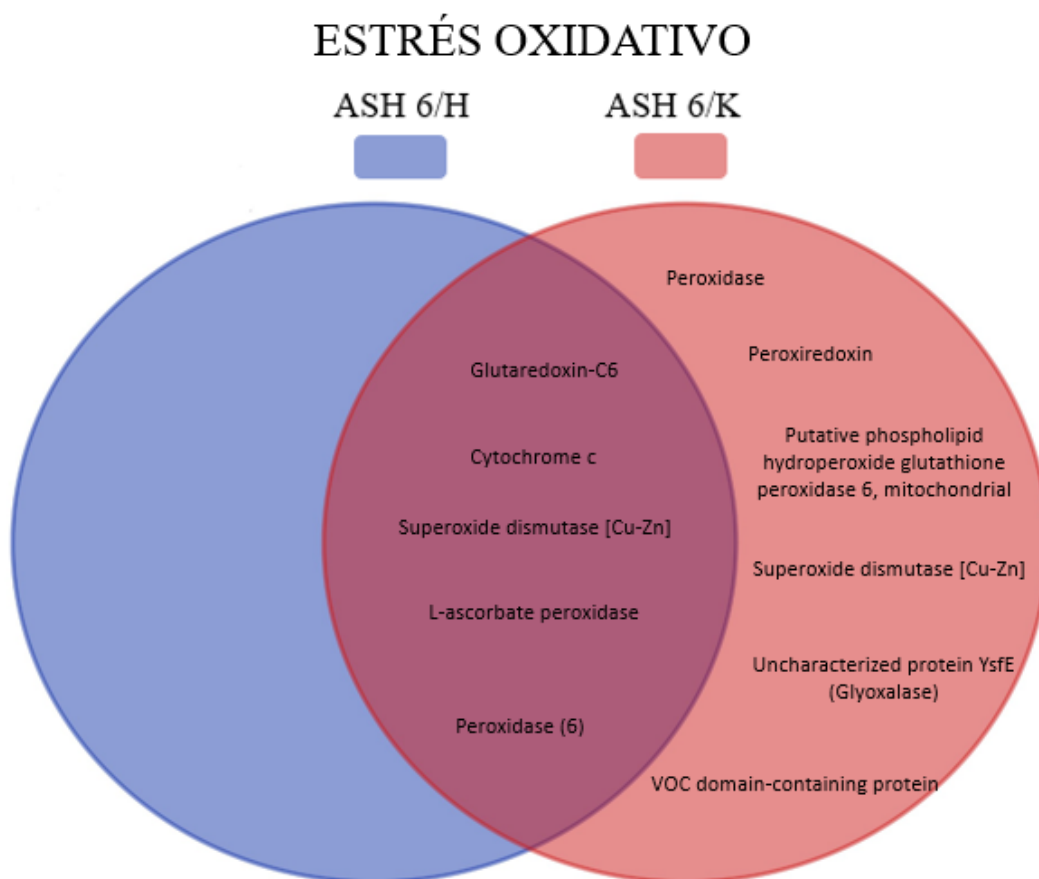


**Figura. 17.** Diagrama de Venn de la categoría de respuesta a estrés.

Al someter a una planta o plántula a algún tipo de estrés siempre se generan o se activan mecanismos en defensa, contención o resolución para dejar de permanecer en condiciones desfavorables. El sistema de reto hidrotópico utilizado para que las raíces induzcan un crecimiento dirigido hacia donde haya una mayor concentración de agua, es un tipo de estrés donde hay una baja cantidad del nutriente principal de la raíz. Los resultados obtenidos por el análisis de espectrometría de masas, develó que cinco de ellas tienen como función responder a estímulos de agua. La condición en estrés (ASH 6h/K) tiene tres grupos de proteínas exclusivas, de las cuales dos parecen ser dehidrinas, cuya función principal es responder a la presencia y ausencia de agua, en este caso, podríamos decir que tiene una respuesta a la ausencia de agua, ya que no se encontró esta proteína en la condición control que

es la que no tiene un estrés hídrico. Y, como podemos ver en la Figura 17, dos de los grupos de proteínas se encuentran presentes en ambas condiciones. Las proteínas que están en ASH 6h/K, tienen la característica de que son IDP y según la literatura, están presentes en respuesta a sequía, congelamiento y salinidad (Mouna *et al.*, 2019). Aunque aún no se conocen los mecanismos de acción de éstas, posiblemente están relacionadas con la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de esta línea de maíces.

### 7.2.2.7. Respuesta a estrés oxidativo



**Figura 18.** Diagrama de Venn de la categoría de estrés oxidativo.

Cuando las plantas están sometidas a estímulos desfavorables, generalmente hay un daño celular que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en el sistema y para responder a ellos las células tienen peroxidasa y/o moléculas que ayudan a eliminarlos, evitando que causen daño al organismo. No es raro que en condiciones “normales” estén presentes y bajo estrés es mucho más probable que haya una mayor cantidad. El análisis por espectrometría de masas mostró que 16 grupos de proteínas están implicadas en la respuesta al estrés oxidativo (Figura 18). Seis de ellas están presentes únicamente en la condición de estrés y aunque 10 también se presenten en ASH control (ASH 6h/H), en contraste con ASH 6 h bajo estrés, es menor la cantidad. Por los resultados obtenidos, podemos deducir que hay mayor

presencia de proteínas que responden al estrés oxidativo en la condición ASH 6h/K (Figura 18).

Ponce *et al.* en el 2017 reportaron que las ROS son reguladores importantes de la elongación diferencial del crecimiento durante el desarrollo de respuestas gravitrópicas e hidrotropicas. Se comportan como promotores de la respuesta gravitrópicas y regula negativamente al hidrotropismo en *A. thaliana*.

Basándonos en los resultados que se obtuvieron, podemos proponer que hay una respuesta para desactivar a ROS, para promover la respuesta hidrotropicas de la raíz y tener una respuesta gravitrópicas negativa.

### 7.2.2.8. Metabolismo

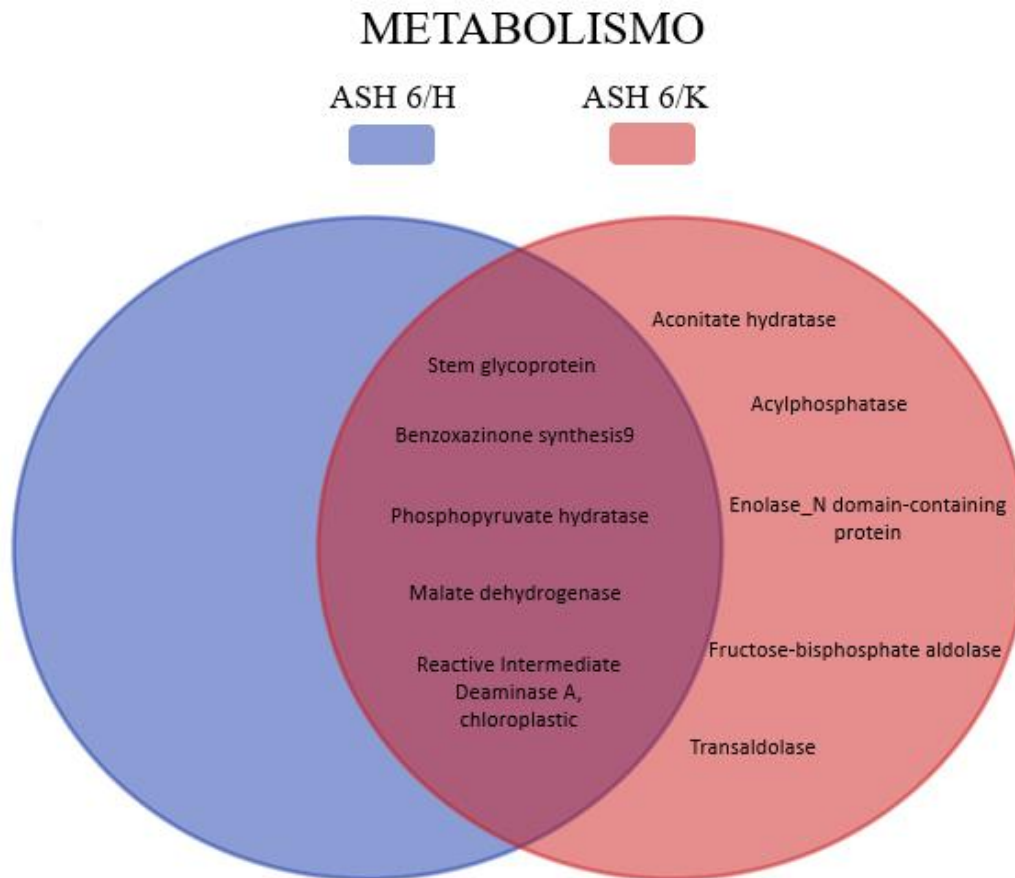


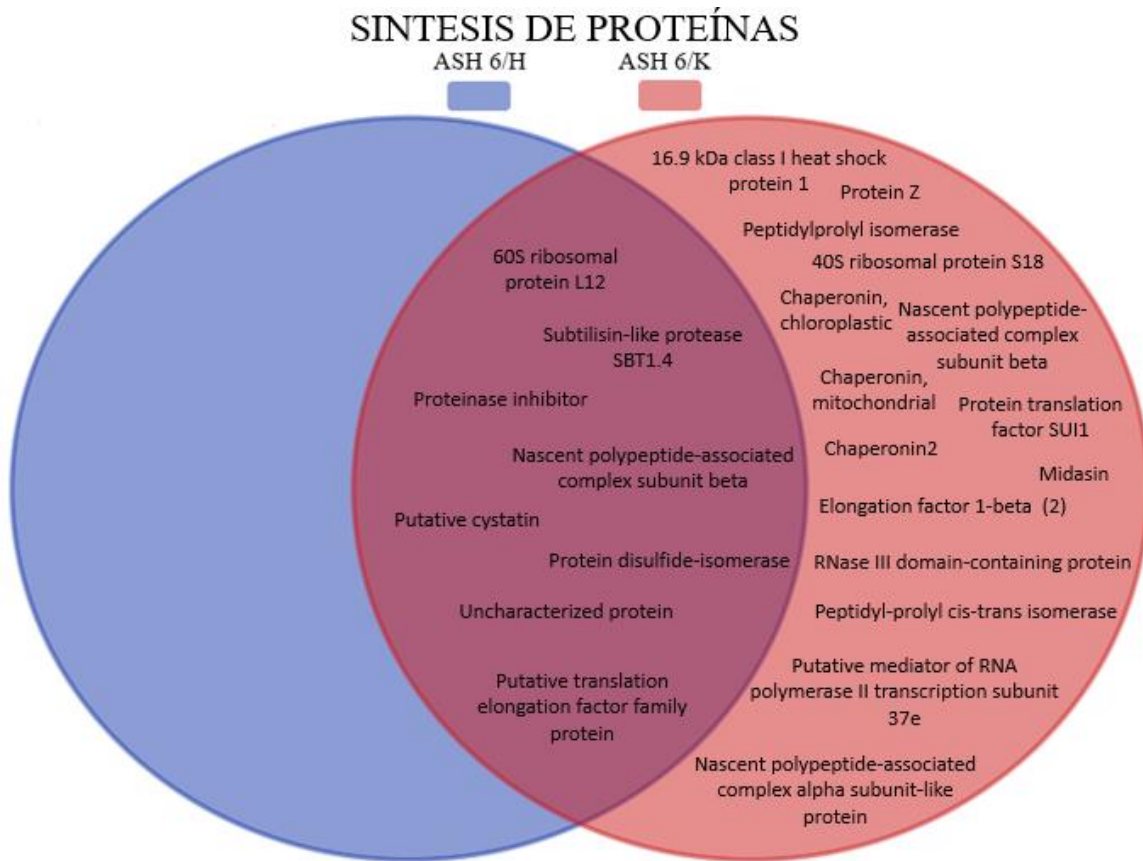
Figura 19. Diagrama de Venn de la categoría de metabolismo.

El metabolismo siempre está presente en las células, puesto que es esencial para el crecimiento, desarrollo y sobre todo la supervivencia de la planta, ya que para todos esos procesos necesita la formación de carbohidrato, lípidos y proteínas que participan de distintos procesos celulares. Como podemos apreciar en el diagrama (Figura 19) 10 grupos de proteínas están relacionadas con el metabolismo de la planta y cinco de ellas, están exclusivamente en la condición ASH 6h/K y las cinco restantes se comparten entre las dos condiciones. Sin embargo, el número de proteínas en condición control contrasta con la condición de reto hidrotópico (ASH 6h/K) donde todas las proteínas que tienen relación con metabolismo están presentes. Se podría deducir que, al estar en una condición desfavorable necesita más productos metabólicos para contender, resistir y responder al estímulo. Los

resultados mostrados, nos hacen proponer que, al estar bajo estrés, la raíz necesita más metabolitos que en condiciones óptimas.

16 de los grupos de proteínas fueron inducidas por hidroestimulación; aconitate hydratase, acylphosphatase, enolase\_N domain-containing protein, fructose-bisphosphate aldolase, transaldolase. Esto indica que únicamente estas proteínas se produjeron por respuesta a falta o detección de agua

### 7.2.2.9. Síntesis de proteínas *de novo*



**Figura 20.** Diagrama de Venn de la categoría de síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas es el proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas. El proceso consta de dos etapas, la traducción del ARN mensajero, mediante el cual los aminoácidos del polipéptido son ordenados de manera precisa a partir de la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN, y las modificaciones postraduccionales que sufren los polipéptidos así formados hasta alcanzar su estado funcional.

Por los resultados del análisis de espectrometría de masas, se relacionaron 24 grupos proteínas implicadas en la síntesis *de novo* de proteínas, de las cuales todas aparecen en la condición de ASH 6h/K (Figura 20). Únicamente 16 de ellas son exclusivas de la condición bajo estrés y comparte con ASH 6h/H (control) las ocho

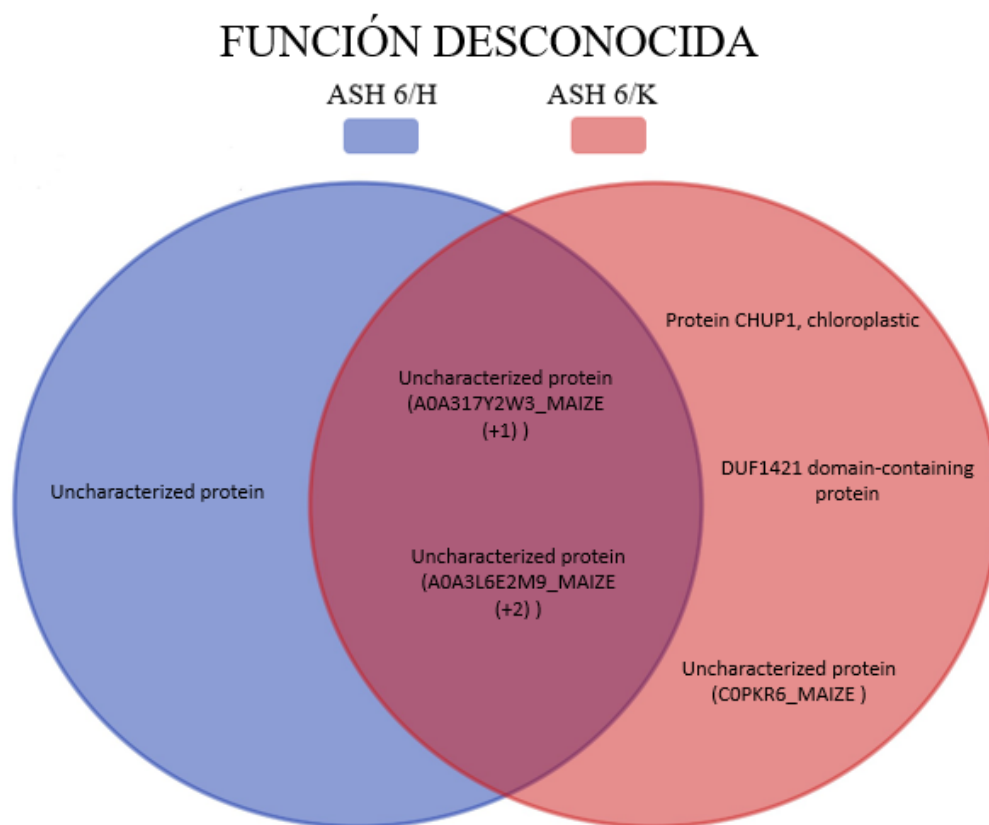
restantes. ASH 6h/control al igual que en la mayoría de las categorías, no tiene proteínas que solo estén presentes en esa condición.

Lo que llama la atención es que se observan muchas de las proteínas que componen el complejo para la síntesis de proteínas, desde las subunidades del ribosoma (60S y 40S ribosomal), factores de elongación (elongation factor 1-beta), proteínas NAC (ascent polypeptide-associated complex alpha y beta), proteínas HSP (heat shock protein), varias chaperonas (chaperonin mitocondrial y chloroplastic, chaperonin 2) y proteínas para la unión de péptidos. También se pueden relacionar las proteínas Heat shock y chaperonas con respuesta a estrés, ya que, se conoce que evitan que las proteínas nativas, pierdan su estructura tridimensional y las “protegen” evitando que expongan sus regiones hidrofóbicas. Sin embargo, se encuentran de igual manera en la síntesis de proteínas ayudando en el plegamiento de las proteínas nacientes.

El que todas estas proteínas implicadas en este proceso y presentes en raíces que fueron expuestas a un estrés hídrico, posiblemente esto sugiere que a las 6 h de la hidroestimulación ya se encuentren y/o estén sintetizando proteínas para contener el estrés y finalizar la respuesta hidrotrópica (24 h).



### 7.2.2.10. Función desconocida.



**Figura 21.** Diagrama de Venn de la categoría de función desconocida.

Los resultados del análisis por espectrometría de masas, se obtuvieron seis grupos de proteínas que se desconoce por completo su función (Figura 21). Las cinco están presentes en ASH 6h/K, de las cuales solo tres son exclusivas de la condición de estrés y un grupo de proteínas está presente únicamente en la condición control (ASH 6h/H) y dos se comparten entre las dos condiciones.

### 7.2.3. Análisis del grado de desorden.

Para conocer el nivel de desorden que posee cada uno de los grupos de proteínas resultantes del análisis de espectrometría de masas, se utilizó el programa IUPredA2 (<https://iupred2a.elte.hu>). Cada secuencia de proteína fue ingresada al programa y de la gráfica resultante se sacó el porcentaje del grado de desorden. Los resultados se muestran en la gráfica Figura 22.

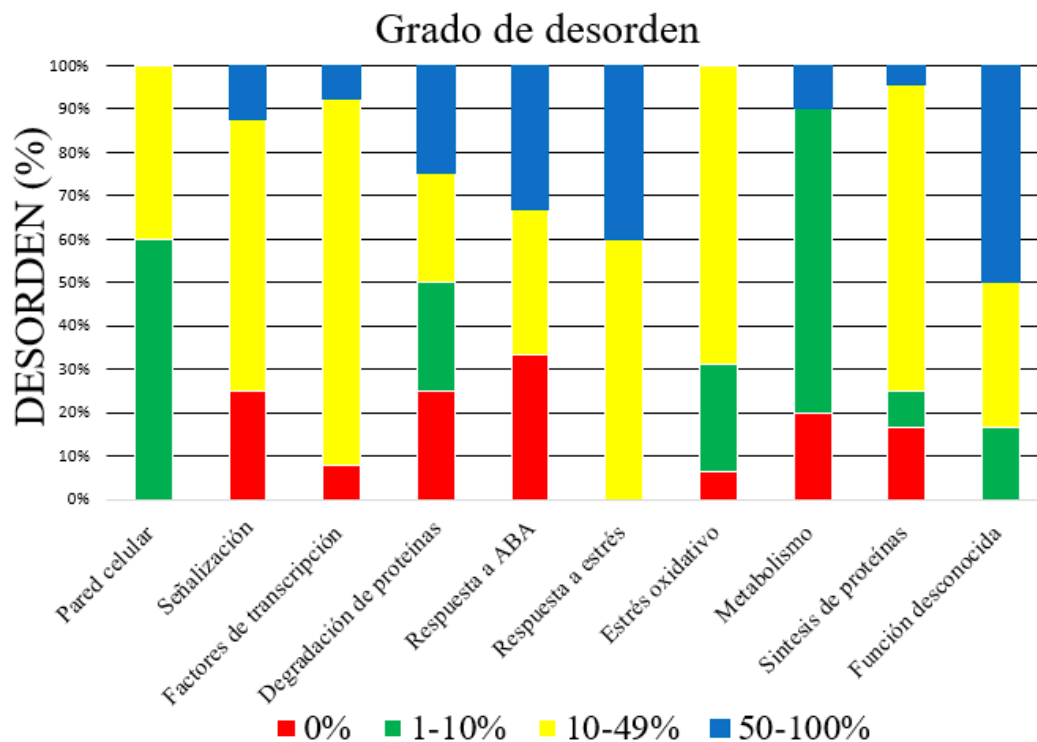


Figura 22. Gráfica del porcentaje de desorden de cada categoría.

La gráfica muestra que el porcentaje de proteínas estructuradas (barra roja), es minoritario en todos grupos de proteínas, y sólo están presentes en las categorías de señalización, Factores de transcripción y/o unión a DNA o RNA, Degradación de proteínas, Respuesta a ABA, Estrés oxidativo, Metabolismo y Síntesis de proteínas. La mayoría de las categorías muestran un porcentaje de desorden menor al 10%, que son proteínas que se pueden considerar con regiones desordenadas. La categoría que tiene un desorden mayor es la de Respuesta a estrés con un 40% de los grupos de proteínas con contenido de desorden mayor al 50%. Las proteínas de esta categoría son consideradas completamente desordenadas. Sin embargo, no

es la única categoría que tiene presente un alto grado de proteínas desordenadas. Ocho de las 10 categorías cuentan con un porcentaje de estas proteínas o, en su caso, todas tienen grupos de proteínas con un grado de desorden desde menor al 10% hasta mayor de 50%.

Nuestros resultados indican que por el tratamiento térmico que se le dio al extracto obtenido de las raíces de maíz de cada línea y de todas las condiciones, obtuvimos grupos de proteínas con una resistencia al calor (termorresistentes), proteínas con regiones desordenadas y proteínas completamente desordenadas. Además, que como vimos en las categorías, se tienen las proteínas de procesos bien definidos y que son importantes para la supervivencia de la plántula. Y aquellas que se consideran con un 100% de desorden, son proteínas que están implicadas en respuesta a estrés y que, solo están presentes en la condición con estímulo hidrotrópico (ASH 6h/K). Y como se ha planteado, la respuesta hidrotrópica parece comenzar a las seis horas después de estar sometida al estímulo, por lo que, nuestros resultados podrían indicar que las raíces del maíz a seis horas en estrés, estaría iniciando la respuesta hidrotrópica, para contender contra a condición desfavorable.

## 8. Conclusiones.

- Las proteínas consideradas IDP o IDPR, están presentes en la respuesta hidrotrópica débil de la raíz primaria del maíz (*Zea mays* L.), lo que implicaría que tienen una función protectora en el proceso de curvatura hidrotrópica de la raíz después de 6 h.
- El perfil de grupos de proteínas obtenidas por el análisis de espectrometría de masas mostró que hay diferencias entre las condiciones de reto hidrotrópico (ASH 6h/K) y el control (ASH 6h/H).
- Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta hidrotrópica débil tiene una mayor presencia de metabolitos, proteínas con relación a la pared celular, factores de transcripción y/o proteínas de unión a DNA o RNA, proteínas con respuesta a estrés oxidativo e hídrico, relacionados a regulación de ácido abscísico, de procesos de señalización y degradación de proteínas. Indicando que requiere de la presencia de todas estas proteínas para iniciar el mecanismo de respuesta hidrotrópica.
- La raíz que fue sometida a reto hidrotrópico por 6 h, mostró que tiene mayor número de componentes relacionadas con la síntesis de proteínas *de novo*, por lo que, se propone que requiere de este proceso para el desarrollo de la respuesta hidrotrópica.

## 9. Perspectivas.

- Debido a contratiempos con el análisis por espectrometría de masas, no se obtuvieron las muestras de 24 h de la línea débil (ASH), ni todas las de la línea robusta (ZAC). Por lo que se pretende obtener las listas de cada una de las muestras de ambas líneas para obtener un panorama mayor de la respuesta hidrotrópica.
- Validar con técnicas bioquímicas aquellas proteínas implicadas en la respuesta hidrotrópica y que son completamente desordenadas.
- Validar con diferentes técnicas bioquímicas, el proceso de síntesis de proteínas *de novo* puesto que la mayoría de las proteínas están relacionadas con ese proceso.

## 10. Referencias.

- ✚ Acosta, Rosa. (2009). El cultivo del maíz, SU origen y clasificación. EL MAIZ en Cuba. Cultivos Tropicales, 30(2), 00.
- ✚ Amara, I. (2012). Abiotic stress in plants: Late Embryogenesis Abundant proteins. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Farmacia).
- ✚ Avendaño, C., Molina, J., Moreno, E., Cadena, J., Aguirre, J. y Rincón, G. (2009). Respuesta a la selección para resistencia a sequía en maíz (*Zea mays* L.) Interciencia, 11: 801-807.
- ✚ Banziger, M., Edmeades, G., Beck, D. y Bellon, M. (2012). Mejoramiento para aumentar la tolerancia a sequía y a deficiencia de nitrógeno en el maíz: De la teoría a la práctica. México, DF: CIMMYT.
- ✚ Bedoya, C. (2010). Teocintle: El ancestro del maíz. Claridades agropecuarias, 201: 32-41.
- ✚ Blum, H., Beier, H y Gross, H. (1986). Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamid gels. Electrophoresis 8:93-94.
- ✚ Bolaños, J y Edmeades, G. (1990). La importancia del intervalo de la floración en el mejoramiento para la resistencia a sequía en maíz tropical. Agronomía Mesoamericana, 1: 45-50.
- ✚ Buchanan, R., Gruissem, W. y Jones, R. (2000). Biochemistry and molecular of plant. American society of plant physiology, 1158-1175.
- ✚ Carrillo, C. (2009). El origen del maíz: Naturaleza y cultura en Mesoamérica. Ciencias, 92-93: 4-13.
- ✚ Cassab, G. y Eapen, D. (2012). Hidrotropismo: Una respuesta innata de las raíces de plantas terrestres. Academia de ciencias de Morelos, AC: 36-37.
- ✚ Cassab, G.I. Sanchez-Guevara, Y. 2008. Mecanismos de desarrollo y fisiología de raíces de plantas superiores en: \*agustin Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap 19. Mexico, D.F.. UNAM. pags. 213-222.

- ✚ Chen, J., Liu, X. y Chen, J. (2020). Targeting intrinsically disorderd proteins through dynamic interactions. *Biomolecules*, 10: 743.
- ✚ Cuevas-Velázquez, C. y Covarrubias-Robles, A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas a estrés. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol*, 14(2): 97-105.
- ✚ Doebley, Y., Ilitis, H. (1980). Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A Subgeneric clasification with key to taxa. *Amer. J. Bot*, 67(6): 982-993.
- ✚ Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., Ausio, J., Nissen, M.S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C.R., Bailey, R.W., Griswold M.D., Chiu, W., Garner, E.C., Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*. 19:26–59.
- ✚ Dunker, A.K., Silman, I., Uversky, V.N., Sussman, J.L. (2008). Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 18:756–764.
- ✚ Eapen, D., Barroso, L., Ponce, G., Campos, M. y Cassab, G. (2005). Hydrotropism: root growth responses to water. *Trends in plants Science* 10: 44-50.
- ✚ Eapen, D., Martínez-Guadarrama, J., Hernández-Bruno, O., Flores, L., Nieto-Sotelo, J. y Cassab, G. (2017). Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Science*, 265: 87-99.
- ✚ Fankhauser, C., & Christie, J.M. (2015). Plant Phototropic Growth. *Current Biology*. 25(2), 384-389.
- ✚ Florescano, E. (2003). Imagen y significancia del dios del maíz. En: Estava, G y C. Marielle. Sin maíz no hay país CONACULTA. México. 36-55.
- ✚ Gallard, Y., Brown, O. y Álvarez, M. (2018). Analysis of impacts caused by agricultural drought in maize and beverage crops in agricultural areas of Venezuela, ciego de Áurla, Cuba. *Sociedad y naturaleza*, 30: 96-115.
- ✚ Grudkowska, M y Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol*, 51 (3): 609-24.

- ✚ Guacho, E. (2014). Características agro-morfológicas del maíz (*Zea mays* L.) de la localidad san José de Chazo. Tesis de Licenciatura, RIOBAMAa-Ecuador.
- ✚ Hsu WL, Oldfield CJ, Xue B, Meng J, Huang F, Romero P, Uversky VN, Dunker AK. (2013). Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding. *Protein Sci.* 22:258–273.
- ✚ Iakouchina, L., Brown, C., Lawsen, J., Obradovic, Z. y Dunker, A. (2002). Intrinsically disordered in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* 333: 573-588.
- ✚ Kato, T., Mapes, L., Mera, J. y Serratos, R. (2009). Origen y diversificación del maíz: Una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México, DF. 116.
- ✚ Kobayashi A., Takahashi, A., Kakimoto, Y., Miyazawa, Y., Fujii, N., Higashitani, A., & Takahashi, H. (2007). A gene essential for hydrotropism in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104(11), 4724-4729.
- ✚ Kobayashi T, Yoshihara T, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S,
- ✚ Lieutaud, P., Ferron, F., Uversky, A., Kurgan, L., Uversky, N. y Longhi, S. (2016). How disordered is my protein and what is its disorder for? A guide through the “dark side” of the protein universe. *Intrinsically Disordered Proteins*. 4:1.
- ✚ Martínez, J. (2019). “Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotropica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS)”. Tesis de maestría. Morelos.
- ✚ Miramontes, C. (2012). Situación actual y perspectiva del maíz en México. Servicio de información agroalimentaria y pesquera: 1996-2012.
- ✚ Miyazawa Y., Takahashi, A., Kobayashi A., Kaneyasu, T., Fujii, N. y Takahashi, H. (2009). The GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 149: 835–840.
- ✚ Miyazawa, Y., Moriwaki, T., Uchida, M., Kobayashi, A., Fujii, N. y Takahashi, H. (2012). Overexpression of *MIZU-KUSSE11* enhances the root hydrotropic



response by retaining cell viability under hydrostimulated conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 53: 1926–1933.

- ✚ Mouna, C., Chantal, E. y Moez, H. (2019). Genomic análisis of intrinsically disordered proteins in cereal: From mining to meaning. *Gene*, 714: 143984.
- ✚ Nadal, A. y T. Wise. (2004). Los costos ambientales de la liberación agrícola: El comercio de maíz entre México y Estados Unidos en el marco del NAFTA. En: H. Blanco, L. Toledo de Algueira y K.P. Gallagher (eds.). *Globalización y medio ambiente* selecciones desde las Américas. Heinrich Böll Foundation North America: 1-44.
- ✚ Nishizawa NK (2007) *Plant Physiol Biochem* 45:262–269.
- ✚ Ortega, D. (2013). Sequía; Causas y efectos de un fenómeno global. *Ciencia UANL*, 61.
- ✚ Pedmale, U. V., Celaya, R. B., & Liscum, E. (2010). Phototropism: mechanism and outcomes. *The Arabidopsis Book*, e0125.
- ✚ Ponce, G., Corkidi, G., Eapen D., Lledías, F., Cárdenas, L y Cassab, G. (2017). Root hydrotropism and thigmotropism in *Arabidopsis thaliana* are differentially controlled by redox status. *Plant Signaling & Behavior*, e1305536.
- ✚ Puentes, C. (2020). PAPEL DE LA UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS Y LA ACUMULACIÓN DE TREHALOSA EN LA RESPUESTA HIDROTRÓPICA DE RAÍCES DE MAÍZ (*Zea mays* L.). Tesis de maestría. Morelos.
- ✚ Raven, P.H., & Johnson, G.B. (2004). How plants grow in response to their environment. *Biology* 6th edition. McGraw-Hill, Boston. Pp 807-810.
- ✚ SADER. (2020). REPORTE DEL MERCADO DE MAÍZ.1-18.
- ✚ Sánchez, I. (2014). Maíz (*Zea mays*). *Reduca (Biología)*, 7: 151-171.
- ✚ Sato, E.M., Hijazi, H., Bennett, M.J., Vissenberg, K., & Swarup, R. (2015). New insights into root gravitropic signaling. *Journal of Experimental Botany*. 66(8), 2155-2165.
- ✚ Shkolnik, D., Nuriel, R., Bonza, C., Costa, A y Fromm, H. MIZ1 regulates ECA1 to generate a slow, long-distance phloem-transmitted Ca<sup>2+</sup> signal essential for root water tracking in *Arabidopsis*. (2018). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 31: 8031-8036.

- ✚ Sotelo, A. (2015). El movimiento de las plantas: Tropismos y nastias. Catedra de fisiología vegetal. FACENAUNNE: 3-10.
- ✚ Takahashi, H. (1997). Hydrotropism: the Current State of Our Knowledge. Journal of Plant Research. 110, 163-169.
- ✚ Tsvetkov P, Myers N, Moscovitz O, Sharon M, Prilusky J, Shaul Y. (2012) Thermo-resistant intrinsically disordered proteins are efficient 20S proteasome substrates. Mol Biosyst, 8(1):368-73. doi: 10.1039/c1mb05283g. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22027891.
- ✚ Useros, José Luis. (2012). “El cambio climático: sus causas y efectos medioambientales.” Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid, 2013: 71-98.
- ✚ Uversky VN. (2013). Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. Biochim Biophys Acta, 1834(5):932-51. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.008. Epub 2012 Dec 23. PMID: 23269364.
- ✚ Uversky, A. (2013). A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics. Protein Sci. 22(6): 693–724.
- ✚ Ward, J., Sodh, J., McGuffin, L., Buxton, B., y Jones, D. (2004). Prediction and funtional análisis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. J. Mol. Biol, 337: 635-645.

## 11. Páginas consultadas.

- ✚ UniProt (de *universal protein*). 2002-2021. <https://www.uniprot.org/>.
- ✚ IUPredA2. 2018. <https://iupred2a.elte.hu/>.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **SALLAS BARRETO MAYRA ALEJANDRA** con número de matrícula **20164012237** cuyo título es:

**“Identificación del desordoma, asociado con el hidrotropismo del maíz (*Zea mays* L.)”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 19 de agosto del 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DR. CARLOS AMERO TELLO**  
**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO**  
**DR. JOSE FERNANDO LLEDIAS MARTÍNEZ**  
**DR. ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA**  
**DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LOPEZ**

**(PRESIDENTE).**  
**(SECRETARIO).**  
**(VOCAL).**  
**(SUPLENTE).**  
**(SUPLENTE).**



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:2022-08-19 10:17:52 | Firmante**

nKY6UghASaxzl/uaYfG8G1tXIBsB5laSg+wrN51alVzVUNHYp7Bmziy4pc4qZcalO+sj7LdwD9uL/zBskQA+9Mr3wghGgHISKKncCN5rrWrfaxuH7KKvOTZCxFcOp4qmKLTqkqd+ct8+DtwelT0BZ4Fc3umzHDA9oLY+gSyBINUwGCfytoedKtezy7lqBnWc56NPzcb6N0q2MhhP52Ez3oes7g0ruzR7Yr+1y67715PdCvZ1IRLMAQHnm5fVfM7G1jUldZAKs4FvBcozxJ60mtpjehIpu5YaG6K8nSyym7Fdb7jmVUX7IMCH3phs9tgbS+fH+kD7WVCyAAu2+BYA==

**JOSÉ FERNANDO LLEDIAS MARTINEZ | Fecha:2022-08-19 14:55:27 | Firmante**

AnZ6fDRlpA1fu941smeYE7WcFLCXFnvDzVENonajuA/wPtKKAoxFHwc0KXoAwVgG1t8MgYo2Q1jUHYQCWw5zTgP99JsbNiUXRapuBJX0Rck+K69li8Oh0FYcvJRUpGCTo1rn4znONsCo9S5I6AqlpHbHRhsasPMIMKitZnZHJTFCvV7288/s8rY18FrFf1GcToOuTiP7IZ2Rg0ICZz2Jxk5n9AHdF0WUOB4ZigWCUIDZtnxdia6n3Wx28RjcFA6LslILBY6tggriDjcfxsn1FCZ72byjX/+bbz85y7ldzePI2xSqOYH1LkN9Kj3ca0HF5W//u0KZSO6a/DFtg==

**ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-08-22 12:37:28 | Firmante**

GC93k0QJumrAvftY6qNYhxqnVHfMMbxjDuds7+Cv2inNF58ExXpJ5KyD29Wolux63Q0/Ffjg8RzcCC2Cgciwz8ZITdhJdawE960q7oDdUTY60SLQJ41ElgNYCJzf4470oSJnSkiMt5sYt7O22vTISYb6v0x82/BSSF2AF4h2QclAUBfPNeMpR3M+BLLyzzgOVb68QvFQ2uCCRyF0QRpcT+QUrEdsBQhtSWB4OZ8Ur7cGX/y6qSC7nYles9SSVHf6vz1UqjuU/tFILOsaR1/7Y/NYdHGDh3h9bwSmi7VeBgdJc+rBvSuSIfKMAWE81Wlpq37kaR20iplehD75sxfQg==

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2022-08-22 13:35:52 | Firmante**

epL9KgOfsA27wgo3w3cotn9Ede4QTiYnFOlrxSdfWpiuJ5D0bCPSVhuwBNSw+fHltWuqotE4oBU5PplvToXs11Pqo7yxkbaLayYmjwXs7seUnZWpKHFf1OEIxWJPubidsxw5Y/jG9hcFmarihvxJR/nxHN83mv1hvlpG3IA7j65KAnniKlhyk8lbtEJ3012WgRmbZ2V+oYHG9AI024KKMZGvMt3iAZsjcEbZbeUwekUUNZ35+YENTdSuGosOVXg6trNZU+0y49L8EqVPbkx2iWZpmuyJPhyMVzdx2Zv5kTciTmXYaueQ9+N/D40NklpAjzh0r88RVck0H+9NLGg==

**CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2022-08-30 11:25:35 | Firmante**

Vi1YbHACVn98hARPP5iMD19APDVQNuiaFK/82FWhASLtuEViOX9E6sY/umbxk6LpGao4b9a0o9RWTKu5kG2XvIkEgJ1BYi1TvR5OKNocnnP7/uRI9IDx0P1A45nU22Lvg6Hjs4MdMjtKnFdg6XkmdWoakpDJCe8K1ECQwKs1od45rwV9yLgUz4zjVOyS0Hvwl/26QE4XgVSS9tFXjniI9OeFHbzqnuC4pjDICAMJhOTDCEqEB+8SBpayMhcRpBcPRerB1MYnNE3dlI8ho4MOBLqj+Ar/lfMhy4f9Y/fZsIC+WuiUrEebAlv7rhpUSmX+0akNgg7O6einjRemw==

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



nXcZNPm

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/B9qlBe20W02x18LyEneH6BSfNGBrx5e>

