

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

***“Identificación de genes relacionados a la respuesta
hidrotrópica en maíz mediante estudios de asociación del
genoma completo (Genome-Wide Association Studies,
GWAS)”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓL. JESÚS JONATHAN MARTÍNEZ GUADARRAMA

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. DELFEENA EAPEN**

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2019

Índice

Contenido	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	6
3.1. Maíz	6
3.1.1. Descripción de la planta de maíz	7
3.1.2. El cultivo del maíz en el mundo	10
3.1.3. Producción y consumo de maíz en México	11
3.2. Sequía	12
3.2.1. Contexto mundial y nacional de la sequía	13
3.3. Estrés hídrico en maíz	14
3.4. Respuestas trópicas	15
3.4.1. Gravitropismo	17
3.4.2. Fototropismo	19
3.4.3. Tigmotropismo	22
3.4.4. Hidrotropismo	23
3.4.4.1. Percepción del gradiente de humedad	23
3.4.4.2. Estudios de hidrotropismo en raíces (antecedentes)	25
3.4.4.3. Mutantes y genes involucrados en la respuesta hidrotropica	29
3.4.4.4. Otros mecanismos moleculares relacionados a la respuesta hidrotropica	30
3.4.4.5. Fenotipificación de la respuesta hidrotropica de maíz y experimento en campo	31
3.5. GWAS	36
3.5.1. Mejoramiento de cultivos agrícolas a través de GWAS	40

4. Justificación	42
5. Hipótesis	42
6. Objetivos	43
6.1. Objetivo general	43
6.2. Objetivos específicos	43
7. Materiales y métodos	44
7.1. Material vegetal	44
7.2. Fenotipificación y clasificación de la respuesta hidrotropica de la raíz primaria de maíz	44
7.3. GWAS para la respuesta hidrotropica de maíz	52
7.4. Extracción de RNA	54
7.5. Selección del gen de referencia	56
7.6. Diseño de cebadores o “primers”	56
7.7. Síntesis de cDNA y PCR tiempo final	60
8. Resultados	61
8.1. Análisis de asociación del genoma completo o GWAS.	61
8.2. Anclaje de SNPs y búsqueda de información en bases de datos	67
8.3. El efecto fenotípico de los SNPs entre híbridos robustos y débiles	75
8.4. Identificación del gen <i>MIZ1</i> en el GWAS de hidrotropismo de la raíz primaria de maíz	81
8.5. SNPs/Genes candidatos asociados a la respuesta hidrotropica de la raíz primaria de maíz	84
8.6. Expresión de los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotropica	88
8.7. Comparación del GWAS con el análisis de ligamiento de QTLs para respuesta hidrotropica de la raíz primaria de maíz.	94
9. Discusión	95
10. Conclusiones	103

11. Perspectivas	104
12. Literatura citada	105

Índice de figuras

Figura	Pág.
1. Esquema de la planta de maíz.	8
2. Imágenes del sistema radicular de plántulas de maíz.	9
3. Interacción de tropismos.	16
4. Percepción y respuesta a la gravedad en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> .	18
5. Modelo de señalización que desencadena la respuesta fototrópica.	20
6. Generación de la curvatura fototrópica.	21
7. Respuesta hidrotrópica de la mutante <i>nph3-1</i> en el sistema de escrutinio de la respuesta hidrotrópica para la raíz primaria de plántulas de <i>A. thaliana</i> .	21
8. Estructura de la raíz de <i>Zea mays</i> .	24
9. Experimentos realizados por Sachs y Molish para demostrar la respuesta hidrotrópica en raíces de diferentes plantas.	26
10. Experimentos con la mutante de chícharo agravitrópico <i>ageotropum</i> .	27
11. Experimento realizado por Takahashi y Scott en 1991 para mostrar la interacción del gravitropismo en la respuesta hidrotrópica.	28
12. Esquema del sistema de escrutinio para analizar la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz.	33
13. Plántulas de maíz con respuesta hidrotrópica débil y robusta.	34
14. Esquema de los tratamientos de riego utilizados en el experimento en campo para evaluar el efecto de la respuesta hidrotrópica.	34
15. Comparación de producción de granos y biomasa radicular en híbridos débiles y robustos.	35

16. Electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) para mostrar la integridad del RNA extraído de raíces.	55
17. Imagen de electroforesis en gel de agarosa (2% p/v) para los genes candidatos.	58
18. Gráfica tipo <i>Manhattan plot</i> resultado del segundo GWAS realizado con los resultados de la fenotipificación de 231 híbridos de maíz DTMA.	64
19. Acercamiento de la gráfica tipo <i>Manhattan plot</i> de los 100 SNPs con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica.	65
20. Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) para los SNPs de la respuesta hidrotrópica.	66
21. Ubicación de los 100 SNPs de acuerdo a su posición génica.	68
22. Porcentaje de SNPs por cromosoma.	69
23. Intensidad (mapa de calor) del efecto fenotípico de los SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica para la población de híbridos DTMA.	79
24. Mapa de calor del efecto fenotípico de SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica en híbridos débiles y robustos.	80
25. Posición de los SNPs en genes homólogos a <i>MIZ1</i> en el GWAS de la respuesta hidrotrópica de maíz.	83
26. Imagen del gel de electroforesis en agarosa (2% p/v) que muestra la expresión constitutiva del gen <i>FPGS</i> .	89
27. Imágenes de geles de electroforesis en agarosa (2% p/v) para los genes <i>NRT1.1</i> , <i>NPH3</i> y <i>EGY3</i> .	89
28. Imagen del gel de electroforesis en agarosa (2% p/v) para el gen <i>DUF1005</i> .	91
29. Acercamiento de la gráfica tipo <i>Manhattan plot</i> de los 100 SNPs con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica.	86
30. Comparación de crecimiento de raíces a las 6 y 24 horas en el sistema experimental.	94

Índice de tablas

Tabla	Pág.
1. Principales países productores de maíz	11
2. Clasificación de la respuesta hidrotónica de acuerdo al ángulo de curvatura	46
3. Resultados obtenidos de la fenotipificación de los híbridos de maíz DTMA	47
4. Concentración obtenida para cada una de las muestra en las dos extracciones de RNA	55
5. Características de los “primers” utilizados para los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotónica	59
6. Condiciones en las cuales los PCRs amplificaron las secuencias de interés	60
7. Resultados del primer análisis de asociación del genoma completo realizado con el programa Golden Helix	63
8. Resultados del segundo GWAS de la respuesta hidrotónica de híbridos de maíz DTMA	70
9. Numeración utilizada en las figuras de efecto fenotípico	77
10. Genes homólogos a MIZ1 en maíz	82

1. Resumen

Las plantas tienen la capacidad de dirigir el crecimiento de sus raíces hacia fuentes de humedad, este fenómeno es conocido como hidrotropismo y puede ser utilizado como mecanismo de evasión a la sequía, sin embargo este fenómeno es poco estudiado y a pesar de su potencial aplicación se conoce muy poco en plantas de interés agrícola como el maíz.

El objetivo de este trabajo fue identificar genes relacionados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz a través de análisis de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS) en una población de 231 híbridos de maíz DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa). El análisis tipo GWAS partió de la fenotipificación de la respuesta hidrotrópica y la identificación de SNPs en la población de híbridos DTMA. A partir de estos datos obtenidos se realizó el análisis tipo GWAS, en el cual se identificaron más de 23 mil SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica de maíz. Se realizó la búsqueda de información de los 100 SNPs con la mayor asociación (valor P) a dicha respuesta y fueron seleccionados los genes *NRT1.1*, *EGY3*, *NPH3* y *DUF1005* para explorar sus funciones reportadas y posible participación en la vía de señalización de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz. A través de PCR tiempo final se identificó que *DUF1005* se expresa a 6 horas de exposición a un gradiente de humedad *in vitro*, y de forma diferencial en híbridos con y sin respuesta hidrotrópica. Interesantemente, el SNP con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz se situó dentro del gen *DUF1005*.

2. Introducción

La planta de maíz es el producto de una interesante y compleja mezcla de tres factores: la naturaleza, la evolución y la intervención humana. El maíz destaca de entre todas las plantas ligadas a nuestras tradiciones y dieta diaria debido a su origen mexicano. En México podemos encontrar una enorme variedad de maíz, tanto en tamaño, forma del grano y color, basta con visitar los mercados locales para darnos cuenta que tan diverso es nuestro maíz.

Debido a esta variabilidad genética presente en el territorio nacional Mexicano, numerosas investigaciones y hallazgos arqueológicos coinciden en que su centro de origen tuvo lugar en el país y que se originó a partir del teocintle (García y Arnaiz, 2006). Su domesticación y posterior distribución de América hacia el resto del mundo constituyó un importante hecho para toda la humanidad, ya que en la actualidad el maíz es el principal grano producido a nivel mundial. La producción internacional más significativa de este cultivo tiene lugar en 10 países, siendo Estados Unidos el principal productor, mientras que México se encuentra en octavo sitio (FIRA, 2016). El consumo de este grano en el territorio nacional es muy elevado en comparación con el de otros países, debido a que durante mucho tiempo ha sido la principal fuente de alimentación en la población, sin embargo la versatilidad del maíz va más allá de la alimentación, a este cultivo se la han dado muchos usos, como la generación de biocombustibles, la utilización de sus aceites para fabricar pinturas o como componente de cosméticos, entre otros usos (SE, 2012).

En años recientes azotadoras sequías han provocado el deterioro en las condiciones de vida de cientos de personas en el mundo. México no ha sido exento de este fenómeno, principalmente en la zona norte del país se han registrado las sequías más intensas en los últimos años (Contreras-Servín, 2005; SEMARNAT, 2014). La falta de agua ha provocado la pérdida de miles de hectáreas de diversos cultivos, entre los que destaca el maíz al ser uno de los cultivos con mayores afectaciones por sequía. Como consecuencia la producción de este grano ha

disminuido y el precio del maíz ha aumentado significativamente debido a que se tiene que importar más maíz para cubrir la demanda de la población y el déficit que las sequías ocasionan (CONAGUA, 2012).

El agua es vital para la vida y la falta de este recurso en cultivos agrícolas trae consigo severas consecuencias que en muchas ocasiones son irreparables, una consecuencia de este déficit es el estrés hídrico, que puede llevar a la pérdida total de cultivos. La raíz es el órgano vegetal encargado de anclar a la planta en el suelo y absorber agua, por lo cual el estudio de este órgano es primordial, de hecho se considera que la próxima revolución verde se centrará en el estudio y mejoramiento del sistema radicular (Den Herder et al., 2010). Una de las características que han sido poco estudiadas es la detección de gradientes de humedad, un factor muy importante que determina en gran medida la dirección del crecimiento de la raíz, y que puede emplearse como un mecanismo de evasión a sequía. El crecimiento de los órganos vegetales en dirección a un estímulo es conocido como tropismo y de acuerdo a su origen se clasifica en:

Tigmotropismo: originado en respuesta al tacto. Por ejemplo, los sarcillos de enredaderas y plantas trepadoras.

Gravitropismo: crecimiento hacia el vector de la gravedad. Por ejemplo, la raíz primaria de la mayoría de las plantas terrestres son positivamente gravitrópicas.

Fototropismo: crecimiento en dirección a la luz. Por ejemplo la parte aérea de las plantas crecen en dirección de la luz.

Hidrotropismo: crecimiento en dirección al agua o en respuesta a un gradiente de humedad. Por ejemplo, las raíces son muy susceptibles al cambio de humedad del suelo y son positivamente hidrotrópicas (Taiz et al., 2015).

El estudio de la respuesta hidrotrópica puede contribuir a disminuir en gran medida el efecto del estrés por sequía ya que las raíces con mayor capacidad de detectar gradientes de humedad crecen hacia las zonas donde se encuentra este recurso. Sin embargo, el estudio de la respuesta hidrotrópica no ha sido muy popular como

el gravitropismo o el fototropismo, tal vez por la dificultad que implica la creación de gradientes de humedad y la fuerte interacción con el gravitropismo. A pesar de los obstáculos implícitos en el estudio de este tropismo, los científicos dedicados a esta área han mostrado diversas maneras de generar los gradientes de humedad que necesitan las plantas para poder responder positivamente a un gradiente hídrico (Takahasi & Scott 1993; Kobayashi et al., 2007).

Desafortunadamente las bases genéticas del hidrotropismo han sido muy poco estudiadas. A la fecha se han identificado dos genes, *MIZ1* y *MIZ2* en *Arabidopsis thaliana*, los cuales son considerados como esenciales para la respuesta hidrotropica. *MIZ1* es una proteína de función desconocida y *MIZ2* codifica para una proteína de tráfico vesicular (Kobayashi et al, 2007). De igual manera se han relacionado otros factores que participan en el hidrotropismo como la luz en *A. thaliana*, donde incrementa la respuesta hidrotropica en comparación con plántulas en oscuridad (Takahashi et al., 2002). También destacan genes relacionados al crecimiento y elongación celular, ya que no puede haber tropismo sin crecimiento, asimismo hormonas como ABA (ácido abscisico) y citocininas favorecen la respuesta hidrotropica mientras que ROS (*Reactive Oxygen Species*) la disminuye (Saucedo et al. 2012). No obstante, se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la respuesta hidrotropica en maíz.

A través de nuevos métodos de secuenciación de genomas y en conjunto con el desarrollo de diferentes programas estadísticos, es posible realizar mapeo genético mediante estudios de asociación del genoma completo o GWAS (*Genome-Wide Association Studies*). En este tipo de análisis vinculan SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) a fenotipos cuantificables, la asociación generada depende de la variación fenotípica específica para el rasgo de interés dentro de una población de al menos 200 individuos (Korte & Farlow, 2013). Este tipo de análisis puede utilizarse para identificar SNPs o regiones génicas asociadas a la respuesta hidrotropica ya que esta respuesta es cuantificable en términos de ángulo de curvatura generada en dicha respuesta. Para realizar GWAS es requerida la fenotipificación y la detección de SNPs en una población de maíz (genotipo).

En nuestro grupo de trabajo se fenotipificó la respuesta hidrotrópica de 283 híbridos de maíz DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) generados por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). La fenotipificación se llevó a cabo en un sistema experimental diseñado con un gradiente de humedad generado por una solución higroscópica y un hidroestimulante (Figura 12). En la fenotipificación se clasificó la respuesta hidrotrópica en base al ángulo de curvatura como *Robusta* (crecimiento en dirección al hidroestimulante, con ángulos $> 40^\circ$) o *Débil* (alejándose de la fuente de humedad, con ángulos $< 39^\circ$) [Eapen et al., 2017]. Los resultados obtenidos a partir de la fenotipificación de la respuesta hidrotrópica de los híbridos DTMA en conjunto con los SNPs (proporcionados por CIMMYT) fueron utilizados para realizar el análisis tipo GWAS de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz mostrado en la presente tesis.

3. Marco teórico

3.1. Maíz

El maíz es una planta que ha evolucionado en conjunto con el desarrollo de las civilizaciones mesoamericanas, su importancia radica en figurar como una de las principales fuentes de alimentación. Existe una íntima relación entre la cultura Mexicana y la historia del maíz (Sánchez-Lacy, 2006), este cultivo ocupaba un lugar preponderante en la época prehispánica, era motivo de veneraciones, representaciones, mitos y dioses vinculados a ella; inclusive algunas civilizaciones crearon esculturas y pinturas que el día de hoy nos recuerdan el impacto que el maíz causó en su vida, por ejemplo, para los Mayas, el maíz fue más que una fuente de alimentación, esta civilización consideraba que el maíz fue un regalo que los dioses le hicieron a la humanidad y que cultivarlo y cuidarlo era un deber sagrado. Lo tenían en tan alta estima que lo simbolizaban con piedras preciosas como el jade, incluso, según el libro *Popol Vuh* (1960), después de varios intentos fallidos con barro y madera, la esencia, cuerpo y alma del hombre maya fue creada a partir de masa de maíz; en pocas palabras, el maíz creó esta brillante civilización (Asturias, 2004). Existen códices donde se plasma al maíz con características animales y vegetales, tal vez en representación de su fertilidad y su íntima relación con la humanidad. En otras civilizaciones como la Mexica, la Tolteca y la Olmeca, existieron deidades que hacían referencia al maíz, como la diosa Xilonen y el dios Centéotl, a quienes se les reconoce como la diosa del maíz y el creador del maíz respectivamente (Pérez-Suárez, 2001). Simplemente el maíz formó parte importante de la cultura mexicana, tanto así, que hoy en día sigue siendo la base de la alimentación de los mexicanos.

3.1.1. Descripción de la planta de maíz.

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual. El tallo o caña de la planta puede llegar a medir hasta cinco metros de altura, es cilíndrico y sin ramificaciones, muy similar al de una caña de azúcar, está formado por una sucesión de nudos que varía entre 8 y 25. Sus hojas nacen en dichos nudos alternadamente en dos filas a lo largo del tallo (Figura 1), pueden llegar a medir 1.5m de largo y 10cm de ancho, éstas se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo, sus nervaduras son paralelas, distintivas de las monocotiledóneas (Yamakake, 2009).

Como se aprecia en la figura 1, *Z. mays* L. es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta. La inflorescencia masculina es terminal y se conoce como panícula o espiga, consta de un eje central; en los dos tercios superiores de dicho eje se desarrolla una espiga, bajo la cual se originan varias ramas finas de aspecto plumoso que corresponden a espigas laterales, que a su vez contienen dos flores estaminadas, donde se desarrollan los granos de polen. Las inflorescencias femeninas conocidas como mazorcas, se localizan en las yemas axilares de las hojas, corresponde a una espiga de eje grueso y forma cilíndrica (olote) cubierta por brácteas u hojas envolventes. En el olote se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla presenta dos flores pistiladas, una fértil y otra abortiva, colocadas en hileras paralelas. Las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis y un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen. La inflorescencia femenina puede formar alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en promedio de 8 a 24 hileras por mazorca; todo esto encerrado en numerosas brácteas o vainas de las hojas, los estilos largos saliendo de la punta del raquis como una masa de hilo sedoso se conocen como pelo de elote (Yamakake, 2009).

El sistema radicular del maíz se compone de varias clases de raíces: la raíz primaria, raíz seminal (que se origina en los primeros días de germinación como se ilustra en la Figura 2), está representada por un conjunto de una a cuatro raíces de origen embrionario, a partir de estas se desarrollan las raíces laterales de segundo y de tercer orden que constituyen prácticamente todo el sistema radicular y pueden llegar a alcanzar hasta dos metros de profundidad. Por encima del suelo se encuentran las raíces de sostén o soporte, las cuales se originan en los nudos del tallo (raíces coronarias) muy cerca de la superficie del suelo, éstas raíces le confieren a la planta estabilidad y disminuyen los problemas de acame (Lesur, 2005).

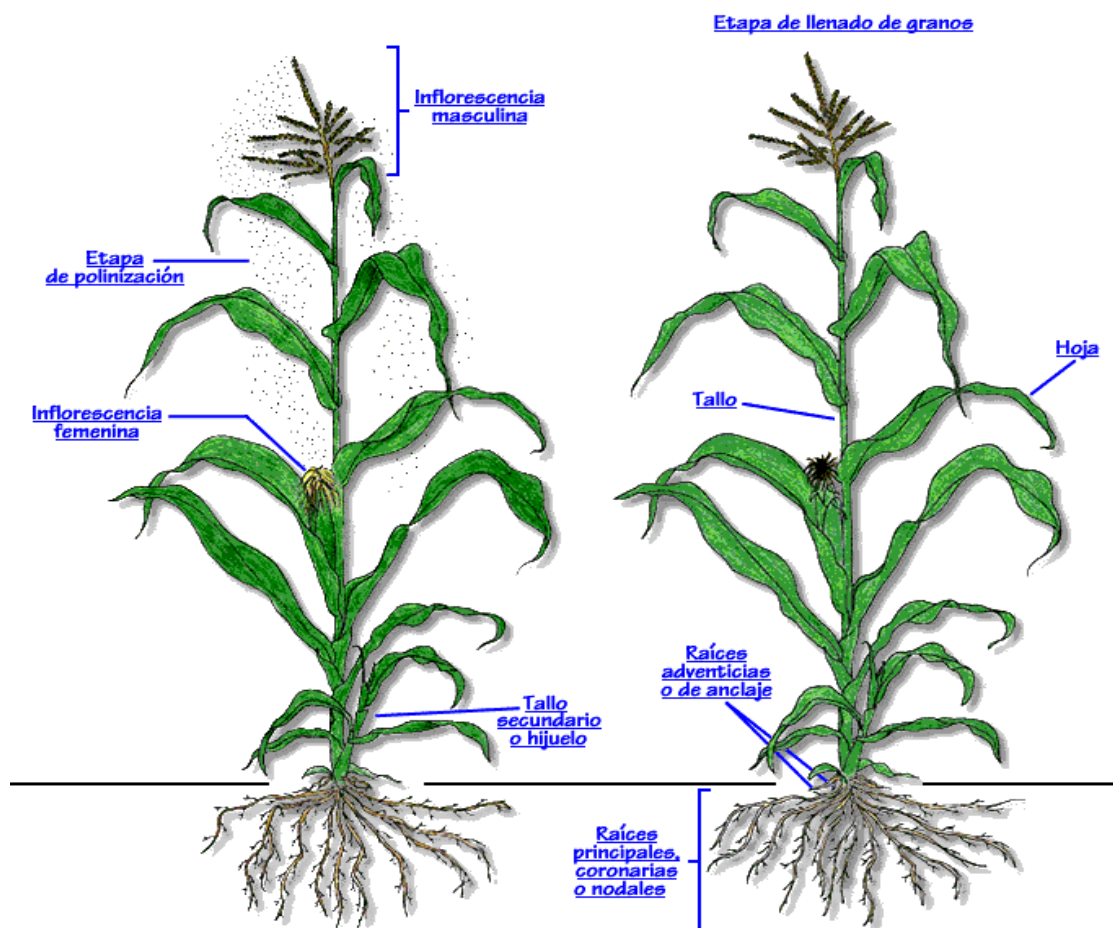


Figura 1. Esquema de la planta de maíz (Adaptado de http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/maiz.htm).

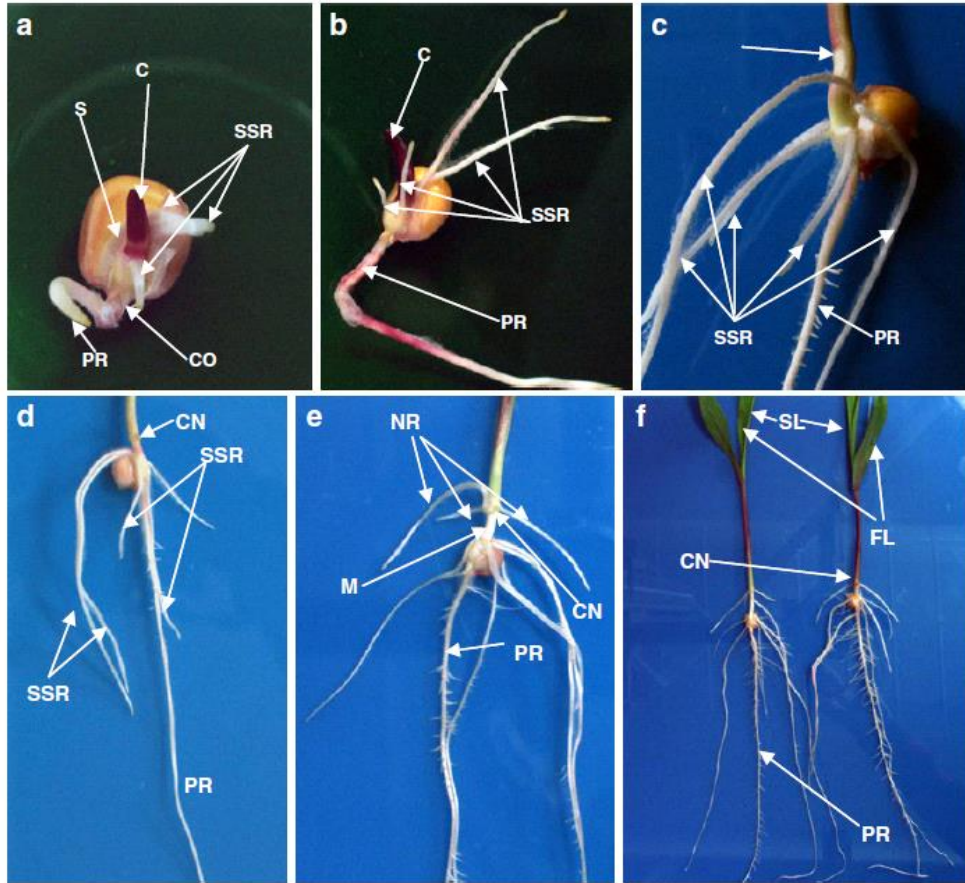


Figura 2. Imágenes del tipo de raíces en plántulas de maíz a los (a) 2 días, (b) 3 días, (c) 4 días, (d) 5 días y (e y f) 7 días después de la germinación. C) coleoptilo; CN) nodo del coleoptilo; CO) coleorriza; FL) primera hoja; M) mesocotilo; NR) raíz nodular; RP) raíz primaria; S) escutelo; SL) segunda hoja; SSR) raíz seminal escutelar (Tomado desde Singh et al., 2010).

La polinización del maíz se realiza con ayuda del viento (anemófila), los granos de polen pueden viajar de 100 a 1000m de distancia, el polen cae sobre los estilos, donde germina y avanza hasta llegar al ovario; cada ovario fecundado crece hasta transformarse en un grano de maíz, por lo tanto cada grano es un individuo con su propio material genético. En la mazorca cada grano o semilla es un fruto independiente llamado cariósipide que está insertado en el raquis cilíndrico u olote; la cantidad de granos producidos por mazorca está limitada por el número de granos por hilera y de hileras por mazorca. Como cualquier otro cereal, las estructuras que constituyen el grano del maíz (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren

propiedades físicas y químicas (color, textura, tamaño, etc.) que han sido importantes en la selección del grano como alimento. Cada planta produce de una a tres mazorcas, según la variedad y condiciones ambientales en las que se encuentre (Lesur, 2005).

3.1.2. El cultivo del maíz en el mundo.

En años anteriores el maíz era considerado el tercer cultivo de mayor importancia a nivel mundial, sin embargo, desde 2011 es el principal grano producido y comercializado en todo el mundo, convirtiéndose en uno de los productos más importantes en los mercados internacionales (SE, 2016). Actualmente a nivel mundial se cosechan cerca de 180 millones de hectáreas de maíz. El 85% del total de producción es aportado principalmente por diez países (Tabla 1), sin embargo no todos alcanzan a cubrir su demanda interna, por lo cual, para solventar este déficit tienen que importar maíz de naciones que registran excedentes. Los principales importadores de maíz son Japón, México y Corea del Sur, de los cuales únicamente el territorio mexicano figura también como un importante productor, mientras que Estados Unidos, Brasil, Argentina y Ucrania son los exportadores más importantes en el mundo (USDA, 2016).

Como se muestra en la Tabla1, el departamento de agricultura de los Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*) hizo una proyección del rendimiento del ciclo agrícola 2016/17, en la cual se estima un incremento en la producción de maíz, que se espera alcance una cifra record de producción (USDA, 2016). Una de las causas principales que han impulsado el aumento en la producción de este grano es el gran avance en los conocimientos científicos y tecnológicos aplicados al estudio del maíz, entre los que destacan la producción de etanol y biocombustibles, además de una amplia gama de productos alimenticios obtenidos a partir de este grano sin olvidar el crecimiento de la población humana que cada día demanda más fuentes de alimentación (SE, 2012).

Tabla 1. Principales países productores de maíz en el periodo 2015/16 y una proyección a la producción del ciclo 2016/17 (las cantidades mostradas corresponden a millones de toneladas, cada periodo corresponde de Octubre de un año a Septiembre del año siguiente) [USDA, 2016].

País	2015/16	2016/17
Estados Unidos	345.5	382.5
China	224.6	216
Brasil	67	83.5
Unión europea	58.5	60.3
Argentina	28	36.5
Ucrania	23.3	26
India	21.8	24.5
México	25.8	24.5
Rusia	13.2	14
Sudáfrica	7.9	13
Otros países	143.6	144.9
Total Mundial	959.5	1,025.7

3.1.3. Producción y consumo de maíz en México.

La República Mexicana produjo 25.8 millones de toneladas de maíz en el ciclo agrícola 2015/16 (USDA, 2016). Representa la principal fuente de alimentación para algunas familias mexicanas y es el único grano de importancia agrícola producido en todos los estados del país (al menos para autoabasto). El consumo *per cápita* del maíz en México oscila entre 123 kg anualmente, cifra muy elevada en comparación con el promedio de la población mundial de 16.8 kg (AgroDer, 2012). Debido al alto consumo, la producción de maíz en México no satisface la demanda exigida por la población, por lo que se tienen que importar entre 8 y 12 millones de toneladas de maíz cada año, convirtiendo al país en el segundo comprador más grande de maíz en el mundo (después de Japón), siendo Estados Unidos el principal proveedor de este grano (FIRA, 2016). Lo anterior ha convertido a México en uno de los principales mercados de maíz en el mundo, tanto por su producción como por su consumo.

El consumo de este grano en el país está dividido por diversas variedades y razas, en las que destacan principalmente el maíz blanco y el amarillo (91 y 9% respectivamente). El maíz blanco es utilizado básicamente para consumo humano, tiene una gran versatilidad dentro de la gastronomía tradicional mexicana, prácticamente no hay día que los mexicanos no consumamos algún producto elaborado a base de este grano. Por su parte el maíz amarillo es utilizado principalmente para alimentación humana, alimentación animal y en el sector industrial (FIRA, 2016).

El precio del maíz se había mantenido constante hasta 2006, la tasa de aumento en los costos de dicho cultivo no era muy significativa, pero hasta dicha fecha el maíz empezó a mostrar un incremento en su costo, el ascenso continuó hasta el año 2011 cuando el Departamento de Agricultura de Estados Unidos declaró que el maíz había alcanzado su máximo precio, de igual manera, en años posteriores el alza en precio del maíz ha ido incrementando (FIRA, 2016). Con el aumento en los costos internacionales del cultivo más importante para los mexicanos, la economía de muchas familias y en general del país se ha visto afectada (SE, 2012).

3.2. Sequía.

Una de las catástrofes capaz de modificar en gran escala el ambiente de una región es la sequía. Sus efectos más alarmantes y fatales se manifiestan en el deterioro de las condiciones de vida de los habitantes y en el daño a los ecosistemas naturales. La sequía es una condición normal y recurrente del clima que ocurre o puede ocurrir en todas las zonas climáticas, aunque sus características varían significativamente de una región a otra (Contreras-Servín, 2005).

La sequía específicamente puede definirse como un conjunto de condiciones ambientales atmosféricas de muy poca humedad que se extiende durante un periodo suficientemente prolongado para que la falta de lluvias cause un grave

desequilibrio hidrológico y ecológico (FAO, 2013). Es difícil definir el periodo en el que la precipitación sea escasa para que se considere sequía, debido a que las características climatológicas de cada región son muy diferentes, por ello la percepción de la sequía puede variar en determinadas regiones, por ejemplo en la región norte de México hay sequía cuando deja de llover cinco o seis años, en cambio en países como Francia o Inglaterra basta con que la precipitación sea escasa uno o dos meses para que su población considere que hay sequía (INIFAP, 2010).

3.2.1. Contexto mundial y nacional de la sequía.

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) declara que la sequía es una de las principales causas de pobreza y hambre en el mundo, y que está motivando a más 135 millones de personas a emigrar de su país de origen. África es el continente más afectado por este fenómeno natural, los países que han sufrido más impacto por la sequía son: Etiopía, Mauritania, Malawi, Kenia, Tanzania, Somalia, Sudáfrica, Uganda, Zimbawe, Zambia y Mozambique; en dichas naciones la escasez de agua ha perjudicado seriamente las cosechas y el ganado. Fuera del continente africano otras naciones como México, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Paraguay, Uruguay, Chile, Irak, Siria, Afganistán, India, Jordania, Turquía, China y Australia, han padecido los estragos de la escasez del vital líquido (Dai, 2011; ONU, 2012; ONU, 2017).

México ha padecido los efectos de la sequía a lo largo de su historia, sin embargo el país ha vivido las sequías más intensas de los últimos 75 años (hasta 2016). Un ejemplo de ello son los datos reportados por el Servicio Meteorológico Nacional a través de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), en el reporte de 2016 identificaron que en el mes de mayo del mismo año se identificó una reducción en la precipitación de 4.3 mm con respecto al promedio de 1941 a 2015. En 19 de las

32 entidades federativas de la nación (aproximadamente la mitad del territorio nacional) hay escasez de agua para consumo humano, de igual manera la agricultura y la ganadería sufren los estragos de la falta de agua. Los estados más afectados por la sequía han sido Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Nuevo León y Zacatecas (CONAGUA, 2016).

La sequía ha agudizado la crisis en el campo mexicano, el cuál enfrenta el desplome de la producción de los principales granos básicos con daños en 3.2 millones de hectáreas. Como consecuencia, México tendrá que incrementar la importación de maíz para abastecer la demanda de la población y resistir el posible aumento en los precios de este cultivo como en el año 2006 (SE, 2012). La falta de agua en cultivos agrícolas trae consigo severas consecuencias que pueden ocasionar la pérdida total de la producción. El déficit de este recurso en las plantas es conocido como estrés hídrico.

3.3. Estrés hídrico en maíz

El agua es el recurso que más comúnmente limita la producción de maíz en zonas tropicales. La falta de agua durante la etapa de establecimiento del cultivo puede debilitar a las plántulas jóvenes y como consecuencia reducir la densidad de la población. Durante la etapa de la floración, el maíz es muy sensible al estrés hídrico, y el rendimiento del grano puede verse gravemente afectado si se produce sequía durante ese periodo. Si el estrés ocurre durante el periodo de desarrollo de los granos, el principal efecto de la sequía es reducir el tamaño de éstos. La incidencia de estrés hídrico por lo general varía mucho de un año a otro, pero si el problema es frecuente, puede reducir el rendimiento del cultivo en más de un 20% (Lafitte, 1993; Núñez, et al., 1998).

Entre las principales causas que originan el estrés hídrico se encuentran: 1) precipitación insuficiente; 2) demanda ambiental muy grande provocada por altas temperaturas y baja humedad relativa; 3) suelos poco profundos o muy

compactados; 4) suelos con escasa capacidad para retener agua; 5) crecimiento radical restringido por las propiedades químicas del suelo y 6) el agua proveniente de las lluvias se pierde por escurrimiento (Lafitte, 1993).

El cambio climático que estamos presenciando ha traído como resultado pérdidas de todo tipo, los cultivos de maíz han sido afectados con altas temperaturas, incendios, inundaciones, heladas, huracanes y devastadoras sequías. Desafortunadamente, no se percibe un mejor futuro para los cultivos nacionales debido a que la sequía y en consecuencia el estrés hídrico sigue en aumento (ONU, 2012). Sin embargo, con el apoyo de investigaciones científicas y nuevas tecnologías implementadas en los campos de cultivo se podría mejorar la resistencia a la sequía del principal producto agrícola para la población mexicana; el maíz. Una alternativa para resolver este problema involucra el estudio de una parte escondida de la planta a la cual no le prestamos mucha atención; la raíz. El desarrollo y crecimiento del sistema radicular, en conjunto con algunos de sus movimientos trópicos (o tropismos) son temas emergentes de estudio para incrementar el rendimiento agrícola.

3.4. Respuestas trópicas.

Las plantas están ancladas a los suelos por medio de sus sistemas radiculares, por tal motivo no pueden huir del ambiente en el que se encuentran en busca de recursos tal como lo hacen los animales cuando necesitan alimentarse o tienen sed (Cassab y Sánchez-Guevara, 2008). Debido a esto, las plantas han tenido que desarrollar mecanismos que les permitan sobrevivir al ambiente en el que se encuentran. Una importante característica de estos organismos es la habilidad de reorientar su crecimiento hacia o en contra de diferentes estímulos ambientales como la luz, el agua, nutrientes, la gravedad o evadir obstáculos físicos (Sato et al., 2015).

El crecimiento de los órganos vegetales en dirección a un estímulo es llamado tropismo y es sumamente importante ya que puede contribuir a la supervivencia de

las plantas (Esmon et al., 2005). Conjuntamente los tropismos interactúan determinando la forma y/o posición que adoptan las plantas en los ambientes que se encuentran. Un mismo órgano vegetal puede responder a un tropismo o más de forma simultánea (Krieger et al., 2016), por ejemplo las raíces crecen hacia la gravedad, en contra de la luz, en dirección al agua o gradientes de humedad además de evadir obstáculos físicos como rocas (Figura 3). De igual manera otros órganos vegetales responden de forma diferente a los estímulos ambientales que los excitan constantemente (Jones et al., 2012; Raven & Johnson, 2004).

Los tropismos son llamados de acuerdo al estímulo al cual los órganos orientan su crecimiento y están regulados por diferentes mecanismos de respuesta ya sean fisiológicos y/o moleculares.

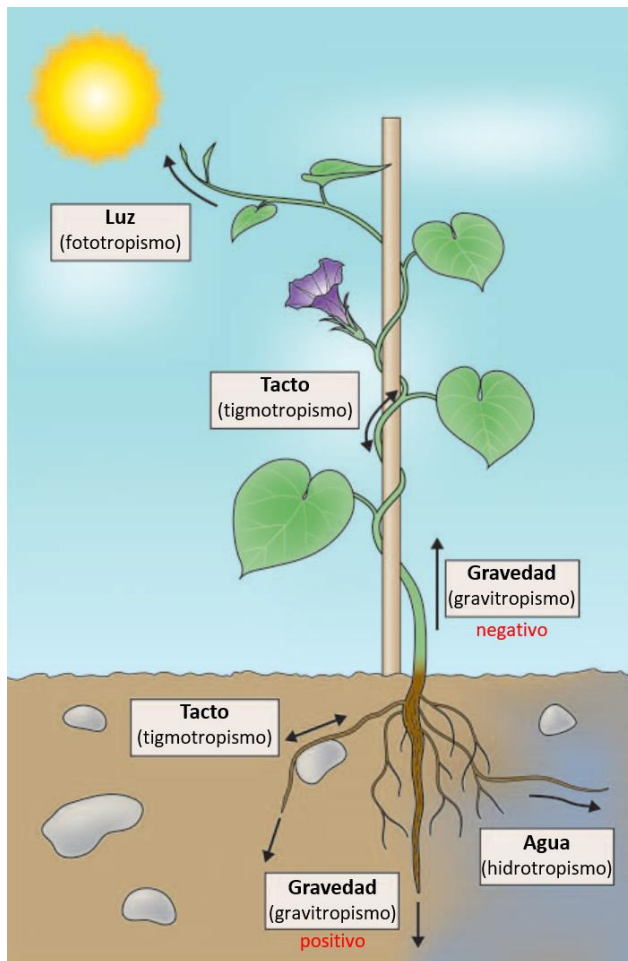


Figura 3. Interacción de tropismos. En esta imagen se muestra como los tropismos interactúan en conjunto para determinar el crecimiento de las plantas. En rojo se señala el efecto de la gravedad, que puede ser positivo (crecimiento hacia el vector de la gravedad en el sistema radicular) o negativo (crecimiento en contra del vector de la gravedad en la parte aérea). Imagen modificada de Jones et al., 2012.

3.4.1. Gravitropismo.

El gravitropismo es el crecimiento en dirección al vector de gravedad, es una respuesta que las plantas han desarrollado por *default* (Krieger et al., 2016), ya que inmediatamente que emergen tanto la raíz primaria como la parte aérea, se orientan de acuerdo a la dirección del vector de la gravedad. La parte aérea de las plantas desarrolla gravitropismo negativo, es decir en contra del vector de la gravedad, mientras que las raíces muestran gravitropismo positivo. Este tropismo es el más estudiado de todos, ya que se conocen varios de los mecanismos fisiológicos y moleculares que lo regulan, sin embargo se sabe poco de los receptores de gravedad, (Sato, et al., 2015). El gravitropismo está regulado bajo diferentes mecanismos moleculares entre los cuales se encuentra el transporte de auxinas, la concentración intracelular de calcio, etileno, Inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3), pH extracelular y óxido nítrico (Blancaflor & Masson, 2003; Sato, et al., 2015).

Para la detección de la gravedad se ha demostrado que las células de la columela son las responsables de percibir la dirección de este vector (Figura 4). Estas células contienen amiloplastos llenos de gránulos de almidón (estatolitos). De acuerdo a diversos estudios realizados la hipótesis más aceptada especula que la sedimentación de dichos gránulos de almidón desencadena la transducción de señales que dan como resultado la generación de una señal transmitida a la zona de elongación de la raíz, tejido que genera la curvatura al vector de la gravedad (Blancaflor, et al., 1998; Blancaflor & Masson 2003; Sato, et al., 2015).

Se han reportado plantas sin respuesta a la gravedad que han facilitado el estudio de este y otros tropismos, por ejemplo, las raíces del chícharo con fenotipo agravitrópico, *ageotropum*, que no responden a la gravedad (Takahashi & Suge, 1991). Igualmente se han identificado mecanismos fisiológicos con los que se disminuye la respuesta a este vector, por ejemplo, se ha postulado que el nivel de etileno regula la respuesta a la gravedad, es decir, al aumentar los niveles de etileno en las plántulas, disminuye la respuesta a la gravedad y puede acelerarse el crecimiento hacia otros estímulos como el agua o en contra de la luz (Sharp & LeNoble, 2002). De igual manera, Takahashi et al. (2003) sugieren que la

degradación de amiloplastos en células de la columela de *A. thaliana* podrían ayudar a disminuir la respuesta a la gravedad y ayudar a la raíz a responder hidrotropicamente. La importancia de estos estudios radica en la robusta interacción del gravitropismo con otros tropismos ya que el vector de la gravedad es ubicuo en la Tierra dificultando discernir la respuesta a la gravedad de otros estímulos.

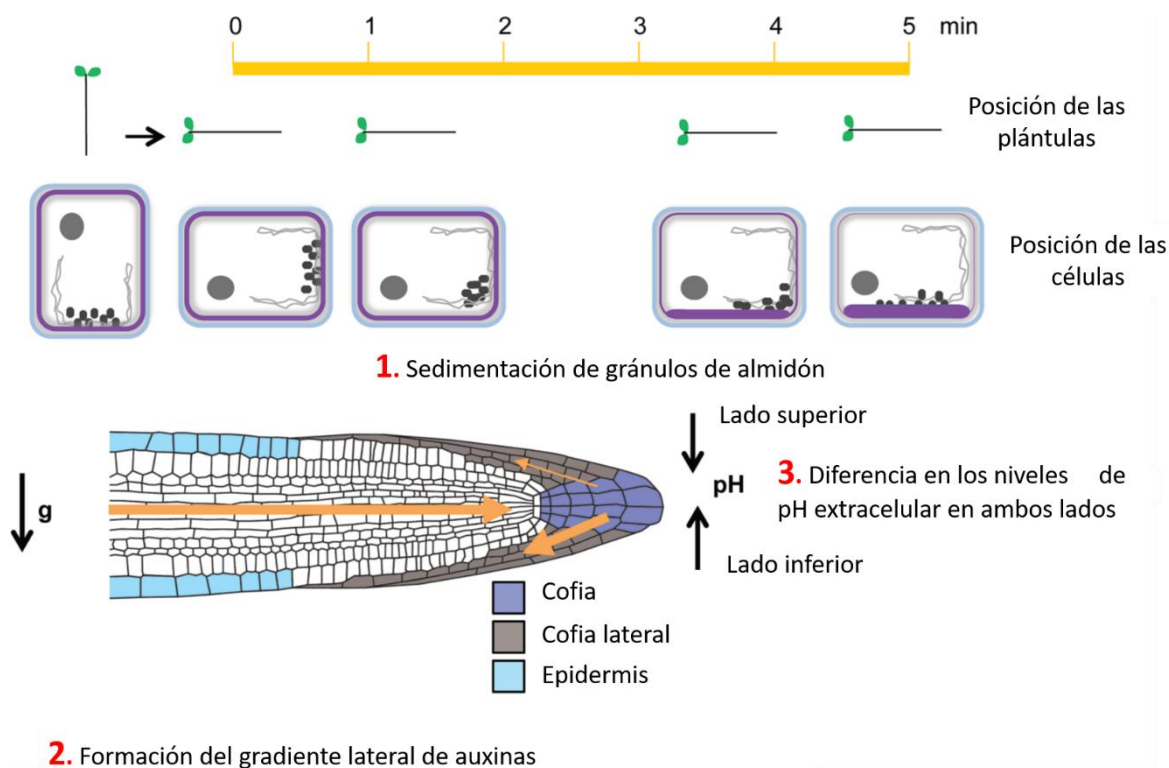


Figura 4. Percepción y respuesta a la gravedad en la raíz primaria de *A. thaliana*. En esta figura se ilustra de manera sencilla como se lleva a cabo la curvatura gravitropica en tres etapas. 1. Al tiempo 0 las plántulas se encuentran en posición vertical, después de ser colocadas en posición horizontal (90°) los estatolitos que se encuentran en la parte inferior de la célula empiezan a sedimentarse en dirección del vector de la gravedad tras el cambio de posición. Transcurridos 5 minutos desde el cambio de orientación de la plántula los estatolitos modifican su orientación de manera uniforme en la nueva parte inferior de la célula. 2. Se genera el gradiente lateral de auxinas entre el lado superior e inferior de la raíz, siendo mayor la concentración en la parte inferior. Esta diferencia en los niveles de auxinas (flechas de color anaranjado) es la responsable de estimular la elongación celular que genera la curvatura a la gravedad. 3. Finalmente los niveles de pH extracelular varían en el lado superior e inferior. Figura modificada de Sato et al., 2015.

3.4.2. Fototropismo.

Las plantas dependen de la luz para realizar la fotosíntesis, sin embargo al ser organismos sésiles han tenido que desarrollar la habilidad de alterar su crecimiento para optimizar la captura de luz e incrementar la eficiencia fotosintética (Fankhauser & Christie, 2015). El crecimiento vegetal en dirección a la luz es llamado *fototropismo* y se observa principalmente en tallos y hojas (Pedmale et al., 2010), aunque las raíces responden generalmente de manera negativa al fototropismo reorientado su crecimiento en contra de la luz.

La percepción de la luz esta mediada por fotoreceptores llamados, fitocromos, criptocromos, fototropinas y otros tipo de receptores que responden en función del tipo de luz que los excita desencadenando distintas respuestas en la planta. Las fototropinas, son proteínas que tienen dominios de quinasas UV-A/luz-azul asociadas a la membrana plasmática, son las encargadas de iniciar el crecimiento fototrópico que depende principalmente de ésta longitud de onda de la luz (Zhao et al., 2013). En condiciones de luz azul las plantas presentan fototropismo positivo, mientras que en longitudes de onda de luz roja e infrarroja la parte aérea muestra fototropismo negativo, es decir; se aleja de esta luz (Pedmale et al., 2010). Las fototropinas tienen dos dominios LOV (Light, Oxygen or Voltage) y un dominio quinasa con un extremo carboxilo terminal (Figura 5), con la incidencia de luz este complejo sufre una serie de cambios conformacionales que desencadenan la fosforilación de los componentes señalizadores ABCB19 (ATP-binding cassette B 19) y PKS4 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4) que participan en el transporte de auxinas. El cambio conformacional de las fototropinas genera la activación de otras vías de señalización que incluyen a las proteínas PINs (PIN-FORMED), NPH3 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3) y la bomba portón-ATPasa; sin embargo, el mecanismo de activación de estos complejos señalizadores aun es desconocido (Fankhauser & Christie, 2015). De esta manera la activación de las fototropinas genera la formación de un gradiente diferencial de auxinas en el tallo fotoestimulado. La mayor concentración de auxinas en el lado sombreado en comparación con el lado iluminado del tallo, induce la elongación

celular que da como resultado la reorientación del tallo hacia el estímulo luminoso (Figura 6).

El gen *NPH3* codifica una proteína esencial para el fototropismo en plantas (Motchoulski & Liscum, 2015), las mutantes de *A. thaliana* para el gen *NPH3* muestran hipocotilos no fototrópicos y al ser analizadas en el sistema de escrutinio de la respuesta hidrotrópica se observa un aumento de la misma en comparación con el fenotipo silvestre (Figura 7).

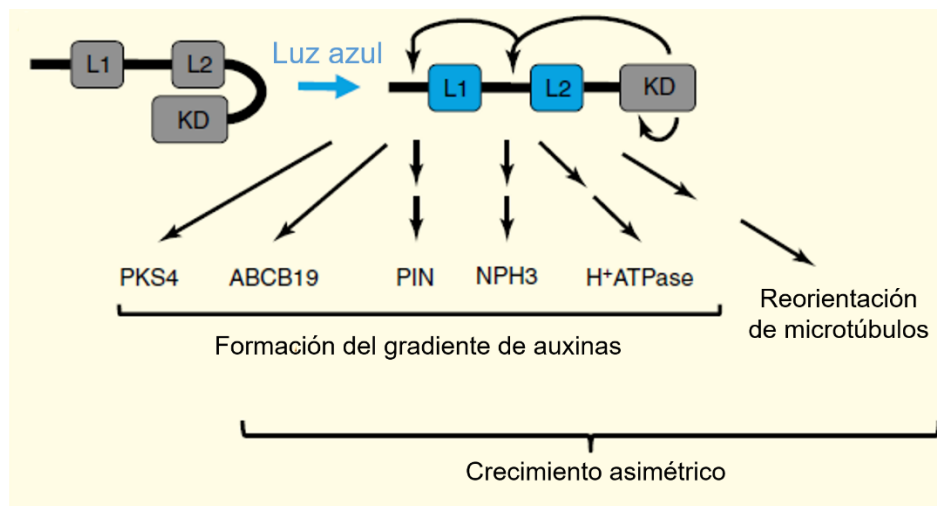


Figura 5. Modelo de señalización que desencadena la percepción de luz azul y la respuesta fototrópica. Dos dominios LOV (L1 y L2) y un dominio quinasa con un extremo carboxilo terminal (KD) conforman el complejo de las fototropinas, que al ser estimulado con luz azul sufre cambios conformacionales en cadena, dichos cambios dan lugar a la fosforilación de PKS4 y ABCB19, así como la activación (mecanismo aún desconocido) de PIN, NPH3 y la bomba protón-ATPasa. La activación de estos componentes señalizadores genera el gradiente de auxinas responsable de generar el crecimiento asimétrico (Figura modificada de Fankhauser & Christie, 2015).

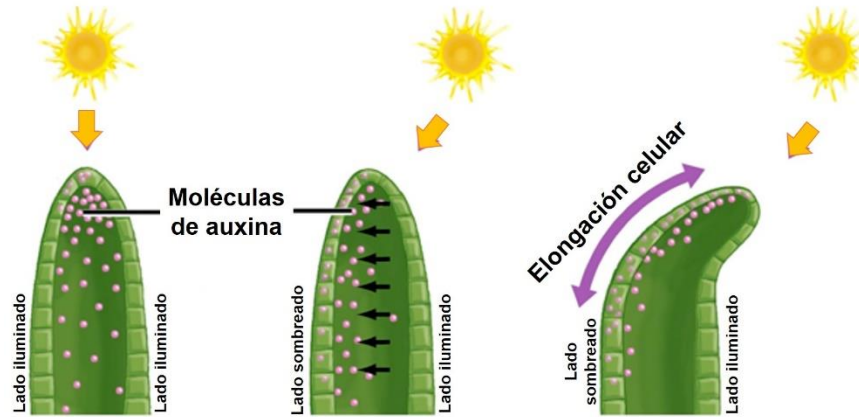


Figura 6. Generación de la curvatura fototrópica. La mayor concentración de auxinas se acumula en el lado sombreado (lado que no recibe la luz directamente) de los tallos fotoestimulados, lo cual genera la reorientación y crecimiento en dirección de la luz (imagen adaptada de la web).

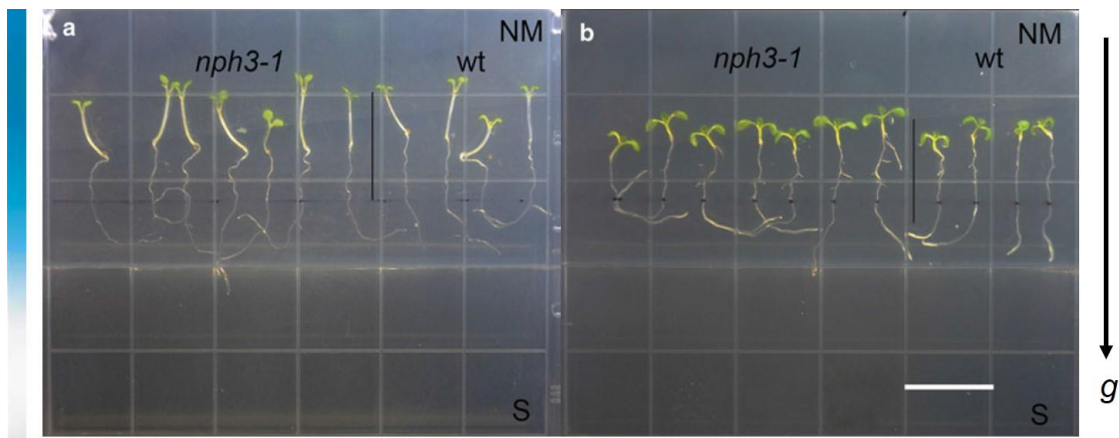


Figura 7. Respuesta hidrotrópica de la mutante *nph3-1* en el sistema de escrutinio para *A. thaliana*. Dicho sistema consta de dos tipos de medio nutritivo; en la parte superior un medio normal (NM) y en la parte inferior un medio con 12.5% (p/v) de sorbitol (S), que simula estrés hídrico y genera un gradiente de potencial hídrico contra la dirección el gradiente de gravedad. En el panel a) se observa la respuesta hidrotrópica en condiciones de oscuridad, nótese que las raíces de la mutante *nph3* son más largas y presentan una mayor curvatura hidrotrópica en comparación con el fenotipo de la plántula tipo silvestre. En el panel b) se muestra la respuesta hidrotrópica en condiciones de luz, nótese que de igual manera en plántulas mutantes la respuesta hidrotrópica es más robusta en comparación con el fenotipo de la plántula silvestre. Escala: 13mm (barra blanca), la flecha indica la dirección del vector de gravedad y la barra degradada de azul a blanco ilustra el gradiente de humedad de mayor a menor (Eapen et al., 2015).

3.4.3. Tigmotropismo.

La percepción y respuesta a estímulos mecánicos o táctiles son esenciales para el desarrollo de algunas especies vegetales, por ejemplo las plantas trepadoras dependen de un estímulo físico para poder trepar y crecer hacia donde se encuentra la mayor cantidad de luz disponible (Braam, 2005). El tigmotropismo es el crecimiento en respuesta a un estímulo físico (tacto) como rocas, otras plantas, animales o incluso el viento (Raven and Johnson, 2004).

La percepción del estímulo inicia cuando los zarcillos entran en contacto con algún objeto, células especializadas de la epidermis perciben el contacto (su mecanismo de acción no ha sido estudiado) y promueven el crecimiento causando que el zarcillo se enrolle o rodee el objeto (McCormack et al., 2006). Se han identificado los genes *TOUCH (TCH)* como partícipes de la respuesta a estímulos táctiles en *A. thaliana*, los cuales son los primeros en activarse para llevar a cabo la respuesta tigmotrópica. Estos genes fueron descubiertos al regularse positivamente ante una diversa variedad de estímulos táctiles. Las proteínas TCH incluyen: calmodulinas, proteínas reguladoras de calmodulinas, y la xiloglucano endotransglicosilasa (XTH) (Braam, 2005). Análisis de expresión y localización de estas proteínas demuestran que bajo tensión mecánica se acumulan participando en la expansión celular y de tejidos, generando así el crecimiento característico de la respuesta tigmotrópica. Además de estas proteínas, se han identificado que aproximadamente el 2.5% del total de los genes de *A. thaliana* se expresan en conjunto con los genes *TCH*, de los cuales la gran mayoría participan en mecanismos relacionados al crecimiento y expansión celular (Braam et al., 1996). También se han identificado hormonas como etileno, auxinas y moléculas señalizadoras, tales como las especies de oxígeno reactivas (ROS) que están implicadas en este tropismo (Raven and Johnson, 2004).

3.4.4. Hidrotropismo.

El agua constituye más del 85% del peso total de las plantas, por lo tanto la obtención de este recurso juega un papel de gran relevancia para su supervivencia, la captación de agua depende de la capacidad de absorción de las raíces y de la disponibilidad del recurso. El crecimiento en dirección al agua o a un gradiente de humedad es conocido como hidrotropismo y la percepción de dicho gradiente tiene lugar en la cofia de la raíz (revisado en Eapen et al., 2005).

3.4.4.1. Percepción del gradiente de humedad.

Hooker (1915) propuso que el sitio de sensibilidad de detección a un gradiente de humedad se encontraba en la cofia de la raíz (Figura 8) y en menor grado en la zona de elongación de la misma. A partir de esta observación diferentes investigadores se dieron a la tarea de demostrarlo; por ejemplo Takahashi y Scott (1993), removieron la punta de la raíz de maíz con ayuda de una navaja y demostraron que su respuesta tanto a gradientes hídricos como al vector de la gravedad fue bloqueada por la “decapitación” de la raíz en comparación con raíces intactas que fungieron como control.

En diferentes años, varios autores (Darwin en 1881, Molisch en 1883 y Hirasawa et al. en 1997) realizaron experimentos donde demostraron que la cofia de la raíz (Figura 8) es la encargada de dirigir el crecimiento de la misma, y de detectar gradientes de humedad (revisado en Takahashi, 1997). Para demostrar esto, envolvieron la punta de la raíz (de 1.5 a 2mm) con un trozo de papel húmedo y una mezcla de aceite de oliva y ceras naturales, con el fin de evitar la transpiración y obstruir la posible zona de detección de agua, como resultado, las raíces no respondieron hidrotropicamente en presencia de un gradiente de humedad y cuando se cubrió la parte superior, es decir la zona de elongación de la raíz, ésta respondió positivamente al hidrotropismo, confirmando que las células implicadas

en la detección de un gradiente de humedad se encuentran en la punta de la raíz (Takahashi, 1997).

Aún no se conoce con certeza el mecanismo a través del cual se detecta el gradiente de humedad en la cofia o la raíz, sin embargo, diferentes grupos enfocados al estudio de este tropismo trabajan activamente para determinar los mecanismos tanto fisiológicos como moleculares implicados en la detección de los gradientes de humedad durante la respuesta hidrotópica.

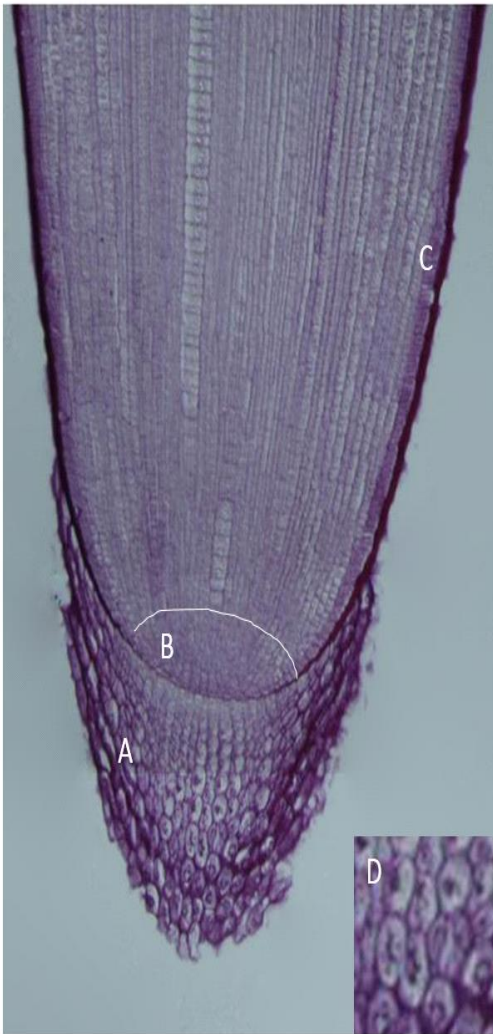


Figura 8.

Estructura de la raíz de *Zea mays*. Microfotografía de corte histológico de la región apical de la raíz de maíz. En la parte apical de la raíz se observa la cofia (A), por debajo de la línea blanca y hasta el inicio de la cofia se encuentra el meristemo apical (B), mientras que en la parte subapical se observa la zona de elongación (C). En el panel D se muestran las células de la columela ubicadas en la cofia de la raíz.

3.4.4.2. Estudios de hidrotropismo en raíces (antecedentes).

El desarrollo y crecimiento del sistema radicular está regulado por diferentes tipos de tropismos que con frecuencia interactúan entre sí influenciando la dirección del crecimiento de la raíz, es por esto que se han presentado dificultades a la hora de estudiar hidrotropismo en raíces. La raíz es un órgano que presenta generalmente un fuerte gravitropismo positivo en la mayoría de las plantas terrestres, en muchas ocasiones es difícil observar una respuesta hidrotrópica positiva ejercida por un gradiente de humedad en su hábitat natural, además, no sólo el gravitropismo interacciona con el hidrotropismo, también el tigmotropismo afecta la respuesta trópica al agua, ya que durante su crecimiento hacia la fuente de humedad puede encontrarse con obstáculos que dificulten su acceso a este recurso (Kiss, 2007). A pesar de que el estudio de la respuesta hidrotrópica en raíz podría contribuir a disminuir la pérdida de cultivos agrícolas por escasez de agua, el hidrotropismo no ha sido muy estudiado como otros tropismos, por ejemplo, la primera mutante sin respuesta hidrotrópica fue registrada 19 años después de haberse presentado las primeras mutantes agravitrópicas (Eapen et al., 2003).

Uno de los primeros investigadores en demostrar hidrotropismo en raíces fue Knight en 1811, de igual manera, pero 61 años después, Sachs demostró la existencia del hidrotropismo utilizando semillas de diversas plantas en un cilindro colgante de malla (Figura 9A), el cual tenía en su interior aserrín húmedo, colocándolo en posición inclinada observó que las raíces presentaban al inicio de su crecimiento gravitropismo positivo y posteriormente la raíz se curvaba siguiendo el sustrato húmedo. Este mismo modelo fue utilizado por Darwin años después (en 1881). Posteriormente, Molisch en 1883 estudió el hidrotropismo utilizando un nuevo sistema experimental mostrado en la figura 9B (revisado en Takahashi, 1997).

En 1915 Hooker estableció y midió gradientes de humedad necesarios para generar la respuesta hidrotrópica. El gradiente de humedad lo generó añadiendo ácido sulfúrico (a diferentes concentraciones) y papel filtro saturado de agua, situados opuestamente en los extremos de una cámara experimental, logrando así un

gradiente hídrico entre el papel filtro, el aire y el ácido sulfúrico. La humedad relativa fue medida en dos puntos de la caja con un higrómetro realizado por él mismo (Takahashi, 1997). A pesar de estas evidencias la existencia del hidrotropismo se puso en tela de juicio, algunos científicos argumentaban que era poco probable o casi imposible que las raíces tuvieran la capacidad de detectar un gradiente de potencial hídrico en su entorno y responder tropísticamente hacia él. Sin embargo, la utilización de chícharos mutantes carentes de respuesta trópica a la luz y gravedad ayudaron a confirmar la existencia del hidrotropismo. Estos experimentos realizados por Jaffe y colaboradores (1985), demuestran que las raíces agravitrópicas del chícharo mutante *ageotropum* crecen hacia gradientes de humedad; cuando el sustrato no está húmedo y el gradiente de humedad está dado por el aire, las raíces crecen hacia arriba como si fueran tallos (Figura 10A), en cambio, al ser colocadas en vermiculita húmeda las raíces emergen primero y después regresan hacia el sustrato (gradiente de humedad dado en el sustrato, Figura 10B). Otros experimentos que han ayudado a diferenciar el hidrotropismo y la respuesta a la gravedad incluyen la utilización de clinorrotación y análisis de microgravedad en el espacio (Takahashi, 1997).

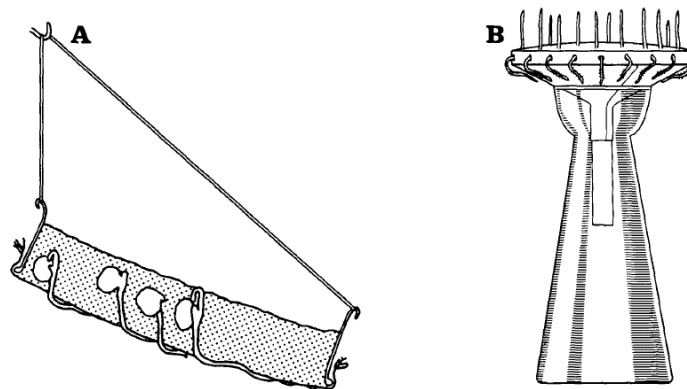


Figura 9. A) Canasta colgante realizada por Sachs en 1872 para demostrar la respuesta hidrotrópica en raíces de diferentes plantas y **B)** experimento realizado por Molish con el mismo objetivo. (Modificado de Takahashi, 1997).

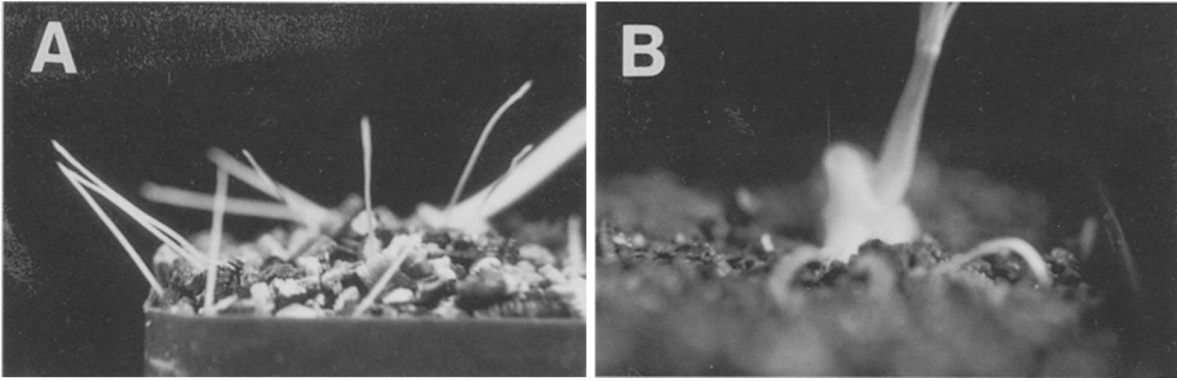


Figura 10. Experimentos realizados por Jaffe et al. (1985) con la mutante de chícharo agravitrópico *ageotropum*. A) Al colocar las plántulas en sustrato seco y aire húmedo las raíces salen del sustrato para estar en contacto con el aire húmedo. B) Cuando las plantas son colocadas en sustrato seco y posteriormente humedecido las raíces emergen y posteriormente regresan siguiendo la humedad.

Takahashi y Scott (1991) realizaron experimentos donde demostraron la fuerte interacción del gravitropismo e hidrotropismo utilizando plántulas de maíz de la variedad Golden Cross Bantam 70. En dicho ensayo, se estimularon las plántulas de maíz colocándolas en hidroestimulantes (bloques de espuma de poliestireno con el extremo inferior cortado a 55° , envuelto con papel filtro y varias capas de gasa húmeda) a diferentes ángulos con respecto a la horizontal (30° , 45° , 70° y 90°), para ser sometidas en el sistema experimental descrito en la figura 11 (Takahashi y Suge, 1991), en el cual la humedad relativa promedio era de $85\% \pm 3$. Como resultado, se mostró que el vector de la gravedad venció al hidrotropismo en plántulas colocadas a 30° y 45° , es decir las puntas de las raíces crecían hacia la gravedad y no hacia el hidroestimulante. Sin embargo, aquellas que fueron colocadas a 70° respondieron de manera positiva al gradiente hídrico venciendo al vector de la gravedad, reorientando su raíz hacia la fuente de humedad. Con esto se concluyó que el grado de interacción entre el hidrotropismo y el gravitropismo depende de la intensidad de uno o ambos estímulos, así como la capacidad de la plántula para detectar el estímulo y manifestar la respuesta.

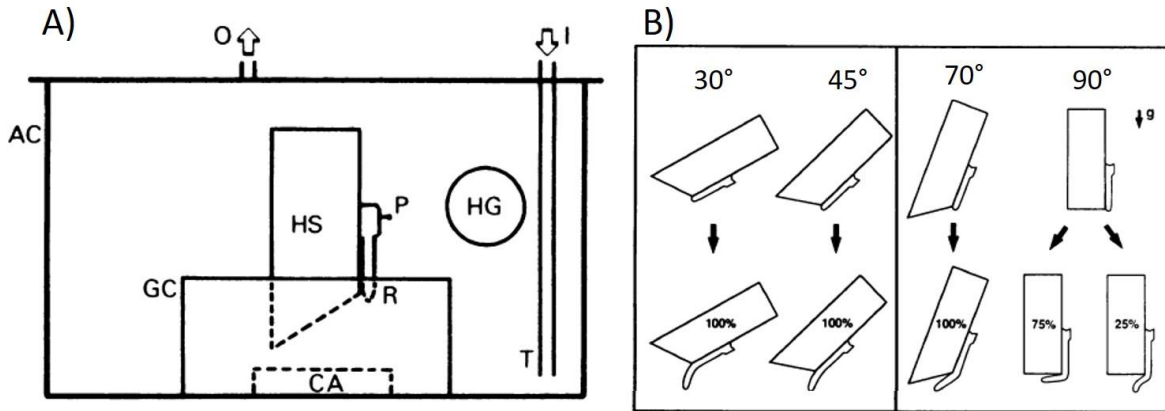


Figura 11. Experimento realizado por Takahashi y Scott en 1991 para mostrar la interacción del gravitropismo en la respuesta hidrotrópica. En el panel A) se muestra el sistema experimental utilizado, el cual consta de lo siguiente: AC) Caja de acrílico, CA) Caja Petri con CaCl_2 , GC) Contenedor de vidrio, HG) higrómetro, HS) Hidroestimulante, I) entrada de flujo de aire, O) Salida del flujo de aire, R) Raíz, T) Tubo plástico para flujo de aire, P) alfiler. En el panel B) se muestran los resultados de sus experimentos, en los cuales al colocar el hidroestimulante a 30 y 45° las raíces dirigen su crecimiento hacia la gravedad, mientras que aquellas que son colocadas a 70 y 90° dirigen su crecimiento al hidroestimulante y en contra del agente desecante (CaCl_2).

Posteriormente, se realizaron estudios en chícharo (*Pisum sativum* L.) y maíz (*Z. mays* L., variedad Silver Queen), para demostrar la importancia de la humedad relativa en la respuesta hidrotrópica (Takahashi & Scott, 1993). Para ello, se utilizaron diferentes niveles de gradientes de humedad colocando un hidroestimulante (bloque de poliestireno envuelto con papel filtro y gasa húmeda) y una solución saturada con diversas sales dentro de una cámara totalmente cerrada, cuya humedad relativa osciló entre 98 y 86%. Las plántulas de maíz fueron colocadas con las raíces dispuestas hacia el hidroestimulante y se observó que las raíces no responden al hidrotropismo en niveles altos de humedad relativa (98-94%); sin embargo, al ser colocadas en porcentajes de humedad relativa inferior (90-86%), la respuesta hidrotrópica fue notable. Estos resultados sugieren que tanto la humedad relativa para la inducción del hidrotropismo, así como la capacidad de respuesta, difieren entre especies de plantas.

3.4.4.3. Mutantes y genes involucrados en la respuesta hidrotrópica.

El estudio de este tropismo se ha realizado a través de la búsqueda de mutantes afectadas en dicho fenómeno. Eapen y colaboradores reportaron en 2003 la primera mutante sin respuesta hidrotrópica, a la cual nombraron *nhr1* (*no hydrotropic response*). Dicha mutante se aisló en *A. thaliana* utilizando un sistema experimental que comprende de una caja Petri cuadrada con dos medios nutritivos, un medio con agar normal en la parte superior (donde fueron colocadas las semillas) y un medio estresante de agar en la parte inferior. En este sistema, observaron que las raíces de *Arabidopsis* con fenotipo silvestre crecen hacia abajo (en dirección al vector de gravedad) y después de 5-6 días muestran una curvatura positiva en respuesta al estímulo hidrotrópico, evitando de esta manera el sustrato con potencial hídrico menor del medio estresante. En base a esta observación, identificaron la mutante incapaz de desarrollar una curvatura positiva al gradiente hídrico y su capacidad de crecimiento en un medio con déficit hídrico, sin embargo no se ha logrado identificar el gen responsable de este fenotipo.

Otra mutante, *altered hydrotropic response* (*ahr1*) de *A. thaliana* fue reportada por Saucedo y colaboradores (2012), la cual posee una respuesta hidrotrópica alterada. Sus raíces crecen hacia donde se encuentra la mayor disponibilidad de agua en el medio de escrutinio y desarrolla un extenso sistema radicular, identificaron que este fenotipo se ve incrementado en presencia de ABA. De igual manera observaron que al adicionar citocininas las raíces de *ahr1* responden hidrotrópicamente como el fenotipo de las plántulas tipo silvestre, lo cual indica que las citocininas juegan un papel crítico en la respuesta hidrotrópica de la raíz y/o en el crecimiento dirigido por estímulo hidrotrópico.

En 2007 Kobayashi y colaboradores reportaron la mutante *mizu-kussei1* (*miz1*) en *A. thaliana*, cuya principal característica es la ausencia de respuesta hidrotrópica. El fenotipo identificado es el resultado de una mutación recesiva en el gen *MIZ1*, que codifica una proteína con un dominio MIZ de función desconocida, expresada

en la cofia y células corticales de la raíz. Este gen está regulado por ácido abscísico (ABA) y luz, de manera independiente, también se identificó que al sobre-expresarse incrementa el hidrotropismo e inhibe la formación de raíces laterales, de igual manera reportaron que este gen se encuentra altamente conservado en plantas terrestres, desde musgos hasta arroz (*Oryza sativa*). Posteriormente Miyazawa y colaboradores (2009) reportaron la mutante *miz2*, que al igual que *miz1* no presenta respuesta hidrotrópica, e identificaron que el gen *MIZ2* codifica para una proteína ARF-GEF (GNOM) involucrada en tráfico vesicular y expresada en todas las células, que al igual que *MIZ1* catalogaron como esenciales para la respuesta hidrotrópica.

Moriwaki y colaboradores en 2010 realizaron un análisis transcriptómico (análisis de microarreglos) en plántulas de *A. thaliana* durante la respuesta hidrotrópica. Como resultado identificaron niveles transcriptómicos significativos de 793 genes durante el estímulo hidrotrópico (en comparación con plántulas control sin estímulo). Este trabajo resaltó la participación de genes relacionados a ABA y a estrés hídrico, ya que estos fueron los transcritos con mayores niveles de expresión.

3.4.4.4. Otros mecanismos moleculares relacionados a la respuesta hidrotrópica.

Una teoría sobre la respuesta hidrotrópica postula que para que ésta se lleve a cabo primero se debe reducir o evadir la respuesta a la gravedad, para ello deben desarrollarse diferentes mecanismos fisiológicos y moleculares. Se ha propuesto que la capacidad de respuesta reducida a la gravedad, puede ser en parte causada por la degradación simultánea de amiloplastos en células de la columela (Figura 8) de raíces en *A. thaliana* (Takahashi et al., 2003, Ponce et al. 2008), ya que el desplazamiento de amiloplastos a la parte inferior de la columela es uno de los

principales mecanismos que utilizan las plantas para detectar la gravedad, y al degradarse posiblemente la raíz tienda a dirigirse a otros estímulos como el agua.

La hormona vegetal, ácido abscísico (ABA), juega un papel importante en la tolerancia de las plantas a la sequía (Jones et al., 2012) y está estrechamente relacionado a estrés hídrico, por lo tanto un cambio en la homeostasis de ABA podría ocurrir bajo un estímulo de potencial hídrico, existe una hipótesis que indica que ABA podría ser un regulador del transporte de auxinas en la respuesta hidrotropica de la raíz (Eapen et al., 2005). Además de su participación durante estrés hídrico se ha identificado que ABA favorece la respuesta hidrotropica. Experimentos realizados con mutantes en la síntesis de ABA en *A. thaliana*, demuestran que las plántulas carentes de ABA son insensibles a estímulos hidrotropicos, por lo tanto no responden al estar expuestas a un gradiente de humedad como lo hacen plántulas de tipo silvestre. Sin embargo, al adicionar ABA, las plántulas recuperan su respuesta hidrotropica normal (Takahashi et al., 2002). Este hecho pone de manifiesto la importancia de ABA en la respuesta hidrotropica.

Recientemente se ha demostrado que la presencia de especies de oxígeno reactivas (ROS) modula las respuestas trópicas. Durante la respuesta gravitropica de *A. thaliana* ROS se distribuye de manera asimétrica con mayor acumulación en el lado cóncavo de la raíz. No obstante, durante la respuesta hidrotropica ROS se acumula de igual manera a ambos lados de la raíz. Aunado a estos resultados observaron que al disminuir los niveles de ROS se atenúa la respuesta a la gravedad e incrementa la respuesta hidrotropica (Krieger et al., 2016).

3.4.4.5. Fenotipificación de la respuesta hidrotropica de maíz y experimento en campo.

En nuestro grupo de trabajo (IBt, UNAM) se fenotipificó la respuesta hidrotropica de 283 híbridos de maíz DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) generados por el

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). La fenotipificación se llevó a cabo en un sistema experimental diseñado con un gradiente de humedad generado por una solución higroscópica y un hidroestimulante (Figura 12 [detallado en la sección 7.2]). En la fenotipificación de los DTMA la respuesta hidrotópica fue clasificada en base al ángulo de curvatura en la siguiente manera: *Débil* (alejándose de la fuente de humedad, ángulos entre 10 y 39° [Figura 13 A]), *Robusta* (crecimiento en dirección a la fuente de humedad, ángulos $\geq 40^\circ$ [Figura 13 B]), o *Gravitrópica* (crecimiento en dirección al vector de la gravedad, ángulos $\leq 9^\circ$). La Tabla 3 muestra la respuesta hidrónica de cada uno de los 283 híbridos utilizados.

A partir de estos resultados se realizó un experimento en campo para evaluar la producción de grano y biomasa radicular bajo tres diferentes condiciones de riego (sequía, riego parcial [mitad de riego con respecto al normal] y riego normal) como se observa en la figura 14. Los híbridos robustos mostraron mayor producción de granos y mayor biomasa radicular en los tratamientos de sequía y riego parcial. En contraste, los híbridos débiles fueron más susceptibles a condiciones de sequía, es decir; presentaron una menor producción de granos y menor biomasa radicular en comparación con híbridos clasificados como robustos (Figura 15). Estos resultados nos indican la importancia de la respuesta hidrotópica ante condiciones de sequía, posiblemente el sistema radicular de los híbridos robustos es más eficiente en la búsqueda y absorción de agua, no así en híbridos débiles. De igual manera en otros parámetros evaluados como temperatura foliar, intervalo de floración masculina y femenina, y biomasa de raíces laterales, los híbridos robustos mostraron mejores resultados que los híbridos clasificados como débiles, dichos parámetros pudieron haberles conferido mayores ventajas adaptativas que contribuyeron a tolerar la sequía (Eapen et al., 2017).

Los resultados obtenidos a partir de la fenotipificación de la respuesta hidrotópica de los híbridos DTMA fueron utilizados para el análisis de asociación del genoma completo (GWAS)

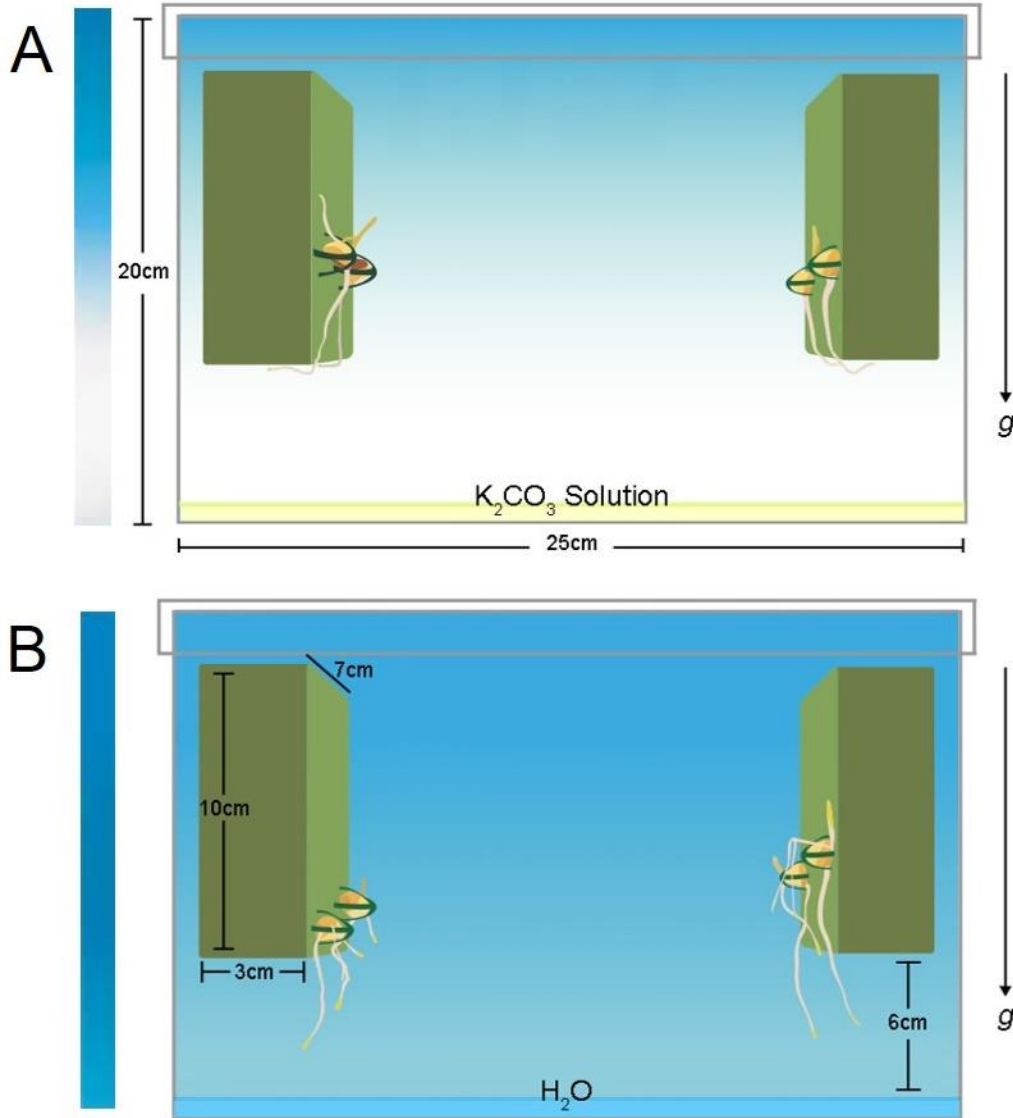


Figura 12. Esquema del sistema de escrutinio para analizar la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz. A) Sistema de escrutinio con carbonato de potasio para generar el gradiente de humedad en el cual se espera que las raíces crezcan a al hidroestimulante (espuma floral, representada con bloques verdes) y B) control del sistema de escrutinio, en el cual se coloca agua en el fondo de la caja. La flecha indica la dirección del vector de gravedad y la barra degradada de azul a blanco ejemplifica el gradiente de humedad de mayor a menor (modificado de Eapen et al., 2015).

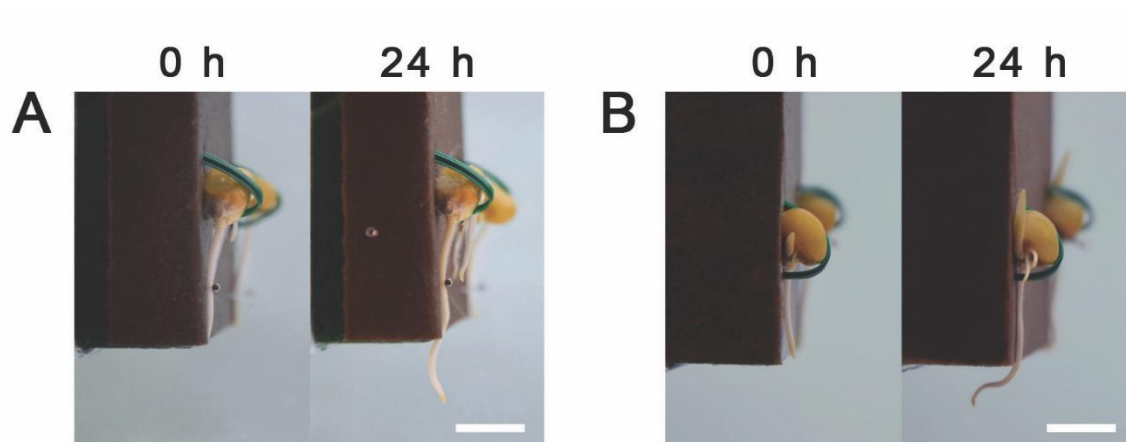


Figura 13. Plántulas de maíz con respuesta hidrotropica débil (A) y robusta (B) de los híbridos 12 y 285 respectivamente en el sistema de escrutinio para la respuesta hidrotropica al tiempo 0 y 24 horas de exposición al gradiente de humedad. La barra corresponde a 1cm.

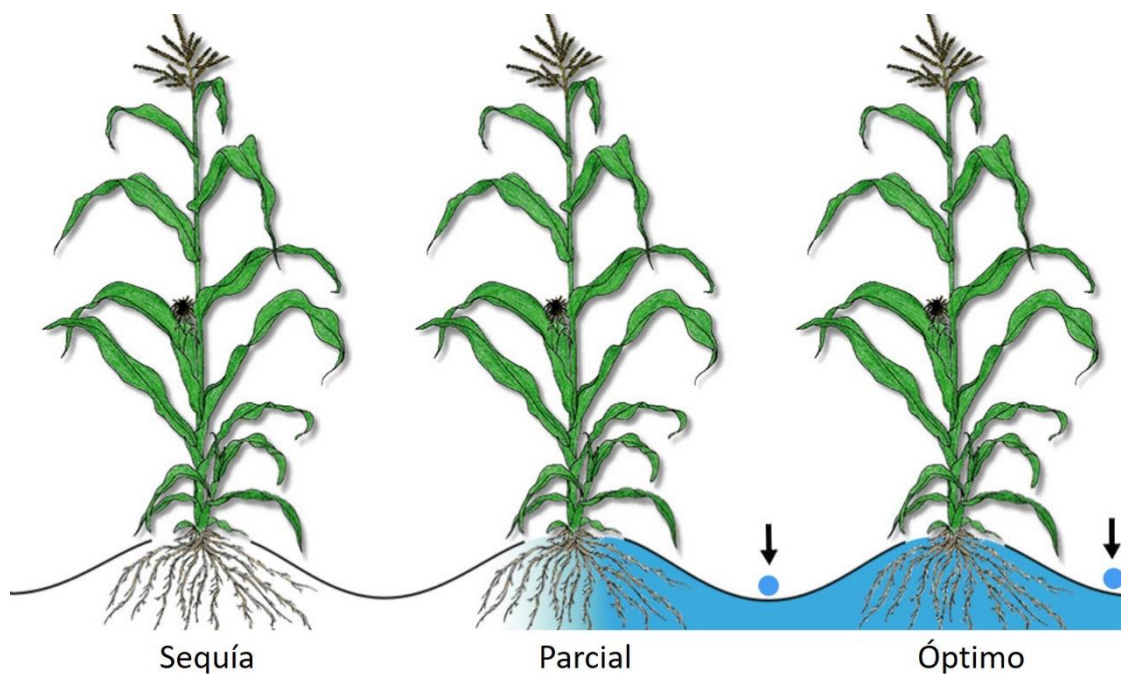


Figura 14. Esquema de los tratamientos de riego utilizados en el experimento en campo para evaluar el efecto de la respuesta hidrotropica. Para el tratamiento de sequía se suspendió el riego 46 días después de la germinación. En el tratamiento de riego parcial sólo se irrigó un surco durante 4 horas, y en el tratamiento de riego óptimo se irrigó a ambos lados del surco durante 8 horas (como normalmente lo hacen los agricultores). Las flechas negras y círculos azules muestran la posición de las mangueras. Se utilizó un sistema de riego por goteo (modificada de Eapen et al., 2017).

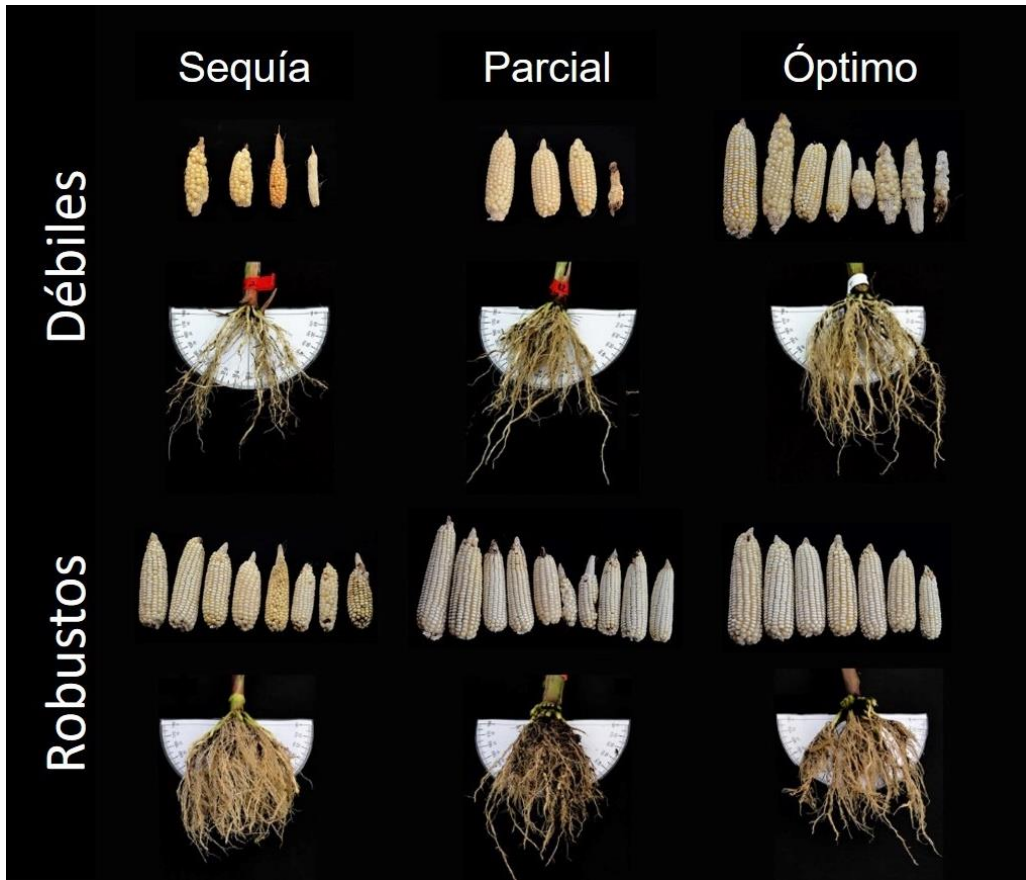


Figura 15. Comparación de producción de granos y biomasa radicular en híbridos débiles y robustos. En los tres tratamientos de riego se observó una mayor producción de biomasa radicular en híbridos robustos en comparación con híbridos débiles, de igual manera la producción de granos fue mayor en híbridos robustos que en débiles (modificada de Eapen et al., 2017).

3.5 GWAS.

Un estudio de asociación del genoma completo (*Genome-Wide Association Studies*, o GWAS) es un análisis de variación genética realizado en todo el genoma de un grupo de organismos, con el objetivo de identificar dicha variación a través de un rasgo observable en la población (un fenotipo). Estos análisis se han realizado en humanos, plantas y animales, para ello es necesario la identificación de SNPs (*Single Nucleotide Polimorfism* o polimorfismos de nucleótidos simples) en el genoma de los individuos. Este tipo de análisis se realiza con una gran cantidad de individuos de una población (más de 200), con el fin de poder comparar los resultados del análisis entre individuos con y sin el rasgo de interés. De esta manera al comparar los SNPs en los genomas de todos los individuos analizados es posible ligar SNPs a rasgos observables y cuantificables (Brachi et al., 2011; Korte & Farlow, 2013). Por ejemplo: si un cambio de base en el genoma es recurrente en individuos con el rasgo de interés y no aparece en individuos sin dicho rasgo podemos suponer que este cambio a nivel génico está asociado o involucrado con el rasgo de interés.

Los análisis de GWAS se realizan a partir de tres principales componentes, 1) identificación de la variabilidad genética, que pueden ser SNPs o microsatélites. Por ejemplo, los SNPs son identificados a través de GBS (Genotipificación por secuenciación [*Genotyping By Sequencing*]) mediante cambios contrastantes con el genoma de referencia. Para ser considerado un SNP, el cambio debe estar presente por lo menos en el 5% de la población. 2) La selección del fenotipo. GWAS requiere de individuos con rasgos contrastantes, es decir, aquellos con el fenotipo o rasgo de interés y otros que no lo poseen, para así identificar diferencias génicas (SNPs) entre ambos grupos de individuos. Además los rasgos contrastantes deben ser cuantificables bajo una fenotipificación lo más exacta posible. Y, 3) análisis estadísticos, los cuales se realizan con ayuda de Softwares bioinformáticos como GoldenHelix o TASSEL que implementan diversos modelos estadísticos que mejoran la calidad de los resultados (Brachi et al., 2011; Visscher et al., 2012; Korte & Farlow, 2013).

Los estudios de asociación del genoma completo han tenido un gran auge en los últimos años ya que permiten analizar rasgos poco comunes en cualquier población. Además han tenido un gran impacto en la medicina moderna al tratar de asociar variaciones genéticas a enfermedades en humanos, como por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades cardíacas, neurodegenerativas o desordenes psiquiátricos (Visscher et al., 2012; The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007).

Por su parte en plantas se han realizado GWAS en diversas especies como frijol, tomate, trigo, arroz y maíz para el estudio genético de rasgos complejos. En el caso del maíz se han analizado diversos rasgos fenotípicos como aquellos relacionados a la altura en líneas híbridas de origen chino que es considerada una variedad enana (Weng et al., 2011). En dicho análisis se asociaron 204 SNPs en los diez cromosomas del maíz. Identificaron genes relacionados a giberelinas, auxinas, así como algunos involucrados en diversas vías epigenéticas que participan en conjunto para expresar el fenotipo “*enano*” de los híbridos de maíz chino. Otros análisis incluyen la identificación de genes asociados a la arquitectura de hojas o producción de metabolitos secundarios (principalmente aceites) en los cuales los resultados asocian claramente a un sólo SNP o diversos genes dentro de un cromosoma (Tian et al., 2011; Wen et al., 2014).

Entre los análisis tipo GWAS, se han realizado estudios para identificar los genes relacionados a estrés por sequía. En el ancestro del trigo *Aegilops tauschii* se identificaron varios genes candidatos que están rodeados (flanqueados) por genes que previamente habían sido identificados como responsables de tolerancia a sequía, por lo que en este análisis se destacan regiones importantes que confieren esta tolerancia en *A. tauschii* (Qin et al., 2016). Los genes que se identificaron en este análisis fueron agrupados en tres categorías de acuerdo al tipo de proteína codificada; (1) enzimas, que se asociaron a la activación de diversas rutas bioquímicas que se activan bajo condiciones de sequía; (2) almacenamiento de proteínas, que podrían ser sintetizadas en respuesta al estrés; y (3) proteínas inducidas por sequía que probablemente juegan un papel importante en la tolerancia al estrés (Qin et al., 2016).

En maíz se han realizado análisis tipo GWAS implementando diferentes métodos de fenotipificación que han permitido la identificación de diversos componentes que participan en procesos moleculares de tolerancia a sequía. De igual manera se han analizado diferentes rasgos que en conjunto podrían conferir tolerancia a sequía. Por ejemplo; Xue et al. (2013) analizaron nueve rasgos agronómicos bajo condiciones de estrés hídrico, dichos rasgos fueron seleccionados de acuerdo su relación con la tolerancia a sequía y producción de granos, por ejemplo; Intervalo de floración, altura de la planta, número de mazorcas y producción de granos. Para cada uno de los nueve rasgos analizados se realizó un análisis tipo GWAS, de los cuales se identificaron genes comunes en todos ellos, de estos destacó el gen *NAC-DOMAIN CONTAINING PROTEIN* debido a que fue identificado en 4 de 9 rasgos agronómicos y dos genes con la misma función (*TYROSIN-KINASE*) identificados en 3 de los 9 rasgos analizados. De estos genes asociados se enfatiza *NAC-DOMAIN* debido a que anteriormente se había identificado como un gen de respuesta ante la falta de agua. Además de los genes antes mencionados se identificaron diversos genes que participan de manera puntual en cada uno de los rasgos estudiados.

Otros análisis tipo GWAS han localizado SNPs en QTLs que con anterioridad se habían identificado como responsables de la tolerancia a sequía, lo cual ha contribuido a reforzar la importancia de los puntos donde se acumulan genes que contribuyen a la resistencia a este estrés. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Wang et al. (2016) donde se identificaron nueve regiones co-localizadas en regiones consenso (*hotspots*) responsables de la tolerancia a sequía en maíz. Entre los genes que se identificaron se encuentra uno que codifica un motivo estructural proteico de dedos de zinc, que había sido relacionado a estrés abiótico en arroz, además identificaron otro gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que de igual manera había sido identificada como importante en la respuesta a estrés. En este artículo subrayan la importancia de identificar genes que contribuyen en menor medida a un fenotipo, como algunos de los genes que ellos identificaron en las zonas que con antelación se habían identificado como importantes para la tolerancia a sequía.

En otros estudios se han identificado genes responsables de conferir tolerancia a sequía en otras especies de plantas (homólogos en maíz), como es el caso de los genes DREB. En un análisis con más de 200 líneas de maíz se identificaron 18 factores de transcripción tipo *DREB* como importantes en la regulación del estrés por sequía (asociados a la tolerancia a sequía de trigo), además se identificó específicamente al gen *ZmDREB2.7* como un alelo importante para el potencial mejoramiento genético de cultivos en la tolerancia a sequía (Liu et al., 2013).

En el estudio de sistema radicular se han llevado a cabo análisis de tipo GWAS para asociar regiones genómicas a rasgos estructurales y funcionales de la raíz bajo estrés por sequía. Los rasgos estructurales que se han analizado son profundidad de raíces, peso seco del sistema radicular, longitud de raíces, volumen, densidad y área superficial de raíces, mientras que para los rasgos funcionales se han analizado la tasa de transpiración, uso de agua durante el periodo de floración y producción de granos. Estos análisis arrojaron regiones en común y genes que podrían estar participando en el desarrollo del sistema radicular y en rasgos funcionales que en conjunto otorgan beneficios a la planta ante la falta de agua (Zaidi et al., 2016).

En general todos los reportes resaltan la importancia de realizar este tipo de análisis para la identificación de SNPs y genes o regiones relacionadas a la resistencia a sequía u otros factores de importancia agronómica ya que podrían ser utilizadas para el mejoramiento de cultivos agrícolas a través de selección asistida por marcadores (*Marker Assisted Selection*).

3.5.1 Mejoramiento de cultivos agrícolas a través de GWAS.

La producción agrícola es la responsable del abastecimiento no solo de alimentos, sino de otros componentes principales en la industria como fibras, biocombustibles, ingredientes activos para la elaboración fármacos y materias primas para una amplia gama de productos de origen vegetal. La importancia de trabajar en el mejoramiento de cultivos agrícolas radica en el aumento de la población humana y en la disminución de áreas destinadas al crecimiento de los mismos, es por ello que diversos centros de investigación, empresas privadas y organizaciones sin fines de lucro se dedican a la generación de variedades mejoradas. Un ejemplo de ello es CIMMYT, un centro de investigación internacional sin fines de lucro, cuyo principal objetivo es incrementar de manera sustentable la productividad de cultivos de maíz y trigo mediante el desarrollo, difusión y aplicación de tecnologías avanzadas en países en vías de desarrollo a través del suministro de semillas mejoradas, capacitación e implementación de nuevas técnicas de cultivo. Aunado al mejoramiento de cultivos (de maíz y trigo), otro de los objetivos de CIMMYT es garantizar la seguridad alimentaria global ante una contingencia alimenticia y ante el creciente aumento en la población humana (CIMMYT, 2017). Además de trabajar en el incremento de producción de granos, también es necesario trabajar activamente en la generación de plantas con la capacidad de adaptarse a las diferentes zonas geográficas donde sean requeridas y a condiciones ambientales desfavorables.

El objetivo del mejoramiento cultivos es alcanzar una alta tasa de producción de frutos o granos y/o aumentar la biomasa sin dejar a un lado la calidad de los mismos. Para lograr lo anterior se han desarrollado diferentes tecnologías con las cuales el mejoramiento de cultivos ha crecido a pasos agigantados, similar a lo ocurrido en la mitad del siglo pasado durante la llamada Revolución Verde (*Green Revolution*) [Den Herder et al., 2010].

En el mejoramiento tradicional de cultivos se invierten por lo menos 15 años de trabajo para poder obtener una población con las características deseadas, la cual se genera a través de la selección de rasgos fenotípicos y posteriores cruzas; es decir, se cruza lo mejor con lo mejor hasta obtener un *súper* híbrido. Con el desarrollo de nuevas técnicas aplicadas al mejoramiento de cultivos es posible reducir a la mitad el tiempo de trabajo necesario para la generación de *súper* híbridos. Una de las técnicas desarrolladas recientemente es el *mejoramiento asistido por marcadores* en cual se invierten aproximadamente de 5 a 7 años de trabajo para la generación de *súper* híbridos (Collard & Mackill., 2008). Esta es una técnica no invasiva, es decir, no se introducen secuencias de otros organismos y no sustituye a las cruzas tradicionales, simplemente las hace dirigidas.

La gran mayoría de los estudios GWAS que se llevan a cabo en la actualidad tienen por objetivo aportar marcadores moleculares para facilitar el mejoramiento genético de cultivos de interés agrícola o comercial, de tal manera que se plantea la utilización de sus resultados a futuro con el fin de seleccionar plantas con las mejores características fenotípicas o cualidades como incremento en la producción de frutos/granos o tolerancia a sequía.

Como se observó en la evaluación de la respuesta hidrotrópica en campo, este rasgo confiere una mayor producción de biomasa radicular y de granos en individuos que presentaron una respuesta hidrotrópica robusta (es decir, mayor crecimiento hacia fuentes de agua, [Figura 15]), por lo cual consideramos importante realizar selección asistida por marcadores moleculares que puedan contribuir a la respuesta hidrotrópica del sistema radicular de maíz, ya que consideramos que el sistema radicular juega un papel preponderante en la evasión a sequía. Den Herder et al. (2010) consideran que la próxima revolución verde se centrará en el desarrollo del sistema radicular, hecho que al parecer puede convertirse en una realidad, debido a que el estudio de este órgano cada día cobra mayor relevancia.

4. Justificación

El estudio del sistema radicular en maíz es primordial debido a que este órgano juega un papel esencial en la supervivencia de la planta ante la falta de agua, además de tener una aplicación potencial en el mejoramiento genético de cultivos. Aunado a esto se considera que es importante centrar las bases genéticas de procesos adaptativos importantes en la tolerancia a sequía como lo es la respuesta hidrotópica de raíces. Además los estudios de asociación del genoma completo ayudarán a enriquecer el conocimiento de la diversidad génica y facilitan el mejoramiento de cultivos de interés agrícola como el maíz a través de la selección asistida por marcadores.

5. Hipótesis

Con la fenotipificación de la respuesta hidrotópica y los SNPs identificados de los híbridos de maíz DTMA será posible reconocer los genes asociados a la respuesta hidrotópica mediante estudios de asociación del genoma completo (GWAS).

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Identificar y determinar la expresión de un gen (o genes) que se asocien a la respuesta hidrotónica mediante estudios de asociación del genoma completo o GWAS.

6.2 Objetivos específicos

- Realizar GWAS utilizando la variación de la respuesta hidrotónica de raíces en la población de 231 híbridos de maíz DTMA proporcionados por CIMMYT.
- Seleccionar los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotónica en raíces de maíz en base a la variación que se encuentra en los alelos robustos y débiles de la respuesta hidrotónica.
- Realizar PCR tiempo final de los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotónica para determinar si se encuentran diferencialmente expresados en híbridos con respuesta hidrotónica débil y robusta.

7. Materiales y métodos

7.1 Material vegetal.

Para realizar este análisis se utilizó una población de 231 híbridos de maíz DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa), los cuales fueron obtenidos a partir de cruces tradicionales de diversos híbridos de maíz mejorados en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, ubicado en Texcoco, Estado de México), este material fue proporcionado por el banco de germoplasma de la misma institución a través del proyecto MasAgro (Modernización Sustentable de la Agricultura Tradicional, SAGARPA). Dicho material vegetal fue utilizado debido a que se cuenta con las secuencias de cada individuo de la población, asimismo, CIMMYT ha identificado aproximadamente un millón de SNPs para toda la población de estos híbridos.

7.2 Fenotipificación y clasificación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz.

En nuestro equipo de trabajo se fenotipificó la respuesta hidrotrópica de los 231 híbridos de maíz en el sistema de escrutinio que se muestra en el esquema de la figura 4. Dicho sistema consta de una caja de acrílico cerrada (20 x 25 x 10 cm), en la cual se colocan dos bloques de espuma floral que funcionan como hidroestimulantes (este material tiene la capacidad de absorber hasta 40 veces su peso en agua [marca Osisis]) a los cuales se anclan las plántulas de maíz, y en el fondo de la caja se deposita una solución de carbonato de potasio a densidad 1.500 g/cm^3 , que actúa como agente higroscópico.

Se utilizaron 10 plántulas de cada híbrido de maíz de 3 ó 4 días de germinación para determinar su respuesta hidrotrópica, dichas plántulas fueron seleccionadas

de acuerdo a la longitud de su raíz (de 2 a 3 cm). Estas se sujetaron con alfileres a la espuma floral (saturada de agua) sin dañar la plántula, se colocaron de tal manera que las puntas de las raíces quedaran justo en el borde del hidroestimulante como se muestra en la figura 13 a las 0 horas. Posteriormente los bloques de espuma floral se colocaron en los costados de la caja (sujetas con cajas petri cuadradas) a 6 cm del fondo de la misma. Finalmente las cajas de acrílico fueron puestas en charolas de peltre con agua y se colocaron en un cuarto de crecimiento a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en condiciones de oscuridad.

Para obtener el ángulo de curvatura se tomaron fotografías de cada una de las plántulas analizadas en el sistema experimental, al tiempo 0 y 24 horas después del estímulo hidrotrópico, estas imágenes nos permitieron medir el ángulo formado por la raíz al dirigirse al hidroestimulante. Lo anterior se llevó a cabo con ayuda del programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Este *software* tiene diferentes herramientas que nos permiten medir de manera sencilla (entre otros parámetros) el ángulo formado por la raíz durante la hidroestimulación.

La respuesta hidrotrópica de los híbridos de maíz DTMA se clasificó de acuerdo al ángulo de curvatura de la raíz primaria empleando el siguiente criterio (Tabla 2); aquellas plántulas que presentaron ángulos de 10 a 39° fueron clasificadas como débiles, las que presentaron un ángulo igual o mayor a 40° se clasificaron como robustas mientras que las plántulas deshidratadas o sin crecimiento fueron consideradas como individuos sin respuesta, ya que algunos híbridos crecieron hacia el vector de la gravedad esta respuesta también fue tomada en cuenta (como respuesta gravitrópica). Inicialmente la fenotipificación incluyó 281 líneas híbridas de maíz, de las cuales 52 presentaron respuestas gravitrópicas para la mayoría de los individuos analizados (6 de 10), por lo cual los individuos gravitrópicos no fueron utilizados para realizar el análisis tipo GWAS.

Los resultados de la fenotipificación y medición de los ángulos se observan en la Tabla 3, la cual muestra el número del DTMA, el ángulo de curvatura y el tipo de respuesta hidrotrópica general (débil o robusta). Estos datos, además de la

desviación estándar y SNPs fueron los que se ingresaron en el programa TASSEL para llevar a cabo el análisis de asociación del genoma completo.

De los 231 híbridos con respuesta hidrotópica 191 (83%) mostraron una respuesta débil, mientras que 40 mostraron una respuesta robusta (17%). Los híbridos con respuesta hidrotópica débil presentaron mayoritariamente ángulos de entre 10 y 38°, es decir presentaron una mayor variabilidad de ángulos en comparación con híbridos robustos cuyo ángulo de curvatura osciló en un rango menor (entre 40 y 50°). Es de importancia destacar la variabilidad fenotípica en la población para la realización de los análisis tipo GWAS, ya que de estas depende la identificación de SNPs contrastantes en las poblaciones de interés. Recordemos que el análisis tipo GWAS comparan las secuencias génicas e identifican los cambios en las secuencias de los individuos con y sin el rasgo de interés (Brachi et al., 2011).

Tabla 2. Clasificación de la respuesta hidrotópica de acuerdo al ángulo de curvatura.

Ángulo	Clasificación
De 10° a 39°	Débil
≥ 40°	Robusto
De 0° a 9°	Gravitrópico

Tabla 3. Resultados obtenidos de la fenotipificación de los híbridos de maíz DTMA. Estos resultados fueron utilizados para realizar el análisis GWAS, incluye el número de DTMA, promedio del ángulo generado por la curvatura hidrotrópica obtenido de 10 individuos y el valor hidrotrópico general (donde 20 es muy hidrotrópico y 0 muy débil/sin respuesta hidrotrópica).

DTMA	Promedio del ángulo	Respuesta hidrotrópica	Desviación estándar
1	45.96	R	17.84
2	18.80	D	11.02
3	23.90	D	28.28
6	31.97	D	11.06
7	10.80	D	12.52
8	26.83	D	22.93
9	28.53	D	22.69
11	31.90	D	23.74
12	15.80	D	6.56
13	23.70	D	27.71
14	36.01	D	15.21
15	23.26	D	20.92
24	26.60	D	20.91
25	18.50	D	39.93
27	30.70	D	20.95
30	21.20	D	7.89
34	37.50	D	23.28

35	17.30	D	30.66
38	14.30	D	4.73
39	25.47	D	16.79
40	13.20	D	5.18
41	36.17	D	19.87
42	11.70	D	12.12
43	31.20	D	12.12
44	13.90	D	21.81
45	27.00	D	35.36
47	34.40	D	18.27
48	50.17	R	19.91
49	21.30	D	14.88
50	20.50	D	27.45
52	28.10	D	27.35
54	28.20	D	23.61
55	33.10	D	18.60
56	29.30	D	23.60
57	44.57	R	29.49
58	40.24	R	23.99
59	25.97	D	23.99
60	36.70	D	19.15
61	50.40	R	27.14
62	52.60	R	20.05
63	26.40	D	25.60
64	12.20	D	13.74
66	22.60	D	17.96
67	27.29	D	17.33
68	35.10	D	27.01

70	47.95	R	14.52
71	21.81	D	16.98
72	31.05	D	20.48
73	39.90	D	26.24
74	19.00	D	17.13
75	13.10	D	19.21
76	77.69	R	15.52
77	27.50	D	23.71
81	36.50	D	6.82
82	36.00	D	20.94
83	31.80	D	17.53
86	24.60	D	14.35
87	21.08	D	16.88
90	32.00	D	31.84
91	17.00	D	7.55
92	20.60	D	28.64
93	22.90	D	14.72
95	25.30	D	18.64
96	14.50	D	12.41
97	8.00	D	15.65
98	19.00	D	12.19
99	14.90	D	7.37
100	46.30	R	11.99
101	11.90	D	9.63
102	22.70	D	4.83
103	27.20	D	20.63
104	21.00	D	11.17
105	15.40	D	7.07

106	9.70	D	7.13
107	11.30	D	8.23
108	41.82	R	15.91
110	45.31	R	13.58
111	23.20	D	12.82
112	22.70	D	17.55
114	8.40	D	8.29
115	32.50	D	28.57
117	19.80	D	20.13
118	18.20	D	20.92
121	16.20	D	9.89
122	28.70	D	15.17
123	45.52	R	24.82
124	23.80	D	26.41
126	27.90	D	13.77
127	48.86	R	24.09
128	26.20	D	27.05
129	31.90	D	9.69
130	26.80	D	13.04
131	30.20	D	21.33
132	28.70	D	15.52
134	22.60	D	11.35
135	26.60	D	15.62
137	26.10	D	11.68
138	24.80	D	22.86
139	7.40	D	13.12
140	22.30	D	17.05
141	26.70	D	24.95

142	23.00	D	10.59
143	11.30	D	6.27
144	10.50	D	4.43
145	37.80	D	32.39
148	29.30	D	26.90
150	30.10	D	11.17
151	19.90	D	13.67
152	23.51	D	11.81
153	19.10	D	7.64
154	13.50	D	12.38
155	22.29	D	17.12
157	49.25	R	17.33
158	18.00	D	18.13
160	41.44	R	16.79
161	9.20	D	19.44
162	47.80	R	25.04
163	67.43	R	17.94
164	32.60	D	26.19
165	32.70	D	23.91
166	20.50	D	14.00
167	16.00	D	7.34
170	9.10	D	13.65
171	8.60	D	14.04
173	22.95	D	12.87
174	26.00	D	27.10
175	16.20	D	12.10
176	35.00	D	30.03
177	13.80	D	14.97

178	38.30	D	24.19
179	68.52	R	23.64
181	74.36	R	14.47
183	61.77	R	11.13
184	51.31	R	23.52
185	8.50	D	10.98
186	26.08	D	11.61
187	13.20	D	12.38
188	35.00	D	20.09
189	12.20	D	20.62
190	19.40	D	5.65
191	34.04	D	27.05
192	13.30	D	17.34
193	12.00	D	9.35
194	9.60	D	2.00
195	41.40	R	19.92
196	9.80	D	20.10
197	58.95	R	18.32
198	17.80	D	22.92
199	30.30	D	26.05
200	20.60	D	7.86
201	16.80	D	7.76
202	17.40	D	8.60
203	12.90	D	8.32
204	53.20	R	28.87
205	31.84	D	18.02
206	48.70	R	15.86
207	12.30	D	14.38

208	15.00	D	8.69
209	17.28	D	26.20
210	13.80	D	9.56
211	1.60	D	1.53
212	1.10	D	14.44
213	31.50	D	14.38
214	18.10	D	10.38
215	20.90	D	10.74
216	29.20	D	16.77
217	41.53	R	20.44
218	25.80	D	10.87
219	19.60	D	20.24
220	1.10	D	2.87
221	11.90	D	16.59
222	16.70	D	9.79
223	23.90	D	11.43
224	10.90	D	6.41
225	15.10	D	24.86
227	30.70	D	23.42
228	12.90	D	7.83
229	24.00	D	10.72
230	31.80	D	13.27
231	24.00	D	23.79
232	21.90	D	11.80
233	30.30	D	15.02
234	28.30	D	20.53
235	41.40	R	11.35
236	10.60	D	19.33

237	27.60	D	16.37
238	16.90	D	18.24
240	41.86	R	28.29
241	12.20	D	32.32
242	48.63	R	16.51
244	14.40	D	23.11
245	52.52	R	18.66
246	19.00	D	18.09
247	25.00	D	20.94
248	26.50	D	13.28
249	49.35	R	18.34
250	62.21	R	23.66
251	29.90	D	9.17
252	36.71	D	22.51
253	34.80	D	16.70
254	21.70	D	17.41
255	49.67	R	14.20
257	25.00	D	16.33
258	34.70	D	25.64
259	14.31	D	23.62
260	36.10	D	25.61
261	21.80	D	27.87
262	52.50	R	51.43
263	10.80	D	20.66
264	18.30	D	15.41
265	12.70	D	20.16
266	7.70	D	9.18
267	48.60	R	16.40

268	11.10	D	18.21
269	30.70	D	16.57
270	59.33	R	16.74
271	37.80	D	16.40
272	17.30	D	18.23
273	29.10	D	28.40
274	58.20	R	26.77
275	15.00	D	10.84
276	58.15	R	24.61
277	34.00	D	21.17
278	23.30	D	17.88
279	34.20	D	28.99
280	36.20	D	24.27
281	24.50	D	25.00
282	37.70	D	26.10
283	53.60	R	18.76
284	19.10	D	19.54
285	62.27	R	22.33

7.3 GWAS para para la respuesta hidrotrópica de maíz.

El análisis de asociación del genoma completo se realizó con ayuda del programa TASSEL 5.0 (<http://www.maizegenetics.net/tassel>), el cual fue diseñado para maíz específicamente y de uso libre. El análisis tipo GWAS que realiza este programa emplea dos modelos lineales estadísticos; un Modelo Lineal General (MLG) y un Modelo Lineal Mixto (MLM). Para llevar a cabo el MLG es necesario introducir a TASSEL las secuencias génicas (que incluye los SNPs), el fenotipo y la estructura de la población de acuerdo a su secuencia. Por su parte el MLM toma en cuenta la estructura de la población y requiere de un análisis tipo kinship con el fin de determinar las relaciones familiares (parentesco) entre las muestras a analizar, lo cual ayuda a disminuir los falsos positivos. Tanto el análisis de estructura de la población como el tipo kinship los lleva a cabo TASSEL previo a la realización de la asociación de los SNPs y el fenotipo (Bradbury et al., 2007).

Adicionalmente este programa nos permite realizar filtros para eliminar falsos positivos, datos erróneos de secuenciación y filtrar SNPs de acuerdo al valor de la frecuencia del alelo menos común (*Minor Allele Frequency*, MAF), el cual hace referencia a un locus/SNP con una baja probabilidad o frecuencia de aparición, esto para discernir entre posibles mutaciones y SNPs. De igual manera permite el filtrado de acuerdo a la estructura de la población, por lo que se optimiza la realización de GWAS y se afinan los resultados (Bradbury et al., 2007).

Previamente CIMMYT identificó cerca de un millón de SNPs en la población de híbridos DTMA, a partir de los cuales se aplicaron filtros para eliminar falsos positivos, SNPs con lecturas de baja confiabilidad (como resultado de la secuenciación) o aquellos SNPs que no se encontraran en una parte significativa de la población con respecto al total de la misma. Estos filtros fueron aplicados de acuerdo al siguiente criterio; que aquellos cambios en la secuencia considerados como SNPs se encontraran en una parte significativa de la población (de acuerdo con el valor MAF) y que los marcadores tuvieran una posición física en el cromosoma (es decir, que se identificara la posición exacta del SNP en el

cromosoma). Después de la aplicación de los filtros se redujo el total de SNPs de aproximadamente 1 millón a más de 400 mil (40% del total inicial de SNPs). Una vez aplicados los filtros se realizó el análisis tipo GWAS. A partir de los 400 mil SNPs y de los datos de secuenciación el programa TASSEL llevó a cabo análisis de estructura de la población y el análisis de relaciones familiares. La asociación final de los SNPs y el fenotipo se llevó a cabo combinando el MLG y el MLM implementando la siguiente ecuación:

$$y = X\beta + Zu + e$$

Donde y es el fenotipo (curvatura hidrotópica); X es el genotipo (SNPs); β es el análisis de estructura de la población; Z corresponde al análisis de relaciones familiares (tipo kinship); u es el vector desconocido de los efectos genéticos aditivos y e hace referencia a la desviación estándar del rasgo fenotípico observado en los individuos de la población. Como se mencionó anteriormente, en la Tabla 3 se muestran los resultados de la fenotipificación de la respuesta hidrotópica de híbridos de maíz DTMA que se utilizaron para este análisis, dicha tabla muestra su ángulo de curvatura, desviación estándar de la misma y tipo de respuesta hidrotópica (D para débil o R para robusta), mismos que fueron ingresados en el programa TASSEL para realizar el GWAS.

Una vez ejecutado el GWAS se realizó una prueba/corrección de Bonferroni en la cual ahora se filtran los resultados. Esta prueba es similar a la aplicación del primer filtro, en este paso fueron seleccionados sólo aquellos resultados que hayan sido significativamente altos (de los SNPs ya asociados a la respuesta hidrotópica), y se eliminaron nuevamente posibles falsos positivos, haciendo el análisis aún más robusto y confiable. De los 400 mil SNPs utilizados para realizar GWAS, TASSEL asoció 23 mil a la respuesta hidrotópica de la población de 231 híbridos de maíz DTMA.

Se realizaron dos análisis tipo GWAS para la respuesta hidrotópica, en el primero se incluyó la respuesta a la gravedad (281 híbridos) y en el segundo ésta fue eliminada (Se eliminaron 52 híbridos con respuesta gravitópica, quedando un total

de 231 híbridos). De ambos análisis destacamos a continuación los resultados del segundo análisis (231 híbridos con respuesta hidrotópica débil o robusta).

7.4 Extracción de RNA.

Se extrajo RNA de aproximadamente 150 mg de raíces de plántulas de maíz (de 2 a 4 raíces) de los híbridos DTMA 144 y 283 (débil y robusto, respectivamente). Se colectó tejido a las 0 horas (directamente de la charola de germinación) y 6 horas después de ser sometidas al sistema de escrutinio de la respuesta hidrotópica, con K_2CO_3 (con gradiente de potencial hídrico) y en el sistema control (sin gradiente de potencial hídrico). El tejido colectado fue congelado inmediatamente con nitrógeno líquido y posteriormente preservado a $-70^\circ C$ hasta su utilización. El tejido congelado fue molido hasta obtener un polvo fino utilizando un mortero manual motorizado (Pellet pestle cordless motor, Kimble Kontes, USA.) y nitrógeno líquido. La extracción se realizó con TRIzol (TRIzol® Reagent by Life Technologies, USA.), tomando 400 μ l del mismo como volumen inicial, posteriormente se siguieron las indicaciones del fabricante para continuar con la extracción. Al finalizar la extracción se midió el RNA total utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA.), posteriormente se incorporó DNasa (Promega, USA.) 2 μ l por cada 40 μ g de RNA total e inhibidor de RNasa Ribolock (Thermo Fisher Scientific, USA), en la misma proporción, luego se incubó durante 30 min a $37^\circ C$ y posteriormente se inactivó la enzima incubando las muestras a $65^\circ C$ durante 15 min. Finalmente se realizaron diluciones para que todas las muestras quedaran a la misma concentración y proseguir a realizar los PCRs (*Polymerase Chain Reaction*, PCR por sus siglas en inglés). En la Tabla 4 se muestra el rendimiento (concentración) para cada uno de los tratamientos en cada extracción.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para determinar la integridad del RNA extraído. En la figura 16 se observa uno de los geles resultado de la extracción de RNA en el cual se observan principalmente dos bandas que corresponden a los

RNA 28S y 18S, podemos resaltar que el RNA se encuentra íntegro y no muestra degradación en ninguna de las muestras.

Tabla 4. Concentración obtenida para cada una de las muestra en las dos extracciones de RNA.

	Tratamiento	Primera extracción (µg)	Segunda extracción (µg)
144 Débil	0 horas	15.460	20.431
	6 horas H ₂ O	30.320	14.940
	6 horas K ₂ CO ₃	21.319	27.918
283 Robusto	0 horas	16.682	4.936
	6 horas H ₂ O	12.289	25.002
	6 horas K ₂ CO ₃	24.323	54.176

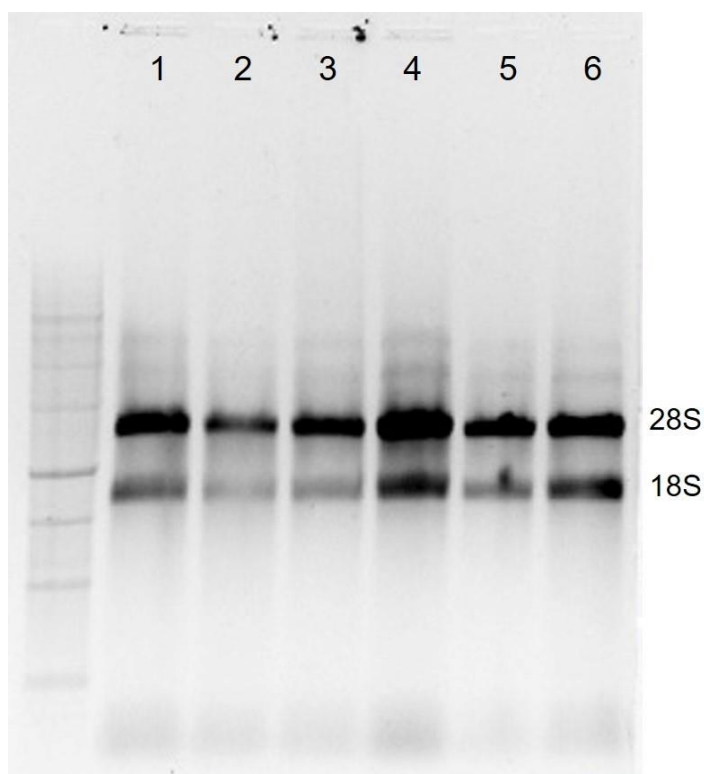


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) para mostrar la integridad del RNA extraído de raíces, las muestras se encuentran en el siguiente orden: 1) Débil 0 horas, 2) Débil 6 horas H₂O, 3) Débil 6 horas K₂CO₃, 4) Robusto 0 horas, 5) Robusto 6 horas H₂O y 6) Robusto 6 horas K₂CO₃.

7.5 Selección del gen de referencia.

Para este análisis se utilizó como gen de expresión constitutiva la Folil poliglutamato sintasa (FPGS), esta enzima participa en la síntesis de lignina, la cual es requerida en la pared celular de todas las células vegetales (Li et al., 2015). El gen que codifica esta enzima es uno de los mejores candidatos como gen de referencia para RT-PCRs en maíz. Este gen fue elegido debido a que los transcritos “clásicos” utilizados ampliamente como marcadores de expresión constitutiva (actina, tubulina y el rRNA 18S), no se expresan de manera estable en maíz (Manoli et al., 2012). Esta enzima se seleccionó de un ranking de 10 genes en base a su expresión en raíz y su ausencia de “splicing” alternativo. Adicionalmente al gen *FPGS*, también se encontraban otros genes de expresión constitutiva: una proteína acarreadora de ubiquitina, una cullina y una proteína de unión a RNA rica en glicina, sin embargo las anteriores presentaban variantes de “splicing”, por lo cual no se utilizaron.

7.6 Diseño de cebadores o “primers”.

Debido a que las bases de datos de maíz no indican el inicio y el final de intrones o exones en las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos, se utilizó el programa *SnapGen Viewer* (<http://www.snapgene.com/products/snapgeneviewer/>) que nos permite visualizar el gen y nos ofrece una vista de simple de la secuencia de nucleótidos, así como de los 6 posibles marcos de lectura, lo cual fue tomado como referencia para realizar un mapa e identificar los intrones y exones de acuerdo a la secuencia de aminoácidos. Adicionalmente se utilizó la página The *GENSCAN Web Server* (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) con la cual, a partir de una secuencia nucleotídica se predice el inicio y termino de intrones que en conjunto con las secuencias de las bases de datos se generaron los mapas que nos permitieron diseñar los “primers”.

Una vez que se definieron los intrones y exones, los “primers” se diseñaron en base a las siguientes reglas; T_m de aproximadamente 60°C, longitud superior a 20

nucleótidos, rico contenido de GC, temperaturas de fusión similar en “primers” usados en la misma reacción (no más de 3°C de diferencia), y que la parte final del “primer” (terminal 3’) acabe en GG, CC o GC. Para incrementar la especificidad de unión de los “primers” a la cadena a amplificar, estos fueron diseñados entre el UTR-3’ y el último exón (en los casos que fue posible); y en los genes donde no se encontró UTR-3’, los “primers” fueron diseñados entre los UTR-5’ y el primer/segundo exón.

La Tabla 5 muestra las características de los “primers” que fueron diseñados para los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica. Los “primers” se diseñaron con ayuda del sitio *OligoCalc* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), que permite determinar las propiedades de los mismos (T_m de las secuencias, longitud, contenido de GC, así como su potencial formación de “hairpins”), estos oligos fueron generados en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. En la figura 17 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica, en esta figura se observa que todos los oligos amplifican las secuencias esperadas.

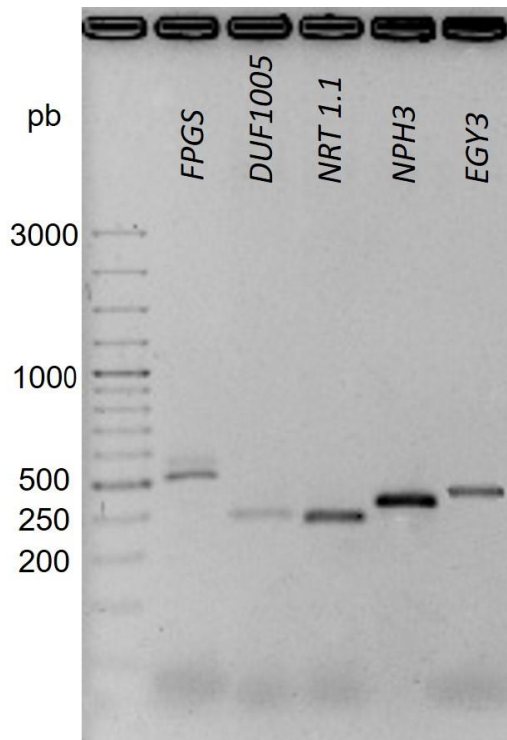


Figura 17. Imagen de electroforesis en gel de agarosa (2% p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico para los genes candidatos, así como el gen de expresión constitutiva. Los genes se encuentran en el siguiente orden; *FPGS*, *DUF1005*, *NRT1.1*, *NPH3*, y *EGY3*.

Tabla 5. Características de los “primers” utilizados para los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica.

ID del gen	Producto génico	Secuencia del <i>primer</i> (forward/reverse)	Longitud	T _m (°C)	% GC	Ubicación del primer	Tamaño del producto
GRMZM2G049349	Deficiente de gravitropismo dependiente de etileno (<i>EGY3</i>).	5'- TGT CGT TCG GCA CGT CCG TCC	21	60.2	67	Ultimo exón	402
		5'- GTA CAG TGG GTG TAG GCC CTG C	22	60.4	64	UTR3'	
GRMZM2G161483	Transportador de nitratos de afinidad dual (<i>NRT1</i>).	5'- GCC TGC TAC TTC ATC CTC TCT TCT CC	26	61.1	54	UTR5'	340
		5'- CGG TGA AGA TGG CGA TGG TGA GG	22	60.6	61	Primer exón	
GRMZM2G078210	Dominio de función desconocida (<i>DUF1005</i>).	5'- CGT CAT GGG CTC CAC TGT CGC G	22	60.4	68	UTR5'	336
		5'- CTA CAA ACC CCC GTC CCG TTC C	22	60.4	64	Segundo exón	
GRMZM2G180490	Hipocotilos no fototrópicos (<i>NPH3</i>).	5'-CAG AGA GGG GGA GGG CAT GG	20	60	70	Ultimo exón	460
		5'- GAT GCT CCT GGA CGC GGA CG	20	60.4	70	UTR3'	
GRMZM2G393334	Folilpoliglutamato sintasa (<i>FPGS</i>).	5'- GTG CTG GTT ACT GGC TCC CTG C	22	60.1	64	Ultimo exón	457
		5'- GGT GCG GCG GAC AGC GAT GC	20	60	75	UTR3'	

7.7 Síntesis de cDNA y PCR tiempo final.

Se sintetizó cDNA a partir de 1.5 µg del RNA total extraído de raíces de plántulas bajo las condiciones antes mencionadas. Con la utilización del oligo dT25 se sintetizó cDNA a partir del RNA mensajero contenido en la muestra, se utilizó como enzima transcriptasa reversa la *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV RT, Invitrogen, CA, USA). Posteriormente se corrieron PCRs para cada uno de los genes candidatos utilizando los oligos antes mencionados. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones (con excepción de la temperatura de alineamiento), el tiempo, temperatura y número de ciclos empleados para llevar a cabo dichas reacciones se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones en las cuales los PCRs amplificaron las secuencias de interés.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicio	94 °C	1min	1
Desnaturalización	94 °C	30 s	25
Alineamiento	55/60 °C	30 s	
Extensión	68 °C	40 s	
Final	72 °C	5 min	1

8. Resultados

8.1 Análisis de asociación del genoma completo o GWAS.

Se realizaron dos análisis de asociación del genoma completo con los datos de fenotipificación y genotipos de los híbridos de maíz DTMA (datos proporcionados por CIMMYT, comunicación personal). En el primer análisis se incluyeron todas las respuestas obtenidas en el sistema de escrutinio, es decir tanto gravitrópicas como hidrotropicas débiles e hidrotropicas robustas, dicho análisis fue realizado con ayuda del programa *Golden Helix* (<http://goldenhelix.com/>), sin embargo este análisis fue descartado debido a que se habían incluido individuos con respuestas gravitrópicas (se empleó la población de 283 híbridos de maíz DTMA). Los resultados del primer análisis tipo GWAS se muestran en la Tabla 7.

En el segundo análisis se utilizaron los datos de la fenotipificación eliminando los híbridos que respondieron mayormente al vector de la gravedad, quedando sólo híbridos con respuestas hidrotropicas débiles y robustas (231 híbridos). Este segundo análisis se elaboró con el programa TASSEL, que fue diseñado específicamente para realizar GWAS (y otros análisis) en maíz. En este segundo GWAS se esperaba encontrar los mismos SNPs que se habían asociado en el análisis anterior (Tabla 7), no obstante los resultados arrojados del segundo análisis fueron totalmente diferentes, a excepción de un SNP dentro del gen *UDP-Glucosil transferasa* asociada inicialmente. Sin embargo, en el segundo análisis se identificaron SNPs en los genes relacionados directamente al fototropismo, gravitropismo, organización la pared celular entre otros genes.

En la figura 18 se observa un gráfico tipo *Manhattan plot* obtenido como resultado del segundo GWAS, en dicha figura se muestran los 10 cromosomas del maíz y los SNPs asociados. Cada punto de este gráfico corresponde a un SNP, siendo los de los cromosomas 1, 3, 5 y 7 los que presentan valores más altos del logaritmo negativo del valor de P ($-\text{Log}_{10}(P\text{-value})$). Para este análisis se tomaron en cuenta los 100 SNPs con

el valor $-\text{Log}_{10}(P\text{-value})$ más alto y que incluyeran SNPs en todos los cromosomas. En la figura 19 se muestra un acercamiento del *Manhattan plot*, en el que se observan los SNPs con el valor de P más alto. La gráfica resalta los 100 SNPs que seleccionamos con mayor asociación a la respuesta hidrotropica, los cuales tienen valores de P entre 5.15 y 3.23, siendo un SNP en el cromosoma 3 el que presenta la mayor asociación a la respuesta hidrotropica (dentro del gen *DUF1005*). De estos SNPs se determinó su ubicación en el genoma de maíz, es decir; si se posicionaron en intrones, exones o regiones intergénicas, además del nombre y función de los genes en donde se ubicaron dichos SNPs.

Adicionalmente, para confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis tipo GWAS se realizó un gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot [figura 20]), el cual compara la distribución *ideal* que se espera que tengan los SNPs con la distribución real que tuvieron los mismos en el análisis tipo GWAS. Dicho gráfico se puede observar en la figura 20 donde se muestra que los resultados del GWAS (línea roja punteada) se ajustan a los resultados *ideales* para los SNPs (línea negra), reafirmando así la confiabilidad de este análisis.

Tabla 7. Resultados del primer análisis de asociación del genoma completo realizado con el programa Golden Helix (donde las flechas indican 5'→3' y 5'←3'; R.I. Región Intergénica).

Chr	Posición	Sitio	Gen ID	Sentido	Coordenadas	Gen/ortólogo
1	81787840	Exón	GRMZM2G044383	←	81,787,076 - 81,788,381	Glutación S-transferasa (<i>GST30</i>).
1	83011288	Exón	GRMZM5G867121	←	83,009,970 – 83,011,658	Sin anotación
1	83020578	Exón	GRMZM5G867121	←	83,019,858-83,021,546	Alfa y Beta hidrolasa
1	229864983	Intrón	GRMZM2G079428	←	229,849,325 - 229,865,626	Proteína de cloroplasto EXCUTER1 (<i>OsEX1</i>)
1	286338809	R.I.	GRMZM2G011385	→	286,338,350-286,339,007	Dominio que contiene un dominio proteico de la familia LOB
1	287364483	R.I.	GRMZM2G178415	←	287,360,596 - 287,367,735	Glutamato deshidrogenasa (<i>GDH1</i>)
2	16401944	Intrón	GRMZM2G161902	→	16,398,790 – 16,402,308	Sin anotación
2	24661386	Exón	GRMZM2G033379	→	24,657,479 – 24,661,845	Super familia de proteínas chaperonas con dominio DnaJ
2	36946833	Exón	GRMZM2G102183	→	36,945,679 - 36,948,155	Malato sintasa, glioxisomal
2	190506461	Exón		→	190,506,378 - 190,506,646	Narrow sheath2 (<i>NS2</i>)
3	9379807	Exón	GRMZM5G832672	→	9,379,322 – 9,383,521	Proteína similar a Frigida
3	168568829	Intrón	GRMZM2G086845	→	168,566,367 - 168,569,728	Fructoquinasa-1 (<i>FRK1</i>)
3	169078369	Intrón	GRMZM2G026855	←	169,071,206-169,080,562	Alcohol deshidrogenasa y poligalacturonasa
4	29171440	R.I.	GRMZM2G070639	←	29,170,302 – 29,171562	Proteína similar a quinesina y diene lactón hidrolasa
4	63564715	Exón	GRMZM2G082087	←	63,562,327 - 63,567,747	12-oxo-phytodienoic acid reductase8 (<i>OPR8</i>)
4	235201281	R.I.	GRMZM2G133653	→	235,199,784 – 235,203,367	Factor de transcripción bZIP
4	238437412	Intrón	GRMZM2G174481	←	238,434,655-238,437,653	Oxidoreductasa y NADP Dependiente de sorbitol phosphato dehydrogenase??
5	215544637	R.I.	GRMZM5G824600	→	215,541,812 - 215,545,867	Alcohol deshidrogenasa clase 3 (<i>FDH1</i>)
5	215618657	Exón	GRMZM2G081907	→	215,618,421 – 215,626,793	Proteína asociada a factor CLIP
7	23730239	Intrón	GRMZM2G097030	←	23,728,517 - 23,730,596	UDP-Glucosiltransferasa
10	81195829	Intrón	GRMZM2G123410	→	81,194,843 - 81,197,151	Sin anotación

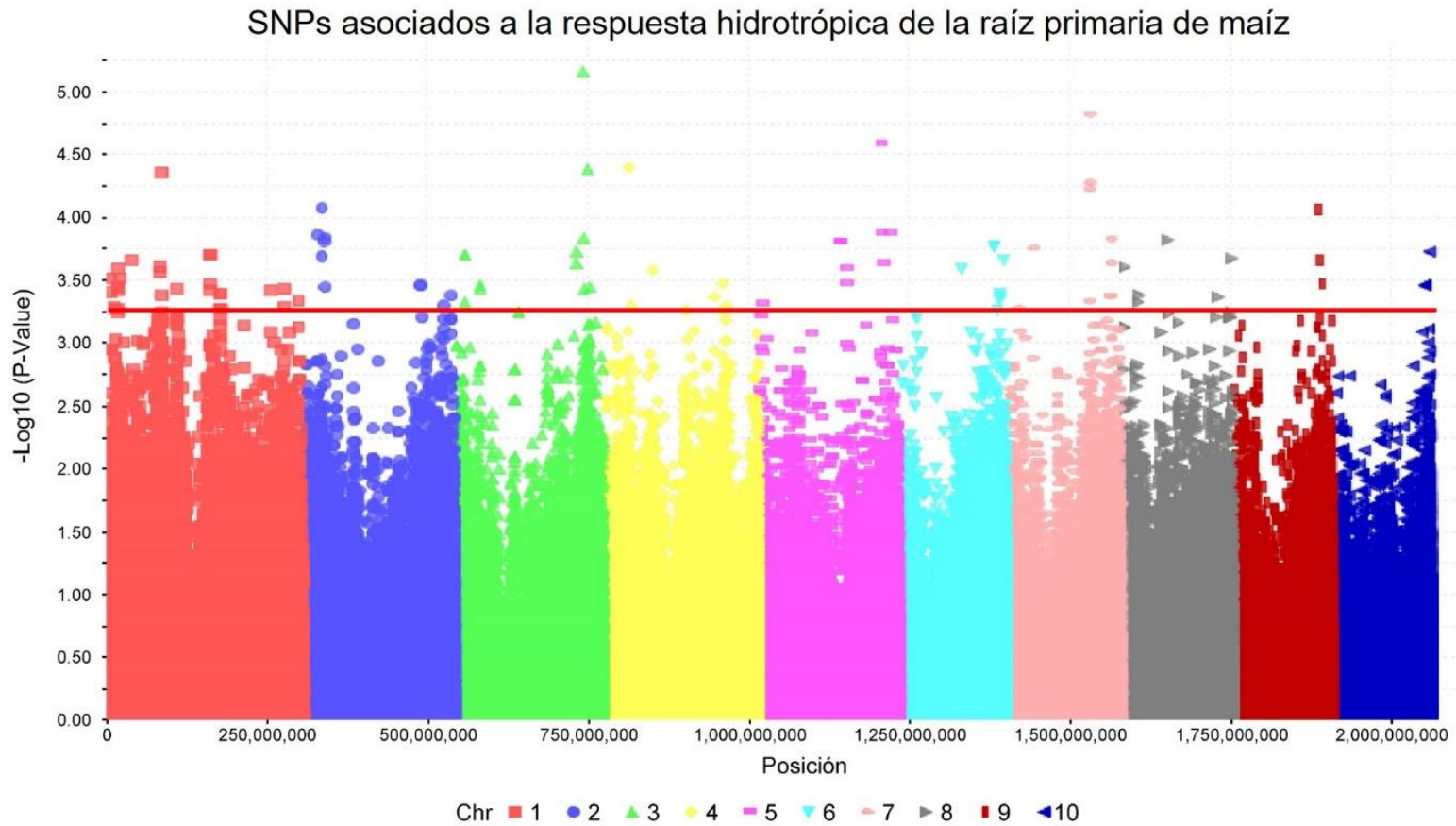


Figura 18. Gráfica tipo *Manhattan plot* resultado del segundo GWAS realizado con los resultados de la fenotipificación de 231 híbridos de maíz DTMA. Los SNPs por arriba de la línea roja corresponden a los 100 seleccionados con más asociación a la respuesta hidrotrópica, los cuales tienen valores de P entre 5.15 y 3.23.

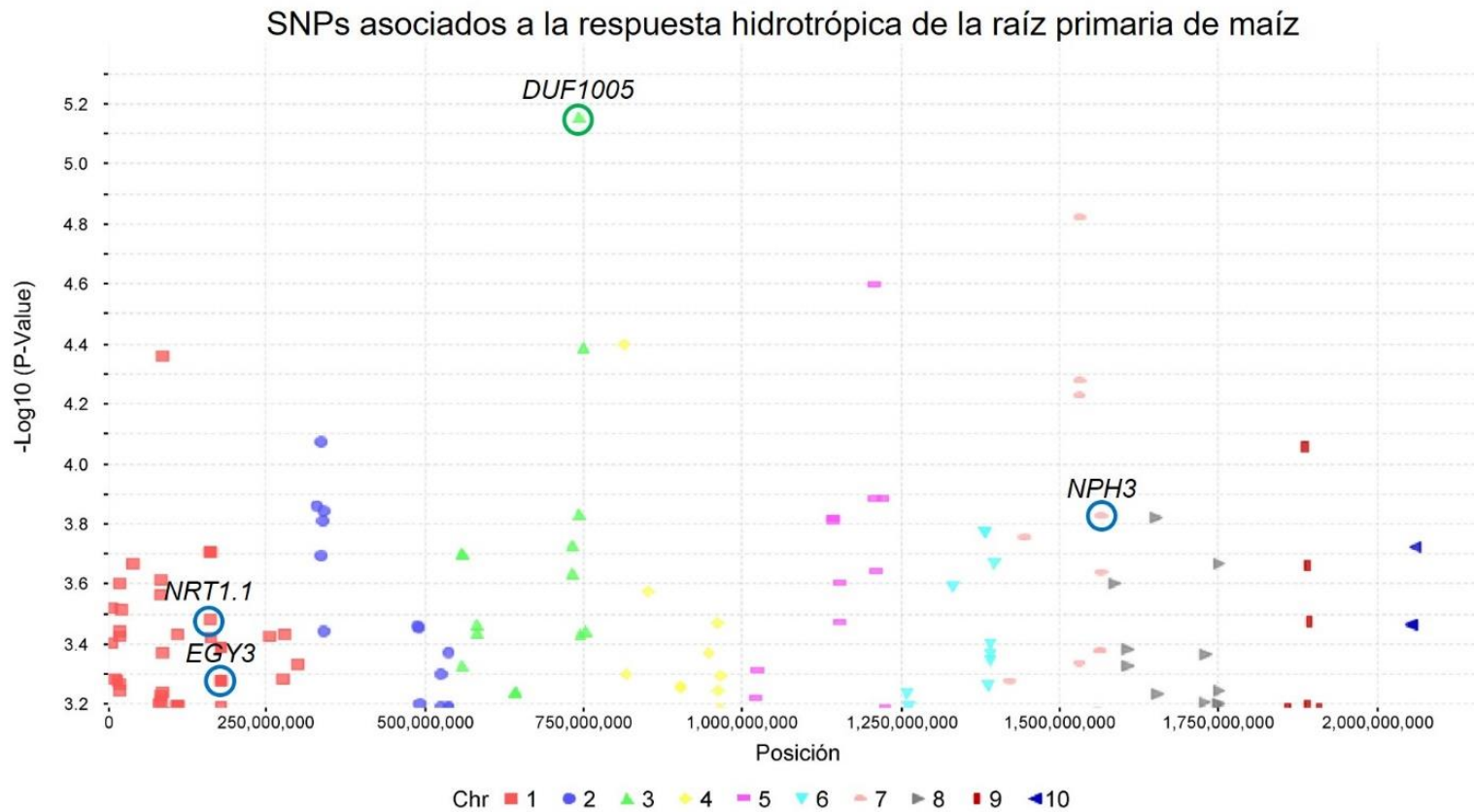


Figura 19. Acercamiento de la gráfica tipo *Manhattan plot* de los 100 SNPs con mayor asociación a la respuesta hidrotónica en los cuales se identificó un *P-value* de 5.15 a 3.23. Nótese que los cromosomas 9 y 10 tienen una menor cantidad de SNPs asociados. En círculos se indican los SNPs situados en los cuatro genes seleccionados como candidatos asociados a la respuesta hidrotónica (*NRT1.1*, *EGY3*, *DUF1005* y *NPH3*), el círculo verde muestra el SNP con la mayor asociación del análisis.

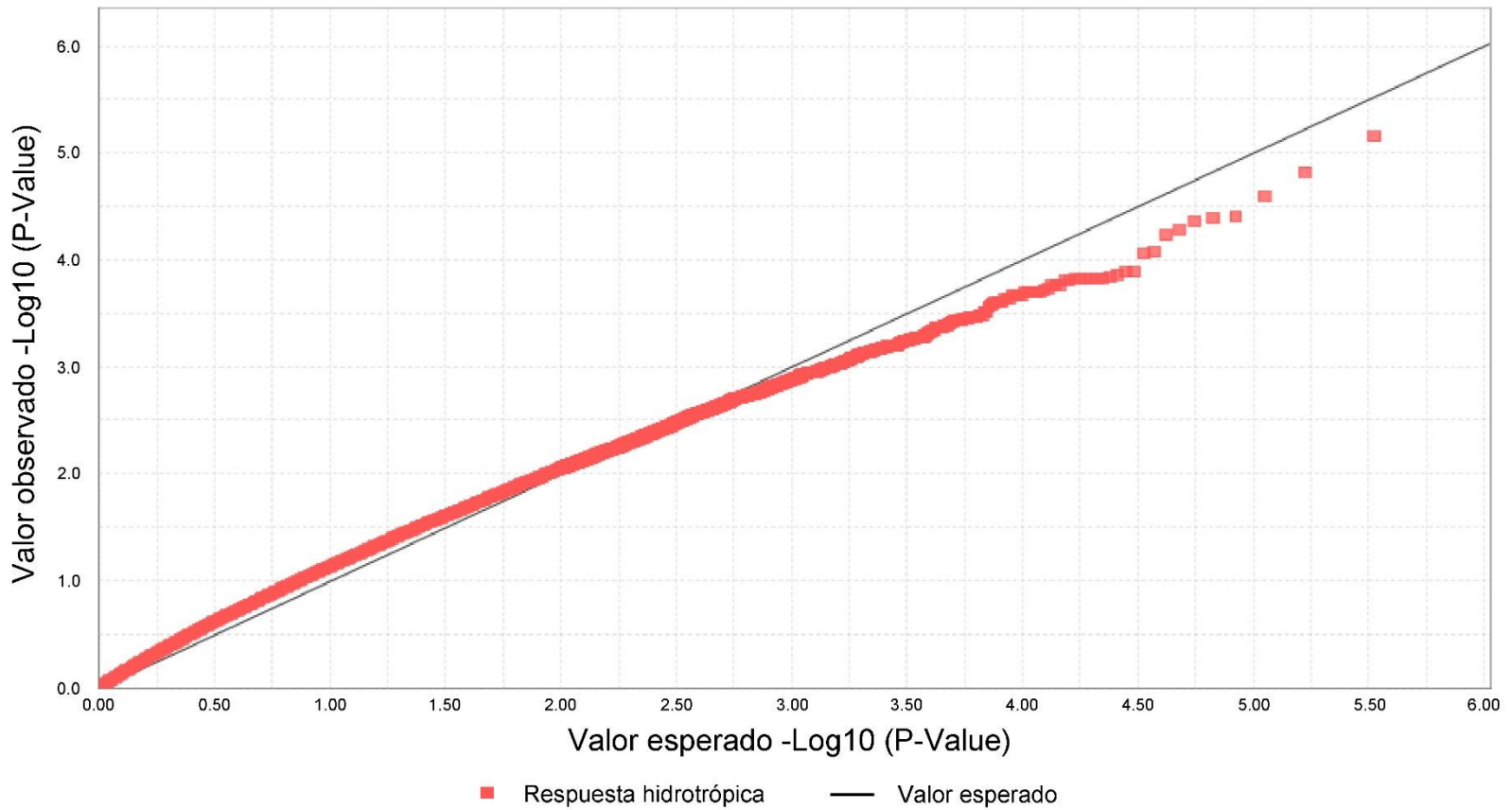


Figura 20. Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot), para los SNPs de la respuesta hidrotrópica. Nótese que la distribución esperada o *ideal* de los SNPs (línea negra) es muy similar a la observada (línea punteada roja), lo cual indica la fiabilidad del análisis realizado.

8.2 Anclaje de SNPs y búsqueda de información en bases de datos.

Una vez realizado el GWAS se obtuvieron las posiciones de los SNPs asociados a la respuesta hidrotónica, se identificó su localización (punto o región de referencia), la dirección de la cadena (de 5' a 3' o viceversa), las coordenadas de los genes, sus isoformas y los diferentes nombres en bases de datos con el fin de identificar la función y patrones de expresión de los posibles genes candidatos. Finalmente se seleccionaron cuatro genes candidatos posiblemente involucrados en procesos relacionados a la respuesta hidrotónica, expresados en raíz y/o tolerancia a sequía en maíz. La búsqueda de todos los datos anteriores se realizó con ayuda del software Artemis y las bases de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), MaizeGDB (www.maizegdb.org/), Gramene (www.gramene.org/), y Phytosome ([phytosome. https://phytosome.jgi.doe.gov/pz/portal](https://phytosome.jgi.doe.gov/pz/portal)), tomando en cuenta la secuencia B73 versión 2 (Maize B73 RefGen_v2) como referencia para nuestro análisis.

De los 100 SNPs seleccionados 35 se situaron en regiones intergénicas, y 65 en regiones génicas, de los cuales a su vez 31 se posicionaron en exones y 34 en intrones (Figura 21). La mayoría de los genes asociados pertenecen al cromosoma 1 (31 SNPs), mientras que en los cromosomas 9 y 10 sólo hay 3 SNPs de los 100 con mayor asociación a la respuesta hidrotónica (Figura 22). La cantidad de SNPs corresponde con el tamaño de los cromosomas; es decir, el cromosoma 1 es el más grande (301.43 Mpb) y ahí se ubicaron más SNPs, mientras que los cromosomas 9 y 10 son los de menor tamaño (157.02 Mpb y 149.62 Mpb respectivamente) y se identificaron menos SNPs en los mismos. La mayoría de los SNPs se situaron en genes (65%), no así en regiones intergénicas (35%), sin embargo las regiones intergénicas también se tomaron en cuenta debido a que pueden ser parte de regiones regulatorias de otros genes. Actualmente no se tiene una anotación completa (de los genes) para el genoma del maíz, es por ello que a la mayoría de los genes no se les ha asignado una función en las bases de datos. Sin embargo, de los 65 SNPs ubicados en regiones génicas se identificaron 49 genes

diferentes debido a que en algunas ocasiones más de un SNP se situó en el mismo gen, de estos sólo 8 tienen una anotación propia en las cuatro bases de datos antes mencionadas y 16 sólo en NCBI (anotaciones predichas). Los 25 genes restantes no presentaron ni anotación propia ni anotación putativa al abrir el gen en NCBI; sin embargo *MaizeGDB* sugiere un ortólogo en *A. thaliana* para la mayoría de los genes. Para asignarles una posible función a los genes sin anotación, se realizaron BLAST utilizando las secuencias de las proteínas. Como resultado identificamos que la mayoría de ortólogos que sugiere *MaizeGDB* concuerdan con los resultados del ProteinBLAST; es decir, la función del gen ortólogo sugerido por *MaizeGDB* en *A. thaliana* es la misma que la función de los genes identificados por *ProteinBLAST* en *Arabidopsis* o en otros organismos. Se tomaron en cuenta porcentajes de identidad \geq a 30% e *E-values* cercanos o iguales a cero.

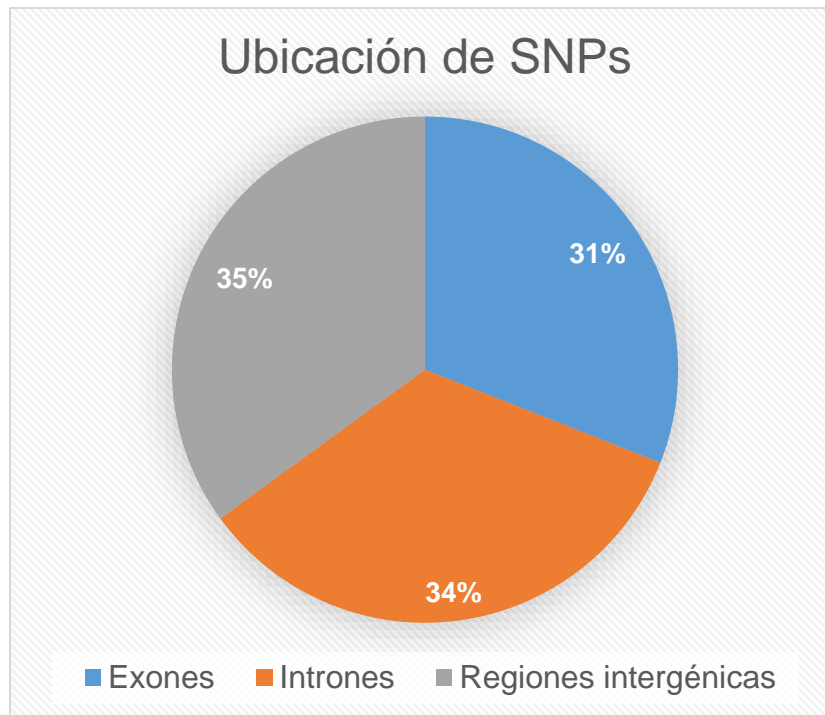


Figura 21. Ubicación de los 100 SNPs de acuerdo a su posición en las regiones de los cromosomas, 31% se encontraron en exones y el 34 % en intrones. Por su parte los SNPs ubicados en regiones intergénicas corresponden al 35%.

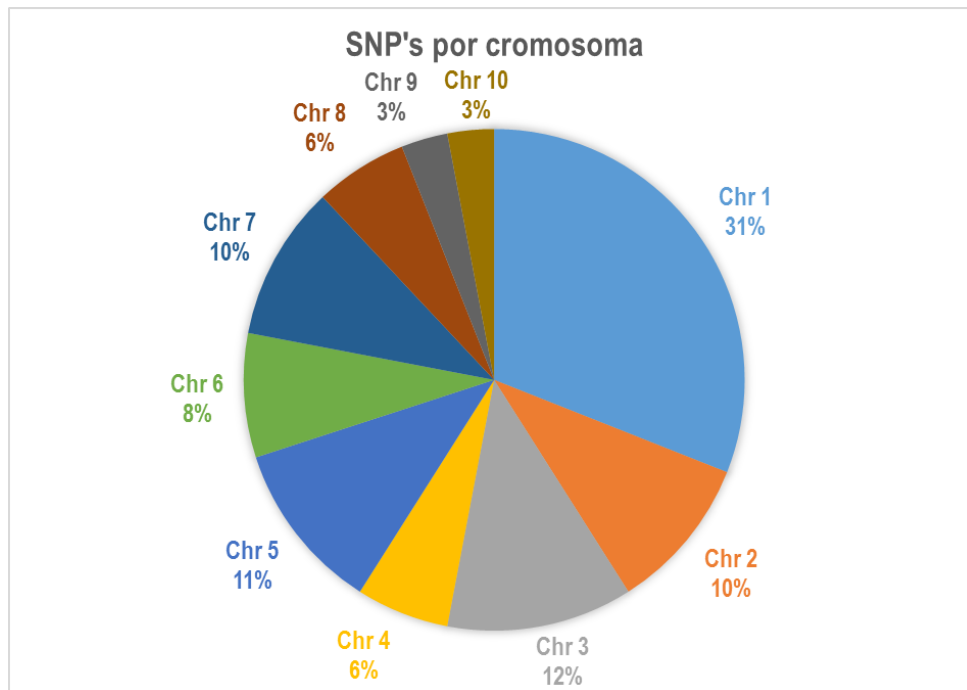


Figura 22. Porcentaje de SNPs por cromosoma, nótese que en los cromosomas 9 y 10 sólo se encuentra el 3% de los SNPs, mientras que en el cromosoma 1 se encuentra el 31% de los SNPs lo cual es proporcional al tamaño de los cromosomas.

Los resultados principales del anclaje de SNPs del GWAS (segundo análisis), se resume en la Tabla 5, en esta tabla se muestra el cromosoma, la posición del SNP, el valor del $-\text{Log}_{10}$ del *P-value*, la ubicación de los SNPs en el genoma, el código e identificación de la proteína, la etiqueta del locus, la dirección de la cadena, la función anotada en MaizeGDB o NCBI, su ortólogo en *A. thaliana*, el proceso biológico en el que participan (información disponible sólo para algunos genes), y en caso de no tener anotación alguna; en la última columna se encuentra el resultado del ProteinBLAST con el organismo al que pertenece. Adicionalmente a la información mostrada en la Tabla 8, se recabaron más datos como el número de isoformas de los genes, posible ubicación intracelular de las proteínas, el *E-value* y el porcentaje de identidad del BLAST, una página con información del gen y otros códigos de identificación para NCBI, sin embargo la información al igual que la anotación no está disponible para la mayoría de los genes.

Tabla 8. Resultados del segundo GWAS de la respuesta hidrotónica de híbridos de maíz DTMA. En esta tabla se muestra el número de cromosoma, la posición del SNP, el logaritmo negativo base 10 (con el que se distribuyen los SNPs en el Manhattan plot), la ubicación dentro del gen, es decir si el SNP se encuentra en Intrones, Exones o UTR, el Gen ID o código de acceso, el sentido del gen (donde las flechas indican 5'→3' y 5'←3'; R.I. Región Intergénica), las coordenadas del gen en la versión B73_v2 y el nombre del mismo (Los genes ortólogos se seleccionaron de acuerdo a su porcentaje de identidad 30% y su E-value igual o cercano a cero). Las filas sombreadas corresponden a los SNPs seleccionados como genes candidatos asociados a la respuesta hidrotónica

Chr	Posición	log pValue	Ubicación	Gen ID	Sentido	Coordenadas	Gen/ortólogo
1	1763337	3.52E+00	Exón	GRMZM2G161483	→	1759349..1763553	Nitrate transporter 1.1 (NRT1.1), AT1G12110.1
1	2740913	3.40E+00	Exón	GRMZM2G085872	←	2736650..2741182	CemA-like proton extrusion protein-related, AT4G31040.1
1	7696231	3.28E+00	Intrón	GRMZM2G048740	←	7686554..7700991	Serine acetyltransferase 3;2 (SERAT3;2), AT4G35640.1
1	10511380	3.28E+00	R.I.				
1	14103060	3.27E+00	Intrón	GRMZM5G850455	→	14103040..14104304	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily, AT2G44290.1
1	14807352	3.60E+00	Intrón	GRMZM2G162725	→	14804662..14809417	Conserved oligomeric Golgi complex component 4, LOC_Os02g25840.1
1	14959861	3.43E+00	Intrón	GRMZM2G139963	←	14958684..14961640	Homeobox-transcription factor 102 (hb102)
1	14959898	3.44E+00	Intrón	GRMZM2G139963	←	14958684..14961640	Homeobox-transcription factor 102 (hb102)
1	16350286	3.52E+00	Intrón	GRMZM2G064732	←	16349086..16357014	Compact plant2 (ct2)
1	34716132	3.67E+00	Exón	GRMZM2G355450	→	34715608..34717855	Protein kinase superfamily protein
1	79139961	3.57E+00	Exón	GRMZM2G401374	←	79139398..79140070	Cystatin/monellin superfamily protein, AT5G47550.1
1	79752332	3.61E+00	R.I.				
1	82912116	4.36E+00	UTR 5'	GRMZM2G064466	→	82911725..82917101	Homeobox-transcription factor 100 (hb100)
1	82912871	4.36E+00	Exón	GRMZM2G064466	→	82911725..82917101	Homeobox-transcription factor 100 (hb100)

1	106063665	3.43E+00	Intrón	GRMZM2G430710	→	106060092..106064025	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein, AT1G16480.2
1	157056283	3.71E+00	Intrón	GRMZM2G074368	→	157054835..157056949	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 (TOM5)
1	157056322	3.71E+00	Intrón	GRMZM2G074368	→	157054835..157056949	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 (TOM5)
1	157056323	3.71E+00	Intrón	GRMZM2G074368	→	157054835..157056949	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 (TOM5)
1	157056374	3.48E+00	Intrón	GRMZM2G074368	→	157054835..157056949	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 (TOM5)
1	158632858	3.42E+00	Exón	GRMZM2G429807	←	158630354..158634416	Plant calmodulin-binding protein-related, AT5G39380.1
1	174171834	3.28E+00	R.I.				
1	174171842	3.28E+00	R.I.				
1	174171843	3.28E+00	R.I.				
1	174171846	3.28E+00	R.I.				
1	174171850	3.39E+00	R.I.				
1	174171853	3.39E+00	R.I.				
1	174171864	3.28E+00	R.I.				
1	251733447	3.42E+00	R.I.				
1	272220852	3.28E+00	Intrón	GRMZM2G049349	←	272218159..272220893	Ethylene-dependent gravitropism-deficient and yellow-green-like 3 (EGY3), AT1G17870.1
1	273871532	3.43E+00	R.I.				
1	295450856	3.33E+00	Intrón	GRMZM2G458549	←	295450010..295457140	Galactokinase (TAP)
2	23557250	3.86E+00	UTR 5'	GRMZM2G078279	←	23557983..23558726	Expansin B3, BETA 1.6 isoform 1
2	30275362	4.07E+00	Exón	GRMZM2G051932	←	30272902..30274884	Protein of unknown function (DUF3741), AT4G28760.1
2	30275545	3.69E+00	Intrón	GRMZM2G051932	←	30272902..30274884	Methyl-coenzyme M reductase II subunit gamma
2	33467097	3.81E+00	Exón	GRMZM2G352379	→	33466737..33497359	Protein of unknown function DUF642 (AT5G11420.1)
2	34688582	3.84E+00	UTR 5'	GRMZM2G364901	→	34699024..34701280	Protoporphyrinogen IX oxidase2 (prpo2)
2	34688817	3.84E+00	Exón	GRMZM2G364901	→	34699024..34701280	Protoporphyrinogen IX oxidase2 (prpo2)
2	182624516	3.46E+00	Intrón	GRMZM2G036832	←	182619406..182625522	Gamete expressed 2 (GEX2), AT5G49150.1

2	184178685	3.46E+00	Intrón	GRMZM2G139963	←	14958684..14961640	Homeobox-transcription factor 102 (hb102)
2	219192655	3.30E+00	R.I.				
2	231206785	3.37E+00	Exón	GRMZM2G471160	←	231206286..231207056	UDP-glucosyl transferase 76E11 (UGT76E11), AT3G46670.1
3	15434813	3.33E+00	R.I.				
3	15434814	3.70E+00	R.I.				
3	15434815	3.70E+00	R.I.				
3	39476219	3.44E+00	R.I.				
3	39478095	3.46E+00	Exón	GRMZM2G132465	→	39476674..39479631	UBP1-associated protein 2A (UBA2A), AT3G56860.1
3	189458589	3.63E+00	R.I.				
3	189458590	3.73E+00	R.I.				
3	199564040	5.15E+00	Exón	GRMZM2G078210	←	199561299..199564254	DUFF1005
3	200114353	3.83E+00	Exón	AC204712.3_FG06	→	200114326..200115063	Sin anotación
3	201670696	3.43E+00	R.I.				
3	206605793	4.39E+00	R.I.				
3	209847971	3.44E+00	R.I.				
4	39096839	4.40E+00	Exón	GRMZM2G158153	←	39092198..39097412	KH domain-containing protein
4	42358954	3.30E+00	R.I.				
4	76446070	3.58E+00	R.I.				
4	171909062	3.37E+00	Exón	GRMZM2G466532	←	171908549..171910339	Sin anotación
4	185640920	3.47E+00	R.I.				
4	191115474	3.29E+00	Exón	GRMZM2G423831	←	191112541..191115579	Pentatricopeptide repeat superfamily protein (PPR), AT5G24060.2
5	6866457	3.31E+00	Exón	GRMZM2G072315	←	6866105..6868021	60S ribosomal protein L13a
5	126774065	3.82E+00	Exón	GRMZM2G082517	→	126773571..126774617	Fasciclin-like arabinogalactan protein 8
5	126774071	3.82E+00	Exón	GRMZM2G082517	→	126773571..126774617	Fasciclin-like arabinogalactan protein 8
5	126774102	3.81E+00	Exón	GRMZM2G082517	→	126773571..126774617	Fasciclin-like arabinogalactan protein 8
5	126774108	3.82E+00	Exón	GRMZM2G082517	→	126773571..126774617	Fasciclin-like arabinogalactan protein 8
5	136582204	3.48E+00	Exón	GRMZM2G147172	→	136581652..136583153	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295), AT2G26160.1

5	136582327	3.61E+00	Exón	GRMZM2G147172	→	136581652..136583153	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295), AT2G26160.1
5	190554383	3.88E+00	Intrón	GRMZM2G072865	→	190554318..190561390	FTSH protease 9 (ftsh9), AT5G58870.1
5	190554422	4.60E+00	Intrón	GRMZM2G072865	→	190554318..190561390	FTSH protease 9 (ftsh9), AT5G58870.1
5	193966482	3.64E+00	R.I.				
5	205374768	3.88E+00	R.I.				
6	97345493	3.59E+00	Intrón	GRMZM2G018280	→	97343332..97346122	Protein kinase superfamily protein
6	147913800	3.77E+00	Exón	GRMZM2G153358	←	147913391..147916344	Nodulin MtN3 family protein, AT1G21460.1
6	147913803	3.77E+00	Exón	GRMZM2G153358	←	147913391..147916344	Nodulin MtN3 family protein, AT1G21460.1
6	153089897	3.26E+00	R.I.				
6	156878227	3.36E+00	Intrón	GRMZM2G078781	→	156878140..156882859	Cyclic nucleotide-gated ion channel 0
6	156878230	3.40E+00	Intrón	GRMZM2G078781	→	156878140..156882859	Cyclic nucleotide-gated ion channel 0
6	156878275	3.35E+00	Intrón	GRMZM2G078781	→	156878140..156882859	Cyclic nucleotide-gated ion channel 0
6	162693541	3.67E+00	Exón	GRMZM2G017269	→	162690848..162694219	ARM repeat superfamily protein, AT5G14790.1
7	17534604	3.28E+00	R.I.				
7	40973424	3.76E+00	Intrón	AC186581.3_FG03	→	40973158..40974020	Sin anotación
7	127886246	3.34E+00	R.I.				
7	127886320	4.23E+00	R.I.				
7	128381601	4.82E+00	Exón	GRMZM2G117217	←	128380820..128381642	Purine permease 2-like
7	128381670	4.28E+00	R.I.				
7	160517646	3.38E+00	R.I.				
7	160517665	3.38E+00	R.I.				
7	161950886	3.64E+00	Exón	GRMZM2G180490	←	161948926..161953678	Non-Phototropic hypocotil 3 family protein (NPH3), AT3G49900.1
7	161950906	3.83E+00	Intrón	GRMZM2G180490	←	161948926..161953678	Non-Phototropic hypocotil 3 family protein (NPH3), AT3G49900.1
8	5977502	3.60E+00	R.I.				
8	26858417	3.33E+00	Intrón	GRMZM2G127687	←	26858309..26862634	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
8	27643226	3.38E+00	R.I.				

8	72423678	3.82E+00	Exón	GRMZM2G100982	←	72423514..72424394	AP2-EREBP-transcription factor 12 (ereb12)
8	150307216	3.37E+00	Intrón	GRMZM2G059449	→	150307207..150312570	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (EMB88), AT1G30610.2
8	171627747	3.67E+00	Intrón	GRMZM2G132251	←	171624655..171629074	Serine/threonine-protein kinase WNK (With No Lysine)-related, AT5G53900.2
9	130918670	4.06E+00	Exón	GRMZM2G012970	→	130918297..130920810	Putative DUF827 domain containing family protein
9	133792850	3.66E+00	Exón	GRMZM2G134279	←	133791821..133794038	MYB-transcription factor 29, (myb29)
9	137351153	3.48E+00	Intrón	AC206223.3_FG08	←	137350754..137354173	Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein (ETO1), AT3G51770.2
10	140974149	3.47E+00	Intrón	GRMZM2G109753	→	140930206..141001351	Scramblase family protein
10	140974151	3.47E+00	Intrón	GRMZM2G109753	→	140930206..141001351	Scramblase family protein
10	147845025	3.72E+00	Intrón	GRMZM2G392101	→	147844785..147846089	Cytokinin response regulator2 (crr2)

8.3 El efecto fenotípico de los SNPs entre híbridos robustos y débiles.

Se analizó el posible efecto fenotípico de los 100 SNPs con mayor asociación a la respuesta hidrotópica, para ello se utilizaron los cambios de base más comunes y menos comunes en la población, así como su promedio total de ángulo. Este análisis se realizó con los 15 híbridos más débiles (por su promedio en ángulo de curvatura) y 15 híbridos más robustos de los 231 utilizados para el segundo GWAS. Como resultado, el estudio nos permitió contrastar las diferencias a nivel de SNPs (diferencia en el cambio de bases) entre la población de híbridos débiles y robustos (efecto fenotípico).

Primero se realizó un análisis general del estatus de los SNPs para determinar la intensidad del efecto fenotípico de la población en general (Figura 23) es decir, que tan fuerte (positivo) o débil (negativo) puede llegar a ser el efecto del cambio de una base en la población, así como determinar si este cambio está presente en todos los individuos y si existen o no diferencias entre individuos débiles y robustos. En la figura 23 se muestra el efecto mayor, menor y hetero para cada SNP, las columnas numeradas representan los SNPs con el mayor *P-value* asociados a la respuesta hidrotópica (se eliminaron SNPs repetidos dentro de un mismo gen, por lo que quedaron sólo 76 SNPs/genes, en la Tabla 9 se muestran los SNPs numerados y al gen que corresponden). El efecto mayor hace referencia al porcentaje de la base con mayor proporción dentro de la población (que es la base común o de referencia de acuerdo a la secuencia B73 RefGen_v2), el efecto menor muestra el porcentaje de la segunda base más común para la población y el efecto hetero muestra la base con menor proporción o menos común dentro de la población (tanto el efecto menor como el efecto hetero muestran cambios a nivel de base, es decir los SNPs). En la figura 19 se observa que el efecto mayor en la población tiende a ser neutro o igual a cero debido a que supone que es el “control” o fenotipo de referencia y por ende no hay diferencias en ambas poblaciones. Por su parte el efecto menor tiende a ser positivo y el hetero negativo (el cual supone un fenotipo menos común).

En la figura 24 se muestra la diferencia del efecto fenotípico entre individuos débiles (por debajo de la línea negra) y robustos (por arriba de la línea negra), de igual manera que en la figura 23, la numeración de los SNPs corresponde a los de la Tabla 9. En esta figura se observa una marcada diferencia entre la población de híbridos DTMA de acuerdo a su tipo de respuesta hidrotópica, en híbridos robustos el efecto tiende a ser positivo, mientras que en los híbridos débiles es más negativo, neutro y con algunos SNPs con valores positivos (similares a híbridos robustos).

En base a estos datos podemos constatar que existen diferencias a nivel de bases nucleotídicas (SNPs) para individuos débiles y robustos. También podemos destacar que algunos DTMA tienen un efecto positivo (robustos) o negativo (débiles) en la mayoría de sus SNPs, por ejemplo el DTMA 181 clasificado como robusto, que en gran parte sus SNPs muestra un efecto fenotípico positivo, que bien podrían ser causantes de la intensidad de su respuesta hidrotópica robusta, por el contrario el DTMA 114 clasificado como débil muestra efectos fenotípicos negativos lo cual, de igual manera nos hace pensar que puede estar asociado a su reducida respuesta hidrotópica. Sí no hubiera diferencias génicas en la población con respecto al fenotipo hidrotópico, observaríamos a todos los DTMA en colores similares a los de efecto mayor, todos con efecto igual o cercano a cero, es decir no habría SNPs y ambas poblaciones serían genéticamente idénticas. Por lo anterior, esperamos que las diferencias observadas entre los híbridos robustos y débiles representadas en las figuras 23 y 24 fueran traducidas a diferencias en los genes (en sus niveles de expresión) asociados a la respuesta hidrotópica.

Tabla 9. Numeración utilizada en las figuras de efecto fenotípico.

No.	Gen/Ortólogo
1	Nitrate transporter 1.1 (<i>NRT1.1</i>), AT1G12110.1
2	Conserved oligomeric Golgi complex component 4, LOC_Os02g25840.1
3	Compact plant2 (ct2)
4	Protein kinase superfamily protein
5	Cystatin/monellin superfamily protein, AT5G47550.1
6	Región intergénica.
7	Homeobox-transcription factor 100 (hb100)
8	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 (TOM5)
11	CemA-like proton extrusion protein-related, AT4G31040.1
12	Homeobox-transcription factor 102 (hb102)
14	Compact plant2 (ct2)
15	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein, AT1G16480.2
16	Región intergénica.
17	Plant calmodulin-binding protein-related, AT5G39380.1
18	Región intergénica.
19	Región intergénica.
20	Serine acetyltransferase 3;2 (SERAT3;2), AT4G35640.1
21	Región intergénica.
28	Ethylene-dependent gravitropism-deficient and yellow-green-like 3 (EGY3), AT1G17870.1
29	Galactokinase (TAP)

30	Región intergénica.
31	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily, AT2G44290.1
32	Expansin B3, BETA 1.6 isoform 1
33	Protein of unknown function (DUF3741), AT4G28760.1
35	Protein of unknown function DUF642 (AT5G11420.1)
36	Protoporphyrinogen IX oxidase2 (prpo2)
37	Gamete expressed 2 (GEX2), AT5G49150.1
38	Homeobox-transcription factor 102 (hb102)
39	Región intergénica.
40	UDP-glucosyl transferase 76E11 (UGT76E11), AT3G46670.1
41	Región intergénica.
44	Región intergénica.
45	DUF1005
46	No identificada
47	Región intergénica.
48	Región intergénica.
49	Región intergénica.
50	UBP1-associated protein 2A (UBA2A), AT3G56860.1
51	Región intergénica.
52	Región intergénica.
53	KH domain-containing protein
54	Región intergénica.
55	Región intergénica.
56	Región intergénica.
57	Región intergénica.

58	Pentatricopeptide repeat superfamily protein (PPR), AT5G24060.2
59	Fasciclin-like arabinogalactan protein 8
63	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295), AT2G26160.1
65	FTSH protease 9 (ftsh9), AT5G58870.1
66	Región intergénica.
67	Región intergénica.
68	60S ribosomal protein L13a
69	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295), AT2G26160.1
70	Protein kinase superfamily protein
71	Nodulin MtN3 family protein, AT1G21460.1
73	Región intergénica.
75	Cyclic nucleotide-gated ion channel 0
76	Cyclic nucleotide-gated ion channel 0
77	ARM repeat superfamily protein, AT5G14790.1
78	Región intergénica.
79	No identificada
80	Región intergénica.
81	Región intergénica.
82	Purine permease 2-like
83	Región intergénica.
85	Región intergénica.
87	Non-Phototropic hypocotil 3 family protein (NPH3), AT3G49900.1
88	Región intergénica.
89	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
90	Región intergénica.

91	AP2-EREBP-transcription factor 12 (ereb12)
92	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (EMB88), AT1G30610.2
93	Serine/threonine-protein kinase WNK (With No Lysine)-related, AT5G53900.2
94	MYB-transcription factor 29, (myb29)
95	Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein (ETO1), AT3G51770.2
96	Cytokinin response regulator2 (crr2)

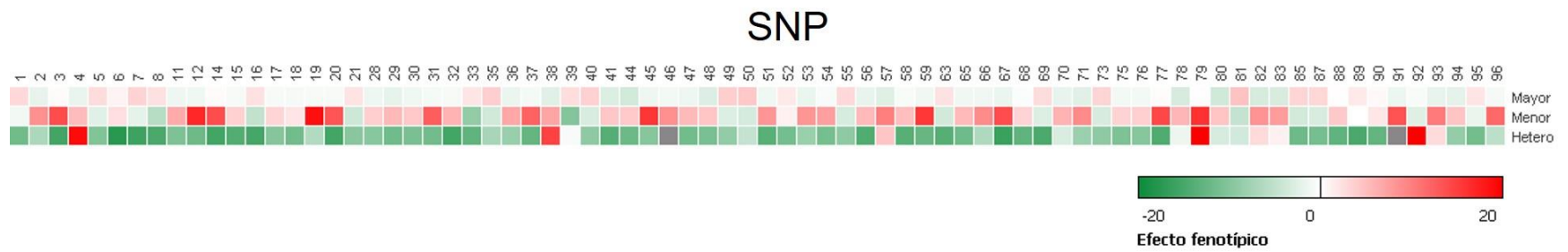


Figura 23. Intensidad (mapa de calor) del efecto fenotípico de los SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica para la población de híbridos DTMA. Las columnas numeradas representan los SNPs con el mayor *P-value* asociado a la respuesta hidrotrópica.

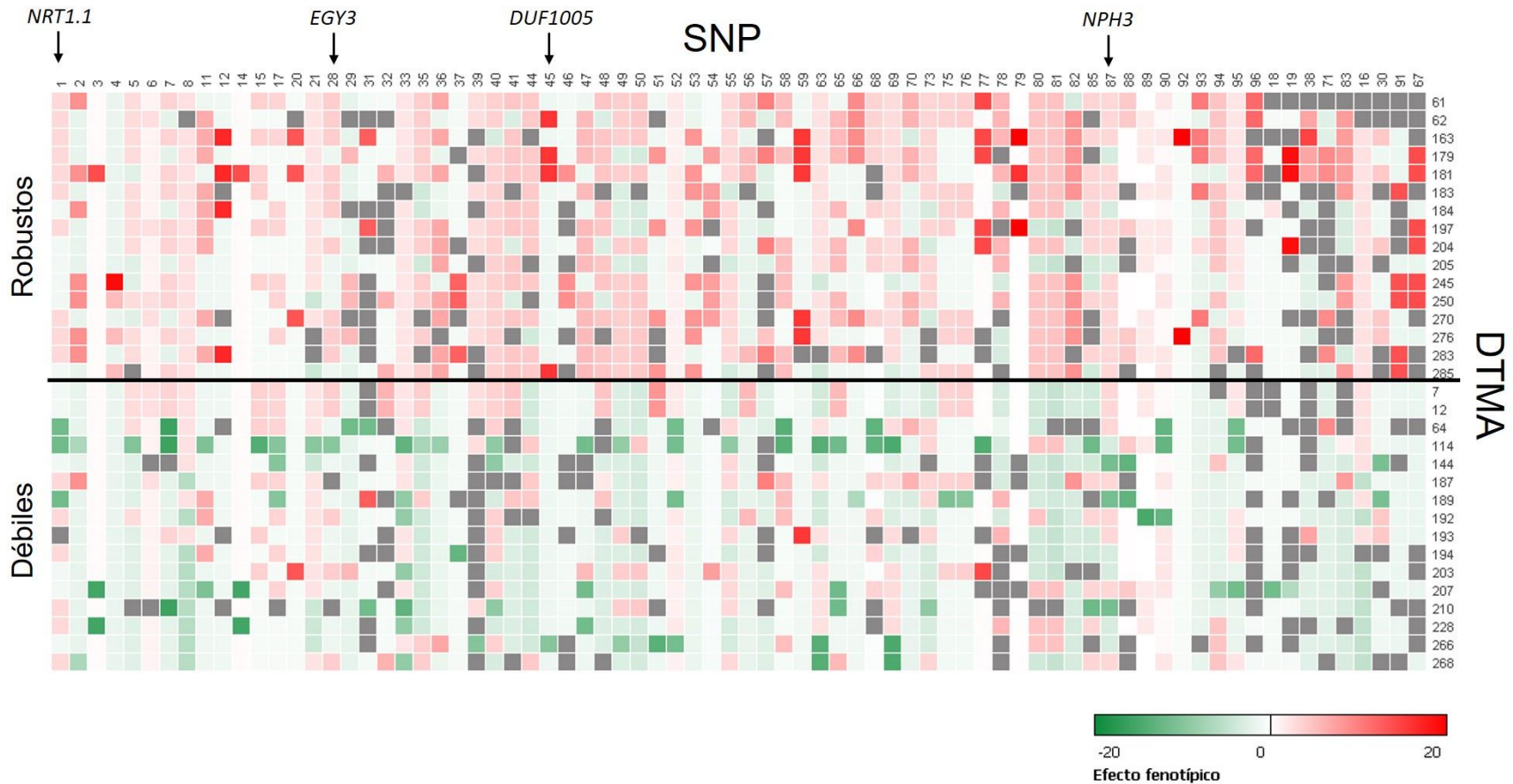


Figura 24. Mapa de calor del efecto fenotípico de SNPs asociados a la respuesta hidrotópica en híbridos débiles (por debajo de la línea negra) y robustos (arriba de la línea negra), nótese el contraste del efecto fenotípico de los SNPs para ambas poblaciones con respecto al cambio de una base. En rojo el efecto positivo que predomina en la población de híbridos robustos, en verde los híbridos con un cambio menos común en la población y en gris algunos SNPs sin datos. Las flechas indican los SNPs/genes seleccionados como asociados a la respuesta hidrotópica.

8.4 Identificación del gen *MIZ1* en el GWAS de hidrotropismo de la raíz primaria de maíz.

El gen *MIZ1* ha sido reportado como un gen esencial para la respuesta hidrotrópica de *A. thaliana*. *MIZ1* es una proteína de función desconocida expresada en la cofia lateral y en células corticales, que al estar sobreexpresada incrementa la respuesta hidrotrópica e inhibe la formación de raíces laterales (Kobayashi, et al., 2007). Al ser un gen participe en la respuesta hidrotrópica de raíz, asumimos que posiblemente este gen se encontraría dentro de los 100 SNPs asociados a la misma, lo anterior pensando que tuviera una función o expresión similar a la que se le ha identificado para *A. thaliana*, sin embargo al analizar los resultados de GWAS, no se encontraron los homólogos u ortólogos del gen *MIZ1* en maíz dentro del valor de *P* establecido (de 5.15 a 3.25), por lo cual, nos dimos a la tarea de buscar en primer lugar todos los homólogos de *MIZ1* en maíz, así como su ubicación en el genoma (de acuerdo a la secuencia de referencia B73_v2), para posteriormente buscar los SNPs que se encontraran dentro de las coordenadas de estos genes. Como resultado de búsqueda, se encontraron 21 genes homólogos a *MIZ1* en maíz. En las coordenadas de dichos genes se identificaron 198 SNPs, de los cuales sólo 56 se asociaron a la respuesta hidrotrópica ubicándose dentro de 11 genes, en algunos casos con más de un SNP por gen. En la Tabla 10 se muestran los 11 genes homólogos a *MIZ1* que tienen SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica, los cuales contienen de 1 a 23 SNPs asociados dentro del mismo gen. Sin embargo el *P-value* de estos es inferior al utilizado como valor de cohorte, siendo el gen GRMZM2G329999 el que presenta el valor de *P* más alto (1.84) dentro de la lista. En la figura 25 se muestra el GWAS obtenido con los SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica en maíz, así como la división del *P-value* utilizado como cohorte para nuestro análisis (línea roja). Así mismo en esta figura se muestra el punto a partir del cual se identificaron los SNPs en genes homólogos a *MIZ1* (por debajo de la línea negra) y en círculos negros algunos de los SNPs ubicados en genes *MIZ*.

Tabla 10. Genes homólogos a *MIZ1* en maíz, número de SNPs dentro de los mismos y *P-value* más alto obtenido por GWAS. La fila sombreada muestra el gen homólogo a *MIZ1* con el valor de *P* más alto identificado dentro del segundo GWAS.

ID del gen homólogo a <i>MIZ1</i>	Coordenadas	chr	No. de SNPs dentro del gen	<i>P-value</i> más alto
GRMZM2G397675	215,036,428..215,037,783	3	4	0.02
GRMZM2G437509	42,864,821..42,865,713	3	5	1.35
GRMZM2G106136	30,632,609..30,634,411	4	1	0.14
GRMZM2G043802	3,084,310..3,085,259	5	6	0.88
GRMZM2G329999	56,911,934..56,912,728	5	6	1.84
GRMZM5G893630	165,978,011..165,979,271	6	1	0.03
GRMZM2G075837	127,373,367..127,374,581	7	2	1.29
GRMZM2G043117	146,746,367..146,747,665	8	2	0.19
GRMZM2G475994	171,326,869..171,327,768	8	5	1.45
GRMZM2G029558	3,482,161..3,483,104	8	23	1.27
GRMZM2G062618	46,872,919..46,874,143	9	1	0.01

Estos resultados nos indican que los genes homólogos a *MIZ1* están relacionados a la respuesta hidrotópica, lo cual esperábamos para utilizar como control positivo del GWAS, sin embargo existen genes que al parecer presentan una mayor asociación a la respuesta hidrotópica de maíz en comparación con los genes homólogos a *MIZ1*, por lo que también nos hace especular que posiblemente la respuesta hidrotópica en maíz se regula a través de un mecanismo diferente al reportado en *A. thaliana*.

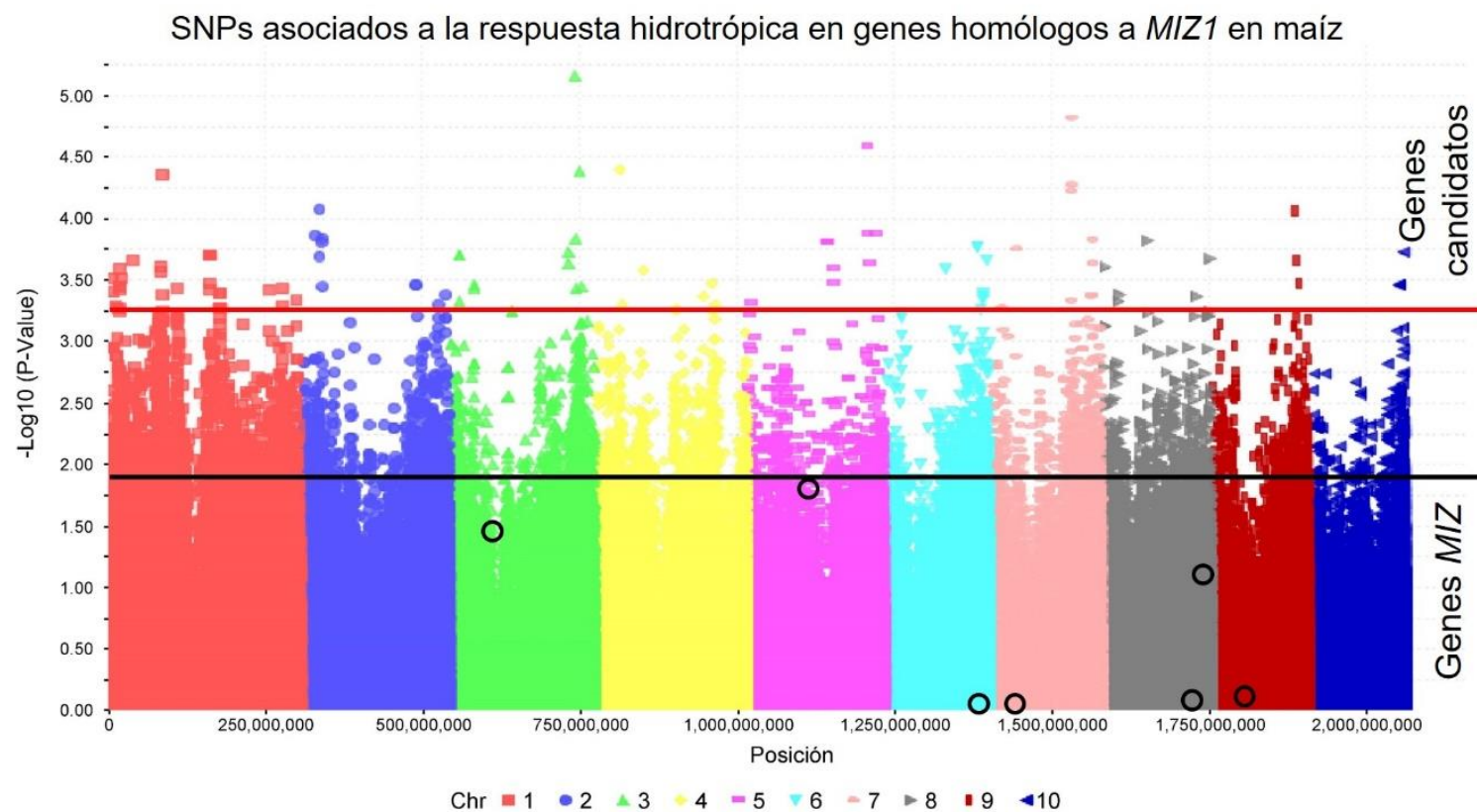


Figura 25. Posición de los SNPs en genes homólogos a *MIZ1* en el GWAS de la respuesta hidrotónica de maíz. Por arriba de la línea roja se muestran los 100 SNPs más asociados a la respuesta hidrotónica en maíz, con $P\text{-value} \geq 3.25$. Por debajo de la línea negra y en círculos negros se encuentran algunos de los SNPs presentes en los genes homólogos *MIZ1* en maíz, estos SNPs presentan $P\text{-values}$ en un rango de 1.84 a 0.0.

8.5 SNPs/Genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz.

De los 100 SNPs se seleccionaron cuatro como posibles partícipes en la respuesta hidrotrópica, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a su posición (preferentemente en genes), *P-value* (dentro del valor de cohorte), función del gen (con posible relación a la respuesta hidrotrópica), expresión en raíz y/o en condiciones de sequía. Los genes candidatos asociados al hidrotropismo se encuentran en la tabla 8 (filas sombreadas) e incluyen una proteína con dominio de función desconocido DUF1005, que se expresa al inducir estrés osmótico (Batelli et al., 2012), una proteína de la familia NPH3, que participa en la respuesta fototrópica (Motchoulski & Emmanuel, 1999), EGY3 que causa deficiencia de gravitropismo dependiente de la concentración de etileno (Sharp & LeNoble, 2002) y NRT1.1, un transportador de nitratos de doble afinidad (Guo et al., 2003). De acuerdo a un estudio de expresión génica en la raíz de maíz realizado en condiciones de estrés hídrico, los genes mencionados anteriormente se encuentran expresados en este órgano, lo cual sugiere que posiblemente estos genes podrían tener expresión diferencial en la raíz durante la respuesta hidrotrópica de híbridos robustos y débiles (Opitz et al., 2015).

- Dominio de función desconocida 1005
DUF1005 (Domain of Unknown Function 1005)
Gene ID. GRMZM2G078210

Este gen se ubica en el cromosoma 3, y corresponde al SNP con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica (Figura 19, *P-value* de 5.15). Las proteínas con un dominio de función desconocida (DUF por sus siglas en inglés *Domain of Unknown Function*) comprenden un gran conjunto de proteínas que no han sido caracterizadas y por ende cuya función aún no ha sido elucidada (Bateman et al., 2010). De acuerdo a la información disponible en bases de datos, esta proteína se localiza en núcleos y pared celular, es expresada en tallos. De acuerdo a la base de

datos del NCBI presenta 9 copias con un alto porcentaje de similitud en la secuencia de maíz.

En *Arabidopsis thaliana* y *Solanum tuberosum* (papa) una proteína DUF1005 es codificada por el gen *Abiotic Stress Gene 1 (ASG1)*, el cual se expresa en respuesta a la inducción de estrés osmótico en raíces, hojas, tallos y flores de ambas especies. Adicionalmente se ha identificado que este gen es regulado por ABA en *A. thaliana*, no así en *S. tuberosum*. La sobre expresión del gen *ASG1* en papa incrementa la resistencia estomática, es decir cierra los estomas para evitar la pérdida de agua durante la inducción de estrés osmótico (Batelli et al., 2012). En *A. thaliana*, los dominios DUF1005 cuentan con 5 copias en el genoma de la planta, lo cual indica que posiblemente existe redundancia de tal dominio en esta especie.

Recientes experimentos realizados por Pomies et al. (2017) en *Populus tremula* (álamo), mostraron que dos genes que codifican para proteínas con DUF1005 son diferencialmente expresadas como resultado de la curvatura de tallos (mediante curvatura mecánica). Dicha expresión destaca en conjunto con otros genes debido a que presenta valores estadísticamente significativos en comparación con otros genes también expresados en tallos durante la curvatura mecánica del mismo. Entre los genes que encontraron expresándose se identificaron en su gran mayoría aquellos que participan en el remodelamiento de la pared celular, lo cual nos hace especular que posiblemente al igual que la mayoría de los genes identificados *DUF1005* participe en el remodelamiento de la pared celular. Sin embargo, los autores no discuten sobre la posible participación de este gen.

- Familia de genes *NPH3* de la respuesta a luz azul
NPH3 (Non-Phototropic Hypocotyl 3)
Gen ID. GRMZM2G180490

Este gen se encuentra en el cromosoma 7 y presenta dos SNPs asociados fuertemente a la respuesta hidrotópica. Existen reportes donde señalan que el gen *NPH3* está involucrado en la respuesta a luz azul, crecimiento de la punta de la raíz,

organización de la pared celular, crecimiento celular multidimensional, fototropismo, ubiquitinación de proteínas, biogénesis de la pared celular, elongación de los pelos radicales entre otros, además en el genoma de maíz se presentan 29 copias del mismo (Esmon et al., 2005; Zhao et al., 2013; Fankhauser & Christie, 2015).

Los hipocotilos de la mutante *nph3* de *A. thaliana*, muestran una pérdida de la respuesta fototrópica debido a que *NPH3* en conjunto con fototropinas actúan físicamente formando un complejo fotoseñalizador como se observa en la figura 5. Bajo condiciones de luz azul este complejo sufre cambios conformacionales en el lado iluminado de los tallos, lo que produce una acumulación desigual de auxinas en el lado sombreado (Figura 6), generando así una curvatura trópica hacia la luz azul (Fankhauser & Christie, 2015; Motchoulski & Liscum, 1999). Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que en el sistema experimental para observar la respuesta hidrotópica de *A. thaliana*, mutantes *nph3-1* presentan una mayor curvatura hidrotópica en condiciones de oscuridad en comparación con las mutantes examinadas en condiciones de luz (Eapen et al., 2015 [Figura 7]). Esto nos muestra que la mutación del gen *NPH3* incrementa la respuesta hidrotópica en condiciones de oscuridad en *A. thaliana* y posiblemente puede actuar de la misma manera en maíz, favoreciendo la respuesta hidrotópica de híbridos robustos.

- Proteína de unión que produce deficiencia en gravitropismo dependiente de etileno

EGY3 (Ethylene-Dependent Gravitropism-Deficient and Yellow-Green 3)

Gen ID GRMZM2G078210

Este gen se ubica en el cromosoma 1, participa en el plegamiento de proteínas, proteólisis, respuesta a calor, respuesta a altas intensidades de luz, repuesta al peróxido de hidrógeno, igualmente regula el crecimiento de los tallos en conjunto con auxinas, y está involucrado en la formación de aerénquima, además de participar en la respuestas trópicas (Madlung et al., 1999).

Se han aislado mutantes *egy1* en jitomate y se ha observado una mayor producción de etileno que genera deficiencia en la respuesta gravitrópica en raíces, asimismo se han realizado estudios en plántulas de maíz donde se ha reportado que al agregar fluridona (que inhibe la biosíntesis de ABA y genera un aumento en la biosíntesis de etileno) la respuesta gravitrópica se ve disminuida (Sharp & LeNoble, 2002). Se ha generado una hipótesis que plantea que para la generación de la respuesta hidrotópica primero debe eliminarse o superarse la respuesta a la gravedad, por lo cual este gen podría ayudar a eliminar la respuesta a la gravedad, favoreciendo el crecimiento de las raíces hacia el agua.

- Transportador de nitrato de afinidad dual.
NRT1.1 (Dual-affinity nitrate transporter)
Gen ID. GRMZM2G161483

Al igual que el gen *EGY3*, *NRT1.1* se ubica en el cromosoma 1 y presenta al menos 50 copias del mismo a lo largo del genoma de la planta (de acuerdo al NCBI). Se expresa en células guarda y raíces, participa en la apertura/cierre de estomas y señalización de nitrato, que permite al sistema radicular detectar/explorar suelos ricos en este nutriente (quimiotropismo; crecimiento en dirección a compuestos químicos). Mutantes de este gen en *A. thaliana* presentan una disminución en la tasa de transpiración y mayor tolerancia a la sequía en comparación con el fenotipo de plantas tipo silvestre (Guo et al., 2003).

Este gen en maíz posiblemente al estar involucrado en la respuesta hidrotópica participe en la búsqueda de nitrato (disuelto en agua) y permita también el crecimiento de las raíces hacia fuentes de agua. Lo anterior proporciona el crecimiento del sistema radicular a la profundidad evadiendo así la sequía. En experimentos de campo realizados con híbridos DTMA débiles y robustos se midió la temperatura foliar; como resultado de las mediciones se determinó que los híbridos robustos presentan una mayor temperatura foliar en comparación con los híbridos débiles (Datos no mostrados). Ésta observación puede estar relacionada con la tasa de transpiración (una menor temperatura foliar resulta en mayor

transpiración, y viceversa, una mayor temperatura foliar genera menor transpiración [Pallas et al., 1967]). Además, se observó mayor tolerancia a sequía en individuos robustos, el cual es un fenotipo similar al observado en la mutante *nrt1.1* de *A. thaliana* (Guo et al., 2003). Con lo anterior podemos inferir que posiblemente observaremos diferencias en los niveles de expresión de este gen de acuerdo al tipo de respuesta hidrotrópica (débil o robusta), y posiblemente menor en híbridos robustos.

8.6 Expresión de los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica.

Como se mencionó en la metodología (sección 7.2), se utilizó *FPGS* (Fosfolil poliglutamato sintasa) como gen de expresión constitutiva (Li et al., 2015), con los cebadores para este gen se amplificaron las secuencias en cada una de las muestras y se determinó que efectivamente se expresan de forma constitutiva como se puede observar en la figura 26, donde se muestra una imagen del gel de electroforesis (agarosa 2% p/v) con las bandas correspondientes a los fragmentos producto de la amplificación del gen. En este gel se observan 6 carriles numerados, de los cuales los primeros tres corresponden al híbrido 144 clasificado como débil y los tres últimos (del carril 4 al 6) al híbrido robusto DTMA 285 (este orden es el mismo para todos los geles aquí mostrados). Posteriormente se prosiguió con la verificación de la expresión de los 3 genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica a través de GWAS. Después de varias repeticiones de PCR a diferentes temperaturas de hibridación se determinó que los genes *NRT1.1*, *NPH3* y *EGY3* no se expresan en raíces de plántulas de maíz de los híbridos DTMA 144 y 285 (débil y robusto respectivamente) a 6 horas de haber sido sometidas al ensayo de respuesta hidrotrópica. En la figura 27 se muestran las tres imágenes de electroforesis en gel de agarosa (2% p/v) de los 3 genes candidatos antes mencionados.

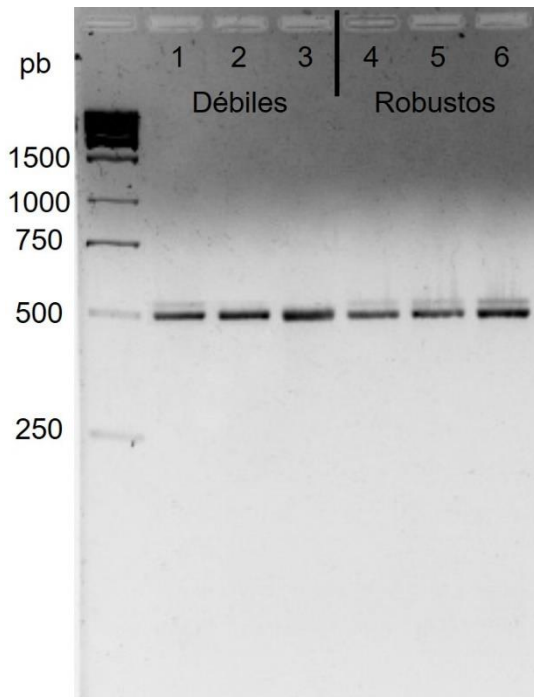


Figura 26. Imagen del gel de electroforesis en agarosa (2% p/v) que muestra la expresión constitutiva del gen *FPGS*. En el gel se observa una intensidad muy similar en todas las condiciones dispuestas de la siguiente manera: 1) Débil 0 horas, 2) Débil 6 horas H₂O, 3) Débil 6 horas K₂CO₃, 4) Robusto 0 horas, 5) Robusto 6 horas H₂O y 6) Robusto 6 horas K₂CO₃.

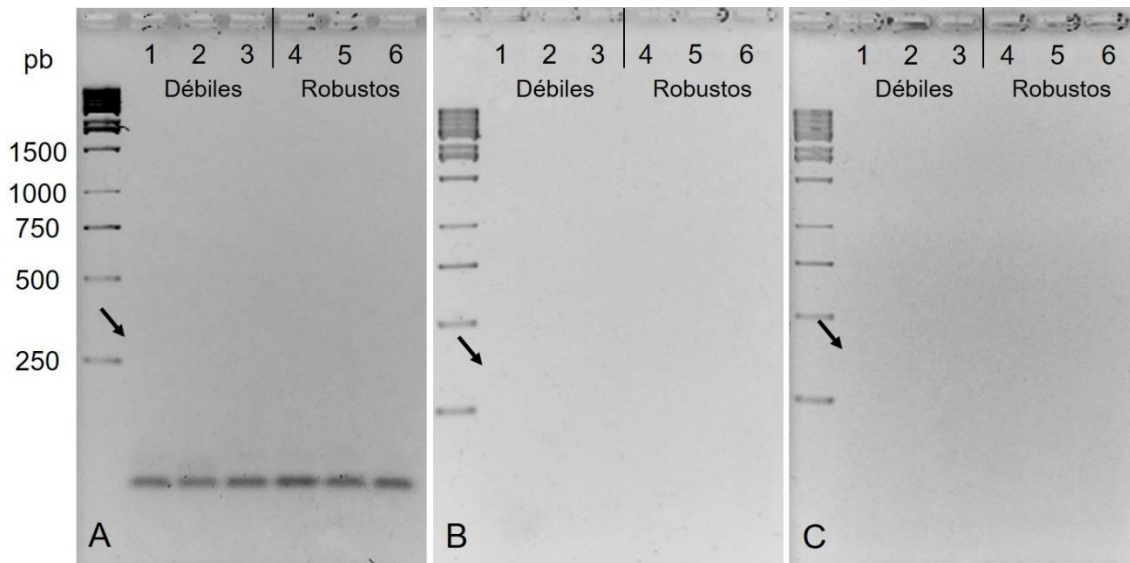


Figura 27. Imágenes de geles de electroforesis en agarosa (2% p/v) para los genes A) *NRT1.1*, B) *NPH3* y C) *EGY3*. Como se aprecia en las imágenes no hubo expresión en el control ni el tratamiento (ensayo hidrotópico), las flechas indican la posición donde deberían estar las bandas de acuerdo al peso esperado de los productos de PCR. Para cada uno de los geles las muestras están dispuesta de la siguiente manera: 1) Débil 0 horas, 2) Débil 6 horas H₂O, 3) Débil 6 horas K₂CO₃, 4) Robusto 0 horas, 5) Robusto 6 horas H₂O y 6) Robusto 6 horas K₂CO₃.

De los cuatro genes candidatos evaluados en este análisis solamente se pudo observar la expresión del gen *DUF1005* (GRMZM2G078210), el cual fue diferente en el híbrido débil y el robusto (Figura 28). En el híbrido robusto (DTMA 285) se observó expresión en las tres condiciones, siendo mayor en las muestras colectadas durante 6 horas con agua añadida al fondo de la caja (control), por su parte, a las 0 horas se observó expresión en menor proporción comparada con 6 horas en agua y aún menos expresión en raíces expuestas al gradiente de humedad generado con carbonato de potasio. En el híbrido débil (DTMA 144) se observó una expresión baja en raíces a las 6 horas con K_2CO_3 en el fondo de la caja, muy similar a la expresión de las 0 horas en el híbrido robusto. En raíces a las 0 horas se observa una muy ligera expresión, mientras que a 6 horas con agua no se observa nada.

Comparando la expresión del gen *DUF1005* entre el híbrido débil y el robusto en cada tratamiento podemos destacar que a las 0 horas se observa la expresión en ambas muestras, siendo menor en el híbrido débil y mucho mayor en el robusto. El híbrido robusto registró la máxima expresión del gen *DUF1005* a 6 horas en el control (con agua en el ensayo), con respecto a otras 5 muestras; en contraste, el híbrido débil no presentó expresión en el mismo tratamiento. En las raíces de plántulas expuestas al gradiente de humedad (con K_2CO_3 en el ensayo) se observó expresión en ambos híbridos, sin embargo esta fue diferente; mayor en el híbrido débil y menor en el robusto (Figura 28). Cabe señalar que el gen *DUF1005* presentó el SNP con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica (*P-value* más alto) de acuerdo al GWAS (Figura 29) en comparación con otros genes candidatos. Otros de los SNPs con *P-values* altos se encuentran en una región intergénica y dentro de los genes *FTSH* (Metaloproteasa de la membrana tilacoidea), *KH-domain* (Dominio homólogo a K) y *hb100* (homeobox 100), que al igual que el gen *DUF1005* podrían expresarse durante la respuesta hidrotrópica y presentar expresión diferencial dependiendo del tipo de respuesta hidrotrópica; débil o robusta.

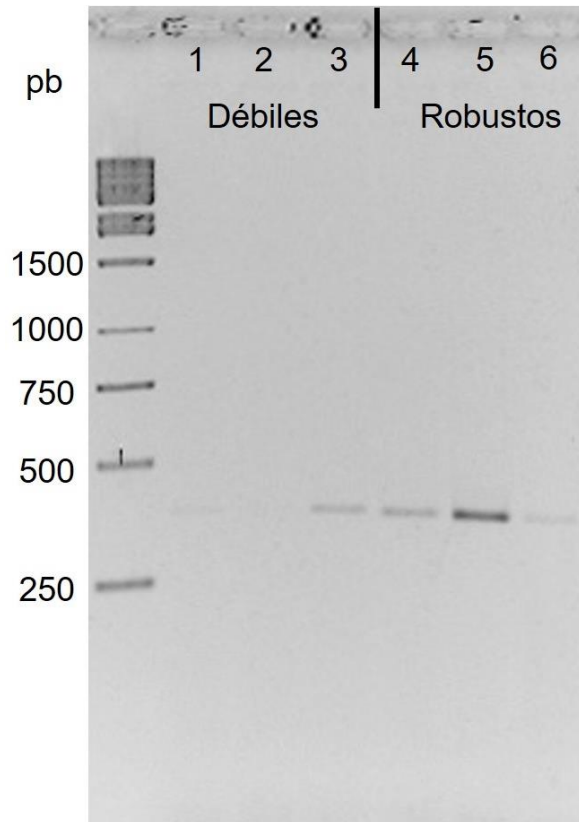


Figura 28. Imagen del gel de electroforesis en agarosa (2% p/v) para el gen *DUF1005*, en el cual se identificó expresión. Nótese que en las tres muestras del híbrido robusto se presenta expresión, siendo la más intensa en la condición 6 horas con H₂O, mientras que en el híbrido débil sólo en el carril 3, que corresponde a 6 horas con K₂CO₃ se observa expresión. El orden de las muestras es el siguiente: 1) Débil 0 horas, 2) Débil 6 horas H₂O, 3) Débil 6 horas K₂CO₃, 4) Robusto 0 horas, 5) Robusto 6 horas H₂O y 6) Robusto 6 horas K₂CO₃. **Nota:** La inclinación de las bandas en el gel fue debido a que el peine tenía la misma forma.

Un punto crucial para este experimento fue el tiempo de exposición al gradiente de humedad (estímulo), los experimentos fueron llevados a cabo durante 6 horas. Sin embargo tomando en cuenta que el GWAS se realizó en base a la respuesta hidrotropica a las 24 horas, comparamos plántulas de 6 horas con plántulas a 24 horas de exposición al gradiente y destacamos que el tamaño de las raíces, la curvatura y tipo respuesta es muy diferente. En la figura 30 se puede observar la diferencia de la respuesta hidrotropica en cuanto a tamaño y vigor de la raíz a las 6

y 24 horas en el sistema de ensayo de la misma. Podemos especular que posiblemente a las 24 horas y/o durante este periodo de exposición al gradiente de humedad los genes que seleccionamos como candidatos asociados a la respuesta hidrotópica (mediante GWAS) se expresan en las raíces, por lo tanto no se descarta la posible participación de los genes que no mostraron expresión a las 6 horas. La extracción de RNA a las 12 y 24 horas, así como la amplificación de las secuencias de interés nos mostrará sí efectivamente estos genes se expresan o no durante la respuesta hidrotópica.

8.7. Comparación del GWAS con el análisis de ligamiento de QTLs para la respuesta hidrotópica en la raíz primaria de maíz.

En nuestro grupo de trabajo además de GWAS se implementan otras técnicas que nos permitan detectar el gen o los genes relacionados a la respuesta hidrotópica; una de ellas es el análisis de ligamiento de QTLs (*Quantitative Trait Locus*), a través del cual se han identificado regiones que podrían ser responsables de este fenómeno en la raíz de maíz. En la primera parte de los resultados obtenidos se han identificado QTLs con alto contenido de SNPs que previamente fueron asociados a la respuesta hidrotópica a través de GWAS, este resultado nos indica que el trabajo realizado hasta el momento resulta contundente, ya que a través de dos métodos con principios diferentes obtenemos resultados similares.

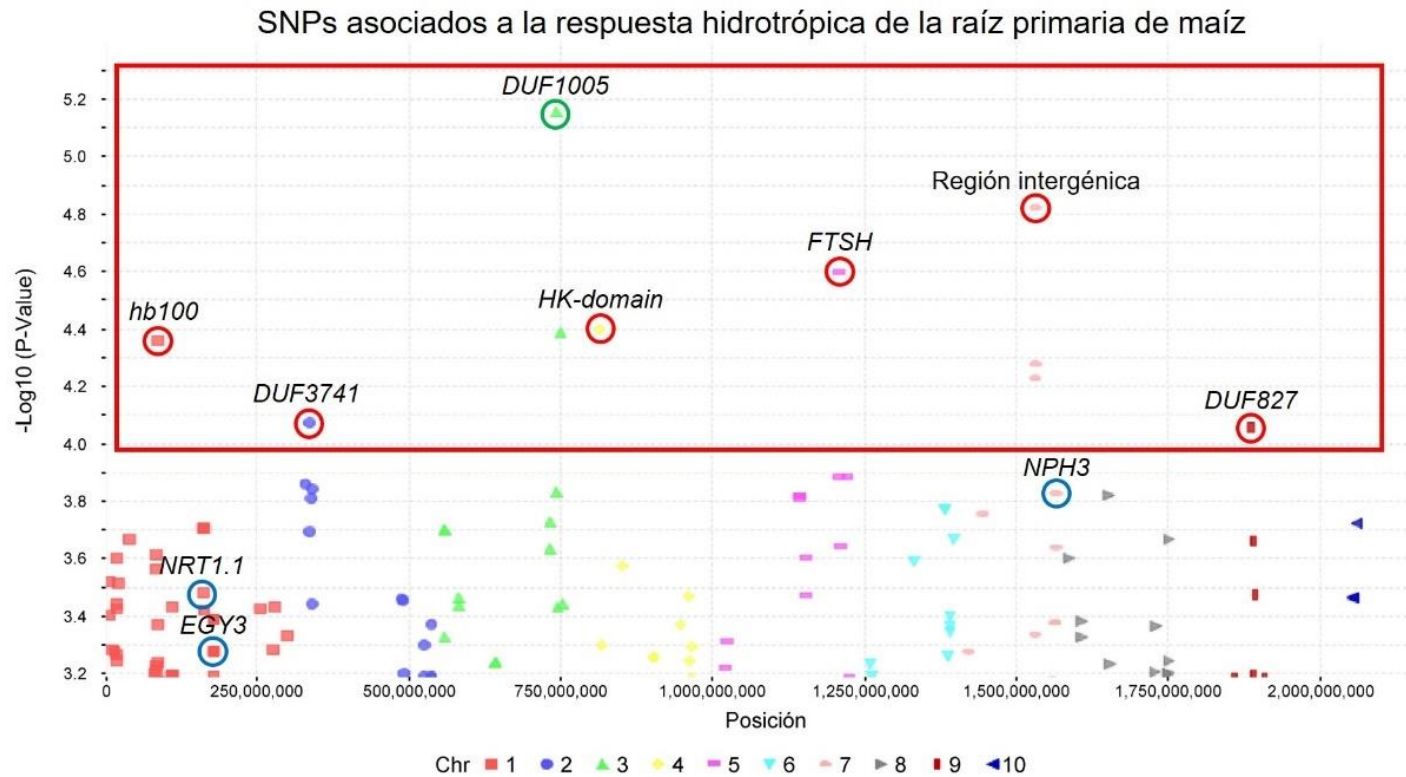


Figura 29. Acercamiento de la gráfica tipo *Manhattan plot* de los 100 SNPs con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica en los cuales se identificó un *P-value* de 5.15 a 3.2, en el recuadro y círculos rojos se encuentran los 6 SNPs con los *P-values* más altos, de los cuales el SNP más asociado se encuentra en el gen *DUF1005* (círculo verde), el cual fue el único gen que mostro expresión a las 6 horas en el sistema experimental de la respuesta hidrotrópica. Otros genes como *hb100*, *KH-domain* o *FTSH* podrían tener participación también durante la respuesta hidrotrópica, sin embargo aún no se analiza su expresión (en círculos azules los genes candidatos asociados a la respuesta hidrotrópica).

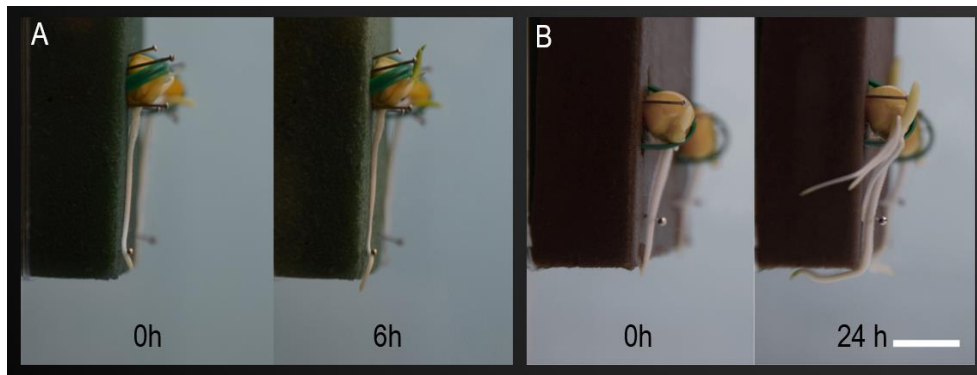


Figura 30. Comparación de raíces a las 6 y 24 horas en el sistema experimental (A; DTMA 283 y B; DTMA 285 respectivamente [ambos robustos]). Nótese que a las 24 horas hay mayor crecimiento de la raíz primaria (aproximadamente 10 veces más), mayor crecimiento de raíces seminales, y mayor intensidad de la respuesta (curvatura). La barra blanca corresponde a 1 cm.

9. Discusión

El objetivo de este trabajo fue *identificar genes asociados a la respuesta hidrotrópica a través de estudios de asociación del genoma completo*, el cual se cumplió al identificar un gran número de SNPs situados en varios genes aparentemente relacionados con la curvatura hidrotrópica de la raíz primaria de maíz, por lo que podemos confirmar que sí es posible analizar este fenómeno a base de análisis estadísticos de asociación genómica (GWAS). Para corroborar la expresión de los genes identificados a través del GWAS de la respuesta hidrotrópica, se hipotetizó que éstos genes se expresarían en el transcurso de la misma, y que su posible participación se reflejaría en la expresión diferencial del híbrido débil y robusto. De igual manera y a modo de referencia para este GWAS se identificaron SNPs asociados a genes *MIZ* que anteriormente se han identificado como asociados a la respuesta hidrotrópica en *A. thaliana*. La señalización del hidrotropismo en la raíz, al parecer es compleja e involucra diferentes vías/procesos fisiológicos y/o moleculares. Aún no hay claridad en cuanto a cómo se detecta la fuente de humedad y cuál es el sensor de los gradientes de humedad, sin embargo, los futuros estudios sobre los genes elegidos como involucrados en esta respuesta pueden ayudar a contestar algunas de estas preguntas.

Con la ejecución de los dos análisis tipo GWAS notamos que para su realización es sumamente importante identificar precisamente el fenotipo que se quiere estudiar, ya que de lo contrario se estarían asociando SNPs que no tienen participación en el fenotipo de interés. Lo anterior fue observado al comparar los resultados de los dos análisis realizados; en el primer GWAS donde no se había discernido que la respuesta gravitrópica puede influir en la respuesta hidrotrópica y el segundo, donde la respuesta a la gravedad quedó eliminada y se realizó el análisis tipo GWAS solamente con la curvatura hidrotrópica de las plántulas de maíz. Comparando los resultados de los dos análisis tipo GWAS encontramos grandes diferencias que nos hicieron razonar sobre la importancia de la identificación y cuantificación rigurosa de los rasgos que se pretenden evaluar. Posiblemente los resultados del primer

análisis son una mezcla de los genes que pudieran participar en la respuesta gravitrópica e hidrotópica.

A varios años de que se publicó el primer borrador de la secuencia del genoma del maíz se tienen muy pocos avances en la identificación de genes funcionales y su anotación, ya que se conoce muy poco sobre la función de la mayoría de los genes presentes. Debido a que la información en las bases de datos de maíz para la mayoría de los genes es escasa, es necesario consultar bases de datos generales y hacer BLAST para identificar los genes con los que se está trabajando. La falta de información es en gran parte debido a que el tamaño del genoma del maíz es grande (2300 Mpb; Schnable et al., 2009). Sin duda se requiere un gran esfuerzo de toda la comunidad científica que trabaja con maíz para completar la anotación de los genes en esta secuencia, y más aún por ser uno de los cultivos de mayor importancia para el mundo y para nuestro país.

En otros análisis de asociación del genoma completo se ha ligado fuertemente una sola región a ciertas características o rasgos de interés, como por ejemplo la biosíntesis del aceite de semillas de maíz (Li et al., 2013) o la producción de metabolitos implicados en el crecimiento del maíz, donde todos los SNPs que se asociaron a este rasgo se ubicaron solamente en el cromosoma 1 (Wen et al., 2014), sin embargo este tipo de resultados habían sido esperados, ya que se tenían previos conocimientos (análisis de QTLs) que indicaban que la producción de estos aceites y metabolitos en maíz estaban regulados por ciertas regiones puntuales en el genoma. Lo anterior es totalmente diferente a los resultados que nosotros observamos para la respuesta hidrotópica de maíz, en la cual se asociaron SNPs en diferentes cromosomas y la mayoría de éstos con poca diferencia en su *P-value*, lo cual sugiere que posiblemente esta respuesta está regulada bajo la participación de diversos genes. De igual manera la gran variedad de genes asociados reflejan la complejidad del mecanismo molecular implicado en la respuesta hidrotópica y del alto número de genes que posiblemente interactúan para desarrollar la misma, similar a lo que ocurre con análisis reportados en tolerancia a sequía (Xue et al., 2013; Wang et al., 2016), donde se asocian varios genes en diferentes cromosomas

que además participan en diferentes procesos que se sugiere trabajan en conjunto para expresar el fenotipo analizado.

Kobayashi y colaboradores (2007) describieron al gen *MIZ1* como esencial para el hidrotropismo en todas las plantas terrestres, lo anterior debido a que es un gen que se encuentra conservado desde musgos hasta plantas superiores, es por ello que esperábamos que este gen se encontrara fuertemente asociado a la respuesta hidrotrópica en maíz, sin embargo, el resultado de búsqueda no muestra esto ya que los genes homólogos a *MIZ* se asociaron débilmente a la respuesta hidrotrópica en maíz. El gen homólogo a *MIZ1* con mayor asociación a la respuesta hidrotrópica de maíz fue GRMZM2G329999 con un *P-value* de 1.84 el cual se encuentra por debajo del valor de cohorte (*P-value* 3.23) definido en el segundo GWAS. Posiblemente la respuesta hidrotrópica en maíz esté regulada por diversos mecanismos fisiológicos y moleculares que le permiten reorientar su crecimiento hacia fuentes de agua, y no por la regulación de un solo gen esencial, como se ha sugerido en *A. thaliana* (Kobayashi, et al., 2007). Quizá el mecanismo de regulación de la respuesta hidrotrópica en maíz requiera la intervención de varios genes para el desarrollo de la misma, posiblemente regulando uno o más genes en cada uno de los procesos necesarios para llevar a cabo esta respuesta, por ejemplo; durante la identificación de un gradiente de humedad, traducción de la señal, la división y expansión celular, así como la elongación de raíz.

Otra posible explicación es que en maíz, al ser una especie diferente a *Arabidopsis* y por las condiciones ambientales en las que se desarrolla, la respuesta hidrotrópica esté regulada por la acción de un gen o genes diferentes a *MIZ1*. De igual manera el proceso de domesticación del maíz pudo haber forjado un cambio que generó la supresión del gen *MIZ1* e impulsó la implementación de otros genes y/o vías que ayudaron a buscar agua ante condiciones de escases. De hecho en nuestro grupo de trabajo se está desarrollando una línea de investigación con teocintle (ancestro del maíz domesticado), a partir de la cual se pretende identificar los mecanismos moleculares que participan en la respuesta hidrotrópica y comparar los resultados

con maíz, para así esclarecer algunas teorías con respecto a la evolución de *MIZ1* producto de la domesticación.

Desafortunadamente no se han identificado los genes responsables del fenotipo de las plantas mutantes *nhr1* y *ahr1* de *A. thaliana*, por lo cual no podemos especular más acerca de esta respuesta en esta planta, no obstante, en estudios realizados en nuestro grupo de trabajo se han identificado algunos de los genes mutados en las mutantes *nhr1* y *ahr1*. Resultados aún no publicados en nuestro grupo de trabajo coincidieron con varios de los genes asociados por GWAS, uno específicamente es el gen *EGY3*, el cual seleccionamos como gen candidato asociado a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria de maíz, una mutación en este gen fue identificada en la mutante *nhr1* carente de respuesta hidrotópica (datos no publicados). Posiblemente este gen participe de alguna manera durante la generación de la respuesta hidrotópica, ya que de acuerdo a Madlung et al. (1999), este gen se modula dependiendo de las concentraciones de etileno en maíz, donde la respuesta a la gravedad se ve inhibida en altas concentraciones de esta hormona. Podríamos especular que al inhibir o evadir la respuesta a la gravedad, aumenta la posibilidad de que la raíz sea capaz de reorientar su crecimiento en dirección a fuentes de humedad. Otros genes que se identificaron en las mutantes *nhr1* y *ahr1* y en el análisis tipo GWAS son; diversos *DUFs*, proteínas con dominios repetidos pentatricopeptido y tetratricopeptido, así como proteínas con repeticiones ricas en leucina y proteínas con dominio HK (Histidina-Kinasa), esta última con un *P-value* muy alto.

Al analizar el efecto fenotípico de los SNPs en híbridos débiles y robustos nos percatamos que a pesar de ser poblaciones de híbridos con un parental en común son genéticamente diferentes, de igual manera observamos que existe un contraste muy marcado en sus secuencias génicas al menos para los 100 SNPs que identificamos como más asociados a la respuesta hidrotópica (Figura 24). Este resultado nos indicó que encontraríamos claras diferencias en los niveles de expresión de dichos genes entre ambas poblaciones (débiles y robustos), lo cual nos hace inferir que en esos genes hay diferencias a nivel de ácidos nucleicos que

podrían ser traducidas a diferencias fenotípicas que posiblemente pudieran estar ligadas a la respuesta hidrotropica de raíces de maíz.

Como resultado del GWAS se asociaron aproximadamente 23 mil SNPs a la respuesta hidrotropica, de los cuales sólo los 100 con el *P-value* más alto fueron seleccionados para identificar su posición, anotación y posible participación en la misma. Actualmente no existen reportes de análisis tipo GWAS para la respuesta hidrotropica, sin embargo se han implementado estudios de RNA-seq en los cuales se han identificado los transcritos de genes expresados durante la generación de la misma en *A. thaliana*. Este análisis fue realizado por Moriwaki y colaboradores (2010), en el cual durante la fase temprana del estímulo hidrotropico identificaron transcritos de 22,810 genes (número de genes similar a los SNPs que asoció GWAS para la respuesta hidrotropica de maíz), cifra que se redujo posteriormente a 793 transcritos con expresión estadísticamente significativa. Al comparar los 100 genes más asociados a la respuesta hidrotropica por GWAS con los resultados de Moriwaki y colaboradores, identificamos algunos genes en común como la UDP-Glucosil transferasa la cual encontramos en el primer GWAS donde se incluyó la respuesta gravitropica. Otros genes en común incluyen; proteínas con repeticiones ricas en leucina, calmodulinas, proteínas con dominio de función desconocida (DUFs) y proteínas con el dominio HK. Estos resultados en conjunto con el hallazgo de *MIZ1*, la mutación del gen *EGY3* en la mutante *nhr1* y algunos otros genes en común para ambos análisis en *A. thaliana* (proteínas con dominio de función desconocida (DUFs) y proteínas con el dominio HK) podrían representar un control positivo del análisis tipo GWAS realizado en el presente estudio. No se descarta la participación de estos genes, ya que podrían ser componentes importantes en la vía de señalización de la respuesta hidrotropica de raíces maíz.

Para la verificación de expresión de los genes identificados por el análisis tipo GWAS, seleccionamos 4 genes como candidatos directos asociados a la respuesta hidrotropica: *DUF1005*, *EGY3*, *NPH3* y *NRT1.1*, los cuales a excepción de *DUF1005* fueron elegidos debido a que anteriormente había sido reportada su participación en algún tropismo o por la alteración de la respuesta hidrotropica en plántulas

mutantes para dichos genes en *A. thaliana*. Por su parte *DUF1005* fue seleccionado debido a que presentó el SNP con mayor asociación a la respuesta hidrotropica en el análisis de asociación genómica (*P-value* 5.15). De los cuatro genes analizados *DUF1005* destacó con la expresión en raíces de plántulas de maíz a 6 horas de estímulo hidrotropico en el sistema de ensayo. Esto también fue confirmado a través de PCR tiempo final, donde determinamos que efectivamente el gen se expresa de forma diferencial entre el híbrido débil 144 y robusto 283 durante el momento en que la respuesta se está efectuando.

Se desconoce el mecanismo molecular a través del cual *DUF1005* participa durante la respuesta hidrotropica, no obstante podemos especular acerca de su posible participación de acuerdo a los reportes que se tienen del mismo. En los experimentos realizados en álamo para identificar los genes responsables de la curvatura de tallos se identificaron algunos genes relacionados al desarrollo de madera y mayoritariamente genes involucrados en la organización y composición de la pared y membrana celular (Pomies et al., 2017). Por lo anterior, especulamos que los DUFs expresados posiblemente están relacionados a la pared y membrana celular aunque no se descarta otra posible función. En caso de que el gen *DUF1005* de maíz estuviera implícito en mecanismos moleculares de la pared y membrana celular como pudiera ocurrir en álamo podríamos especular que se desencadenan mecanismos moleculares similares a los observados en la respuesta tigmotropica, en la que participan proteínas requeridas para el re-modelamiento de la membrana plasmática, reorganización, y expansión celular que en conjunto llevan a cabo la reorientación de los órganos vegetales (Braam, 1996), lo cual ocurre durante cualquier tropismo, ya que todos ellos involucran crecimiento diferencial (reorientación) hacia un estímulo en particular.

Aunado a lo antes mencionado, recientemente Salazar-Blas y colaboradores (2017) reportaron que la mutante *ahr1* (*altered hydrotropic response 1*) requiere una alta tasa de producción celular para mantener el crecimiento robusto en la raíz ante condiciones de déficit hídrico. Esto nos hace especular que si algo similar ocurre en la respuesta hidrotropica de maíz (es decir que se requiera una alta proliferación

celular) posiblemente diversos genes relacionados a la reorganización de la pared y membrana celular sean requeridos. Se han analizado mutantes en genes como *FORMIN* que están implicados en la reorganización y re-modelamiento de pared celular cuyas mutantes en *A. thaliana*, presentan raíces de tamaño reducido en comparación con el fenotipo de plántulas tipo silvestre, lo cual atribuyen a la escasa elongación celular (Rosero et al., 2013). Recordemos que los híbridos débiles mostraron menor expresión de los transcritos del gen *DUF1005* en comparación con los híbridos robustos y que el tamaño de las raíces de híbridos débiles es menor en comparación con las de híbridos robustos, lo cual podríamos relacionar con la capacidad de elongación celular dada por el *DUF1005* en caso de que este gen al igual que en álamo participe en procesos moleculares relacionados a la pared celular. No descartamos que la función de *DUF1005* sea diferente en maíz, tal como ocurre en *A. thaliana*, donde el mismo dominio *DUF1005* aparentemente se expresa en condiciones diferentes (durante la inducción de estrés osmótico; Batelli et al., 2012). Es importante destacar que los dominios proteicos son clasificados de acuerdo a unidades funcionales o estructurales específicas (por ejemplo de acuerdo al plegamiento), por lo cual, dominios similares pueden agrupar proteínas con funciones totalmente diferentes que se pliegan de la misma manera, como aparentemente ocurre con *DUF1005* de *A. thaliana* y álamo.

Consideramos que al no identificar expresión de los genes *EGY3*, *NPH3* y *NRT1.1* a las 6 horas de exposición al sistema de ensayo de la respuesta hidrotópica posiblemente estos genes pueden expresarse diferencialmente en otros tejidos y tiempos, por lo que se propone analizar la expresión de estos genes durante mayor tiempo de exposición al gradiente hídrico tanto en raíces seminales como en coleótilos (donde pudiera expresarse *NPH3*). Es importante que el análisis fenotípico con el que se obtuvieron los datos para efectuar el GWAS fue realizado con plántulas expuestas al sistema de escrutinio durante 24 horas, mientras que el análisis de transcritos se realizó a las 6 horas de exposición al gradiente de humedad. Estas observaciones se tomarán en cuenta para el diseño de los experimentos siguientes y las condiciones para realizar un análisis de RNAseq, el

cual es un método que permite identificar la expresión de genes durante la respuesta hidrotónica.

Cabe destacar la importancia de este tipo de análisis, en los cuales se detectan genes que contribuyen a procesos fisiológicos complejos como el de la respuesta hidrotónica, donde el fenotipo puede deberse a la acción de varios genes o a la interacción entre la señalización de otros estímulos. Sin duda el gran número de SNPs en genes que GWAS asoció a la respuesta hidrotónica requieren de un análisis puntual para posteriormente poder inferir un posible mecanismo de acción.

10. Conclusiones

En general las conclusiones de este análisis son las siguientes:

Se realizó un análisis tipo GWAS para la respuesta hidrotropica de 231 híbridos de maíz DTMA al cual se asociaron más de 23 mil SNPs.

Existen diferencias contrastantes a nivel de cambio de base (SNP) entre las poblaciones de individuos débiles (efecto negativo) y robustos (efecto positivo) identificados a través de un análisis de efecto fenotípico.

MIZ1 está asociado a la respuesta hidrotropica en maíz, sin embargo no se detectó una asociación fuerte en el GWAS, debido a que posiblemente hay varios genes que jueguen un papel más importante que éste durante dicha respuesta.

El SNP con la asociación más fuerte a la respuesta hidrotropica se situó dentro del gen *DUF1005* ubicado en el cromosoma 3.

DUF1005 fue el gen con el SNP de mayor asociación a la respuesta hidrotropica según el resultado de GWAS, y fue el único gen que presentó expresión durante la misma a las 6 horas de estar expuesto al sistema de escrutinio de la respuesta hidrotropica, indicando así su participación en hidrotropismo.

Los genes *NPH3*, *EGY3* y *NRT1.1* no se expresan a las 6 horas de exposición al sistema de escrutinio de la respuesta hidrotropica, sin embargo consideramos que posiblemente pueden expresarse a un mayor (o menor) tiempo de exposición en el sistema de escrutinio de la respuesta hidrotropica.

SNPs asociados en GWAS se identificaron en QTLs asociados a la respuesta hidrotropica de maíz, confirmando así que nuestros resultados son contundentes.

11. Perspectivas

Comparar los resultados finales del análisis de ligamiento con los resultados de GWAS, para determinar cuáles son los SNPs (o genes) y regiones específicas que se asociaron a esta respuesta a través de los dos métodos (que cuentan con principios diferentes).

En el grupo de trabajo tenemos planeado realizar PCR tiempo final y RT-PCR de todos los genes analizados en este estudio en diferentes tejidos de plántulas de maíz en el sistema de escrutinio de la respuesta hidrotrópica a las 0 horas, 6 horas y 24 horas de exposición al gradiente de humedad. Los tejidos/regiones que se tienen contemplados para dicho análisis son coleoptilo, raíces seminales, y raíz primaria (base y punta), de esta manera descartaremos o verificaremos definitivamente la participación de los genes *NPH3*, *EGY3* y *NRT1.1* durante la generación de la respuesta hidrotrópica en raíces de plántulas de maíz.

El objetivo a futuro de este proyecto es: realizar mejoramiento asistido por marcadores, es decir, seleccionar genes involucrados en la búsqueda de agua a través de la selección de SNPs identificados en el análisis tipo GWAS y el mapeo de QTLs para posteriormente con ayuda de cruza tradicionales y marcadores moleculares segregarlos en una población que tenga nuestro fenotipo de interés, que es un sistema radicular robusto, es decir; eficiente en la búsqueda de agua.

12. Literatura Citada

- AgroDer. (2012).** Producción de maíz, México, Comparativo regional de rendimiento de maíz. *AgroDer Sociedad Civil*. México.
- Asturias, M.A. (2004).** Maíz, de alimento sagrado a negocio del hambre. *Red por una América Latina libre de Transgénicos*, Quito, Ecuador.
- Batelli, G., Massarelli, I., Van Oosten, M., Nurcato, R., Vannini, C., Raimondi, G., Leone, A., Zhu, J. K., Maggio, A., & Grillo, S. (2012).** Asg1 is a stress-inducible gene which increases stomatal resistance in salt stressed potato. *Journal of plant physiology*, 169(18), 1849-1857.
- Bateman, A., Coggill, P., & Finn, R. D. (2010).** DUFs: families in search of function. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(10), 1148-1152.
- Blancaflor, E. B., Fasano, J. M., & Gilroy, S. (1998).** Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant physiology*, 116(1), 213-222.
- Blancaflor, E. B., & Masson, P. H. (2003).** Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiology*, 133(4), 1677-1690.
- Braam, J. (2005).** In touch: plants responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*, 165, 373-389.
- Braam, J., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., Xu, W., Purugganan, M.M., Antosiewicz, D.M., Campbell, P., & Johnson, K.A. (1996).** Life in changing world: TCH gene regulation of expression and response to environmental signals. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 909-916.

- Brachi, B., Morris, G.P., & Borevitz, J.O. (2011).** Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. *Genome Biology*. 12(232), 1-8.
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007).** TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633-2635.
- Cassab, G.I., & Sánchez-Guevara, Y. (2008).** Mecanismos de desarrollo y fisiología de raíces de plantas superiores. México, D.F.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). (2017).** Nuestra labor. www.cimmyt.org/es/nuestra-labor/.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005).** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), 169-196.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2016).** Reporte del clima en México. Coordinación General del Servicio Meteorológico Nacional, Gerencia de Meteorología y Climatología, Subgerencia de Pronóstico a Mediano y Largo Plazo. México.
- Contreras-Servín, C. (2005).** Las sequías en México durante el siglo XIX. *Investigaciones geográficas*, (56), 118-133.
- Dai, A. (2011).** Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2(1), 45-65.
- Darwin, C. (1881).** *The power of movement in plants*. John Murray, London.
- Den Herder, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., & De Smet, I. (2010).** The roots of a new green revolution. *Trends in plant science*, 15(11), 600-607.

- Eapen, D., Barroso, M.L., Campos, M.E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J.G., & Cassab, G.I. (2003).** A no hydrotropic response Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 131, 536-546.
- Eapen, D., Barroso. M.L., Ponce, G., Campos, M.E., & Cassab, G.I. (2005).** Hiotropism: root growth responses to water. *Trends in Plant Science*. 10(1), 44-50.
- Eapen, D., Martínez-Guadarrama, J.J., & Cassab., G.I. (2015).** Cap 11. Assay for Root Hydrotropism and Response to Water Stress. *Plant Gravitropism: Methods and Protocols*. New York. Springer New York. Pp 133-142.
- Eapen, D., Martínez-Guadarrama, J., Hernández-Bruno, O., Flores, L., Nieto-Sotelo, J., & Cassab, G.I. (2017).** Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Science*. 265, 87-99.
- Esmon, C.A., Pedmale, U.V. & Liscum, E. (2005).** Plant tropism: providing the power of movements to a sessile organism. *International Journal of Developmental Biology*. 49(5-6), 665-674.
- Fankhauser, C., & Christie, J.M. (2015).** Plant Phototropic Growth. *Current Biology*. 25(2), 384-389.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2013).** Drought. USA.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura), (2016).** Panorama Agroalimentario, Maíz 2016. México.
- García, S. O., & Arnaiz, A. O. (2006).** México como el centro de origen del maíz y elementos sobre la distribución de parientes silvestres y variedades o razas de maíz en el norte de México. *Revista de Geografía Agrícola*. 38, 141-150.

- Guo, F-Q., Young, J., & Crawford, N.M. (2003).** The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell*. 15, 107-117.
- Hirasawa, T., Takahashi, H., Suge, H., & Ishihara, K. (1997).** Water potential, turgor and cell wall properties in elongating tissues of the hydrotropically bending roots of pea *Pisum sativum* L. *Plant, Cell & Environment*. 20, 381-386.
- Hooker, H.D. (1915).** Hydrotropism in roots of *Lupinus albus*. *Annals of Botany*. 2, 265-283.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). (2010).** Sequía: Vulnerabilidad, impacto y tecnología para afrontarla en el Norte Centro de México. Libro Técnico. México.
- Jaffe, M.J., Takahashi, H., & Biro, R.L. (1985).** A pea Mutant for the Study of hydrotropism in Roots. *Science*, 230, 445-448.
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., & Waaland, S. (2012).** *Molecular life of plants*. Wiley-Blackwell.
- Knight, T.A. (1811).** On the causes which influence the direction of growth of roots. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2, 209-219.
- Kiss, J.Z. (2007).** Where's the water? Hydrotropism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 114(11), 4247- 4278.
- Kobayashi A., Takahashi, A., Kakimoto, Y., Miyazawa, Y., Fuji, 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.
- Korte, A., & Farlow, A. (2013).** The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*. 9(29), 1-9.
- Krieger, G., Shkolnin, D., Miller, G., & Fromm, H. (2016).** Reactive oxygen species tune root tropic responses. *Plant Physiology*. 102, 1209-1220.

- Lafitte, H.R. (1993).** Identificación de problemas en la producción de maíz tropical, guía de campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México D.F.
- Lesur, M. (2005).** Manual del cultivo del maíz: una guía paso a paso. *Colección: como hacer bien y fácilmente.* México.
- Li, H., Peng, Z., Yang, X., Wang, W., Fu, J., Wang, J., Liu, J., Han, Y., Chai, Y., Guo, T., Yang, N., Cheng, Y., Hao, X., Wang, G., Li, J., & Yan, J. (2013).** Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels. *Nature Genetics*, 45(1), 43-50.
- Li, L., Hill-Skinner, S., Liu, S., Beuchler, D., Tang, H.M., Yeh, C.T., Nettleton, D., & Schnable, P.S. (2015).** The maize brown *midrib4* (*bm4*) gene encodes a functional foylpolylpolyglutamate synthase. *The Plant Journal*. 81(2), 493-504.
- Liu, S., Wang, X., Wang, H., Xin, H., Yang, X., Yan, J., Li, J., Tran, L.S.P., Shinozaki, K., YamaguchiShinozaki, K., & Qin, F. (2013).** Genome-Wide Analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. *PLoS Genetics*. 9(9), 1-14.
- Madlung, A., Behringer, F. J., & Lomax, T. L. (1999).** Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato. *Plant physiology*, 120(3), 897-906.
- McCormack, E., Velasquez, L., Delk, N. A., & Braam, J. (2006).** 17 Touch-Responsive Behaviors and Gene Expression in Plants. *Communication in plants*, 249.
- Manoli, A., Sturaro, A., Trevisan, S., Quaggiotti, S., & Nonis, A. (2012).** Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology*. 169, 807-815.

- Miyazawa, Y., Takahashi, A., Kobayashi, A., Kaneyasu, T., Fujii, N., & Takahashi, H. (2009).** GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of Arabidopsis roots. *Plant Physiology*, 149(2), 835-840.
- Molisch, H. (1883).** Untersuchungen über Hydrotropismus. *Sitzungsberichte Akad. Wiss., Wien*. 88: 897-943.
- Moriwaki, T., Miyazawa, Y., & Takahashi, H. (2010).** Transcriptome analysis of gene expression during the hydrotropic response in Arabidopsis seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 69(2), 148-157.
- Motchoulski, A., & Liscum, E. (1999).** Arabidopsis NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science*, 286(5441), 961-964.
- Núñez, A., Ritchie, Joe., & Smucker, A.J.M. (1998).** El efecto de la sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*. 9 (2), 1-8.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2012).** Drought is a global problem. <http://www.un.org/apps/news>.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2017).** Conflict and drought deepen food insecurity in Africa, Middle East. UN agency. <http://www.un.org/apps/news/story>.
- Opitz, N., Marcon, C., Paschold, A., Malik, W.A., Lithio, A., Brandt, R., Piepho, H.P., Nettleton, D., & Hochholdinger, F. (2015).** Extensive tissue-specific transcriptomic plasticity in maize primary roots upon water deficit. *Journal of Experimental Botany*. 67(4), 1095-1107.
- Pallas, E.J., Michel, B.E., & Harris, D.G. (1967).** Photosynthesis, transpiration, leaf temperature and stomatal activity of cotton plants under varying water potentials. *Plant Physiology*. 42, 76-88.

- Pedmale, U. V., Celaya, R. B., & Liscum, E. (2010).** Phototropism: mechanism and outcomes. *The Arabidopsis Book*, e0125.
- Pérez-Suárez, T. (2001).** Los Olmecas y los Dioses del maíz en Mesoamérica. *Instituto de Investigaciones Filológicas, UNAM*. México D.F.
- Ponce, G., Rasgado, F.A., & Cassab, G.I. (2008).** Roles of amyloplasts and water deficit in root tropism. *Plant, cell & environment*, 31(2), 205-217.
- Pomies, L., Decourteix, M., Franchel, J., Moulia, B., & Leblanc-Fournier, N. (2017).** Polar stem transcriptome is massively remodeled in response to single or repeated mechanical stimuli. *BMC Genomics*. 18(300), 1-16.
- Qin, P., Lin, Y., Hu, Y., Liu, K., Mao, S., Li, Z., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., & Zheng, Y. (2016).** Genome-wide association study of drought-related resistance traits in *Aegilops tauschii*. *Genetics and molecular biology*, (AHEAD), 0-0.
- Raven, P.H., & Johnson, G.B. (2004).** *How plants grow in response to their environment*. Biology 6th edition. McGraw-Hill, Boston. Pp 807-810.
- Rosero, A., Zarsky, V., & Cvrckova, F. (2013).** *AtFH1* formin mutation affects actin filament and microtubule dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 64(2), 585-597.
- Salazar-Blas, A., Noriega-Calixto, L., Campos, M. E., Eapen, D., Cruz-Vázquez, T., Castillo-Olamendi, L., Sepulveda-Jiménez, G., Porta, H., Dubrovsky, J.G., & Cassab, G.I. (2017).** Robust root growth in *altered hydrotropic response1 (ahr1)* mutant of *Arabidopsis* is maintained by high rate of cell production at low water potential gradient. *Journal of Plant Physiology*, 208, 102-114.
- Sánchez-Lacy, A.R. (2006).** Mitos del maíz. *Artes de México*. No. 79 México, D.F.

- 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.
- Saucedo, M., Ponce, G., Campos, M. E., Eapen, D., García, E., Luján, R., Sánchez, Y., & Cassab, G. I. (2012).** An altered hydrotropic response (ahr1) mutant of *Arabidopsis* recovers root hydrotropism with cytokinin. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3587-3601
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... & Minx, P. (2009).** The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326(5956), 1112-1115.
- SE (Secretaría de Economía). (2012).** Análisis de la Cadena de Valor Maíz-Tortilla: Situación Actual y Factores de Competencia Local. Secretaría de Gobierno. [Boletín disponible en línea].
- SE (Secretaría de Economía). (2016).** Sistema de Información e Integración de Mercados. Secretaría de Gobierno. [Boletín disponible en línea].
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2014).** Análisis espacial de las regiones más vulnerables ante las sequías en México. Gobierno federal [Boletín disponible en línea].
- Sharp, R.E. & LeNoble, M.E. (2002)** ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under stress. *Journal of Experimental Botany*. 53(366), 33-37.
- Singh, V., Van Oosterom, E.J., Jordan, D.R., Messina, C.D., Cooper, M., & Hammer, G.L. (2010).** Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil*. 333: 287-299.
- Takahashi, H. (1997).** Hydrotropism: the Current State of Our Knowledge. *Journal of Plant Research*. 110, 163-169.
- Takahashi, H., & Scott, T.K. (1991).** Hidrotropism and its Interaction with Gravitropism in Maize Roots. *Plant Physiology*. 96, 558-564.

- Takahashi, H., & Scott, T.K. (1993).** Intensity of hydrostimulation for the induction of root hydrotropism and its sensing by the root cap. *Plant, Cell & Environ.* 16, 99-103.
- Takahashi, H., & Suge, H. (1991).** Root hydrotropism of an agravitropic Pea mutant, *ageotropum*. *Physiologia Plantarum.* 82, 24-31.
- Takahashi, N., Yamazaki, Y., Kobayashi, A., Higashitani, A., & Takahashi, H. (2003).** Hydrotropism Interacts with Gravitropism by Degrading Amyloplasts in Seedlings Roots of Arabidopsis and Radish. *Plant Physiology.* 132, 805-810.
- Takahashi, N., Goto, N., Okada, K., & Takahashi, H. (2002).** Hydrotropism in abscisic acid, wavy and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 216, 203-211.
- Taiz, L., Zeiger, E., moller, I.M., & Murphy, A., (2015),** *Plant physiology and development.* Sinauer Associates, Incorporated.
- The Wellcome Trust Case Control Consortium. (2007).** Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shares controls. *Nature.* 447, 661-678.
- Tian, F., Bradbury, P.J., Brown, P.J., Hung, H., Sun, Q., Flint-Garcia, S., Rocherford T.R., McMullen, M.D., Holland, J.B., & Buckler, E.S. (2011).** Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. *Nature Genetics.* 43(2): 159-162.
- USDA (United States Department of Agriculture). (2016).** World Agricultural Supply and Demand Estimates, WASDE. USA.
- Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., & Yang, J. (2012).** Five years of GWAS discovery. *The American Journal of Human Genetics.* 90, 7-24.
- Vuh, P. (1953).** *Las antiguas historias del Quiché.* Fondo de Cultura Económica.

- Wang, N., Wang, Z. P., Liang, X. L., Weng, J. F., Lv, X. L., Zhang, D. G., Yang, J., Yong, H., Li, M., Li, F., Jiang, L., Zhang, S. H., Hao, Z. f., & Li, X. H. (2016).** Identification of loci contributing to maize drought tolerance in a genome-wide association study. *Euphytica*, *210*(2), 165-179.
- Wen, w., Li, D., Li, X., Gao, Y., Li, W., Li, H., Liu, J., Liu, H., Chen, W., Luo, J., & Yan, J. (2014).** Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights. *Nature Communications*. *5*:3438 10-1.
- Weng, J., Xie, C., Hao, Z., Wang, J., Liu, C., Li, M., Zhang, D., Bai, L., Zhang, S., & Li., X. (2011).** Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Genes That Affect Plant Height in Chinese Elite Maize (*Zea mays* L.) Inbred Lines. *PLoS ONE* *6*(12): e29229.
- Xue, Y., Warburton, M. L., Sawkins, M., Zhang, X., Setter, T., Xu, Y., Grudloyma, P., Gethi, J., Ribaut, J. M., Li, W., Zhang, X., Zheng, Y., & Yan, J. (2013).** Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. *Theoretical and applied genetics*, *126*(10), 2587-2596.
- Yamakake, K., Sánchez, T. Á. M., Ovando, C. M., & Hernández, L. M. S. (2009).** Origen y diversificación del maízuna revisión analítica. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México D.F.
- Zaidi, P. H., Seetharam, K., Krishna, G., Krishnamurthy, L., Gajanan, S., Babu, R., Zerka, M., Vinayan, M. T., & Vivek, B. S. (2016).** Genomic Regions Associated with Root Traits under Drought Stress in Tropical Maize (*Zea mays* L.). *PloS one*, *11*(10), e0164340.

Zhao, X., Wang, Y. L., Qiao, X. R., Wang, J., Wang, L. D., Xu, C. S., & Zhang, X. (2013). Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in Arabidopsis by altering cytosolic calcium. *Plant Physiology*, 162(3), 1539-1551.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
MÉXICO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
POSGRADO EN CIENCIAS

50 años
Autonomía
1963

CICSA

DR. RAMÓN GONZALEZ GARCIA-CONDE
COORDINADOR DEL POS
GRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotópica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS)" que presenta el alumno Jesús Jonathan Martínez Guadarrama (5620150701) para obtener el título de Maestría en Ciencias.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Raúl Arredondo Peter CIDC-UAEM	Aprobado	<i>R. Arredondo Peter R.</i>
Dr. Nelson Avonca Vergara CIDC-UAEM	Aprobado	<i>N. Avonca Vergara</i>
Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC-UAEM	Aprobado	<i>A. Hernández Mendoza</i>
Dra. Delfeena Espartero IST-UNAM	Aprobado	<i>Delfeena Espartero</i>
Dra. Gladys Iliana Cessabi López IST-UNAM	Aprobado	<i>Gladys Iliana Cessabi López</i>

