



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FENOTÍPCA Y MOLECULAR A
ESTRÉS POR CALOR DE DOS VARIETADES MEXICANAS DE MAÍZ (*Zea
mays*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ITZEL GARCÍA BRAVO

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
(Facultad de Química)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Jorge Nieto Sotelo
(Instituto de Biología)
Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
(Facultad de Química)
Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre
(Instituto de Biotecnología, UNPA)

Ciudad de México. Diciembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A PAPIIT IN218921, UNAM y PAIP 5000-9118, Facultad de Química, UNAM, por el apoyo financiero otorgado para realizar el proyecto.

Al Conahcyt, por brindarme una Beca Nacional de Maestría bajo en CVU 1146701 durante la realización de esta tesis.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a congresos nacionales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova del laboratorio 103 del departamento de Bioquímica, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, quien fue mi tutora en esta tesis. Por guiarme durante todo el proceso, contagiarme su emoción por el tema y de quien aprendí mucho.

A los miembros de mi comité tutor: El Dr. Jorge Nieto Sotelo, del Instituto de Biología, en la UNAM; El Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, de la Facultad de Química de la UNAM; y la Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre, del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan. Por ayudar a dar forma y enriquecer el proyecto en cada examen tutorial.

A los miembros de mi jurado sinodal: El Dr. Eleazar Martínez Barajas, de la Facultad de Química de la UNAM; la Dra. Gladys Iliana Cassab López, del Instituto de Biotecnología de la UNAM; la Dra. María Del Rocío Cruz Ortega, del Instituto de Biotecnología de la UNAM; el Dr. Angel Arturo Guevara García, del Instituto de Biotecnología de la UNAM; y el Dr. Francisco Javier Plasencia De La Parra, de la Facultad de Química de la UNAM. Por sus revisiones que ayudaron a pulir mi tesis.

Al laboratorio 103 del departamento de Bioquímica, en la Facultad de Química de la UNAM, por proveer de equipos y materiales necesarios para la realización de la tesis. Además, a todos sus integrantes por brindarme consejos durante toda la maestría y brindar un buen ambiente para crecer.

A la Mta. María Manuela Nájera Martínez y el Mto. Elpidio García Ramírez, técnicos académicos del laboratorio 103 y 114, respectivamente, del departamento de Bioquímica, en la Facultad de Química de la UNAM. Por apoyarme en la obtención del material biológico y guiarme en técnicas realizadas en la tesis.

A Nallely, Damaris y Bryan, por leer mis resúmenes, oír mis ensayos y darme ánimos durante todo el proceso.

DEDICATORIA

A mi mamá, Dalia, por su amor y apoyo durante toda mi vida, sin la cual nada de esto hubiera sido posible.

Lista de abreviaturas

4E-BPs	Proteínas de unión eIF4E
ABA	Ácido abscísico
ABF	Factores de unión a ABRE
ABRE	Elementos de respuesta a ABA
ACC oxidasa	1- amino-ciclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa
ACC sintasa	1-amino-ciclopropano-1-ácido carboxílico sintasa
AIH	Agmatina iminohidrolasa
AMP	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
APAO	N1-Acetilpoliamina oxidasa
AUX	Auxinas
Ca ²⁺	Catión de calcio
CBF	Factor de unión a repeticiones-C
CK	Citocininas
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CPA	N-carbamoilputrescina aminohidrolasa
CPK	Proteínas cinasas dependientes de calcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRE	Elementos de respuesta a deshidratación
DREB	Familias de proteínas de unión a DRE
eEF2- α	Factor de elongación de la traducción en eucariotas 2 subunidad alfa
eEF2K	Factor de elongación eucariota cinasa 2
ET	Etileno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAT	Blanco de adhesión focal
FATC	FAT carboxilo terminal
FKBP12	Proteína de unión a FK506
FRB	FKBP de unión a rapamicina
Gas	Giberelinas
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
HAI	Horas posteriores a la imbibición
HEAT	Subunidad del factor de elongación Huntington 3a de proteína fosfatasa 2A y TOR1
HP	Polirribosomas pesados
HSF	Factores de transcripción de choque térmico

HSP	Proteínas de shock térmico
HSR	Respuestas a estrés por calor citoplásmicas
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INIFAP	Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
LEA	Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía
LP	Polirribosomas ligeros
LSD	Diferencia mínima significativa
LST8	Proteína 8 letal SEC13 en mamíferos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MP	Polirribosomas medianos
mRNA	RNA mensajero
MyC	Proto-oncogén C en mamíferos
Na ⁺	Catión de sodio
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
O ²⁻	Ion superóxido
ODC	Ornitina descarboxilasa
PAO	Poliamina oxidasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	Cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasas
PRAS40	Sustrato AKT 40 KDa rico en prolina
Put	Putrescina
RAPTOR	Proteína reguladora asociada a TOR1
Rheb2	Ras Homolog Enriched in Brain 2
RNA	Ácido ribonucleico
ROP2	Rho-related GTPase 2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
rpS6	Proteína ribosomal S6
rpS6K	Proteína ribosomal cinasa S6K
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción
RuvB	Proteína B de Recombinación UV
RuvBL	RuvB-like
SAM sintasa	Sadenosilmetionina sintasa
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
Ser	Serina
SMO	Espermidina oxidasa
SNF1	No fermentadora de sacarosa
SnRK	Proteína cinasa serina / treonina relacionada con SNF
Spd	Espermidina

SPDS	Espermidina sintasa
Spm	Espermina
SPMS	Espermina sintasa
SSAT	Espermina/espermidina N1-Acetiltransferasa
T/ha	Tonelada/Hectárea
Thr	Treonina
TOR	Target of Rapamicyn
TORC	Complejo TOR
uORF	Marcos abiertos de lectura río arriba del principal
UPR	Proteína desplegada localizada en el retículo endoplásmico
UV	Ultravioleta
VS	Variedad sintética

Índice de Figuras

Figura 1. Línea temporal de eventos físicos y metabólicos que ocurren durante etapas germinativas (Fase I y II) y crecimiento de plántula temprano (Fase III).	13
Figura 2. Sistema radicular de maíz.	14
Figura 3. Cambios en los niveles de fitohormonas durante las fases de germinación de las semillas.	15
Figura 4. Origen probable del maíz Chalqueño	18
Figura 5. Clasificación de razas mexicanas de maíz.....	18
Figura 6. Relación entre señalización de estrés y crecimiento de la planta	24
Figura 7. Representación esquemática de los dominios de la proteína TOR y los principales miembros del complejo TORC1.....	26
Figura 8. Procesos celulares y de desarrollo conservados y especializados que regulan la señalización TOR en plantas y animales.	27
Figura 9. Vía de señalización propuesta para TOR en plantas.	30
Figura 10. Ruta de biosíntesis de la poliaminas.	31
Figura 11. Estructura química de poliaminas presentes en ejes embrionarios de maíz.....	32
Figura 12. Abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR en germinación de maíz.....	34
Figura 13. Efecto de choque térmico en los niveles y actividad de proteínas específicas de ejes embrionarios de maíz Chalqueño.	34
Figura 14. La traducción de ZmPAO3 y ZmSAMDC muestra sensibilidad a la inhibición de TOR por AZD-8055.	35
Figura 15. Efecto de espermidina sobre la actividad de TOR.....	36
Figura 16. Efecto de espermidina en la respuesta a estrés por calor en maíz Chalqueño	36
Figura 17. Diagrama de flujo de metodología a seguir en el trabajo experimental.	38
Figura 18. Plántulas a 7 días de recuperación.	40
Figura 19. Representación de las secciones de ejes embrionarios.	41
Figura 20. Efecto del choque térmico a 7 días de recuperación en maíz Chalqueño y VS-536.....	45
Figura 21. Efecto del choque térmico a mediano plazo en crecimiento de coleoptilo y primera hoja de maíz Chalqueño y VS-536	46
Figura 22. Efecto del choque térmico a mediano plazo sobre a) el número de hojas extendidas y b) porcentaje de supervivencia en plantas provenientes de semillas germinadas en condiciones control y con choque térmico (HS).	47
Figura 23. Efecto de espermidina sobre el fenotipo de plantas de maíz Chalqueño y VS-536 sometidas a choque térmico a los 7 días de recuperación en oscuridad.	48
Figura 24. Comparación de los niveles basales de rpS6 total y fosforilada entre variedades.....	50

Figura 25. Análisis de proteínas en meristemo apical radicular (MAR), mesocotilo y meristemo de brote apical (MBA) de ejes de 48h tratados con choque térmico	51
Figura A1. Representación de morfología de semillas de maíz Chalqueño y VS-5367 al término del periodo de recuperación del choque térmico	68
Figura A2. Porcentaje de germinación de maíz Chalqueño y VS-536, utilizando el método de siembra vertical.	68
Figura A3. Crecimiento de plántulas tratadas con choque térmico (HS) y control (Ctr) a siete días de recuperación.....	69
Figura A4. Longitud de a) coleoptilo y b) primera hoja de plantas a 10, 15 y 21 días post-germinación con o sin choque térmico (HS) aplicado a las semillas a 48 hpi.....	70
Figura A5. Efecto de espermidina (Spd) en la longitud de raíz primaria, mesocotilo, coleoptilo y primera hoja de plantas de maíz VS-536 y Chalqueño sometidas a choque térmico, con siete días de recuperación.....	70
Figura A6. Plantas de maíz Chalqueño y VS-536 a los 21 días post germinación, control (25°C) o con choque térmico (42°C) realizado por 4h a las 72 hpi, sin espermidina y con 0.1 mM espermidina.	71
Figura A7. Medidas de coleoptilo y primera hoja de plantas de maíz VS-536 y Chalqueño, con esperimina, sin espermidina, con y sin choque térmico (HS) a) 10, b) 15 y c) 21 días de germinación.	72
Figura A8. Número de hojas expandidas en maíz Chalqueño y VS-535 VS-536, con y sin espermidina (Spd), con y sin choque térmico (HS) a 10, 15 y 21 días de germinación.	73
Figura A9. Porcentaje de supervivencia en maíz Chalqueño y VS-535 VS-536, con y sin espermidina (Spd), con y sin choque térmico (HS) a 21 días de germinación	73
Figura A10. Réplicas biológicas de comparación de los niveles basales de rpS6 total y fosforilada (rpS6-P) entre variedades.....	73
Figura A11. Réplicas biológicas de Inmuno detecciones para rpS6 total y fosforilada (rpS6-P) de meristemo apical radicular, mesocotilo y meristemo de brote apical de maíz VS-536 y chalqueño en condiciones control y con choque térmico (HS).	74
Figura A12. Réplicas biológicas de Inmuno detección para HSP70 y HSP101 de meristemo apical radicular, mesocotilo y meristemo de brote apical de maíz VS-536 y chalqueño en condiciones control y con choque térmico (HS).	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Genes relacionados con el estrés en plantas. *.....	20
Tabla 2. Señales río arriba de la vía TOR en plantas, efecto sobre TOR y sobre la fisiología de la planta.	28
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Inmuno detección.	43
Tabla 4. Concentración de anticuerpos utilizados en Inmuno detección.....	44

Tabla A1. Reacción para realizar curva patrón de albúmina sérica bobina. 67

Tabla A2. Preparación de soluciones para geles de electroforesis. 67

Tabla de contenido

1. Resumen.....	11
2. Introducción	12
2.1. Importancia del maíz.....	12
2.2. Germinación del maíz.....	12
2.2.1. Maíz variedad sintética 536	16
2.2.2. Maíz Chalqueño	17
2.3. Estrés abiótico.....	19
2.3.1. Factores de estrés abiótico.....	19
2.3.2. Mecanismos de defensa ante estrés abiótico	20
• Señalización	20
• Respuestas a estrés abiótico	21
2.4. Estrés por calor	21
2.4.1. Termotolerancia	22
2.4.2. Estrés por calor en Maíz	23
2.4.3. Sensores y reguladores maestros de la señalización de estrés por calor	24
2.5. TOR.....	25
2.5.1. Estructura y función en plantas	25
2.5.2. Vía de TOR en plantas.....	28
• Reguladores río arriba de TORC1.....	28
• Efectores río abajo de la vía TOR	29
2.6. Poliaminas.....	30
2.6.1. Poliaminas en el crecimiento temprano de eje embrionario	32
2.6.2. Poliaminas y estrés	33
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
6. HIPÓTESIS.....	37
7. OBJETIVOS.....	37
OBJETIVO GENERAL	37

OBJETIVOS PARTICULARES	38
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
8.1. Obtención de material biológico.....	39
8.2. Desinfección de semillas	39
8.3. Imbibición de semillas y crecimiento de plántulas.	39
8.4. Análisis de efecto fenotípico de choque térmico y espermidina.....	39
• Aplicación de choque térmico.....	39
• Evaluaciones a siete días de recuperación.	40
• Evaluaciones en invernadero a mediano plazo.....	41
8.5. Análisis de efecto molecular de choque térmico	41
• Sección de ejes embrionarios para análisis molecular.....	41
• Extracción de proteína	41
• Cuantificación de proteínas por método Bradford	42
• Electroforesis	42
• Transferencia a membrana	43
• Inmuno detección.....	43
9. RESULTADOS	44
9.1. Condiciones basales de germinación de maíz VS-536 y Chalqueño.	44
9.2. Efecto del choque térmico sobre el crecimiento de maíz VS-536 y Chalqueño.	45
9.2.1. Efecto del choque térmico a 7 días de recuperación en oscuridad.	45
9.2.2. Efecto del choque térmico a mediano plazo.	45
9.2.3. Efecto de espermidina sobre el fenotipo de plantas sometidas a choque térmico ...	47
9.3. Respuesta a nivel molecular al choque térmico.....	49
10. DISCUSIÓN.....	52
11. CONCLUSIONES	56
12. PERSPECTIVAS	57
13. LITERATURA CONSULTADA	58
14. ANEXOS	67

1. Resumen

El maíz es un cultivo de gran importancia en México, cuya producción ha disminuido por el aumento de la temperatura anual, afectando el tamaño de la planta y el llenado de granos. La germinación y establecimiento de la planta son etapas críticas en su ciclo de vida e influyen en la cantidad y calidad de producción de semilla. El estrés abiótico al que las plantas se ven sometidas en esas etapas se ha intensificado con el cambio climático, aumentando la cantidad de CO₂ en la atmósfera, cambiando los patrones de lluvia y aumentando los periodos de sequía e intensidad de luz, así como la temperatura. El estrés por calor causa estrés oxidativo, desnaturalización de proteínas, degradación de los pigmentos y disminución del número de granos formados en cereales, la tasa de crecimiento de la planta, la germinación del polen y su fertilidad. Las plantas como organismos sésiles han desarrollado diversos mecanismos para mitigar los efectos de estrés abiótico. Uno de éstos es la producción de poliaminas, cuya aplicación exógena disminuye el daño por choque térmico. La vía de señalización TOR (Target of rapamycin), considerada un regulador maestro de la proliferación y el crecimiento celular, se ve modificada ante el estrés por calor. Recientemente se reportó que TOR regula la traducción de enzimas de biosíntesis de poliaminas. La vía de transducción de señales mediada por TOR involucra a proteínas del ciclo celular y traducción, como la proteína ribosomal S6 (rpS6) fosforilada por la cinasa S6K, blanco de TOR. En jitomate y maíz se reduce la fosforilación de rpS6 ante estrés por calor.

En este proyecto se buscó caracterizar la respuesta fenotípica y molecular a estrés por calor, así como evaluar el efecto de la aplicación de la poliamina espermidina en la respuesta a estrés por calor en dos poblaciones de maíz mexicanas: Chalqueño de clima templado y Tuxpeño VS-536 de clima tropical.

Durante la investigación se encontró que, a cortos tiempos de evaluación, ambas variedades disminuyen la longitud de su raíz primaria, mesocotilo, coleoptilo y primera hoja en respuesta a un choque térmico de 42°C por 2h, sin embargo, solo hubo diferencia significativa entre variedades en la reducción del mesocotilo a 7 días de recuperación de la aplicación de un choque térmico de 42°C por 2h, mostrando mayor sensibilidad el maíz Chalqueño. A mediano plazo, se observó una recuperación completa del crecimiento del maíz VS-536, mientras que el maíz Chalqueño continuó significativamente afectado en su crecimiento. En la respuesta a espermidina ante choque térmico, hubo un comportamiento contrastante entre ambas variedades. A nivel molecular se vieron diferencias en la actividad basal de rpS6, medida como la relación entre su fosforilación y acumulación (rpS6-P/rpS6 total) con mayor actividad en meristemo apical radicular de maíz Chalqueño que en VS-536, y con mayor acumulación de rpS6 en el meristemo apical radicular de maíz VS-536. Mientras que la fosforilación de rpS6 disminuye significativamente en todos los tejidos evaluados al aplicar un choque térmico, la disminución de la actividad es mayor en el meristemo apical radicular que en el resto de los tejidos y se ve más afectado en maíz Chalqueño. Es

importante extender el estudio a un mayor número de variedades de maíz y por periodos prolongados de evaluación.

2. Introducción

2.1. Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays*, Poaceae) es una gramínea nativa de México perteneciente a la familia Poaceae y con metabolismo fotosintético C_4 , adecuada para clima cálido, sin embargo, se siembra en muchas partes del mundo con distintos climas (Mondragón, 2009; Xue *et al.*, 2021). Es un cultivo de interés económico en México y en el mundo, siendo el cereal más cultivado a nivel mundial, con una producción de 1.160 millones de toneladas métricas en la temporada 2022-2023 (Orús, 2023).

Es un cultivo representativo en México, donde se cultivan las variedades que producen grano amarillo para la producción pecuaria y la variedad blanca para consumo humano, además de las 59 variedades criollas registradas (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios, 2018). En 2017, México ocupó el octavo lugar en producción mundial de maíz, produciendo 27.8 millones de toneladas en 7.5 millones de hectáreas, equivalente al 25% del territorio cultivado (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios, 2018; FAO, 2020). Si bien México importa maíz para su consumo, principalmente de Estados Unidos, país del que en 2021 se importó 28.27 millones de dólares en maíz, la exportación hacia América central ha aumentado de manera importante desde el 2009 (The Growth Lab at Harvard University, 2023). Entre 1996 y 2008, México exportó a América del Sur 1.28 ± 0.69 millones de dólares en granos de maíz, mientras que entre 2009 y 2019 fueron 9.96 ± 3 millones. Esta cantidad ha disminuido desde el 2017, donde se alcanzó su pico máximo de exportación de 75.5 millones de dólares de semillas de maíz al mundo, para 2021 esta cantidad disminuyó 34.7 millones de dólares, exportando principalmente a Perú, Venezuela y Guatemala (The Growth Lab at Harvard University, 2023).

2.2. Germinación del maíz

La germinación es un proceso fisiológico por el cual una planta se desarrolla a partir de una semilla. Este proceso comienza con la imbibición o toma de agua y termina, acorde al criterio fisiológico, con la ruptura de las cubiertas seminales por elongación de la radícula, o acorde al criterio agronómico, con la emergencia sobre la tierra de una plántula. En el laboratorio se utiliza el criterio fisiológico (Xue *et al.*, 2021; ISTA, 2016; Pérez y Pita, 1998).

La germinación es considerada el punto más crítico en el ciclo de vida de una planta debido a que se encuentra vulnerable a daño, en maíz, las condiciones de germinación influyen en la cantidad y calidad de producción (Rojjou *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2021). La semilla tiene

los elementos necesarios para iniciar la síntesis de proteínas y respiración, pero debe haber imbibición para el inicio de la transcripción y traducción (Nonogaki *et al.*, 2010).

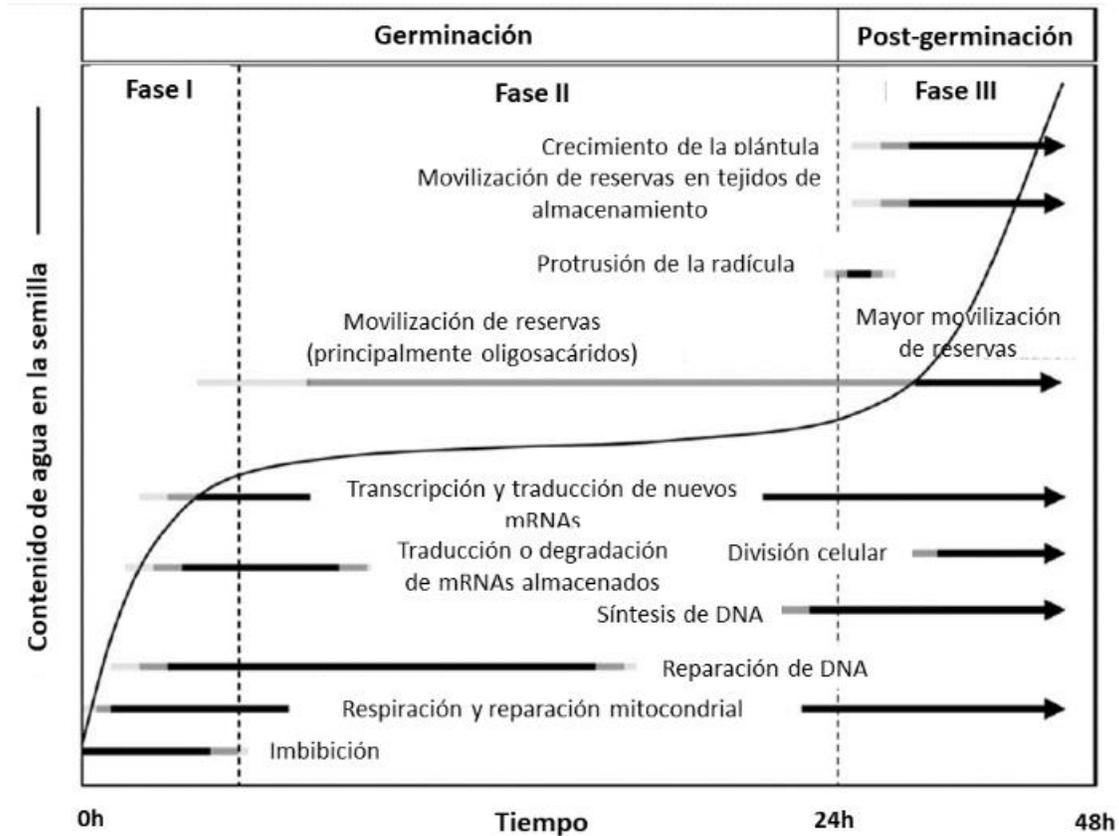


Figura 1. Línea temporal de eventos físicos y metabólicos que ocurren durante etapas germinativas (Fase I y II) y crecimiento de plántula temprano (Fase III). Modificado por Olea-Badillo (2020) de Nonogaki *et al.* (2010).

De acuerdo con lo descrito por Nonogaki *et al.* (2010) y Luján-Soto y Dinkova (2021), la germinación se divide en 2 fases y una fase post-germinativa, como se muestra en la Figura 1, en ocasiones para estudios moleculares se considera esta fase III post-germinativa, en la cual se espera a que ocurra al menos una replicación de DNA y primer ciclo celular para considerar a la germinación como exitosa. La fase I que comienza con la imbibición, consiste en la rápida absorción de agua y por lo tanto un aumento en el volumen de la semilla, en maíz tiene que absorber al menos el 30% de contenido de agua. Durante esta etapa comienza la respiración celular y reparación mitocondrial, así como la traducción o degradación de mRNAs almacenados. Durante la fase II, la concentración de agua en la semilla se mantiene constante, al haber tanto absorción como secreción de agua. Así la fase continúa con la reparación de DNA y mitocondrias, dándose también la traducción y degradación de mRNAs almacenados, pero inicia la transcripción, traducción de nuevos mRNAs, la movilización de reservas y la expansión celular, terminando con la protrusión de la radícula. La fase III comienza a partir de la protrusión y elongación de la radícula y se

caracteriza por una rápida división celular y elongación de la planta, para lo cual hay nuevamente una absorción acelerada de agua. Durante esta fase ocurre una mayor movilización de reservas, inicia la síntesis de DNA, activación génica, acumulación de histonas, el ciclo celular y una mayor activación del metabolismo.

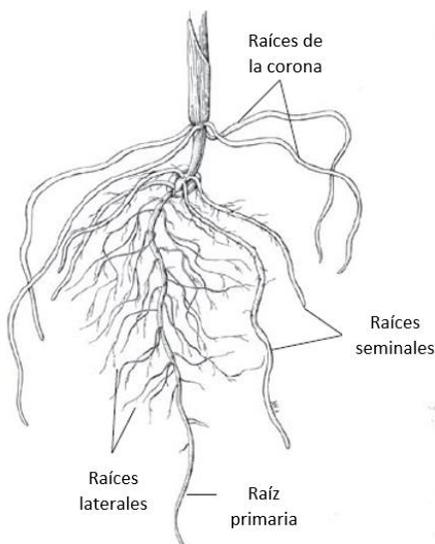


Figura 2. Sistema radicular de maíz. Traducido de Hochholdinger.

Las semillas de maíz entran en la categoría de semillas ortodoxas, éstas soportan desecación una vez maduras en su planta madre y se pueden almacenar por periodos largos, manteniendo su capacidad de germinación (Rojjou *et al.*, 2012). Este tipo de semillas requieren un período de almacenamiento en seco conocido como post-maduración, liberándose de la latencia. Al igual que lo descrito previamente para germinación general, su germinación comienza con la imbibición y continúa con la activación de su fisiología interna y respiración. Esta última etapa requiere agua, una temperatura ideal y presencia de oxígeno para poder llevarse a cabo, también se ve afectada por la presencia de nutrientes, actividad de fitohormonas y azúcares, entre otros (Xue *et al.*, 2021). Con la raíz, la planta puede anclarse al suelo y obtener nutrientes y

agua; para emerger, el primer internodo se elonga hacia la superficie del suelo para alcanzar la luz (Ransom, 2020). El sistema de raíces de maíz consiste en raíces embriónicas, que son la primaria y las seminales, y postembrionarias. La raíz primaria está formada en el polo basal del embrión y las seminales en el nodo escutelar. Las raíces postembrionarias son raíces de brotes, de ellas, las de la corona se encuentran al nivel del suelo e inician en el periciclo, las laterales inician tanto en el periciclo como en las células endodermiales opuestas a los polos del floema y son típicamente muy cortas. La absorción de la mayoría del agua y nutrientes se debe a las raíces laterales, pero también son más propensas a desecación por transpiración (Hochholdinger, 2009). Los tipos de raíces previamente mencionados e ilustrados en la Figura 2 se inducen por estímulos endógenos, sin embargo, con estímulos exógenos pueden aparecer las raíces adventicias; estas raíces se forman por un mecanismo adaptativo en sitios como el mesocótilo debido a factores ambientales, estos pueden ser hormonas exógenas, heridas u otros estreses (Hochholdinger, 2009), además sirven como un sistema de anclaje para las plantas en sus últimas etapas de crecimiento (Oñate, 2016).

Los factores que afectan la germinación, tanto en general como particularmente en el maíz, son variados. Entre estos se encuentran los ambientales, como temperatura y agua, fitohormonas como el ácido abscísico, giberelinas y auxinas, y los nutrientes. Las semillas de maíz requieren una temperatura media de entre 26 y 29 °C, presencia de agua, azúcares, nitrógeno, fósforo, potasio, sodio y calcio, entre otros elementos para poder germinar (Xue

et al., 2021). Las condiciones no propicias causan estrés en las plantas, sus efectos y los mecanismos de defensa ante estos se abordan en la sección de estrés abiótico.

Las fitohormonas son moléculas de señalización que regulan su crecimiento y desarrollo de las plantas, funcionan a concentraciones muy bajas y pueden actuar en los mismos tejidos que son producidas, o transportarse a otros. Entre las más estudiadas involucradas en la germinación, están el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GAs), las auxinas (AUX) el etileno (ET) y las citocininas (CK) (Xue *et al.*, 2021). En la Figura 3 se presentan las fluctuaciones en la concentración de fitohormonas durante las etapas de germinación y establecimiento de una plántula.

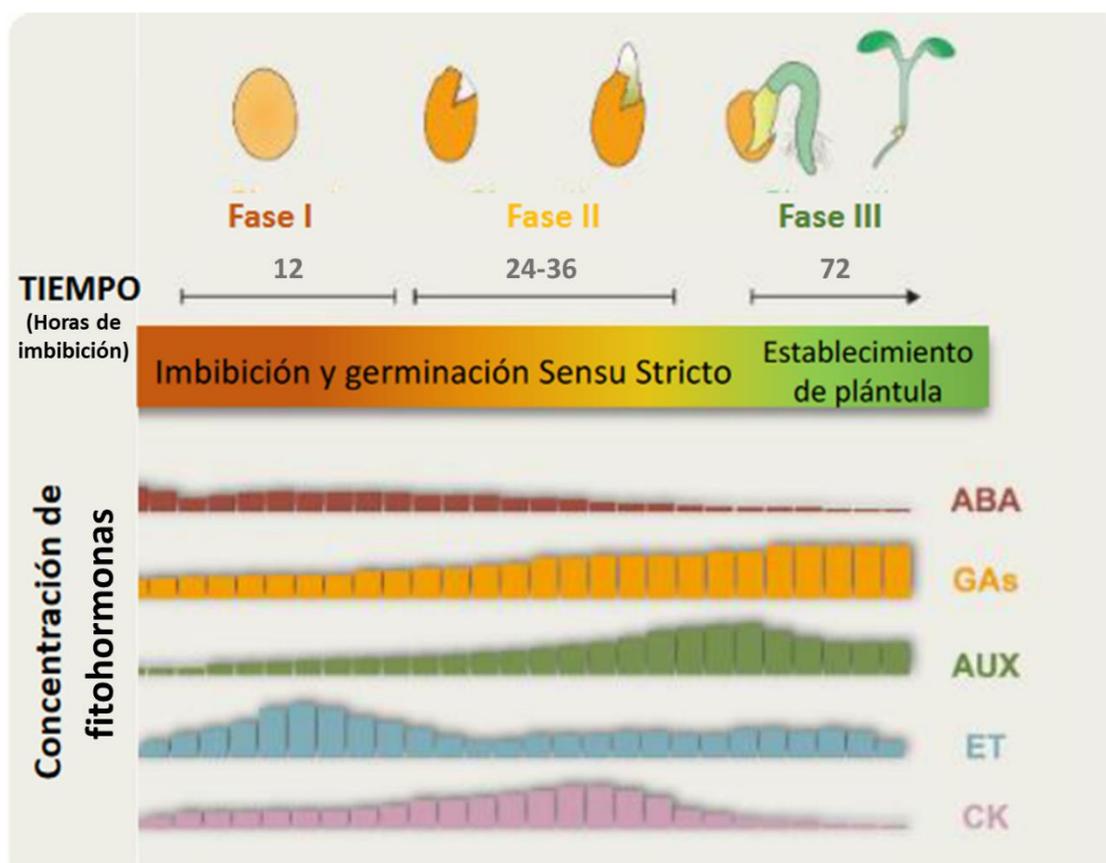


Figura 3. Cambios en los niveles de fitohormonas durante las fases de germinación de las semillas. ABA, ácido abscísico; GAs, giberelinas; AUX, auxinas; ET, etileno; CK, citocininas. Traducido de Luján-Soto y Dinkova (2021).

El papel del ABA es regular el tamaño de órganos, cierre de estomas y respuesta a estrés ambiental, también regula la maduración del embrión y se encarga de iniciar y mantener la latencia de la semilla, por lo cual cuando su concentración disminuye es posible romper la latencia e iniciar la germinación. Se ha observado ABA regula la expresión de ciertas proteínas como la de proteínas abundantes en embriogénesis tardía, proteínas pequeñas de choque térmico, proteínas relacionadas con el estrés, enzimas antioxidantes y proteínas

relacionadas con el almacenamiento; a su vez, la señalización de ABA en plantas mediada por Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y ROS (Especies reactivas de oxígeno) (Luján-Soto y Dinkova, 2021; Xue *et al.*, 2021).

Las giberelinas son la contraparte del ABA, promueven el rompimiento de la dormancia e inicio de la germinación, así como el crecimiento de la planta. Las GAs pueden antagonizar la señalización por ABA, pero también ser inactivadas por ABA, por lo cual la concentración de GAs disminuye en los picos altos de ABA. Por otro lado, la concentración de etileno aumenta después de la imbibición de la semilla y tiene su pico más alto antes de la protrusión de la radícula, éste regula negativamente los genes del metabolismo y rutas de señalización de ABA, promueve la protrusión de la radícula, la germinación y el establecimiento de la plántula (Luján-Soto y Dinkova, 2021; Xue *et al.*, 2021). Las auxinas y citocininas pueden regular el nivel de expresión de las ciclinas del ciclo celular, pero aún no se sabe si las auxinas pueden regular la germinación independientemente de ABA (Xue *et al.*, 2021). Otras fitohormonas como el ácido jasmónico y los brasinoesteroides se encuentran menos estudiados, pero se cree que afectan el balance ABA/GAs bajo ciertos tratamientos. Se ha observado que la estratificación, proceso en el que se someten a las semillas a condiciones frías y húmedas, aumenta el contenido de ácido jasmónico, regulando positivamente la actividad de represores de la biosíntesis de ABA (Luján-Soto y Dinkova, 2021).

2.2.1. Maíz variedad sintética 536

Los híbridos son resultado del cruce deliberado de al menos 2 líneas puras no emparentadas, en parcelas aisladas. Cada variedad híbrida consiste en una combinación específica de una progenitora hembra y un progenitor macho (McRobert *et al.*, 2015). En los híbridos se logra un tipo de semilla que produce un rendimiento superior al de sus padres, como consecuencia de la heterosis o vigor híbrido, si se siembra el grano que cosechó, la heterosis habrá disminuido al igual que la uniformidad del cultivo y por lo tanto el rendimiento y la calidad serán menores (Semillas Valle, 2021; Semillas y propiedad intelectual, 2023).

Las variedades sintéticas son poblaciones de semillas formadas a partir de al menos cuatro líneas, seleccionadas por una buena aptitud combinatoria, y que se mantiene por polinización libre (Sierra-Marcías *et al.*, 2016). Estas variedades pueden obtenerse desde la generación inicial o cero (Márquez, 2010). Debido a los altos costos de las semillas híbridas, en México se ha optado por el uso de variedades sintéticas (Márquez, 2010), que ofrecen la ventaja de mayor adaptabilidad y pueden usarse por varios ciclos de siembra sin que se afecte el rendimiento de grano (Sierra-Marcías *et al.*, 2016). Una variedad sintética (VS) muy utilizada en el sureste del país es la VS-536, su uso se ha promovido debido a su buen potencial de rendimiento y su adaptación al clima de las zonas tropicales del país. Esta variedad sintética se formó mediante la recombinación genética por polinización controlada de nueve líneas endogámicas: Las líneas LE27 derivada de la población

Braquíticos, LE36 de la población La posta, LE37 de Tuxpeño Opaco, LE73 Blanco Cristalino, D471, D368, del programa de maíz de Iguala, que fueron derivadas de híbridos comerciales en F2, OCOT2 y LRB14-413-7, provenientes de los programas de Ocotlan y Río Bravo. VS-536 fue liberada en 1992 (Sierra-Macías *et al.*, 2016); presenta un aumento en la media de rendimiento de hasta un 32% en estados del trópico de México, como Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima, San Luis Potosí y Tamaulipas, estados con temperaturas en primavera que pueden acercarse a los 50 °C y temperatura promedio de alrededor de 31-36 °C (INEGI, 2021; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020). Otra característica importante, de esta variedad, es que puede usarse en varios ciclos de siembra sin presentar una disminución del rendimiento ni que se modifiquen las características agronómicas. La planta surgida de esta semilla alcanza una altura promedio de 2.48 m, es de grano blanco dentado, su ciclo vegetativo intermedio presenta floración a los 52-55 días, madurez fisiológica a los 90 días y siembra de cosecha a los 120 días, bajo condiciones del ciclo primavera-verano (Sierra-Macías *et al.*, 2016).

2.2.2. Maíz Chalqueño

El maíz Chalqueño es una raza moderna incipiente, que comprende razas desarrolladas a partir de la Conquista de México (Kato *et al.*, 2009). Estudios morfológicos altamente citados de las razas de maíz mencionan al Chalqueño como probable híbrido del Cónico y Tuxpeño (Figura 4), debido a la similitud con Cónico en su diagrama de entrenudos, longitud del grano, número de hileras y resistencia al hongo de hoja conocido como Roya o chahuixtle (*Puccinia polysora*), y su similitud con Tuxpeño en diámetro de olote y raquis, número de nudos cromosómicos y longitud de pelos del pedicelo (CONABIO, 2020; CONABIO, 2021; Wellhausen *et al.*, 1951). Sin embargo, estudios taxonómicos más recientes que consideran datos de efectos genéticos e interacciones genotipo-ambiente (Figura 5) muestran una separación muy grande entre el maíz Chalqueño y Tuxpeño, aunque concuerdan en una que hay una gran similitud y probable origen común entre el Chalqueño y Cónico (Serratos-Hernández, 2009), además de tener una distribución geográfica casi idéntica (Wellhausen *et al.*, 1951).

El maíz Chalqueño está adaptado a las regiones templadas de México, distribuido principalmente en la Mesa Central y toma su nombre de Chalco, ciudad en el Valle de México (Wellhausen *et al.*, 1951). Se caracteriza por un alto vigor de germinación y emergencia, así como resistencia a la sequía en etapas medias de su crecimiento (CONABIO, 2021; González-Huerta *et al.*, 2007). La planta alcanza los 1.8 m de altura, sus granos son color crema dentados, su floración ocurre a los 103 días de siembra y su rendimiento promedio es de 7.58-8.22 t/ha (CONABIO, 2021; González-Huerta *et al.*, 2021). Se siembra en lugares altos, húmedos y templados como los valles altos del centro de México, Durango, Zacatecas y en la Mixteca Oaxaqueña, donde la temperatura promedio es de 16 °C (CONABIO, 2021; INEGI, 2021).

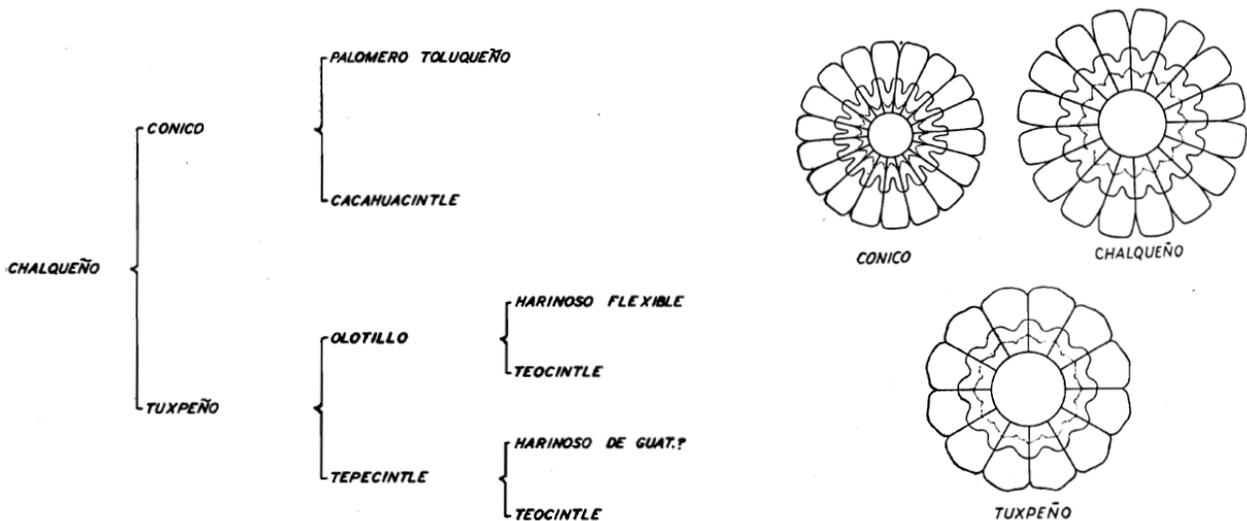


Figura 4. Origen probable del maíz Chalqueño. Se dedujo a partir de criterios morfológicos y comparación de diagramas de los cortes transversales de mazorcas típicas de Cónico, Chalqueño y Tuxpeño. Obtenido de Wellhausen et al. (1951).

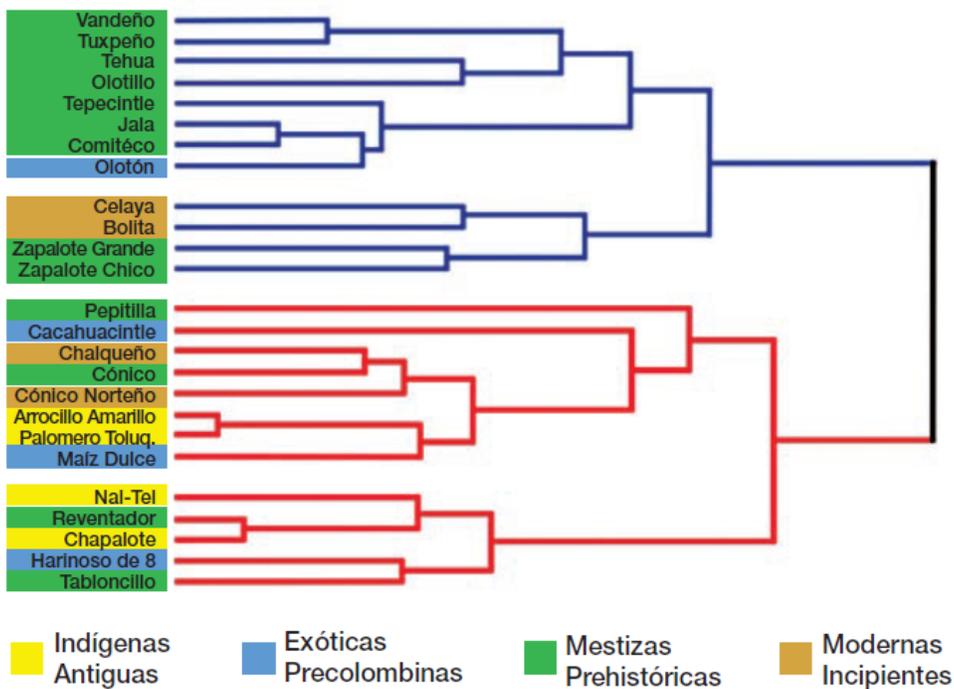


Figura 5. Clasificación de razas mexicanas de maíz. Generada a partir de datos genéticos e interacciones genotipo-ambiente. Obtenida de Serratos-Hernández (2009).

2.3. Estrés abiótico

El estrés abiótico es el efecto negativo de factores ambientales físico-químicos sobre los organismos (Ben-Ari y Lavi, 2012). Entre los tipos de estrés abiótico en plantas se encuentra la presencia de metales pesados, radiación ultravioleta, falta de nutrientes, temperaturas altas o bajas, hipersalinidad, inundaciones y sequía (Ben-Ari y Lavi, 2012; He *et al.*, 2018; Zhu, 2017). Las plantas se encuentran constantemente bajo estas condiciones desfavorables para su desarrollo, las cuales causan pérdidas en la agricultura; debido a su naturaleza sésil, deben enfrentar estas condiciones con mecanismos adaptativos o desarrollar tolerancia hacia algunas de ellas (He *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2003; Wani *et al.*, 2016).

Con el cambio climático ha aumentado la cantidad de CO₂ en la atmósfera, cambiado los patrones de lluvia, aumentado los periodos de sequía e intensidad de luz, así como la temperatura. Estos cambios afectan la producción de cultivos de interés, lo cual recalca la importancia del estudio del efecto del estrés abiótico en plantas (Onyekachi *et al.*, 2019; Wani *et al.*, 2016). En un ambiente natural, las plantas pueden estar expuestas a un factor de estrés, o simultáneamente, a una combinación de ellos (Wani *et al.*, 2016). Los cultivos con baja resistencia al estrés consumen mucha agua y fertilizantes, afectando así al ambiente, por lo cual aumentar la resistencia a estrés en cultivos es importante para una agricultura sustentable (Zhu, 2016).

2.3.1. Factores de estrés abiótico

De acuerdo a una publicación de Cramer *et al.* (2011) basada en datos de FAO del 2000 y 2007, el 96.5% del área global cultivada se ve afectada por algún tipo de estrés abiótico, el 64% se ve afectado por sequía, mientras que el 13% por inundación, el 57% por frío y el 30% por químicos en el suelo, ya sea por acidez, falta de nutrientes o salinidad. Si bien no se tiene una cifra exacta para estrés por calor, se ha reportado que este puede reducir el rendimiento de los cultivos hasta en un 50% (Lamaoui *et al.*, 2018).

Los principales factores de estrés abiótico son: sequía, salinidad, frío, calor y contaminación química. Estos tipos de estrés causan un estrés secundario, como el estrés oxidativo y el estrés osmótico (Wang *et al.*, 2003). La sequía, el frío y la salinidad originan un estrés osmótico en las células, ya que causan efectos adversos en el balance de solutos del citoplasma; el estrés por sequía en particular, causa reducción en la germinación y desarrollo de plantas, en la fotosíntesis y en peso seco (Bowne *et al.*, 2011; Onyekachi *et al.*, 2019). A temperaturas por debajo de cero, el agua del espacio extracelular se congela, causando potencial osmótico en la pared celular y formando cristales que dañan la membrana y colapsan la célula, además se congelan los ácidos grasos de la membrana, causando que dejen de funcionar. El estrés por salinidad causa tanto un desbalance iónico, que afecta la elongación de las raíces, como toxicidad por Na⁺ (Bowne *et al.*, 2011), además, afecta la capacidad de la planta de absorber agua y nutrientes, disminuyendo su crecimiento, puede causar quemaduras de hojas y reduce la actividad enzimática. El estrés

por calor disminuye el número de granos formados en cereales, el rendimiento de semillas, la germinación del polen y de fertilidad en plantas (Onyekachi *et al.*, 2019). El estrés oxidativo puede llevar a desnaturalización de proteínas estructurales (Wang *et al.*, 2003).

2.3.2. Mecanismos de defensa ante estrés abiótico

- **Señalización**

A pesar de que se asume que son capaces de reconocer una gran variedad de señales, se han identificado pocos sensores de señales ambientales en plantas. Esto puede ser debido a la redundancia de funciones en genes y a que es complicado obtener evidencia experimental directa de la función de los sensores. La familia de proteínas cinasas SnRK (Proteína cinasa serina / treonina relacionada con SNF), se ha identificado como sensor clave del estado energético celular y estrés abiótico. Muchas vías de señalización de estrés involucran a las proteínas cinasas dependientes de calcio (CPK) y a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); además, muchas utilizan como segundos mensajeros al calcio, NO (óxido nítrico), ABA, H₂S (Ácido sulfhídrico), H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno), especies reactivas de oxígeno y lípidos (He *et al.*, 2018; Zhu, 2016).

Distintos tipos de estrés ambiental, causan un mismo tipo de estrés secundario y tienen vías de señalización similares. Una señal primaria de estrés, inicia un proceso de señalización río abajo y controladores de la transcripción, los cuales activan mecanismos de respuesta para restablecer la homeostasis y reparar el daño de proteínas y membranas. Los genes relacionados con estrés se dividen en tres categorías principales (Wang, 2003), como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes relacionados con el estrés en plantas. *

Categoría	Tipo
Involucrados en cascadas y en control transcripcional	MyC (Proto-oncogen C en mamíferos) Cinasas MAP Cinasas SOS Fosfolipasas Factores de transcripción de choque térmico (HSF), familias de proteínas de unión a DRE/factor de unión a repeticiones-C (DREB/CBF) y factores de unión a ABRE/Elementos de respuesta a ABA (ABF/ABAE)
Con función directa en la protección de membranas y proteínas	Proteínas de shock térmico (HSP) Chaperonas Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) Osmoprotectores Captadores de radicales libres
Involucrados en el transporte hídrico e iónico	Aquaporinas Transportadores iónicos

*Elaborada a partir de Wang *et al.* (2003)

- **Respuestas a estrés abiótico**

Las plantas han tenido que enfrentar el estrés con mecanismos adaptativos o de tolerancia, y las defensas pueden ser de tipo fisiológico, celular o morfológico. Entre las principales defensas fisiológicas ante estrés abiótico se encuentran procesos metabólicos encaminados al endurecimiento de la cutícula, a la síntesis de ácidos grasos insaturados para la integridad de la membrana, captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la síntesis de proteínas que actúan como chaperonas moleculares y metabolitos osmoprotectores (He *et al.*, 2018).

Las cutículas con estructuras protectoras en la superficie exterior en plantas, formados principalmente por cutina y ceras, restringen flujos de líquidos y gases, defienden a la planta de ataques de patógenos o insectos y resisten varios tipos de estrés abiótico ((He *et al.*, 2018; Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Las membranas celulares están principalmente formadas por fosfolípidos y glucolípidos, cuyas insaturaciones aumentan la fluidez de la membrana. Ante frío la membrana se vuelve más rígida, mientras que con calor aumenta su fluidez, por lo cual se ajusta el grado de insaturación de las colas en la bicapa interna puede compensar el efecto de la temperatura sobre la membrana, manteniendo el rango óptimo de fluidez. Debido a que virtualmente todos los tipos de estrés pueden activar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) o especies reactivas de carbonilo (RCS, por sus siglas en inglés) como metilglioxal, sus captadores funcionan como sistema de defensa. Los captadores de ROS pueden ser no enzimáticos, que son moléculas con propiedades antioxidantes como betalainas, carotenoides, flavonoides, y vitamina E, o enzimáticos especializadas como superóxido dismutasas (SODs), catalasas (CATs) y peroxidasas (PODs). El principal captador de RCS es un sistema de glioxalasa que consiste en Gly I, Gly II y Gly III, que toman el metilglioxal y lo convierte en D-lactato. Las chaperonas (entre las cuales se encuentran las HSPs) facilitan el plegamiento, ensamblaje, transporte y degradación de proteínas; como sistema de defensa pueden servir para prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas o llevarlas a proteosomas para mantener la homeostasis. También pueden estabilizar proteínas orgánicas neutras, moléculas altamente solubles y poco tóxicas, como azúcares, aminoácidos y derivados, los cuales pueden servir como osmoprotectores contra la deshidratación o estabilizadores de membranas y proteínas. Estos mecanismos de defensa forman una red regulatoria con varias señales moleculares y factores reguladores de genes como el ABA, H₂O₂, H₂S, NO, poliaminas, citocromo B, cationes de calcio (Ca²⁺) y factores de transcripción (He *et al.*, 2018).

2.4. Estrés por calor

El estrés por calor se presenta por un aumento de temperatura por cierto periodo de tiempo, que causa un daño irreversible en plantas, generalmente entre 10 y 15 °C por sobre

su rango óptimo (Firmansyah y Argosubekti, 2020). Este estrés puede causar hasta el 50% de pérdida de rendimiento en cultivos (Lamaoui *et al.*, 2018).

El estrés por calor afecta diferentes rutas metabólicas disminuyendo la eficiencia de enzimas o desnaturalizándolas, provoca el cerrado de estomas para disminuir la pérdida de agua por transpiración, disminuye el área de para disminuir el área de exposición a la radiación solar, en etapas tardías acelera el paso de una etapa fenológica a la siguiente, causando plantas u órganos de menor tamaño (Firmansyah y Argosubekti, 2020). Asimismo, disminuye la eficiencia de la fotosíntesis al afectar la actividad del fosotistema II y de rubisco en el ciclo de Calvin, también disminuye la actividad de pigmentos, la respiración celular, el contenido y el potencial del agua, evitando la distribución adecuada del agua que se encuentra en la planta (Zhao *et al.*, 2021). El estrés prolongado puede causar disminución del vigor de la planta, retraso en crecimiento y, por lo tanto, una menor producción de semillas. En cereales, durante la etapa de llenado de granos disminuye la formación de almidón, proteínas y aceites (Firmansyah y Argosubekti, 2020), además de afectar la germinación de polen y fertilidad de la planta (Onyekachi *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2021).

Este tipo de estrés se ha reportado como un factor limitante del crecimiento de cultivos tanto en zonas tropicales como en templadas (Firmansyah y Argosubekti, 2020), además, con el calentamiento global, se encuentra cada vez más presente.

2.4.1. Termotolerancia

La termotolerancia es la capacidad de un organismo y sus células de sobrevivir a estrés térmico destructivo que supera el rango óptimo de temperatura para su desarrollo (Muñoz-Valencia *et al.*, 2013). La termotolerancia puede clasificarse en dos formas para su estudio: basal e inducida. La basal consiste en la capacidad del organismo a sobrevivir a la exposición a temperaturas altamente estresantes, por cortos periodos de tiempo; esta termotolerancia es una respuesta evolutiva y está relacionada con la genética del organismo (Esperk *et al.*, 2016, Muñoz-Valencia *et al.*, 2013). Por su parte, la inducida se refiere al aumento de tolerancia de un organismo a elevadas temperaturas, luego de haber recibido un tratamiento de temperaturas altas, pero no letales; esto es una respuesta asociada a la plasticidad del genoma (Esperk *et al.*, 2016, Muñoz Valencia *et al.*, 2013). La relación entre ambos tipos de termotolerancia no está conservada entre especies, ya que en algunos organismos hay relaciones positivas entre ellas, en otros hay relación negativa y en otros, no parece haber una relación clara (Esperk *et al.*, 2016). En el trigo se ha observado expresión diferencial de 1,314 transcritos dependiendo del tipo de termotolerancia (Bokszczanin *et al.*, 2012). Se han reportado proteínas o moléculas necesarias para la termotolerancia basal, como son el regulador transcripcional MBF1c (Multiprotein Bridging Factor 1c), la enzima catalasa detoxificante de ROS, los jasmonatos, la señalización dependiente de ácido salicílico y los factores de respuesta a etileno ERF95 y ERF97 (Bokszczanin, 2013; Clarke *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2009; Hughes, 2021). En cambio, los factores de transcripción de choque térmico (Heat Shock Factors o HSF) y algunas

chaperonas como HSP101, son necesarias para ambos tipos de termotolerancia (Bokszczanin, 2013; Nieto-Soletto *et al.*, 2002).

La termotolerancia inducida suele presentarse en plantas en lugares con cambios de temperatura graduales, sin embargo, gracias al cambio climático las plantas se ven cada vez en mayor necesidad de depender de su termotolerancia basal, que es el tipo de termotolerancia en la que se centra en este proyecto.

2.4.2. Estrés por calor en Maíz

La mayor parte de los estudios de estrés por calor se han llevado a cabo para maíz cultivado en Estados Unidos o China, por lo que no se cuenta con mucha información para variedades de maíz cultivadas en México. Sin embargo, se encuentran algunos estudios sobre el efecto del estrés por calor en variedades tropicales de maíz en Tamaulipas (Rincón-Tuexi *et al.*, 2006), evaluación de materiales de maíz con posible tolerancia a estrés de calor del Banco de Germoplasma de Maíz de CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) en Coahuila (Isidro-Hernández, 2019) y reseñas sobre el desarrollo de líneas resistentes a estrés por calor por el CIMMYT-México (Prasanna *et al.*, 2021).

El maíz es sensible al estrés por calor, particularmente en sus etapas tempranas de germinación (Hussain *et al.*, 2019). Temperaturas superiores a 35 °C afectan las etapas vegetativas y reproductivas, desde la germinación hasta el llenado de granos. Bajo estas condiciones, la planta disminuye: la absorción de nutrientes, eficiencia de fotosíntesis, altura, biomasa, el área foliar y la eficiencia de uso de agua, llevando en consecuencia a una disminución del rendimiento; también se altera al metabolismo oxidativo, causando inestabilidad de la membrana y afectando la conductancia estomática (Hussain *et al.*, 2019). Específicamente durante la etapa de llenado de granos, este tipo de estrés destruye los cloroplastos, reduce la absorción de carbono y decrece el potencial hídrico de la planta, lo cual resulta en menor peso y rendimiento de granos, así como en un aumento del número de granos abortivos (Jing *et al.*, 2020; Tao *et al.*, 2016).

Entre las estrategias para la termotolerancia en maíz, se ha observado: la inducción de respuestas a estrés por calor citoplásmicas (HSR), donde los factores de transcripción HSF activan a genes que codifican para HSPs; la inducción de respuesta de proteína desplegada localizada en el retículo endoplásmico (UPR) que activa a factores de transcripción que regulan al alza una familia de genes de respuesta al estrés; respuestas hormonales que involucran calcio, ABA, etileno y ácido salicílico, para protección de daño oxidativo; corte y empalme alternativo de ARN de genes de respuesta a estrés abiótico y la transducción de señales de ABA para activar genes de HSPs (Tao *et al.*, 2016). Además, se ha reportado la expresión diferencial de miRNAs conocidos y nuevos en la respuesta a estrés por calor en maíz, conduciendo a cambios en los niveles de sus mRNA objetivos. Entre estos se encuentra miR172 que regula a factores de transcripción tipo AP2 (Li y Howell, 2021).

2.4.3. Sensores y reguladores maestros de la señalización de estrés por calor

La percepción de un estímulo es importante para responder a éste, es el primer paso de una vía de señalización y posterior respuesta; a pesar de esto, el estudio de termosensores aún es limitado, ya que los estudios se centran en la respuesta al estímulo. Un termosensor es una molécula que se ve afectada por calor y responde a él para dar una respuesta que lleva a cambios relevantes en la fisiología o morfología de la planta. El efecto que el calor tiene sobre dicho termosensor puede ser tanto un cambio en su estructura como en su interacción con proteínas, además debe sin intervención de otros componentes río arriba; la respuesta al calor puede ser a nivel bioquímico o biofísico. Un ejemplo de termosensor es el Fitocromo B (PhyB), un receptor de luz roja que, ante la presencia de la misma, pasa a su forma activa y cambia de conformación de su cromóforo, pero en presencia de altas temperaturas, revierte este proceso y pasa a su forma inactiva (Dai-Vu *et al.*, 2019). Otros potenciales termosensores son el receptor de membrana de luz azul fototropina, cuya actividad se ve inducida a altas temperaturas, regulando la localización de cloroplastos: A 22°C induce el movimiento de los cloroplastos hacia la superficie celular, mientras que a 5°C induce el movimiento de los cloroplastos hacia las paredes celulares periclinales; y el receptor de luz azul Zeirlupes, cuya tasa de inactivación aumenta en calor y podría disminuir la velocidad del ciclo circadiano (Hayes *et al.*, 2020).

Existen reguladores maestros como el Complejo Mediador, SnRK1 y TOR, que se encuentran relacionados con varios tipos de estrés abiótico, incluyendo el calor, y con procesos del desarrollo normal de las plantas. El Complejo Mediador tiene una subunidad Med25 que pueden interactuar con factores de transcripción de respuesta a estrés, en calor es con la

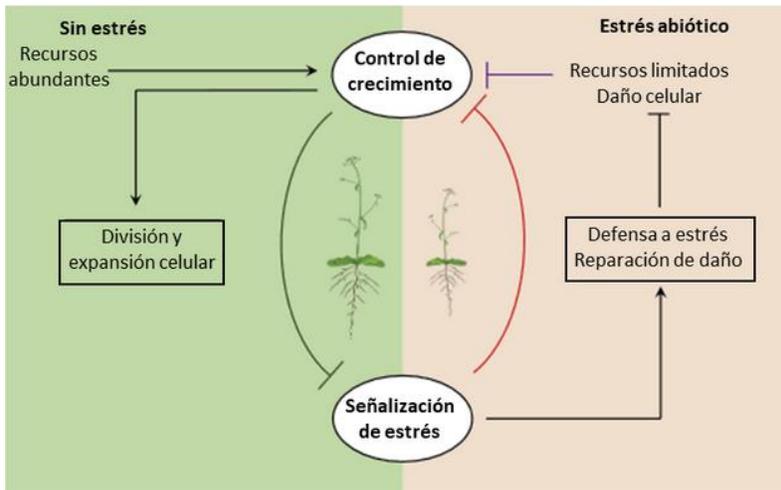


Figura 6. Relación entre señalización de estrés y crecimiento de la planta. El estrés abiótico (ruta rosa) inhibe el crecimiento debido a la limitación de recursos y el daño celular, al encontrarse libre de estrés (ruta verde) se promueve la división y expansión celular e inhiben la señalización de estrés. Traducido de Zhang *et al.* (2020).

proteína MYB-like, y a su vez también regula el tiempo de floración. SnRK1 (proteína cinasa 1 relacionada con SNF1) es un señalizador de privación de energía en plantas, éste regula procesos metabólicos y de desarrollo en plantas, así como vías de señalización medidas por hormonas en respuesta a estrés abiótico, entre ellos el calor (Balderas-Hernández *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2012). La actividad de SnRK1 se encuentra estrechamente relacionada

con la del regulador maestro TOR para interpretar y balancear la señalización por estrés y desarrollo en la planta. TOR se ve inactivado por SnRK1 en condiciones de inanición y estrés, por medio de la fosforilación de la proteína reguladora de TOR RAPTOR. Esta comunicación entre reguladores maestros funciona tanto en desarrollo como en estrés, debido a que las plantas necesitan mantener un equilibrio entre crecer y resistir las condiciones adversas (Figura 6), optimizando los recursos celulares con los que cuenta la planta (Zhang *et al.*, 2020; Balderas-Hernández *et al.*, 2013). Bajo condiciones óptimas, la planta tiene múltiples recursos con los cuales puede crecer, sin embargo, estos recursos y su energía se ven limitados ante un estrés abiótico, debido a reducciones en la eficiencia de la fotosíntesis, uso del agua o absorción de nutrientes. Por lo tanto, bajo condiciones de estrés hay inhibición del crecimiento para enfocar los recursos disponibles en activar respuestas a el estrés y reparar el daño celular producido por estrés (Zhang *et al.*, 2020).

2.5. TOR

2.5.1. Estructura y función en plantas

TOR (Target of Rapamycin, por sus siglas en inglés) es una Ser/Thr cinasa que pertenece a la familia de las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K), se encuentra muy conservada en eucariontes y es considerada como regulador central de crecimiento. Esta función implica la regulación de la actividad de múltiples blancos que controlan el crecimiento, proliferación celular, metabolismo y defensa en los organismos eucariontes. En *Arabidopsis thaliana*, la mutante nula de TOR es letal a nivel embrionario y la reducción de sus niveles por RNAi reduce mucho el crecimiento y desarrollo a nivel de plántula (Shi *et al.*, 2018). A través de sus blancos, TOR regula la transcripción, el empalme alternativo y la síntesis de proteínas. En levadura y animales, TOR puede formar parte de dos complejos, TORC1 que es sensible a rapamicina, y TORC2 que es insensible. TORC1 está formado por TOR, RAPTOR (Regulatory associated protein of TOR) y LST8 (mammalian lethal SEC13 protein 8), y es el único complejo identificado hasta el momento en plantas y algas (Martínez *et al.*, 2021; Romero *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2018; Wullschleger *et al.*, 2006).

En el genoma de *Arabidopsis*, solamente un gen codifica para TOR, mientras que hay dos que codifican para RAPTOR y dos para LST8. TOR es una proteína que consta de 5 dominios principales (Figura 7): el dominio catalítico de cinasa, varias repeticiones en tándem de HEAT (Huntingtin elongation factor 3a subunit of protein phosphatase 2A and TOR1), un dominio FAT (focal adhesion target), un dominio FRB y un dominio FATC (FAT carboxy-terminal) (Martínez *et al.*, 2021; Romero *et al.*, 2018). El dominio HEAT interactúa con la proteína RAPTOR para regular la actividad del complejo TORC1, el dominio FAT interactúa con el dominio catalítico, el dominio FRB interactúa con el complejo rapamicina/FKBP12 inhibiendo la actividad de TORC1, el dominio cinasa es el encargado de fosforilar a las proteínas río abajo del complejo TORC1 y el dominio FATC interactúa con la proteína LST8 para dar especificidad por y estabilizar su unión al sustrato (Salazar-Díaz y Dinkova, 2021; Martínez *et al.*, 2021).

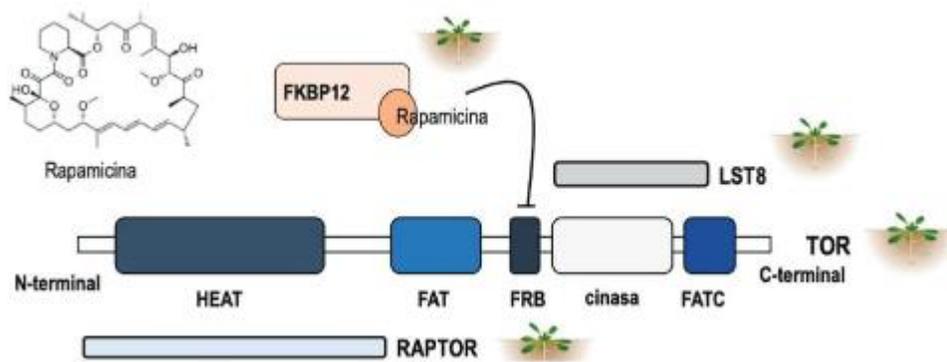


Figura 7. Representación esquemática de los dominios de la proteína TOR y los principales miembros del complejo TORC1. Donde se muestra que el complejo TOR1 se forma por TOR, RAPTOR (Regulatory associated protein of TOR) y LST8 (mammalian lethal SEC13 protein 8); a su vez TOR se forma por el dominio HEAT (Huntingtin elongation factor 3a subunit of protein phosphatase 2A and TOR1), FAT (focal adhesion target), FRB y un dominio FATC (FAT carboxy-terminal). Tomado de Salazar-Díaz y Dinkova (2021).

Se han encontrado relaciones directas e indirectas, por fosforilación de sustratos, entre las funciones de TOR y diversos procesos del desarrollo de plantas (Shi *et al.*, 2018). Algunas de sus funciones son específicas para plantas, mientras que otras se comparten con animales (Figura 8). En plantas, TORC1 regula la asimilación de nutrientes, el metabolismo de macromoléculas, metabolismo secundario, el ciclo celular, el flujo de la información genética, proliferación celular, desarrollo de organelos y respuestas a estrés (Martínez *et al.*, 2021; Romero *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2018; Wullschleger *et al.*, 2006).

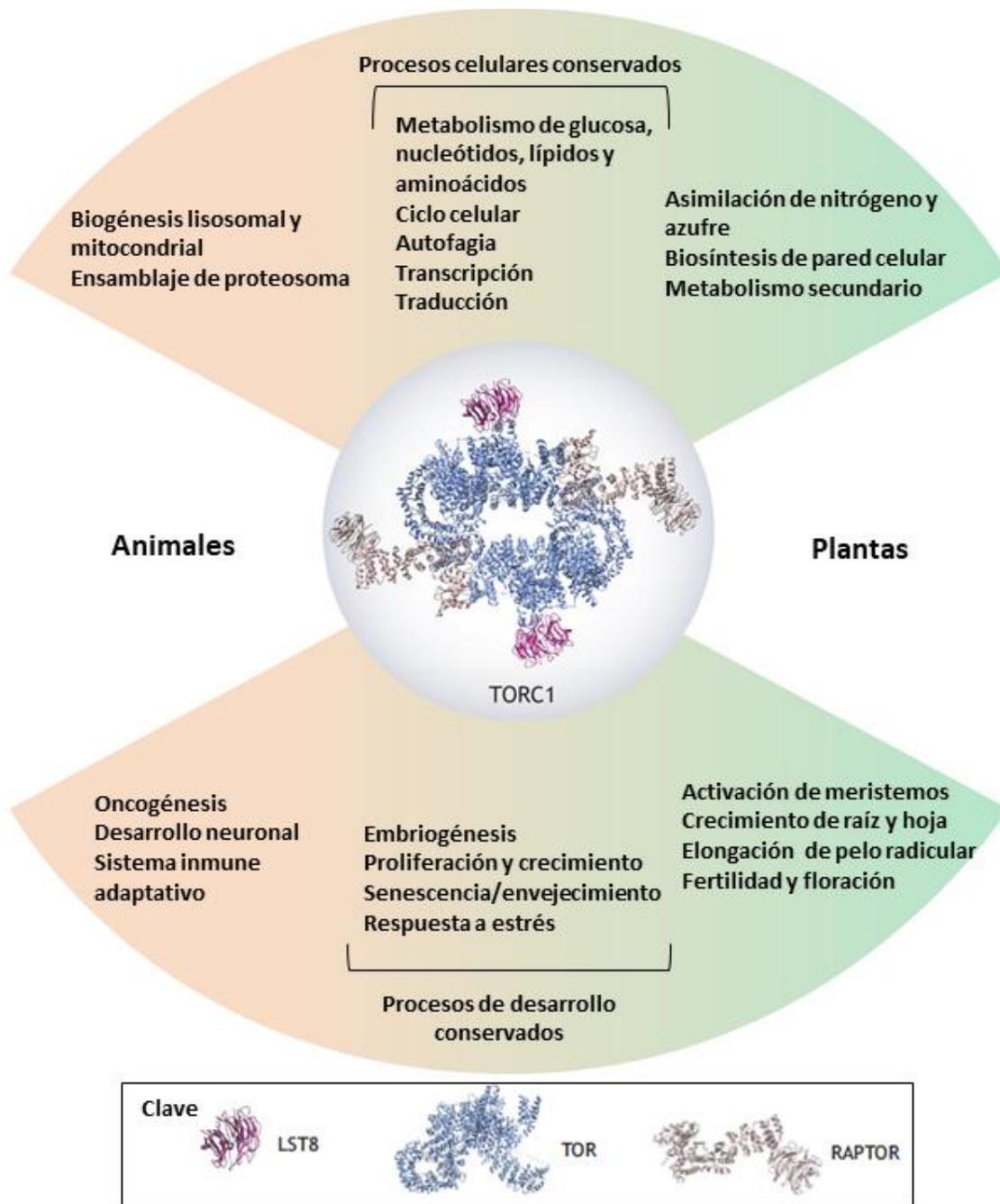


Figura 8. Procesos celulares y de desarrollo conservados y especializados que regulan la señalización TOR en plantas y animales. En el centro se muestran dos unidades de TORC1, destacando los componentes conservados en plantas y animales (TOR, RAPTOR y LST8). Los procesos regulados que se conservan en ambos se muestran en medio, mientras que los específicos para plantas se encuentran a la derecha y los específicos para animales a la izquierda. Traducido por Olea-Badillo (2020) de Shi *et al.* (2018).

2.5.2. Vía de TOR en plantas

Considerando a TORC1 como regulador central, la vía puede dividirse en dos partes, donde los elementos que detectan señales ambientales y las transducen hacia TOR se clasifican como “río arriba”, mientras que los elementos que son regulados por TOR y actúan como respuesta a su estado activo se clasifican como “río abajo”.

- **Reguladores río arriba de TORC1**

En levadura y animales, los reguladores río arriba de TOR incluyen a los aminoácidos, mitógenos y factores de crecimiento que activan la vía TORC1. Sin embargo, una señalización similar no se ha identificado para plantas. En este caso, se ha encontrado a la glucosa, auxinas y nitrógeno como señales principales para la activación de TORC1 (Tabla 2; Martínez *et al.*, 2021).

Tabla 2. Señales río arriba de la vía TOR en plantas, efecto sobre TOR y sobre la fisiología de la planta.

Señal	Efecto sobre TOR	Efecto fisiológico
Deficiencia de azufre	Baja la actividad de TORC1	Aumento de la autofagia y disminución de la traducción y la actividad de la quinasa meristemática.
Aumento de la concentración de aminoácidos de cadena ramificada	Activadores río arriba de la vía TORC1	Síntesis de proteínas en las hojas maduras en Arabidopsis.
Concentraciones bajas de nucleósidos en el citosol	Reprimir la actividad de la cinasa TOR	Inducción de autofagia.
Señales de luz	Afectar la vía TOR a través de los azúcares	Señal de crecimiento. Activación de células madre mediada por TOR en el ápice del brote y para desencadenar la traducción de proteínas durante el proceso de des-etiolación en plántulas de Arabidopsis.
Proteína Rho activada por auxinas	Activa a TOR por fosforilación	Promueve el reinicio de la traducción de los ARNm que contienen marcos abiertos de lectura río arriba (uORF).
Aumento del transporte de auxinas de brote a raíz y acumulación de auxinas en las puntas de las raíces de las plantas de maíz cultivadas con baja disponibilidad de N	Inducen la vía TOR	Lleva a la elongación de las raíces para explorar un mayor volumen de suelo.
Glucosa en el maíz	Induce la vía TOR	Regulación del ciclo celular y la proliferación celular en el meristemo apical de la raíz, controlando el momento de la germinación.

Elaborada a partir de Martínez *et al.* (2021)

El eje de señalización auxina/ROP2/TOR es uno de los ejemplos mejor estudiados de regulación río arriba de TOR en plantas. Las auxinas actúan sobre TOR por la activación de una GTPasa pequeña, ROP2, la cual se une a TOR1 y promueve su activación por fosforilación si está unido a GTP, TOR se asocia a estructuras similares a endosomas. Existe una relación antagonista entre el ortólogo en plantas de la proteína cinasa AMP (AMPK) que funciona como sensor de energía, SnRK1, y las vías de señalización relacionadas a TOR, ya que SnRK1 puede interactuar y fosforilar a RAPTOR, inhibiendo a TOR al percibir inanición o estrés (Schepetilnikov y Ryabova, 2018). Estos reguladores río arriba de TOR se muestran en la Figura 9.

El efecto de otras señales se encuentra menos estudiado. Altas concentraciones de nucleótidos activan la señalización de TOR bajo condiciones normales de crecimiento. Se sabe que los azúcares tienen un papel importante en la vía y se considera la posible conservación en plantas del mecanismo de dimerización de TORC1 inducido por glucosa. En las células de mamíferos, el complejo TTT-RuvVBL1/2 podría ser el sensor metabólico que induce la dimerización de mTOR cuando hay ATP disponible, o que evita el ensamblaje y, por lo tanto, la activación de mTOR cuando el ATP es escaso (Martínez *et al.*, 2021).

Los inhibidores de la actividad cinasa de TOR son de primera y segunda generación y han posibilitado el estudio de la vía sin la necesidad de mutantes, las cuales resultan letales. La rapamicina es el inhibidor de primera generación, promueve la interacción de FKBP12 con el dominio FRB de la proteína TOR, inhibiendo la actividad de TORC1. Se ha demostrado que rapamicina inhibe la fosforilación de S6K de *Arabidopsis* y como consecuencia indirecta, la fosforilación de la rpS6. La segunda generación es más potente, ya que incluye inhibidores competidores de ATP que actúan directamente sobre TOR. En plantas, se ha encontrado que AZD8055, TORIN1, TORIN2, WYE-132, WYE-354 y KU-63794 bloquean TORC1 (Shi *et al.*, 2018).

- **Efectores río abajo de la vía TOR**

Los principales blancos río abajo de TORC1 en mamíferos son la proteína cinasa ribosomal S6 (S6Ks) y las proteínas de unión a eIF4E (4E-BPs). La activación de S6Ks, depende de su fosforilación directa por mTORC1 en un residuo C-terminal y de la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1), que contribuye a la activación total de S6K1 por fosforilación a un motivo dentro del bucle de activación (Thr389 y Thr229 en S6K1, respectivamente). El residuo Thr389 se encuentra conservado en los homólogos de S6K en plantas (Schepetilnikov y Ryabova, 2018; Wang *et al.*, 2003).

Las S6Ks forforilan distintos objetivos, principalmente factores de traducción, la proteína ribosomal S6 (rpS6) y el factor de elongación eucariota cinasa 2 (Eukaryotic elongation factor-2 kinase, eEF2K), por lo que controlan diversas funciones celulares. En plantas, se ha relacionado a la fosforilacion de rpS6 con la activación y fosforilacion de S6K1 y se ha observado que, en respuesta a estrés abiótico, rpS6 es fosforilada en distintos sitios de su α -hélice C-terminal; además, se ha sugerido que la fosforilación de la Ser240 responde a

TOR/S6K1, ya que la inactivación de TOR disminuye esta fosforilación en rpS6 (Schepetilnikov y Ryabova, 2018; Dobrenel *et al.*, 2016). En maíz, se ha observado que la insulina, similar a lo que ocurre en mamíferos, transduce la señal hacia la activación de TOR, promoviendo la fosforilación de rpS6 (Dinkova *et al.*, 2007; Garcia-Flores *et al.*, 2001; Ruvinsky *et al.*, 2005, Vanhaesebroeck y Alessi 2000). En plantas no se han encontrado proteínas ortólogas a las 4E-BP de mamífero.

Bajo el estímulo de auxinas o en infecciones virales, se identificó a eIF3h como una nueva proteína blanco de TOR/S6K1 en plantas. Su fosforilación por S6K1 en el sitio Ser178, promueve el reinicio de traducción para mRNAs que presentan uORFs en su región 5'UTR (Schepetilnikov y Ryabova, 2018). Los principales efectores río abajo de TOR en plantas se muestran en la Figura 9.

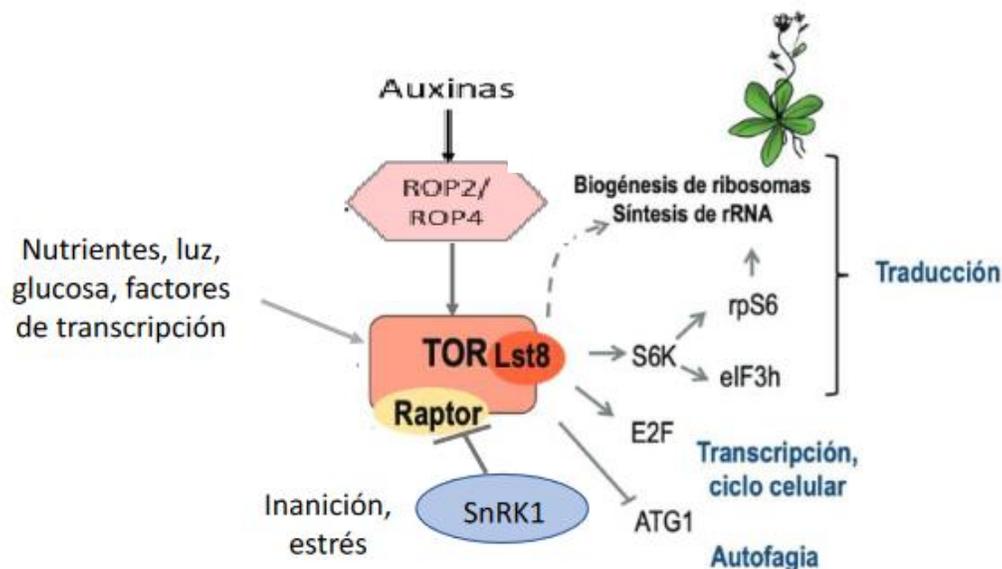


Figura 9. Vía de señalización propuesta para TOR en plantas. Modificado de Salazar-Díaz y Dinkova (2021) y Olea-Badillo (2020, a partir de Dinkova *et al.*, 2007; y Schepetilnikov y Ryabova, 2018).

El estudio sobre su respuesta ante estrés se ha centrado en la actividad de proteínas río abajo de TOR como la proteína rpS6 y S6K1, no en TOR directamente (Calderón-Valencia, 2020). En tomate silvestre (*Lycopersicon peruvianum*) se reduce la fosforilación de rpS6 ante estrés por calor (Scharf y Nover, 1982).

2.6. Poliaminas

Las poliaminas son derivados orgánicos polícationicos de aminoácidos, tienen bajo peso molecular y son mayoritariamente cadenas alifáticas cortas con dos o más grupos aminos (He *et al.*, 2018; Tiburcio y Alcázar, 2018; Wimalasekera *et al.*, 2011). Las poliaminas se encuentran en casi todos los organismos; en plantas, las más comunes son la diamina putrescina (Put), triamina espermidina (Spd), tetraamina espermina (Spm), que en

ocasiones se presentan de manera conjugada con unión a ácidos cinámicos (Tiburcio y Alcázar, 2018; Wimalasekera *et al.*, 2011).

Las poliaminas son necesarias durante la germinación y desarrollo de organismos eucariotas y procariotas, en plantas regulan la proliferación celular, la embriogénesis somática, la diferenciación, la morfogénesis, la germinación, el desarrollo de raíces, ápices, flores y frutos, la senescencia, la terminación de dormancia, la expresión génica, la síntesis de DNA y la regeneración *in vitro* (Tiburcio y Alcázar, 2017; Wimalasekera *et al.*, 2011). Además de esto, también tienen un papel protector contra diversos tipos de estrés abiótico, como salinidad, frío, sequía, señalización de defensa contra patógenos, hipoxia, radiación UV, calor, herbicidas y metales pesados (Alcázar, Bueno y Tiburcio, 2020; Gao *et al.*, 2020; He *et al.*, 2018; Wimalasekera *et al.*, 2011).

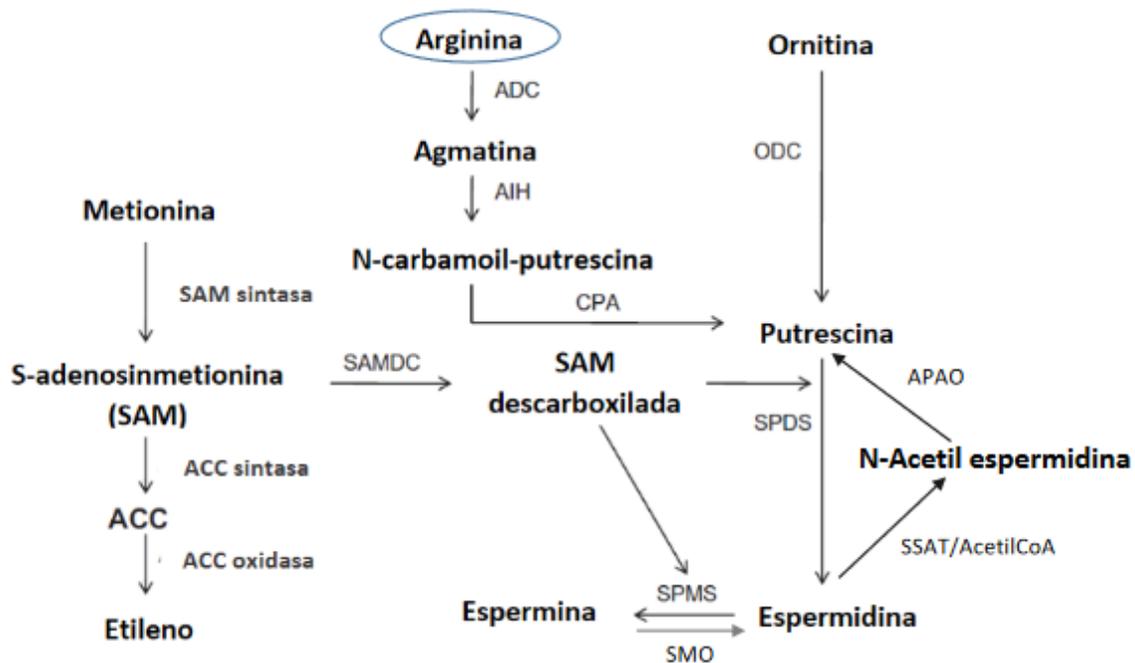


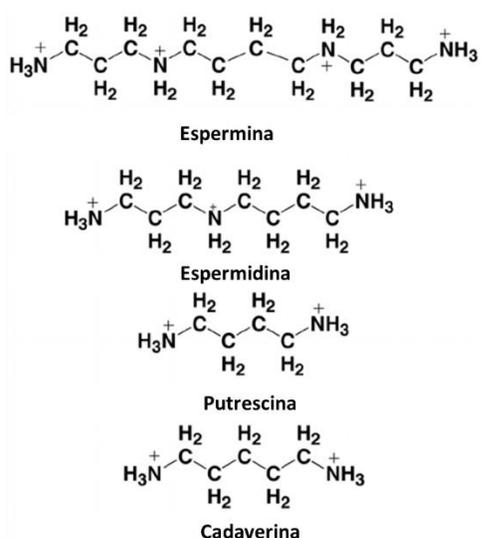
Figura 10. Ruta de biosíntesis de la poliaminas. Donde ADC: arginina descarboxilasa; AIH: agmatina iminohidrolasa; APAO: N1-Acetilpoliamina oxidasa; CPA: N-carbamoilputrescina aminohidrolasa; ODC: ornitina descarboxilasa; SPDS: espermidina sintasa; SPMS: espermina sintasa; SAM sintasa: Sadenosilmetionina sintasa; SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa; SMO: Espermidina oxidasa; SSAT: Espermina/espermidina N1-Acetiltransferasa; ACC sintasa: 1-amino-ciclopropano-1-ácido carboxílico sintasa; ACC oxidasa: 1- amino-ciclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa. Modificado de Wimalasekera *et al.* (2011) y Soda, (2011).

La ruta de biosíntesis de poliaminas se muestra en la Figura 10: comienza con la formación de putrescina (Put) a través de la descarboxilación de ornitina o arginina, por ornitina descarboxilasa (ODC) o arginina descarboxilasa. En plantas, solamente se produce descarboxilación de arginina. La triamina spd y la tetramina spm se forman al añadir

sucesivamente grupos aminopropilo para Put y Spd, respectivamente, en reacciones catalizadas por espermidina sintasa (SPDS) y espermina sintasa (SPMS). Los grupos aminopropilo se producen de la descarboxilación de S-adenosilmetionina (SAM) catalizada por SAM descarboxilasa (SAMDC). Para la degradación de las poliaminas complejas se utilizan enzimas oxidasas: N1-Acetilpoliamina oxidasa y espermidina oxidasa (Soda, 2011). La expresión de genes implicados en la biosíntesis de poliaminas está fuertemente regulado por una serie de respuestas de estrés abiótico y biótico debido a la toxicidad de altas concentraciones de SAM (Wimalasekera *et al.*, 2011). Cabe mencionar que los mRNA correspondientes a varias de las enzimas involucradas en la vía presentan uORFs en sus regiones 5'UTR (Salazar-Díaz *et al.*, 2021).

2.6.1. Poliaminas en el crecimiento temprano de eje embrionario

La concentración y perfil de poliaminas en semillas varía durante su ciclo. En general, están presentes durante la embriogénesis y se acumulan en cantidades relativamente altas en



semillas secas maduras de algunas especies. Su concentración puede ser alterada por el proceso de estratificación, aumentando durante etapas tempranas de germinación. Después de la germinación es posible que los órganos de reserva sintetizen y exporten algunos tipos de poliaminas al eje embrionario. En soya se ha observado la presencia de espermina y cadaverina en el eje embrionario durante la embriogénesis; a mediados de la maduración de la semilla, la acumulación de cadaverina se detiene sin afectar la viabilidad. En semillas maduras de maíz, la relación Spd:Spm:Put es de 7.5:6:1 en el embrión, mientras que en el endospermo no se detecta Spd y la relación Put:Spm es 2:1. Se encuentra mayor contenido de poliaminas en escutelo que en los tejidos del eje de las semillas secas (Matilla, 1996; Villanueva, Adlakha y Cantera-Soler, 1978). Durante la

Figura 11. Estructura química de poliaminas presentes en ejes embrionarios de maíz. Traducida de Kabir y Suresh-Kumar (2013).

Durante la germinación, el embrión aumenta la concentración de putrescina cuatro veces, mientras disminuye la de espermina y espermidina. La síntesis de poliaminas en el eje embrionario se ha relacionado con la pérdida de capacidad germinativa del maíz, y se ha sugerido que no hay movimiento activo de poliaminas en tejido embrionario durante la germinación. De 2 a 12 horas después de la germinación, se ha observado un aumento en la concentración de poliaminas totales (Matilla, 1996; Villanueva *et al.*, 1978). A pesar de que la cadaverina se ha estudiado poco en el eje embrionario, ya que se encuentra en muy poca concentración y disminuye aún más después de una hora de germinación, se sabe que es necesaria para el desarrollo normal de la raíz de soya (Gamarnik y Frydman, 1991).

2.6.2. Poliaminas y estrés

Se observan niveles elevados de poliaminas en plantas expuestas a estrés abiótico, ya que éstas aumentan la tolerancia a distintos tipos de estrés como sequía, salinidad, frío, calor, hipoxia, deficiencia de potasio, ozono, radiación UV, metales pesados, herbicidas y diversos patógenos (Alcázar, 2020; Wimalasekera *et al.*, 2011). Estas proporcionan un amplio espectro de tolerancia ya que ayudan a mantener la homeostasis de las proteínas, desintoxicar especies reactivas de oxígeno, activar la maquinaria antioxidante y las chaperonas moleculares (Alcázar, 2020; Lio, 2016). Aparte de su papel en la homeostasis iónica, también pueden unirse a moléculas cargadas negativamente (como lípidos de membrana y proteínas), para mitigar el daño de membrana. Las poliaminas también se asocian con otros factores regulatorios de respuesta a estrés: como ABA y H₂O₂ e induce la producción de NO (He *et al.*, 2018). Pueden aumentar la cantidad de proteínas solubles en hojas, disminuir la cantidad y conductividad de malondialdehído. Su aplicación exógena mantiene un nivel alto de clorofila, reduce la permeabilidad y mantiene la integridad de la membrana plasmática, promueve el balance de contenido de O₂⁻ y el llenado de granos en arroz (Jing *et al.*, 2020).

En el caso del maíz, se ha reportado que las poliaminas juegan un papel importante en la resistencia a estrés por sequía (Alcázar *et al.*, 2020; An *et al.*, 2012), por bajas temperaturas (Alcázar *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2020) y por calor (Jing *et al.*, 2020).

Las poliaminas son importantes para el desarrollo de plantas y respuesta a estrés, sin embargo, los estudios sobre la relación entre su contenido y respuesta a estrés en por calor en cultivos de interés aún son limitados.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

La vía de TOR en el maíz ha sido estudiada principalmente durante la germinación y establecimiento temprano de plántula. En el 2007, Agredano-Moreno *et al.* analizó la regulación de expresión de *ZmTOR* (TOR de *Zea mays*) durante la germinación de maíz Chalqueño, e identificaron su secuencia completa a partir de cDNA. En este estudio, se pudo detectar la proteína TOR a partir de las 12 horas de imbibición (hpi) y sus niveles aumentaron gradualmente hasta las 48 hpi, donde se observó el nivel más alto. En el mismo estudio, se detectaron altos niveles del mRNA de TOR en ejes embrionarios de semillas secas a 0 hpi, mas no a 6 hpi, aumentando nuevamente entre las 12 y 48 hpi, consistente con el patrón de acumulación de la proteína. También se analizaron hojas jóvenes y viejas, meristemas de raíz, callos embriogénicos y no embriogénicos, encontrando el mRNA de TOR en todos los tejidos a niveles similares. Estos resultados sugirieron que la expresión de TOR a nivel de mRNA es ubicua y probablemente se encuentra regulado principalmente a nivel de su actividad proteica.

En el 2020, Olea-Badillo analizó la expresión a nivel de mRNA de varios componentes de la vía TOR durante la germinación de maíz. Observó un aumento en la expresión de TOR y S6K

a las 24h de germinación, mientras que RAPTOR mostró niveles similares a todos los tiempos y LST8 disminución y posterior aumento a las 48 hpi (Figura 12). Esto sugiere que la expresión de algunos componentes podría resultar limitante para la formación de TORC1.

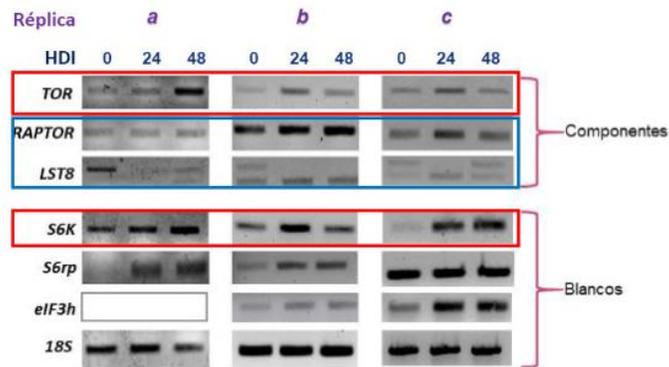


Figura 12. Abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR en germinación de maíz. Se realizó la amplificación de regiones específicas para cada gen mediante RT-PCR punto final. Se visualizaron los productos mediante geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. HDI: horas de imbibición de las semillas. El rRNA18S se utilizó para normalizar la abundancia. Se encerró con rojo los transcritos que aumentaron su expresión a partir de las 24 horas de imbibición, y en azul los que se mantuvieron constantes en el tiempo. Modificado de Olea-Badillo (2020).

Por su parte, Calderón-Valencia en 2020 encontró que la fosforilación de rpS6-S240 disminuye a consecuencia de un choque térmico en etapas tempranas post-germinativas de semillas de maíz Chalqueño (Figura 13). En cambio, los niveles de proteína rpS6 total no variaron ante el estrés. Estos datos sugieren una inhibición de la vía TOR por choque térmico. Sin embargo, no se ha analizado el efecto de esta inhibición en el crecimiento posterior de la planta. La disminución en la fosforilación de rpS6 coincide con el aumento en la expresión de la chaperona HSP101, indicando una respuesta adecuada al choque térmico.

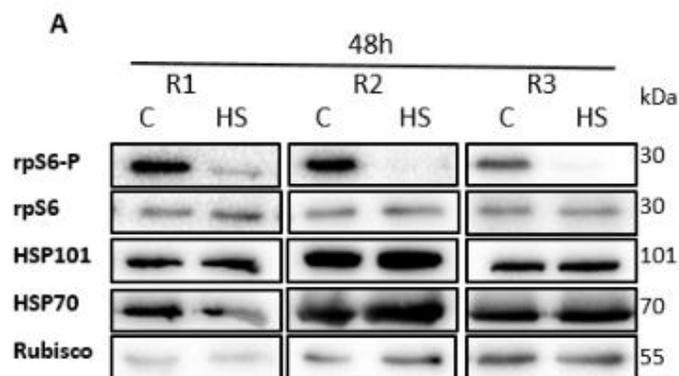


Figura 13. Efecto de choque térmico en los niveles y actividad de proteínas específicas de ejes embrionarios de maíz Chalqueño. Semillas embebidas por 48 h fueron sometidas por una hora a

42°C (HS) o incubadas a 25°C (C) bajo las mismas condiciones. Se muestran tres réplicas biológicas independientes (R1-R3). Tomado de Calderón-Valencia (2020).

Analizando la actividad de la vía TOR durante las últimas etapas de la germinación y las primeras etapas de establecimiento de la plántula en maíz y su rol en la regulación traduccional (Salazar-Díaz et al., 2021), se encontró que la presencia del inhibidor específico AZD-8055 afecta el reclutamiento de los mRNAs de *ZmSAMDC* y *ZmPAO3*, que participan en la biosíntesis y degradación de poliaminas a poliribosomas, sugiriendo afectación en su eficiencia traduccional (Figura 14). Por otro lado, la incubación de semillas germinadas con espermidina exógena estimuló la fosforilación de rpS6 dependiente de la actividad de TOR (Figura 15) y redujo el daño ocasionado por calor (Figura 16).

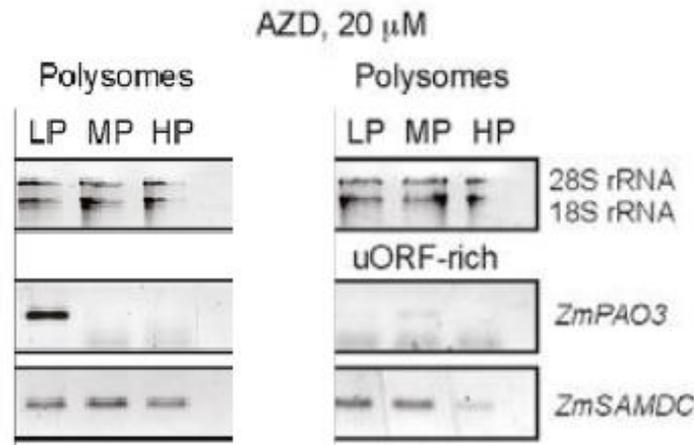


Figura 14. La traducción de *ZmPAO3* y *ZmSAMDC* muestra sensibilidad a la inhibición de TOR por AZD-8055. Polisomas de ejes embrionarios con 48 h de imbibición con 20 mM de AZD-8055 fueron sometidos a sedimentación por gradientes de densidad de sacarosa. Se muestran las fracciones de poliribosomas ligeros (LP), medianos (MP) y pesados (HP), la distribución de rRNA (18S y 28S) y la amplificación de transcritos (*ZmPAO3* y *ZmSAMDC*) a partir de cDNA de cada fracción por RT-PCR. Tomado de Salazar-Díaz et al. (2021).

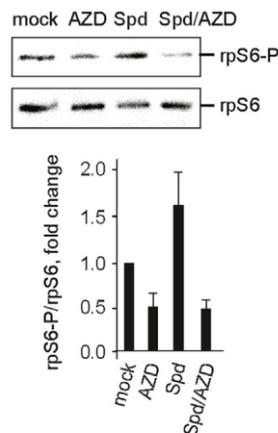


Figura 15. Efecto de espermidina sobre la actividad de TOR. Análisis por inmunoréplica de los niveles de rpS6 fosforilada (rpS6-P) y total (rpS6) en ejes embrionarios de semillas germinadas e imbibidas por 24 h en presencia de 0.1 mM espermidina sola (Spd) o con AZD-8055 (Spd/AZD) comparados con los controles de agua (mock) y 50 μ M de AZD-8055 (AZD). Tomado de Salazar-Díaz *et al.* (2021).

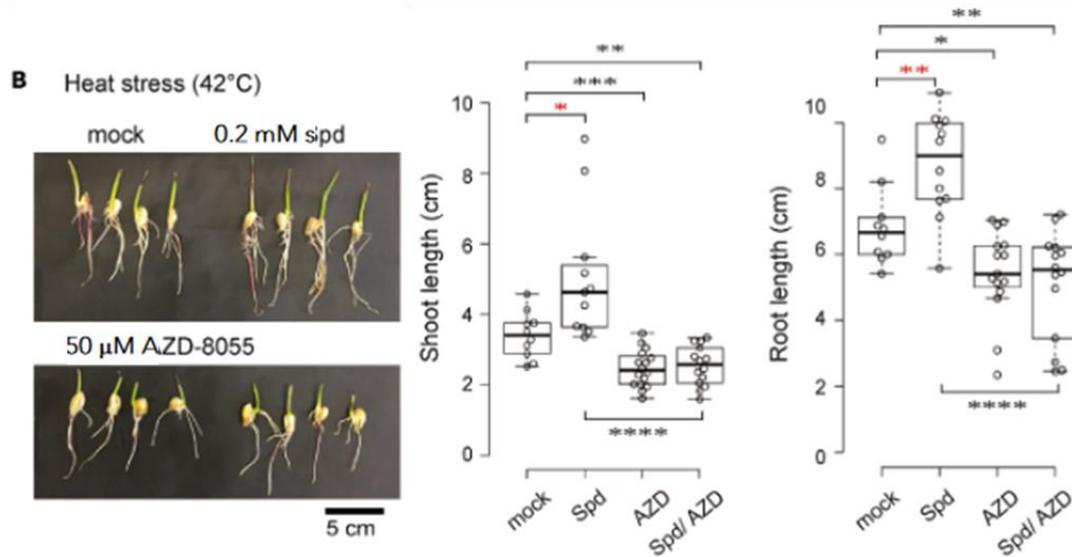


Figura 16. Efecto de espermidina en la respuesta a estrés por calor en maíz Chalqueño. Se muestran imágenes representativas de plántulas de maíz de 6 días que crecieron a 42 °C bajo fotoperiodo de día largo con agua (mock) o espermidina a 0.2 mM (Spd), en presencia o ausencia 50 μ M AZD-8055, así como las mediciones de longitud de coleoptilo y raíz primaria (n = 15). Tomado de Salazar-Díaz *et al.* (2021).

4. JUSTIFICACIÓN

El maíz (*Zea mays*) es un cultivo de interés económico en México y en el mundo, al ser el cereal más cultivado. Es utilizado para el consumo humano y de ganado, por lo cual es importante para la seguridad alimentaria de la población. Sin embargo, su producción ha disminuido a partir del 2017, en parte debido al aumento anual de la temperatura, ya que la germinación, el punto más crítico en el ciclo de vida de la planta, es susceptible al calor, que causa disminución en el contenido de agua de la semilla y estrés oxidativo. Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para responder ante el estrés abiótico. Por un lado, optimizan su energía para contender con el estrés y por otro regulan su crecimiento a la baja en espera de mejores condiciones. La producción de poliaminas en maíz puede aliviar el daño del estrés por calor. Recientemente, se ha reportado una conexión entre el regulador maestro TOR y la biosíntesis y degradación de poliaminas, lo que abre nuevas

perspectivas para el estudio de su actividad durante la respuesta a estrés. La fosforilación de proteínas río debajo de TOR, como la proteína cinasa S6K y su blanco, la proteína ribosomal S6 (rpS6), se han utilizado para evaluar el estado de activación de TOR. En plantas como un tomate silvestre (*Lycopersicon peruvianum*) y maíz (*Zea mays*) se reduce la fosforilación de rpS6 ante un estrés por calor. Sin embargo, tanto los niveles basales de actividad, como la extensión del efecto del estrés, pueden repercutir de manera diferencial en la respuesta óptima del crecimiento de la planta bajo condiciones adversas.

Para entender las bases moleculares que podrían determinar un balance adecuado entre crecimiento y tolerancia al estrés, es importante evaluar la relación entre cantidad total y fosforilación de rpS6, así como el efecto de espermidina en la respuesta a estrés por calor en variedades maíz adaptadas a diferentes condiciones climáticas.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es importante estudiar la respuesta ante estrés por calor en etapas tempranas de germinación en variedades de maíz mexicanas, sembradas ampliamente en el país y adaptadas a temperaturas distintas, para evaluar posibles diferencias en la respuesta molecular y fisiológica entre ellas y su relación con la tolerancia al estrés. Los cambios a nivel molecular inducidos por un choque térmico tienen repercusión sobre la germinación, crecimiento y rendimiento en cultivos de importancia económica como el maíz. Además, la relación entre la vía TOR y poliaminas, recientemente reportada en la respuesta a estrés por calor en maíz Chalqueño, debe explorarse a mayor profundidad para determinar si opera de manera similar en diferentes genotipos.

6. HIPÓTESIS

Habrà una respuesta diferencial a nivel fisiológico entre semillas de variedades mexicana de maíz adaptadas a clima contrastantes. Las semillas de la variedad adaptada a clima cálido presentarán una menor afectación en la relación entre la fosforilación y cantidad total de rpS6 ante el estrés por calor aplicado durante imbibición temprana, así como en su respuesta a la aplicación exógena de poliaminas, en comparación a las de la variedad de clima templado.

7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta fenotípica y molecular al choque térmico de dos variedades mexicanas de maíz adaptadas a crecer en condiciones climáticas contrastantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones experimentales que permitan evaluar las respuestas fenotípicas y moleculares al estrés por choque térmico, durante la germinación y el crecimiento de las dos variedades de semillas de maíz.
- Determinar los efectos de choque térmico sobre el crecimiento de plántulas de dos variedades mexicanas de maíz adaptadas a climas contrastantes.
- Evaluar de manera preliminar el efecto de la adición previa de espermidina sobre la respuesta a choque térmico en dos variedades mexicanas de maíz adaptadas a climas contrastantes.
- Analizar la presencia de HSP101, HSP70 y la relación entre la fosforilación y cantidad total de rpS6 en respuesta al choque térmico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 17 se representa el esquema general de trabajo que se siguió para abordar los objetivos del proyecto. Cabe mencionar que las condiciones fueron establecidas a partir de un análisis inicial con diferentes métodos de germinación y condiciones de choque térmico que permitieron definir este esquema.

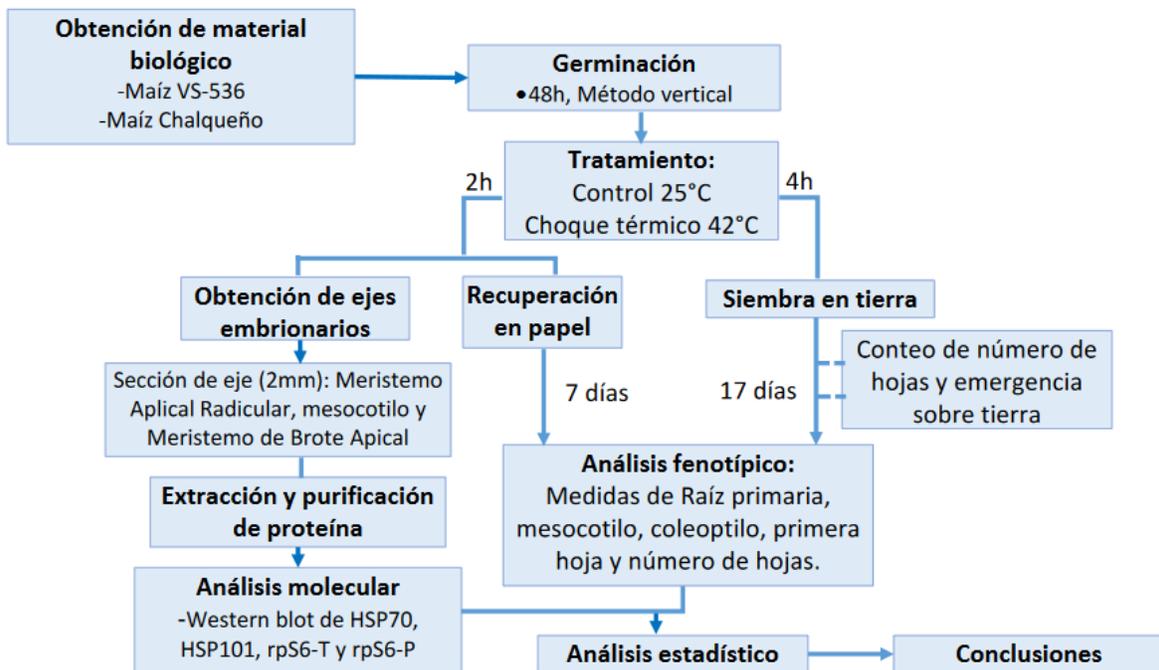


Figura 17. Diagrama de flujo de metodología a seguir en el trabajo experimental.

8.1. Obtención de material biológico.

Se compraron semillas de maíz VS-536 de la marca Proace (México), en Tuxtepec, Oaxaca, y semillas seleccionadas de maíz Chalqueño crecido en Chalco, Estado de México, con productores en un tianguis. Las cosechas fueron de 2021 para ambas variedades.

8.2. Desinfección de semillas

Las semillas se trataron con agua destilada estéril con hipoclorito de sodio a 0.325% (v/v) por 3 minutos en agitación a 180 rpm. Posteriormente se hicieron 5 lavados de 5 minutos c/u con agitación de 120 rpm. Todo el proceso se realizó en la oscuridad.

8.3. Imbibición de semillas y crecimiento de plántulas.

Se utilizó el método reportado por Crombez *et al.* (2016). Brevemente, se tomó una tira de papel toalla de 19.4 cm de ancho y 1.4 m de longitud, doblada a la mitad (9.7 cm de ancho) donde se distribuyeron 20 semillas con el embrión hacia arriba, dejando 7 cm entre cada semilla. El papel se enrolló envolviendo las semillas y se pegaron los extremos con cinta para evitar que se desenrollara. Varias réplicas de rollos se colocaron en vasos de 10 cm de diámetro y sobre cada rollo se vertieron lentamente 150 mL de agua destilada estéril. A las 48 horas de imbibición se seleccionaron 8 semillas germinadas con los ejes embrionarios de tamaño similar por cada rollo, a las cuales se les aplicó el choque térmico. Posteriormente, las semillas se incubaron a 25°C en la oscuridad para evitar estrés oxidativo adicional al del choque térmico, dejando 11 cm entre cada semilla y cambiando el agua diariamente por 50 mL de agua desionizada esteril por 7 días. Para evaluar el efecto del choque térmico sobre el crecimiento a períodos más largos, las semillas tratadas se sembraron en sustrato Sunshine mix 3 (Contiene Vermiculita, cal dolomítica, yeso y agente de humedecimiento), colocando 3 semillas por maceta de 12 cm de diámetro que se mantuvieron en invernadero bajo fotoperíodo y luz natural (horario de primavera-verano), por 3 semanas.

8.4. Análisis de efecto fenotípico de choque térmico y espermidina.

- **Aplicación de choque térmico**

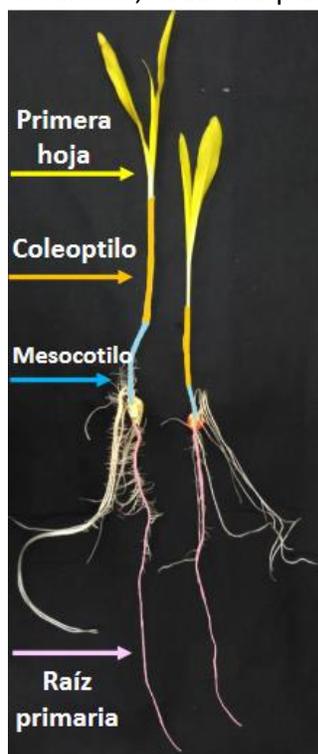
Se seleccionaron 8 semillas por grupo, con 3 grupos por tratamiento. Las semillas de maíz VS-536 seleccionadas fueron las que contaran con una radícula protruida de 0.1-0.5 cm, para maíz Chalqueño se seleccionaron semillas con una radícula protruida de 0.5-1.5 cm, lo cual corresponde al desarrollo normal para estas semillas bajo las condiciones de siembra utilizadas. Se colocaron las semillas en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se cubrieron con 40 mL de CaCl₂ 0.1 mm estéril. Los matraces se colocaron a 42°C en una incubadora con agitación de 70 rpm para el choque térmico, los controles se colocaron a 25° en un agitador a 70 rpm. El choque térmico fue de 2h para los experimentos de evaluación de 7 días de germinación, y de 4h para la evaluación a mediano plazo. La temperatura y tiempo del choque térmico se seleccionaron en base a temperaturas que se alcanzan en la época de siembra en el sureste del país y en los experimentos mostrados en la Figura A1 de Anexos.

- **Aplicación de espermidina exógena**

Los tratamientos con espermidina se modificaron a partir de la metodología utilizada por Salazar-Díaz *et al.* (2021) de la siguiente manera: A las 48 h de imbibición en agua, esta se cambió por una solución acuosa de Spd 0.1 mM por 24h adicionales en oscuridad; posteriormente se seleccionaron semillas con radículas de 3-4 cm para maíz VS-536 y 5.5-7 para en maíz Chalqueño. Esta diferencia es debida a que el crecimiento post-germinativo de las dos variedades no es igual. Las medidas corresponden al desarrollo promedio observado para cada una a los tiempos de imbibición indicados. Se aplicó el choque térmico y tiempo de recuperación mencionados previamente, y se tomaron las medidas de raíz primaria, mesocotilo, coleoptilo, primera hoja.

- **Evaluaciones a siete días de recuperación.**

Para analizar el efecto del choque térmico, a los siete días de recuperación a 25°C en oscuridad, todas las plantas de cada rollo se fotografiaron con una regla a un lado. La raíz



primaria se midió manualmente, mientras que el mesocotilo y resto de tejidos aéreos se midieron con el programa ImageJ. En la Figura 18, se muestran plántulas indicando los tejidos cuya longitud se midió: mesocotilo (azul) comprende desde el nodo escutelar al coleoptilar, coleoptilo (amarillo) desde el nodo coleoptilar a la primera hoja verdadera, raíz primaria (rosa) como la primera raíz seminal (Hanway, 1966 y Martínez-Becerra, 1973). Asimismo, se midió la longitud de la primera hoja.

El porcentaje de crecimiento de cada tejido en la condición con choque térmico con las plantas control se comparó mediante la siguiente fórmula:

Fórmula 1

$$\% \text{ reducción} = 100 - \frac{(\text{Medida en tratamiento})(100)}{\text{Promedio de medida en control}}$$

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, con la prueba de comparación múltiple Bonferroni como prueba Post hoc.

Figura 18. Plántulas a 7 días de recuperación.

Para las evaluaciones con espermidina, se registró el porcentaje de supervivencia, así como el porcentaje de plantas con 0, 1, 2 y

3 hojas extendidas.

Con las medidas de tejido se calcularon las veces de cambio entre plantas que fueron tratados con Spd o solo con agua, para esto se utilizaron las siguientes formulas:

Fórmula 2.
$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{Medida de planta con choque térmico} (100)}{\text{Medida de planta control}}$$

Fórmula 3.
$$\text{Veces de cambio} \frac{\text{Spd}}{\text{H2O}} = \frac{\% \text{ crecimiento Spd (fórmula 2)}}{\% \text{ crecimiento H2O (fórmula 2)}}$$

Los datos de medidas de tejidos, porcentaje de supervivencia y porcentaje de plantas por número de hojas se analizaron con un ANOVA de una vía con Fisher como prueba Post hoc en Minitab 17, y las veces de cambio con una prueba t-Student, utilizando el programa GraphPad Prism 8.

- **Evaluaciones en invernadero a mediano plazo.**

Para evaluar el efecto del choque térmico sobre crecimiento a períodos más largos, las semillas tratadas se sembraron en sustrato Sunshine mix 3, colocando 3 semillas por maceta de 12 cm de diámetro que se mantuvieron en invernadero bajo fotoperíodo y luz natural (horario de primavera-verano), por 3 semanas, regando cada 3 días con 70 mL de H₂O. Se registró su desarrollo a los 10, 15 y 21 días post imbibición. Se contó el porcentaje de plantas que emergen del sustrato, considerando solo plantas vivas, así como el número de hojas extendidas. A los 21 días, las plantas se fotografiaron, y se registraron medidas de raíz primaria y tejidos aéreos. Los datos se analizaron del mismo modo que para los siete días de recuperación en oscuridad.

8.5. Análisis de efecto molecular de choque térmico

- **Sección de ejes embrionarios para análisis molecular.**

Posterior al choque térmico, se extrajeron los ejes embrionarios de las semillas (n≥70) y de cada eje embrionario se obtuvieron 2 mm del Meristemo Apical Radicular (MAR), mesocotilo y del Meristemo de Brote Apical (MBA), como se muestra en la Figura 19. Estas secciones se almacenaron a -70 °C hasta la extracción de proteínas.

- **Extracción de proteína**

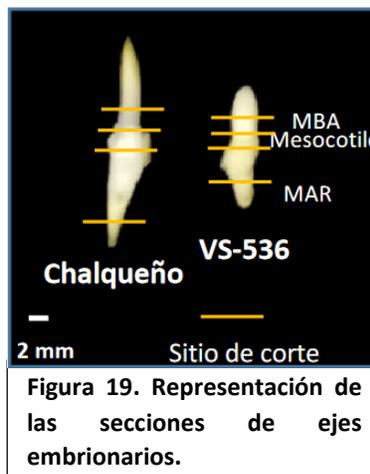
Se realizó la metodología utilizada por Salazar-Díaz *et al.* (2021) que se describe brevemente a continuación.

Se preparó un amortiguador de extracción con:

- 50 mM de HEPES pH 7.6
- 4 mM EDTA
- 20 mM EGTA
- 20 mM manitol

Se esterilizó por filtración y, a al momento de utilizar, se le agregó:

- 10 mM PMSF



- 1x de cocktail Inhibidor de fosfatasa "Halt Phosphatases" (Sigma)
- 1 tableta de Inhibidor de proteasas "Complete™ Roche Diagnostics libre de EDTA" por cada 10 mL de amortiguador.

Entre 0.4 y 1.2 g de material biológico se homogenizaron en un mortero usando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se agregó amortiguador de extracción en una proporción 1:3 (p/v). Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 40 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C.

- **Cuantificación de proteínas por método Bradford**

Se preparó un stock de BSA (albúmina sérica bovina) a 1 µg/µL a partir de uno de 10 µg/µL y solución Bradford 1x a partir de la solución stock Bradford 5x (Biorad).

Se realizó una curva patrón de BSA con la relación de soluciones que se muestra en la Tabla A1 de Anexos.

Para las muestras de proteína se agregaron 2 µL de muestra, 50 µL de solución Bradford y 198 µL de H₂O. Para el control de las muestras se agregó 2 µL de Amortiguador de extracción en lugar de muestra de proteínas.

Se realizó cada punto de la curva y muestras por triplicado, colocándolo en una placa ELISA (Por sus siglas en inglés de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) y leyendo a 595nm.

A partir de los datos obtenidos se obtuvo una gráfica de dispersión de concentración de BSA vs absorbancia, se obtuvo la ecuación de la recta y con ella se calculó la concentración de proteína en las muestras.

- **Electroforesis**

Para la electroforesis se prepararon geles con la sección del gel de separación al 12.5% y la sección del gel concentrador al 4%, ambos a pH de 8.8, de acuerdo a las instrucciones de la Tabla A2 de Anexos.

Sobre el gel separador se agregó isopropanol al 50 % durante su polimerización, este se retiró antes de agregar el gel concentrador.

En los geles se cargaron 5 µL de amortiguador de marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards Dual color de Bio-Rad, y para verificar la integridad de las proteínas se cargaron 15 µg por pozo, con 1x de amortiguador de corrida, el cual consiste de 5% β-Mercaptoetanol y 95% Buffer 2x Laemmli. Para realizar transferencias de proteína a membranas se cargaron 40 µg de proteína por pozo.

Los geles se resolvieron en un Mini-PROTEAN® Tetra cell de Bio-Rad, con amortiguador de corrida 1x Tris/Tricine/SDS Running Buffer de Bio-Rad, a un voltaje constante de 25 mA por gel.

Para la tinción los geles se fijaron por 15 minutos con una solución al 40% de etanol absoluto, 10% ácido acético y 50% H₂O desionizada, agitándose a 50 rpm. Se lavaron con H₂O desionizada, se les agregó Coomassie coloidal “QC Colloidal Coomassie Stain” de Bio-Rad por toda la noche y se hicieron 3 lavados con H₂O desionizada, el primero de una hora, el segundo de toda la noche y el tercero de un día, en agitación a 50 rpm.

Las imágenes se capturaron con un ChemiDoc.

- **Transferencia a membrana**

Las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilion™-P. Para esto, la membrana se sumergió en metanol absoluto, posteriormente en H₂O y finalmente en amortiguador de transferencia 1x Tris/Glicina SDS pH 8.3 de Bio-Rad, con 10% de metanol.

Para la transferencia se utilizó un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad, utilizando papel filtro y esponjas humedecidas en el buffer de transferencia y ensambladas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante toda la noche a 30 volts en un cuarto frío.

- **Inmuno detección**

Se prepararon un amortiguador de lavado con TBS 1x de Bio-Rad con 0.1% de tween20, y un amortiguador de bloqueo con buffer TBS 1x de Bio-Rad, 0.1% de tween20 y 5% de leche Svelty en polvo 0%.

Las membranas secas se activaron con metanol absoluto, posteriormente con H₂O y se equilibraron en amortiguador de lavado por 15 minutos en agitación a 50 rpm. Se bloquearon con 20 mL de solución de bloqueo por 2 horas en agitación a 50 rpm, luego se incubaron con 10 mL del anticuerpo primario en amortiguador de bloqueo durante toda la noche en agitación a 50 rpm a 4 °C. Las membranas se lavaron 3 veces con amortiguador de lavado por 10 minutos en agitación a 80 rpm, luego se añadió 10 mL del anticuerpo secundario en amortiguador de bloqueo por 1 hora en agitación a 50 rpm a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces del mismo modo que en el paso anterior y se incubaron 5 minutos en 5 mL de Clarity Western ECL Substrate de Bio-Rad.

Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 3 y sus diluciones en la Tabla 4.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Inmuno detección.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Proteína ribosomal S6 total (Anticuerpo policlonal derivado de <i>A. thaliana</i>) Agrisera	Anti-Rabbit IgG (H+L) acoplado a peroxidasa de rábano, Jackson ImmunoResearch
Proteína ribosomal 40S S61 fosforilada en serina 240 (rpS6-P240), Agrisera	

Proteína de choque térmico 70 HSP70 (Anticuerpo policlonal citoplásmico AS08 371 cruza con <i>A. thaliana</i> y <i>Z. mays</i>), Agrisera	
Proteína de choque térmico 101 HSP101 (Anticuerpo policlonal cruza con <i>Z. mays</i>), Sigma-Aldrich	

Tabla 4. Concentración de anticuerpos utilizados en Inmuno detección.

Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
Proteína ribosomal S6 total (rpS6-T)	1:2,000	Anti-Rabbit IgG (H+L) acoplado a peroxidasa de rábano	1:10,000
Proteína ribosomal fosforilada en serina 240 (rpS6-P240)	1:2,000		
Proteína de choque térmico 70 HSP70	1:10,000		
Proteína de choque térmico 101 HSP101	1:1,000		

Los datos de intensidad de obtuvieron por un análisis de bandas en ImageLab y se normalizaron con la membrana teñida con rojo de Ponceau. Para ver la actividad de TOR se dividió la intensidad de banda de rpS6-P240 entre la de rpS6-T. Se calcularon las veces de cambio (FC) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 4.} \quad \text{FC} = \frac{\frac{rpS6-P}{rpS6-T} \text{ en control}}{\frac{rpS6-P}{rpS6-T} \text{ en choque térmico}}$$

9. RESULTADOS

9.1. Condiciones basales de germinación de maíz VS-536 y Chalqueño.

Se utilizó el método de siembra vertical, con el cual no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de germinación a las 24h de imbibición entre las semillas de maíz Chalqueño y VS-536. Se observó un mayor porcentaje de germinación a las 48 y 72h de imbibición para VS-536 ($P \leq 0.5$ y $P \leq 0.01$, respectivamente), pero esta diferencia no fue significativa a las 96h de imbibición. A las 96 horas de imbibición, el maíz VS-536 alcanzó un porcentaje de germinación de $96.25 \pm 4.79\%$ y el maíz Chalqueño de $85 \pm 8.7\%$, más el maíz VS-536 se acercó a su germinación máxima a las 72h de imbibición, mientras que el Chalqueño hasta las 96h (Figura A2, Anexos). Esto sugiere una germinación más lenta para el maíz Chalqueño a tiempos intermedios de imbibición. Con estas mismas condiciones de germinación se continuaron los siguientes experimentos.

9.2. Efecto del choque térmico sobre el crecimiento de maíz VS-536 y Chalqueño.

9.2.1. Efecto del choque térmico a 7 días de recuperación en oscuridad.

Se evaluó el efecto del choque térmico sobre ambas variedades de maíz a corto plazo, y los resultados se muestran en la Figura 20.

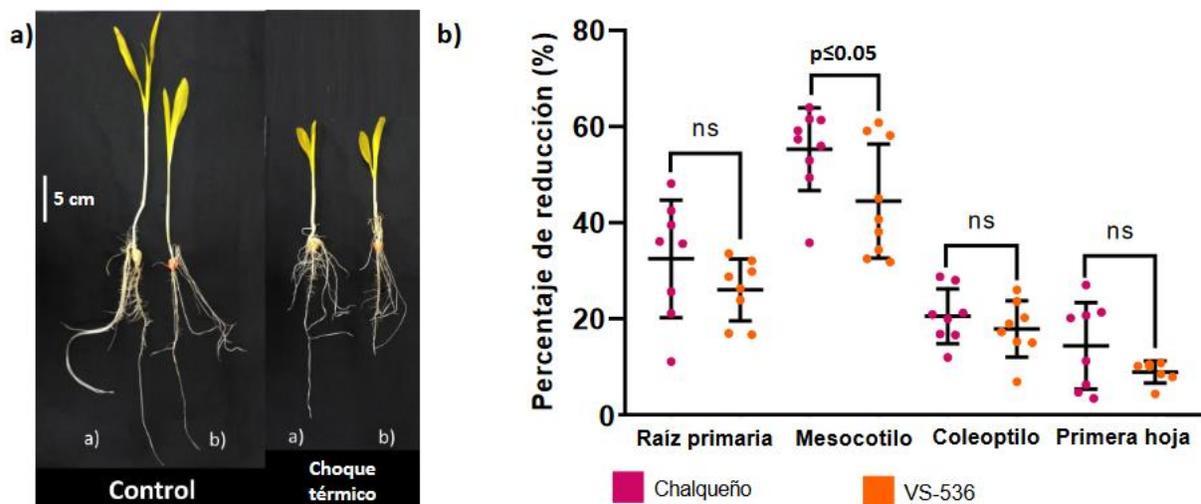


Figura 20. Efecto del choque térmico a 7 días de recuperación en maíz Chalqueño y VS-536. a) Imagen representativa plantas de c) maíz Chalqueño y d) VS-536 en condiciones control y choque térmico. b) Porcentaje de reducción de longitud de diferentes tejidos de plántulas en HS de maíz Chalqueño y VS-536; los datos mostrados en b) fueron calculados a partir de los datos presentados en la Figura A3 del Anexo. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. La comparación entre variedades se realizó utilizando la prueba t-Student.

Se evaluó la longitud de la raíz primaria, mesocotilo, coleoptilo y la primera hoja como se indica en la Figura 18, encontrando para todos los tejidos disminución en su longitud al aplicar el choque térmico, independientemente de la variedad de maíz (Figura A3, Anexos). Al comparar la reducción de crecimiento para cada tejido entre las variedades, se observó una mayor magnitud de cambio para el maíz Chalqueño (Figura 20), así como mayor variabilidad en la respuesta entre individuos, lo que resulta en una diferencia significativa solamente para la reducción del crecimiento del mesocotilo, que también resultó ser el tejido con mayor porcentaje de reducción en ambas variedades. A nivel cualitativo, es interesante notar que los tejidos aéreos del maíz Chalqueño muestran mayor crecimiento que VS-536 bajo condiciones control, mientras que después del choque térmico esta diferencia no se observa.

9.2.2. Efecto del choque térmico a mediano plazo.

Para observar el crecimiento en condiciones más similares a campo al colocar las plantas con sustrato y luz solar, además de para observar si el daño por el choque térmico se mantiene por un periodo prolongado, o la planta logra una recuperación parcial o total, se

evaluó un choque térmico similar al previo, pero manteniéndolo por 4h. Las plantas se recuperaron en invernadero y se evaluaron a los 10, 15 y 21 días de germinación.

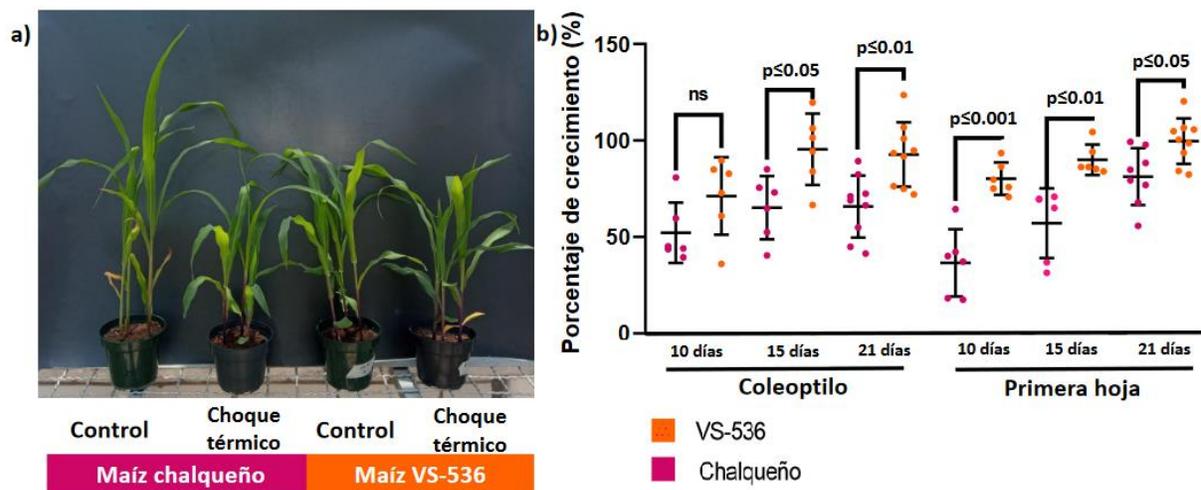


Figura 21. Efecto del choque térmico a mediano plazo en crecimiento de coleoptilo y primera hoja de maíz Chalqueño y VS-536. a) Imagen representativa de plantas de maíz Chalqueño y VS-536 en condiciones control y choque térmico. b) Porcentaje de crecimiento en longitud de diferentes tejidos de plántulas en HS de maíz Chalqueño y VS-536, respecto a plantas control; los datos mostrados en b) fueron calculados a partir de los datos presentados en la Figura A4 del Anexo. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. La comparación entre variedades se realizó utilizando la prueba t-Student.

En el maíz Chalqueño se observó una disminución del crecimiento del coleoptilo y primera hoja a todos los tiempos de evaluación (Figura A4, Anexos); sin embargo, el maíz VS-536 presentó menor reducción en sus medidas del coleoptilo a partir de los 15 días de germinación (Figura A4-a, Anexos), y no se observó reducción en el crecimiento de la primera hoja entre controles y plantas con choque térmico a 21 días de germinación (Figura A4-b, Anexos). Con estos datos fue evidente que a tiempos más prolongados el maíz VS-536 se recupera alcanzando a las plantas control, mientras que el daño para el maíz Chalqueño persiste. Además de esto, existe una diferencia entre los porcentajes de crecimiento en longitud del coleoptilo y la primera hoja de maíz sometido al choque térmico en comparación con las plantas del control (Figura 21) entre ambas variedades. En todas las evaluaciones de la primera hoja, el maíz Chalqueño mostró una mayor reducción en longitud por el choque térmico que el maíz VS-536, lo mismo se observó a partir de los 15 días de evaluación en el coleoptilo de la planta.

Continuando con la evaluación de daño a mediano plazo, se cuantificó el número de hojas extendidas y el porcentaje de supervivencia, estos resultados se observan en la Figura 22.

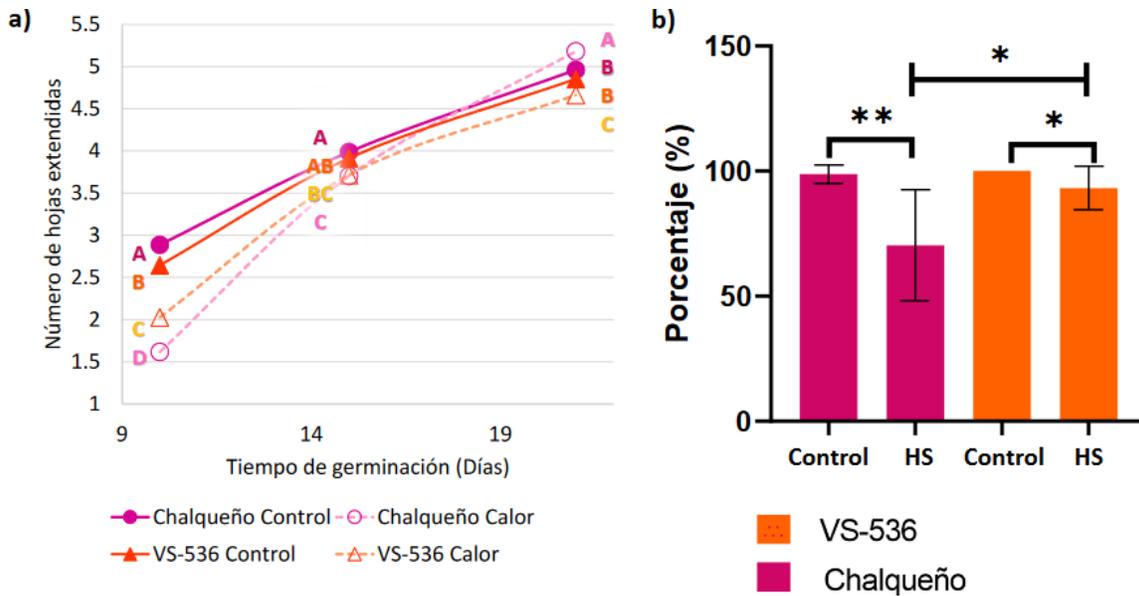


Figura 22. Efecto del choque térmico a mediano plazo sobre a) el número de hojas extendidas y b) porcentaje de supervivencia en plantas provenientes de semillas germinadas en condiciones control y con choque térmico (HS). $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. En a) se realizó una prueba ANOVA de una vía con Fisher como prueba *Post hoc*, con $p \leq 0.5$, donde letras diferentes representan diferencia significativa. En b) la comparación entre variedades se realizó utilizando la prueba t-Student, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

Si bien, al ser sometidas a choque térmico, las hojas de plantas de ambas variedades tardan más en expandirse, a 21 días de germinación solo el maíz VS-536 presentó menor número de hojas expandidas en plantas con choque térmico, mientras que el número de hojas expandidas de maíz Chalqueño es incluso mayor en plantas con choque térmico con respecto a las que no sufrieron este estrés (Figura 22, a). En cuanto a supervivencia, en ambas variedades disminuyó su porcentaje de supervivencia ante un choque térmico; sin embargo, el maíz Chalqueño se ve significativamente más afectado que el maíz VS-536 (Figura 22, b).

Con los resultados a mediano plazo se confirmó un mayor daño por choque térmico en el maíz Chalqueño que en el VS-536, además de que el daño sobre el crecimiento persiste por más tiempo. También se observó que, si bien se reduce el crecimiento de los tejidos, en el maíz Chalqueño no se afecta la expansión de hojas ya existentes en el eje embrionario durante la aplicación del choque térmico, pero sí se afecta para el maíz VS-536.

9.2.3. Efecto de espermidina sobre el fenotipo de plantas sometidas a choque térmico

Con base en los antecedentes sobre una potencial protección ante daño por calor con la aplicación de espermidina exógena a semillas de maíz (Salazar-Díaz, 2021), se realizaron

experimentos para evaluar el efecto de 0.1 mM de espermidina sobre la respuesta a choque térmico para las variedades Chalqueño y VS-536.

Se observó que para el maíz Chalqueño, agregar espermidina exógena aumenta la longitud de la raíz primaria, mientras que el maíz VS-536 presentó una disminución en la longitud de la raíz primaria, el mesocotilo y el coleoptilo de plantas sometidas a choque térmico a los 7 días de evaluación (Figura 23, a y b), sin embargo, debido a la gran variabilidad entre grupos y experimentos sería recomendable aumentar el número de repeticiones para tener datos más contundentes. Evaluando las veces de cambio entre plantas sometidas a choque térmico que fueron tratadas con espermidina, se observa que hubo una diferencia significativa entre variedades en la respuesta a espermidina para la raíz primaria y primera hoja (Figura 23, c), ya que el maíz Chalqueño se vio protegido, mientras que el VS-536 se vio afectado.

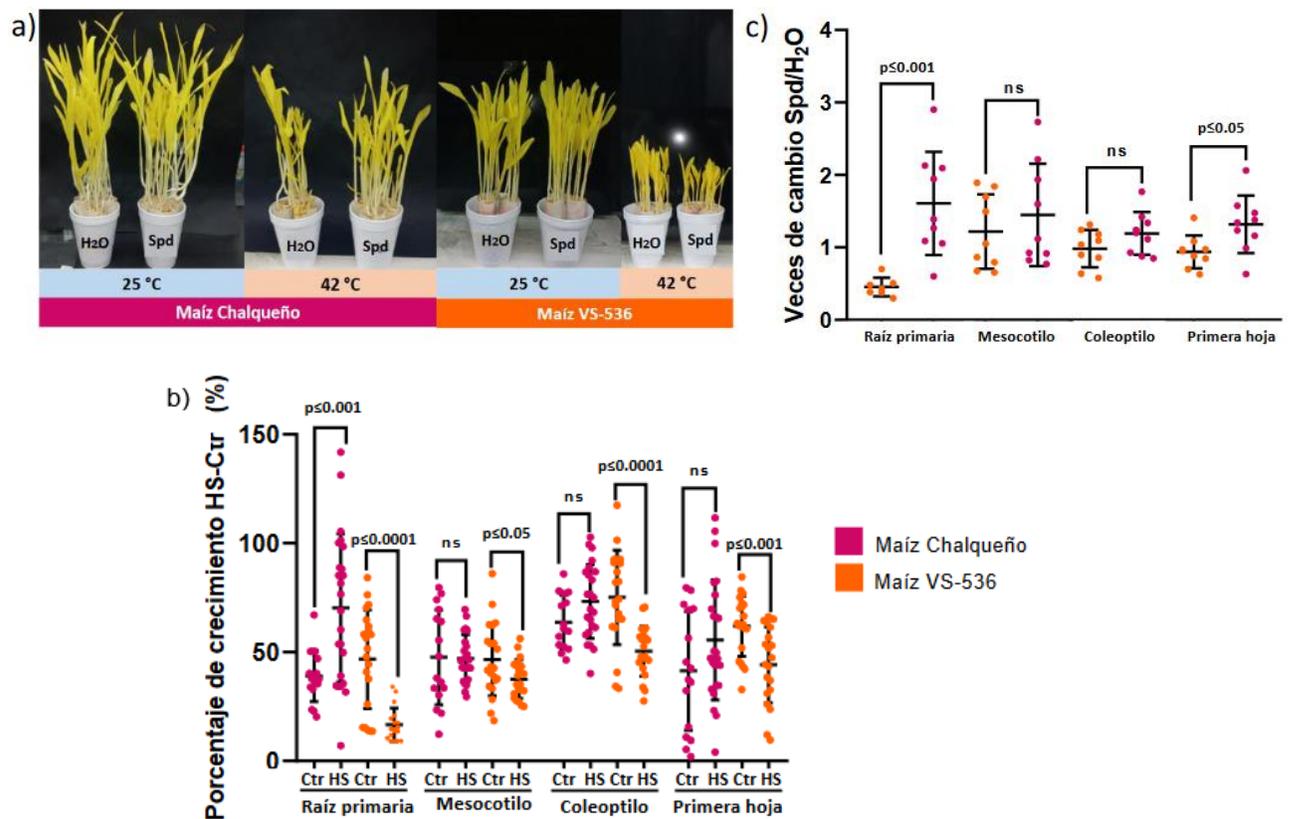


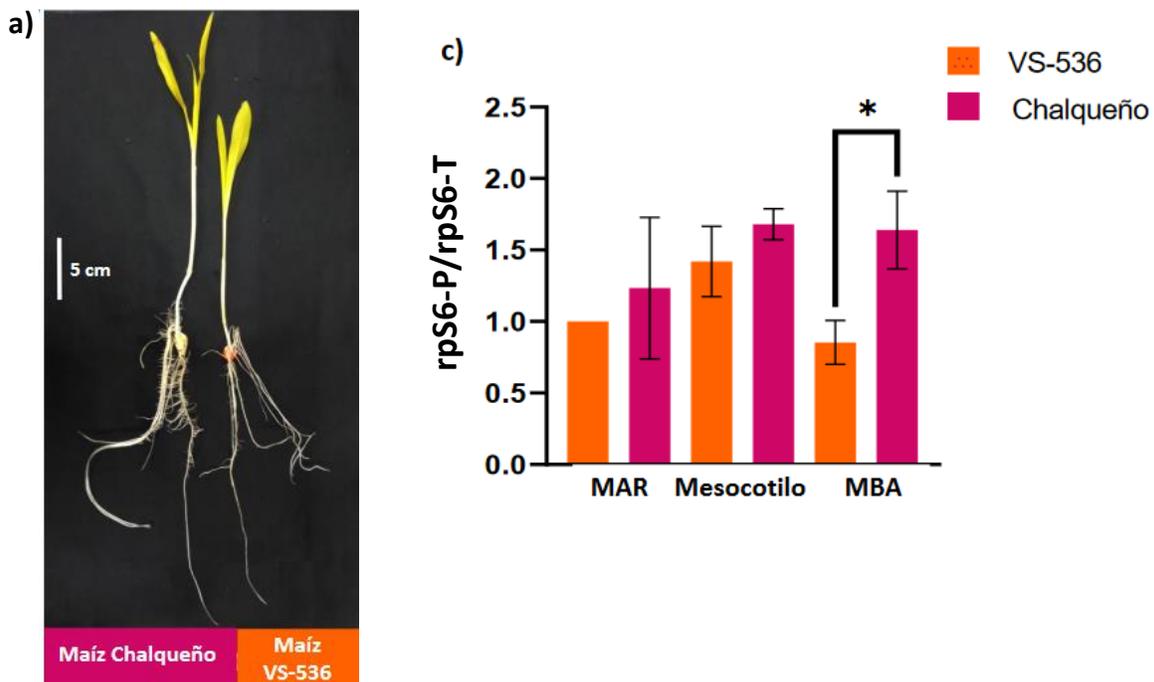
Figura 23. Efecto de espermidina sobre el fenotipo de plantas de maíz Chalqueño y VS-536 sometidas a choque térmico a los 7 días de recuperación en oscuridad. a) Imagen representativa de plantas de maíz Chalqueño y VS-536 en condiciones control y choque térmico, con y sin espermidina, b) Porcentaje de crecimiento de diferentes tejidos de plántulas de maíz Chalqueño y VS-536 con y sin espermidina ante choque térmico y c) Veces de cambio para la longitud de diferentes tejidos en presencia de espermidina y choque térmico. Los datos mostrados en b) fueron calculados a partir de los datos presentados en la Figura A5 del Anexo. $n \geq 60$, correspondiente a 3

réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. La comparación entre variedades se realizó utilizando la prueba t-Student.

Las evaluaciones a mediano plazo no mostraron los mismos resultados. Cualitativamente, se observó mayor crecimiento para plantas de maíz Chalqueño tratadas con espermidina y sometidas a choque térmico, mientras que las de maíz VS-536 mostraron menor crecimiento (Figura A6, Anexos). Sin embargo, la variación entre réplicas fue muy grande para Chalqueño, por lo que la diferencia no fue significativa, y la diferencia entre tratamientos para maíz VS-536 tampoco fue significativa (Figura A7, Anexos). A pesar de la falta de efecto estadísticamente significativo en las medidas de tejidos, la espermidina exógena sí causó un menor número de hojas expandidas en maíz Chalqueño ante choque térmico, así como un menor número de hojas expandidas en maíz VS-536, tanto en controles como en plantas sometidas al choque térmico (Figura A8, Anexos). También se afectó significativamente la supervivencia de plantas de maíz VS-536 sometidas a choque térmico, sin tener efecto en maíz Chalqueño (Figura A9, Anexos).

9.3. Respuesta a nivel molecular al choque térmico

Para evaluar la respuesta a nivel molecular se analizaron las proteínas de respuesta a choque térmico Hsp101 y Hsp70, así como los niveles de proteína total y fosforilada de la proteína ribosomal S6 (rpS6), que se ha reportado que responde a la actividad de la vía TOR durante la germinación y crecimiento temprano de la plántula. Dado que las variedades analizadas mostraron diferencias en el crecimiento de sus tejidos (Figura 24, a), se comenzó evaluando el nivel basal de rpS6 total y fosforilada en cada tejido (Figura 24, b-c).



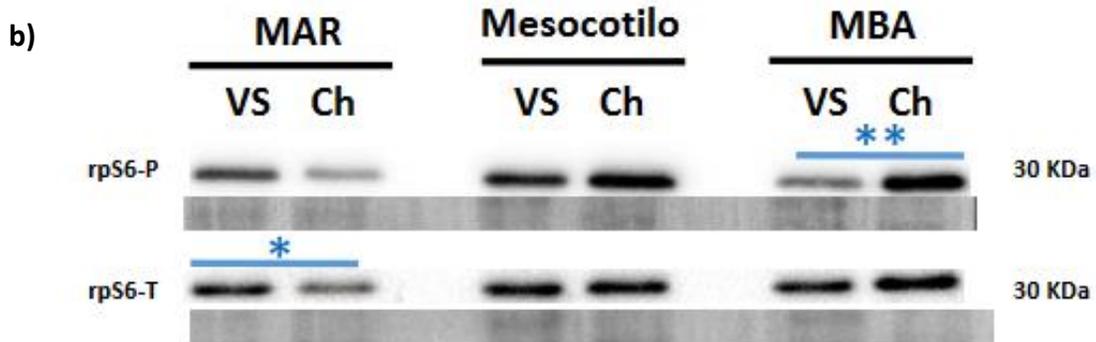


Figura 24. Comparación de los niveles basales de rpS6 total y fosforilada entre variedades. a) Imagen representativa de maíz VS-536 y Chalqueño crecidas bajo condiciones control a 9 días de germinación, b) Inmunoblot de rpS6-P y rpS6 total en meristemo apical radicular (MAR), mesocotilo y meristemo de brote apical (MBA) de maíz VS-536 y Chalqueño de ejes embrionarios embebidos por 48h bajo condiciones control y c) Relación rpS6-P/rpS6-T. Las densitometrías fueron normalizadas en membranas teñidas con Rojo Ponceau, las réplicas experimentales posteriores consideradas en el análisis estadístico se muestran en la Figura A10 de Anexos. La comparación entre variedades se realizó utilizando la prueba T-Student, $n \leq 3$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

El análisis de tres réplicas independientes con al menos 180 ejes embrionarios a las 48h de imbibición mostró que el meristemo apical radicular (MAR) presentó mayor cantidad basal de rpS6 (rpS6-T) respecto a la variedad Chalqueño, sin diferencia significativa en el mesocotilo o meristemo de brote apical (MBA). En cambio, se observaron niveles de fosforilación de rpS6 (rpS6-P) significativamente mayores en el MBA de maíz Chalqueño, sin diferencia en MAR o mesocotilo (Figura 24, b). Al obtener la relación promedio entre proteína fosforilada y total (rpS6-P/rpS6-T), para mostrar la activación de rpS6, se observó que rpS6 se encuentra mayoritariamente fosforilada en los meristemos del eje embrionario para ambas variedades, con mayor activación en el MBA de maíz Chalqueño (Figura 24, c). Esto podría corresponder con una mayor activación de TOR en este tejido y variedad y con el crecimiento observado en la Figura 24, a.

Posterior a esto, se evaluó el efecto del choque térmico en los mismos tejidos para rpS6, Hsp101 y Hsp70 (Figura 25). En este caso, las imágenes corresponden a membranas independientes por variedad, por lo que las intensidades de las bandas no se pueden comparar entre variedades.

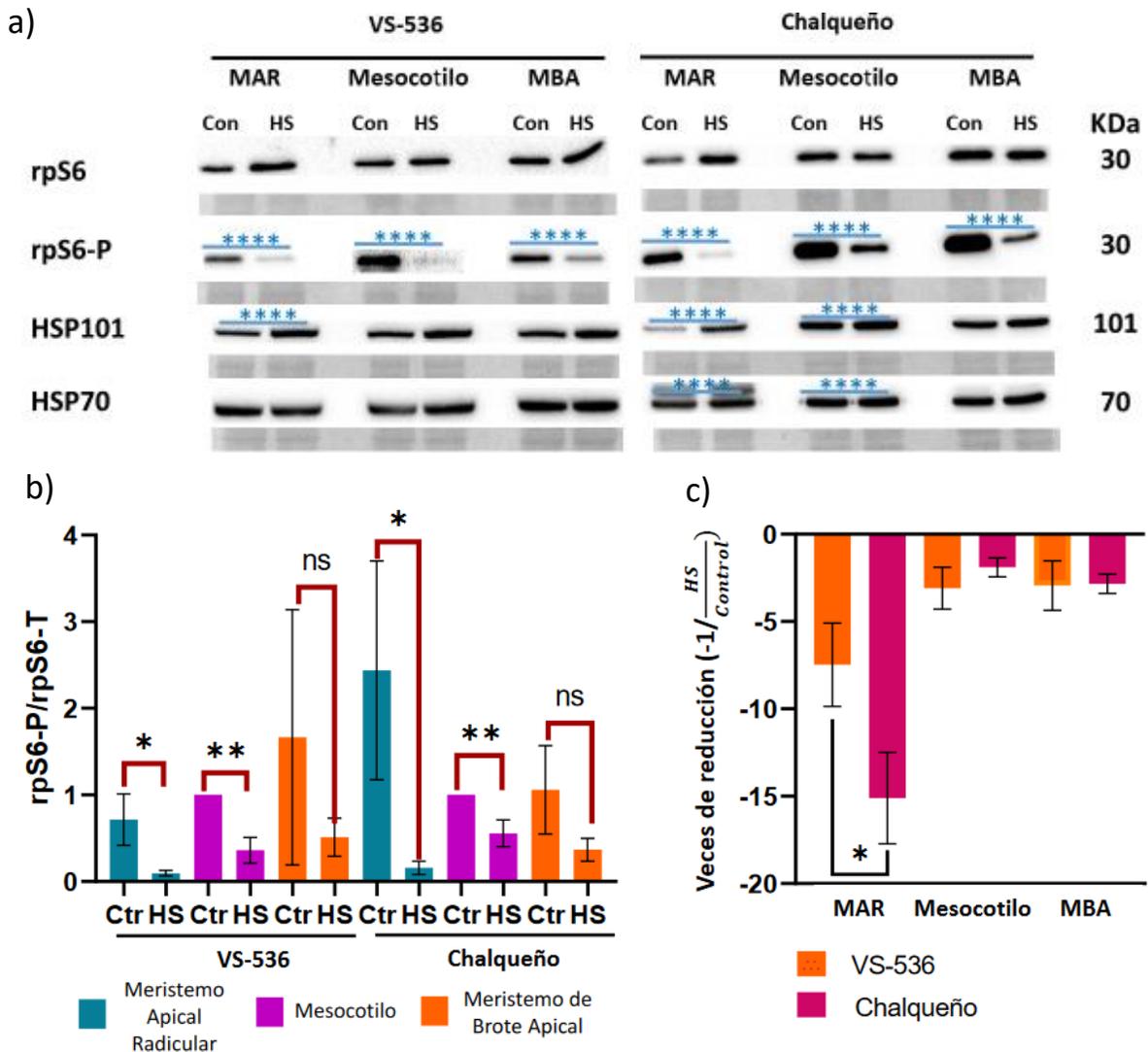


Figura 25. Análisis de proteínas en meristemo apical radicular (MAR), mesocotilo y meristemo de brote apical (MBA) de ejes de 48h tratados con choque térmico. A) Inmunoblot de rpS6-P, rpS6 total, HSP70 y HSP101 en tejidos de ejes embrionarios de maíz VS-536 y Chalqueño bajo condiciones control (Con) y con choque térmico (HS), b) Relación rpS6-P/rpS6 total y c) Veces de reducción de la relación rpS6-P/rpS6 total entre condiciones control con choque térmico. Las repeticiones de los inmunoblots se encuentran en las Figuras A11 y A12 de Anexos, las señales fueron analizadas mediante densitometría y normalizadas con la tinción de Rojo Ponceau que se encuentra en la Figura A13 de Anexos. La comparación entre tratamientos y variedades se realizó utilizando la prueba T-Student, $n \geq 3$ * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$; **** $P \leq 0.0001$. Los asteriscos corresponden a diferencias significativas en la señal de choque térmico (HS) vs control (Con).

Al considerar la desviación entre réplicas, los niveles totales de rpS6 no presentaron diferencias significativas entre las condiciones control y después de choque térmico para ningún tejido en ambas variedades de maíz. Sin embargo, hubo una disminución muy significativa en la fosforilación de rpS6 en la S240 después del choque térmico para todos los tejidos en ambas variedades. Esto coincide con las observaciones previas del laboratorio

para el maíz Chalqueño. De manera interesante, el aumento en los niveles de HSP101 con el choque térmico fue significativo para la radícula en ambas variedades y para el mesocotilo de maíz Chalqueño. Asimismo, el maíz Chalqueño mostró aumento significativo en la acumulación de HSP70 en su radícula y mesocotilo después del choque térmico, mientras que no hubo cambios en Hsp70, para los tejidos de VS-536 (Figura 25, a).

Para evaluar el estado de la actividad de rpS6, se obtuvo la relación entre niveles de rpS6 fosforilada y total. Dado que en todos los tejidos se observó una disminución de la fosforilación por choque térmico, se determinó si había diferencias significativas en esta reducción entre las dos variedades. Se encontró una disminución significativa en la activación de rpS6 ante el choque térmico para ambas variedades en MAR y mesocotilo. A pesar de la evidente reducción en la actividad de rpS6 en MBA (valores < 1 de la relación rpS6-P/rpS6-T), esta no fue significativa, mostrando una gran desviación en los controles.

De manera interesante, la relación rpS6-P/rpS6-T se vio mucho más afectada por el choque térmico en la radícula en ambas variedades. Al comparar las veces de reducción, se observó una diferencia significativa entre variedades en este tejido, donde el maíz Chalqueño resultó más afectado que el maíz VS-536 (Figura 25, c). Curiosamente, esto no coincide con el fenotipo observado a los 7 días después del choque térmico, donde la mayor afectación en crecimiento se observa en el mesocotilo. Esto puede implicar una regulación mucho más compleja para el crecimiento de cada tejido.

10. DISCUSIÓN

El constante aumento de población, así como el aumento y modificación los patrones de temperaturas anuales debido al cambio climático, llevan a la importancia de estudiar el efecto de altas temperaturas en distintos tipos de cultivos, sobre todo en uno tan importante para la alimentación mundial y la cultura de México como el maíz.

En este proyecto se evaluaron dos variedades mexicanas de maíz, el Chalqueño cosechado en el Valle de Chalco en el Estado de México, y el VS-536, cultivado en las zonas de Veracruz, Chiapas y norte de Oaxaca. En estas variedades, se observaron diferencias claras en las condiciones control: una germinación más rápida del maíz VS-536 (Figura A2, Anexos) y un mesocotilo más largo del maíz Chalqueño (Figura 20, a), característica que se ha seleccionado para siembra profunda en el centro y norte de México para permitir una mayor resistencia al estrés biótico y abiótico en etapas tempranas y aprovechar el agua del subsuelo en lugares menos húmedos (Niu *et al.*, 2019; Sáenz-Rodríguez y Cassab, 2021).

Se encontró un mayor efecto negativo del calor en maíz Chalqueño que en VS-536, el daño fue persistente en el Chalqueño, mientras que el VS-536 se recuperó después de 21 días de germinación (Figura 20 y 21). El mayor efecto del choque térmico sobre la viabilidad y el crecimiento de maíz Chalqueño puede explicarse en parte por su ciclo de siembra y la

temperatura que predomina durante el mismo. Esta variedad se cosecha en el periodo otoño-invierno en el Valle de Chalco, donde la temperatura máxima promedio en el mes de octubre de los últimos 10 años ha sido de 23 °C, sin picos máximos mayores a 25°C; por su parte, el maíz VS-536 se cosecha en el periodo Primavera-Verano en el sur de Veracruz y norte de Oaxaca y Chiapas, donde la temperatura máxima promedio en los meses de abril y mayo de los últimos 10 años ha sido de 36 °C, con picos máximos constantes que varían año con año entre 38 y 44°C, con tendencia a aumentar en años recientes (Diebel *et al.*, 2023).

Un factor poco considerado, pero importante para el comportamiento de una planta son los efectos ambientales sobre la herencia materna, fenómeno por el cual el ambiente en el que crece una planta parental influye en el fenotipo de la progenie al afectar su plasticidad fenotípica, pero sin afectar al genotipo (Donohue, 2009; Vivas, *et al.*, 2020). A pesar de que se conocen los efectos maternos desde hace décadas, los mecanismos genéticos subyacentes son poco comprendidos y los efectos son poco predecibles, no ocurren bajo todas las condiciones, pueden ser positivos o negativos sobre la progenie y no son necesariamente aditivos con más de un estrés. Se ha observado que afectan la germinación, tiempo de dormancia, vigor, biomasa, resistencia a estrés biótico y abiótico como sequía y salinidad (Aycan *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Donohue, 2009; Latzel *et al.*, 2021; Matzrafi *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2021; Vivas *et al.*, 2013; Vivas *et al.*, 2020). Debido a los antecedentes de esos efectos ambientales sobre la herencia materna, además de que el maíz VS-536 cuyas plantas parentales se exponen a estrés por calor de manera natural durante su siembra tuvieron menor daño por el choque térmico, se cree que estos efectos podrían estar influyendo, mas es necesario estudiar generaciones posteriores para confirmarlo.

El maíz Chalqueño no solo se vio más afectado que el VS-536 por el choque térmico, sino que además se vio más afectado específicamente en el crecimiento del mesocotilo (Figura 21, b), tejido particularmente importante porque, como se mencionó previamente, el maíz Chalqueño se siembra a profundidad mientras que el VS-536 es de siembra superficial, por lo cual la disminución en el crecimiento de mesocotilo afectaría menos al maíz VS-536 en condiciones de campo.

Es interesante notar que el único parámetro que no se vio afectado por el choque térmico para el maíz Chalqueño, o incluso fue beneficiado a mediano plazo, fue el número de hojas extendidas (Figura 22, a). Se afectó el crecimiento de las hojas, ya que la longitud de la primera hoja sí disminuyó con el choque térmico, pero no su capacidad de expandirse, ya que las primeras 5 o 6 hojas se encuentran formadas en el embrión maduro en el momento que se aplica el choque térmico (Kiesselbach, 1949; Liu *et al.*, 2013). Entre los factores adicionales que podrían estar involucrados en la capacidad de expandirse de las hojas previamente formadas en el eje son los brasinosteroides, ya que después de la formación de las hojas los genes de su biosíntesis se encuentran sobreexpresados previamente a la

expansión. Estas fitohormonas promueven la expansión celular y diferenciación vascular, pero también pueden estar involucrados el jasmonato, el ácido salicílico, productos de genes de la fotosíntesis como RuBisCO, el factor de transcripción ABI5, que regula la transición entre germinación y crecimiento vegetativo en respuesta a ácido abscísico, receptores putativos de citocininas AHK que funcionan como reguladores del desarrollo de tejido vascular del tallo y el receptor putativo de auxinas TIR1 (Liu *et al.*, 2013).

Contrario a lo esperado por reportes previos en maíz Chalqueño (Salazar-Díaz, 2021) que indicaron un efecto positivo de la espermidina para aliviar el daño del estrés por calor, en este proyecto solo se observó un efecto benéfico de la poliamina a corto plazo, mientras que los resultados no fueron concluyentes a mediano plazo (Figura 23, A6-A10). El resultado puede diferir del trabajo previo ya que previamente se había utilizado un estrés por calor constante en lugar de un choque térmico, y ambos representan un tipo de estrés distinto, que pueden requerir mecanismos de respuesta diferentes (Bokszczanin, 2013; Clarke *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2009; Hughes, 2021; Nieto-Soletto *et al.*, 2002).

De forma notoria, se observó un efecto diferente en magnitud y sentido de la espermidina sobre el maíz VS-536. Su crecimiento se vio afectado negativamente de manera importante a corto plazo por la espermidina al aplicar un choque térmico, ya que las plantas sometidas a choque térmico y tratamiento con espermidina presentaron menor longitud de raíz primaria, coleoptilo y primera hoja, en comparación a las que no se trataron con espermidina (Figura 23). Diferencias importantes en el comportamiento de ambas variedades podrían deberse a distintos niveles basales de poliaminas que lleven a distintos niveles de tolerancia a la misma. Se han reportado distintos niveles endógenos de poliaminas en semillas de maíz dependientes del genotipo y del ambiente en el cual se cultivan, si bien no se encontraron reportes de niveles endógenos de espermidina en maíz VS-536, si se cuentan con reportes para el maíz Tuxpeño, altamente relacionado con el maíz VS-536 (Sierra-Macías *et al.*, 2016) y el maíz Compuesto Universal, que es una variedad de Toluca de maíz Chalqueño que se siembra a gran altura sobre el nivel del mar. Estos reportes indican 2 veces mayor contenido de espermidina en el eje maduro de maíz Compuesto Universal que en el eje maduro del maíz Tuxpeño (Sepúlveda y Sánchez de Jiménez, 1988), también se ha reportado diferencia en contenido de espermidina endógena entre variedades de maíz relacionada con la cantidad de proteína en ejes y con velocidad de germinación (Anguillesi *et al.*, 1982), esto último podría sugerir una potencial mayor cantidad endógena de espermidina en maíz VS-536, que en maíz Chalqueño al tener una germinación más rápida (Anguillesi *et al.*, 1982), sin una previa cuantificación, no se puede saber si alguna de las variedades estudiadas tiene mayor contenido endógeno de espermidina. Una cantidad endógena de espermidina distinta entre variedades, podría explicar un comportamiento distinto ante la aplicación exógena, ya que sus tolerancias a la misma podrían ser distintas. Cabe mencionar que la biosíntesis de poliaminas complejas como la espermidina se encuentra estrictamente regulada en las semillas y no suele aumentar a menos de que se necesite para responder a un estrés, esto debido a que la

acumulación de altas concentraciones de poliaminas en el SAM son tóxicas para la planta (Wimalasekera *et al.*, 2011), ya que en su posterior catabolismo producen especies reactivas de oxígeno, que en cantidades pequeñas funcionan como señalizadores, pero en cantidades altas, causan estrés oxidativo y toxicidad (Liu *et al.*, 2015), además de afectar interacciones proteína-proteína y DNA-proteína (Thomas y Thomas, 2001).

A nivel molecular, se puede decir que el tejido más sensible al choque térmico en el eje embrionario imbibido por 48h, fue el meristemo apical radicular. Este tejido mostró la mayor disminución en la fosforilación de rpS6 y también el incremento más significativo de Hsp101 en ambas variedades de maíz (Figura 25). Si bien la radícula no es el tejido más afectado de manera fenotípica, si es consistente con un alto porcentaje de reducción de crecimiento a 7 días de recuperación (Figura 20), de 32.47% para maíz Chalqueño y 26% en maíz VS-536, esta disminución en la longitud podría llevar en problemas para el establecimiento, la absorción de nutrientes y agua (Ramson, 2020). Que haya un efecto importante en radícula puede explicarse por la alta acumulación de auxinas que promueven la actividad de la ruta TOR en la zona meristemática en este tejido (Martínez *et al.*, 2021; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009). Además, este tejido es sensible a estrés, ya que la ruta TOR afecta la fosforilación de rpS6. Sin embargo, las diferencias inherentes al genotipo son interesantes y novedosas, constituyendo un punto de partida para evaluar posibles diferencias en la acumulación de fitohormonas entre variedades y tejidos. Es conocido que las auxinas también se acumulan en los meristemos aéreos, pero el efecto del choque térmico sobre la fosforilación de rpS6 en este tejido es pequeño en comparación al observado en la radícula. Es posible que el balance con otras fitohormonas como citocininas y ABA juegue un rol importante en la regulación diferencial de TOR por estrés entre tejidos (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009).

En la comparación entre variedades se observó mayor acumulación basal de rpS6 en el meristemo apical radicular de maíz VS-536 respecto al maíz Chalqueño, así como una mayor relación rpS6-P/rpS6-T en Chalqueño que en VS-536 (Figura 24). La mayor acumulación basal en radícula de VS-536 es consistente con una emergencia de la radícula más rápida (Figura A2, Anexos), mas no con una mayor longitud de radícula (Figura A3, Anexos). La aparente mayor activación basal de rpS6 en meristemo de brote apical de maíz Chalqueño, es consistente con el mayor crecimiento del coleoptilo y la primera hoja de este maíz, que el de VS-536 (Figura 24-b y A4 Anexos). No se puede establecer una relación directa entre activación de rpS6 en mesocotilo y su crecimiento, ya que hay una mayor longitud en el mesocotilo del maíz Chalqueño que en maíz VS-536 (Figura A3, Anexos), mas no se observaron cambios a nivel molecular entre variedades en este tejido (Figura 24). También es importante el incremento observado para Hsp101 y Hsp70 en mesocotilo para Chalqueño, pero no para VS-536, porque indica varios cambios para este tejido en la variedad más sensible al calor (Figura 25). Cabe mencionar que las medidas de longitud en los tejidos y los análisis moleculares corresponden a tiempos distintos después del choque

térmico, por lo cual podrían haber intervenido factores adicionales en el crecimiento post-estrés de los tejidos a los tiempos de medición.

Las plantas necesitan un equilibrio entre crecimiento y respuesta a estrés para poder aprovechar sus recursos de la mejor manera, esto puede verse de manera clara en la actividad de SnRK1 y TOR (Zhang *et al.*, 2020) y es consistente con lo que se observó en esta investigación, donde la variedad VS-536, cuyo crecimiento en condiciones control es menor que el de maíz Chalqueño, aunque puede soportar mejor el estrés por calor. Sin embargo, aún se cuenta con información necesaria para unirlo de manera directa con esas vías de regulación. Para contar con un panorama más completo, es necesario a futuro observar diferencias entre las mismas variedades al inhibir la ruta de TOR de manera específica, así como cuantificar la activación de SnRK1 y algunas ciclinas del ciclo celular. Para tener un modelo más robusto, también deberían investigarse respuestas a choque térmico en otras variedades mexicanas de maíz con distintos fenotipos, en condiciones control y la respuesta a distintos tipos de estreses, para observar si se ajustan al modelo observado hasta el momento. Otra cosa que sería parece importante, es observar el efecto de este choque térmico inicial sobre la progenie de las plantas, para determinar si el efecto materno si existe en estas variedades, si es un factor importante en la mayor resistencia a choque térmico de maíz VS-536 y si existe un potencial para que pudiera aumentar la resistencia de otras variedades altamente productivas, pero poco resistentes a este estrés, como el maíz Chalqueño.

11. CONCLUSIONES

La aplicación de choque térmico (42°C por 2 h) durante la imbibición temprana de semillas de maíz afecta significativamente el crecimiento de los tejidos de plántula en proceso de establecimiento, tanto para la variedad de maíz adaptada a clima templado, Chalqueño, como para la adaptada a clima cálido, VS-536. Sin embargo, el grado de afectación depende del tejido y del genotipo.

El desarrollo del mesocotilo es fundamental para el establecimiento de la plántula de maíz. Al ser el tejido que resulta más afectado negativamente en su crecimiento por el choque térmico, y en mayor medida para Chalqueño adaptado a clima templado, sugiere que los mecanismos de termotolerancia del mesocotilo difieren con respecto a los mecanismos presentes en otros tejidos y dependen del genotipo de maíz.

La inhibición del crecimiento en tejidos aéreos debida al choque térmico aplicado a 48 h de imbibición de la semilla se observa por tiempos más prolongados en la variedad Chalqueño, además de afectar en mayor medida su supervivencia respecto a VS-536. Esto sugiere una menor termotolerancia basal para Chalqueño y posibles afectaciones en el rendimiento al enfrentarse a temperaturas elevadas en etapas tempranas de su siembra.

Aunque la espermidina es una molécula necesaria para el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés en las plantas, el efecto su aplicación exógena resulta contrastante para la respuesta a choque térmico a corto plazo en diferentes genotipos de maíz. Mientras el crecimiento de maíz Chalqueño se afecta menos por choque térmico en presencia de espermidina, para el maíz VS-536 se afecta más, con diferencias significativas en raíz primaria y coleoptilo.

La actividad de la proteína ribosomal S6, evaluada mediante sus niveles de fosforilación, es mayor en el meristemo de brote apical del maíz Chalqueño y en el meristemo apical radicular de maíz VS-536, lo cual resulta consistente con mayor crecimiento de tejidos aéreos en Chalqueño y una germinación más rápida de maíz VS-536. Hasta el momento, los datos apoyan la hipótesis planteada en el proyecto, de que la relación entre la fosforilación y cantidad total de rpS6 se ve menos afectada por el choque térmico en la variedad con mayor tolerancia al calor (VS-536). Sin embargo, para esto es importante hacer una inhibición específica de la ruta TOR, que permita evaluar si la disminución de la activación de rpS6 realmente se debe a TOR.

12. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de inhibidores específicos de TOR para poder relacionar de manera directa la disminución de activación de rpS6 con la actividad de TOR.
- Medir concentraciones basales de espermidina en semillas de maíz Chalqueño y VS-536 para observar la importancia de estos niveles en las respuestas a estrés.
- Observar el efecto de aplicación exógena de espermidina sobre la actividad de TOR basal de ambas variedades de maíz y para determinar si existen diferencias.
- Analizar las diferencias en respuesta ante distintos estreses abióticos de ambas variedades de maíz, como a déficit de nutrientes o frío para determinar si existe diferencia entre genotipos.
- Observar las respuestas a estrés en distintas variedades de maíz adaptadas a clima tropical, con siembra a baja altura sobre nivel del mar y clima templado, sembradas a gran altura sobre el nivel del mar para determinar si el contraste de respuestas se conserva.

13. LITERATURA CONSULTADA

1. Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. (2018). Maíz grano cultivo representativo de México. Recuperado a 27 de agosto de 2021 de <https://www.gob.mx/aserca/articulos/maíz-grano-cultivo-representativo-de-mexico?idiom=es>
2. Agredano-Moreno, L., Reyes, H., Martínez-Castilla, L. y Sánchez, E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular BioSystems*, 3(11), 794-802. DOI: 10.1039/b705803a
3. Alcázar, R., Bueno, M. y Tiburcio, A. (2020). Polyamines: Small Amines with Large Effects on Plant Abiotic Stress Tolerance. *Cells*, 9(11), 2373-2393. DOI: 10.3390/cells9112373
4. An, Z., Li, C., Zhang, L. y Alva, A. (2012) Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays* L.) response to drought stress. *South African Journal of Botany*. 83, 145-150. DOI: 10.1016/j.sajb.2012.08.009.
5. Anguillesi, M.C., Grilli, I., y Floris, C. (1982). Polyamines and protein metabolism in maize inbreds differing in seed protein content. *Journal of experimental botany*, 33(136), 1014-1020.
6. Aycan, M., Baslam, M., Ozdemir, B., Asiloglu, R., Mitsui, T., y Yildiz, M. (2021). Direct contribution of the maternal genotype on the transgenerational salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 192, 104648. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104648
7. Balderas-Hernández, V.E., Alvarado-Rodríguez, M. y Fraire-Velázquez, S. (2013). Conserved versatile master regulators in signalling pathways in response to stress in plants. *Journal for Plant Sciences*, 5(33), 1-19. DOI: 10.1093/aobpla/plt033
8. Ben-Ari, G. y Lavi, U. (2012). Marker-assisted selection in plant breeding. *Biotechnology and Agriculture*, 11, 163-184. DOI: 10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0
9. Bokszczanin, K. (2013) Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant science*, 4(1), 1-20. DOI: 10.3389/fpls.2013.00315
10. Bowne, J., Bacic, A., Tester, M. y Roessner, U. (2011). Abiotic Stress and Metabolomics. *Annual Plant Reviews Volume 43*, 61–85. DOI: 10.1002/9781444339956.ch3
11. Calderón-Valencia, K. (2020). Regulación de la ruta de señalización por TOR durante la germinación de maíz en respuesta a estrés y auxinas [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
12. Chen, D., Yuan, Z., Wei, Z., y Hu, X. (2022). Effect of maternal environment on seed germination and seed yield components of *Thlaspi arvense*. *Industrial Crops and Products*, 181, DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114790

13. Cho, Y.H., Hong, J.W., Kim, E.C., y Yoo, S.D. (2012). Regulatory Functions of SnRK1 in Stress-Responsive Gene Expression and in Plant Growth and Development. *Plant Physiology*, 158, 1955-1964. DOI: 10.1104/pp.111.189829
14. Clarke, S. M., Cristescu, S. M., Miersch, O., Harren, F., Wasternack, C., y Mur, L. (2009). Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist*, 182(1), 175–187. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02735.x
15. Clarke, S. M., Mur, L. A., Wood, J. E., y Scott, I. M. (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 38(3), 432–447. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02054.x
16. CONABIO. (2020). Cónico. México: CONABIO. Consultado a 3 de octubre de 2021 en <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-conico/conico>
17. CONABIO. (2021). Chalqueño. México: CONABIO. Consultado a 3 de octubre de 2021 en <http://www.biodiversidad.gob.mx:9999/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-conico/chalqueno>
18. Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11(1), 163. DOI: 10.1186/1471-2229-11-163
19. Crombez, H., Roberts, I., Vangheluwe, N., Motte, H., Jansen, L., Beeckman, T., & Parizot, B. (2016) Lateral Root Inducible System in *Arabidopsis* and Maize. *Journal of Visualized Experiments*. 107, e53481.
20. Dai-Ve, L., Gevaert, K. y De-Smet, I. (2019). Feeling the Heat: Searching for Plant Thermosensors. *Trends in Plant Science*, 24(3), 210-220. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.11.004.
21. Diebel, J., Norda, J., Kretchmer, O. y Kretchmer, J. (2023). Weather Spark. United States: Cedar Lake Ventures Inc. <https://weatherspark.com>
22. Dinkova, T., Reyes, H., García-Flores, C., Aguilar, R., Jiménez-García, L., y Sánchez, E. (2007). Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: Relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum*, 130(1), 1-10. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00862.x
23. Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M., Schepetilnikov, M., Chicher, J., Langella, O., Zivy, M., Robaglia, C., Ryabova, L.A., Hanson, J., Meyer, C. (2016). The *Arabidopsis* TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Frontiers in Plant Science*, 7(1611). DOI: 10.3389/fpls.2016.01611

24. Donohue, K. (2009). Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1520), 1059–1074. DOI: 10.1098/rstb.2008.0291
25. Esperk, T., Kjærsgaard, A., Walters, R.J., Berger, D. y Blanckenhorn, W.U. (2016). Plastic and evolutionary responses to heat stress in a temperate dung fly: negative correlation between basal and induced heat tolerance?. *Journal of Evolutionary Biology*, 29, 900-915. DOI: 10.1111/jeb.1283
26. FAO. (2020). México en una mirada. Recuperado a 20 de septiembre de 2020 de <http://www.fao.org/mexico/fao-en-mexico/mexico-en-una-mirada/es/>
27. Firmansyah, F. y Argosubekti, N. (2020). A review of heat stress signaling in plants. A review of heat stress signaling in plants, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 481(1), 1-11. DOI: 10.1088/1755-1315/484/1/012041.
28. Gamarnik, A. y Frydman, R.B. (1991) Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiology*. 97, 778-785. DOI: 10.1104/pp.97.2.778
29. Gao, C., Sheteiwy, M., Han, J., Dong, Z., Pan, R., Guan, Y., Alhaj, Y., y Hu, J. (2020). Polyamine biosynthetic pathways and their relation with the cold tolerance of maíz (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signaling and Behavior*. 15(11), 1-10. DOI: 10.1080/15592324.2020.1807722.
30. García Flores, C., Aguilar, R., Reyes De La Cruz, H., Albores, M. y Sánchez De Jiménez, E. (2001). A maíz insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal*, 358(1), 95. DOI: 10.1042/0264-6021:3580095
31. González-Huerta, A., Vázquez-García, L., Sahagún-Castellanos, J., Rodríguez-Pérez, J., y Pérez-López, D. (2007). Rendimiento del maíz de temporal y su relación con la pudrición de mazorca. *Agricultura técnica en México*, 33(1), 33-42. Consultado a 1 de octubre de 2021 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172007000100004&lng=es&tlng=es.
32. Hanway, J. (1996). How a Corn Plant Develops. Iowa State University Cooperative Extension Special Report No. 48. Ames, IA.
33. Hayes, S., Schachtschabe, J., Mishkind, M., Munnik, T. y Arisz, S. (2020). Hot topic: Thermosensing in plants. *Plant, Cell & Environment*, 44(7), 1987-2439. DOI: 10.1111/pce.13979.
34. He, M., He, C. Q. y Ding, N. Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771-1789. DOI: 10.3389/fpls.2018.01771
35. Hochholdinger, F. (2009). The Maíz Root System: Morphology, Anatomy, and Genetics. *Handbook of Maíz: Its Biology*. 145–160. doi: 10.1007/978-0-387-79418-1_8

36. Hughes, P.W. (2021). Hot stress: basal thermotolerance in Arabidopsis depends on two ethylene response factors, ERF95 and ERF97. *The Plant Cell*, 33(2), 175–176. DOI: 10.1093/plcell/koaa034
37. Hussain, H.A., Men, S., Hussain, S. Chen, Y., Ali, S., Zhang, S., Zhang, K., Li, Y., Xu, Q., Liao, C. y Wanget, L. (2019). Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Scientific Report.* 9, 1-12. DOI: 10.1038/s41598-019-40362-7
38. INEGI. (2021). Clima. Recuperado a 20 de agosto del 2021 de <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/groo/territorio/clima.aspx?tema=me>
39. Isidro-Hernández, J. (2019). Evaluación de materiales de maíz con tolerancia putativa a estrés de calor en Torreón, Coahuila. Ensayo HTW06 (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México. Recuperado en 21 de noviembre de 2021, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/45968>
40. ISTA. (2016). Reglas internacionales para el análisis de semillas. Bassersdorf, Suiza: The International Seed Testing Association.
41. Jing, J., Guo, S., Li, Y., y Li, W. (2020). The alleviating effect of exogenous polyamines on heat stress susceptibility of different heat resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Scientific Reports*, 10(1). DOI: 10.1038/s41598-020-64468-5
42. Kato, T.A., C. Mapes, L.M. Mera, J.A. Serratos Y R.A. Bye. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. Ciudad de México, México.
43. Kiesselbach, T. A. (1949). The Structure and Reproduction of Corn. Department of agronomy.
44. Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., y Bekkaoui, F. (2018). Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, DOI: 10.3389/fchem.2018.00026
45. Latzel, V., Fischer, M., Groot, M., Gutzat, R., Lampei, C., Ouborg, J., Parepa, M., Schmid, K., Vergeer, P., Zhang, Y., y Bossdorf, O. (2021). Parental environmental effects are common and strong, but unpredictable, in Arabidopsis thaliana. *BioRxiv*. DOI: 10.1101/2021.11.04.467350
46. Li, Z. y Howell, S. H. (2021). Heat Stress Responses and Thermotolerance in Maize. *International journal of molecular sciences-* 22(2), 948-967. DOI: 10.3390/ijms22020948
47. Liu, J.H., Wang, W., Wu, H., Gong, X. y Moriguchi, T. (2015). Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Science*. 6, 827-837. DOI: 10.3389/fpls.2015.00827
48. Liu, W.-Y., Chang, Y.-M., Chen, S. C.-C., Lu, C.-H., Wu, Y.-H., Lu, M.-Y. J., ... Li, W.-H. (2013). Anatomical and transcriptional dynamics of maize embryonic leaves during

- seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 3979–3984. DOI: 10.1073/pnas.1301009110
49. Luján-Soto, E., & Dinkova, T. D. (2021). Time to Wake Up: Epigenetic and Small-RNA-Mediated Regulation during Seed Germination. *Plants*, 10(2), 236. DOI: 10.3390/plants10020236
50. MacRobert, J.F., P.S. Setimela, J. Gethi y M. Worku. (2014). *Manual de producción de semilla de maíz híbrido*. México, D.F.: CIMMYT
51. Márquez, F. (2010). Epistasia en variedades sintéticas de maíz. *Revista fitotecnia mexicana*. 33(4), 101-105. Recuperado a 20 de agosto de 2021 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000500020&lng=es&nrm=iso&tlng=es
52. Martínez, J., Canal, M., Pereyra, C., Welchen, E., Martínez-Noël, G., y Estévez, J. (2021). The tip of the iceberg: emerging roles of TORC1, and its regulatory functions in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4085-4101. DOI: 10.1093/jxb/eraa603
53. Martínez-Becerra, A. (1973). *Obtención de una variedad de maíz con mesocotilo-coleoptilo largo* (Tesis de licenciatura). Universidad de Guadalajara.
54. Matilla, A. J. (1996). Polyamines and seed germination. *Seed Science Research*, 6(03), 81-96. DOI: 10.1017/s096025850000310x
55. Matzrafi, M., Osipitan, O. A., Ohadi, S., y Mesgaran, M. B. (2020). Under pressure: Maternal effects promote drought tolerance in progeny seed of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science*, 1–29. DOI: 10.1017/wsc.2020.75
56. Mondragón, J. (2009). *Malezas de México, Zea mays ssp. mexicana* (Schradler) Iltis. Ed Vibrans, H. Recuperado en 27 de agosto de 2021 de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/zea-mays-mexicana/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias>
57. Muñoz-Valencia, V., Díaz-González, F., Manzano-Martínez, M.R., Toro-Perea, N., Y Cárdenas-Henao, H. (2013). Basal and induced thermotolerance to heat shocks in *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 18-25. Recuperado a 05 de febrero del 2022 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882013000100004&lng=en&tlng=en.
58. Nguyen, C. D., Chen, J., Clark, D., Perez, H., y Huo, H. (2021). Effects of Maternal Environment on Seed Germination and Seedling Vigor of *Petunia* × *hybrida* under Different Abiotic Stresses. *Plants*, 10(3), 581. DOI: 10.3390/plants10030581
59. Nieto-Sotelo, J., Martínez, L. M., Ponce, G., Cassab, G. I., Alagón, A., Meeley, R. B., Ribaut, J. M., y Yang, R. (2002). Maíz HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *The Plant cell*, 14(7), 1621–1633. DOI: 10.1105/tpc.010487

60. Niu, L., Hao, R., Wu, X., y Wang, W. (2020). Maize mesocotyl: Role in response to stress and deep-sowing tolerance. *Plant Breeding*, 139(3), 466–473. DOI: 10.1111/pbr.12804
61. Nonogaki, H., Bassel, G. W., y Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.02.0
62. Nonogaki, H., Bassel, G. y Bewley, J. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*. 179(6), 574–581. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010
63. Olea-Badillo, G. (2020). Análisis de la expresión de los componentes de la vía TOR durante la germinación de maíz [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
64. Onyekachi, O., Boniface, O., Gemlack, N. y Nicholas, N. (2019). The Effect of Climate Change on Abiotic Plant Stress: A Review. En Bosco de Oliveira, A. (Ed.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants* (5). Londres, Reino Unido: IntechOpen.
65. Oñate. (2016). Duración de las etapas fenológicas y profundidad radicular del cultivo de maíz (*Zea mays*) var. Blanco harinoso criollo, bajo las condiciones climáticas del cantón Cevallos (Tesis de licenciatura). Universidad Técnica de Ambato.
66. Orús, A. (2021). Producción global de los distintos tipos de cereales en 2019. Statista. Recuperado a 5 de septiembre del 2021 en <https://es.statista.com/estadisticas/1140499/produccion-mundial-de-cereales-por-tipo/>
67. Pita, J. y Pérez, F. (1998). Germinación de semillas. En Pérez, F. (Ed), *Hojas divulgadoras* (1-20). Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Recuperado a 24 de agosto del 2021 de: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf
68. Prasanna, B., Cairns, J., Zaidi, P., Beyene, Y., Makumbi, D., Gowda, M., Magorokosho, C., Zaman-Allah, M., Olsen, M., Das, A., Worku, M., Gethi, J., Vivek, B.S., Nair, S., Rashid, Z., Vinayan, M.T., Beshir, A., Vicente, F., Dhliwayo, T. y Zhang, X. (2021). Beat the stress: breeding for climate resilience in maize for the tropical rainfed environments. *Theoretical and Applied Genetics*. 134(1), 1729-1752. DOI: 10.1007/s00122-021-03773-7
69. Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Claudette, J. y Dominique, J. (2012). Seed Germination and Vigor. *Annual Reviews of Plant Biology*, 63, 507-533. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105550
70. Ransom, Joel. (2020). *Corn Growth and Management Quick Guide*. North Dakota State University. Recuperado a 20 de agosto del 2021 de: <https://www.ag.ndsu.edu/publications/crops/corn-growth-and-management-quick-guide>
71. Rincón-Tuexi, J., Castro-Nava, S., López-Santillán, J., Huerta, A., Trejo-López, C. y Briones-Encinia, F. (2006). Temperatura alta y estrés hídrico durante la floración en poblaciones de maíz tropical. *Phyton* (Buenos Aires), 75, 31-40. Recuperado en 21 de noviembre de 2021, de

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572006000100003&lng=es&tlng=es.

72. Rodríguez-Gacio, M., Matilla-Vázquez, M., y Matilla, A. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signaling and Behavior*, 4(11): 1035-1049. DOI: 10.4161/psb.4.11.9902.
73. Romero, L., Guerra, G., Luqueño, O., y Pardo, J. (2018). La cinasa de residuos de serina y treonina blanco de la rapamicina (TORC1) es esencial en el metabolismo celular de los eucariontes. *Revista de educación bioquímica*, 37(1), 4-13.
74. Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P. y Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*, 19(18), 2199–2211. DOI: 10.1101/gad.351605
75. Sáenz-Rodríguez, M. N., y Cassab, G. I. (2021). Primary Root and Mesocotyl Elongation in Maize Seedlings: Two Organs with Antagonistic Growth below the Soil Surface. *Plants*, 10(7), 1274. DOI: 10.3390/plants10071274
76. Salazar Díaz y Dinkova. (2021). TOR (Target Of Rapamycin): Emperador en la toma de decisiones que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas. *Revista de Educación Bioquímica*. 40(3):100-110. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2021/reb213c.pdf>
77. Salazar-Díaz, K., Dong, Y., Papdi, C., Ferruzca-Rubio, E.M., Olea-Badillo, G., Ryabova, L.A. y Dinkova, T.D. (2021). TOR senses and regulates spermidine metabolism during seedling establishment and growth in maize and Arabidopsis. *iScience*. 24(11):103260. DOI: 10.1016/j.isci.2021.103260.
78. Scharf, K. D. y Nover, L. (1982). Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30, 427–437. DOI: 10.1016/0092-8674(82)902409
79. Schepetilnikov, M. y Ryabova, L. (2018). Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants. *Plant Physiology*, 176(2), 1095-1105. DOI: 10.1104/pp.17.01243
80. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). El maíz a través de la investigación siempre mejora. México: Gobierno de México. Consultado a 4 de octubre del 2021 en <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-maíz-a-traves-de-la-investigacion-siempre-mejora?idiom=es>
81. Semillas Valle. (2021). Semillas Valle. Recuperado de <https://semillasvalle.com/site/blog/semilla-hibrida-el-secreto-de-los-altos-rendimientos/> a 19 de septiembre del 2023
82. Semillas y propiedad intelectual. (2023). ¿Cómo se hace un híbrido?. Semillas y propiedad intelectual. Recuperado de <https://www.semillasypi.org.ar/index.php/vida-cotidiana/lo-sabias/191-como-se-hace-un-hibrido> a 19 de septiembre del 2023.

83. Sepúlveda, G. y Sánchez de Jiménez, E. (1988). Polyamine distribution among maize embryonic tissues and its relation to seed germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 153(2), 881-887.
84. Serratos-Hernández, J.A. (2009). The origin and diversity of maize in the american continent. Greenpeace México. Recuperado de https://croppgenbank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/Origin_Diversity_Maize_In_America_Hernandez.pdf
85. Shi, L., Wu, Y., y Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: Conservation and innovation. *Development*, 145(13), 1-13. DOI: 10.1242/dev.160887
86. Sierra-Macías, M., Rodríguez-Montalvo, F., Palafox-Caballero, A. Y Espinosa-Calderón, Al. (2016). Adopción e impacto de la variedad sintética de maíz VS-536 en la región tropical del sureste de México. *Revista del desarrollo económico*. 3(9), 32-40. Consultado a 2 de octubre de 2021 en https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewiFgsbzvon0AhXrnWoFHY9PBZkQFnoECAMQAw&url=https%3A%2F%2Fwww.ecorfan.org%2Fbolivia%2Fresearchjournals%2FDesarrollo_Economico%2Fvol3num9%2FRevista_de_Development_Economico_V3_N9_3.pdf&usq=AOvVaw1KWgZgqEEAxLdEol6Z_yY3
87. Soda, K. (2011). The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 95. DOI: 10.1186/1756-9966-30-95
88. Tao, Z., Chen, Y., Li, C., Zou, J., Yan, P., Yuan, S. y Sui, P. (2016). The causes and impacts for heat stress in spring maize during grain filling in the North China Plain — A review. *Journal of Integrative Agriculture*. 15(12), 2677–2687. DOI: 10.1016/s2095-3119(16)61409-0
89. Tafolla-Arellano, J.C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M.E., Zacarías García, L. y Báez-Sañudo, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnica Mexicana*. 36 (1), 3-12. Recuperado a 20 de septiembre del 2023 de <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-1/1a.pdf>
90. The Growth Lab at Harvard University. (2023). The Atlas of Economic Complexity. Recuperado a 20 de septiembre de 2023 de <http://www.atlas.cid.harvard.edu>
91. Thomas, T. y Thomas, T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 244–25. DOI: 10.1007/PL00000852.
92. Tiburcio, A. y Alcázar, R. (2018). Potential Applications of Polyamines in Agriculture and Plant Biotechnology. *Methods in Molecular Biology*. 1694, 489-508. DOI: 10.1007/978-1-4939-7398-9_40.
93. Vanhaesebroeck, B. y Alessi, D. R. (2000). The PI3K–PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal*, 346(3), 561–576. DOI: 10.1042/bj3460561

94. Villanueva, V. R., Adlakha, R. C., y Cantera-Soler, A. M. (1978). Changes in polyamine concentration during seed germination. *Phytochemistry*, 17(8), 1245–1249. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)94565
95. Vivas, M., Wingfield, M. J., y Slippers, B. (2020). Maternal effects should be considered in the establishment of forestry plantations. *Forest Ecology and Management*, 460, 117909. DOI: 10.1016/j.foreco.2020.117909
96. Vivas, M., Zas, R., Sampedro, L., y Solla, A. (2013). Environmental Maternal Effects Mediate the Resistance of Maritime Pine to Biotic Stress. *PLoS ONE*, 8(7), e70148. DOI: 10.1371/journal.pone.0070148
97. Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 28, 1–14. DOI: 10.1007/s00425-003-1105-5
98. Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., y Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*. 4, 162–176. DOI: 10.1016/j.cj.2016.01.010
99. Wellhausen, E. J., Roberts L. M., y Efrain Hernandez X. 1951. Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Primera edición. Tipografía, Diseño y Edición S.A. de C.V., México. Vol II: 609-732.
100. Wimalasekera, R., Tebartz, F. y Scherer, G. (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science*. 181(5), 593-603. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002.
101. Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124(3), 471–484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016
102. Xue, X., Du, S., Jiao, F., Xi, M., Wang, A., Xu, H., Jiao, Q., Zhang, X., Jiang, H., Chen, J., y Wang, M. (2021). The regulatory network behind maize seed germination: Effects of temperature, water, phytohormones, and nutrients. *The Crop Journal*, 9(4), 718-724. DOI: 10.1016/j.cj.2020.11.005.
103. Zhang, H., Zhao, Y. y Zhu, J.K. (2020). Thriving under Stress: How Plants Balance Growth and the Stress Response. *Developmental Cell*, 55(5), 529-543. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.10.012
104. Zhao, J., Lu, Z., Wang, L. y Jin, B. (2021). Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (1), 1-14. DOI: 10.3390/ijms22010117.
105. Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313-324. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.029

14. ANEXOS

Tabla A1. Reacción para realizar curva patrón de albúmina sérica bovina.

BSA (μg)	BSA (μL)	Solución Bradford 1x (μL)	H ₂ O (μL)
0	0	50	200
1	1	50	199
3	3	50	197
5	5	50	195
7	7	50	193
10	10	50	190

Tabla A2. Preparación de soluciones para geles de electroforesis.

- Gel separador:
 - 4.6 ml Solución 1
 - 5.5 ml Solución 2
 - 0.9 ml H₂O
 - 50 μL Persulfato de amonio al 10%
 - 5 μL TEMED
- Gel Concentrador
 - 0.83 ml Solución 1
 - 2.5 ml Solución 3
 - 1.615 ml H₂O
- 50 μL APS 10%
- 5 μL TEMED
- Solución 1 (100 mL)
 - 29.2 g Acrilamida
 - 0.8 g Bis-Acrilamida
- Solución 2 (100 mL)
 - 0.75 M Tris-HCl pH 8.8
 - 0.2% SDS
- Solución 3 (100 mL)
 - 0.25 M Tris-HCl pH 6.8
 - 0.2% SDS

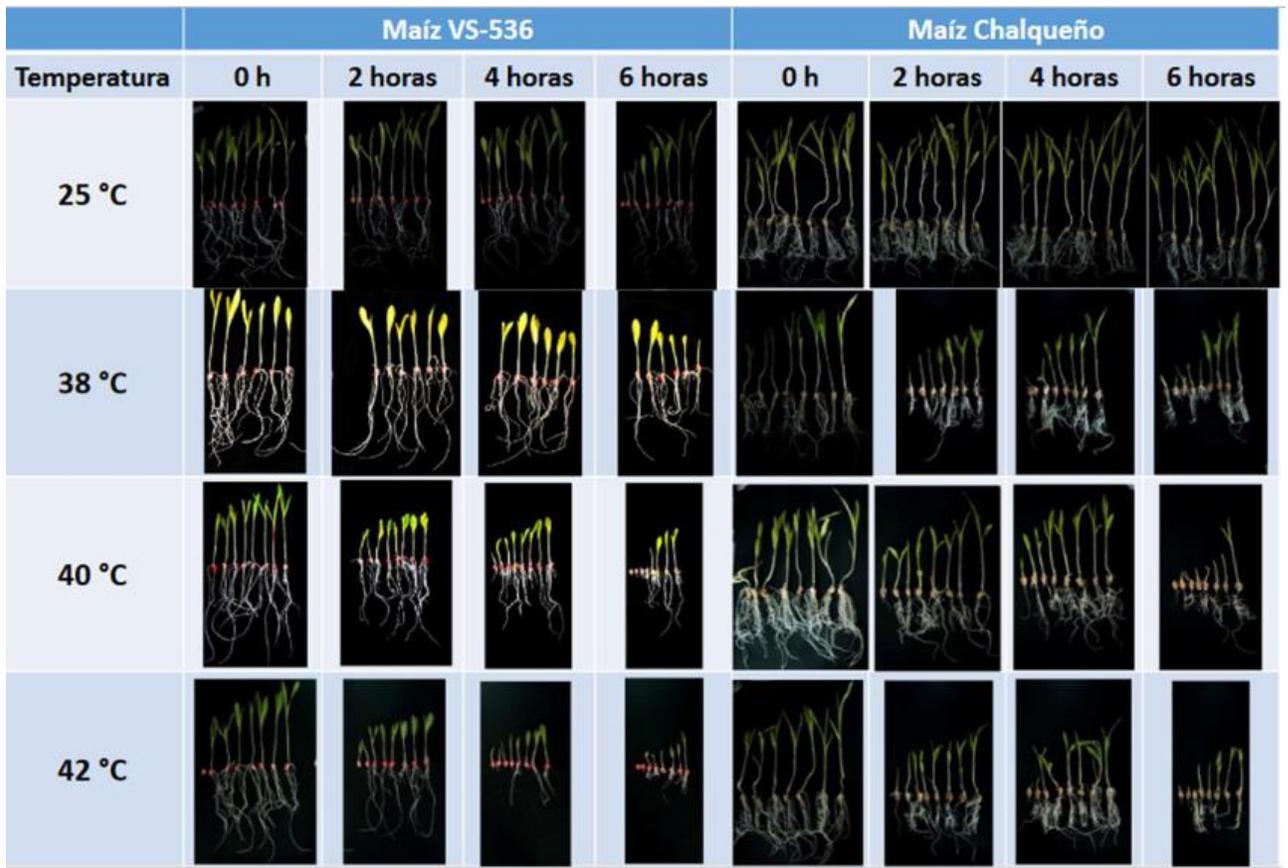


Figura A1. Representación de morfología de semillas de maíz Chalqueño y VS-5367 al término del periodo de recuperación del choque térmico, donde 0 horas a 25 °C significa 0 horas de CaCl₂ y entre 38 y 42 °C significa 0 horas de choque térmico, pero presencia de CaCl₂. indica que las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio previo a la imbibición.

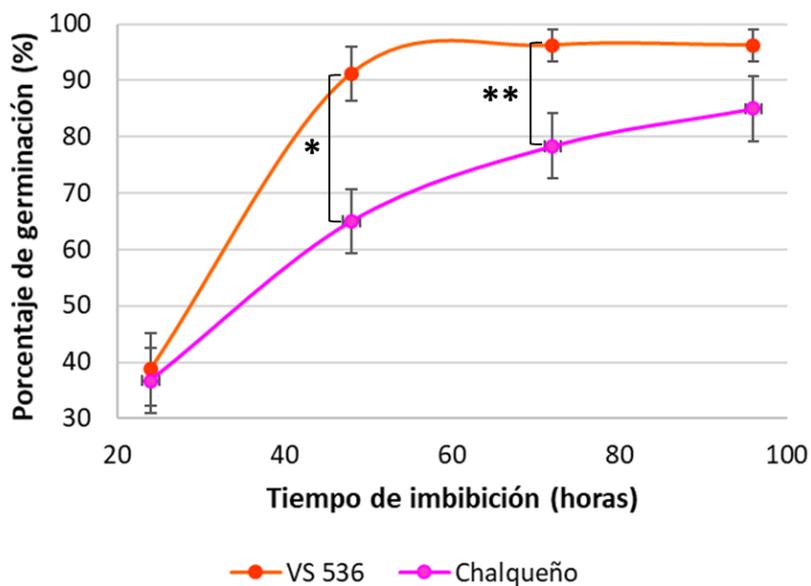


Figura A2. Porcentaje de germinación de maíz Chalqueño y VS-536, utilizando el método de siembra vertical. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas para cada variedad de maíz, con al menos 20 individuos por cada una. Prueba t-Students, donde * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$.

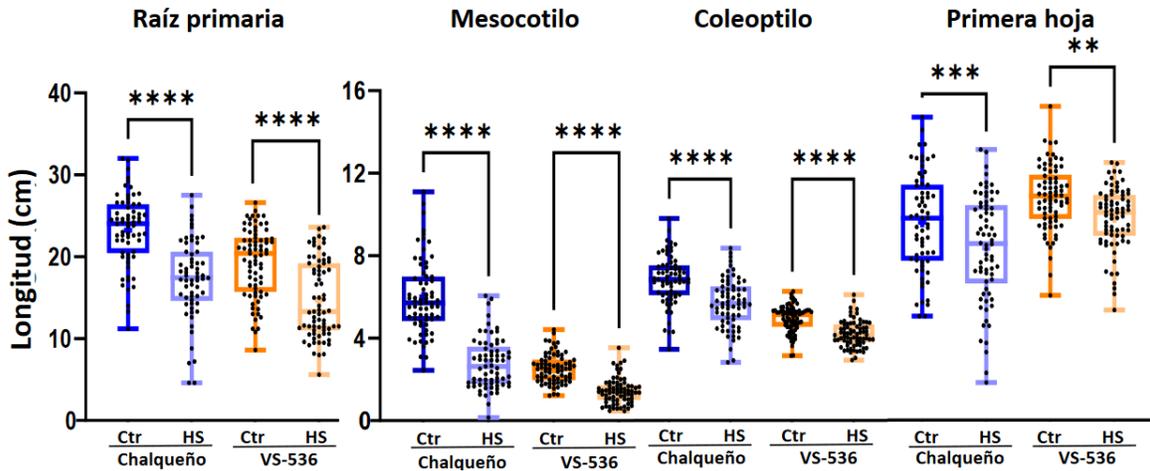


Figura A3. Crecimiento de plántulas tratadas con choque térmico (HS) y control (Ctr) a siete días de recuperación. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una con al menos 7 individuos por cada una. Prueba t-Students, donde ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ y **** $P \leq 0.0001$.

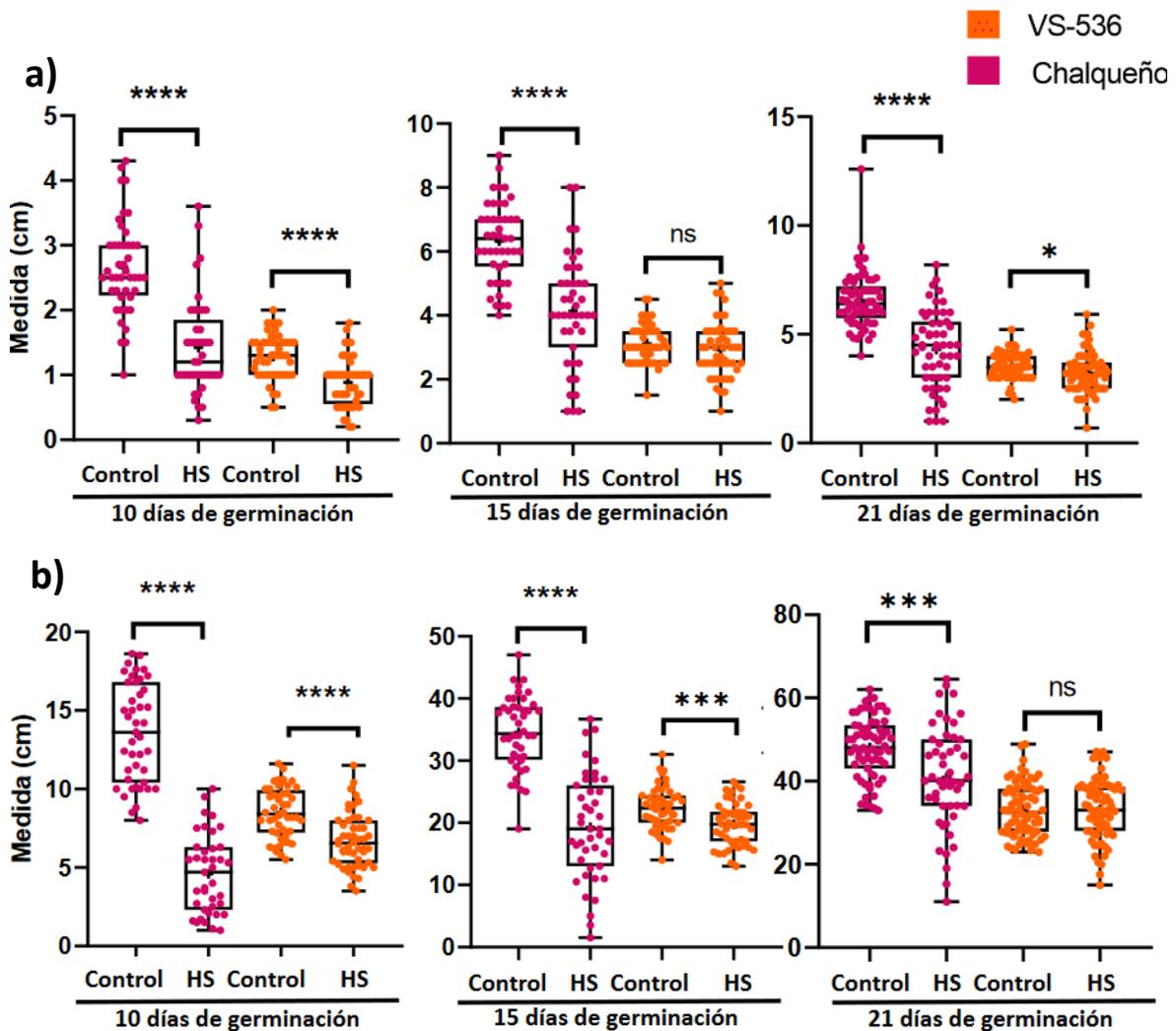


Figura A4. Longitud de a) coleoptilo y b) primera hoja de plantas a 10, 15 y 21 días post-germinación con o sin choque térmico (HS) aplicado a las semillas a 48 hpi. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. Prueba t-Students, donde *** $P \leq 0.001$ y **** $P \leq 0.0001$.

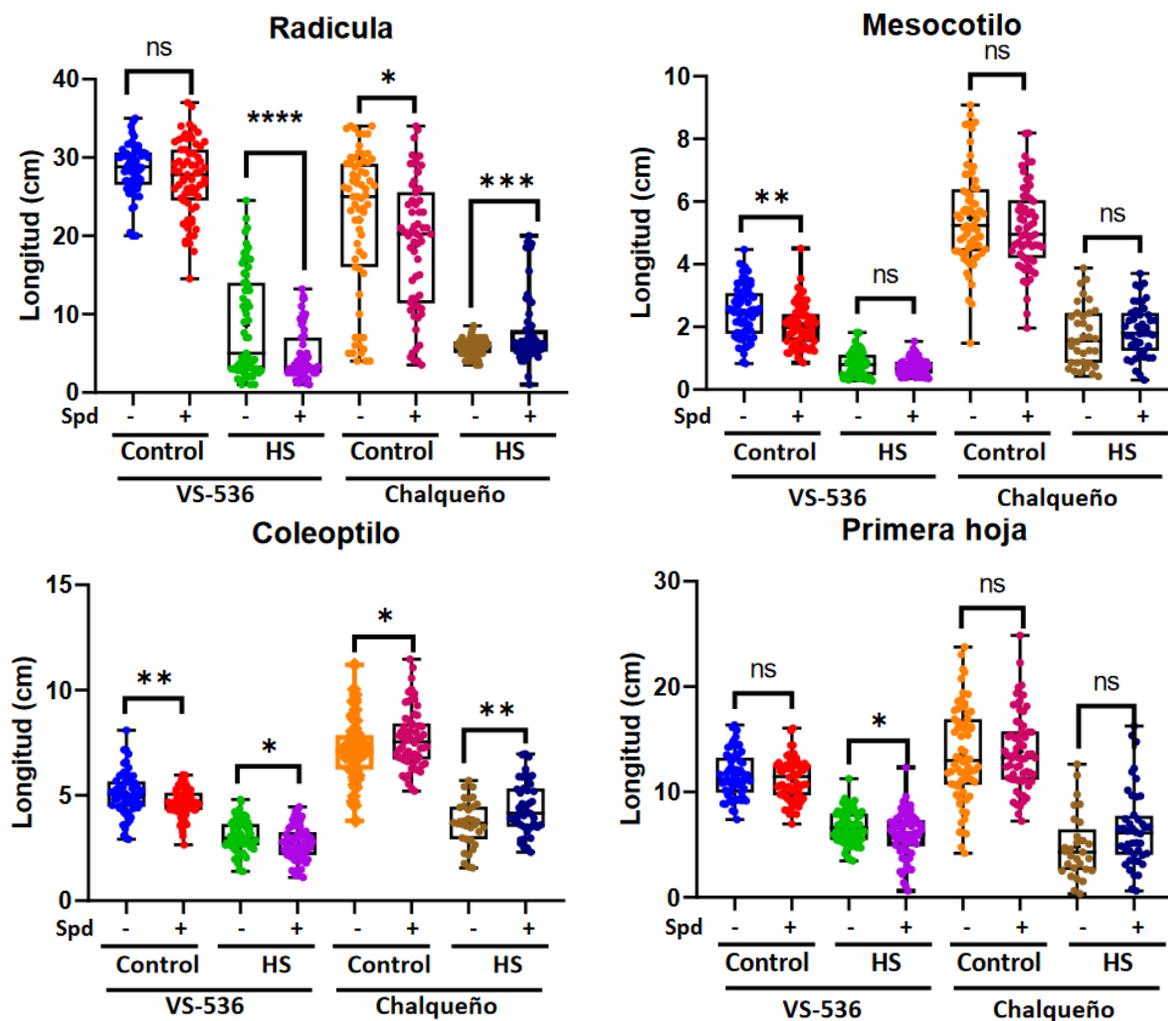


Figura A5. Efecto de espermidina (Spd) en la longitud de raíz primaria, mesocotilo, coleoptilo y primera hoja de plantas de maíz VS-536 y Chalqueño sometidas a choque térmico, con siete días de recuperación. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. Prueba t-Students, donde * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

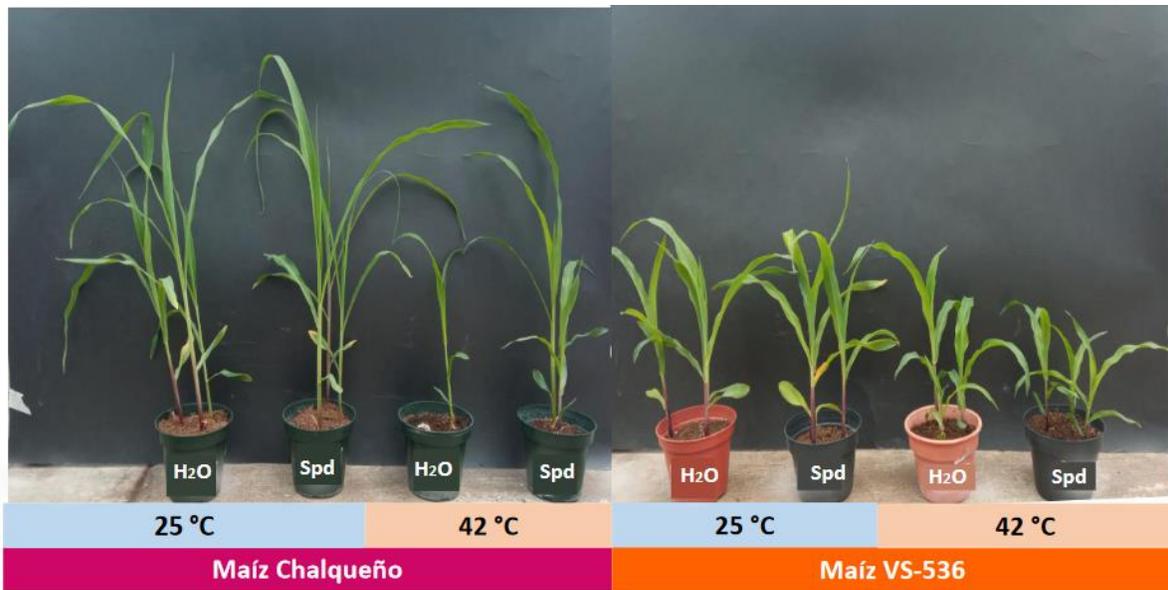


Figura A6. Plantas de maíz Chalqueño y VS-536 a los 21 días post germinación, control (25°C) o con choque térmico (42°C) realizado por 4h a las 72 hpi, sin espermidina y con 0.1 mM espermidina.

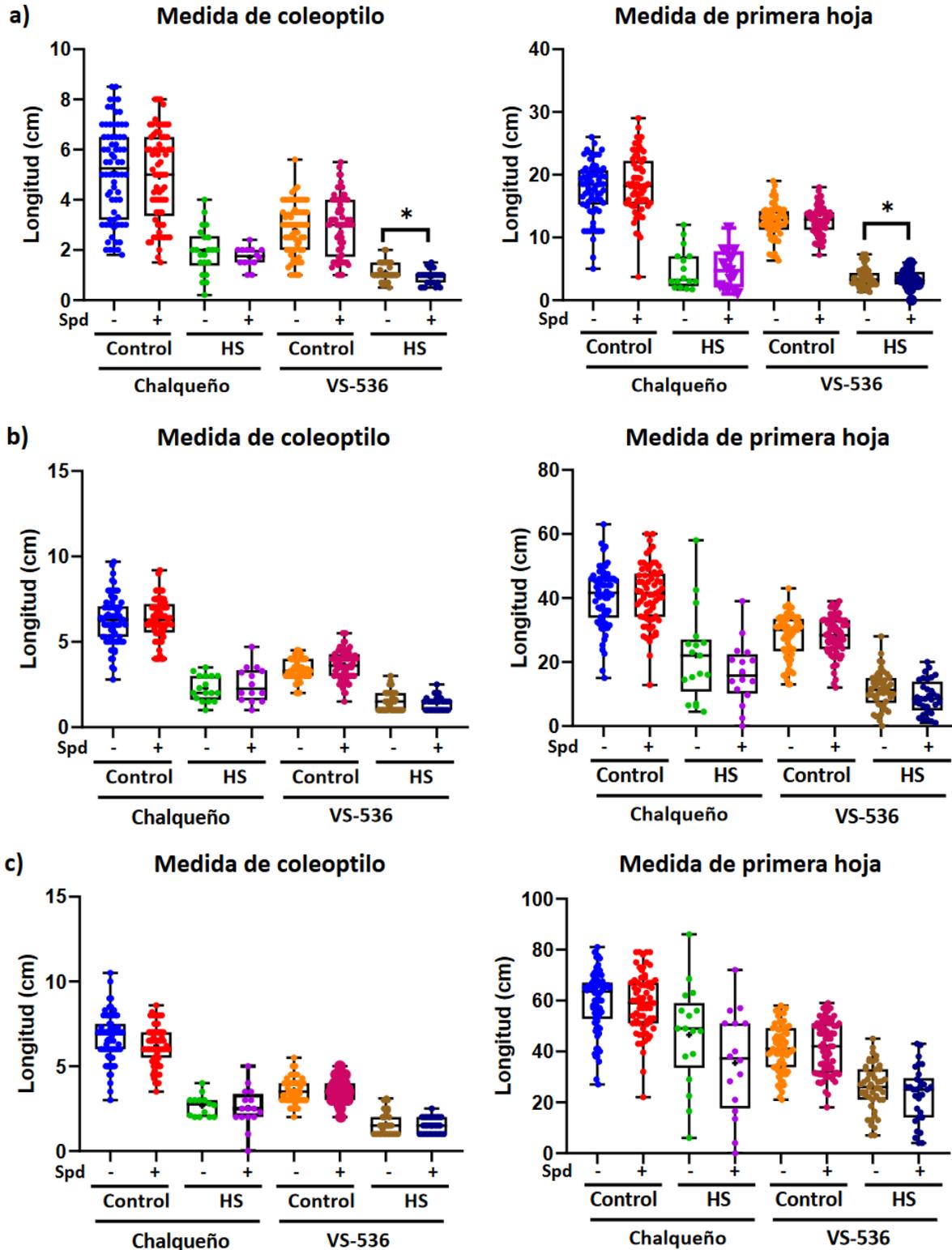


Figura A7. Medidas de coleoptilo y primera hoja de plantas de maíz VS-536 y Chalqueño, con esperimina, sin espermidina, con y sin choque térmico (HS) a) 10, b) 15 y c) 21 días de germinación. $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. Prueba t-Students, donde * $P \leq 0.05$.

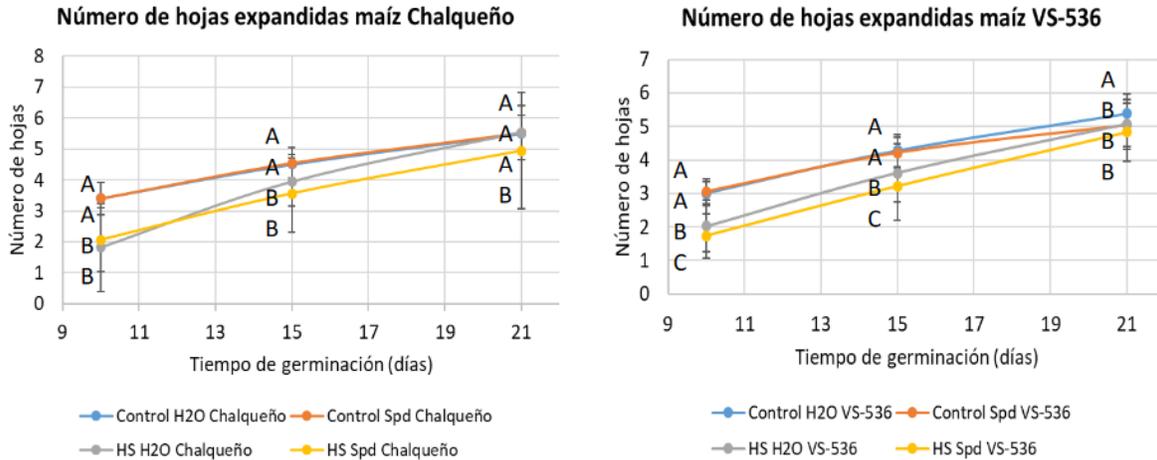


Figura A8. Número de hojas expandidas en maíz Chalqueño y VS-535 VS-536, con y sin espermidina (Spd), con y sin choque térmico (HS) a 10, 15 y 21 días de germinación. Las letras distintas representan diferencia significativa, con ANOVA de una vía, LSD como prueba de comparación, $\alpha \leq 0.05$ y $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una.

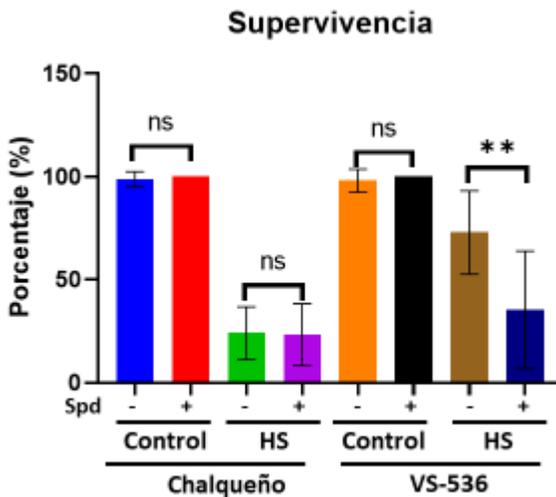


Figura A9. Porcentaje de supervivencia en maíz Chalqueño y VS-535 VS-536, con y sin espermidina (Spd), con y sin choque térmico (HS) a 21 días de germinación $n \geq 60$, correspondiente a 3 réplicas biológicas independientes con 3 réplicas cada una, con al menos 7 individuos por cada una. Prueba t-Students, donde $** P \leq 0.01$.

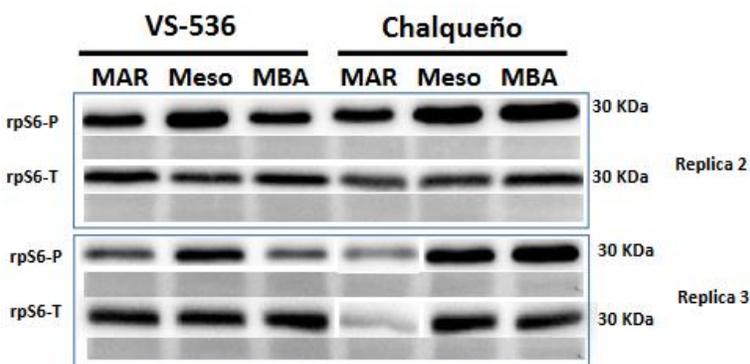


Figura A10. Réplicas biológicas de comparación de los niveles basales de rpS6 total y fosforilada (rpS6-P) entre variedades, donde se muestran proteínas de meristemo apical radicular (MAR), mesocotilo (Meso) y meristemo de brote apical (MBA) de maíz VS-536 y Chalqueño de distintos tejidos de eje con 48h de germinación, en condiciones control.

condiciones control.

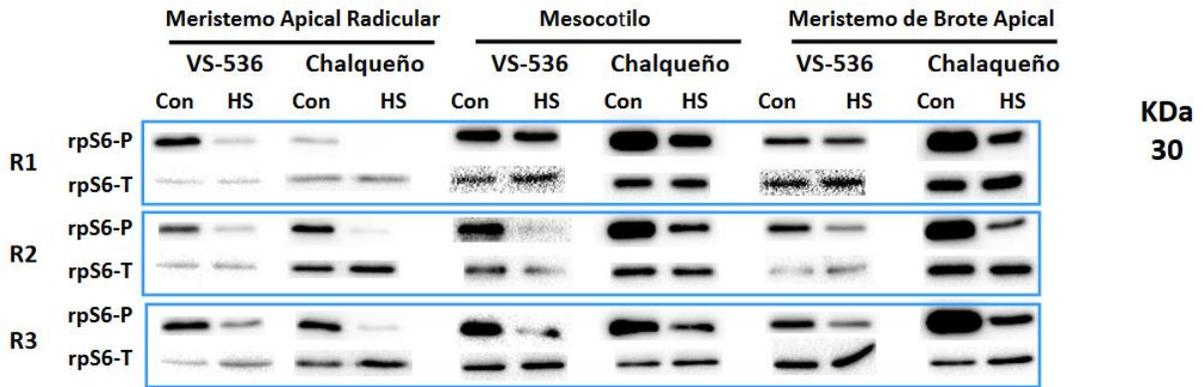


Figura A11. Réplicas biológicas de Inmuno detecciones para rpS6 total y fosforilada (rpS6-P) de meristemo apical radicular, mesocotilo y meristemo de brote apical de maíz VS-536 y chalqueño en condiciones control y con choque térmico (HS).

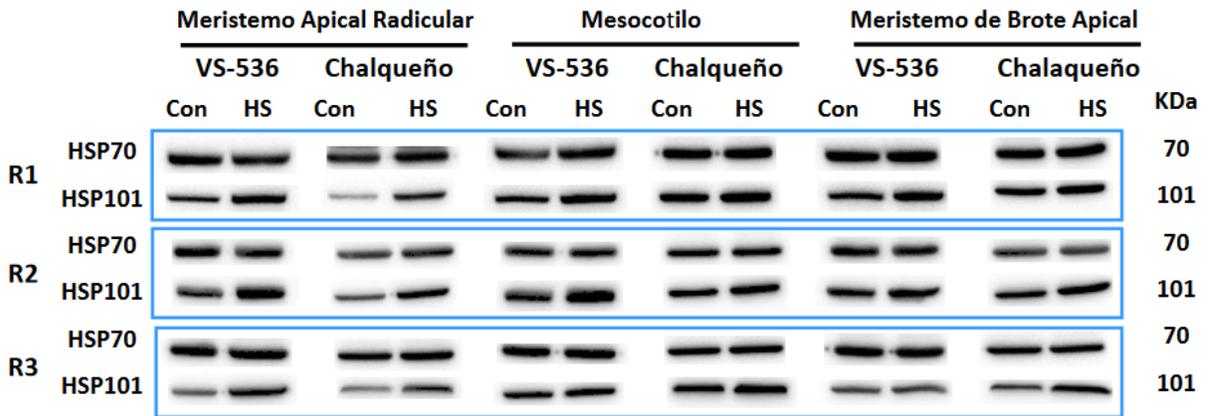


Figura A12. Réplicas biológicas de Inmuno detección para HSP70 y HSP101 de meristemo apical radicular, mesocotilo y meristemo de brote apical de maíz VS-536 y chalqueño en condiciones control y con choque térmico (HS).

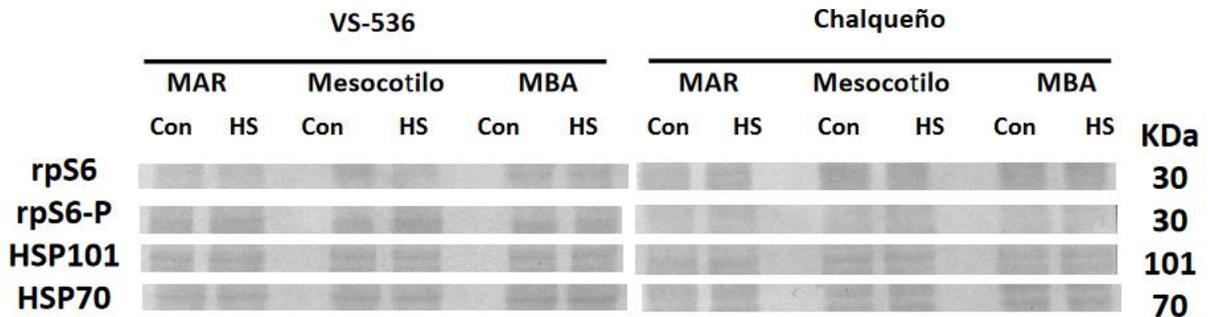


Figura A13. Tinción de membranas con Rojo Ponceau, donde se muestran proteínas de maíz VS-536 y Chalqueño meristemo apical radicular (MAR), mesocotilo y meristemo de brote apical (MBA) de 48h de germinación, en condiciones control y con choque térmico (HS).