



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de asociación genómica (GWAS) de marcadores
moleculares asociados a la elongación del coleoptilo en
plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones
de siembra profunda

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Angel Raymundo Alonso Hernández

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Jorge Nieto Sotelo



2019

Ciudad Universitaria, Cd. de México



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Alonso

Hernández

Angel Raymundo

55 54 33 54 20

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307071039

2. Datos del tutor

Dr

Jorge

Nieto

Sotelo

3. Datos del sinodal 1

Dra

Gladys Iliana

Cassab

López

4. Datos del sinodal 2

Dra

Alicia

Gamboa

de Buen

5. Datos del sinodal 3

Dr

Javier Andrés

Juárez

Díaz

6. Datos del sinodal 4

M en C

Gabriel Sinué

Fonseca

Salazar

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de asociación genómica (GWAS) de marcadores moleculares asociados a la elongación del coleoptilo en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de siembra profunda

64 p

2019

“... mientras este planeta ha ido girando según la constante ley de la gravitación, se han desarrollado y se están desarrollando, a partir de un principio tan sencillo, infinidad de las formas más bellas y portentosas.”

-Charles Darwin

"Aceptar nuestro parentesco con todas las formas de vida sobre la Tierra, no es solo ciencia concreta, en mi opinión, también es una experiencia espiritual elevada"

- Neil deGrasse Tyson

Agradecimientos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fisiología Molecular del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Jorge Nieto Sotelo, con el apoyo de los proyectos DGAPA-PAPIIT-UNAM (IG200515) y CONACYT (PN247732).

En primer lugar, agradezco al comité de sinodales encargado de revisar este trabajo, quienes con sus valiosas observaciones y comentarios contribuyeron a su mejora. Gracias por su tiempo a la Dra. Gladys Iliana Cassab López, a la Dra. Alicia Gamboa de Buen, al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz y al M. en C. Gabriel Sinué Fonseca Salazar.

Asimismo, quiero reconocer las oportunidades que me brindó la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales me permitieron acceder a una educación superior, pública, gratuita y laica. En especial, agradezco a la Facultad de Ciencias y a los excelentes profesores que con su valioso nivel académico contribuyeron a mi formación profesional como biólogo.

Por otro lado, quiero dar las gracias a los miembros del laboratorio de Fisiología Molecular: Alberto, Alejandra, Alejandro, Eric, Jesús y Lucy. Agradezco profundamente el apoyo del M. en C Leopoldo Vázquez, quien, con mucho esfuerzo, me instruyó en las herramientas para el análisis bioinformático de datos genómicos. Especialmente, mi gratitud total con el Dr. Jorge Nieto Sotelo, quien fungió como tutor de este trabajo académico. ¡Gracias por la confianza al permitirme integrarme a su equipo de trabajo! En este sentido, quiero reconocer su labor como científico y su enorme compromiso como líder del laboratorio y, sobre todo, por su paciencia y generoso esfuerzo por transmitir sus conocimientos a sus alumnos.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias, quienes contribuyeron a mi estabilidad emocional. Recuerdo en los primeros semestres a los integrantes "del biofilm": Jessica, Alejandra, Luis, Elisa y Diana. A los que se unieron posteriormente a mi vida, mis seres vivos favoritos en la Facultad: Carolina, Gabriela, Marina, Maru, Nahui, Natalia, Paola, Ulises y Bren. A ustedes, les agradezco infinitamente por estar y permitirme compartir angustias, incertidumbres y certidumbres académicas y de vida. A mi estimado Jhon, quien fue un invaluable compañero de carrera, desvelos, tazas de café y de un cuarto 3x3. A Mariana Valeria, que, si bien su estancia académica fue temporal, su contribución en mi vida ha sido permanente.

Agradezco con especial énfasis a mi familia y a quienes ahora forman parte de ella. A mi abuela, "mamá Toñita", y a mi mamá Yolanda, quienes han sido un gran ejemplo de bondad, incondicionalidad, fortaleza y guías constantes en mi formación como individuo. A mis tías Gloria, Mireya y Rosalba, quienes además de ayudarme a dar mis primeros pasos, entre lecturas, me presentaron a Juan Rulfo y Manuel Payno, entre otros, con lo que inconscientemente contribuyeron a mi gusto por la lectura y el estudio. A mi papá que me mostro que la felicidad se busca desde la individualidad. No me olvido de mis hermosas criaturas de la evolución: Alexa, Alexis, Antonio, Diana, Fernanda, Jatziry y Uriel, quienes me motivan a esforzarme. Y por último a David, quien es la prueba fehaciente de que las personas somos el resultado de instantes azarosos que redireccionan y trascienden.

Índice

Resumen

Introducción.....	1
Prácticas agrícolas tradicionales.....	1
La siembra profunda.....	1
Características morfológicas que contribuyen a la emergencia de las plántulas bajo siembra profunda.....	3
El coleoptilo: origen embrionario, desarrollo y fisiología.....	3
El crecimiento del coleoptilo.....	6
El crecimiento por división celular.....	6
El crecimiento por elongación celular.....	8
Factores fisiológicos	9
Factores genéticos	11
GWAS: Análisis de asociación genómica para el estudio de rasgos complejos.....	12
Antecedentes.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
Materiales y métodos.....	16
Material biológico y fenotipificación.....	16
Variación de la longitud del coleoptilo, análisis de correlación lineal entre las estructuras y aportación del coleoptilo a la emergencia.....	17
Genotipificación y análisis de GWAS	17
Resultados	20
Discusión	34
Variación en la longitud del coleoptilo.....	34
Genes candidatos putativos.....	35
Metabolismo y transporte de auxinas.....	35
Metabolismo de la pared celular y espacio apoplástico	37
Actividad lipasa-esterasa	40
Unión a ATP.....	41
Factores de transcripción y unión a DNA.....	43
Conclusiones	47
Perspectivas	47
Referencias	49
Abreviaturas	58
Anexo	59

Resumen

La siembra profunda es una práctica agrícola que permite la germinación y el establecimiento óptimo de diversos cultivos aun en condiciones de déficit hídrico. No todas las variedades de cultivos se pueden utilizar bajo este manejo, siendo el factor limitante la capacidad de las plántulas para emerger a la superficie. El coleoptilo es una estructura embrionaria vegetal que tiene un papel fundamental en la emergencia y en el establecimiento de plántulas de algunas gramíneas. La variación en el tamaño y en la capacidad de elongación del coleoptilo es un carácter complejo que está influenciado por la interacción de factores ambientales y genéticos. En este trabajo se realizó el análisis de correlación lineal entre la longitud del coleoptilo y el mesocotilo, el tallo, la plúmula, la raíz principal y las raíces adventicias asociadas al nodo coleoptilar, de 10,841 plántulas de una colección endogámica de maíz (*Zea mays* L.) sometidas a condiciones de siembra profunda. Los resultados sugieren que el tamaño del coleoptilo no contribuye de manera significativa a la emergencia de las plántulas en la población de estudio. Así mismo, se realizó un estudio de asociación genómica (*GWAS*, por sus siglas en inglés) en líneas endogámicas de maíz con 134, 648 polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*, por sus siglas en inglés) para detectar genes asociados implicados en la variación del tamaño del coleoptilo. Se obtuvieron 28 SNP ($\geq 3.5 -\log_{10}$), de los cuales 23 estuvieron asociados a marcos de lectura abierta de un gen. Los genes candidatos encontrados en este trabajo codifican a factores de transcripción, proteínas estructurales tanto de la pared celular como de la membrana plasmática y a enzimas relacionadas con respuestas a la luz y a las auxinas.

Introducción

Prácticas agrícolas tradicionales

Actualmente en México existen 54 variedades de maíz (*Zea mays* L.). Cada una es el resultado de una selección participativa de diversas comunidades humanas las cuales, a través de la selección e intercambio de germoplasma, han adaptado dichas variedades a una gran cantidad de ambientes a lo largo de decenas de generaciones (van Heerwaarden *et al.*, 2011; Wellhausen, 1951). Las adaptaciones específicas de cada variedad les permiten sobrevivir a condiciones ambientales particulares de la región en la que han sido domesticadas. En este sentido la diversificación generada, aún en la actualidad, corresponde a la diversidad de prácticas agrícolas tradicionales bajo las cuales se cultiva y domestica al maíz y, a su vez, estas corresponden a elementos sociales, culturales, económicos y ambientales. El conocimiento de las prácticas, así como de las características fenotípicas de las variedades resultantes de la adaptación local nos permitirán hacer frente a las demandas agronómicas que surgen como resultado de los retos ambientales actuales, tales como la sequía y el calor.

La siembra profunda

La siembra profunda es una práctica agrícola utilizada en regiones áridas y semiáridas alrededor del mundo (Muñoz y Pérez, 2002; Rebetzke *et al.*, 2005; Rebetzke *et al.*, 2007; Mohan *et al.*, 2013;). Las semillas de diversas especies agrícolas son comúnmente sembradas en profundidad para acceder a la humedad residual de las capas inferiores del suelo (Rebetzke *et al.*, 2014; Muñoz y Pérez, 2002).

El éxito de este tipo de manejo depende en gran medida de la capacidad de las plántulas para emerger a la superficie del suelo (Rebetzke *et al.*, 2016). A su vez, la emergencia está en función de la capacidad de elongación de algunos órganos vegetales, como el mesocotilo y el coleoptilo (Radford y Henzell, 1990; Simon y Yuri, 2011). La mayoría de los híbridos mejorados de diversos cultivos no tienen la capacidad de emerger a la superficie bajo condiciones de siembra profunda y mueren a los pocos días de la germinación (Collins, 1914; Muñoz y Pérez, 2002).

En el altiplano noroccidental del estado de Oaxaca, se lleva a cabo una práctica agrícola conocida como agrosistema de maíz de cajete, que es una contribución

del grupo étnico de los mixtecos. Una de sus principales características consiste en generar un cajete, escarbando hasta encontrar la humedad, se perfora un agujero en cuyo fondo se deposita a la semilla y se cubre con la tierra húmeda. La semilla se coloca a 35 cm de profundidad (Muñoz y Pérez, 2002).

Otro ejemplo de práctica agrícola en donde el maíz es sembrado en profundidad es el de las comunidades originarias Hopi, Navajo y Zuni, en el desierto estadounidense de Arizona. Dichas comunidades colocan la semilla a profundidades que oscilan de los 15 a los 45 cm, de esta manera proveen de la humedad adecuada a la semilla para hacer posible su germinación (Collins, 1914).

Por otra parte, la siembra de trigo (*Triticum aestivum* L.) es posible en regiones con precipitación anual menores a los 300 mm mediante prácticas de siembra profunda. En el noroeste de Estados Unidos, occidente y suroeste de Australia, centro de Chile y algunas regiones cerca del Mediterráneo, este cultivo es sembrado entre 10 y 20 cm por debajo de la superficie del suelo dentro de surcos profundos (Mohan *et al.*, 2013). Así mismo, en el altiplano de Loess en China, una región con un clima árido y semiárido, se ha observado que la captación de agua por parte de la raíz de plántulas de trigo ocurre de manera más eficiente entre los 10 y 20 cm de profundidad y que, a medida que la planta crece, la mayor cantidad de agua captada proviene de zonas más profundas, llegando incluso a los 300 cm (Wang *et al.*, 2016).

Por otro lado, las variedades Segalane y 65D de sorgo presentan mayor emergencia con tan solo 3 cm de diferencia en la profundidad de siembra. Estas variedades son ampliamente sembradas en regiones semiáridas de la República de Botsuana, al sur de África, que recibe una precipitación anual de entre 400 y 600 mm (Harris *et al.*, 1987).

Por el uso de la humedad residual de las capas inferiores del suelo en ambientes de déficit hídrico, claramente la siembra profunda puede ser vista como un importante factor de resistencia a sequía.

Características morfológicas que contribuyen a la emergencia de las plántulas bajo siembra profunda

No todas las variedades de maíz, y de otros cultivos, son proclives a ser usadas en esta modalidad de manejo. Debido a la profundidad a la que es depositada la semilla, con respecto a la siembra convencional, las plántulas bajo siembra profunda requieren de una mayor capacidad para emerger. A tales profundidades algunas variedades mueren antes de llegar a la superficie.

De manera general, se conoce que el potencial de emergencia está en función de la capacidad de elongación de algunas de sus estructuras embrionarias vegetales. Por ejemplo, en el maíz y el sorgo, el órgano que más contribuye a la emergencia en respuesta a la siembra profunda y al establecimiento de las plántulas es el mesocotilo. En las variedades de maíz Hopi y Navajo, este órgano puede alcanzar tamaños de hasta 30 cm, mientras que en la gran mayoría de los híbridos modernos el tamaño del mesocotilo de una plántula sembrada profundamente oscila entre los 3 y 11 cm (Nieto-Sotelo y Cassab, 2012), lo que las vuelve incapaces de emerger a profundidades mayores de 10 o 20 cm.

Por otra parte, la estructura que contribuye en mayor medida a la emergencia de trigo y arroz (*Oryza sativa* L.), es el coleoptilo. En el primer caso se ha documentado que la longitud del coleoptilo oscila entre 34 y 114 mm (Mohan *et al.*, 2013), mientras que en el arroz alcanza un valor máximo de 40 mm (El-Hendawy *et al.*, 2014). Cabe señalar que, a pesar de las diferencias de longitud intraespecíficas, en todos los casos un mayor tamaño del coleoptilo correlaciona positivamente con el porcentaje de emergencia y el establecimiento de las plántulas.

El coleoptilo: origen embrionario, desarrollo y fisiología

El coleoptilo tiene su origen en estadios tempranos del desarrollo embrionario del maíz. La fusión de una célula espermática (n) y la célula del huevo (n) originan al cigoto (2n), el cual comienza su desarrollo con procesos de división celular por mitosis. Al cabo de 75 horas el proembrión consiste de 12 a 24 células pequeñas en el hemisferio apical (embrión), mientras que la parte basal consiste de pocas células de tamaño pequeño (suspensorio), es decir, se establece una polaridad basal-apical (Sheridan y Janice, 1994). Posteriormente, se comienza a generar una gran actividad mitótica que da origen al meristemo apical radical y al meristemo apical

caulinar (*shoot apical meristem*). Simultáneamente, el embrión se ensancha hacia la parte posterior para formar el escutelo y al mismo tiempo una cresta semicircular de células aparece en la cara anterior apical y se extiende hasta encerrar el meristemo caulinar. En este momento, el embrión ahora posee un prominente meristemo apical rodeado del anillo coleoptilar, dentro del cual al cabo de 15 días aparecerá la plúmula con 5 o 6 primordios foliares (Sheridan y Janice, 1994). El coleoptilo es una estructura efímera que desaparece poco tiempo después de la germinación (Inada *et al.*, 2002).

De manera general se puede definir al coleoptilo como un órgano vegetal embrionario característico de las monocotiledóneas (Avery, 1930). Han existido distintas interpretaciones sobre su funcionamiento y naturaleza biológica. Schleiden (1839) concluye que el coleoptilo es una lígula y en el mismo año, De Jussieu (1839) lo interpreta como una estructura homóloga a un cotiledón verdadero. Estudios anatómicos posteriores en trigo y otras monocotiledóneas (Lestiboudois, 1848) respaldan esta última conclusión. Por otra parte, algunos trabajos consideran al coleoptilo como la segunda o tercera hoja de la planta (Avery, 1930).

En la actualidad, la homología morfológica y funcional del coleoptilo con otras hojas es aún cuestionada. Sin embargo, generalmente se le considera como un tejido especializado que protege a las hojas jóvenes (Inada *et al.*, 2002). Además, su morfología está asociada a facilitar el acceso de la plántula a la superficie, debido a que la punta del coleoptilo, que es alargada, aguda y rígida, puede abrirse paso a través del suelo, labor que la falta de rigidez de la plúmula no puede lograr (Collins, 1914; M'Ragwa *et al.*, 2000).

En su artículo *Comparative Anatomy and Morphology of Embryos and Seedlings of Maize, Oats, and Wheat*, George Avery (1930) describe que, bajo condiciones favorables de germinación, la raíz primaria crece rápidamente e irrumpe el pericarpio, poco después emerge el coleoptilo que es el punto de crecimiento del tallo junto con las hojas embrionarias que se encuentran dentro del él. El coleoptilo es empujado hacia arriba como consecuencia de un alargamiento "de esa parte del eje" (actualmente se conoce como mesocotilo) justo por debajo del nivel de su divergencia. El coleoptilo permanece cerrado hasta que su base está nivelada o ligeramente por debajo de la superficie del suelo; luego sus bordes comienzan a

separarse cerca de su punta, en el lado opuesto al escutelo, para dar paso a las primeras hojas. Avery (1930) también describe la anatomía tisular del coleoptilo. En cortes transversales se ha observado que presenta una estructura muy sencilla, siendo principalmente parenquimatosa, comúnmente tiene un sistema vascular compuesto de dos haces largos, uno de cada lado. Cada haz tiene varios grupos de xilemas y una cantidad considerable de floema, y el parénquima que forma el cuerpo del coleoptilo tiene solo pequeños espacios intercelulares, los estomas están presentes solamente en la epidermis externa.

Adicionalmente, el coleoptilo es un modelo biológico importante para el estudio de fenómenos complejos como los tropismos de las plantas. Charles Darwin en su libro *The Power of Movement in Plants* (1880), describe que el estímulo fototrópico se detecta en la punta del coleoptilo de las plántulas de las gramíneas y que el movimiento en dirección a la luz se da en una región ligeramente más basal ya que al colocar una cubierta opaca sobre la punta, el movimiento no se producía aunque el resto del coleoptilo estuviera iluminado, sin embargo, al colocar la plántula cubierta de sustrato y sólo con la punta del coleoptilo expuesto a la luz, la respuesta fototrópica se origina sin ningún inconveniente, dejando claro que la punta de algún modo se comunica con las células de la región de elongación, que dirigen la plántula en dirección a la luz (Darwin, 1880).

Posteriormente, Jansen Boysen (1918) describió que esa señal era una sustancia química que se transporta de la punta del coleoptilo hacia la parte basal del tallo. No fue sino hasta 1937 que Went y Thimann describieron que los movimientos fototrópico y gravitrópico en plantas son causados por la distribución asimétrica de una sustancia química a la que llamaron auxinas, que se producen en el ápice del coleoptilo (Went y Thimann, 1937; Iino, 1995). En la actualidad existen numerosos estudios acerca de los mecanismos fisiológicos tanto a nivel celular y molecular que subyacen a estos tropismos, así como del efecto de distintas longitudes de onda sobre la respuesta fototrópica y los componentes moleculares involucrados en dichos procesos (Iino, 1995; Jabeen *et al.*, 2006; Kutschera *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2014).

El crecimiento del coleoptilo

El desarrollo vegetal involucra tanto el crecimiento como la diferenciación celular. El término crecimiento implica cambios cuantitativos que ocurren durante el desarrollo y puede definirse como un cambio irreversible en el tamaño de una célula, órgano u organismo completo (Wareing y Phillips, 1981). El crecimiento vegetal está determinado tanto por el aumento del tamaño celular, así como por el incremento en el número de células, y ambos procesos en gran medida están regulados por fitohormonas endógenas y factores ambientales (Kutschera y Wang, 2016).

El crecimiento por división celular

La proliferación celular juega un papel importante en la elongación del coleoptilo de algunas gramíneas (Srivastava, 2002). Se han observado células en división celular en las etapas postgerminativas tempranas a lo largo del coleoptilo de trigo, una vez que dicha estructura supera los 9 mm de tamaño, las células en división desaparecen y a partir de este momento, la elongación del coleoptilo depende totalmente de la expansión celular (Lu *et al.*, 2006). Asimismo, se ha reportado que, en plántulas de arroz sembradas bajo condición de anoxia, ocurre la división celular en el coleoptilo. Las células en división celular se observan a partir del primer día después de la imbibición y el índice mitótico cesa gradualmente (Takahashi *et al.*, 2011). También se ha observado que la deficiencia del gen ADH1 (deshidrogenasa alcohólica 1) en mutantes de arroz rad, reprime genes asociados tanto a la elongación celular como a la división celular, lo cual provoca una disminución del tamaño del coleoptilo (Takahashi *et al.*, 2011).

La división celular en plantas ocurre generalmente en zonas especializadas llamadas meristemos, en donde, la producción de células nuevas se lleva a cabo por mitosis (Inzé y De Veylder, 2006). El ciclo celular se divide en cuatro fases, una célula recién formada comienza con la fase G1, que es un periodo de crecimiento previo a la fase de replicación de DNA (fase S), posteriormente ocurre una segunda etapa de crecimiento en la fase G2 y finalmente se lleva a cabo la segregación de los cromosomas duplicados (mitosis) y la separación física de dos células hijas (citocinesis) (Inzé y De Veylder, 2006; Perrot-Rechenmann, 2010; Salisbury y Ross, 1992). Las transiciones de G1 a S y de G2 a M son dos momentos reguladores

críticos del ciclo celular que también se denominan puntos de control o de restricción (Gutierrez *et al.*, 2002; Perrot-Rechenmann, 2010).

La progresión del ciclo celular vegetal es controlada por un mecanismo molecular conservado evolutivamente que involucra distintas combinaciones entre ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDK). Los complejos CDK-ciclina fosforilan selectivamente varios sustratos, lo que modula de manera coordinada la actividad de la maquinaria molecular que permiten las transiciones G1/S y G2/M (Inzé y De Veylder, 2006). La mitosis y la salida de la mitosis requieren la degradación de las ciclinas a través de la proteólisis dependiente de la ubiquitina (Perrot-Rechenmann, 2010).

En las plantas, las auxinas y otras fitohormonas influyen directa o indirectamente en la regulación tanto transcripcional como postraduccional de genes y proteínas importantes en el ciclo celular. Se demostró que las auxinas inducen la expresión de CDKA; 1, que codifica el CDK implicado en las transiciones G1/S y G2/M (Menges, 2006). También se observó que las citocininas, los brasinoesteroides y las auxinas, regulan la expresión de la ciclina CYCD3;1, la cual está involucrada en la transición G1/S. Además se encontraron elementos de respuesta a auxinas (AuxRE) en las regiones promotoras de muchas ciclinas (Perrot-Rechenmann, 2010). En células de raíz la auxina redujo la expresión de los genes KRP1 y KRP2, que son inhibidores de CDK (Himanen *et al.*, 2013; Perrot-Rechenmann, 2010)

Las auxinas aumentan la estabilidad del factor de transcripción E2FB, el cual es un activador transcripcional de varios genes cuyos productos están involucrados en la regulación del ciclo celular o en la replicación del DNA. Asimismo, las auxinas estimulan la degradación de la proteína SKP2A F-box, dicha proteína es un componente del complejo ubiquitina ligasa E3, el cual se encarga de la degradación de proteínas por la vía del proteosoma 26S (Jurado *et al.*, 2008). Presumiblemente, SKP2A modula la degradación de sustratos para la progresión del ciclo celular entre la fase S tardía y la fase M (Perrot-Rechenmann, 2010).

También se ha observado que las citocininas inducen la expresión de tres genes que codifican ciclinas las cuales, presumiblemente, son importantes para la regulación del ciclo celular. Asimismo, se ha observado que la biosíntesis de citocininas es esencial para la transición G2/M y que su concentración en la célula oscila durante el transcurso del ciclo celular, con picos agudos al final de la fase S y durante la entrada a la mitosis (Schaller, Street, y Kieber, 2014). En general se considera que las citocininas regulan positivamente la división celular, pero los

mecanismos moleculares de cómo interactúan con la maquinaria que regula la progresión a través del ciclo celular apenas comienzan a apreciarse (Schaller et al., 2014).

El crecimiento por elongación celular

El crecimiento vegetal corresponde al aumento en el tamaño de los órganos preexistentes o recién formados y se debe en parte al agrandamiento celular, también conocido como expansión o elongación celular. Durante la elongación celular, se involucran procesos de biosíntesis de citoplasma, proteínas y componentes de la pared celular. Además, se activan numerosas proteínas integrales de la membrana que permiten el intercambio de iones y de sustancias osmóticamente activas que, a su vez, transforman las propiedades bioquímicas de la pared celular y mantienen los valores de potencial osmótico, respectivamente (Hager, 2003; Wareing, 1981).

Los estudios realizados para dilucidar de forma detallada este proceso han comprendido diferentes enfoques. En primer lugar, se conoce desde los años 30 del siglo XX, que las auxinas, principalmente el ácido indolacético (IAA), son los reguladores centrales del crecimiento dirigido por turgencia (Kutschera y Wang, 2016). Actualmente se conoce, de manera general, que el IAA está involucrado en la expresión coordinada de un gran número de genes y proteínas; sin embargo, aun falta conocerse el alcance y la totalidad de sus funciones en el crecimiento celular (Garay-Arroyo *et al.*, 2014).

Por otra parte, una gran cantidad de fisiólogos vegetales han estudiado el crecimiento celular en relación a las proteínas involucradas en este proceso, dando a conocer que la biosíntesis de proteínas es un factor limitante para el crecimiento y que la función de muchas de ellas está relacionada con el IAA (Key, 1964; Kutschera y Wang, 2016). En este sentido, existe el concepto de proteínas limitadoras del crecimiento (GLP, por sus siglas en inglés). Este concepto hace referencia a un gran número de proteínas que están involucradas en la biosíntesis de los componentes de la pared celular, la relajación de la pared, la organización del citoesqueleto, el transporte de vesículas y en otros procesos causales de la elongación celular (Key, 1964). Cabe señalar que la totalidad de las de las GLP involucradas en la elongación de las células del coleoptilo, así como su regulación

genética y caracterización funcional permanecen desconocidas (Kutschera y Wang, 2016).

Adicionalmente, hay estudios que demuestran la influencia de factores ambientales tales como la luz, la temperatura, la humedad, la disponibilidad de oxígeno (O₂) y nutrientes, que provocan cambios en la elongación celular y, por ende, en el tamaño del coleoptilo (Chebli y Geitmann, 2017; El-Hendawy *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2014).

Los estudios fisiológicos en torno a la elongación celular han utilizado a los coleoptilos del maíz y de otras gramíneas, como modelos experimentales, ya sea en fragmentos extirpados o en plántulas intactas. En este sentido, se cuenta con numerosos y valiosos estudios fisiológicos tradicionales que han ayudado a establecer procesos generales de la elongación celular (Clouse, 2003; Hager, 2003; Kutschera y Wang, 2016). Sin embargo, la forma en que la variación genotípica puede generar patrones de elongación y tamaños específicos en el coleoptilo, se ha comenzado a estudiar sólo en décadas recientes.

Factores fisiológicos

Los bioensayos pioneros de Frits Went (1928), quien extirpaba la punta del coleoptilo y la sustituía con bloques de agar con (o sin) suplemento de auxinas, dieron a conocer que esta fitohormona es fundamental para la elongación del coleoptilo. Posteriormente con base en los trabajos de Overbeek (1936), quien estudió la inhibición inducida por luz de la elongación del mesocotilo en plántulas de maíz, Went y Thimann (1937) llegaron a la conclusión de que, además del coleoptilo, el crecimiento de todo el tallo era dependiente del flujo de auxinas desde la punta del coleoptilo hasta la base de la plántula. Actualmente existen dos hipótesis del mecanismo molecular por el cual el IAA actúa para promover la elongación celular. La primera consiste en que esta hormona activa directamente a la ATPasa – H⁺, que es una proteína secretora de protones de la membrana plasmática, la segunda hipótesis indica que la auxina actúa como mensajero secundario y activa la síntesis de la ATPasa – H⁺ (Hager, 2003). En ambos casos el aumento de esta proteína en la membrana plasmática provoca la salida de protones (H⁺) al espacio apoplástico, lo que resulta en la acidificación del apoplasma. Este cambio de pH activa proteínas, tales como a las expansinas, que promueven la relajación y la plasticidad de la pared celular. Al mismo tiempo, esta

acidificación provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática que induce la captación de K^+ provocando cambios osmóticos que permiten la afluencia de agua por las acuaporinas de la membrana plasmática, lo que favorece la elongación celular y la de los órganos dirigida por la presión de turgencia (Kutschera y Wang, 2016).

Análisis comparativos y cuantitativos, sin embargo, permiten llegar a la conclusión de que la secreción de protones inducida por IAA es insuficiente para causar la relajación vía acidificación de la pared celular en los coleoptilos (Kutschera y Wang, 2016). Por lo tanto, el efecto del IAA en la elongación celular no solo se restringe a la capacidad de acidificación en la pared, sino que además induce otros mecanismos celulares. Por ejemplo, se documentó que en presencia de IAA se generan nanopartículas a lo largo de las paredes celulares externas de la epidermis (OEW, por sus siglas en inglés) del coleoptilo. Estos gránulos se encuentran en los coleoptilos de plántulas intactas y desaparecen en los segmentos cortados basales de este órgano. Sin embargo, pueden reaparecer si son incubados en IAA, coincidiendo con la inducción de la elongación celular. Estos gránulos han sido interpretados como "complejos ablandadores de la pared celular" dependientes de IAA, debido a que en presencia de factores acidificantes como la fusicoccina y amortiguadores de pH 4 se promueve el crecimiento de fragmentos de coleoptilo, pero no se observan las nanopartículas (Kutschera y Wang, 2016).

La composición de estos gránulos no ha sido dilucidada. Sin embargo, se conoce que contienen proteínas O-glicosiladas que se incorporan a la OEW. Se ha descrito que la OEW tiene propiedades elásticas particulares que representan un factor limitante de carácter biofísico para el crecimiento del órgano (Lipchinsky, 2013). El IAA además promueve la incorporación de leucina- 3H dentro del OEW, pero la biosíntesis de la celulosa, la hemicelulosa y de las pectinas, que son polisacáridos estructurales de la pared, no se ven afectadas (Kutschera y Wang, 2016).

Otra aproximación utilizada para el estudio fisiológico del crecimiento del coleoptilo son los experimentos con sustancias inhibitoras de la biosíntesis de proteínas y de RNA en donde se observa que el crecimiento inducido por IAA puede ser inhibido. Por ejemplo, algunos antibióticos como el cloranfenicol y la puromicina inhiben el crecimiento de segmentos de coleoptilo aun en presencia de IAA (Noodén y Thimann, 1963). Asimismo, inhibidores específicos de la síntesis de

RNA suprimieron el crecimiento en segmentos del mesocotilo (Key, 1964). Estos estudios llevaron al concepto de proteínas limitadoras del crecimiento (GLP, por sus siglas en inglés), en donde se propone que la elongación mediada por auxinas es dependiente de la biosíntesis de GLP, las cuales pueden tener diversas funciones (Chae *et al.*, 2012). También se conoce que en la pared celular existen distintas enzimas que contribuyen a la reorganización y expansión de la pared durante el crecimiento celular. Por ejemplo, se ha descrito que las expansinas son proteínas endógenas asociadas a la pared que se activan en condiciones ácidas. Estas proteínas separan los enlaces de hidrógeno (H) entre las microfibrillas de celulosa y la matriz de polímeros (Gao *et al.*, 2008). Así mismo, se conoce que las xiloglucano-endotransglicosilasa-hidrolasas (XTH), tienen la habilidad de cortar el esqueleto de xiloglucanos e integrar más moléculas de xiloglucano en la pared celular (Santana, 2016).

En estudios proteómicos realizados con el centeno (*Secale cereale*) se detectó una proteína de unión a GTP cuya abundancia disminuyó a los 30 min de iniciado el tratamiento con IAA. Al mismo tiempo, la subunidad 26S del proteosoma aumentó (Kutschera *et al.*, 2010). En un análisis proteómico y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) realizado con coleoptilos de plántulas de maíz etioladas se descubrieron 15 proteínas que podrían estar involucradas en la biosíntesis de la pared celular o de la cutina, así como de dos proteínas epidérmicas (Hyp 3 y Hyp 4) que pueden estar asociadas con la relajación de la pared (Jie, *et al.*, 2013).

Aún no se conocen todas las proteínas involucradas en el proceso de elongación celular en el coleoptilo, ni tampoco se conoce la función específica de muchas de las que se han observado en estudios proteómicos. Sus funciones propuestas son la biosíntesis de la pared celular, la relajación de la pared, el transporte de vesículas y la organización del citoesqueleto (Kutschera y Wang, 2016).

Factores genéticos

A partir de la información previamente descrita, es posible concluir que la elongación del coleoptilo mediada por auxinas involucra la síntesis coordinada de un gran número de proteínas y su respectiva regulación génica. Sin embargo, las aproximaciones genéticas sobre el estudio del tamaño del coleoptilo en el maíz y en otras gramíneas son escasas.

Los análisis genómicos en *Arabidopsis thaliana* demuestran que el factor de respuesta a auxina ARF6, el factor de transcripción regulador de luz y temperatura PF4, y el factor de transcripción señalizador de brasinoesteroides BZR1, interactúan unos con otros y conjuntamente regulan un gran número de genes diana en común involucrados en el crecimiento en plántulas de *A. thaliana* (Oh *et al.*, 2014).

En variedades de trigo se detectó que los alelos *Rht-B1b* y *Rht-D1b* confieren un fenotipo enano y que las plántulas presentan coleoptilos pequeños. Estos genes se caracterizan por la falta de respuesta a las giberelinas (GA). Se conoce que estas fitohormonas promueven la elongación celular actuando sinérgicamente con las auxinas (Oh *et al.*, 2014).

Los estudios sobre las variaciones genéticas que explican las variaciones en el tamaño del coleoptilo han sido reportados principalmente en trigo. Mediante el uso de secuencias simples repetidas (SSR), como marcadores moleculares, se han detectado *loci* de carácter cuantitativo (QTL, por sus siglas en inglés) sobre el cromosoma 6A que explican el 8% de la variación de la longitud del coleoptilo (Spielmeyer *et al.*, 2007). Por otro lado, en un análisis de asociación con 5,011 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), se han detectado ocho QTL para este carácter y se mostró estadísticamente que el gen *Rht-B1b* está asociado a la elongación del coleoptilo (Li *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en arroz sembrado en condiciones anaeróbicas (bajo sumersión en agua), se han detectado cambios en los patrones de expresión del coleoptilo en genes que codifican a proteínas involucradas con modificación de la pared celular, como pectinesterasas, y factores de transcripción, como *AP2-EREB*, *MYB* y *WRKY* y biosíntesis hormonal (Narsai *et al.*, 2015).

GWAS: análisis de asociación genómica para el estudio de rasgos complejos

La variación fenotípica del tamaño del coleoptilo está determinada por la acción conjunta de varios genes (Murphy *et al.*, 2008; Rebetzke *et al.*, 2007), de los cuales cada uno tiene un efecto moderado sobre el fenotipo, es decir, se trata de un rasgo complejo. Una metodología ampliamente usada en investigación agrícola para detectar genes candidatos implicados en rasgos complejos y cuantitativos es el estudio de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2014). Los marcadores genéticos que comúnmente se utilizan en análisis de

asociación genómica son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés). La aproximación básica del GWAS es evaluar la asociación entre los SNP y un fenotipo de interés que haya sido cuantificado en un gran número de individuos (Korte y Farlow, 2013). De este modo, estadísticamente, se identifican *loci* candidatos del genoma asociados al fenotipo y estos resultados aportan una primera aproximación antes de establecer una relación causal entre el genoma y el fenotipo (en este caso, el tamaño del coleoptilo).

No existen estudios en maíz sobre la variación genética que subyace a la longitud del coleoptilo. El conocimiento de la arquitectura genética que controla este rasgo es de gran importancia para el entendimiento de su aportación en la emergencia del maíz y el papel que juega en el desarrollo temprano de la plántula, además de contribuir al entendimiento de la evolución de las variedades locales.

Antecedentes

Ventajas de la siembra profunda

Nieto-Sotelo y Cassab (2012) realizaron bioensayos de siembra profunda bajo condiciones controladas de 284 accesiones de plántulas de maíz desarrolladas por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, por sus siglas en inglés) y provenientes del proyecto *Drought Tolerant Maize for Africa* (DTMA). En estos ensayos se caracterizó la morfología de diversos órganos, así como el rendimiento en grano (T/ha) de cuatro híbridos DTMA en parcelas sembradas bajo diferentes profundidades y condiciones de riego y sequía.

Los datos muestran que el rendimiento obtenido bajo condiciones de sequía en parcelas de las semillas sembradas a profundidad (34 cm) es superior al obtenido en parcelas sembradas de forma somera (5, 16 y 24 cm). Además, encontraron que el rendimiento es similar al de las plantas procedentes de semillas sembradas a 5 cm de profundidad en condiciones de riego.

Por otra parte, este estudio también concluye que los organismos sembrados a profundidad en condiciones de déficit hídrico desarrollan mayor biomasa radicular en comparación con las sembradas de forma somera. Esta característica es común en las raíces que están en contacto con la humedad y podría tener implicaciones en la absorción de nutrientes del suelo y por lo tanto en el desarrollo óptimo de los cultivos.

Además, la temperatura foliar a medio día fue menor en los organismos sembrados a profundidad, lo que indica que este manejo mejora la tasa de transpiración, denotando claramente un mecanismo de tolerancia al estrés calórico.

La variación en el tamaño del coleoptilo, que es resultado de la división y alargamiento celular, es un rasgo cuantitativo, también conocido como rasgo complejo. Este tipo de fenotipos están determinados por la acción conjunta de varios genes que se relacionan en una red de interacción génica compleja que determinan los fenotipos observables (Dávila y Álvarez, 2015). El conocimiento de la arquitectura genética que controla la variación en la longitud del coleoptilo es de gran importancia para el entendimiento de su aportación en la emergencia y la relación que tiene con otras estructuras embrionarias en el desarrollo temprano de la plántula.

Hipótesis

1. Bajo condiciones de siembra profunda el tamaño de estructuras como el mesocotilo, la plúmula, la raíz principal y las raíces asociadas al nodo coleoptilar, podrían correlacionar con el tamaño del coleoptilo.
2. El tamaño del coleoptilo podría contribuir a la emergencia de las plántulas bajo condiciones de siembra profunda.
3. La variación de la longitud del coleoptilo es un rasgo complejo por lo que se espera que esté determinado por una multitud de genes que subyacen a la diversidad de este carácter en el maíz.
4. Debido a que el crecimiento del coleoptilo está determinado por división celular y por el crecimiento de células individuales, es posible que los genes candidatos involucrados en la variación del tamaño de dicha estructura estén relacionados con funciones de relajación de la pared celular y hormonas involucradas con la elongación y división celular.

Objetivos

1. Evaluar la relación del tamaño del coleoptilo con el tamaño de diversas estructuras embrionarias como el mesocotilo, la plúmula, la raíz primaria y las raíces asociadas al nodo coleoptilar.
2. Evaluar la aportación del coleoptilo sobre la emergencia de las plántulas bajo condiciones de siembra profunda.
3. Identificar, mediante análisis de GWAS, genes candidatos que influyen en la variación del tamaño del coleoptilo de plántulas de maíz bajo siembra profunda en una colección de híbridos DTMA.

Materiales y métodos

Material biológico y fenotipificación

Se utilizó una colección de 282 híbridos de maíz provenientes del programa de mejoramiento *Drought Tolerant Maize for Africa* (DTMA). Estos híbridos fueron desarrollados y proporcionados por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). La colección de híbridos DTMA se originó a partir de la cruce de 275 líneas altamente endogámicas con distancias genéticas amplias, ya que este germoplasma proviene de distintos programas de mejoramiento de maíces tropicales y subtropicales, principalmente. (Cairns *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2011). La colección consta de híbridos medio hermanos, ya que cada una de las líneas endogámicas usadas se cruzó contra la línea CML312 para formar cada uno de los híbridos.

La fenotipificación de los híbridos DTMA se realizó previo al inicio de esta tesis en el laboratorio de Fisiología Molecular del Jardín Botánico de la UNAM. Para esto, se realizaron bioensayos de siembra profunda por triplicado (Nieto-Sotelo y Cassab, 2012). Para simular la siembra profunda se utilizó un tubo de PVC hidráulico de 3 pulgadas de diámetro y 40 cm de longitud, en uno de sus extremos se colocó una tapa del mismo material. Se añadieron aproximadamente 2 litros de turba rubia pura (*peat-moss*) de las marcas Terracult® o Hawita®, las cuales no contienen fertilizantes que promuevan mayor crecimiento en las plántulas. La turba rubia fue homogéneamente humedecida con 750 ml de agua corriente, de esta manera se formó una capa de turba rubia con una profundidad de 20 cm.

En cada bioensayo se colocaron 15 semillas, las cuales fueron previamente desinfectadas durante 10 min con 20 ml de hipoclorito de sodio al 5.1% de marca comercial (Patitos, S.A de C.V) y enjuagadas con agua corriente para quitar los residuos de hipoclorito de sodio. Posteriormente, se colocaron las semillas sobre la superficie de la turba rubia con una separación de aproximadamente 2 cm entre ellas. Se agregó sobre las semillas una capa de 16 cm de vermiculita de tamaño mediano, de la marca AGROLITA® (Accimin, S.A de C.V.) y se humedeció con 500 ml de agua corriente.

Los bioensayos de germinación se realizaron a una temperatura de 28°C. Así mismo, la germinación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad para evitar que

la luz influya en la longitud de las estructuras vegetales, ya que las plantas utilizan la luz como una señal ambiental para alterar su crecimiento (Pratt, 1994). Además, los estímulos de luz son percibidos por la punta del coleoptilo, ya que en esta zona se encuentra la mayor cantidad de receptores de la luz azul (criptocromos y fototropinas) y la luz roja y su presencia desencadena una respuesta fotomorfogénica en la zona de crecimiento de la plántula (Pratt, 1994; Briggs, 2014). Los tubos se regaron con 100 ml de agua corriente cada 48 h, y solo se utilizó luz verde (bombilla led 5 Watts, lámpara LD1018) de seguridad durante el riego. Las plántulas se retiraron de los tubos 7 días después de inducir la germinación e inmediatamente se midió la longitud de las siguientes estructuras vegetales: el coleoptilo, el mesocotilo, la plúmula, la raíz primaria y la cantidad de las raíces asociadas al nodo coleoptilar (RANC). La germinación de cada accesión de DTMA se realizó en tubos separados y por triplicado.

Variación de la longitud del coleoptilo, análisis de correlación lineal entre las estructuras y aportación del coleoptilo a la emergencia

Se realizaron pruebas de normalidad del tamaño del coleoptilo considerando los promedios de cada accesión de la colección. Igualmente se realizaron diagramas de caja y bigote para observar la variación de la longitud de dicha estructura en el software *GraphPad Prism 5*.

Así mismo, se realizó un análisis de correlación lineal entre el tamaño del coleoptilo y el tamaño de la plúmula, el mesocotilo, la raíz primaria y la cantidad de RANC, con la finalidad de conocer la relación que existe entre estas estructuras bajo condiciones de siembra profunda. Además, se realizó un análisis de correlación entre la emergencia y el tamaño de la plúmula, el mesocotilo y el coleoptilo para analizar la aportación del tamaño de estas estructuras sobre la emergencia bajo condiciones de siembra profunda. Se consideró como emergencia al número de plántulas cuyo tallo superara los 16 cm de longitud. Esta medida corresponde a la capa de vermiculita que se colocó sobre las semillas durante la germinación.

Genotipificación y análisis de GWAS

La extracción de DNA y obtención de SNP se llevó a cabo en el *Institute of Biotechnology, Cornell University, NY, USA*, con la técnica *Genotyping by sequencing* (GBS). Este método utiliza protocolos de "secuenciación de nueva

generación" que se basa en la digestión del DNA genómico con enzimas de restricción sensibles a metilación, por lo tanto, no cortan sobre secuencias de DNA metilados, asegurando que la secuenciación se lleve a cabo en regiones codificantes del genoma. Los fragmentos obtenidos se ligan a adaptadores de código de barras y posteriormente se amplifican por PCR y se secuencian (He *et al.*, 2014). Esta técnica ha sido usada exitosamente en implementación de GWAS.

La información sobre los SNP que se obtuvieron nos fue proporcionada por el CIMMYT en archivos *hapmap* que contienen 955,690 SNP para cada una de las 272 accesiones. Para el análisis de GWAS se aplicaron filtros de control de calidad de los SNP en el programa *Tassel 5.0* (Bradbury *et al.*, 2007). El primer filtro (MC, *minimum count*) consideró únicamente aquellos SNP que estuvieran presentes en al menos 258 líneas, es decir, el 95% de los datos presentes. El segundo filtro (*MAF, Minor Allele Frequency*) consideró que la frecuencia del alelo menor de cada SNP fuera de al menos 0.05 con la intención de retirar los SNP con frecuencias alélicas bajas, ya que estas variaciones genéticas podrían atribuirse a errores técnicos en la secuenciación. Con la aplicación de estos filtros de control de calidad sólo se consideraron en el análisis 134,694 SNP para cada línea DTMA.

El análisis de GWAS se realizó con el paquete GAPIT (*Genomic Association and Prediction Integrated Tool*) versión 2 (Lipka *et al.*, 2012). Este análisis se ejecutó con el modelo lineal mixto comprimido (CMLM) (Zhang *et al.*, 2010), el cual se basa en el Modelo General Mixto (MLM).

El MLM disminuye la tasa de falsos positivos sin comprometer las asociaciones verdaderas (Li *et al.*, 2014) provocadas por el desequilibrio de ligamiento y la estructura genética de la población. El CMLM es una optimización que ha demostrado aumentar el poder estadístico en los análisis de GWAS, además de reducir el tiempo de cálculo computacional.

Cabe mencionar que Wen y colaboradores (2011) realizaron un análisis de componentes principales (PCA), un agrupamiento por *neighbor-joining* y un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando SNP, demostrando que la diversidad genética y el desequilibrio de ligamiento de estas líneas es ideal para mapeos de asociación donde el error de tipo 1 se puede controlar usando un MLM (Wen *et al.*, 2011).

Los datos fenotípicos utilizados para el análisis de GWAS corresponden al promedio de elongación de coleoptilo de cada línea DTMA.

Resultados

Variación de la longitud del coleoptilo, análisis de correlación lineal entre las estructuras y aportación del coleoptilo a la emergencia

Considerando las tres réplicas, en cada línea DTMA se indujo la germinación de 45 semillas. Sin embargo, la viabilidad de las semillas difirió en cada accesión, por lo que la cantidad total de plántulas fenotipadas para cada línea DTMA fue distinta a 45. La accesión DTMA 79 es la línea con menor número de semillas germinadas teniendo solo 13 plántulas fenotipadas. Ciento cinco accesiones tuvieron entre 15 y 40 plántulas y el resto contaron con más de 40 individuos fenotipados. En total se fenotiparon 10, 841 plántulas. Cabe señalar que 10 de las accesiones fenotipadas no contaban con datos genotípicos por lo cual solo 272 accesiones se consideraron para el análisis.

La variación en el tamaño de los coleoptilos de las líneas DTMA oscila entre 1 y 9 cm. En el **Anexo 1** se presentan diagramas de caja y bigote en los que se visualiza la distribución de tamaño (cm) de los coleoptilos de las 272 accesiones. En la **Figura 1** se observa un histograma de frecuencias de la longitud coleoptilar, en el que se muestra que la colección DTMA, para este carácter, tiene un promedio de 4.81 ± 0.59 cm. La accesión DTMA 269 tiene la longitud promedio menor, con un valor de 3.21 cm, mientras la accesión DTMA 210 tiene el promedio mayor con un valor de 6.37 cm.

Adicionalmente se realizó un análisis de normalidad con la longitud promedio del coleoptilo de las 272 accesiones. La prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) de una muestra indica que los datos presentaron una distribución normal ($p > 0.05$). Adicionalmente, los valores de asimetría y curtosis (0.339 y -0.174, respectivamente) indican que la distribución de frecuencias de los promedios de la longitud del coleoptilo presentaron una distribución normal con datos cargados en el centro. Los análisis de asociación por MLM parten del supuesto que los datos se distribuyen de manera normal, esto ayuda a disminuir la cantidad de asociaciones falsas.

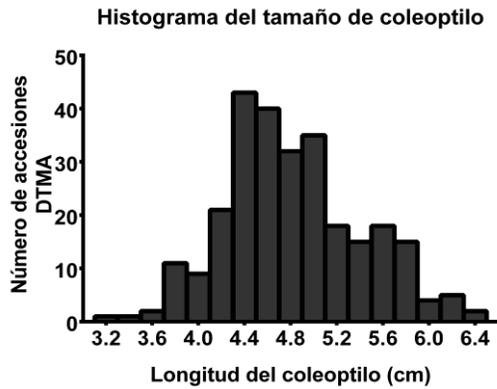


Figura 1. Histograma del promedio de la longitud del coleoptilo (cm) de las 272 accesiones DTMA. La prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra indicó que los datos tienen una distribución normal ($p > 0.05$). La asimetría (0.339) y curtosis (-0.174) se encontraron dentro de los valores establecidos para una distribución normal (± 0.5). Media = 4.81, desviación estándar = 0.59, valor mínimo = 3.21, valor máximo 6.37.

En la **Figura 2** se muestran gráficas de caja y bigote con las líneas de mayor contraste en el tamaño promedio del coleoptilo. Se tomaron las 15 líneas con el mayor y el menor promedio y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con los datos de sus respectivos individuos. El resultado muestra que ambos grupos difieren significativamente ($p < 0.0001$) para este carácter.

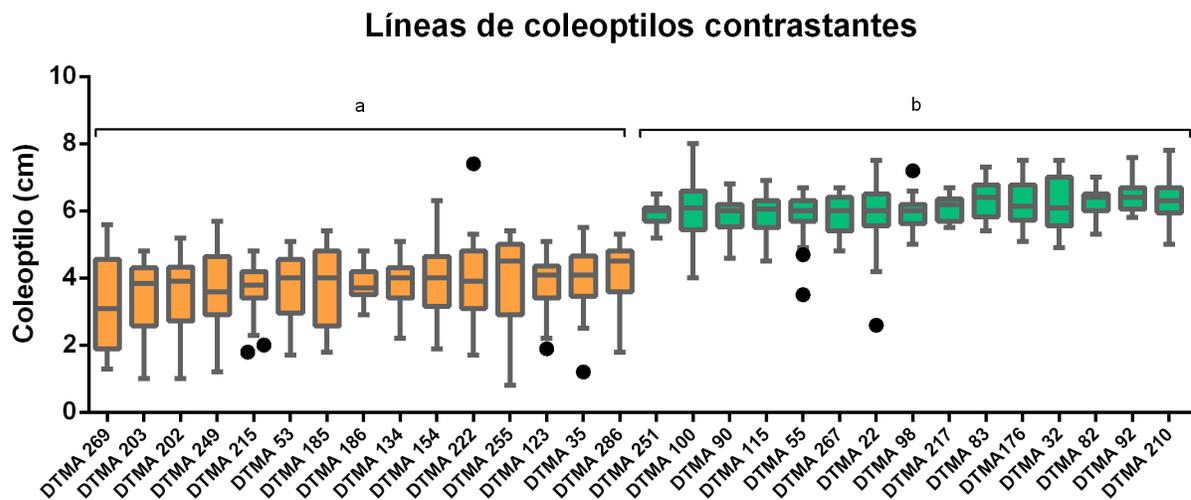


Figura 2. Gráficas de caja y bigote de los híbridos DTMA con tamaño de coleoptilo contrastante. El ANOVA de una vía mostró que ambos grupos difieren significativamente ($P < 0.0001$) para este carácter. Las cajas de color naranja corresponden a las líneas cuyo promedio fue menor a 3.9 cm de longitud y las cajas verdes a las líneas con promedio mayor a 5.86 cm.

Se realizaron análisis de regresión lineal entre los órganos de la plántula (**Figura 3**). Los resultados muestran que la proporción de la varianza en la longitud del coleoptilo, que se explica a partir de la longitud de la plúmula, el mesocotilo, la raíz primaria y las RANC, son de 0.256, 0.081, 0.1648 y 0.091, respectivamente. Esto significa que el modelo de correlación lineal explica un 25.6 % de la varianza observada para la longitud del coleoptilo respecto a la plúmula. El 8.1 % para coleoptilo y el mesocotilo y solo 16.4% y 9.1% entre el coleoptilo y la raíz primaria y las RANC, respectivamente. En todos los casos hay una correlación positiva con un valor $p < 0.0001$.

Así mismo se realizaron análisis de correlación entre la longitud promedio de las estructuras que conforman el tallo de la plántula (la plúmula, el mesocotilo y el coleoptilo) con respecto a la emergencia de cada línea DTMA (**Figura 4**). Se consideró como emergencia al número de plántulas cuyo tallo superara los 16 cm de longitud. Esta medida corresponde a la capa de vermiculita que se colocó sobre las semillas durante la germinación. Los resultados muestran que las tres estructuras correlacionan con el número de plantas que emergen a la superficie; sin embargo, el coleoptilo es la estructura que menos explica la emergencia de las plántulas.

Figura 3. Gráficas de regresión lineal entre el coleoptilo, la plúmula, el mesocotilo, la raíz primaria (RP) y las raíces asociadas al nodo coleoptilar (RANC). En todos los casos se observaron correlaciones ligeramente positivas con valor $p < 0.0001$. En el modelo lineal, la proporción de la varianza de la longitud del coleoptilo que se explica a partir de la longitud de la plúmula (a), mesocotilo (b), RP (c) y RANC (d) fue de 0.256, 0.081, 0.1648 y 0.091, respectivamente.

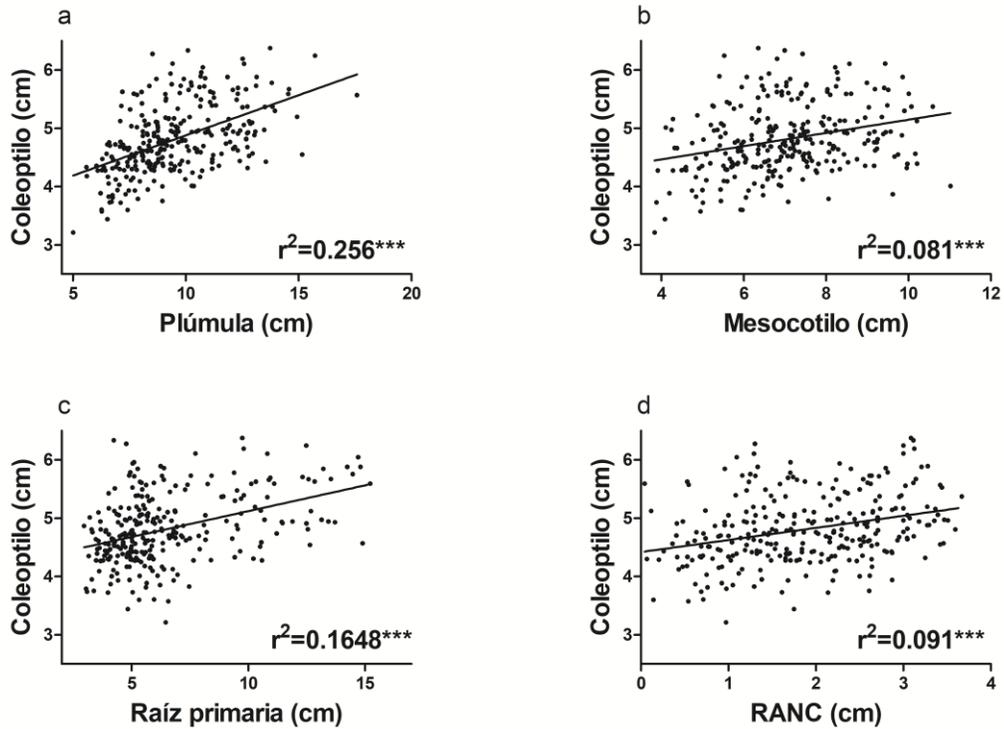
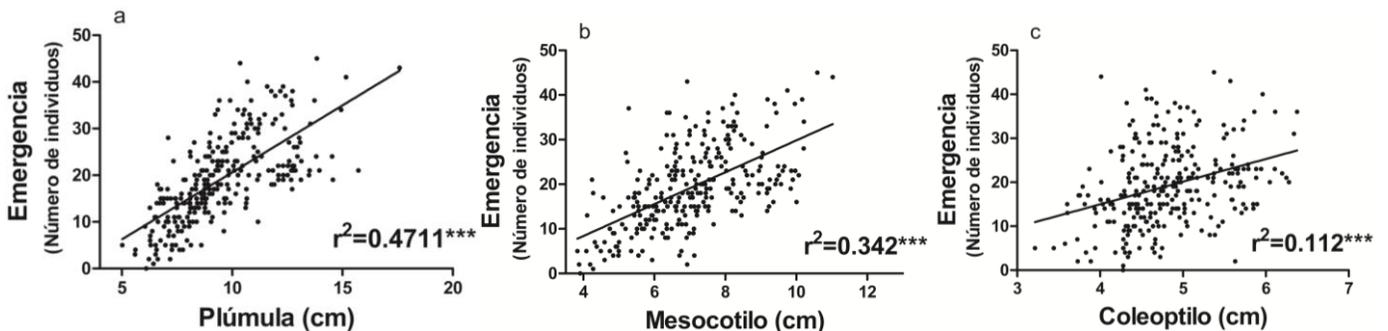


Figura 4. Gráficas de emergencia. Se observa que las tres estructuras presentan correlación positiva ($p < 0.0001$) con respecto a la emergencia. En el modelo lineal, la proporción de la varianza de la emergencia que se explica a partir de la longitud de la plúmula (a), el mesocotilo (b) y el coleoptilo (c) fue de 0.4711, 0.342 y 0.112, respectivamente.



Datos genotípicos y análisis de GWAS

La información sobre los SNP obtenidos nos fue proporcionada por el CIMMYT en archivos *hapmap* que contenían 955,690 SNP en cada una de las 272 accesiones. Para el análisis de *GWAS* se aplicaron los filtros de control de calidad MC y MAF de los SNP en el programa *Tassel* (como se explicó en Materiales y métodos). Con la aplicación de estos filtros sólo se consideraron en el análisis 134,694 SNP para cada línea DTMA. En la **Tabla 1** se muestra la cantidad total de SNP de cada cromosoma que cumplieron los criterios de calidad, así como la relación de los SNP originales para cada cromosoma y los que cumplieron con los criterios de calidad. Solo 134,648 SNP, que corresponden al 14% del número original, fueron considerados en el análisis de GWAS.

Tabla 1. Filtros de calidad de los datos genotípicos. En promedio, se consideraron 13,465 SNP por cromosoma siendo el cromosoma 1, con 21,676 SNP, el que tuvo la mayor cantidad. El cromosoma 0 corresponde a los SNP provenientes de ADN no nuclear, por ejemplo, del cloroplasto.

Cromosoma	SNP sin filtro	SNP filtrados (MAF <0.05 y CM 95%)
0	570	0
1	148,752	21,676
2	115,173	16,592
3	108,224	15,349
4	94,726	13,262
5	110,328	16,257
6	76,475	10,662
7	80,517	10,845
8	81,431	11,597
9	72,368	9,852
10	67,126	8,556
Total	955,690	134,648

El análisis de GWAS se realizó con el paquete GAPIT (*Genomic Association and Prediction Integrated Tool*) versión 2 (Lipka *et al.*, 2012). Este análisis se ejecutó con los datos de la longitud promedio del coleoptilo de cada accesión y los 134,648 SNP que cumplieron con los criterios de calidad (Tabla 1).

Los resultados de salida proporcionados por GAPIT consisten en asignar un valor p para cada SNP, dicho valor corresponde a la significancia estadística asociada a la longitud del coleoptilo. En la **Figura 5** se observa un diagrama tipo Manhattan (*Manhattan Plot*), en el que se muestra de forma gráfica la distribución de los SNP en relación al logaritmo negativo del valor p obtenido por el GWAS. En el eje horizontal del gráfico se encuentran los 10 cromosomas de maíz representados por distintos colores y cada punto representa a un polimorfismo. Sobre el eje X, cada SNP se distribuye en relación a su posición física en el genoma y sobre el eje Y en relación al logaritmo negativo de su valor de asociación ($-\log_{10} \text{valor } p$ de cada SNP). Debido a que las asociaciones estadísticas más fuertes tienen el valor p más pequeño, sus algoritmos negativos serán más grandes, por lo tanto, se ubicarán en la parte superior del gráfico.

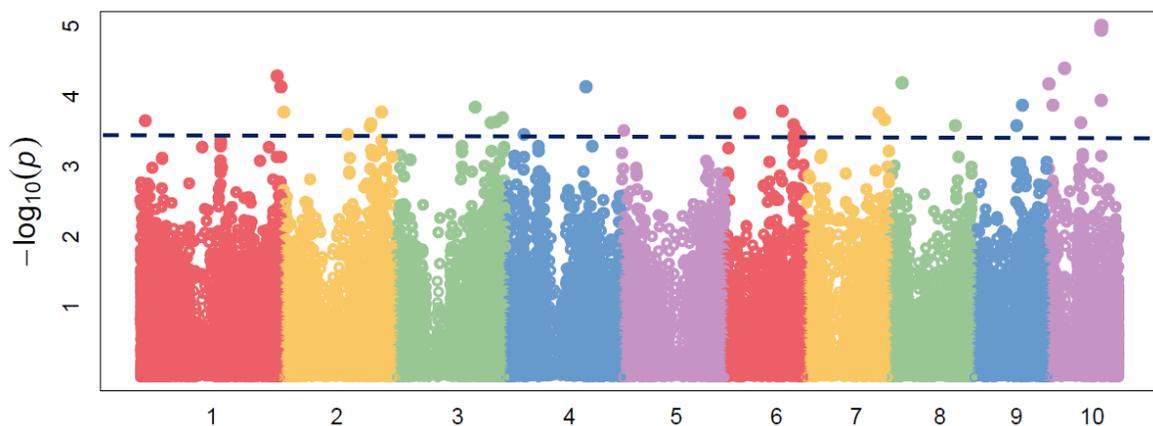


Figura 5. La gráfica tipo Manhattan es el resultado del GWAS y muestra la distribución de los SNP en el genoma (eje X) en función de su valor de asociación (eje Y). El umbral máximo de aceptación para este trabajo se determinó a partir de $-\log_{10}(p) = 3.5$ (línea punteada) en la cual hay 30 SNP asociados candidatos.

Para determinar el umbral de significancia estadística (valor p mínimo) se pueden considerar dos criterios. El primero, conocido como ajuste de Bonferroni, consiste en hacer más astringente la significancia estadística tomando en cuenta el valor convencional de valor p (0.05) dividido entre el total de tratamientos o comparaciones realizadas en el análisis. En este caso los 134,648 SNP, que da como resultado 3.713×10^{-7} cuyo logaritmo negativo es 6.43, por lo tanto, los SNP asociados estadísticamente significativos deben ser mayores a dicho valor. En el análisis de asociación para la longitud de coleoptilo, ninguno de los SNP cumplió con el umbral establecido bajo la prueba de Bonferroni, siendo el valor de asociación más alto en este análisis el SNP *S10_111618837*, ubicado en el cromosoma 10 con un $-\log_{10}(\text{valor } p)$ de 5.006297133.

El segundo criterio consiste en generar un gráfico cuantil cuantil (*Q Q Plot*, por sus siglas en inglés) del $-\log_{10}(\text{valor } p)$ de cada SNP. Este gráfico muestra la distribución esperada de los valores de asociación estadística (eje x) de todos los SNP del análisis y los compara con los valores observados en el eje Y. Los resultados de los SNP asociados a la longitud del coleoptilo (**Figura 6**) muestran una línea continua, donde coinciden los valores observados con los esperados. Este patrón es común y representa a los SNP no asociados, al final del gráfico se observan algunos SNP (círculos azules) que difieren de este patrón y representan las pocas asociaciones verdaderas. Bajo este criterio se determinó el umbral de significancia a un $-\log(\text{valor } p)$ de 3.5 (línea discontinua) lo cual permitió localizar 30 polimorfismos candidatos a la variación del coleoptilo sobre los diez cromosomas del maíz.

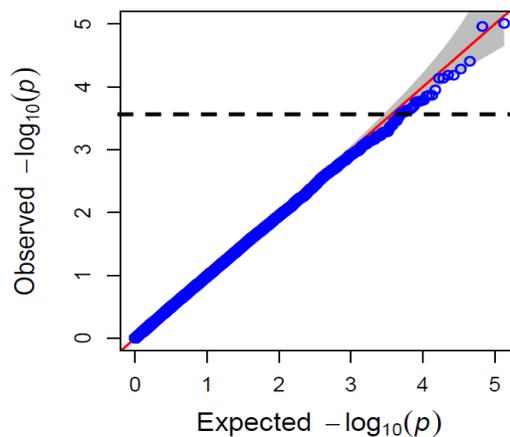


Figura 6. El Q-Q Plot muestra la distribución esperada de los valores de asociación estadística (eje x) de todos los SNP del análisis y los compara con los valores observados en el eje y. El umbral máximo

de aceptación para este trabajo se determinó a partir de $-\log_{10}(p) = 3.5$ (línea punteada) en la cual hay 30 SNP asociados candidatos.

Ubicación genómica de los SNP asociados

De acuerdo a lo anterior, se localizaron 30 polimorfismos candidatos asociados a la variación del coleoptilo con un valor $p < 0.00029$ distribuidos en los diez cromosomas del maíz (**Tabla 2**), tres de los SNP candidatos se encontraban a menos de 50 pb de distancia, por lo cual fueron considerados como haplotipo y solo se tomó en cuenta como SNP asociado al "S10_111618837", ya que posee el valor de significancia mayor. Por lo tanto, solo se consideraron 28 SNP asociados.

Para conocer la región genómica en la cual se encuentran los SNP candidatos asociados, se mapeó su posición física en el genoma de referencia (maíz B73, RefGen_v2) mediante el programa Artemis. Posteriormente, se seleccionó la secuencia de los 100 pb que rodean al SNP asociado y con dicha región se realizó un alineamiento de búsqueda local o BLAST (*Basic local Alignment Search Tool*) en la versión B73 RefGen_v4 de maíz en las bases de datos *Maize Genetics and Genomics Database* (<https://www.maizegdb.org/>) y *Gramene Project* (<http://www.gramene.org>). Así mismo, estas bases de datos fueron consultadas para conocer la familia génica a la que pertenecen los genes asociados, así como la posible función molecular y/o biológica de acuerdo a los términos ontológicos (*GO terms*).

Tabla 2. Lista de los 28 SNP candidatos con mayor valor de asociación a la elongación del coleoptilo en orden descendente. Se muestra el cromosoma en el que se ubican, así como su posición genómica de acuerdo a la versión de referencia de maíz B73 RefGen_v2. En la columna “Región” se indica si el SNP se encuentra dentro de un marco de lectura abierto o en regiones intergénicas. También se indica su anotación de referencia de acuerdo a Gramene Project y MaizeGDB. El SNP S3_199745938 corresponde a una región intergénica y no se encontraron marcos de lectura abierta de gen a más de 100 kbp de distancia.

SNP	Crom	Posición	p-value	Región	Gen asociado	Anotación
S10_111618837	10	112506562	5.04	gen	Zm00001d025281	Putative AP2/EREBP transcription factor superfamily protein
S10_34726220	10	35679080	4.44	gen	Zm00001d024000	Beta-glucosidase3
S1_289598893	1	295014318	4.28	gen	Zm00001d034510	Histidine kinase- DNA gyrase B- and HSP90-like ATPase family protein
S10_2255134	10	1809451	4.21	gen	Zm00001d023272	ENTH/VHS family protein
S8_26349938	8	27190749	4.20	gen	Zm00001d008957	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6
S1_296993149	1	302476557	4.19	gen	Zm00001d034805	Translocation protein-related
S4_166927555	4	169880287	4.16	gen	Zm00001d051791	GDSL esterase/lipase
S9_102962591	9	106507886	3.90	gen	Zm00001d046803	Protein POLAR LOCALIZATION DURING ASYMMETRIC DIVISION AND REDISTRIBUTION
S10_10669884	10	10706886	3.88	gen	Zm00001d023581	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
S3_166245083	3	168869332	3.86	gen	Zm00001d042474	Probable carboxylesterase 11
S2_207041487	2	213898773	3.80	gen	Zm00001d006668	MADS-transcription factor 17
					Zm00001d001876	Uncharacterized
S2_2221784	2	2220994	3.79	Intergénica	Zm00001d001877	Phytosulfokine receptor 1
S7_153654562	7	158943632	3.79	gen	Zm00001d021642	Uncharacterized
					Zm00001d037386	Transmembrane protein20
S6_120177825	6	124090223	3.79	Intergénica	Zm00001d037387	DUF679 domain membrane protein 7
					Zm00001d035548	Protein NETWORKED 2D /
S6_31315953	6	32798044	3.79	Intergénica	Zm00001d035550	Uncharacterized

S3_223691921	3	227444492	3.70	gen	Zm00001d044412	Uncharacterized
S2_183402893	2	188906946	3.69	gen	Zm00001d005794	AT-rich interactive domain-containing protein 4
S1_12663168	1	12850633	3.66	gen	Zm00001d027759	Yucca7 (Probable indole-3-pyruvate monooxygenase)
S7_165912861	7	171513793	3.65	gen	Zm00001d022167	Putative caltractin
S10_69087693	10	68325983	3.65	gen	Zm00001d024386	xyloglucan endo-transglycosylase/hydrolase1
S3_199745938	3	204043522	3.65	Intergénica	LOC103651229	-----
S3_211534125	3	215165215	3.64	gen	Zm00001d043965	Mannan endo-14-beta-mannosidase 7
S2_185171168	2	190762251	3.60	gen	Zm00001d005847 Zm00001d011185	Uncharacterized Protein transport protein Sec61 subunit beta
S8_138261555	8	142338475	3.59	Intergénica	Zm00001d011187	Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein
S6_143989532	6	148087924	3.59	gen	Zm00001d038106	E3 ubiquitin-protein ligase KEG
S9_91249888	9	94659815	3.59	gen	Zm00001d046537	ABC transporter G family member 26
S5_5212954	5	5339797	3.55	gen	Zm00001d013138	GeBP-transcription factor 19 (Tyrosine specific protein phosphatase-like)
S6_149531827	6	153621057	3.52	gen	Zm00001d038296	Putative bZIP transcription factor superfamily protein

Del total de los SNP asociados, 23 se ubicaron dentro del marco de lectura abierto de un gen y 5 correspondieron a regiones intergénicas; en estos casos se buscaron los genes adyacentes más cercanos (tanto río arriba como río abajo) de cada SNP que estuvieran a menos de 5,000 pb de distancia. Sólo para el SNP intergénico S3_199745938 no se encontraron marcos de lectura abiertos a más de 100 kbp de distancia. De esta forma se consideraron 31 genes candidatos en total.

Solamente tres de los genes candidatos identificados en este trabajo se encuentran caracterizados funcionalmente en maíz. La información sobre la función molecular o el proceso biológico (Tabla 3) de los genes candidatos restantes se obtuvo a partir de la base de datos de Gramene y UniProtKB. En estos casos, la mayoría de la información se infiere con base en la homología que existe con el arroz (*O. sativa*) y *A. thaliana*.

Tabla 3. Información sobre la función molecular y proceso biológico de los genes asociados a la elongación del coleoptilo. Los genes candidatos asociados están ordenados de manera ascendente de acuerdo a su valor de asociación.

Gen asociado	Cromosoma	Probable función molecular y/o biológica
Zm00001d025281	10	Factor de transcripción, unión específica a DNA
Zm00001d024000	10	Hidroliza compuestos glucosilo, involucrado en el metabolismo de carbohidratos
Zm00001d034510	1	Transporte polar de auxinas, especificación del destino celular
Zm00001d023272	10	Familia de proteínas ENTH/VHS
Zm00001d008957	8	Ligasa, sintetasa ja-amino / Cataliza la síntesis de los conjugados de ácido indol-3-acético (IAA) -aminoácido
Zm00001d034805	1	Proteína transportadora
Zm00001d051791	4	Hidrolasa, actua sobre enlaces ester / proceso catabólico de lípidos
Zm00001d046803	9	Localización polar transitoria y segregación desigual /división celular asimétrica
Zm00001d023581	10	Transducción de señales
Zm00001d042474	3	Actividad hidrolasa ester carboxilo
Zm00001d006668	2	Unión a DNA, actividad de dimerización de proteínas /regulación de la transcripción
Zm00001d001876		Proteína no caracterizada
Zm00001d001877	2	Unión a ATP, proteína con actividad cinasa serina-treonina
Zm00001d021642	7	Proteína no caracterizada
Zm00001d037386	6	Proteína transmembranal
Zm00001d037387	6	Actividad cinasa / Organización del sistema de endomembranas
Zm00001d035548		Enlace de actina / Complejo adaptador membrana-citoesqueleto.

Zm00001d035550	6	Proteína no caracterizada
Zm00001d044412	3	Proteína no caracterizada
Zm00001d005794	2	Unión a DNA
Zm00001d027759	1	Unión del dinucleótido flavina adenina, actividad monooxigenasa N, N-dimetilanilina, unión al NADP
Zm00001d022167	7	Caltractina putativa
Zm00001d024386	10	Xyloglucosyl transferasa / Biogénesis y organización de la pared celular, metabolismo del xiloglucono
Zm00001d043965	3	Actividad hidrolasa, hidrolización de compuestos O-Glucosil/ Proceso metabólico de los carbohidratos
Zm00001d005847	2	Proteína no caracterizada
Zm00001d011185	8	Necesario para la translocación de proteínas en el retículo endoplásmico.
Zm00001d011187		Unión a DNA/ Proteína con actividad de dimerización
Zm00001d038106	6	Unión a ATP, ligasa, cinasa, union de iones metálicos
Zm00001d046537	9	ATP-asa, union a ATP/ Formación y maduración de polen
Zm00001d013138	5	Regulación de la transcripción, DNA molde
Zm00001d038296	6	Factor de transcripción, unión a ADN secuencia-específico / Transcripción

Los genes asociados se clasificaron en 9 categorías tomando en cuenta la función molecular, la función biológica o, de ser posible y dependiendo de la información disponible en la literatura, los procesos celulares en los que participan. En la **Figura 7** se observa una gráfica con el número de genes incluido en cada categoría. Los genes con mayor representación en este análisis codifican factores de transcripción o proteínas con motivos de unión a DNA, que tuvieron 6 miembros, seguido de 4 genes que codifican proteínas involucradas con el metabolismo y el transporte de las auxinas y, en la misma proporción, proteínas involucradas con el tránsito y la organización celulares. Así mismo, se hallaron 3 genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular y 3 proteínas con dominios de

unión al ATP. Por último, hay un gen que codifica un factor involucrado en la división celular asimétrica, otro que codifica a una proteína transportadora y dos cuyos productos codifican proteínas con actividad de hidrolasa relacionadas con distintas rutas catabólicas.

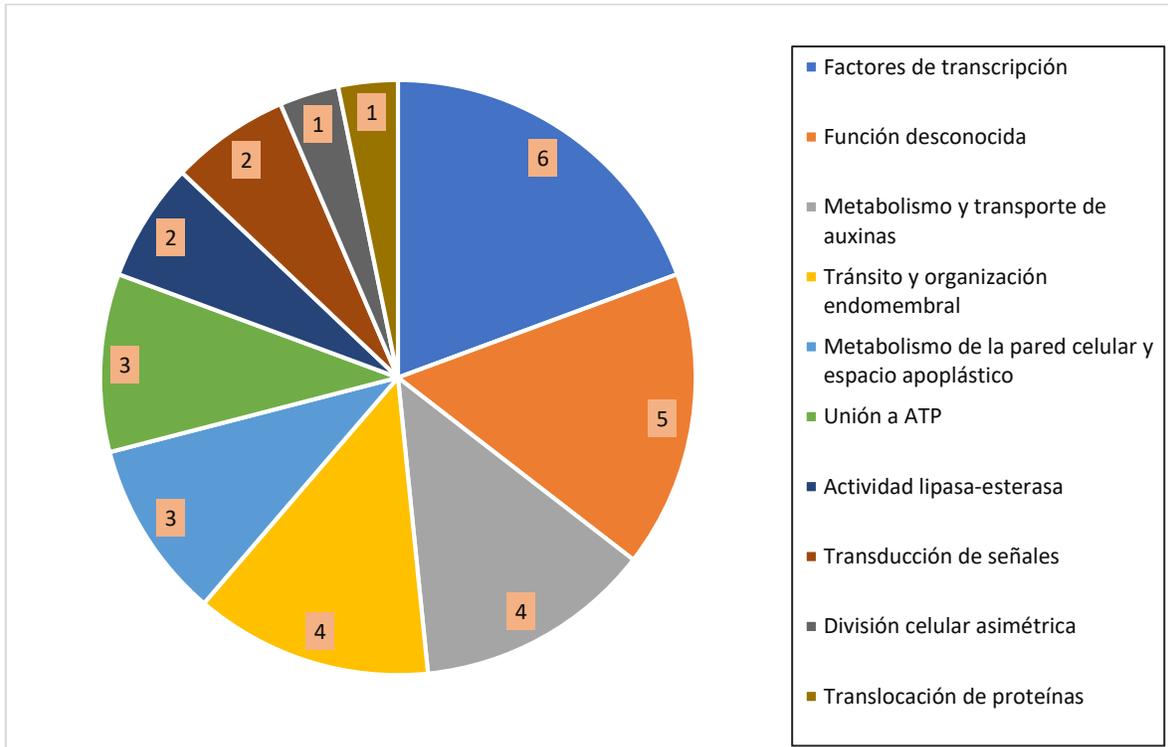


Figura 7. Clasificación de funciones de los genes asociados a la elongación del coleoptilo. Se observa que los genes que codifican para factores de transcripción son los más representados en este análisis, así como los involucrados en el metabolismo de la pared celular y el tránsito del sistema de endomembranas.

En la **Tabla 4** se muestran los tres genes con caracterización funcional parcial en maíz, así como el nombre de sus elementos reguladores en *cis*. Dos de ellos codifican a las enzimas beta-glucosidasa 3 y ácido-indol-3-acético-amido sintetasa (*GH3.6*), respectivamente, y cuentan con análisis bioinformáticos y de expresión bajo distintas condiciones ambientales (Feng *et al.*, 2015; Gómez-Anduro *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016). Mientras que el tercero codifica a la proteína *ZmXTH1* xiloglucano endotransglucosilasa, la cual cuenta con caracterización de su patrón de expresión ante estímulos hormonales así como estudios de caracterización enzimática (Genovesi *et al.*, 2008).

Tabla 4. Elementos reguladores en *cis* en los promotores de genes asociados a la elongación del coleoptilo que han sido caracterizados en maíz (*Zea mays spp. mays*)

Gen candidato	Elementos <i>cis</i>
Ácido-indol-3-acético-amido sintetasa (GH3.6)	<p><i>ASF</i>: respuesta a auxina</p> <p><i>ARFAT</i>: (<i>AuxRE</i>) elemento de respuesta a las auxinas</p> <p><i>SARE</i>: elemento promotor de respuesta al ácido salicílico.</p> <p>Sitio de unión <i>W-box</i>: <i>WRKY</i>.</p> <p><i>CG-box</i>: sitio de unión a CAMTA</p> <p><i>DRe/CRT</i>: respuesta a la deshidratación y al frío</p>
Beta-glucosidasa 3	<p><i>GATA Box</i>: control de la transcripción dependiente de la luz</p> <p><i>ERELEE4</i>: Elemento de respuesta al etileno</p> <p><i>WRKY71OS</i>: Sitio de unión a <i>WRKY71</i>, un represor transcripcional de la ruta de señalización de las giberelinas, relacionado con la defensa de la planta.</p>
ZmXTH1 Xiloglucano-endotransglucosilasa	<p>Respuesta al etileno y a las giberelinas.</p>

Discusión

Variación en la longitud del coleoptilo

La longitud del coleoptilo en la colección DTMA presentó variabilidad entre cada accesión y entre los individuos, lo cual era una condición necesaria para llevar a cabo la asociación genómica.

La elongación del coleoptilo de plántulas de maíz en la población DTMA no tiene una contribución significativa en la emergencia a la superficie de las plántulas. Sin embargo, es necesario conocer si este patrón se mantiene en otras poblaciones de maíz especialmente en razas nativas. Algunos trabajos muestran que, tanto en razas de maíz como en sus ancestros silvestres, los *teocintles*, y en especies cercanas del género *Tripsacum*, el tamaño del coleoptilo es mayor que en la población híbrida DTMA (Cruz-Sánchez, datos no publicados; Martínez-Nava, datos no publicados). Por lo tanto, el tamaño del coleoptilo podría contribuir de manera más significativa a la emergencia en otras razas y variedades de maíz. Por otro lado, la contribución de esta estructura a la emergencia de las plántulas podría depender de otras características distintas al tamaño (e. g. la rigidez de la punta y el grosor del coleoptilo), ya que son cualidades que posiblemente le permiten abrirse paso a la superficie.

Por otro lado, el análisis de regresión lineal entre las diferentes estructuras de la plántula, muestran que la proporción de la varianza en la longitud del coleoptilo, que se explica a partir del mesocotilo, la raíz primaria y las RANC es muy baja (0.081, 0.164 y 0.091, respectivamente) lo cual indica que bajo condiciones de siembra profunda la variación en el tamaño del coleoptilo no influye en la variación del tamaño de estas otras estructuras y viceversa. Por otro lado, la correlación positiva entre el coleoptilo y la plúmula ($r^2 = 0.256$) se puede explicar en parte, porque el punto de medición de ambas estructuras se determinó a partir del nodo coleoptilar; por lo tanto, en todos los individuos, el tamaño de la plúmula correspondía por lo menos al tamaño del coleoptilo. En este sentido no es posible determinar si la variación en el tamaño del coleoptilo se ve afectada por el tamaño de la plúmula, o viceversa.

Estos resultados toman relevancia, ya que ayudan a inferir que, bajo las condiciones microambientales que conlleva la siembra profunda en los ensayos de laboratorio,

especialmente la ausencia de luz, el tamaño de las estructuras no muestra influencias entre ellas. Por el contrario, se conoce que la luz influye en la longitud de las estructuras vegetales (Pratt, 1994). Por ejemplo, los estímulos de luz son percibidos por la punta del coleoptilo, ya que en esta zona se encuentra la mayor cantidad de receptores de la luz azul (criptocromos y fototropinas) y la luz roja y su presencia desencadena una respuesta fotomorfogénica que inhibe la elongación del mesocotilo en plántulas de maíz, principalmente vía la reducción del suplemento de IAA desde el coleoptilo (Kutschera y Wang, 2016).

Genes candidatos putativos

Metabolismo y transporte de auxinas

Se conoce que las auxinas son un regulador clave en el desarrollo del tallo en plántulas de maíz (Kutschera y Wang, 2016) y que inducen el crecimiento de segmentos de coleoptilo, ya que intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (Garay-Arroyo *et al.*, 2014). Debido a que la elongación del coleoptilo es resultado de la proliferación celular y del crecimiento en tamaño de células individuales, resulta concordante la presencia de proteínas involucradas en el metabolismo de auxinas para explicar la variación en el tamaño del coleoptilo.

El SNP candidato S8_26349938 está asociado al gen putativo de maíz que codifica a la ácido-indol-3-acético-amido sintetasa (*GH3-6*), también conocido como ZmGH3-9 o ZmGH3-10. Esta enzima parece específicamente adenilar al IAA y participa en la homeostasis de las auxinas libres (Zhang *et al.*, 2016). Además, se ha descrito que su expresión se induce por la adición exógena de IAA tanto en el tallo como en las hojas; en presencia de NaCl, la expresión de sus transcritos aumenta 10 veces más en las raíces que en el tallo. Finalmente, bajo tratamiento con polietilenglicol su expresión se reduce en las hojas y aumenta en la raíz (Feng *et al.*, 2015).

Además de elementos de respuesta a auxina (*AuxRE*), este gen contiene diversos elementos *cis* en su región regulatoria como *W-box*, *CG-box* y *DRe/CRT* (**Tabla 4**). Se conoce que los dos primeros elementos están involucrados con las respuestas al estrés tanto biótico como abiótico y el tercero específicamente con la respuesta a la deshidratación y al frío. Este conjunto de elementos *cis* provoca que la

transcripción de *ZmGH3-9* sea diferencialmente regulada bajo distintas condiciones ambientales. Por lo tanto, es importante hacer un análisis de la expresión de *ZmGH3-9* bajo las características microambientales que implica la siembra profunda, así como pruebas fisiológicas y genéticas que permitan analizar su repercusión en los patrones de crecimiento y a nivel celular en el coleoptilo, ya que se ha observado que algunos genes ortólogos en *A. thaliana* son regulados positivamente por luz, de modo que promueven el crecimiento del hipocotilo (Nakazawa *et al.*, 2001). Así mismo, el gen ortólogo *OsGH3.1* en arroz inhibe el crecimiento celular y la relajación de la pared celular mejorando la resistencia a los patógenos (Zhang *et al.*, 2016).

Adicionalmente, en este trabajo se encontraron otros dos SNP asociados a genes involucrados en el transporte de las auxinas. El primero codifica una proteína de la familia de cinasas de histidina-DNA girasa B-ATPasa tipo Hsp90. Esta proteína no se encuentra funcionalmente caracterizada en maíz. Sin embargo, es ortólogo del gen *NI VEIN (NOV)* de *A. thaliana*, el cual codifica un factor nuclear requerido, entre otras cosas, para el desarrollo vascular foliar, el crecimiento y la separación del cotiledón. A nivel celular está involucrado en la correcta expresión y polaridad de las proteínas PIN durante la determinación del primordio foliar y de órganos en desarrollo (Tsugeki *et al.*, 2009).

En segundo lugar, se encuentra el gen *Transmembrane protein20 (TM20)*, que algunos autores sugieren que forma parte de un sistema de transporte de auxinas activo durante la embriogénesis (Jahrmann *et al.*, 2005); se ha observado la presencia significativa de la proteína en el coleoptilo embrionario a los 10 días después de la polinización. Esto es relevante debido a que el coleoptilo es una estructura que se forma en estadios tempranos en el desarrollo embrionario y su formación, así como el de otras estructuras embrionarias, dependen de un flujo apropiado de hormonas, entre ellas las auxinas.

Los genes candidatos encontrados en este análisis en relación a auxinas están involucrados a diferentes niveles, desde su síntesis hasta el transporte polar y metabolismo de dicha hormona. Dado que las auxinas tienen una función importante tanto en la proliferación como en la elongación celulares, y que el coleoptilo es el principal productor de auxinas en estadios tempranos de la

plántula, no es de extrañarse que existan variantes alélicas que subyacen a la variación en el tamaño y patrones de elongación del coleoptilo.

Metabolismo de la pared celular y espacio apoplástico

La composición y estructura de la pared celular vegetal se encuentra en constante cambio durante el crecimiento de las células y el desarrollo vegetal (Reiter, 2002; Chebli y Geitmann, 2017). La manera en que la célula regula la modificación de esta estructura permite la expansión celular dirigida por turgencia, lo que a su vez puede repercutir en los patrones de crecimiento del coleoptilo.

Se encontró un SNP asociado a un gen que codifica para la enzima xiloglucano endotransglicosilasa. Los análisis transcripcionales del gen que codifica esta proteína en maíz indican que se expresa en toda la parte aérea de la plántula a los 6 días de germinación; se detecta preferentemente en hojas y en menor cantidad en mesocotilo y nódulo del coleoptilo, mientras que en la raíz se detectan mayoritariamente en la zona de elongación. Por el contrario, 45 días después de la germinación, los niveles de expresión son muy bajos. Esto sugiere que la proteína está relacionada con fenómenos de crecimiento y elongación en tejidos jóvenes (Genovesi *et al.*, 2008).

El trabajo de Genovesi y colaboradores (2008) indica que esta enzima tiene actividad xiloglucano endotransglicosilasa, es decir, cataliza el corte de un polímero de xiloglucano y transfiere uno de sus extremos a otra molécula u oligosacárido de xiloglucano. Cabe recordar que el xiloglucano es una hemicelulosa estructural de la pared celular que une microfibrillas de celulosa entre sí y este complejo (celulosa-xiloglucano) restringe la expansión celular y permite la generación de presión de turgencia. Por lo tanto, la actividad de las xiloglucano-endotransglicosidasas representa un mecanismo para regular el proceso de relajación de la pared durante la expansión celular, ya que durante la elongación, las microfibrillas necesitan desacoplarse y reorganizarse para permitir la incorporación de nuevo material constituyente de la pared celular (Reiter, 2002; Chebli y Geitmann, 2017).

En concordancia con lo anterior, también se ha observado que plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan *ZmXTH1* presentan pared celular y lámina media más ancha y, como consecuencia, un tallo cualitativamente más grueso (Genovesi *et al.*,

2008). En conjunto, estos datos permiten sugerir un papel de *ZmXTH1* en fenómenos de relajación de la pared durante la expansión celular.

Los análisis transcripcionales de Genovesi *et al.* (2008) fueron llevados a cabo en plántulas crecidas en sustrato bajo condiciones de invernadero y en hidroponía en incubadoras con fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad y se encontró una expresión diferencial de los transcritos de *ZmXTH1* tanto en tallo como en raíz; esto sugiere que existen factores ambientales que influyen en la expresión de dicha enzima y sería importante conocer su comportamiento bajo condiciones de siembra profunda que en primer instancia se caracterizan por la ausencia de luz y, probablemente, baja disponibilidad de oxígeno e impedancia ejercida por una mayor cantidad de sustrato sobre la plántula.

Otro gen candidato que se encontró en este trabajo es el Zm00001d024000 que codifica para la isozima beta-glucosidasa-3. La caracterización bioinformática de los exones e intrones de este gen sugiere que se localiza en los cloroplastos, además que contiene elementos reguladores en *cis* muy específicos relacionados con la deshidratación, así como con la respuesta y la regulación por etileno y amonio (Gómez-Anduro *et al.*, 2011).

En general, se conoce que las β -glucosidasas se desempeñan en la eliminación de residuos glucosilo terminales no reductores de sacáridos y glucósidos. En plantas funcionan en la lignificación de la pared celular, en el recambio de β -glucano en la pared celular, en la activación de fitohormonas, como ácido abscísico y auxinas, y en la liberación de compuestos aromáticos (Ketudat y Esen, 2010).

Cabe resaltar que se ha detectado una gran actividad de este tipo de enzimas en coleoptilos de maíz y se ha relacionado con la respuesta fototrópica. Específicamente la iluminación con luz azul (445 nm) provoca un aumento en la actividad de la β -glucosidasa, promoviendo un incremento en la síntesis de DIMBOA (2,4-Dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona), la cual, según la evidencia, tiene una función inhibitoria sobre el crecimiento de las regiones que se iluminan con luz azul en el coleoptilo, produciendo la curvatura fototrópica de dicha estructura (Jabeen *et al.*, 2006).

Lo anterior tiene sentido al considerar que bajo siembra profunda, el mecanismo principal del maíz para emerger a la superficie consiste en la elongación exagerada

del mesocotilo y que dicho crecimiento puede ser inhibido cuando el coleoptilo entra en contacto con la luz. Por lo tanto, en condiciones de oscuridad, la actividad de β -glucosidasa no promovería la activación de inhibidores del crecimiento y por lo tanto no podría comprometer la elongación celular ni el aumento de tamaño de la plántula.

Sin embargo, se conoce que la actividad enzimática de algunas β -glucosidasas es importante en el proceso de crecimiento celular vegetal, ya que permite la lignificación y el recambio de β -glucano de la pared celular (Ketudat y Esen, 2010). Por lo tanto, sería necesaria su actividad catalítica aun en condiciones de oscuridad. Por ejemplo, hay evidencia de que los transcritos de las β -glucosidasas (dhurrinase-1 y dhurrinase-2) de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), se encuentran en altos niveles en el nodo y en la parte superior del mesocotilo de plántulas etioladas, mientras que las plántulas crecidas en condiciones lumínicas presentan niveles más bajos del mRNA de dhurrinase (Cicek y Esen, 1998).

Estos ejemplos revelan que la luz es capaz promover la transcripción de algunas β -glucosidasas y, a su vez, inhibir la transcripción de otras isoenzimas, por lo que es necesario conocer específicamente qué miembros de esta familia se traducen en condiciones de siembra profunda, es decir en oscuridad, y si su actividad promueve o inhibe el crecimiento celular.

Acorde a la idea anterior, Gómez y colaboradores (2011) analizaron *in silico* la secuencia de los genes que codifican para β -glucosidasas en maíz, así como su expresión en diferentes tejidos y condiciones ambientales. Se identificaron 26 isoenzimas (*ZmBGLU*) y se determinó que la varianza en los patrones de expresión génica de cada miembro de la familia *ZmBGLU* es más alta entre el tipo de órgano que entre condiciones de crecimiento y genotipo. Además, concluyeron que no hay dos parálogos con propiedades moleculares idénticas. Por esta razón es importante conocer los patrones de expresión de las *ZmBGLU* en condiciones de siembra profunda.

Es importante considerar que la elongación del coleoptilo es resultado, en parte, del crecimiento de células individuales y que el metabolismo de la pared celular es fundamental para dicho proceso. En este sentido, no es de extrañarse la asociación de genes que codifiquen para β -glucosidasas para explicar la varianza en la elongación del coleoptilo.

Por otro lado, se encontró un SNP asociado a un gen que codifica una proteína con actividad de hidrolasa en el cromosoma 3. Esta proteína es una manano endo-14-beta-manosidasa 7. El gen no se encuentra caracterizado funcionalmente en maíz, pero tiene un ortólogo en *A. thaliana* (*MAN3*) cuya enzima codificada se localiza en el espacio apoplástico, tiene actividad endo- β -mananosa y confiere tolerancia al Cd mediada por un aumento en la acumulación de manosa en la pared celular de plantas transgénicas de *A. thaliana* (Chen *et al.*, 2015).

La pared celular es una estructura dinámica cuya arquitectura se encuentra en constante cambio durante el crecimiento y su composición es un factor que repercute en la elongación celular. Asimismo, se ha observado que las diferentes enzimas que promueven cambios en su estructura, a su vez, pueden ser inducidos por diferentes señales ambientales y, por lo tanto, cambian los patrones de crecimiento y elongación celular. En este sentido, sería importante conocer de qué manera las variantes alélicas de los genes encontrados en este trabajo pueden influir en la dinámica y en el metabolismo de la pared celular en distintos contextos ambientales. Es importante considerar que la elongación del coleoptilo es resultado no solo de la proliferación celular, sino del crecimiento de células individuales y que el metabolismo de la pared celular es fundamental para éste último proceso. En este sentido, no es de extrañarse la presencia de genes implicados en la modificación estructural de la pared celular.

Actividad lipasa-esterasa

Se encontró un miembro de la familia de genes GDSL que codifica una esterasa/lipasa. Esta familia está compuesta por enzimas que hidrolizan lípidos (Lai *et al.*, 2017). En *Arabidopsis*, las funciones biológicas de esta familia de enzimas están asociadas con la regulación de componentes de la pared celular (de la Torre *et al.*, 2002), la formación de la cutícula (Takahashi *et al.*, 2010), el aumento en la respuesta inmune vía señalización por etileno (Kim *et al.*, 2014), así como en la regulación negativa de la señalización de auxinas bajo estrés por patógenos (Lee *et al.*, 2009).

La enzima de maíz *AChE* (acetilcolinesterasa), contiene un dominio de la familia GDSL. Se ha observado que su actividad en el mesocotilo y en el nodo coleoptilar, principalmente en la epidermis, aumenta durante el estrés calórico de plántulas de maíz lo que sugiere que tiene un papel importante en la tolerancia al calor del

maíz. Por lo tanto, la actividad de *AChE* podría relacionarse con la regulación de la homeostasis del agua durante el estrés calórico, como la prevención de la transpiración epidérmica y/o el control del agua y el equilibrio iónico a través de vacuolas (Yamamoto y Momonoki, 2012).

AChE también está relacionada con el gravitropismo en plántulas de maíz (Sagane *et al.*, 2005). Cabe recordar que la curvatura de las plantas provocada por el efecto gravitropico negativo es, en buena medida, el resultado de la distribución asimétrica del IAA que acelera el crecimiento celular de la parte baja del tallo graviestimulado, en donde se encuentra en mayor concentración esta hormona. Si bien los datos de Sagane y colaboradores indican que la actividad de AChE está asociada a la distribución asimétrica del IAA durante la respuesta gravitropica, esto no significa que la enzima esté limitada a este proceso, ya que el cambio de orientación es resultado del crecimiento celular asimétrico, habiendo razones para suponer que esta enzima está relacionada con el proceso general de elongación celular y por lo tanto, responder a otros estímulos ambientales. Dado que este gen está asociado a la elongación del coleoptilo bajo condiciones de siembra profunda, su actividad podría responder a factores ambientales que la plántula presenta en esta condición de siembra.

Otro SNP que se encontró fue el asociado a un gen que codifica una carboxilesterasa-11 putativa, cuyo ortólogo en *A. thaliana*, conocido como *CXE11*, se expresa constitutivamente en diversos tejidos de las plantas y su papel biológico es aun desconocido (Putterill *et al.*, 2007). En general, las carboxilesterasas hidrolizan ésteres de cadenas cortas de ácidos grasos y se especula que tienen implicaciones en la respuesta a patógenos y a diversas vías de señalización de las plantas. También se conoce que algunos receptores de giberelinas tienen secuencias homólogas con varias carboxilesterasas (Vandenbussche *et al.*, 2007). Esto es importante porque las giberelinas son hormonas vegetales que pueden regular el crecimiento por proliferación y la elongación en las plantas.

Unión al ATP

Se encontró un gen que codifica un receptor de fitosulfoquina (PSKR1) el cual es un receptor tipo cinasa rico en leucinas (Kwezi *et al.*, 2011). La sobreexpresión de su ortólogo en *A. thaliana* (*AtPSKR1*) altera la longevidad y el potencial de crecimiento (Kwezi *et al.*, 2011).

La fitosulfoquina (PSK, por sus siglas en inglés) es un péptido sulfatado de 5 aminoácidos que promueve el crecimiento de los órganos de las plántulas, principalmente a través de la expansión celular (Sauter, 2015). Asimismo, también promueve la proliferación en cultivos celulares vegetales *in vitro* (Matsubayashi, 2006). La acción de la PSK depende de su unión al receptor de *PSK* localizado en la membrana celular. Aunque diversos descubrimientos sugieren que los precursores de la *PSK* se expresan más fuertemente en tejidos vegetales maduros que en los jóvenes (Matsubayashi, 2006), la asociación a la elongación del coleoptilo en este trabajo podría suponer que también participa en el crecimiento de este tejido joven.

Otro gen candidato conocido como *KEEP ON GOING (KEG)* codifica para una proteína E3 ubiquitina-ligasa, la cual no se encuentra funcionalmente caracterizada en maíz, pero se conoce que en *A. thaliana* regula negativamente la señalización del ácido abscísico (ABA) (Wawrzynska *et al.*, 2008). Se sugiere que, en ausencia de estrés, la proteína KEG mantiene a los factores de transcripción de respuesta a ABA (como ABI5) a niveles bajos, ya que controla su degradación vía proteosoma (Liu y Stone, 2013). Así mismo, la pérdida de función de *KEG* produce un fuerte arresto del crecimiento postgerminativo; los cotiledones no se expanden, la emergencia del primer par de hojas verdaderas se retrasa 3 semanas y el segundo par de hojas verdaderas no surge, además el hipocotilo es significativamente de menor tamaño tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Stone *et al.*, 2006).

Cabe recordar que el ABA es una hormona importante en el crecimiento y el desarrollo vegetal, especialmente ante condiciones ambientales desfavorables (Stone *et al.*, 2006). Inmediatamente después de la germinación, el ABA puede suspender el crecimiento de las plántulas si están en condiciones de estrés. Este arresto postgerminativo representa un punto de control del desarrollo temprano para desacelerar el crecimiento de las plántulas hasta que surgen mejores condiciones (Lopez-Molina *et al.*, 2001).

Lo anterior es muy importante, ya que se han observado diferencias en los patrones de crecimiento en las etapas postgerminativas entre líneas híbridas y razas nativas de maíz, así como teocinte, bajo condiciones de siembra profunda. Por ejemplo, en la colección endogámica utilizada en este trabajo (DTMA), así como en poblaciones BC₁F_{2:3} de maíz, a los 7 días de germinación la plúmula

rompe el coleoptilo y se alarga de manera significativa contribuyendo a la emergencia. Sin embargo, en las plántulas de distintas variedades de maíz nativo, así como en sus parientes silvestres los teocintles, el coleoptilo se rompe con mucho menor frecuencia por la plúmula. En el caso de las especies del género *Tripsacum*, otro pariente cercano del maíz, se encontró que la plúmula nunca rompe al coleoptilo previo a la emergencia (Alberto Cruz Sánchez, datos no publicados).

Una posible explicación para este fenómeno es que la capacidad de la plúmula para romper el coleoptilo aún en condiciones de oscuridad es una característica que ha sido reforzada durante la domesticación. Debido a que la gran mayoría de las variedades nativas y los híbridos mejorados son sembrados de forma somera, los alelos que inhiben el crecimiento plumular en ausencia de luz no fueron fijados en estas poblaciones, mientras que algunas variedades nativas y los parientes silvestres conservan alelos que promueven una fina regulación ante la ausencia/presencia de luz. La variación alélica funcional del gen *KEG E3 ubiquitin-protein ligase*, por el fenotipo asociado a la pérdida de función en *A. thaliana*, puede ser un buen candidato para poner a prueba esa hipótesis.

Factores de transcripción y unión a DNA

Los factores de transcripción forman parte de una red de regulación transcripcional que determina el patrón de la expresión génica en las células de un organismo durante su desarrollo (Arratia y Aguirre, 2013; Walhout, 2011). Las modificaciones en los elementos de una red transcripcional pueden acarrear cambios no lineales en su dinámica, lo que significa grandes cambios en el fenotipo del organismo que los porta (Dávila y Álvarez, 2015). En este sentido, la variación alélica de un factor de transcripción puede tener efectos fenotípicos relevantes. Varios factores de transcripción se asociaron a la variación en la elongación del coleoptilo.

El SNP candidato S10_111618837 obtuvo el valor de asociación más alto con un $-\log p$ de 5.03. Dicho polimorfismo se encuentra dentro del marco de lectura del gen putativo *AP2-EREBP* que codifica al factor de transcripción *149* (*Zm00001d025281*). La familia multigénica AP2/EREB únicamente se ha identificado en plantas y puede dividirse en dos subfamilias basadas en el número de dominios AP2 que poseen: la subfamilia EREB, que contiene uno solo; y la subfamilia AP2, que cuenta con dos (Riechmann y Meyerowitz, 1998).

Los genes tipo *AP2* (*apetala2*) actúan como reguladores clave en los procesos de desarrollo y sus funciones han sido determinadas por análisis en los mutantes del gen *G15*, para el caso de maíz y *ap2* y *ant* para *Arabidopsis*. Por otro lado, los genes tipo *EREB* (proteínas de unión a elementos sensibles al etileno) están involucrados en respuestas a estreses bióticos y abióticos (Riechmann y Meyerowitz, 1998).

El gen *G15* se requiere para la expresión de caracteres propios de un estadio juvenil en la epidermis de las hojas de las plántulas; como la presencia de cera epicuticular y la ausencia de pelos epidérmicos. La mutación de este gen no afecta otros rasgos morfológicos juveniles de la plántula (Vega *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 1994).

Por otro lado, los genes tipo *EREB* han sido relacionados en su mayoría con respuesta a patógenos y a condiciones ambientales adversas, tales como el frío o la sequía vía la activación por etileno (Riechmann y Meyerowitz, 1998). El etileno es una molécula señalizadora que induce la expresión de varios genes relacionados con la patogénesis, entre ellos se encuentran los genes tipo *EREBP*. *TINY* es un gen tipo *EREBP* reportado en *Arabidopsis*, la sobre expresión de este gen presenta efectos pleiotrópicos, como reducción en el tamaño y la elongación del hipocotilo, como consecuencia de una reducción general en la expansión celular (Wilson *et al.*, 1996).

Cabe señalar que el etileno tiene efectos en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas. En términos de crecimiento, esta fitohormona se asocia con mayor frecuencia a la regulación en el tamaño de las plantas y a la inhibición del alargamiento y la división celular (Schaller, 2012). Por ejemplo, las variedades silvestres de *Arabidopsis* que se someten a etileno exógeno desarrollan un hipocotilo corto y grueso, mientras que las mutantes insensibles al etileno no muestran estos cambios morfológicos (Guzmán y Ecker, 1990).

Las enzimas involucradas en la ruta biosintética del etileno se expresan diferencialmente en respuesta a las señales del desarrollo interno y al estrés ambiental, como la anoxia, la sequía y la presión mecánica. Además, esta hormona es biológicamente activa a muy bajas concentraciones: alrededor de 0.01 a 1.0 partes por millón (ppm) (Chang, 2016). Lo anterior toma relevancia al considerar que las plántulas sometidas a siembra profunda tienen una mayor presión

mecánica ejercida por el sustrato que aquellas sembradas de forma somera, lo cual podría promover la biosíntesis del etileno en respuesta a la siembra profunda lo que podría afectar en la elongación celular y el tamaño del coleoptilo, así como otras estructuras de la plántula.

Se encontraron asociados también otros genes candidatos que codifican para factores de transcripción (FT) putativos que carecen de caracterización funcional en maíz. La mayor parte de la información disponible se encuentra en *A. thaliana*. Por ejemplo, se encuentra el gen *MADS-transcription factor 17*, cuyos miembros se han relacionado principalmente con el desarrollo floral en dicotiledóneas y en *O. sativa* (Ohmori *et al.*, 2009). Así mismo, se encontró el gen candidato putativo *AT-rich interactive domain-containing protein 4*, cuyos miembros están implicados en el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celular (Wilsker *et al.*, 2002). También se encontró un miembro putativo de la familia de factores de transcripción de la superfamilia de proteínas con dominios de unión al DNA tipo HLH (Hélice-vuelta-hélice básica, del inglés: *Basic Helix-Loop-Helix*), cuya función en plantas se desconoce, pero se infiere que puede estar relacionada con la proliferación celular y el desarrollo de tejidos (Heim *et al.*, 2003).

Otro gen candidato asociado que se encontró en este trabajo y que tampoco está caracterizado en maíz codifica para el factor de transcripción GeBP-19 (*Glabrous1 enhancer binding protein*, por sus siglas en inglés). Se conoce que los miembros de esa familia en *A. thaliana* influyen en la señalización de las citocininas, ya que mutantes de pérdida de función son menos sensibles a las citocininas exógenas y se observa un aumento en los niveles de transcripción de los genes ARR (*Arabidopsis response regulators*) de tipo A sensibles a las citocininas (Chevalier *et al.*, 2008). Las citocininas regulan el crecimiento celular y el desarrollo, incluyendo la actividad meristemática apical y caulinar. También se conoce que el gen *GeBP* en *A. thaliana* se expresa principalmente en los tejidos meristemáticos vegetativos y en los primordios foliares muy jóvenes, además que, posiblemente, actúe como un represor del destino de las células de la hoja (Curaba *et al.*, 2003). Esto es importante, ya que concuerda con el hecho de que el coleoptilo es un órgano embrionario cuyas funciones se limitan a los primeros estadios de desarrollo de las plántulas.

Por último, se encontró un gen que codifica a un miembro putativo de la familia de factores de transcripción tipo bZIP, los cuales son reguladores de algunos procesos fisiológicos y del desarrollo incluyendo la fotomorfogénesis, la formación de semilla y hojas, la homeostasis de energía y la respuesta al estrés biótico y abiótico (Guedes-Corrêa *et al.*, 2008).

Conclusiones

La elongación del coleoptilo en plántulas de maíz en la población DTMA no mostró una contribución significativa en la emergencia a la superficie de las plántulas. Asimismo, la variación de tamaño del mesocotilo, el tallo, la plúmula, la raíz principal, y las RANC, no correlacionaron significativamente con la longitud del coleoptilo bajo condiciones de siembra profunda.

El GWAS reveló que la variación en la elongación del coleoptilo en la colección DTMA de maíz es un carácter complejo al cual contribuyen varios *loci* con efectos pequeños sobre el tamaño. Muchos de los *loci* asociados corresponden a genes candidatos relacionados con procesos de elongación celular como son: la relajación de la pared, la homeostasis de las auxinas, así como la biosíntesis y la secreción de componentes de la pared celular. Además, se encontraron genes relacionados con el proceso de división celular y el metabolismo celular y la funcionalidad del sistema de endomembranas. En este sentido se puede advertir que los procesos de elongación celular dirigidos por turgencia y la división celular tienen un papel fundamental en la determinación de la variación en el tamaño del coleoptilo.

Los genes encontrados en este trabajo podrían contribuir a entender la variación genética que subyace a la elongación del coleoptilo, especialmente en cultivos como el trigo, donde el factor limitante para la emergencia en condiciones de siembra profunda es el tamaño de esta estructura.

Perspectivas

El presente trabajo fue un primer paso para elucidar la variación genética que produce la variación en la longitud del coleoptilo. Los resultados aquí presentados proporcionan información que puede abordarse desde diferentes enfoques tanto para el entendimiento de la genética y fisiología de la elongación del coleoptilo y celular, hasta una aproximación evolutiva sobre este carácter en razas de maíz y parientes cercanos.

Por un lado, el GWAS es una buena aproximación para detectar genes candidatos asociados a la elongación de la variación del coleoptilo. Esta herramienta se basa en la detección de haplotipos que segregan ligados durante la meiosis, pero la detección de los alelos causales depende de la profundidad de secuenciación. Para

ello sería importante realizar una re-secuenciación de los genes candidatos y posteriormente, realizar una nueva asociación que permita esclarecer con mayor detalle la variación alélica causal. La identificación de los genes implicados en la elongación del coleoptilo en condiciones de siembra profunda puede ser la base de estudios sobre genética funcional que permitan determinar los roles moleculares precisos de las proteínas codificadas por dichos genes.

Así mismo, es posible hacer mediciones precisas de las características microambientales que conlleva la siembra profunda; especialmente la impedancia para distintos tipos de suelo y la acumulación de etileno a distintas profundidades. También será importante realizar el análisis de expresión en distintos tejidos bajo las características microambientales que implica la siembra profunda; especialmente la luz y la acumulación de etileno. De este modo será posible conocer de manera más detallada los factores involucrados en la regulación de los genes candidatos y si estos repercuten en un cambio en los patrones de crecimiento del coleoptilo u otra estructura o bien, en los patrones de crecimiento celular.

Por último, sería importante realizar análisis comparativos de *RNA-seq* entre una variedad nativa de maíz que presenten un gran tamaño de coleoptilo y una variedad o línea mejorada con un tamaño de coleoptilo contrastantemente menor. De esta manera será posible comprobar experimentalmente si los genes candidatos encontrados en este trabajo efectivamente tienen una repercusión en la variación de la longitud del coleoptilo. Así mismo, los genes diferencialmente expresados, pueden estudiarse desde un enfoque de evolución molecular y genética de poblaciones para dilucidar si hay procesos microevolutivos involucrados en la variación de este carácter. Esto es importante, ya que los resultados de este trabajo, en conjunto con otras investigaciones llevadas en el Laboratorio de Fisiología Molecular sugieren que el tamaño del coleoptilo es un carácter que posiblemente tenga un papel biológico de mayor contribución a la emergencia en variedades nativas de maíz (Cruz-Sánchez, 2018; Martínez-Nava, 2018), por lo que conocer su evolución puede tener implicaciones en su manejo y conservación tanto *in situ* como del germoplasma.

Referencias

- Arratia, J., y Aguirre, J. (2013). Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 98–108. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72081-3](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72081-3)
- Avery, G. (1930). Comparative anatomy and morphology of embryos and seedlings of maize, oats, and wheat. *Botanical Gazette*, 89(1), 1–39. <https://doi.org/10.2307/2678832>
- Boysen, J. (1918). Studies on the production of matter in light- and shadow-plants. *Botanisk Tidsskrift*, 36, 219–126.
- 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Briggs, W. R. (2014). Phototropism: some history, some puzzles, and a look ahead. *Plant Physiology*, 164(1), 13–23. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230573>
- Cairns, J. E., Crossa, J., Zaidi, P. H., Grudloyma, P., Sanchez, C., Luis Araus, J., ... Atlin, G. N. (2013). Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Science*, 53(4), 1335–1346. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.09.0545>
- Chae, K., Issacs, C., Reeves, P., Maloney, G., Muday, G., Nagpal, P., & Reed, J. (2012). Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation. *The Plant Journal*, 71(4), 684–697.
- Chang, C. (2016). Q and A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>
- Chebli, Y., & Geitmann, A. (2017). Cellular growth in plants requires regulation of cell wall biochemistry. *Current Opinion in Cell Biology*, 44(2), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.002>
- Chen, J., Yang, L., Gu, J., Bai, X., Ren, Y., Fan, T., ... Cao, S. (2015). MAN3 gene regulates cadmium tolerance through the glutathione-dependent pathway in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 205(2), 570–582. <https://doi.org/10.1111/nph.13101>
- Chevalier, F., Perazza, D., Laporte, F., Le Henanff, G., Hornitschek, P., Bonneville, J.-M., ... Vachon, G. (2008). GeBP and GeBP-Like Proteins Are Noncanonical Leucine-Zipper Transcription Factors That Regulate Cytokinin Response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1142–1154. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110270>
- Cicek, M., & Esen, A. (1998). Structure and expression of a dhurrinase (β -Glucosidase) from Sorghum. *Plant Physiology*, 116(4), 1469 LP-1478. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/116/4/1469.abstract>
- Clouse, S. (2003). *REGULATORS OF GROWTH | Brassinosteroids*. (B. Thomas, Ed.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Academic Press.

- Collins, G. N. (1914). Pueblo Indian Maize Breeding. *Journal of Heredity*, 5(6), 255–268.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107868>
- Cruz-Sánchez, A. (2019). *La elongación del mesocotilo en respuesta a la siembra profunda en los géneros Zea (razas de maíz y teocintles) y Tripsacum (Poacea)*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. (En proceso).
- Curaba, J., Herzog, M., & Vachon, G. (2003). GeBP, the first member of a new gene family in Arabidopsis, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1. *Plant J*, 33(2), 305–317. <https://doi.org/1622> [pii]
- Darwin, C. (2009). *El poder del movimiento en las plantas (Colección de la Biblioteca de Cambridge - Darwin, Evolución y Genética)*. Cambridge: Cambridge University. [https://doi.org/10.1017 / CBO9780511693670](https://doi.org/10.1017/CBO9780511693670)
- Dávila, J., & Álvarez, E. (2015). Esquemas de causación lineales en biología postgenómica: la subliminal y conveniente suposición del mapeo uno a uno entre genotipo y fenotipo. *Interdisciplina*, 3(5), 61–76.
- De Jussieu, A. (1839). Sur les embryons monocotyledone. *Annales Des Sciences Naturelles: Botanique, II*, 341–361.
- de la Torre, F., Sampedro, J., Zarra, I., & Revilla, G. (2002). AtFXG1, an Arabidopsis gene encoding alpha -l-fucosidase active against fucosylated xyloglucan Oligosaccharides. *Plant Physiology*, 128(1), 247 LP-255. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/128/1/247.abstract>
- El-Hendawy, S., Al-Suhaibani, N., Schmidhalter, U., & Sakagami, J. I. (2014). Adaptive traits associated with tolerance to flash flooding during emergence and early seedling growth stages in rice. *Plant OMICS*, 7(6), 474–489.
- Evans, M. M., Passas, H. J., & Poethig, R. S. (1994). Heterochronic effects of glossy15 mutations on epidermal cell identity in maize. *Development (Cambridge, England)*, 120(7), 1971–1981. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925002>
- Feng, S., Yue, R., Tao, S., Yang, Y., Zhang, L., Xu, M., ... Shen, C. (2015). Genome-wide identification, expression analysis of auxin-responsive GH3 family genes in maize (*Zea mays* L.) under abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(9), 783–795.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12327>
- Gao, Q., Zhao, M., Li, F., Guo, Q., Xing, S., & Wang, W. (2008). Expansins and coleoptile elongation in wheat. *Protoplasma*, 233, 73–81.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 33(1), 13–22. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Genovesi, V., Fornalé, S., Fry, S. C., Ruel, K., Ferrer, P., Encina, A., ... Caparrós-Ruiz, D. (2008). ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in maize, affects cell wall

- structure and composition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 875–889. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern013>
- Gómez-Anduro, G., Cenicerros-Ojeda, E. A., Casados-Vázquez, L. E., Bencivenni, C., Sierra-Beltrán, A., Murillo-Amador, B., & Tiessen, A. (2011). Genome-wide analysis of the beta-glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). *Plant Molecular Biology*, 77(1), 159–183. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9800-2>
- Guedes Corrêa, L. G., Riaño-Pachón, D. M., Guerra Schrago, C., Vicentini dos Santos, R., Mueller-Roeber, B., & Vincentz, M. (2008). The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: Adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS ONE*, 3(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002944>
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., & Pozo, J. C. del. (2002). G 1 to S transition : more than a cell cycle engine switch Crisanto Gutierrez * , Elena Ramirez-Parra , M Mar Castellano. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 480–486.
- Guzmán, P., & Ecker, R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *THE PLANT CELL ONLINE*, 2(June), 513–523. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.6.513>
- Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: Historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116(6), 483–505. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0110-x>
- Harris, D., Hamdi, Q. A., & Terry, A. C. (1987). Germination and emergence of *Sorghum bicolor*. genotypic and environmentally induced variation in the response to temperature and depth of sowing. *Plant, Cell & Environment*, 10(6), 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1987.tb01828.x>
- He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z.-X., Liu, H., & Li, Z. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00484>
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P. C., ... Yu, G.-L. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), 735–747. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg088>
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Engler, J. D. A., Inzé, D., Beeckman, T., & Inze, D. (2013). Lateral during Early Auxin-Mediated Cell Cycle Activation Root Initiation. *The Plant Cell*, 14(10), 2339–2351. <https://doi.org/10.1105/tpc.004960.1>
- Iino, M. (1995). Gravitropism and phototropism of maize coleoptiles: Evaluation of the Cholodny-went theory through effects of auxin application and decapitation. *Plant and Cell Physiology*, 36(2), 361–367. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078768>
- Inada, N., Sakai, A., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (2002). Three-Dimensional Progression of Programmed Death in the Rice Coleoptile. *International Review of Cytology*, 218, 221–258.
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Review of Genetics*, 40(1), 77–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>

- Jabeen, R., Yamada, K., Shigemori, H., Hasegawa, T., Hara, M., Kuboi, T., & Hasegawa, K. (2006). Induction of β -glucosidase activity in maize coleoptiles by blue light illumination. *Journal of Plant Physiology*, *163*(5), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.05.004>
- Jahrmann, T., Bastida, M., Pineda, M., Gasol, E., Ludevid, M. D., Palacín, M., & Puigdomènech, P. (2005). Studies on the function of TM20, a transmembrane protein present in cereal embryos. *Planta*, *222*(1), 80–90. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1519-3>
- Jie, L., Tiffany, J., Dickerson, H., & Susanne, H. (2013). Contribution of Proteomics in the Identification of Novel Proteins Associated with Plant Growth. *Journal of Proteome Research*, *12*(11), 4882–4891.
- Jurado, S., Díaz-Triviño, S., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C., & Pozo, C. Del. (2008). SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant Journal*, *53*(5), 828–841. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03378.x>
- Ketudat, J., & Esen, A. (2010). β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(20), 3389–3405. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>
- Key, J. (1964). Ribonucleic acid and protein synthesis are essential processes for cell elongation. *Plant Physiol*, *39*, 365–370.
- Kim, H. G., Kwon, S. J., Jang, Y. J., Chung, J. H., Nam, M. H., & Park, O. K. (2014). GDSL lipase 1 regulates ethylene signaling and ethylene-associated systemic immunity in Arabidopsis. *FEBS Letters*, *588*(9), 1652–1658. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.062>
- Korte, A., & Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, *9*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>
- Kutschera, U., Deng, Z., Osés-Prieto, J. A., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y. (2010). Cessation of coleoptile elongation and loss of auxin sensitivity in developing rye seedlings: A quantitative proteomic analysis. *Plant Signaling and Behavior*, *5*(5), 509–517. <https://doi.org/10.4161/psb.11210>
- Kutschera, U., & Wang, Z. (2016). Growth-limiting proteins in maize coleoptiles and the auxin-brassinosteroid hypothesis of mesocotyl elongation. *Protoplasma*, *253*, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0787-4>
- Kwezi, L., Ruzvidzo, O., Wheeler, J. I., Govender, K., Iacuone, S., Thompson, P. E., ... Irving, H. R. (2011). The phytosulfokine (PSK) receptor is capable of guanylate cyclase activity and enabling cyclic GMP-dependent signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(25), 22580–22588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168823>
- Lai, C. P., Huang, L. M., Chen, L. F. O., Chan, M. T., & Shaw, J. F. (2017). Genome-wide analysis of GDSL-type esterases/lipases in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *95*(1–2), 181–197. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0648-y>
- Lee, D. S., Kim, B. K., Kwon, S. J., Jin, H. C., & Park, O. K. (2009). Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *379*(4), 1038–1042. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.006>

- Lestiboudois, T. (1848). Phyllotaxie anatomique, ou recherches sur les causes organiques des diverses distributions des feuilles. *Annales Des Sciences Naturelles: Botanique*, *III*, 136–189.
- Li, G., Bai, G., Carver, B. F., Elliott, N. C., Bennett, R. S., Wu, Y., ... Xu, X. (2017). Genome-wide association study reveals genetic architecture of coleoptile length in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *130*(2), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2820-1>
- Li, M., Liu, X., Bradbury, P., Yu, J., Zhang, Y. M., Todhunter, R. J., ... Zhang, Z. (2014). Enrichment of statistical power for genome-wide association studies. *BMC Biol*, *12*, 73. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0073-5>
- Lipchinsky, A. (2013). Elastic properties of the growth-controlling outer cell walls of maize coleoptile epidermis. *Acta Physiol Plant*, *35*, 2183–2191.
- Lipka, A. E., Tian, F., Wang, Q., Peiffer, J., Li, M., Bradbury, P. J., ... Zhang, Z. (2012). GAPIT: Genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics*, *28*(18), 2397–2399. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts444>
- Liu, H., & Stone, S. L. (2013). Cytoplasmic degradation of the Arabidopsis transcription factor abscisic acid insensitive 5 is mediated by the ring-type E3 ligase keep on going. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(28), 20267–20279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465369>
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., & Chua, N.-H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(8), 4782–4787. <https://doi.org/10.1073/pnas.081594298>
- Lu, C., Yuan, S., & Li, J. (2006). Contribution of both cell elongation and cell division to wheat coleoptile. *Royal Botanical Society of Belgium*, *139*(2), 167–172.
- M'Ragwa, L. R. F., Watson, C. E., & Gourley, L. M. (2000). Seedling root and coleoptile length as selection criteria for field emergence in pearl millet. *Journal of Sustainable Agriculture*, *17*(2–3), 111–121. https://doi.org/10.1300/J064v17n02_11
- Martínez-Nava, D. (2019). *Comparación morfológica del crecimiento de plántulas de maíces nativos en función de la profundidad de siembra*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. (En proceso).
- Matsubayashi, Y. (2006). Disruption and overexpression of Arabidopsis phytochrome receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiology*, *142*(1), 45–53. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081109>
- Menges, M. (2006). The D-Type Cyclin CYCD3;1 Is Limiting for the G1-to-S-Phase Transition in Arabidopsis. *the Plant Cell Online*, *18*(4), 893–906. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039636>
- Mohan, A., Schillinger, W. F., & Gill, K. S. (2013). Wheat seedling emergence from deep planting depths and its relationship with coleoptile length. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073314>
- Muñoz, A., & Pérez, G. (2002). Maíz de cajete: Agrosistema y resistencia a sequía. In J. Palerm (Ed.), *Antología sobre pequeño riego: Sistemas de riego no convencionales* (Vol. III, p. 373). Estado de México.

- Murphy, K., Balow, K., Lyon, S. R., & Jones, S. S. (2008). Response to selection, combining ability and heritability of coleoptile length in winter wheat. *Euphytica*, *164*(3), 709–718. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9692-7>
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y. Y., Yoshizumi, T., & Hasunuma, K. (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *The Plant Journal*, *25*(2), 213–221.
- Narsai, R., Edwards, J. M., Roberts, T. H., Whelan, J., Joss, G. H., y Atwell, B. J. (2015). Mechanisms of growth and patterns of gene expression in oxygen-deprived rice coleoptiles. *The Plant Journal*, *82*(1), 25–40. <https://doi.org/10.1111/tpj.12786>
- Nieto-Sotelo, J., & Cassab G. (2012). *Informe Técnico Final del proyecto IMIC-2011-008: Descripción de caracteres hidrotropicos y del desarrollo y crecimiento del mesocotilo y de las raíces adventicias en razas y líneas de maíz.*
- Noodén, L., & Thimann, K. (1963). Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *50*(2), 194–200.
- Oh, E., Zhu, J. Y., Bai, M. Y., Arenhart, R. A., Sun, Y., & Wang, Z. Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *ELife*, *2014*(3), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.03031>
- Ohmori, S., Kimizu, M., Sugita, M., Miyao, A., Hirochika, H., Uchida, E., ... Hake, S. (2009). MOSAIC FLORAL ORGANS1, an AGL6-Like MADS Box Gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. *The Plant Cell*, *21*(9), 2578–2590. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067751>
- Overbeek, J. (1936). Light Growth Response and Auxin Curvatures of Avena. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *22*(6), 421–425.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001446>
- Pratt, L. H. (1994). Distribution and localization of phychrome within the plant. In R. E. Kendrick & G. H. M. Kronenberg (Eds.), *Photomorphogenesis in Plants* (Second, pp. 163–185). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Retrieved from [http://scholar.google.com/scholar?hl=en%7B&%7DbtnG=Search%7B&%7Dq=intitle:Photomorphogenesis+in+Plants+\(2nd+edn\)%7B#%7D5](http://scholar.google.com/scholar?hl=en%7B&%7DbtnG=Search%7B&%7Dq=intitle:Photomorphogenesis+in+Plants+(2nd+edn)%7B#%7D5)
- Putterill, J. J., Plummer, K. M., Newcomb, R. D., Marshall, S. D. G., Gershater, M. C., & Edwards, R. (2007). The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Evolution*, *57*(5), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.008>
- Radford, B. J., & Henzell, R. G. (1990). Temperature affects the mesocotyl and coleoptile length of grain sorghum genotypes. *Australian Journal of Agricultural Research*, *41*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1071/AR9900079>
- Rebetzke, G. J., Bruce, S. E., & Kirkegaard, J. A. (2005). Longer coleoptiles improve emergence

- through crop residues to increase seedling number and biomass in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*, 272(1–2), 87–100. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-4040-8>
- Rebetzke, G. J., Richards, R. A., Fettell, N. A., Long, M., Condon, A. G., Forrester, R. I., & Botwright, T. L. (2007). Genotypic increases in coleoptile length improves stand establishment, vigour and grain yield of deep-sown wheat. *Field Crops Research*, 100(1), 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.05.001>
- Rebetzke, G. J., Verbyla, A. P., Verbyla, K. L., Morell, M. K., & Cavanagh, C. R. (2014). Use of a large multiparent wheat mapping population in genomic dissection of coleoptile and seedling growth. *Plant Biotechnology Journal*, 12(2), 219–230. <https://doi.org/10.1111/pbi.12130>
- Rebetzke, G. J., Zheng, B., & Chapman, S. C. (2016). Do wheat breeders have suitable genetic variation to overcome short coleoptiles and poor establishment in the warmer soils of future climates? *Functional Plant Biology*, 43(10), 961–972. <https://doi.org/10.1071/FP15362>
- Reiter, W. D. (2002). Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), 536–542. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00306-0)
- Riechmann, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*, 379(6), 633–646. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.6.633>
- Sagane, Y., Nakagawa, T., Yamamoto, K., Michikawa, S., & Oguri, S. (2005). Molecular Characterization of Maize Acetylcholinesterase . A novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiology*, 138(July), 1359–1371. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062927.1991>
- Salisbury, F., & Ross, C. (1992). Growth and Development. In *Plant Physiology* (4th ed., p. 682).
- Santana Artilles, F. (2016). La pared celular vegetal en la producción de biocombustibles. (Trabajo fin de grado). La Laguna: Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca.
- Sauter, M. (2015). Phytosulfokine peptide signalling. *Journal of Experimental Botany*, 66(17), 5161–5169. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv071>
- Schaller, G. (2012). Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biology*, 10(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-9>
- Schaller, G. E., Street, I. H., & Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015>
- Sheridan, W., & Janice, C. (1994). Fertilization and embryogeny in maize. In *The Maize Handbook* (pp. 3–10).
- Schleiden, M. (1839). Sur la formation de l'ovule et l'origine de l'embryon dans les Phanerogam. *Annales Des Sciences Naturelles: Botanique*, II, 129–141.
- Simon, A., & Yuri, S. (2011). Relationship between coleoptile and mesocotyl elongation of upland rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under submergence and soil-sand culture. *African Journal of Agricultural Research*, 6(31), 6463–6472. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1506>
- Spielmeyer, W., Hyles, J., Joaquim, P., Azanza, F., Bonnett, D., Ellis, M. E., ... Richards, R. A. (2007).

- A QTL on chromosome 6A in bread wheat (*Triticum aestivum*) is associated with longer coleoptiles, greater seedling vigour and final plant height. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0540-2>
- Srivastava, L. (2002). Hormonal Regulation of Cell Division and Cell Growth. En *Plant Growth and Development* (pp. 23–74).
- Stone, S. L., Williams, L. A., Farmer, L. M., Vierstra, R. D., & Callis, J. (2006). KEEP ON GOING, a RING E3 Ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *The Plant Cell Online*, 18(12), 3415–3428. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046532>
- Takahashi, K., Shimada, T., Kondo, M., Tamai, A., Mori, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2010). Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 51(1), 123–131. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp173>
- Takahashi, H., Saika, H., Matsumura, H., Nagamura, Y., Tsutsumi, N., Nishizawa, N. K., & Nakazono, M. (2011). Cell division and cell elongation in the coleoptile of rice alcohol dehydrogenase 1-deficient mutant are reduced under complete submergence. *Annals of Botany*, 108(2), 253–261. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr137>
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>
- Tsugeki, R., Ditengou, F. A., Sumi, Y., Teale, W., Palme, K., & Okada, K. (2009). NO VEIN Mediates Auxin-Dependent Specification and Patterning in the Arabidopsis Embryo, Shoot, and Root. *The Plant Cell*, 21(10), 3133–3151. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068841>
- van Heerwaarden, J., Doebley, J., Briggs, W. H., Glaubitz, J. C., Goodman, M. M., de Jesus Sanchez Gonzalez, J., & Ross-Ibarra, J. (2011). Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1088–1092. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013011108>
- Vandenbussche, F., Fierro, A. C., Wiedemann, G., Reski, R., & Van Der Straeten, D. (2007). Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components. *BMC Plant Biology*, 7(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-65>
- Vega, S. H., Sauer, M., Orkwiszewski, J. A. J., & Poethig, S. (2002). The early phase change Gene in Maize. *The Plant Cell*, 14(January), 133–147. <https://doi.org/10.1105/tpc.010406.identified>
- Walhout, A. J. M. (2011). *Gene-Centered Regulatory Network Mapping. Methods in Cell Biology* (Second Edition, Vol. 106). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-544172-8.00010-4>
- Wang, B., Zheng, L. J., Ma, J. J., Sun, X. H., Guo, X. H., & Guo, F. (2016). Effective root depth and water uptake ability of winter wheat by using water stable isotopes in the Loess Plateau of China. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9(6), 27–35. <https://doi.org/10.3965/j.ijabe.20160906.2450>
- Wareing, P. (1981). *Growth & Differentiation in Plants* (Third). Pergamon.

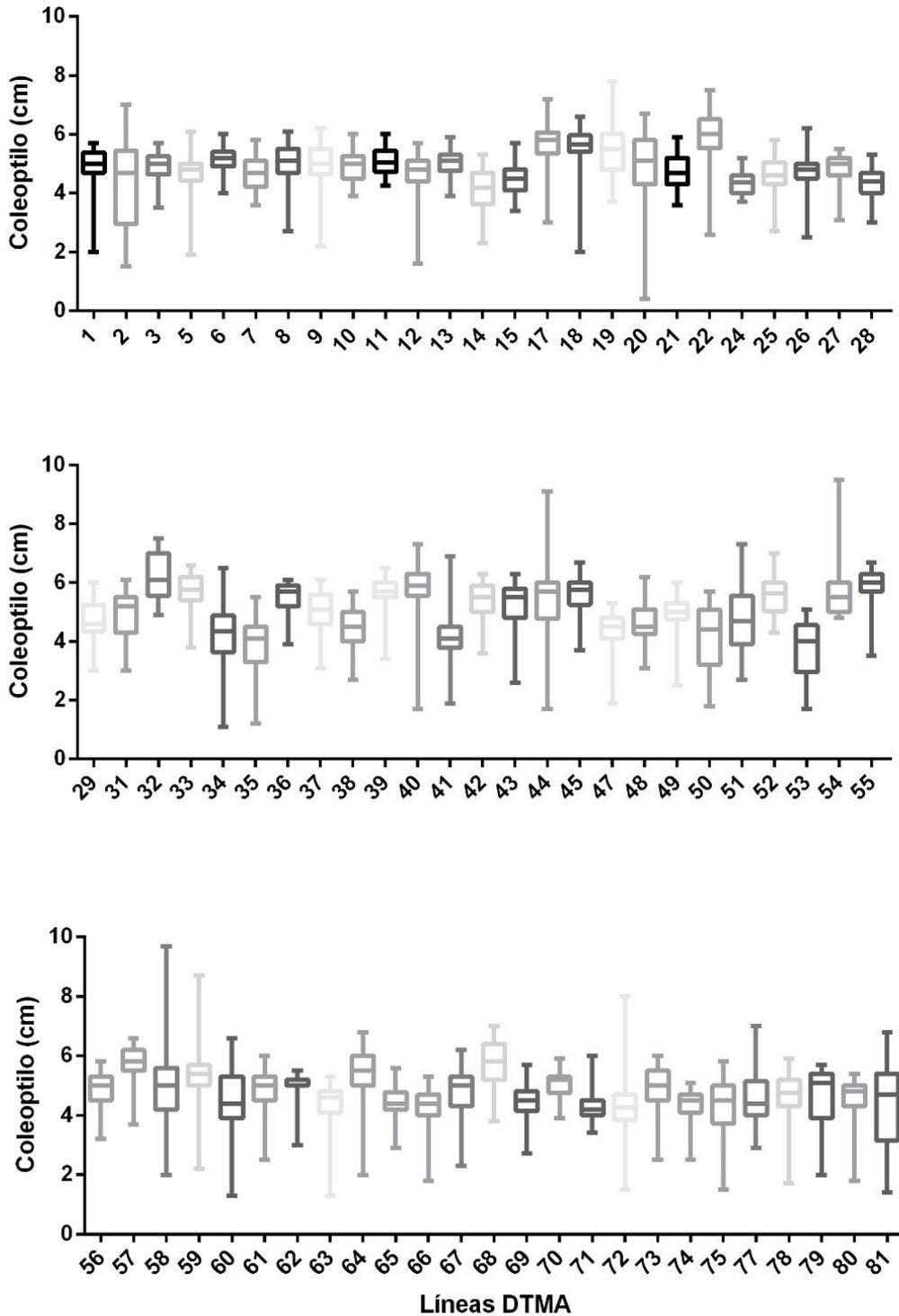
- Wareing, P., & Phillips, I. (1981). Structural and morphological aspects of development. In *Growth & Differentiation in plants*. Pergamon.
- Wawrzynska, A., Christiansen, K. M., Lan, Y., Rodibaugh, N. L., & Innes, R. W. (2008). Powdery Mildew Resistance Conferred by Loss of the ENHANCED DISEASE RESISTANCE1 Protein Kinase Is Suppressed by a Missense Mutation in KEEP ON GOING, a regulator of abscisic acid signaling. *Plant Physiology*, *148*(3), 1510–1522. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127605>
- Wellhausen, E. J., Roberts, L. M., Hernández, X., & Mangelsdorf, P. (1951). *Razas de maíz en México, su origen, características y distribución*. Secretaria de Agricultura y Ganadería, Oficina de Asuntos Especiales. México, Distrito Federal. Retrieved from https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/50301000/Races_of_Maize/Raza_Mexico_0_Book.pdf
- Wen, W., Araus, J. L., Shah, T., Cairns, J., Mahuku, G., Bänziger, M., ... Yan, J. (2011). Molecular characterization of a diverse maize inbred line collection and its potential utilization for stress tolerance improvement. *Crop Science*, *51*(6), 2569–2581. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.08.0465>
- Went, F. W. (1928). "Wuchsstoff und Wachstum". *Rec. Trav. Bot. Neerland.* 24:1-116.
- Went, F., & Thimann, K. (1937). *Phytohormones*. New York: The Macmillan Company.
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J., & Coupland, G. (1996). A Dissociation Insertion Causes a Semidominant Mutation That Increases Expression of TINY, an Arabidopsis Gene Related to APETALA2. *The Plant Cell*, *8*(4), 659. <https://doi.org/10.2307/3870342>
- Wilsker, D., Patsialou, A., Dallas, P. B., Moran, E., Zheng, B., He, H., ... McCormick, S. (2002). An ARID domain-containing protein within nuclear bodies is required for sperm cell formation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, *10*(7), 95–106. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004421>
- Yamamoto, K., & Momonoki, Y. S. (2012). Tissue localization of maize acetylcholinesterase associated with heat tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(3), 1–5. Retrieved from <http://doi.org/10.4161/psb.19007%0A>
- Zhang, D. F., Zhang, N., Zhong, T., Wang, C., Xu, M. L., & Ye, J. R. (2016). Identification and characterization of the GH3 gene family in maize. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(2), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61076-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61076-0)
- Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C. Q., Todhunter, R. J., Tiwari, H. K., Gore, M. A., ... Buckler, E. S. (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics*, *42*(4), 355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>

Abreviaturas

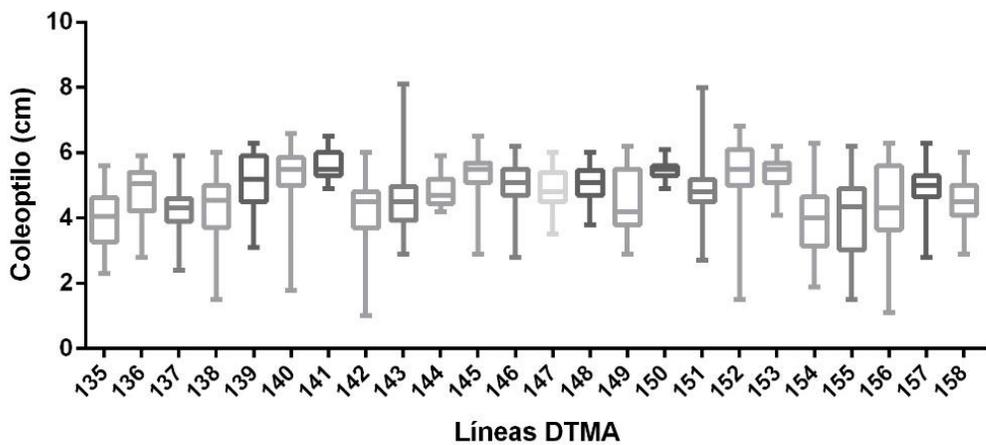
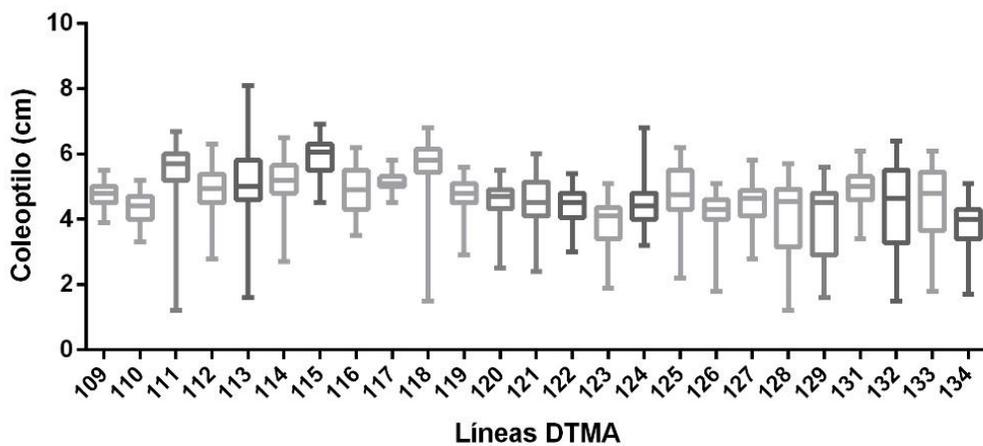
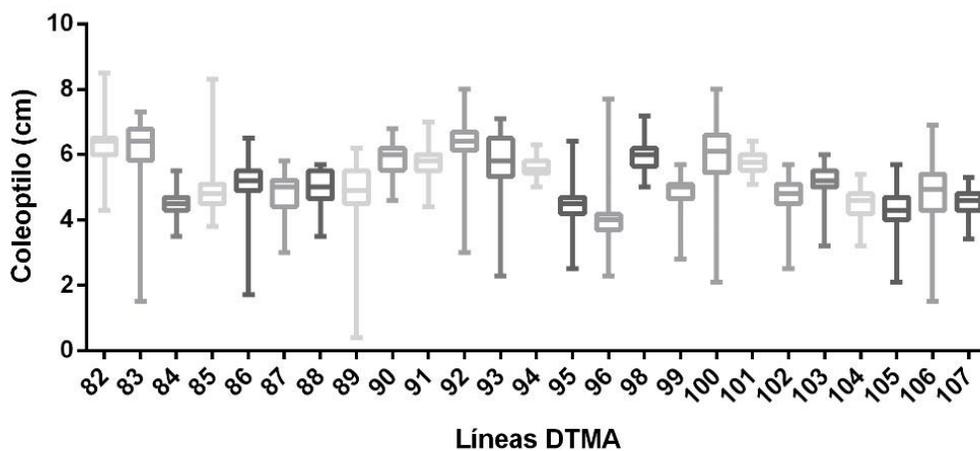
ABA	Ácido abscísico (<i>Abscisic acid</i>)
AMOVA	Análisis de varianza molecular (<i>Analysis of molecular variance</i>)
CIMMYT	Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo (<i>International Maize and Wheat Improvement Center</i>)
CMLM	Modelo lineal mixto comprimido (<i>Compressed mixed linear model</i>)
DTMA	Maíz tolerante a la sequía para África (<i>Drought Tolerant Maize for Africa</i>)
FT	Factores de transcripción
GAPIT	Herramienta integrada de predicción asociada al genoma (<i>Genome Associated Prediction Integrated Tool</i>)
GLP	Proteínas limitadoras del crecimiento (<i>Growth-limiting protein</i>)
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>)
IAA	Ácido indol acético (<i>Indole acetic acid</i>)
MAF	Frecuencia del alelo menos común (<i>minor allele frequency</i>)
MLM	Modelo lineal mixto (<i>mixed linear model</i>)
OEW	Pared celular epidérmica externa (<i>Outer epidermal cell wall</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal component analysis</i>)
RANC	Raíces adventicias asociadas al nodo coleoptilar
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TASSEL	Análisis de rasgos por asociación, evolución y vinculación (<i>Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage</i>)

Anexo

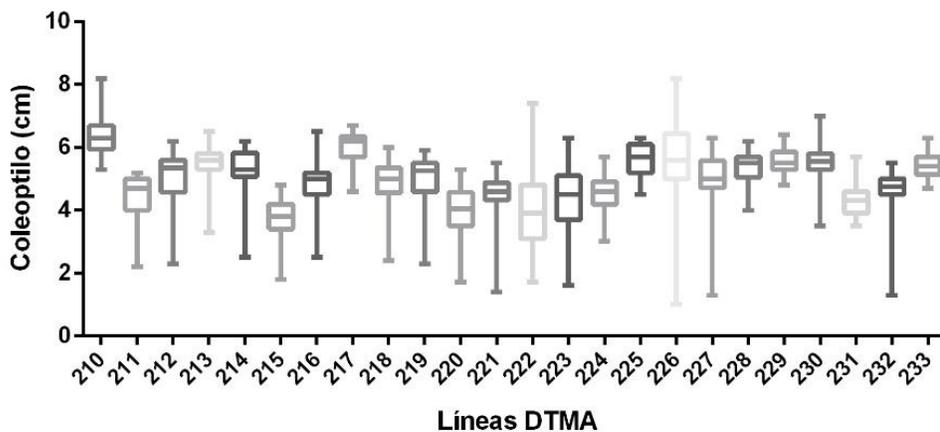
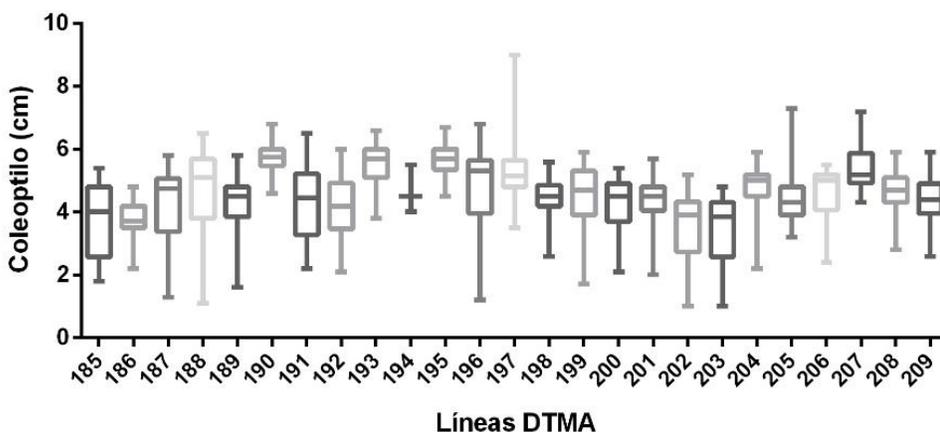
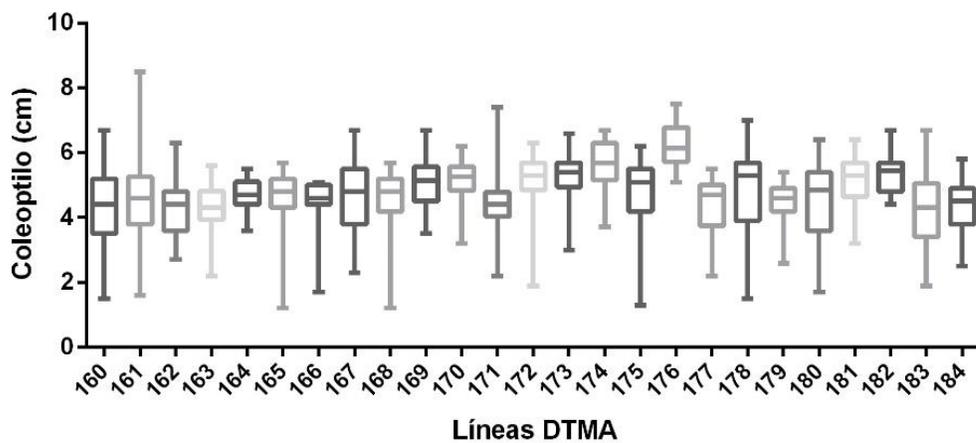
Anexo 1. Gráficas de caja y bigote de la longitud del coleoptilo de las plántulas de maíz. En el eje X se encuentra cada una de las líneas DTMA.



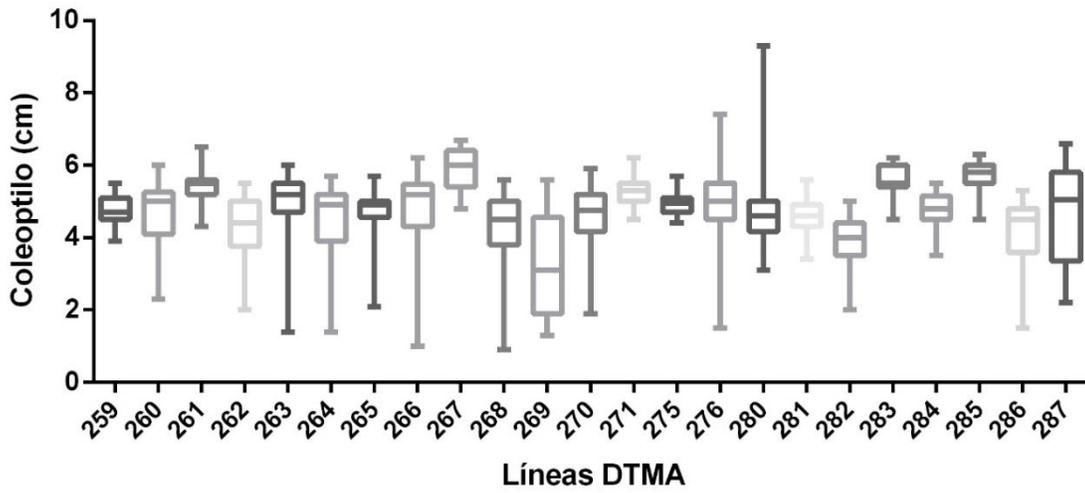
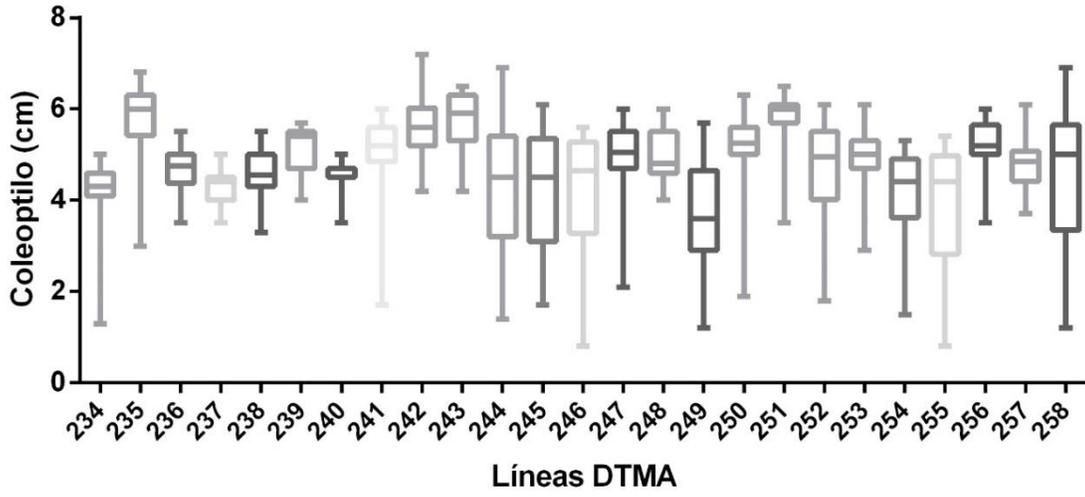
Variación del coleoptilo



Variación del coleoptilo



Variación del coleoptilo



Anexo 2. Listado de SNP y su secuencia de los 50 nucleótidos río arriba y río abajo que rodean al SNP asociado (sombreado) a la elongación del coleoptilo.

S1_289598893

>GAAGTGATGAGCCTGCTGCTGCTGCGAGTTGGTAGGCAGCTAGGGCAGCGGAGTTCTGGGGGAGGAAGTTATTGAAG
AAAGGGTTAGGGGCGAAGCCGTAGG

S1_296993149

>ACCCAAAAACAATTAACGAGGGCCTAGACCTTCGGCTGTATCCTGTGTGACTATGTGAGCTTCTTTGTTTGCCCCAC
TAACCTTCTGGGATATCACAT

S1_12663168

>GCCGGGAGGTGGCAGGCGGAGGTGGCAGCAGCGGTGGCTGGAGCCAAGGTTTCCTCGGCCTCGGTGTAGTCGTCG
TCCACAGAGCGTGCATGCATGGTGGT

S2_207041487

>GCGGCGCCAGGGCCGACAACGTCTCGCCGTCGACCGGCAGACCCAGTGCCTCATCCTGTCTCCGAGGCCCGTAT
CGCGGCGTCGATGGCCTCGAGCAG

S2_2221784

>CTGTCAGTCGCTCTCCCAAGTCCACACAACCGCCACTACAACGGCAGCCAGAGCATTATTATTTTCAGCACAACTC
CGTTTGATCCGCGCCTGCCAC

S2_183402893

>CCAAGACGCGATTTTTCGGCGCAATCGGCAGCGGCACGCCCTCAATCGACGGCCGGGAAGGGGGCGGATTCGGTGC
TGGGAGATGGGGCAGCGAAGGGTA

S2_185171168

>TAAATTGCGAGTTTCGGTTTTAGGTCTAGTGGGGAGGCGGGTGGATGGGATATATCGACAAATTACCGCTGCCAGATC
GCGGCATGGGTGCTGGGTTCTTCG

S3_166245083

>GCATAGATGTGTGATTGTGCGCTAAACTTTACTAATTGATAGGGTAAATGTTACTGAACCTCCAATTTATAGCTGCATA
AATGTGTGCTAAACTTTACTAA

S3_223691921

>ACTCAGTTCTCAGAAGTTTGAAGTGCAGAAGTCATGCTGCATATTGAAATGCCGGTACACACGAACCACTACTACTCA
GTTCTCAGAAATTTCAAGTGCAA

3_199745938

>GCCGGCAGCCGGCAGGCAGCTCGGACTCGCTCAACGGATCCGATCCACATCCACTGGTGTTCGCTGGCTGCTGGGAG
TGGACGGCTGTAGTAGTAGAAATA

S3_211534125

>CGGCTCTGCGTGCGGATGACTCCGGCGGTGGACGGCGCCTGCGGGAGGACACCTCGTAGCCGTCCCCGTAGGAGT
CCATCCCCTCCGCCAGGAGCTGCCA

S4_166927555

>TCATGGCGGACGGCACCCACGTACACGCACGACCGAGTTCATCCGCTCCTCATCACC GCCCTAGACCGGCAGCTCAAGG
CAAGACCGCCAGACCGACCCGCC

S5_5212954

>TCGTCGGATTTCAGGAGGAGAGTCAAGGACGTCAAGGTGATGGCGAGGGTCAAGATGTTTCGTCGGAGCCGATG
GTGGTGCTGCCGTCCGAGGACGCAGA

S6_120177825

>ATGGATCGTCGTCATGGCGAGGATGAGGAGAGCGATCGAGAGTACGTAGCTAACCTAAAAGCTAGAGCTAGCCAG
GATCTCAAAGTTCACAGAGAAAAA

S6_31315953

>AAGCTCCTGGAGATTCTCGGGTCCCTATGGACCAGAGCTGCGATGAGGACGGGTGATTATTGGGAGAATACACGGTG
GATTACGAAGCATCGCTGCAACAC
S6_143989532
>CCAGGGCACGGCGCTAGGCTGCAACTCCGCCGTCTAGGGCGGCTCCAGCATCGTTGTCCAGCCTGTCTCAGTAAGA
TCTGCCGCCGTCCGCAGCCAGATC
S6_149531827
>AACGCAGCCAAAACCTTTGCGTGCGTGCTTAACCCCTCTAAAAATGCAGATAAACATCATTAGCACTTTCCACCATTATC
ATTAATCTGTATATATATGTGC
S7_153654562
>GGCCTACACAATACATGTATCATGCATGCCCTCAAAGCTGGCAGCAATACGAGCGAGCAAATTGGGGCAGAAAGGA
GGGGAGGAAAAGAAAGGGGGAGCC
S7_165912861
>GACGGCGGCCGAGATACCGCTGCTCAAGTCGCGGATCGAGTCCACGAACGCCGCGGTCGCCACGAGGCAGGAGGC
GGCGGCGAGGAAGAAGGCCGCCGCGG
S8_26349938
>CTCCGCCACTACCTCTCCCTCGGCGCCCCGTGAGCCAGTTCAAGTCGCCGCGCTGCGTCGGCCGGGCCAACAACTCC
GGCGTCTCCAGATCCTCTCCGC
S8_138261555
>GGTCCGGCGACGCCATTAAAATACCGTACCATTAGCAGTAGCAAGGCCACGCTTTATCGTCTCTGCTTTTGCTTGCTG
CGATGCCTTCCCTCCGATCGAA
S9_102962591
>CCGTCATCCTCGGACGACCTCTCGTAGCCCGCGCTCCACGCAAGACGAGCGGAGCTGGTACTCCAGGCGAGCGCT
TGCGGTCTGGTCTGTTGCCGTCGGT
S9_91249888
>AGCACGAGCGACGCCATGACCCCCGCCCTTTGACGCTGAGGATGGCGGCCCCAGCAGCTCCCCGGTGCCTGGCT
GGTGAACACGATGAGCAGCGTGCC
S10_111618837
>GGTCGGCCGGGAGTCAACCTGCCCTCCACGTTCTCGCCGTCGTCGTCGCCATCGGCGCCGCAGATACTGGACTTCTCC
ACGAGCAGCTCATCCGGCCCCGG
S10_34726220
>ACAAAACAGAAACAAGAGACTCAGGCTTAGGTACGAGCACAAAGGATAAGCAGTCAGCTGCTTGAAGCCGAAAG
CTTATGCCATGGCAAATCCCTAAAA
S10_2255134
>GTCTCCTCAGTTACAGTCGCTGAATCCAGCACCCCTACTCGCCCCCTCAAATCGGTGCAGCCGGAGATGAGCCCAAGAG
AACGGCAGCAGCAATGGCCGACA
S10_69087693
>TAGTGTGGTCGTGCTCTGATGCAGTGCGGCGAAACACGGAGAGGTGGCGCGGCTTTATACTAGTGGTGGGTGCGTG
CTCCTCTGCGTGGCTAGCTTCGGCG
S10_10669884
>GGCTGTTCTGTTGGTGACTTCTCTCTCTCTAACTATATCATTTTTGTGTAATGTGATGTGCAATGAAAATAGTCAAGGGT
GCCATGATTTGGCGTGTTTTAG