



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA HIDROTRÓPICA DE RAÍZ Y ELONGACIÓN DEL  
MESOCOTILO EN HÍBRIDOS DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) EN  
CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Doctor en Ciencias Bioquímicas**

**PRESENTA:**

**MERY NAIR SÁENZ RODRÍGUEZ**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA. GLADYS CASSAB LOPEZ**  
**Instituto de Biotecnología IBT- UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DRA. ALEJANDRA COVARRUBIAS**  
**Instituto de Biotecnología IBT-UNAM**  
**DR. JORGE NIETO SOTELO**  
**Instituto de Biología- UNAM**

**Cuernavaca-Morelos / México., Mayo 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“Hay una  
fuerza motriz  
más poderosa que  
el vapor, la electricidad  
y la energía atómica: **La voluntad**”  
Albert Einstein.*

### ***Agradecimientos institucionales***

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, alma mater que me permitió continuar mi crecimiento académico y personal.*

*Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de su apoyo institucional que permite el desarrollo de nuevos científicos y da acogida al talento extranjero.*

*Al Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México que, a través de su apoyo institucional, su talento humano e instalaciones me brindó las herramientas necesarias para: el diseño, planeación metodológica y desarrollo experimental de mi proyecto.*

*Al Instituto de Biología, a su Jardín Botánico y al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México en Ciudad universitaria, por permitirme el desarrollo de actividades experimentales en sus instalaciones y por el apoyo de sus profesionales.*

*A la Unidad de Computo del Instituto de Biotecnología en especial al M. En T.I. Juan Manuel Hurtado quien brindo la asesoría y el soporte técnico para el desarrollo del análisis bioinformático.*

*A la Fundación CEIBA: SGR Colciencias DNP: BPIN: 2013000100210 por otorgarme la beca Rodolfo Llinás para la promoción de la formación avanzada y el espíritu científico en Bogotá y cuyo apoyo económico permitió el desarrollo del programa de doctorado.*

*A los proyectos que permitieron la realización de este trabajo: CONACYT (PN247732) y DGAPA-PAPIIT-UNAM (IG200515) otorgados a la Dra. Gladys Iliana Cassab López del Instituto de Biotecnología de la UNAM y al apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico: PAPIIT\_UNAM (IN214119).*

*Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por suministrar el material experimental para el desarrollo de esta tesis de su banco de germoplasma.*



## ***Agradecimientos a título personal***

*A Dios, a mis padres: Gilma Rodríguez Dávila y Rodrigo Armando Sáenz Puentes, mis hermanas: Nury Milena Sáenz Rodríguez, Dayra Rocio Sáenz Rodríguez, a mí perro Lucky y a mí enorme familia; por su apoyo incondicional, su paciencia, fortaleza y por creer en mí siempre.*

*Al Tío, a mí Tía-mamá y a sus familias, por su apoyo incondicional; ya que sin su ayuda este viaje no hubiera sido posible.*

*A la familia Arroyo, que me adopto como parte de la suya y que desde el primer momento me han apoyado y motivado.*

*A la Dra. Gladys Iliana Cassab López por darme acogida en su grupo de investigación, brindarme su apoyo humano-académico y por convertirse en mí mentora, amiga y motivadora constante.*

*Al Dr. Jorge Nieto Sotelo del Laboratorio de Fisiología Molecular, Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de trabajar junto a su equipo de investigación, por sus valiosos aportes académicos, su paciencia y confianza.*

*A la Dra. Alejandra Covarrubias Robles del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por sus apreciaciones oportunas en el desarrollo del proyecto, la disponibilidad de su laboratorio para actividades experimentales y su apoyo.*

*A los miembros del comité del examen de candidatura por su valioso aporte, su acompañamiento y apoyo.*

*A María Eugenia Campos por su apoyo excepcional a nivel personal, académico y con la administración del laboratorio. A Marcela Ramírez por su ayuda en las actividades de microscopía.*

*A Carmelita por su amistad, su motivación diaria y su enorme ayuda con las actividades del laboratorio.*

*A mis compañeros de labores y amigos de la Universidad Nacional Autónoma de México en sus diferentes institutos:*

*Instituto de Biotecnología: Jesús Martínez, Delfina Eapen, Claudia Puente, Mayra, Laura, Max, Brandon, Kelly, Alejandra, Paty.*

*Instituto de Biología y Fisiología Celular: Leopoldo, Alejandra, Alejandro, Eric, Jesús, Luz María Rangel, Miguel, Yajima, Ray, Francisco y todos aquellos con quienes he interactuado y compartido durante este viaje ... gracias totales por sus consejos, apoyo e inmensurable paciencia.*

# CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	14
<b>ABSTRACT</b>	16
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	18
<b>CAPITULO I. Estado del arte</b>	22
<b>1. Estrés hídrico</b>	22
1.1. Estrés hídrico por déficit hídrico en México	23
<b>2. Maíz</b>	24
2.1 Origen y generalidades	25
2.2 Efectos del estrés hídrico en maíz	28
2.3 Mecanismos de respuesta del maíz al estrés hídrico	29
2.4 Emergencia del maíz	30
2.5 Sistema radicular del maíz	31
2.5.1 Hidrotropismo	34
2.6 Mesocotilo del maíz	35
2.6.1 Siembra profunda	36
<b>3. Mejoramiento genético en maíz</b>	37
3.1. Estudios de asociación genómica (GWAS)	38
<b>II. ANTECEDENTES</b>	40
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	45
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	46
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	46
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	46
<b>REFERENCIAS</b>	47
<b>CAPITULO II. Metodología</b>	55
<b>1. Fenotipificación</b>	56
1. 1. Materiales y Métodos	56
1.1.1 Material vegetal	57
1.1.2 Localización del ensayo, almacenamiento y conservación del germoplasma	58
1.1.3 Material vegetal de control	58
1.1.4 Germinación del material vegetal	59
1.1.5 Descripción del sistema de ensayo diseñado para la fenotipificación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elonación del mesocotilo	60
1.1.6 Ensayo para la determinación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo	63

	Pág.
1.2. Determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y el mesocotilo	67
2.2.1 Protocolo de determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y el mesocotilo	68
1.3. Determinación de iones solubles sodio (Na <sup>+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> ) por fotometría de llama	69
1.3.1 Protocolo de determinación de iones solubles sodio (Na <sup>+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> ) de la raíz primaria y el mesocotilo	70
1.4. Análisis histológico de la raíz primaria y el mesocotilo bajo condiciones de estrés hídrico	71
1.5. Análisis estadístico de las respuestas fenotípicas	74
<b>2. Genotipificación</b>	<b>75</b>
2.1. Estudios de asociación a nivel de genoma completo (GWAS) de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo de híbridos DTMA de maíz	78
2.2. Efecto fenotípico de los SNP asociados para los rasgos en estudio	79
2.3. Identificación de los genes asociados a los rasgos en estudio	80
2.4. Análisis de enriquecimiento con los genes asociados a los rasgos en estudio	81
2.5. Análisis estadístico de la genotipificación	81
<b>REFERENCIAS</b>	<b>82</b>
<b>CAPITULO III. Resultados</b>	<b>86</b>
<b>1. Fenotipificación</b>	<b>86</b>
1.1. Determinación de la respuesta hidrotónica en raíz primaria y la elongación del mesocotilo	88
1.1.1 Determinación de la respuesta hidrotónica en la raíz primaria	90
1.2. Determinación de la elongación del mesocotilo	94
1.3. Análisis de la respuesta hidrotónica vs elongación del mesocotilo	96
1.4. Determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y el mesocotilo	99
1.5. Determinación de iones solubles sodio (Na <sup>+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> ) de la raíz primaria y el mesocotilo por fotometría de llama	101
1.5.1 Determinación de iones solubles sodio (Na <sup>+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> ) de la raíz primaria	102
1.5.2 Determinación de iones solubles sodio (Na <sup>+</sup> ) y potasio (K <sup>+</sup> ) de mesocotilo	103
1.6. Análisis histológico de raíz primaria y mesocotilo sometidos las condiciones del sistema de ensayo	107

	Pág.
<b>2. Genotipificación</b>	113
2.1. Estudios de asociación a nivel de genoma completo (GWAS) de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo.	117
2.2. Efectos fenotípicos de los SNP asociados a la respuesta hidrotónica y elongación de mesocotilo.	121
2.3. Resultados de otros análisis bioinformáticos.	123
2.4. Identificación de genes asociados a la respuesta hidrotónica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo.	125
2.5. Identificación de genes asociados a los rasgos en estudio en términos genómicos (GO: terms).	135
2.6. Análisis de enriquecimiento con los genes asociados a los rasgos en estudio.	137
<b>REFERENCIAS</b>	141
<b>CAPITULO IV. Discusión</b>	148
<b>1. Fenotipificación</b>	148
1.1. Grupos de clasificación de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo en los híbridos DTMA.	152
1.1.1 Análisis del grupo DTMA con RH robusta y elongación del mesocotilo alta.	154
<b>2. Genotipificación</b>	162
2.1. SNPs y genes asociados a las respuestas fenotípicas a través del estudio de asociación (GWAS).	164
2.2. Análisis de enriquecimiento y co-expresión de genes asociados a las respuestas fenotípicas en condiciones de estrés hídrico.	169
<b>CONCLUSIONES</b>	171
<b>PERSPECTIVAS</b>	172
<b>REFERENCIAS</b>	174
<b>ANEXOS</b>	183

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>CAPITULO I. Estado del arte</b>	
Tabla 1. Fases y etapas del desarrollo del maíz.	29
<b>CAPITULO II. Metodología</b>	
Tabla 1. 72 híbridos DTMA de maíz seleccionados como población de estudio.	57
Tabla 2. Material vegetal control.	59
Tabla 3. Condiciones diferenciales entre el sistema de ensayo control y prueba	64
Tabla 4. Respuestas fenotípicas de híbridos DTMA de maíz seleccionados para la determinación de sodio y potasio en los tejidos en estudio	69
Tabla 5. Fracciones de la raíz primaria y el mesocotilo analizadas histológicamente por microscopía óptica en bajo aumento (4X y 10X)	72
<b>CAPITULO III. Resultados</b>	
Tabla 1. Porcentaje de humedad relativa promedio medido en el interior del sistema de ensayo para la determinación de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo	86
Tabla 2. Resultados de la determinación del potencial osmótico ( $\Psi\pi$ ) de la raíz primaria y el mesocotilo de plántulas de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo	87
Tabla 3. Resultados de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria (ángulo de curvatura en grados) en los 72 híbridos DTMA analizados bajo las condiciones del sistema de ensayo a las 24h	88
Tabla 4. Clasificación de la respuesta hidrotónica de la raíz de acuerdo al ángulo de curvatura	89
Tabla 5. Resultados fenotípicos de la elongación del mesocotilo (longitud en milímetros) en los 72 híbridos DTMA analizados bajo las condiciones del sistema de ensayo a las 96 h	91
Tabla 6. Clasificación de la elongación del mesocotilo de acuerdo su longitud	92
Tabla 7. Potencial osmótico calculado de los órganos en estudio (raíz primaria y mesocotilo) de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz (RH débil y EM media; RH robusta y EM alta, respectivamente) bajo condiciones de estrés hídrico a las 96h de ensayo	100
Tabla 8. Resultados del análisis de iones solubles sodio y potasio en la raíz primaria de híbridos DTMA de maíz con respuestas fenotípicas contrastantes a las 24 y 96 horas de ensayo	105
Tabla 9. Resultados del análisis de iones solubles sodio y potasio en mesocotilo a las 24 y 96 horas de ensayo. Se analizaron mesocotilos del DTMA 38 con RH débil y EM baja (DB), del DTMA 184 con RH robusta y EM alta (RA) y de la línea endogámica B73 de maíz con RH débil y EM alta (DA)	106

Tabla 10. Número de SNPs obtenidos a través del método de genotipificación por secuenciación masiva (GBS) de los 72 híbridos DTMA de maíz y el número de SNPs resultantes por cromosoma al aplicar dos filtros de calidad; el primer filtro de 0,05 mínima frecuencia alélica (MAF: 0,05) y un segundo filtro de mínimo conteo (MC: 56)	112
Tabla 11. SNPs adicionales asociados a través de GWAS aplicado con GAPITsuper a la respuesta hidrotópica de la raíz (RH) y la elongación del mesocotilo (EM) de los 72 híbridos DTMA de maíz	114
Tabla 12. Listado de ochenta y seis genes candidatos de estar asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria en los 72 híbridos DTMA	126
Tabla 13. Listado de cuarenta y siete genes candidatos de estar asociados con elongación del mesocotilo en los 72 híbridos DTMA	128
Tabla 14. Clasificación de SNPs asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria en relación a variaciones mapeadas entre híbridos clasificados con RH robusta e híbridos con RH débil	132
Tabla 15. Clasificación de SNPs asociados con la elongación del mesocotilo en relación a variaciones mapeadas entre híbridos clasificados con EM alta y EM baja	134

#### **CAPITULO IV. Discusión**

Tabla 1. Clasificación de la respuesta hidrotópica (RH) y elongación del mesocotilo (EM) de 70 híbridos DTMA de maíz analizados bajo las condiciones del sistema de ensayo diseñado por referenciando su origen	154
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>CAPITULO I. Estado del arte</b>	
Figura 1. Clasificación taxonómica del maíz.	26
Figura 2. Estructura de la planta del maíz.	28
Figura 3. Etapa de emergencia del maíz.	31
Figura 4. Estructura anatómica y arquitectura del sistema de raíces en maíz.	33
Figura 5. Anatomía y arquitectura del mesocotilo en maíz.	36
<b>CAPITULO II. Metodología</b>	
Figura 1. Flujograma Metodológico	55
Figura 2. Esquema del sistema de ensayo para la fenotipificación de la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en plántulas de maíz	62
Figura 3. Resumen gráfico del ensayo de fenotipificación de la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo en híbridos DTMA de maíz	66
Figura 4. Protocolo de determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y mesocotilo en híbridos DTMA de maíz	68
Figura 5. Protocolo de determinación iones solubles Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en la raíz primaria y mesocotilo en híbridos DTMA de maíz por fotometría de flama	71
Figura 6. Análisis histológico de la raíz primaria y el mesocotilo en híbridos DTMA de maíz por microscopía óptica	71
Figura 7. Gráfico representativo del procedimiento genotipificación por secuenciación (GBS)	75
Figura 8. Diagrama de pasos requeridos para el desarrollo de estudios de asociación del genoma completo (GWAS)	77
<b>CAPITULO III. Resultados.</b>	
Figura 1. Esquema de ejemplo del registro fotográfico de las respuesta hidrotópica de la raíz primaria de los 72 híbridos de DTMA de maíz bajo las condiciones de ensayo	90
Figura 2. Clasificación de la respuesta hidrotópica de la raíz primaria de 72 de los híbridos de DTMA de maíz	93
Figura 3. Clasificación fenotípica de la elongación del mesocotilo de los 72 híbridos de DTMA de maíz	95
Figura 4. Análisis de correlación de la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en 70 híbridos DTMA	96
Figura 5. Análisis de componentes principales de los rasgos en estudio Combinados	97

	Pág.
Figura 6. Análisis de correlación de nueve rasgos medidos en los 72 híbridos DTMA de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo	98
Figura 7. Imágenes de cortes transversales de raíz primaria del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H <sub>2</sub> O y prueba: K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) a 96 y 24h	100
Figura 8. imágenes de cortes transversales de mesocotilo del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H <sub>2</sub> O y prueba: K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) a 96 y 24h	105
Figura 9. imágenes de cortes transversales de la raíz primaria del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H <sub>2</sub> O y prueba: K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) a 96 y 24h	106
Figura 10. imágenes de cortes transversales de la raíz primaria del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H <sub>2</sub> O y prueba: K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) a 96 y 24h	114
Figura 11. Análisis de los 335,931 SNPs de los 72 híbridos DTMA de maíz	124
Figura 12. Cladograma de distancias genéticas entre los 72 DTMA analizados (datos filtrados) construido mediante el método de vecino más cercano	126
Figura 13. a y b. Gráficos cuantil-cuantil QQ plot que muestran los valores esperados de p y los valores observados para los SNPs usados en el GWAS	128
Figura 14. a y b. Gráficos cuantil-cuantil QQ plot que muestran los valores esperados de p y los valores observados para los SNPs usados en el GWAS	129
Figura 15. Mapa de calor del efecto fenotípico de los SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo seleccionados por GWAS de los 72 híbridos DTMA de maíz (TASSEL v.5.2.50 y GAPIT R package)	132
Figura 16. a. Clasificación en términos ontológicos ( <i>Go: terms</i> ) de las funciones moleculares, biológicas y la localización de los genes asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria para los 72 híbridos DTMA; b. Clasificación en términos ontológicos ( <i>Go: terms</i> ) de las funciones moleculares, biológicas y localización de genes asociados a la elongación del mesocotilo para los 72 híbridos DTMA de maíz. Se indica el número de genes asociados en cada categoría	134
 <b>CAPITULO IV. Discusión</b>	
Figura 1. Formación de aerénquima en cortes transversales de raíz primaria (a) y mesocotilo (b) de híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico a 96 horas de exposición, 10X.	159



## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Assay system for mesocotyl elongation and hydrotropism of maize primary root in response to low moisture gradient	183
Anexo 2. Ensayo de la respuesta hidrotrópica Eapen., et al (2015)	196
Anexo 3. Ensayo de Elongación del mesocotilo. Nieto-Sotelo et al. (2012)	198
Anexo 4. Curvas cinéticas de la respuesta hidrotrópica	200
Anexo 5. Respuesta hidrotrópica de la raíz primaria bajo dos sistemas de ensayo diferentes	201
Anexo 6. Respuestas de los rasgos fenotípicos medidos bajo las condiciones del sistema de ensayo	202
Anexo 7. Correlación entre las respuestas de los rasgos fenotípicos medidos a las condiciones del sistema de ensayo	204
Anexo 8. Potencial osmótico de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz	205
Anexo 9. Potencial osmótico del mesocotilo bajo las condiciones del sistema de ensayo de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz	206
Anexo 10. Potencial osmótico en raíz primaria y mesocotilo de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz	207
Anexo 11. Peso fresco vs peso seco de raíz primaria y mesocotilo bajo las condiciones hídricas del ensayo	208
Anexo 12. Correlación entre las respuestas de los rasgos anatómicos medidos en cortes de raíz primaria y mesocotilo bajo las condiciones del sistema de ensayo	209
Anexo 13. Respuestas fenotípicas anatómicas que difieren en mesocotilo bajo las condiciones del sistema de ensayo	210
Anexo 14. Marcadores comunes potencialmente asociados a la respuesta Hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo por los estudios de asociación (GWAS) aplicados	211
Anexo 15. Variables alélicas mapeadas en los SNPs potencialmente asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo por los estudios de asociación (GWAS) aplicados	212
Anexo 16. SNPs potencialmente asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo por los estudios de asociación (GWAS) aplicados	213
Anexo 17. Gráficas de enriquecimiento y coexpresión de genes asociados a la respuesta hidrotrópica	214
Anexo 18. Gráficas de enriquecimiento y coexpresión de genes asociados a la elongación del mesocotilo	217

## GLOSARIO

<b>CAMOCO</b>	<i>(Co-analysis of molecular components, por sus siglas en ingles)</i>
<b>CC_num</b>	<i>(Número de células corticales, por sus siglas en ingles)</i>
<b>CF_num</b>	<i>(Número de filas celulares, por sus siglas en ingles)</i>
<b>CMLM</b>	<i>(Compressed mixed linear model, por sus siglas en ingles)</i>
<b>COB</b>	<i>(Co-expression browser, por sus siglas en ingles)</i>
<b>CYMMIT</b>	<i>(Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo)</i>
<b>DTMA</b>	<i>(Drought Tolerant Maize for Africa, por sus siglas en ingles)</i>
<b>EC</b>	<i>(Elongación del coleóptilo, por sus siglas en ingles)</i>
<b>ECMLM</b>	<i>(Enriched compressed mixed linear model, por sus siglas en ingles)</i>
<b>EH</b>	<i>(Elongación de la hoja, por sus siglas en ingles)</i>
<b>EM</b>	<i>(Elongación del mesocotilo)</i>
<b>ET</b>	<i>(Elongación del tallo, por sus siglas en ingles)</i>
<b>FAO</b>	<i>(Food and Agriculture Organization of the United)</i>
<b>GBS</b>	<i>(Genotyping by Sequencing, por sus siglas en ingles)</i>
<b>GWAS</b>	<i>(Genome-wide association study, por sus siglas en ingles)</i>
<b>GO</b>	<i>(Gene Ontology, por sus siglas en ingles)</i>
<b>QTL</b>	<i>(Quantitative Trait Locus, por sus siglas en ingles)</i>
<b>MLM</b>	<i>(Mixed linear model, por sus siglas en ingles)</i>
<b>MX_num</b>	<i>(Número de vasos de metaxilema, por sus siglas en ingles)</i>
<b>MXVA</b>	<i>(Área del metaxilema, por sus siglas en ingles)</i>
<b>LRP</b>	<i>(Longitud de la raíz primaria, por sus siglas en ingles)</i>
<b>LSR</b>	<i>(Longitud de la raíz seminal, por sus siglas en ingles)</i>
<b>RACs</b>	<i>(Raíces asociadas al nudo coleoptilar, por sus siglas en ingles)</i>
<b>RH</b>	<i>(Respuesta hidrotropica)</i>
<b>RNAseq</b>	<i>(RNA Sequencing, por sus siglas en ingles)</i>
<b>RXSA</b>	<i>(Área transversal del corte, por sus siglas en ingles)</i>
<b>qRT-PCR</b>	<i>(quantitative-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)</i>
<b>SNP</b>	<i>(Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en ingles)</i>
<b>SR</b>	<i>(Raíces seminales, por sus siglas en ingles)</i>
<b>TCA</b>	<i>(Área del cortex, por sus siglas en ingles)</i>
<b>TSA</b>	<i>(Área transversal del vástago, por sus siglas en ingles)</i>
<b>USDA</b>	<i>(The U.S. Department of Agriculture)</i>

## RESUMEN

El estrés hídrico por sequía es el principal factor limitante para la agricultura, el cuál condiciona la seguridad alimentaria y la economía de los pueblos. El estudio e identificación de rasgos agronómicos y genes asociados a mecanismos de tolerancia a la escases de agua en etapas tempranas de desarrollo en un modelo genético como el maíz resulta de interés dada su enorme diversidad fenotípica y genotípica, al igual que por su potencial uso en programas de mejoramiento del cultivo. Este trabajo tuvo como objetivo principal identificar genes asociados con la variación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo bajo condiciones de estrés hídrico. Estos son dos mecanismos de evasión al estrés, donde en el primero: las raíces cambian la dirección de su crecimiento hacia un gradiente de humedad superior y en el segundo el crecimiento del mesocotilo permite la emergencia, el establecimiento en la superficie y el inicio de la actividad fotosintética de la plántula de maíz. La determinación fenotípica de los rasgos en estudio requirió el diseño y validación de un sistema de ensayo que simuló condiciones de estrés hídrico en laboratorio con bajos porcentajes de humedad relativa (%HR) y potenciales hídricos ( $\Psi_w$ ) en los órganos en estudio, lo que permitió medir la variación de las respuestas en 72 híbridos DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) de maíz pertenecientes a una colección de 272 híbridos provenientes de cruza entre líneas elites y suministrados por el Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT). Se encontró correlación entre la respuesta hidrotrópica y la elongación del mesocotilo con el mantenimiento del crecimiento y desarrollo de la plántula bajo las condiciones de ensayo al igual que la asociación potencialmente ventajosa entre una respuesta hidrotrópica robusta y la elongación del mesocotilo alta en plántulas de híbridos DTMA de maíz con una tolerancia mejorada a condiciones de estrés hídrico. A la par, fueron procesados los datos genómicos correspondientes a los 72 híbridos en estudio obtenidos por GBS (*genotyping by sequencing, por sus siglas en inglés*), suministrados por el CIMMYT y de los cuales se usaron un total de 335,391 SNPs (*single nucleotide polymorphism, por sus siglas en inglés*) para el desarrollo del estudio de asociación del genoma completo (GWAS). El análisis del estudio permitió asociar 172 SNPs a la respuesta hidrotrópica de la raíz y 91 SNPs a la elongación del mesocotilo

distribuidos a lo largo de los 10 cromosomas del maíz y a partir de ellos se asociaron potencialmente 86 y 47 genes candidatos a los rasgos, respectivamente sin encontrar genes coincidentes entre ellos. Los genes asociados a los rasgos fenotípicos estudiados codifican para proteínas involucradas en actividades catalíticas, metabólicas, hormonales, de transporte de azúcares, unión y reparación de ácidos nucleicos, movimiento de componentes celulares e involucran procesos localizados en membrana y la pared celular en respuesta a estreses bióticos y abióticos. La presente tesis aporta una enorme cantidad de información relacionada con la tolerancia a condiciones de estrés hídrico asociada a la variación de los dos rasgos en estudio e incentiva a continuar con su análisis con el propósito de establecer perfiles de expresión, definir mecanismos celulares y moleculares de su asociación que corroboren su actividad en poblaciones robustas y en maíces de diversos orígenes.

## ABSTRACT

Water stress caused by drought is the main limiting factor for agriculture, which conditions food security and the economy of world population. Identification and analysis of agronomic traits and genes associated with mechanisms of tolerance to water scarcity in plants at early developmental stages in a genetic model such as maize is of great interest given its enormous phenotypic and genotypic diversity, as well as their potential in the development of plant breeding programs. The main objective of this work was to identify genes associated with two traits: (1) variations in the primary root hydrotropic response and (2) the elongation of the mesocotyl under water stress conditions. The two traits underline mechanisms of stress avoidance in which roots change the direction of their growth towards a greater water potential and the mesocotyl growth allows the emergence, establishment on the soil surface, and initiation of the photosynthetic activity of the seedlings.

The phenotypic analysis of these traits required the design and validation of a new test system that simulated conditions of water stress in the laboratory with low percentage of relative humidity (% RH) and low water potential ( $\Psi_w$ ). In this study such test-system was designed and validated analyzing the responses in 72 DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) hybrids belonging to a collection of 272 hybrids of crosses between elite lines, which were supplied by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). We identified a significant correlation between the hydrotropic root response and the mesocotyl capacity to elongate under stressful condition, and these traits correlated also with the robust maintenance of the growth and development of the seedling under the test conditions. At the same time, the genomic data corresponding to the 72 hybrids under study obtained by GBS (genotyping by sequencing) with a total of 335,391 SNPs (single nucleotide polymorphisms) were used for the development of the genome-wide association study (GWAS). This study allowed us to associate 172 SNPs (distributed along 10 chromosomes of maize) to the root hydrotropic response and 91 SNPs to the mesocotyl elongation. Based on this analysis, 86 and 47 candidate genes were potentially identified and associated with these traits, respectively. No matching genes were found between them. The genes associated with these traits included sugar

transporters, proteins involved in catalytic, metabolic, hormonal, carriers, nucleic acid binding and repair activities, as well as with movement of cellular components, and processes localized at the plasma membrane and cell wall in response to stress. This thesis provides a great amount of information related to tolerance to water stress conditions associated with the variation of the traits under study and encourages us to continue with their analysis to establish gene expression profiles, and define cellular and molecular mechanisms that corroborates its activity in robust populations and in maize landraces of different origins.

## I. INTRODUCCIÓN

El florecimiento de un gran porcentaje de las civilizaciones antiguas se debió a sus habilidades para producir, almacenar y distribuir semillas de maíz en el continente americano antes de la llegada de los europeos; de arroz en las grandes civilizaciones asiáticas; y de cebada en Etiopía y el nordeste de África [1-3]. Más de nueve mil años necesitó la agricultura para convertirse en la principal fuente de sustento de los pueblos que empezaron a cosechar plantas comestibles; producto del proceso lento de domesticación, que se dio de manera independiente en cada uno de los cinco continentes y que marcó el inicio al periodo Neolítico [1-5]. Entonces, surgió la agricultura como la respuesta adaptativa del hombre a los numerosos factores de estrés ambiental, que modificaron su dieta y sus hábitos para sobrevivir [5-7].

Los cereales juegan un papel crucial en el propósito de los gobiernos por garantizar la seguridad alimentaria y acabar con el hambre en sus países [1,8-9]. Dado su alto contenido en carbohidratos, los cereales son la base energética de más del 70% por ciento de la mayoría de las dietas, especialmente de las poblaciones más pobres en el mundo en desarrollo. En contraste, para los Estados Unidos y algunos países europeos, los cereales representan menos del 40% por ciento del aporte energético en carbohidratos. El cultivo de algunos de ellos se restringe casi en su totalidad a regiones climáticas templadas (cebada, avena y el centeno); mientras cultivos como el trigo y el maíz, se producen en una amplia gama de latitudes, donde quiera que las condiciones climáticas sean idóneas para el desarrollo de variedades adaptadas [8-9].

Se estima que la producción mundial de cereales para el año 2022 alcance los 2764 millones de toneladas, cifra que describe una disminución interanual cercana al 1.8% (50.8 millones de toneladas) en referencia a la producción pronosticada por el USDA al inicio del año; como resultado, de las fuertes y prolongadas sequías registradas en el mundo, con especial dureza en el hemisferio norte del continente americano. En consecuencia, el rendimiento de cereales secundarios (maíz, sorgo, mijo, cebada, avena y centeno) por primera vez en cuatro años registró una reducción de alrededor del 2.8% (1.3 millones de toneladas), lo que provocó una nueva estimación de su rendimiento en

alrededor de 1467 millones de toneladas, que se aleja de las proyecciones récord pronosticadas para este año [10-11]. Donde, la histórica reducción en la producción de cereales secundarios se adjudica principalmente a la disminución en el rendimiento del maíz; el cuál, se estima cercano a los 1168 millones de toneladas para el nuevo ciclo y donde México aportará aproximadamente 27600 millones de toneladas para el periodo 2022/23 a pesar de sufrir una reducción de más del 0.4% [11].

La reducción en los rendimientos de cereales a nivel mundial provoca altos niveles de inseguridad alimentaria, en especial de aquellos países con requerimientos de su asistencia (33 en Africa, 9 en Asia y 2 en América Latina y el Caribe); los cuales, le suman un elevado crecimiento poblacional, constantes conflictos sociales, condiciones de estrés hídrico por sequía e inundaciones que continuarán afectando los cultivos y por ende la disponibilidad de alimentos [12-14].

La densidad poblacional en el mundo durante el año 2022; se estimó en más de 8 billones de habitantes, con una proyección de ascenso superior a los 2 billones para el 2050, concentrándose la mayor parte del crecimiento en las regiones menos desarrolladas [15-16]. México aporta más de 126 millones de habitantes al total, convirtiéndolo en el decimo país más poblado del mundo y el primero entre los hispanohablantes [17-18]. En consecuencia, los sistemas agrícolas son presionados a producir un 60% más de alimentos a nivel mundial, y un 100% más en los países en vías de desarrollo [12,19-20]. La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, por sus siglas en inglés*) prevé un aumento del 14% de la producción agrícola mundial para el año 2030, manteniendo los compromisos celebrados con el Acuerdo de París, emanado de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático en 2015 y bajo el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para erradicar el hambre, lograr la seguridad alimentaria, mejorar la nutrición y promover la agricultura sostenible [19-20]. No obstante, la producción agrícola es susceptible a numerosas condiciones de estrés que pueden afectar cualquier estimación.



La escasez de agua es el principal factor limitante para el sistema agrícola. Está condición de estrés disminuye drásticamente la producción de los cultivos, contribuye con el deterioro del suelo (matriz fisicoquímica y biológica que contiene el agua, los nutrientes, aire, calor y permite el intercambio con microorganismos y el medio) y agota los pastizales; lo cuál, provoca desequilibrio en la economía mundial que en casos extremos puede llegar a causar fuertes hambrunas y hasta la muerte de personas y animales. Datos recopilados por La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2012) estiman que el 70% por ciento de las extracciones de agua dulce a nivel mundial tienen como propósito el riego agrícola y más del 90% son de uso consuntivo [21-25]. Las tasas estimadas de crecimiento y la demanda agrícola de recursos de agua dulce son insostenibles [23]. La sequía a su vez es responsable del aumento de la migración de las zonas rurales a las urbanas, lo que impone una presión adicional para la producción de alimentos [23-25].

El cultivo de maíz para México no solo es la base fundamental de su alimentación, también de su cultura, sus tradiciones y economía [3-7,26]. El déficit hídrico hace vulnerable al desarrollo agrícola en México, que pese a su extensa superficie (197.3 millones de hectáreas), las condiciones climáticas óptimas para la producción de maíz, posee una limitada disponibilidad de zonas naturales para su práctica, así como limitadas condiciones climáticas óptimas para la producción de maíz. Además, la complejidad física de su territorio y la calidad de los suelos; dificulta el acceso a los recursos necesarios para el desarrollo de los cultivos [26-28]. Las prácticas agrícolas se desarrollan en condiciones de temporal y riego, siendo la práctica de temporal particularmente vulnerable a las alteraciones en la precipitación estacional [26-29]. De igual forma, se ha descrito un mayor impacto de las sequías al Noroeste y de inundaciones al Sureste del país; causados por fenómenos meteorológicos extremos y por su débil estructura social y económica [26-30]. De acuerdo con Villers y Trejo (1997) [29], más de la mitad del territorio del país (entre el 50% y el 57%) cambiará sus condiciones climáticas y los habitantes de los ecosistemas, incluida la población humana, deberán adaptarse a las nuevas condiciones [30].

Por tanto, es urgente el desarrollo de estrategias que garanticen la seguridad alimentaria y permitan detectar a tiempo las respuestas al estrés en los ecosistemas, tanto a escala regional como global para aprovechar las respuestas positivas, en pro de mitigar los impactos adversos y potencialmente irreversibles. El presente estudio pretende identificar genes asociados con la respuesta hidrotópica robusta de la raíz y la elongación del mesocotilo en condiciones de estrés hídrico en híbridos Drought Tolerant Maize for Africa (DTMA), que posteriormente puedan emplearse como indicadores de tolerancia al estrés hídrico y rasgos de carácter agronómico, para su potencial uso en programas de mejoramiento vegetal; aplicando para este propósito técnicas fisiológicas, microscópicas, bioinformáticas y moleculares.

## CAPITULO I. Estado del arte

### 1. Estrés hídrico

El estrés hídrico se produce como una respuesta fisiológica, morfológica, bioquímica y/o molecular de las plantas a la limitada disponibilidad de agua, las temperaturas extremas, los altos niveles de salinidad en el suelo, la baja presión atmosférica y/o la combinación de estos factores abióticos; siendo esta primera condición, la principal limitante del crecimiento, desarrollo, reproducción y rendimiento de los cultivos [31-33]. La severidad de los efectos adversos que provoca en las plantas depende en gran medida de la etapa de desarrollo y de la duración e intensidad de exposición al estrés [31-36]. En ecofisiología, los términos déficit hídrico y sequía son clasificados como dos condiciones de estrés hídrico; donde la primera hace referencia a la limitación hídrica de los tejidos de la planta que puede presentarse también en otras condiciones de estrés (alta salinidad, bajas temperaturas, etc.) y la segunda a la interacción entre escasas precipitaciones, baja disponibilidad de agua, altas temperaturas y alta irradiación [35-36]. A pesar de esto, los tres términos: estrés hídrico, déficit hídrico y sequía son usados con frecuencia como sinónimos por los investigadores; ya que los tres definen limitaciones en el funcionamiento óptimo de las plantas ante la baja disponibilidad de agua [31-36]. En 1973 Hsiao [36] clasificó el estrés hídrico por déficit hídrico en tres niveles:

1. Leve: plantas con óptimo riego bajo leve demanda evaporativa, con un contenido relativo de agua (CRA) en un 8-10% ó un potencial hídrico ( $\psi_w$ ) entre -0.20 y -0.8 MPa.
2. Moderado: un CRA entre un 10-20% y  $\psi_w$  entre -0.81 y -1.49 MPa.
3. Severo: disminución del CRA mayor al 20% y  $\psi_w$  mayor a -1.5 MPa. (15 bares) [33,36].

Por su parte, el estrés hídrico por sequía ha sido clasificado en relación con el periodo en que el cultivo es expuesto al estrés en tres tipos:

1. Sequía temprana: la cual se desarrolla dentro de los primeros 15 días después de siembra, afectando la germinación y establecimiento de la planta.

2. Sequía intermitente: que se caracteriza por periodos de sequía cortos a lo largo del ciclo fenológico de la planta.
3. Sequia terminal: la cual afecta por un tiempo prolongado la fase de floración y llenado de grano [31-33,38].

Para el rendimiento de los cultivos agrícolas el estrés hídrico es el principal factor limitante, convirtiendo a este factor abiótico en tema central de numerosos estudios, que en su mayoría analizan las fases reproductivas de las plantas, ante el interés entre los mejoradores por sus repercusiones directas sobre la productividad de los cultivos [31-38]. No obstante, el estrés hídrico durante las etapas tempranas de desarrollo de las plántulas provoca sistemas radicales poco profundos, menor elongación del brote y la disminución del peso seco de estos órganos; lo que pone en riesgo la continuidad del desarrollo del cultivo y por ende su productividad [39-43]. Lo anterior, motiva el interés por el estudio de los efectos del estrés hídrico sobre los órganos en desarrollo bajo la superficie del suelo (las raíces, mesocotilo, etc.), en relación con el rol que juegan en el paso de un desarrollo escotomorfogénico al establecimiento de la planta en el suelo, su emergencia sobre la superficie, el vigor temprano y el paso al desarrollo fotosintético [39-44].

### **1.1. Estrés hídrico por sequía en México**

Históricamente, las sequias continuas han afectado al territorio mexicano al grado de ser consideradas un factor decisivo en el colapso de sus civilizaciones prehispánicas; problemática que continúa amenazando la seguridad alimentaria y económica del país hasta el día de hoy [29,45-46]. Su localización geográfica tropical y sub-tropical, influye en las condiciones climáticas áridas y semi-áridas de su territorio, que lo hacen altamente vulnerable al estrés hídrico por sequia cíclica, a la variación significativa de los patrones de lluvias y a los fenómenos meteorológicos extremos [29, 45-48]. Es así, como anualmente al menos una cuarta parte de México experimenta algún grado de sequía<sup>1</sup>, sus acuíferos sufren sobreexplotación, se ha incrementado degradación de sus suelos y

---

<sup>1</sup> CONTRERAS, Carlos (2005). *“En tanto que como definición de sequía operacional: son todas aquellas que identifican el principio, el final y el grado de severidad de la misma. Desde el punto de vista disciplinario, las sequías pueden clasificarse en meteorológica, hidrológica, agrícola y socioeconómica.”* (p.119).

se prevé la reducción en más del 10% en sus precipitaciones, junto con el incremento de la temperatura; todo esto potenciado por el cambio climático, factores sociales (crecimiento poblacional, desigualdad económica) y la priorización por la mitigación antes que por la prevención [45-49].

La mayor demanda de recursos hídricos corresponde al campo mexicano, el cual debe prepararse mejor para dar respuesta a la sequía, a través de estrategias que garanticen la supervivencia de los cultivos, su productividad y su desarrollo económico [45-52]. Y es que la agricultura, en especial la de temporal es altamente sensible a la sequía agrícola; definida como: la falta de humedad del suelo provocado por la falta de lluvias, las altas temperaturas y la evaporación que impiden el desarrollo exitoso de cualquier cultivo durante un tiempo determinado [46-52]. Por lo tanto, la investigación científica debe ser estimulada en la búsqueda de nuevos conocimientos que puedan explicar los mecanismos de respuesta y tolerancia a la sequía, junto con la identificación de rasgos y genes de variedades tolerantes dentro de la diversidad biológica vegetal, que puedan ser utilizados para el mejoramiento de los cultivos [47-52].

## 2. Maíz

El maíz (*Zea mays* L.), el trigo (*Triticum sp*), el arroz (*Oryza Sativa*) y el sorgo (*Sorghum bicolor*) son comúnmente conocidos bajo la denominación de cereales; base dietaria de la población mundial [53-56]. Su eficiente producción garantiza la disponibilidad de alimentos y requerimientos nutricionales (proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales) necesarios para satisfacer a una población en constante crecimiento; que se estima superará los 9100 millones de personas para el año 2050 [53-58]. Dentro del grupo de los cereales, el maíz es el cultivo más representativo de México; siendo el más extensamente sembrado por hectárea a nivel mundial y el tercero en rendimiento después del trigo y el arroz [58-60]. Este regalo de Mesoamérica para el mundo, constituye el punto de origen de la agricultura en el continente americano, que gracias a su plasticidad ha podido adaptarse a diversas condiciones y ambientes geográficos dentro y fuera del territorio mexicano [53-60]. El consumo promedio de maíz en México es superior a los 196.4 Kg per cápita al año; demanda que se satisface casi en su

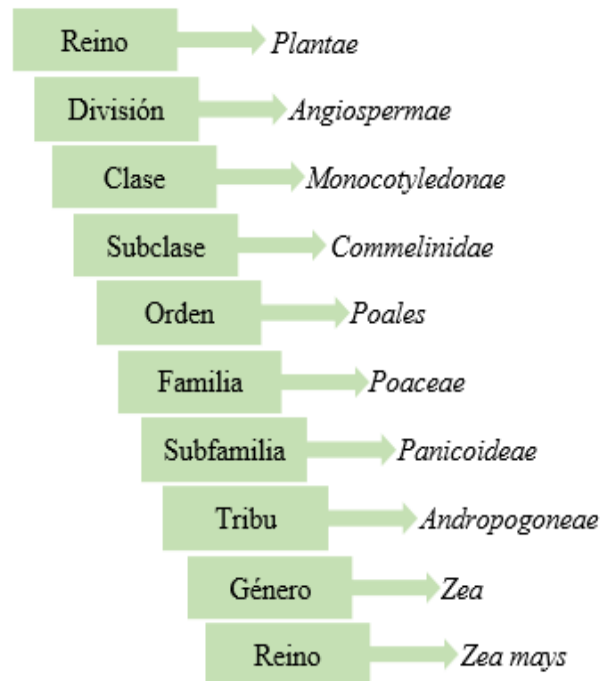
totalidad con la producción de maíz blanco (86.94%), que es destinado principalmente para el consumo humano y en menor proporción con la producción de maíz amarillo (13.06%) usado para alimentación animal y procesos industriales [60]. Además de su aprovechamiento como base nutricional humana y animal, este cultivo multipropósito es materia prima en la fabricación de numerosos productos industriales (maltodextrinas, aceite de maíz, jarabe de maíz, productos de fermentación y destilados) y recientemente en la producción de biocombustibles [53-60].

Durante el periodo 20/21, la agricultura mexicana enfrentó la segunda sequía más grave reportada en registros recientes después de la ocurrida en 2011, como resultado directo del fenómeno de *La Niña*; el cual provocó escasez de lluvias en más de tres cuartas partes del país (los estados de Sonora, Chihuahua, Guerrero, Sinaloa y Tamaulipas entre los más afectados), provocando la reducción de un 3.1% en la producción nacional de maíz al mes de mayo/21 con respecto a la reportada el año agrícola anterior [43-45,53]. A pesar de la continuidad en los efectos climáticos del fenómeno de *La Niña* y su transición al del *Niño*, se estima una producción de maíz superior a los 27.6 millones de toneladas para el periodo 2021/22; pronósticos que son altamente dependientes a los efectos del cambio climático, a las potenciales crisis sociales y económicas globales [52,60]. Así, potenciales reducciones en la producción de maíz impactarían la economía mexicana y la cobertura de sus necesidades locales; lo cual podría ser amortiguado a través de la siembra de variedades de maíz tolerantes a la sequía, garantizando su suministro [43-48,61].

## **2.1. Origen y generalidades del maíz.**

El maíz (*Zea mays* L.) surgió aproximadamente hace más de 9000 años AC, localizándose geográficamente en al área entre México meridional y Guatemala a partir de un ancestro silvestre anual el teocintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) que, tras numerosos procesos de domesticación, cuyo tiempo y localización exacta no se pueden precisar. Se transformó en lo que conocemos hoy como maíz [53-54,62]. Su semilla se distribuyó por toda Mesoamérica y de ahí al resto del continente americano usando principalmente la cuenca de los ríos como corredores biológicos; proceso que se

respalda con evidencia geológica (polen y fitolitos: restos de origen vegetal mineralizados) encontrada en diversas zonas del país; arribando posteriormente al continente europeo tras el contacto entre el viejo mundo y el nuevo mundo y desde allí probablemente a los continentes restantes [7,57]. De esta manera, el cultivo de maíz logró adaptarse a una amplia gama de condiciones climáticas y geográficas [7,61-63].



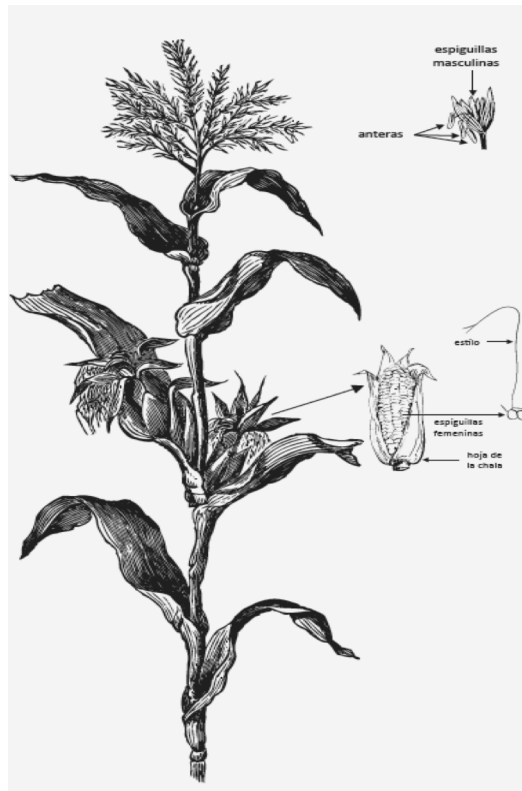
**Figura 1.** Clasificación taxonómica del maíz [62].

Taxonómicamente el maíz ha sido clasificado dentro de la familia Poaceae (Graminae), junto con otros cultivos de importancia económica tales como: el trigo, el arroz, la avena, el sorgo, la cebada y la caña de azúcar; los cuales de acuerdo con evidencias fósiles provienen de un ancestro común de aproximadamente 70 millones de años de antigüedad del periodo cercano al final del reinado de los dinosaurios [54,62-64]. Así mismo, esta gramínea anual, perenne de origen mesoamericano pertenece al género *Zea*; el cual está constituido por la especie silvestre (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) conocida comúnmente como teosinte y la domesticada (*Zea mays* L. spp *mays*) maíz (Figura 1) [61-64].

Esta monocotiledónea anual de variable altura, tamaño y forma puede llegar a medir hasta cinco metros de altura; lo que dependerá de su origen, etapa de desarrollo, finalidad y condiciones ambientales de crecimiento [62-64]. El maíz tropical describe plantas altas, con abundantes hojas (hasta 30 por tallo), un crecimiento vegetativo elevado, por lo general sin macollos y un sistema radical fibroso; lo que contrasta con plantas de menor altura y abundante follaje cultivados en tierras altas, de importancia forrajera y productiva en maíces dulces [54,62-64]. Está planta monoica (desarrolla dos tipos de inflorescencias); una femenina denominada comúnmente con el nombre de mazorca (almacén de reserva), localizada hacia la mitad superior de la planta y la cual surge a partir de una o dos yemas laterales ubicadas en las axilas de las hojas y una masculina o panoja, que se encuentra localizada en la zona terminal superior de la planta, donde sobresale una espiga central con varias ramificaciones con flores masculinas productoras de abundante polen (Figura 2) [61-64].

La siembra tradicional del maíz es de temporal, lo que la hace altamente susceptible al déficit hídrico; ya que depende de las precipitaciones anuales, donde periodos de escasa humedad repercuten negativamente sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo [64-65]. Con el propósito de afrontar los retos que impone el cambio climático y así garantizar la producción del grano, se hacen necesarios estudios de mejoramiento del cultivo centrados en la búsqueda y desarrollo de genotipos de maíz capaces de tolerar diversas condiciones de estrés hídrico por sequía y adaptados diversos métodos de siembra con un uso más eficiente del agua [59, 62-66].





**Figura 2.** Estructura de la planta de maíz [62].

## **2.2. Efectos de la sequía sobre el maíz.**

Los efectos de la baja disponibilidad de humedad sobre el maíz son dependientes de los requerimientos específicos de cada tejido en relación con la etapa de desarrollo en que se encuentre la planta y al tiempo de exposición al estrés [28,39,67]. Esta gramínea anual describe un ciclo fenológico común que va desde la germinación hasta la madurez, dividido por dos grandes fases: una vegetativa (V) y otra reproductiva (R), que a su vez agrupan las cuatro etapas de desarrollo de la planta; el primero de ellos el crecimiento de las plántulas, el segundo el crecimiento vegetativo, el tercero la floración y fecundación y el cuarto el llenado del grano y la madurez fisiológica (Tabla 1) [68-69].

**Tabla 1.** Fases y etapas de desarrollo del maíz [68].

<b>Fases</b>	<b>Etapas de Desarrollo</b>	
<b>Vegetativa</b>	VE	Germinación y emergencia
	V1	Primera hoja
	V2	Segunda hoja
	V2	Tercera hoja
	V(n)	Enésima hoja
	VT	Floración masculina
<b>Reproductiva</b>	R1	Floracion femenina
	R2	Grano acuoso
	R3	Grano lechoso
	R4	Grano masoso
	R5	Grano dentado
	R6	Madurez fisiológica

La fase reproductiva del maíz se ha definido como el periodo más sensible a la escasez de agua; siendo la polinización la etapa crítica de la cual depende directamente el rendimiento del cultivo [68-69]. Por lo tanto, la falta de humedad puede causar reducción del rendimiento del cultivo, acompañado por la reducción de la biomasa, el tamaño y el número de semillas provocando enormes pérdidas económicas [66-69]. Aunque los requerimientos de agua durante las primeras etapas de desarrollo (fase vegetativa) son bajos, el déficit en sus niveles óptimos puede provocar reducción en la tasa de crecimiento, prolongando el periodo vegetativo, afectando la emergencia y por ende el establecimiento de la planta en la superficie; lo que terminará repercutiendo sobre la fase reproductiva y su rendimiento [31-34,69]. La última etapa de desarrollo del maíz (madurez fisiológica) se considera insensible al déficit hídrico ya que no tiene repercusiones sobre el rendimiento del cultivo [39,67].

### **2.3. Mecanismos de respuesta del maíz al estrés hídrico.**

La plasticidad y resiliencia propia de las plantas, les permite tolerar y adaptarse a condiciones estresantes mediante la activación de diversos mecanismos de respuesta que están ligados a sus rasgos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares [30-34,70]. Por lo tanto, el maíz con el propósito de sobrevivir, reproducirse y mantener su productividad en condiciones de baja disponibilidad de agua, puede usar los siguientes mecanismos:

a *Escape*: este mecanismo plantea la posibilidad de sincronizar la fenología del cultivo de maíz con la disponibilidad de agua en el suelo y el cual a su vez dependerá de la etapa en que la planta sea expuesta al estrés hídrico por sequía (sequía temprana, intermitente o terminal) [30,70-73]. Así, con el propósito de escapar al estrés, el maíz puede completar su ciclo de vida de forma precoz (madurez temprana) ó retrasándolo (madurez tardía), usando eficientemente el agua disponible y alcanzando un rendimiento aceptable [70-71].

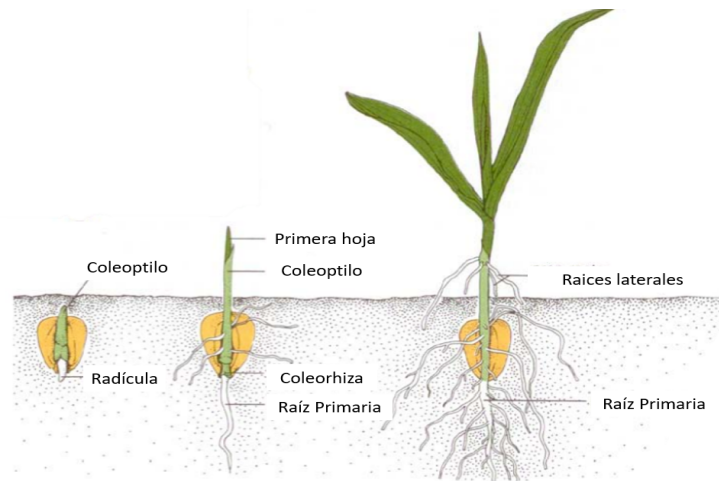
b) *Evasión*: el maíz es capaz de mantener el funcionamiento de numerosos procesos fisiológicos y metabólicos; evitando la pérdida de agua y manteniendo su absorción a través de cambios en características fenotípicas, funcionales o hidráulicas de algunos tejidos que permiten proteger a la planta de la exposición al estrés hídrico [30,70-72]. Rasgos anatómicos, arquitectónicos y trópicos en la hoja (enrollamiento de la hoja, cocción, la temperatura del dosel, el cierre de estomas, etc.) y de la raíz (elongación, longitud, número de raíces, hidrotropismo, etc.) son útiles en la evasión a la sequía [30,70-71]

c) *Tolerancia*: este mecanismo es el potencial que posee la planta para mantener su crecimiento y desarrollo bajo estrés hídrico por sequía [30,70-71]. Este proceso es altamente complejo, ya que se asocia con condiciones de estrés persistente, en el cual las plantas han desarrollado numerosas adaptaciones a nivel fisiológico y niveles moleculares para conferir tolerancia a la sequía y que le permite un rendimiento económico satisfactorio [70-72]. Otros procesos que han sido implicados con tolerancia a la sequía por parte de las plantas son: la osmoprotección por ajuste osmótico y canales de agua, la acción de reguladores del crecimiento de las plantas (hormonas), sistema de defensa de barrido de antioxidantes proteínas, proteínas sensibles al estrés, factores de transcripción y vías de señalización [30,70-72].

## **2.4 Emergencia del maíz.**

La emergencia es una etapa del desarrollo del maíz caracterizada por la aparición de la plúmula (primera hoja), sobre la superficie del suelo y protegida por el coleóptilo; cuya estructura es empujada por la rápida elongación del mesocotilo y que cesa una vez el

extremo del coleóptilo llega a la superficie (Figura 3) [54,73-76].



**Figura 3.** Etapa de emergencia [74].

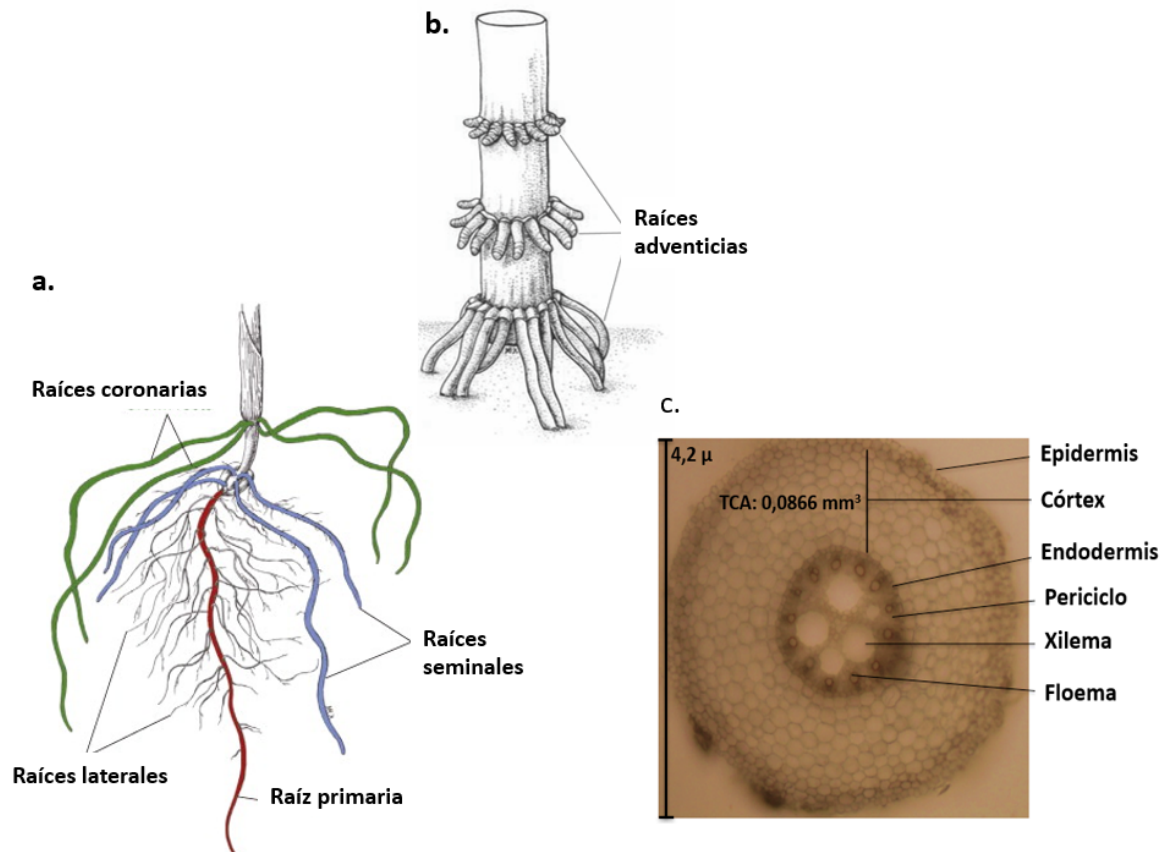
No obstante, la emergencia de la plántula es el resultado de numerosos procesos previos de desarrollo a nivel subterráneo, que se inicia con semillas viables de maíz bajo condiciones óptimas de oscuridad, humedad (al menos un 30% p/v) y temperatura; continuando con el desarrollo meristemático (radical y axilar), que genera cambios internos y externos y da paso a la aparición de la plúmula y la radícula durante la germinación [73-77]. La plasticidad en la tasa de crecimiento y longitud del sistema radical y del mesocotilo bajo la superficie del suelo durante la fase vegetativa, cumplen importantes roles que culminan con la emergencia de la plántula y que los convierte en potenciales indicadores de su vigor de emergencia y establecimiento vegetal [73-77]. El sistema de raíces y el mesocotilo son estructuras que se han adaptado a mecanismos de domesticación, cría y cambio climático; que han provocado diversos cambios (genotipo-fenotipo), que les ha otorgado tolerancia y que tienen potencial uso en programas de mejoramiento vegetal [44,78-82]

## **2.5. Sistema radical del maíz.**

El sistema de raíces del maíz funciona como anclaje de las plantas al suelo, permitiendo su exploración para su crecimiento, desarrollo y la absorción de agua y de nutrientes; jugando un papel crucial en el vigor de la planta [73,80-82]. Sin embargo, poco se conoce

sobre sus funciones durante el periodo previo a la emergencia [82-84]. El origen de su desarrollo se caracteriza por ser de dos tipos: el primero embrionario y el segundo post embrionario, siendo ambos altamente regulados a nivel genético, hormonal e influenciado por interacciones rizosféricas y condiciones medio ambientales (Figura 3) [85-86]. Inicialmente, surge la radícula del polo basal del embrión y con su alargamiento da paso al desarrollo de la raíz primaria (RP), mientras un número variable de raíces seminales (RS) se establecen desde el nodo escutelar (raíces embrionarias) [73,84-87]. Posteriormente, desde una célula del periciclo y/o célula endodérmica de la zona de diferenciación de la RP se forman nuevas y numerosas raíces laterales (RL) de origen post embrionario [53,82-84]. Las raíces laterales aumentan el área de absorción del sistema de raíces, haciéndose esenciales para la absorción de agua y nutrientes en plántulas jóvenes [82-87]. Aunque la RP puede ser relativamente funcional durante toda la vida de la planta, su importancia disminuye después del establecimiento de las plántulas, dejando de crecer y ramificarse [83-87].

Para etapas de desarrollo posteriores a la emergencia, cobra mayor importancia el desarrollo de raíces post embrionarias: numerosas RL que surgen del periciclo de todas las raíces, raíces que surgen de brotes que se forman en nodos de brotes consecutivos y de raíces nodales del maíz que se subdividen en: raíces coronarias y adventicias, dependiendo del nodo de origen subterráneos ó no subterráneos, respectivamente (Figura 4) [84-87].



**Figura 4.** Estructura anatómica y arquitectónica del sistema de raíces en maíz [88-89]. (c. Corte transversal de la raíz primaria de maíz 10X). TCA: área total del córtex.

La arquitectura de la RP está determinada por la presencia de varios tipos celulares, funcionalmente diversos y que orientados transversalmente describen: un sistema vascular central que contiene los elementos necesarios para el transporte de agua y nutrientes (xilema y floema), una capa celular más externa distinta de células de periciclo de paredes delgadas, seguidos de la corteza y la epidermis sin cutícula (Figura 4) [53,80-84]. Longitudinalmente, las raíces de maíz se pueden dividir en la cofia de la raíz, seguido del meristemo radical (RAM), la zona de alargamiento y la zona de diferenciación que se caracteriza por la presencia de pelos de raíz, que se forman en la raíz embrionaria y post embrionaria y tienen un papel crucial en la absorción de agua y nutrientes [44,80-89].

**2.5.1 El Hidrotropismo.** Las plantas son capaces crecer en dirección a un estímulo (la gravedad, la luz, el tacto, el agua, el oxígeno, etc.), a través de un fenómeno denominado: tropismo [90-95]. Es así como, las raíces de las plantas son capaces de direccionar su crecimiento al percibir la disminución del gradiente de humedad del suelo, orientándose hacia un área con un mayor porcentaje de humedad; en una respuesta conocida como: hidrotropismo [90-92]. Respuesta que juega un papel importante como mecanismo de evasión a la sequía y de sus efectos sobre las plantas [90-95]. El ambiente de crecimiento y desarrollo de las raíces, sumado al posible solapamiento ejercido por el gravitropismo hace que el estudio del hidrotropismo sea complejo y aún un amplio campo por explorar [90-94]. Se sabe que en *Arabidopsis thaliana*, una adecuada respuesta hidrotropica requiere regulación hormonal mediada por el ácido abscísico (ABA), auxinas, citoquininas y algunos genes transductores de sus señales [90-93]. Adicionalmente, se ha demostrado la intervención de los genes MIZ1 y MIZ2 a partir del estudio de mutantes; siendo el primero específico para hidrotropismo, capaz de codificar para una proteína de función desconocida y cuya sobreexpresión realza la respuesta hidrotropica (expresada en la estela y en la punta de la raíz), mientras que el segundo afecta al locus GNOM que codifica una proteína ARF-GEF; la cual está involucrada en el tráfico vesicular como factor de intercambio GDP/GTP y donde su actividad sobre PIN puede afectar el flujo de auxinas y por ende las respuestas hidrotropica y gravitropica [90-95]. El mecanismo molecular de la respuesta hidrotropica aun no es claro, los actores involucrados y sus funciones parecen ser ampliamente diferenciales en relación con la especie vegetal en estudio [90-95]. Por lo tanto, resulta de interés el estudio de la respuesta hidrotropica en un cultivo de importancia económica como: el maíz; así como el uso potencial de este rasgo fenotípico en el mejoramiento vegetal a condiciones de sequía, que a su vez brindaría información sobre sus mecanismos moleculares y permitiría la identificación de genes implicados en el proceso [92-94]. Lo cual se apoya con los resultados reportados por Eapen et al., (2017) [95] en sus estudios en campo sobre respuesta hidrotropica en maíz; donde encontraron correlación positiva entre la respuesta hidrotropica robusta de la raíz, con una mejor adaptación de la planta a condiciones de sequía y su rendimiento [95].

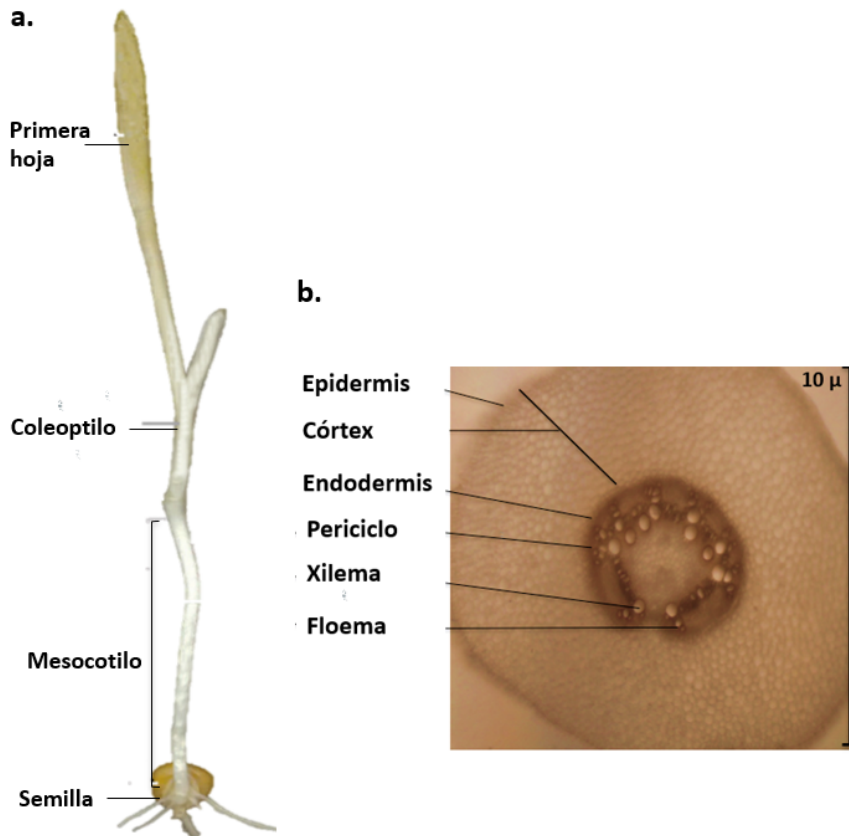
## 2.6. Mesocotilo del maíz.

El mesocotilo es el primer inter-nodo del tallo de la plántula de maíz, actúa como un puente que conecta la parte basal de la plántula con el nodo coleoptilar y el brote (Figura 5) [96-98]. Este órgano es crucial para el desplazamiento del coleóptilo (la vaina protectora que encierra las hojas jóvenes) sobre la superficie del suelo y asegurando el establecimiento del sistema radicular bajo el suelo a una profundidad adecuada [98-99]. Por lo tanto, el mesocotilo es fundamental en el vigor temprano de la plántula, su establecimiento en superficie y la transición del desarrollo escotomorfogénico (ausencia de luz como fuente de energía) al fotosintético (luz como fuente de energía) [96-100]. A pesar de que aun no son claros los mecanismos que rigen la elongación del mesocotilo, se sabe que la división y el alargamiento celular son estimulados a nivel hormonal por auxinas y giberelinas en especial; donde existe una estrecha regulación de la luz sobre el transporte y movimiento de auxinas del mesocotilo al coleóptilo estimulando positiva o negativamente su elongación [95,101]. El alargamiento del mesocotilo es inhibido por altas concentraciones de ABA, el bajo potencial hídrico, la exposición a radiaciones del espectro rojo, rojo-lejano, UV (ultravioleta) y azul; siendo dependiente de la intensidad y el tiempo de exposición, mediado por la acción de diversas enzimas (sintasa de óxido nítrico, endoglucanasas, poliaminooxidasa) [44,95,102].

La anatomía y morfología del mesocotilo se divide en diversas zonas. El tejido visto a través de un corte transversal (de afuera hacia adentro) describe la presencia de: epidermis, corteza y estela vascular central [44]. Longitudinalmente se observan tres zonas en el tejido: una primera zona aproximadamente a 1 mm del nodo coleoptilar (incluye células meristemáticas), una segunda zona a 3.0 mm bajo la zona anterior (contiene células de crecimiento rápido) y una tercera zona 5.0 mm más bajo cerca del nodo escutelar (presenta células maduras) (Figura 5) [100-102].

La elongación del mesocotilo mantiene una estrecha relación con el desarrollo de la raíz durante las fases previas a la emergencia [95-102].





**Figura 5.** Anatomía y arquitectura del mesocotilo en maíz [100]. (b. Corte transversal del mesocotilo del maíz 10X).

**2.6.1 Siembra profunda.** Es una práctica agrícola ancestral, empleada en zonas altas, áridas, semiáridas y con bajas precipitaciones pluviales [103-104]. Utilizada exitosamente en regiones del suroeste de los EE. UU., y algunas zonas del oeste mexicano, donde los pobladores nativos siembran variedades de maíz a profundidades mayores a 20 cm; aprovechando la humedad residual del suelo para su germinación [98,105]. El maíz es cultivado comúnmente entre 5 a 8 cm de profundidad, por lo que la implementación de la técnica de siembra profunda se ve sujeta a numerosos factores tales como: el tamaño de la semilla, la capacidad de elongación del mesocotilo, el área de siembra y la humedad de horizontes profundos del suelo [106-108].

Esta práctica agrícola requiere de intervención mecánica para incorporar semillas a una mayor profundidad en el suelo, reduciendo así el riesgo de desecación o efectos adversos a altas temperaturas cerca de la superficie. Además, las semillas pueden evadir

las dificultades extremas propias de la superficie del suelo, como posibilidad de ser arrastrada por el viento o las corrientes de agua, y también por la depredación. Las plantas poco profundas en la superficie pueden desarrollarse adecuadamente; sin embargo, pueden exponer su sistema de raíces, lo que puede ser perjudicial para la aptitud de las plantas [107-108].

Dado que la siembra profunda es una práctica agrícola alternativa que tiene una gran influencia en la germinación de las plantas y el rendimiento final del cultivo; la identificación de variedades de maíz tolerantes para la siembra profunda y con una respuesta hidrotropica robusta debería ser de suma importancia para su aplicación en la agricultura sostenible en tiempos de sequías inminentes debido a las crisis climáticas [80,109].

### **3. Mejoramiento genético en maíz**

El principal objetivo de los programas de mejoramiento se centra en la selección de genotipos relacionados a fenotipos identificados con características sobresalientes de interés [110-111]. Proceso que en el maíz ha sido desarrollando desde su domesticación, con la selección de características visuales de la panoja o del grano que se ajustaban a sus gustos y necesidades; los cuales a la fecha siguen siendo parámetros de selección que han ido evolucionando de la mano de los avances genéticos [110-113]. Siendo aprovechada la enorme diversidad genética del maíz, el fácil acceso y actualización constante de su información genómica en las bases de datos; convirtiéndolo en modelo de elección para el desarrollo de programas de mejoramiento [110]. La aplicación de métodos de hibridación propuestos por Shull (1908, 1909) y East (1908) a inicios del siglo XX [114-116], dieron paso a programas de selección más elaborados y recurrentes en maíz; lo que ha permitido el desarrollo de nuevas variedades a partir polinización abierta, híbridos dobles, (de cuatro líneas), híbridos de tres líneas, híbridos simples (producto del cruzamiento entre dos líneas) surgieron [113-117]. Así, los híbridos modernos de maíz mostraron superioridad frente a los antiguos; lo cual se atribuye a características tales como: mayor tolerancia a condiciones de estrés biótico y abiótico [119-120], eficiencia en el uso de recursos y alto rendimiento productivo [118-123]. Donde queda claro que el

éxito de los programas de mejoramiento depende en gran medida de la elección de los rasgos con propósitos de mejora; los cuales deben describir un tipo de herencia predecible, preferiblemente no regulada por procesos epistáticos, polimórficos, detectables y medibles en individuos de una población segregante [73,110-124]. Así, las metodologías tradicionales de mejoramiento han permitido la selección y liberación exitosa de numerosas variedades de maíz, pese a la enorme inversión de recursos y tiempo que implica su implementación; factores que en la última década han sido contrarrestados con el acceso a técnicas innovadoras de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencers*), tales como la: Genotipificación Mediante Secuenciación (GBS, *Genotyping By Sequencing*), con las cuales es posible obtener una enorme cantidad de marcadores moleculares que permiten identificar genes asociados a diversos rasgos y la determinación de su expresión bajo condiciones específicas por medio de metodologías de análisis matemático, bioinformático y estadístico [123-126].

### **3.1. Estudios de asociación genómica (GWAS).**

Los estudios de asociación a nivel de todo el genoma (GWAS) son herramientas poderosas que tienen como objetivo comprender la base genética de rasgos fenotípicos, por medio de la identificación de asociaciones de genotipos con fenotipos a través del análisis de diferencias en la frecuencia de alelos de variantes genéticas entre individuos que son ancestralmente similares, pero difieren fenotípicamente [127-129]. Las variantes genéticas más comúnmente estudiadas en GWAS son las secuencias simples repetidas (SSR) o marcadores de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), bajo modelos estadísticos robustos (MLG: Modelo Lineal General; MLM: Modelo Lineal Mixto; CMLM: Modelo Lineal Mixto Comprimido) que permiten imputar la identificación y asociación de alelos favorables con uno o varios rasgos de interés, planteando diferentes modelos de interacciones génicas para explicar los cambios fenotípicos (dominancia y/o aditividad); con el propósito de ayudar a los mejoradores en la selección genotipos superiores y contribuyendo a una óptima planeación de cruces en relación a condiciones objetivo-

específicas (mayor rendimiento, resistencia a plagas, tolerancia a estreses bióticos y abióticos, etc.) [130-132].

No hay estudios publicados sobre la variación genética de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo en maíz bajo condiciones de estrés hídrico durante el periodo previo a la emergencia. Por lo tanto, los conocimientos que se obtengan a partir de este estudio contribuirán al entendimiento del rol que cumplen estas estructuras sobre la emergencia, el establecimiento de las plántulas y su tolerancia a condiciones de baja humedad con potencial uso en el mejoramiento del maíz.

## II. ANTECEDENTES

El cultivo de maíz durante siglos ha sido objeto del mejoramiento genético por procesos de selección natural y humana, con el propósito de mejorar características del cultivo y aumentar su rendimiento productivo [133].

En México el grupo de investigación de la Dra. Cassab y el Dr. Nieto adscritos a la Universidad Autónoma Nacional de México (UNAM) en los Institutos de Biotecnología (IBt, UNAM) de la ciudad de Cuernavaca, Morelos y el Instituto de Biología (IB,UNAM) en la Ciudad de México, respectivamente, vienen desarrollando estudios enfocados en la búsqueda de genotipos superiores de maíz a partir de la identificación de fenotipos superiores de rasgos que no han sido muy estudiados dada su localización edáfica y que resultan de interés ya que podrían proporcionar marcadores de mejoramiento vegetal a condiciones de estrés hídrico y siembra profunda. El primer rasgo en el que han centrado su interés corresponde a la respuesta hidrotrópica de la raíz, (RH) como respuesta adaptativa de las raíces de la planta, con crecimiento direccionado hacia regiones con gradiente de humedad superior, interactuando positiva o negativa con otros tropismos presentes como lo son el gravitropismo y el tigmotropismo. Estrategia que permite la supervivencia de las plantas terrestres, como mecanismo de evasión al estrés hídrico y que es dependiente de la capacidad de las raíces para obtener agua y nutrientes del suelo [134-136]. En segundo lugar y no menos importante se encuentra la elongación del mesocotilo, (EM): estructura de origen embrionario, localizada entre los nodos escutelar y coleoptilar que eleva el coleóptilo permitiendo la emergencia de la plántula. Rasgo que ha sido relacionado con vigor vegetal en cultivos como el arroz y sorgo, poco estudiado en maíz, sujeto a alta variación genética, aparentemente influenciado por la disponibilidad hídrica, la profundidad de la siembra, niveles de hormonas y la luz [137-138].

El grupo de investigación del IBt, UNAM determinó fenotípicamente la respuesta hidrotrópica de una colección de cerca de 300 híbridos DTMA de maíz suministrada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) provenientes de

diversos programas de mejoramiento alrededor del mundo (Cairns *et al.*, 2013) y seleccionados por el programa de mejoramiento de maíz tolerante a la sequía para África (DTMA). Programa creado con el objetivo de mitigar la sequía y otras limitaciones para la producción de maíz en el África subsahariana; aumentando los rendimientos de maíz y beneficiando a más de 40 millones de personas en 13 países africanos [139-141]. La respuesta hidrotrópica de los híbridos se midió en el laboratorio utilizando un sistema de ensayo diseñado por Eapen., et al (2015) para plántulas de maíz [94], el cuál genera un ambiente con bajo gradiente de humedad como resultado de la la interacción entre una solución hidroestimulante (H<sub>2</sub>O) y una higroscópica (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) concentrada con una densidad de 1.500 g/cm<sup>3</sup> y con condiciones de ensayo controladas en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 26+/-2° por 24h, en oscuridad total y siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 2. Los datos fenotípicos obtenidos permitieron la clasificación de la respuesta hidrotrópica medida como el ángulo de curvatura de la raíz (formado por el crecimiento direccionado hacia un gradiente de humedad superior) de la siguiente manera: RH robusta (ángulos de curvatura  $\geq 40^\circ$ ) y RH débil (ángulos de curvatura entre 10° y 39°). Aquellas raíces con ángulos  $\leq 9^\circ$  se definieron como gravitrópicas (crecimiento dirigido al vector de la gravedad) [94,142].

A partir de los datos fenotípicos obtenidos de la respuesta hidrotrópica en los DTMA se seleccionaron los cuatro híbridos con mejores RH robusta (DTMA 76, 206, 283 y 285) y los cuatro híbridos con la RH mas débil (DTMA 12, 144, 194 y 266) para el desarrollo de pruebas de campo bajo tres condiciones hídricas diferentes (riego óptimo, riego lateral y sequía) descritas por Eapen., et al (2017) en su estudio [95]. Donde, se encontró la correlación positiva (estadísticamente significativa) entre la respuesta hidrotrópica robusta y la tolerancia a la sequía con un mayor rendimiento del grano y mayor densidad de raíces. Lo que indica el potencial del uso de líneas con respuesta hidrotrópica robusta para el desarrollo de líneas de maíz mejoradas y capaces de tolerar condiciones limitantes de agua [95,142].

En paralelo, el grupo de investigación del IB, UNAM determinó fenotípicamente la variación en la elongación del mesocotilo en híbridos DTMA de maíz a través de ensayos de laboratorio bajo condiciones de siembra profunda, la cual fue recreada dentro de un tubo PVC hidráulico de 40 cm; donde, fueron sembradas 15 semillas de maíz a una

profundidad de 16 cm entre los sustratos turba rubia pura y vermiculita, por un periodo de 6.5 días de siembra, a 28°C, en oscuridad y con riego cada 48 hrs por cortos periodos de tiempo con exposición a luz verde de seguridad, siguiendo el protocolo descrito por Nieto-Sotelo., et al (2012-13) [143-144] y detallado en el Anexo 3. Los datos de elongación del mesocotilo obtenidos. Los ensayos de laboratorio se realizaron en condiciones controladas en una cámara de crecimiento durante 6.5 días de cultivo a 28°C, en oscuridad y con iluminación durante lapsos breves usando luz verde de seguridad para regar las plántulas cada 48 horas (riego óptimo) en los DTMA permitieron clasificar su variación en tres grupos: EM baja (longitud del mesocotilo  $\geq 38,3$  mm), EM media (longitud del mesocotilo entre 60,0 y 80,0 mm) y EM alta (longitud del mesocotilo  $\leq 113,3$  mm) como resultado del cálculo de rangos estadísticos [143-144].

Adicionalmente, el CIMMYT proporciono amablemente los datos genotípicos (secuencias genómicas completas) de la colección de híbridos DTMA de maíz obtenidos mediante el método GBS (*Genotyping By Sequencing, por sus siglas en inglés*) usando como marcador molecular los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés*)[145-146]. Lo que permitió la disponibilidad de datos fenotípicos y genotípicos para el análisis de la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo por parte de cada grupo de investigación. Es así como, Martínez., (2019) en su estudio de tesis de maestría consiguió asociar un total de 23,000 SNPs a la respuesta hidrotópica de híbridos DTMA de maíz bajo condiciones de estrés hídrico a través del análisis GWAS (*Genome-wide association study, por sus siglas en inglés*), de los cuales seleccionó un total de 100 SNPs usando como punto de corte estadístico un p-valor mayor que  $\geq 3.25 \cdot 10^{-10}$  y a partir de ellos logró identificar un total de 77 genes candidatos de estar asociados al rasgo. Exploró por medio de PCR en tiempo final la presencia de los cuatro genes con mayor significancia estadística de asociación: NRT1.1 (Transportador de nitrato 1.1), EGY3 (Etileno dependiente gravitropismo deficiente-amarillo-verde), NPH3 (familia de proteínas NPH3 de respuesta fototópica) y DUF1005 (Familia de proteínas DUF1005); en condiciones de bajo gradiente de humedad a 6 h, de forma diferencial en híbridos con y sin respuesta hidrotópica. El gen DUF1005 fue el único de los cuatro presentes diferencialmente en el híbrido con respuesta hidrotópica robusta a las 6 h de análisis, asociado a través del SNP con mayor significancia estadística y cuya función

aun es desconocida [142]. Por su parte, en estudios reportados por Wang et al., (2020) se demostró que las raíces primarias de maíz difieren de *Arabidopsis* en relación con el sitio de detección de la disminución del gradiente de humedad y en la participación de la redistribución de auxinas IAA durante la respuesta hidrotópica [147]. Lo que aumenta aun más nuestro interés por profundizar en el mecanismo molecular que regula la respuesta de este rasgo.

Por otro lado, Vásquez., (2018) en su tesis de maestría a través de estudios de asociación genómica (GWAS) asocio 51 SNPs a la variación en la elongación del mesocotilo en híbridos DTMA de maíz tomando como punto de corte estadístico un p-valor mayor que  $\geq 3.25 -\log^{10}$ , el cuál le permitió identificar 63 genes candidatos de asociación involucrados en procesos de transcripción, transporte de lípidos, metales pesados y amonio, proteínas de unión al promotor del gen *Squamosa*, componentes de núcleo y membranas. Resultados que validó al encontrar dos coincidencias entre los genes asociados por GWAS con regiones QTLs mapeadas por análisis de ligamiento de alta densidad en la población recombinante ABQTL-DTP BC<sub>1</sub>F<sub>2:3</sub> (DTP) de maíz del CIMMYT y que se esperan puedan usarse para procesos de mejoramiento [148].

Niu et al., (2020) en su revisión sobre la elongación del mesocotilo propone que este rasgo del maíz puede servir para evaluar la tolerancia al estrés en la etapa temprana de las plántulas; permitiendo a su vez comprender los mecanismos de la resistencia del maíz a patógenos transmitidos por el suelo y la modulación mediada por la luz [100]. Así, Zhao et al., (2021) en su estudio sobre los mecanismos moleculares de elongación de mesocótilos inducida por brasinoesteroides en maíz bajo condiciones de estrés por siembra profunda; a través de la secuenciación de ARN (RNAseq) de las líneas de maíz W64A y K12 (tolerante e intolerante a siembra profunda, respectivamente), identificaron la expresión diferencial de genes asociados con componentes de la pared y biosíntesis de lignina, factores de transcripción, vías de transducción de señalización, activación e inhibición hormonal y síntesis de metabolitos relacionados con hormonas [148]. Sus hallazgos tienen potencial uso en el mejoramiento de variedades de maíz, permitiendo la implementación de siembra profunda y que refuerzan nuestro interés en su estudio en la tolerancia a la sequía del maíz [143-150].

Actualmente, se pretende identificar y evaluar la participación de genes



significativamente relacionados con las dos estrategias en estudio, en maíces nativos y continuar con su análisis transcripcional mediante RNAseq, con el objetivo de comprender las bases genéticas que regulan la respuesta hidrotrópica y la elongación del mesocotilo, para mejorar estos procesos fisiológicos en híbridos modernos en pro de una agricultura sustentable y adaptada al estrés por sequía y calor [141-149].

Este proyecto de doctorado se propone aprovechar la información generada por los dos grupos de investigación, para asociar regiones génicas relacionadas con de la respuesta hidrotrópica de raíz robusta y la elongación del mesocotilo en híbridos de maíz DTMA en condiciones de estrés hídrico. Para identificar genes asociados con las dos estrategias para el desarrollo de líneas de maíz mejoradas capaces de crecer bajo condiciones de limitación hídrica, aprovechando la diversidad del maíz mexicano.

### III. JUSTIFICACIÓN

El maíz es el principal producto agrícola de México. Primer productor de maíz blanco en el mundo, que destina aproximadamente el 35% por ciento de su territorio para su siembra y consumiendo anualmente alrededor de 20 millones de toneladas del cereal que es base de su alimentación [150].

Más del 60% por ciento del territorio mexicano se caracteriza por condiciones áridas y semi-áridas, que limitan la disponibilidad de agua; principal factor limitante para el crecimiento, desarrollo y rendimiento productivo del cultivo de maíz. Presionando al cultivo a responder y adaptarse a diversas condiciones de estrés hídrico (dificultad que experimenta la planta para extraer agua del suelo por causa de un suministro inadecuado) en cualquier fase de su desarrollo, con lo que se pone en riesgo la seguridad alimentaria y económica del país [150-152].

Los suelos agrícolas experimentan condiciones de sequía severa o deficiencia de agua como resultado del cambio climático, afectando con ello el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de maíz y las plantas naturalmente desarrollan estrategias genéticamente reguladas como: a) la respuesta hidrotrópica robusta; donde se redirige el crecimiento de la raíz en busca de fuentes de agua, evadiendo bajos potenciales hídricos y b) la elongación del mesocotilo; que permite la siembra profunda de las semillas favoreciendo la emergencia y establecimiento de la planta, brindando una mayor área de exploración al sistema radicular de agua en el suelo y permitiéndole sobrevivir en condiciones de escasez de agua. [153-154].

Este proyecto plantea identificar genes asociados a las dos estrategias mencionadas en condiciones de estrés hídrico, que permitan generar conocimientos sobre los mecanismos genéticos que las regulan, para ser aprovechados en el desarrollo de programas de mejoramiento vegetal sin sacrificar el rendimiento del cultivo.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Se estima que en híbridos DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) se encuentre sinergia entre la respuesta hidrotrópica de raíz y la elongación del mesocotilo en condiciones de estrés hídrico.

**H<sub>0</sub>**= En híbridos DTMA de maíz la respuesta hidrotrópica robusta de la raíz primaria y la variación de la elongación del mesocotilo no se relacionan con tolerancia a condiciones de estrés hídrico.

**H<sub>a</sub>**= En híbridos DTMA de maíz la respuesta hidrotrópica robusta de la raíz primaria y la baja elongación del mesocotilo se relacionan con tolerancia a condiciones de estrés hídrico.

**H<sub>b</sub>**= En híbridos DTMA de maíz la respuesta hidrotrópica robusta de la raíz primaria y elevada elongación del mesocotilo se relacionan con tolerancia a condiciones de estrés hídrico.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Identificar genes asociados con la respuesta hidrotrópica y la variación en la elongación del mesocotilo en híbridos DTMA de maíz bajo condiciones de estrés hídrico.

#### **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Fenotipificar la respuesta hidrotrópica y la elongación del mesocotilo de híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico.
2. Identificar SNPs asociados con la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en condiciones de estrés hídrico.
3. Determinar el patrón de expresión de genes seleccionados a partir de la asociación de genoma completo (GWAS) asociados con la respuesta hidrotrópica y elongación del mesocotilo en híbridos de maíz DTMA en condiciones de estrés hídrico.

## Capítulo I. Referencias.

1. Latham, M. C. (2021). Cereales, raíces feculentas y otros alimentos con alto contenido de carbohidratos. En: Nutrición humana en el mundo en desarrollo (cap.26). FAO. Roma, Italia. <https://www.fao.org/3/W00735/w007350u.htm#bm30x>.
2. Vargas, L. A. (2014). El maíz, viajero sin equipaje. *An. Antrop* 48(I):128-137. [https://doi.org/10.1016/S0185-1225\(14\)70492-8](https://doi.org/10.1016/S0185-1225(14)70492-8).
3. Piperno, D. R. (2011). The Origins of Plant Cultivation and Domestication in the New World Tropics: Patterns, Process, and New Developments. *Curr Anthropol* 52(S4):S453–S470. <https://doi.org/10.1086/659998>.
4. Olsson, O. (2001). The Rise of Neolithic Agriculture. En: Department of Economics Göteborg University Working Papers in Economics. Ed. Handels.gu.se. pp. 1-28. Göteborg, Suecia.
5. Garcés, S. (2011). Bienestar y sustentabilidad en el medio rural: herramientas y debates para una agricultura sustentable. Ed. Abya Ala. Quito, Ecuador.
6. Escalante, P. (1989). Mesoamérica, Aridoamérica, Oasisamérica. En Larousse *Atlas histórico de Mesoamérica*. México D.F., México.
7. Delgado, G. 2002. Mesoamérica. Etapa formativa. En Pearson *Historia de México. El proceso de gestación de un pueblo*. pp.2-34. Ed. 4. México D.F., México
8. FAO. (1990). Utilización de alimentos tropicales. En: Cereales 47(1). Roma, Italia. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>.
9. ONU. (2001). El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Roma, Italia. <https://www.fao.org/3/X7650S/x7650s00.htm>.
10. FAO. (2022). Rebaja de los pronósticos relativos a la producción, la utilización y las reservas mundiales de cereales respecto del mes pasado. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/04/11/2022>.
11. GCMA con datos de USDA. (2022). Perspectivas del mercado de maíz. <https://gcma.com.mx/reportes/perspectivas/maiz/>
12. FAO. (2022). Perspectivas alimentarias (resúmenes de mercado). <https://www.fao.org/3/cc1116es/cc1116es.pdf>. 04/11/2022.
13. WFP and FAO. (2022). Hunger Hotspots. FAO-WFP early warnings on acute food insecurity: October 2022 to January 2023 Outlook. Rome.
14. Hubert, B., Rosegrant, M., Boekel, M., Ortiz, R. (2010). The Future of Food: Scenarios for 2050. *Crop Sci* 2(50): S33-S50. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0530>.
15. United Nations. (2022). World population prospects 2022 (summary results). UN DESA/POP/2021/TR/NO. 3. New York, UN.
16. United Nations. (2021). Population and vital statistics report. Statistical Papers Series A Vol. LXXIII. [https://unstats.un.org/unsd/demographicssocial/products/vitstats/sets/Series\\_A\\_2021.pdf](https://unstats.un.org/unsd/demographicssocial/products/vitstats/sets/Series_A_2021.pdf). ISSN: 0251-0030.
17. UNFPA.(2022). Población mundial de México. <https://www.unfpa.org/es/data/world-population/MX.02/22>.
18. INEGI.(2022). Población. <https://www.inegi.org.mx/temas/estructura/>. 02/22.
19. Carlson, K. M., Cassidy, E.S., Johnston, M., et al. (2014). Leverage points for improving global food security and the environment. *Science* 345:25-328.MN, USA.
20. FAO. (2021). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2021. Lograr que los sistemas agroalimentarios sean más resilientes a las perturbaciones y tensiones. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4476es>.

21. OECD/FAO (2020), *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029*, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/a0848ac0-es>. FAO. (2016). Hodgson, S. Exploring the concept of water tenure. Roma, Italia.
22. Kramer, P.J., Boyer, J.S. (1983). Water relations of plants and soils. Academic Press Inc. (San Diego) California, USA.
23. Gliessman, E., et al.1998. Bringing about a sustainable world food system. En CRC Press. *Agroecological processes in sustainable agricultura*. (Santa Cruz) California, USA.
24. FAO. (2016). Sequía: Emergencias. <http://www.fao.org/emergencias/emergencias/sequia/es/>
25. FAO. (2019). El sistema alimentario en México - Oportunidades para el campo mexicano en la Agenda 2030 de Desarrollo Sostenible. Ciudad de México. 68 pp.
26. FAO & SAGARPA. (2014). México: el sector agropecuario ante el desafío del cambio climático 2014. <http://www.fao.org/3/a-i4093s.pdf>.
27. Moreno, S., Urbina, J. (2008). PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo). Impactos sociales del cambio climático en México.
28. Dobler-Morales, C., Bocco, G. (2021). Social and environmental dimensions of drought in Mexico: An integrative review. *Int. J. Disaster Risk Reduct* **55**:102067. ISSN 2212-4209. <https://doi.org/10.1016/j.ijdr.2021.102067>.
29. Villers-Ruiz, L. & Trejo-Vázquez, L. (1997). Assessment of the vulnerability of forest ecosystems to climate change in Mexico. *Clim Res* **9**: 87-93.
30. Aslam, M., Maqbool, M.A., Cengiz, R. (2015). Drought Stress in Maize (*Zea mays* L.): Effects, Resistance Mechanism, Global Achievements and Biological Strategies for Improvement. Ed. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25442-5>.
31. Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. *Agron Colomb* **27**(2):179-191. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012099652009000200006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012099652009000200006&lng=en&tlng=es).
32. Soriano, E. F. (2017). Mecanismos de protección frente al déficit hídrico reiterado en plantas [Tesis de Doctorado, Universitat de Barcelona]. Repositorio Institucional – Universitat de Barcelona.
33. Ojeda, C.M. (2015). Efecto de un producto bioactive compuesto por oligogalacturonidos como mitigador del estrés hídrico en variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) [Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. Repositorio Institucional – Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
34. Bray, E. A. (1997). Plant response to water deficit. *Trends Plant Sci* **218**:48-54.
35. Sánchez, D.M., Aquirreolea, J. (2000). Capítulo 2. El agua en la planta. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (Azcón-Bieto, J., Talón, M), Ed. Mc Graw-Hill Interamericana Ediciones de la Universitat de Barcelona, Madrid-Barcelona, pp 17-82.
36. Hsiao, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann Rev Plant Physiol* **24**:519-570.
37. Mayor, V.M. (2016). Identificación de QTLs de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) asociados a tolerancia a sequía. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional- Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira.
38. Pawar, K. R., Wagh, S. G., Sonune, P. P., et al. (2020). Analysis of water stress in different varieties of maize (*Zea mays* L.) at the early seedling stage. *Biotechnol J Int* **24**:15-24.
39. Shafique, F., Ali, Q., Malik, A. (2020). Effects of water deficit on maize seedlings growth traits. *Biol Clinic Sci Res J* **2020**(1). <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2020i1.28>.
40. Zhang, L., Yan, M., Ren, Y., et al. (2021). Zinc regulates the hydraulic response of maize root under water stress conditions. *Plant Physiol Biochem* **159**:123-134. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.12.014>.

41. Zhao, X.Q., Zhong, Y. (2021). 24-Epibrassinolide Mediated Interaction among Antioxidant Defense, Lignin Metabolism, and Phytohormones Signaling Promoted Better Cooperative Elongation of Maize Mesocotyl and Coleoptile under Deep-Seeding Stress. *Russ J Plant Physiol* **68**:1194–1207. <https://doi.org/10.1134/S1021443721060224>.
42. Zhao, X.Q., Zhong, Y., Zhou, W. (2021). Molecular mechanisms of mesocotyl elongation induced by brassinosteroid in maize under deep-seeding stress by RNA-sequencing, microstructure observation, and physiological metabolism. *Genomics* **113**(6):3565-3581. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.08.020>.
43. USDA. (2021). Drought Conditions in Mexico and Its Effect on Agriculture. <https://fas.usda.gov/data/mexico-drought-conditions-mexico-and-its-effect-agriculture>.
44. Sáenz-Rodríguez, M. N., & Cassab, G. I. (2021). Primary Root and Mesocotyl Elongation in Maize Seedlings: Two Organs with Antagonistic Growth below the Soil Surface. *Plants (Basel, Switzerland)* **10**(7): 1274. <https://doi.org/10.3390/plants10071274>.
45. Mayet, E., Sancho, J., Perez, D. (1980). Las sequías en México: historia, características y efectos. *Comercio Exterior* **30**(7):747-757.
46. Esparza, M. (2013). Drought and Water Shortages in Mexico. Current Status and Future Prospects.
47. Bravo-Cadena, J., Pavón, N.P., Balvanera, P., (2021). Water Availability– Demand Balance under Climate Change Scenarios in an Overpopulated Region of Mexico. *Int J Environ Res Public Health* **18**:1846. <https://doi.org/10.3390/ijerph1804184>.
48. Zamora, I., Sánchez, D. (2020). Jornada de agua, mares y océanos. Panorama y perspectivas del agua en México, 2019–2024. Cuaderno de investigación No.62. Instituto Belisario Domínguez, Senado de la Republica. CDMX, México.
49. Macias H.L., Del Arenal, R. (2007). La distribución del agua subterránea en México. *Ciencia* **58**(3):55-63. [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/58\\_3/PDF/08-547.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/58_3/PDF/08-547.pdf).
50. Sánchez-Cohen, I., Bueno-Hurtado, P., Esquivel-Arriaga, G., Velásquez-Valle, M. A. (2015). Impact of crop sensitivity to water stress in rain feed areas of Mexico. *RChSZAr* **14**(1):61–74. <https://doi.org/10.5154/r.rchza.2015.05.00>.
51. Martínez-Austria, P.F., Díaz-Delgado, C., Moeller-Chavez, G. (2019). Water security in Mexico: general diagnosis and main challenges. *Ing del agua* **23**(2):107-121. <https://doi.org/10.4995/Ia.2019.10502>.
52. Martínez, B., Dominguez, C. (2021). *Sequia 2020-2021: La segunda más severa del registro reciente*. Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático / ICAYCC en los medios. <https://www.atmosfera.unam.mx/sequia-2020-2021-la-segunda-mas-severa-del-registro-reciente/>.
53. Bennetzen, J & Hake, S. (2009). Handbook of Maize: Its Biology. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1>.
54. Paliwal, R. L. (2001). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 1-392.
55. Sah, R.P., Chakraborty, M., Prasad, K. *et al.* (2020). Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. *Sci Rep* **10**:2944. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59689-7>.
56. United Nations. (2019). How certain are the United Nations global population projections? *Population Facts* 6. <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/factsheets/index.asp>.
57. Tripathi, K. K., Warriar, R., Govila, O.P., Ahuja, V. (2011). Biology of Zea mays (Maize). Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology and Ministry of Environment and Forests, Government of India. [http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/geac/Biology\\_of\\_Maize](http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/geac/Biology_of_Maize).

58. ILSI. (2006). Maíz y nutrición: informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Serie de informes especiales, vol 2. Argentina. ISBN: 978-987-21507-1-6.
59. FAO. (2009). La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Foro de expertos de alto nivel- Como alimentar al mundo 2050. Roma, Italia.
60. SAGARPA (2018) Maíz blanco y amarillo mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. Planeación agrícola 2017-2030. 22 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B\\_sicoa\\_z\\_Grano\\_Blanco\\_y\\_Amarillo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sicoa_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf).
61. Murray-Tortarolo, G., Jaramillo, V. (2018). El reto del maíz en México frente al cambio climático. *RDU* **19**(1). <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2018.v19n1.a1>.
62. Langner, J. A., Zanon, A. J., Streck, N. A., et al. (2019). Maize: Key agricultural crop in food security and sovereignty in a future with water scarcity. *Rev Bras Eng Agric Ambient* **23**(9): 648–654. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v23n9p648-654>.
63. Ministerio del Ambiente. (2018). Línea de base de la diversidad genética del maíz peruano con fines de bioseguridad. Viceministerio de Desarrollo Estratégico de los Recursos Naturales. Lima, Peru. ISBN: 978-612-4174-31-5
64. Sánchez Ortega, Iván and Pérez-Urria Carril, Elena (2014) *Maíz I (Zea mays L.)*. REDUCA Biología **7**(2):151-171. ISSN 1989-3620.
65. Montesillo, J. L. (2016). Rendimiento por hectárea del maíz grano en México: distritos de riego vs temporal. Instituto de Estudios sobre la Universidad (IESU) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). *Economía Informa* **398**:60-74. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/80070>.
66. Flores, H. y Ruíz, J. (1998). “Estimación de la humedad del suelo para maíz de temporal mediante un balance hídrico”. *Terra* **16**(3):219-229.
67. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., et al. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* **29**:185-212.
68. Ritchie, S. W., Hanway, J. J., Benson, G. O. (1992). How a corn plant develops. Special report No. 48. Iowa State University of Science and Technology. Ames, Iowa, USA. 21 p.
69. Marcial, M. (2017). Determinación de variables agronómicas del cultivo de maíz mediante imágenes obtenidas desde un vehículo aéreo no tripulado (VANT). [Tesis de Maestría. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua]. Jiutepec-Morelos, México.
70. Ludlow, M. (1989). Strategies of response to water stress. En: K. H. Kreeb, Richter H, Hinckley T.M, eds. Structural and functional responses to environmental stresses: water shortage: SPB Academic. The Hague, pp. 269-281.
71. Suarez, S. (2020). Variaciones Morfológicas en Raíces de Plantas de Frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) Sometidas a Diferentes Condiciones de Humedad. [Tesis de Licenciatura. Universidad (UNAD) Nacional Abierta y a Distancia]. Palmira, Colombia.
72. Asrat, Zewdu. (2021). International Journal of Advanced Research in Biological Sciences the Improvement of Maize (*Zea mays L.*) for Drought Stress Tolerance. 7-2021.
73. Hallauer, A., Carena, M., Miranda-Filho, J. (2010). Quantitative Genetics in Maize Breeding. Handbook of Plant Breeding 6. Springer. New York.
74. Nielsen, R.L. (2020). The Emergence Process in Corn. Agronomy Dept., Purdue Univ. <http://www.kingcorn.org/news/timeless/Emergence.html>.
75. Maree, P. H. (2008). Prediction of field emergence of maize (*Zea mays L.*) hybrids exposed to cold and wet conditions. [Tesis de Maestría. Universiteit Van Pretoria]. Pretoria, Sudáfrica. <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/27200/dissertation.pdf?sequence=1>.



76. Oñate, L.A. (2016). Duración de las etapas fenológicas y profundidad radicular del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) var. Blanco harinoso criollo, bajo las condiciones climáticas del Cantón Cevallos [Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias (UTA)]. Cevallos, Ecuador.
77. Mantilla, Angel. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. En J. Azcón-Bieto & M. Talón (Eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw Hill. pp.537-558.
78. Alibu S, Saito Y, Shiwachi H, Irie K. 2012. Genotypic variation in coleoptile or mesocotyl lengths of upland rice (*Oryza sativa* L.) and seedling emergence in deep sowing. *Afr J Agric Res* 47:6239–6248. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.022>.
79. Sun, X., Ren, W., Wang, P., et al. (2021). Evaluation of maize root growth and genome-wide association studies of root traits in response to low nitrogen supply at seedling emergence. *Crop J* 9(4):794-804. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.09.011>.
80. De Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., et al. (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* 12:474-481. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.012>.
81. Gregory, P.J., Bengough, A.G., Grinev, D., et al. (2009). Root phenomics of crops: opportunities and challenges. *Funct Plant Biol* 36:922–929.
82. Costa de Oliveira, A & Varshney, R. K. (2011). Root genomics. *Springer, Berlin*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85546-0>.
83. Morte, A & Varma, A. (2014). Root Engineering: Basic and Applied Concepts. *SS BM* 493.
84. Koevoets, I.T., Venema, J.H., Elzenga, J.T., et al. (2016). Roots Withstanding their Environment: Exploiting Root System Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance. *Front Plant Sci* 7:1335. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01335>.
85. Abbe E. C. & Stein O. L. (1954). The growth in the shoot apex in maize: embryogeny. *Amer J Bot* 41:285-293.
86. Aiken, R.M & Smucker, A.J.M. (1996). Root system regulation of whole plant growth. *Annu Rev Phytopathol* 34:325–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.325>.
87. Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M., et al. (2004). Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays* L.) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann Bot* 93:359-368. <https://doi.org/10.1093/aob/mch056>.
88. Hochholdinger F, Zimmermann R. (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr Opin Plant Biol* 11(1):70-4. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.002>.
89. Hochholdinger F, Tuberosa R. (2009). Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Curr Opin Plant Biol* 12(2):172-7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.002>.
90. Takahashi, H & Scott, T.K. (1991). Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiol* 96:558-564. <https://doi.org/10.1104/pp.96.2.558>.
91. Cassab, G.I., Sánchez, Y. (2006). Diferenciación y Crecimiento Diferencial: La Capacidad Motriz de las Plantas. In: Sequeo FA, Cardemil, L, editors. Fisiología Vegetal. *Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile* 8:1-26.
92. Antoni, R., Dietrich, D., Bennett, M.J., Rodríguez, P.L. (2016). Hydrotropism: analysis of the root response to a moisture gradient. *Methods Mol Biol* 1398:3–9.
93. Dietrich D. 2018. Hydrotropism: how roots search for water. *J Exp Bot* 69(11):2759-2771. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery034>.
94. Eapen, D., Martínez, J.J., Cassab, G.I. (2015). Assays for root hydrotropism and response to water stress. In: Blancaflor EB, ed. Plant gravitropism: methods and protocols. New York. Springer New York, pp. 133-142. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8_11).
95. Eapen, D., Martínez, J.J., Hernández, O., et al. (2017). Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Sci* 265:87-99.



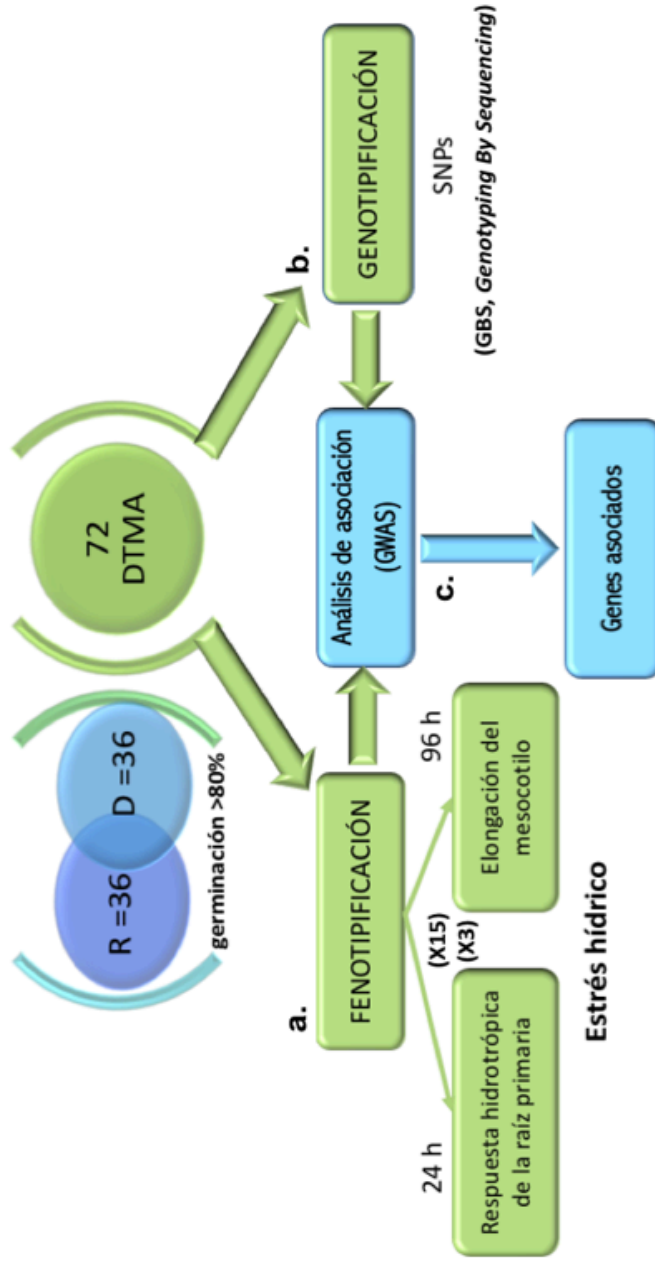
- <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.016>.
96. Kempton J. 1923. Inheritance of Mesocotyl Length in Hibrids of Brachytic Maize. *Amer Midl Naturalist* **57**:374-377.
  97. Flint, L.H. (1944). Light and the elongation of the mesocotyl in corn. *Plant Physiol* **19**:537–543. <https://doi.org/10.1104/pp.19.3.537>.
  98. Mgonja, M.A., Ladeinde, T.A.O., Aken'Ova, M.E. (1993). Genetic analysis of mesocotyl length and its relationship with other agronomic characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **72**:189–195. <https://doi.org/10.1007/BF00034157>.
  99. Ohn, H., N. Banayo, C. S. Bueno, J. Kashiwagi, N. Taiken, A. Corales, R. Garcia, N. Sandhu, and A. Kumar, and Y. Kato. 2018. Longer mesocotyl contributes to quick seedling establishment, improved root anchorage, and early vigor of deep-sown rice. *Field Crops Res* **228**:84-92.
  100. Niu, L., Hao, R., Wu, X., Wang, W. (2020). Maize mesocotyl: role in response to stress and deep-sowing tolerance. *Plant Breed* **00**:1–8.
  101. Saab IN, Sharp RE, Pritchard J. (1992). Effect of inhibition of abscisic acid accumulation on the spatial distribution of elongation in the primary root and mesocotyl of maize at low water potentials. *Plant Physiol* **99**:26–33. <https://doi.org/10.1104/pp.99.1.26>.
  102. Johanson, J.G., Cheeseman, J.M. (1983). Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings: I. Role of the mesocotyl in `sodium exclusion`. *Plant Physiol* **73**:153-158. <https://doi.org/10.1104/pp.73.1.153>.
  103. Collins, G.N. (1914a). Drought-resisting adaptation in maize. *J Agric Res* **1**:293-302. illus.
  104. Collins GN. (1914b). Pueblo Indian Maize Breeding (Varieties specially adapted to arid regions developed by Hopis and Navajos their work not sufficiently appreciated. Probably much yet to be learned from them). *J Heredity* **5**:255-267.
  105. Muñoz, A.O., Pérez, G.J., López, P.A., et al. (2002). Maíz de cajete: agrosistema y resistencia a sequía. In J.P. Viqueria (Ed.), *Antología sobre pequeño riego*, (Vol.III Sistem, pp. 137-161). Colegio de Posgraduados, México:Editores Plaza y Valdez.
  106. Mapoka, K.O.M., Birrellz, S.J., Tekekeste, M. (2019). A comprehensive survey of nondestructive sensing technologies for the detection of corn seed in a closed trench and measuring planting depth to augment the conventional method. *Comput Electron Agric* **158**:249-257. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.02.010>.
  107. Markelz, N.H., Costich, D.E., Brutnell, T.P. (2003). Photomorphogenic responses in maize seedling development. *Plant Physiol* **133**:1578–1591. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029694>.
  108. Hardegree, S.P., Jones, T.A., Roundy, B.A., et al. (2016). Assessment of range planting as a conservation practice. *Rangel Ecol Manag* **69**:237–247. <https://doi.org/10.1016/j.rama.2016.04.007>.
  109. Nieto-Sotelo, J.; Martínez, D.A.; Cruz, C.A.; Vázquez, L. (2018). Prácticas agrícolas tradicionales y la conservación de maíces nativos en México. In *Sistemas Agroalimentarios Localizados Y Prácticas Agrícolas Tradicionales. Hacia Una Propuesta De Política Pública Para El Desarrollo Rural*; Tolentino, J.M., Larroa, R.M., Renard, M.-C., Del Valle, M.-C., Eds.; Red SIAL-México: Ciudad de México, Mexico, pp.176–200. ISBN 978-607-8535-37-8.
  110. Martínez, M.C.; Helguera, M.; Carrera, A. (2010). Marcadores moleculares. Herramientas básicas. In *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*; Levitus, G., Echenique, V., Rubistein, C., Hopp, E., Mroginski, L., Eds.; INTA: Mar del Plata, Argentina, Vol. 5, pp. 70–85.
  111. Bennetzen, J & Hake, Sarah. (2009). *Handbook of Maize: Genetics and Genomics*.
  112. Lee M. (2007). *Maize Breeding and Genomics: An Historical Overview and Perspectives*. In: Varshney R.K., Tuberosa R. (eds) *Genomics-Assisted Crop Improvement*. Springer, Dordrecht
  113. Khanday et al. (2019). “A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds”. *Nature* **565**:91-95.

114. Shull GH (1908). The composition of a field of maize. *Am Breed Assoc* **4**:296-301.
115. Shull GH (1909). The composition of a field of maize. *Am Breed Assoc* **4**:296-301.
116. East EM (1908). Inbreeding in corn. *Reports of the Connecticut agricultural experiment station for years 1907–1908*, pp 419–428.
117. Tokatlidis, I.S.& Koutroubas, S.D. (2004). A review of maize hybrids' dependence on high plant populations and its implications for crop yield stability. *Field Crops Res* **88**:103-114. [10.1016/j.fcr.2003.11.013](https://doi.org/10.1016/j.fcr.2003.11.013).
118. Troyer, A.F., 1995. Breeding widely adapted, popular corn hybrids. In: Proceedings of the XIV EUCARPIA Congress on Adaptation in Plant Breeding, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland, 31 July–4 August.) 103–114.
119. Hall, A.J., Lemcoff, J. H. and Trapani, N.1981. Water stress before and during flowering in maize and its effects on yield, its components, and their determinants. *Maydica* **26**:19-38.
120. Bolaños, J & Edmeades, G.O. (1996). The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res* **48**:65-80.
121. Duvick, D.N. (1997). What is yield? In: Edmeades, G.O., Banziger, M., Mickelson, H.R., Peña-Valdicia, C.B. (eds.) Developing Drought-and Low N-Tolerant Maize. Proceedings of a Symposium, March 25-29. CIMMYT. El Batán, México, 332-335. México, D. F.: CIMMYT.
122. Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* **142**:(1–2).
123. Liu, S & Qin, F. (2021). Genetic dissection of maize drought tolerance for trait improvement. *Mol Breeding* **41**:8. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01194-w>.
124. Huang, Y., Liu, H., Xing, Y. (2018). Next-Generation Sequencing Promoted the Release of Reference Genomes and Discovered Genome Evolution in Cereal Crops. *Curr Issues Mol Biol* **27**:37-50. <https://doi.org/10.21775/cimb.027.037>.
125. Deschamps, S., Llaca, V., May, G. D. (2012). Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology*, **1**(3):460–483. <https://doi.org/10.3390/biology1030460>.
126. He, J., Zhao, X., Laroche, A., et al. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Front Plant Sci*: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00484>.
127. Xiao, Y., Liu, H., Wu, L., et al. (2017). Genome-wide Association Studies in Maize: Praise and Stargaze. *Mol Plant* **10**(3):359-374. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.008>.
128. Soto-Cerda, B. J & Cloutier, S. (2012). Association mapping in plant genomes. *Genetic Diver Plan*, pp. 29–54.
129. Gowda, M., Das, B., Makumbi, D., et al. (2015). Genome-wide association and genomic prediction of resistance to maize lethal necrosis disease in tropical maize germplasm. *Theor Appl Genet* **128**(10):1957–1968.
130. Stram, D.O. (2014). Design, Analysis, and Interpretation of Genome-Wide Association Scans. Springer. L.A California.USA.
131. Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C. Q., et al. (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics* **42**(4):355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>.
132. Varshney, R. K., Singh, V. K., Hickey, J. M., et al. (2015). Analytical and Decision Support Tools for Genomics-Assisted Breeding. *Trends Plant Sci* **21**:1–10.
133. Aguirre, J.A.& Garcia, M.L. (2012). Selección para el mejoramiento de maíz criollo. Manual de capacitación. INIFAP- CEBAJ. México.
134. Antoni R., et al. (2016). Environmental Responses in Plants Methods and Protocols. En Hydrotropism: Analysis of the Root Response to a Moisture Gradient. (cap.I). Humana Press. Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.

135. Chloupek, O. & J. Rod. (1992). The root system as a selection criterion. *J Plant Breed* **62**: 1337-1341.
136. Eghball, B. & J. W. Maranville. (1993). Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and nitrogen stresses. *Agron J* **85**:147-152.
137. Vanderhoef L., et al. (1979). Red Light-inhibited Mesocotyl Elongation in Maize Seedlings. *Plant Physiol* **63**(6):1062–1067.
138. Zhan, J., Lu, X., Liu, H. *et al.* (2020). Mesocotyl elongation, an essential trait for dry-seeded rice (*Oryza sativa* L.): a review of physiological and genetic basis. *Planta* **251**:27. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03322-z>.
139. Cairns, J. E., Crossa, J., Zaidi, P. H., et al. (2013). Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Sci* **53**(4):1335–1346.
140. CIMMYT. (2013). The Drought Tolerant Maize for Africa project. DTMA Brief, September <http://dtma.cimmyt.org/index.php/about/background>.
141. CIMMYT. (2014). DT Maize. A Quarterly Bulletin of the Drought Tolerant Maize for Africa <http://dtma.cimmyt.org/index.php/component/content/article/110-news-articles/180-dtmamoves-to-the-next-level-welcoming-dtmass>. CIMMYT, Nairobi.
142. Martínez-Guadarrama, J.J. (2019). Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotrópica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS). [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)]. Repositorio UAEM, Cuernavaca-México.
143. Nieto-Sotelo, J., Cassab, G.I., Eapen, D., et al. (2012). Informe técnico final del proyecto IMIC-2011-008 : « Descripción de caracteres hidrotrópicos y del desarrollo y crecimiento del mesocotilo y de las raíces adventicias en razas y líneas de maíz.
144. Nieto-Sotelo, J., Cassab, G.I., Eapen, D., et al. (2013). Informe técnico final del proyecto MASAGRO IMIC-2012-035 : « Descripción de caracteres hidrotrópicos y del desarrollo y crecimiento del mesocotilo y de las raíces adventicias en razas y líneas de maíz.
145. Elshire, R. J *et al.* 2011. Arobust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos One* **6**(5): e19379.
146. Uffelmann, E., Huang, Q.Q., Munung, N.S. *et al.* (2021). Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers* **1**:59. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>.
147. Wang, Y., Afeworki, Y., Geng, S., et al. (2020). Hydrotropism in the primary roots of maize. *New Phytologist* **226**:1796–1808. <https://doi.org/10.1111/nph.16472>.
148. Vasquez, L. (2018). Estudios de asociación genómica (GWAS) relacionados a la elongación del mesocotilo en maíz y su validación mediante análisis de ligamiento de genes candidatos [Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio UNAM-CU/CDMX, México.
149. Zhang, H *et al.* 2012. Mapping QTL controlling maize deep-seeding tolerance-related traits and confirmation of a major QTL for mesocotyl length. *Theoret Appl Genet* **124**:223-232.
150. SAGARPA. (2011). Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios.México.
151. López, R., et al. (2009). Índice de estrés hídrico como un indicador del momento de riego en cultivos agrícolas. *Agricultura Técnica en México* **35**(1):97-111.
152. De Santa Olalla, M., et al. (2005). Agua y Agronomía. Mundi-prensa. Madrid, España.
153. Yan, J., Shah, T., Warburton, M.L., et al. (2009). Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS One* **4**: e8451.
154. Tenaillon, M.I., Sawkins, M.C., Long, A.D., et al. (2001). Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays ssp. mays* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9161-6.

## CAPITULO II. Metodología

En la Figura 1 se muestra el flujoograma de la metodología empleada para el desarrollo de esta investigación.



**Figura 1.** Flujoograma Metodológico. Principales pasos de la estrategia metodológica definida para el estudio: **a.** Determinación fenotípica de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo en plántulas de 72 híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico; **b.** Procesamiento de datos genotípicos de los 72 híbridos DTMA de maíz; **c.** Desarrollo del análisis de asociación fenotipo-genotipo por medio de estudios de asociación (GWAS) e identificación de genes asociados a los rasgos fenotípicos. (D: respuesta hidrotrópica débil; R: respuesta hidrotrópica robusta).

## 1. Fenotipificación

Inicialmente, con la finalidad de evaluar la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (RH) y la elongación del mesocotilo (EM) en plántulas de maíz bajo condiciones de estrés hídrico se diseñó y validó un sistema de ensayo adaptado a partir del descrito por Eapen., et al (2015) [1], manteniendo el principio de recrear un ambiente con bajo gradiente de humedad por acción de una solución higroscópica que absorbe agua del medio y proporcionando el espacio suficiente para el crecimiento y desarrollo vegetal hasta el periodo de emergencia (Figura 1a).

A continuación, se describirán los materiales y métodos empleados para la determinación fenotípica de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (RH) y la elongación del mesocotilo (EM) en plántulas de 72 híbridos DTMA de maíz usando un sistema de ensayo que mantuvo condiciones de estrés hídrico hasta el periodo de emergencia de las plántulas de maíz.

### 1.1. Materiales y métodos

**1.1.1 Material vegetal.** Para realizar este estudio se utilizó una población de 72 híbridos DTMA de maíz perteneciente a una colección de 231 híbridos DTMA de maíz, cuya respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (RH) fue fenotipificada (en razón al ángulo de curvatura) en ensayos realizados por el grupo del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología (IBt), UNAM; usando el sistema de ensayo descrito por Eapen et al., (2015) y cuyos resultados fueron reportados por Martínez (2019) [1-2]. La clasificación fenotípica de los datos mencionados se usó como criterio de selección para definir la población de este estudio. Es así como, fueron elegidos los 36 híbridos DTMA de maíz clasificados con una RH robusta (ángulo de curvatura de la raíz  $> 40^\circ$ ) junto con un número igual de híbridos clasificados con una RH débil (ángulo de curvatura de la raíz entre  $10^\circ$  y  $39^\circ$ ), seleccionados al azar a partir de los 171 clasificados con esta respuesta y los cuales mantuvieron un porcentaje de germinación superior al 80% (Tabla 1) [1-2].

**Tabla 1.** 72 híbridos DTMA de maíz seleccionados como población de estudio. La clasificación fenotípica de la respuesta hidrotrópica de la raíz de los híbridos determinada por Martínez., 2019 (36 híbridos con RH robusta y 36 híbridos con RH débil con un porcentaje de germinación >80%) se uso como criterio de selección de la población de estudio. Se incluye el número del DTMA y el código de referencia asignado por el CIMMYT.

#	DTMA (RH robusta)	Referencia CYMMIT	#	DTMA (RH débil)	Referencia CYMMIT
1	1	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	1	7	AF 11 A-602-7 x CML 312 SR
2	48	AF 11 A-602-48 x CML 312 SR	2	35	AF 11 A-602-35 x CML 312 SR
3	57	AF 11 A-602-57 x CML 312 SR	3	38	AF 11 A-602-38 x CML 312 SR
4	58	AF 11 A-602-58 x CML 312 SR	4	40	AF 11 A-602-40 x CML 312 SR
5	61	AF 11 A-602-61 x CML 312 SR	5	42	AF 11 A-602-42 x CML 312 SR
6	62	AF 11 A-602-62 x CML 312 SR	6	44	AF 11 A-602-44 x CML 312 SR
7	70	AF 11 A-602-70 x CML 312 SR	7	64	AF 11 A-602-64 x CML 312 SR
8	100	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	8	75	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
9	110	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	9	91	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
10	123	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	10	96	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
11	127	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	11	99	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
12	157	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	12	101	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
13	160	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	13	106	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
14	162	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	14	121	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
15	163	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	15	144	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
16	179	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	16	154	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
17	181	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	17	175	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
18	183	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	18	177	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
19	184	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	19	187	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
20	195	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	20	189	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
21	197	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	21	192	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
22	204	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	22	193	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
23	206	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	23	198	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
24	235	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	24	201	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
25	240	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	25	202	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
26	242	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	26	203	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
27	245	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	27	207	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
28	249	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	28	209	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
29	250	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	29	210	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
30	255	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	30	222	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
31	262	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	31	225	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
32	267	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	32	228	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
33	270	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	33	238	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
34	276	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	34	257	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
35	283	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	35	259	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR
36	285	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR	36	268	AF 11 A-602-1 x CML 312 SR

La colección de híbridos DTMA de maíz (*Drought Tolerant Maize for Africa*, por sus siglas en inglés) a la cual pertenecen los 72 híbridos de estudio, fue desarrollada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a partir de la cruce de líneas endogámicas DTMA provenientes de diversos programas de mejoramiento alrededor del mundo con la línea endogámica *tester* CML312; lo que generó, híbridos (medio hermanos) adaptados a diversas agroecologías (Cairns *et al.*, 2013), algunos de ellos con alto rendimiento productivo, tolerantes o resistentes a condiciones de sequía, a suelos ácidos, bajas concentraciones de nitrógeno en suelo y a la hierba parásita *Striga hermonthica* [3-6].

La sede del CIMMYT ubicada en El Batán, Estado de México suministro amablemente el germoplasma correspondiente a los 72 híbridos DTMA de maíz de estudio junto con las secuencias genómicas completas de cada individuo; las cuales, fueron obtenidas mediante el método GBS (*Genotyping By Sequencing*, por sus siglas en inglés) con cerca de un millón de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*, por sus siglas en inglés) identificado para toda la población [7].

**1.1.2 Ensayo, almacenamiento y conservación del germoplasma.** La evaluación y determinación de los rasgos en estudio, se llevaron a cabo en los laboratorios del Jardín Botánico y del IBt (UNAM) ubicados en Ciudad de México y Cuernavaca, respectivamente durante el periodo comprendido entre los años 2017-2018. Las semillas se almacenaron en sobres de papel y protegidas con bolsas plásticas de cierre Ziploc a una temperatura de  $10^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e identificadas con el número asignado por el CIMMYT [8-9].

**1.1.3 Material vegetal de control.** El material vegetal usado como control correspondió en primer lugar a la línea endogámica B73; cuya secuencia genómica se encuentra disponible en las bases de datos de maíz y cuyas versiones son refinadas periódicamente [10-11]. De igual forma, se usaron semillas de los híbridos DTMA de maíz (DTMA 12 y 194) probados en campo junto con las variedades de maíces de palomero toluqueño (Mexi-5), maíz criollo (M33), Chihuahua 338 y ASH (forrajera comercial) con respuestas hidrotópicas y elongaciones del mesocotilo medidas por los



grupos de laboratorio (Tabla 2) [1-4,12]. El germoplasma control fue amablemente proporcionado por el CIMMYT, investigadores adscritos al INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) y adquirido de tiendas agronómicas del área del Estado de Morelos, México [3-6].

**Tabla 2.** Material vegetal usado como control. Grupo de germoplasma de origen diverso, el cuál ha sido fenotipificado para la respuesta hidrotrópica de la raíz o la elongación del mesocotilo por los grupos de laboratorio del IBt y el IB de la UNAM usando los sistemas de ensayo descritos por Eapen., et al (2015) y Nieto-Sotelo., et al (2012), respectivamente [1,13]. Se incluye el número de DTMA, código de referencia asignado por el CIMMYT o la designación definida por el mejorador que proporciono el material vegetal y la clasificación fenotípica reportada cualitativamente.

#	No.	Maíces	Respuesta
1	12	AF 11 A-602-12 x CML 312 SR (DTMA_CIMMYT)	Hidrotrópica débil de raíz primaria
2	194	AF 11 A-602-194 x CML 312 SR (DTMA_CIMMYT)	Hidrotrópica débil de raíz primaria
3	B73	Línea endogámica (Sawers)	Hidrotrópica débil de raíz primaria
4	M33	Variedad criolla (Alejandro Martínez)	Elongación del mesocotilo alta
5	Mexi5	Palomero Toluqueño (CIMMYT)	Elongación del mesocotilo media
6	CHI-338	Chihuahua-338 1-1	Hidrotrópica robusta de raíz primaria
7	ASH	Forrajera comercial	Hidrotrópica débil de raíz primaria

**1.1.4 Germinación del material vegetal.** El proceso de germinación del material vegetal se realizó de acuerdo al protocolo estandarizado por el grupo de investigación del laboratorio 21 del IBt (UNAM), reportado por Eapen., et al (2015) [1] y que será descrito a continuación:

1. Seleccionar 45 semillas de maíz (de no más de dos híbridos y/o control por semana) y depositarlas dentro de un Erlenmeyer (50 o 100 mL) previamente rotulado con el número, referencia o designación del grupo de semillas según corresponda.
2. Cubrir las semillas de maíz con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), agitar por un periodo de 30 segundos y posteriormente descartar el líquido residual con el propósito de retirar impurezas en cada ocasión. Repetir este paso tres veces.



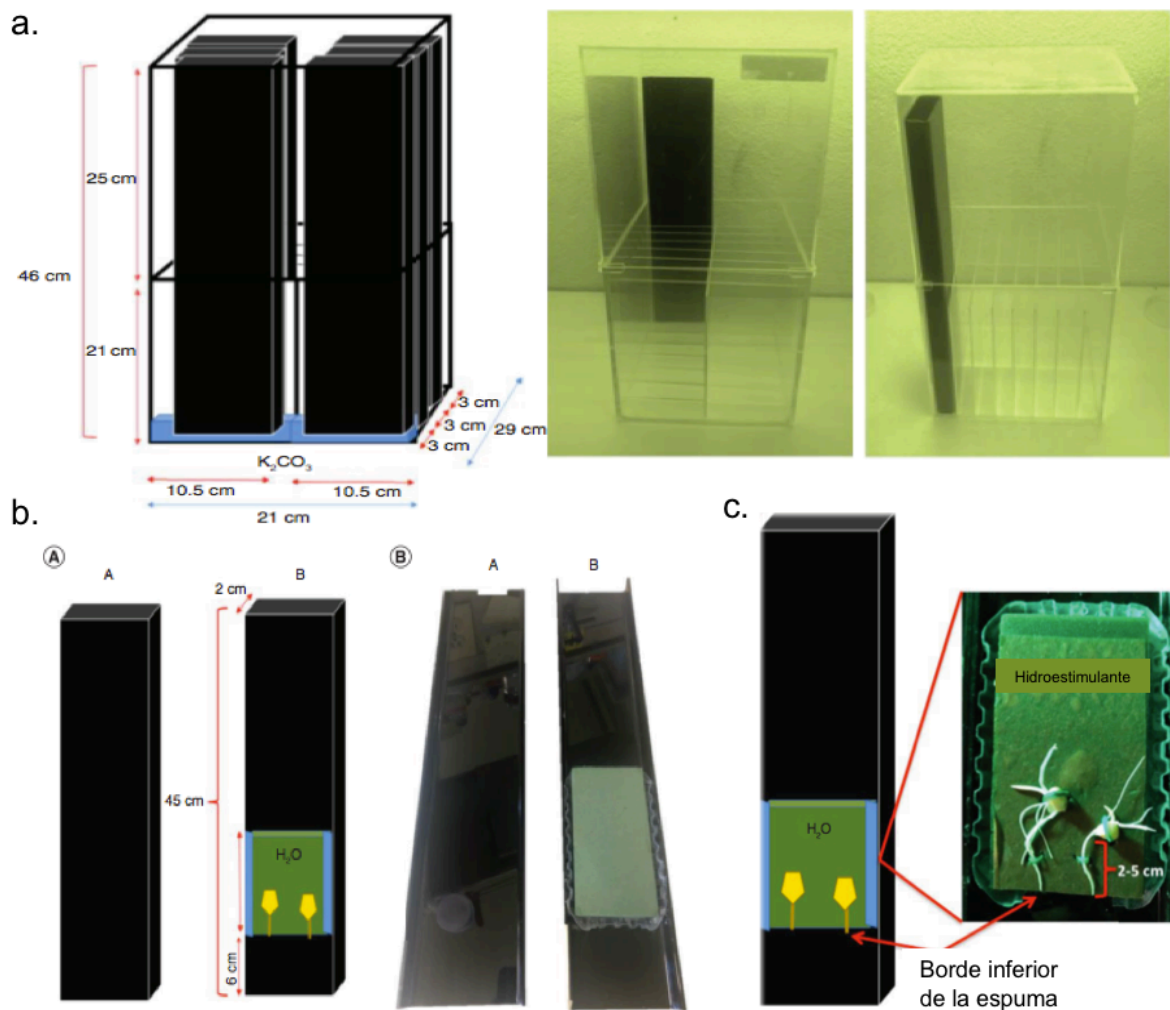
3. Desinfectar las semillas agregando 25 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) al 15% (v/v) a cada Erlenmeyer por un periodo de 4 minutos, agitar cada minuto hasta completar el tiempo de desinfección y descartar la solución.
4. Repetir el paso 2.
5. Sumergir las semillas en 25 mL de una solución fungicida (BANROT®) al 0.17 % (v/v) durante 15 minutos, descartar la solución en un recipiente especial (de acuerdo al grado de toxicidad del fungicida) o mantener en la cámara de extracción hasta su evaporación.
6. Preparar la cama de germinación o cámara húmeda (flamear una bandeja metálica con etanol absoluto, cubrir el fondo con tres capas de papel absorbente una vez baje la temperatura y humedecer con 200 mL de agua destilada estéril).
7. Depositar las semillas de forma intercalada sobre el papel absorbente de la cama de germinación, orientando la radícula de cada semilla hacia abajo (en dirección al gradiente de gravedad). Cubrir la bandeja con papel aluminio etiquetado con los datos correspondientes al híbrido o control en prueba, la fecha, las iniciales del responsable del proceso y una marca que indique la dirección de crecimiento de la raíz.
8. Incubar las camas de germinación en el cuarto de crecimiento manteniendo un ángulo de inclinación entre 30° y 40°, a una temperatura de 26+/-2°C, en oscuridad y durante un lapso de 3 o 4 días. Al terminar este periodo, calcular el porcentaje de germinación y se seleccionan las plántulas de maíz a fenotipificar.

**1.1.5 Sistema de ensayo para la fenotipificación de la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo.** Para la determinación de la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en condiciones de estrés hídrico en este estudio se diseñó un sistema de ensayo que consta de una cámara de acrílico transparente (21cm x 29 cm x 46cm) de 3 mm espesor y un espacio volumétrico de 0.028 m<sup>3</sup> (Figura 2a), dentro de la que son depositadas 16 cajas de acrílico negro (de prueba)

compuestas por dos partes complementarias (**A**: 45 cm x 7.3 cm x 2.5 cm y **B** : 45 cm x 7.1 cm x 2.5 cm) ajustables tipo sandwich y que se introducen verticalmente dentro de la cámara (Figura 2b). Adicionalmente, la parte **B** cuenta con un soporte plástico a 6 cm del borde inferior, cuyo propósito es sujetar una espuma floral verde marca Oasis® (13 cm x 7 cm x 1 cm) la cual, contiene a la solución hidroestimulante (H<sub>2</sub>Od) previa saturación por un periodo de 10 minutos y que la convierte en la única fuente de agua disponible para las plántulas de maíz en el sistema de ensayo (Figura 2b). La espuma floral se cubrió con una hoja de papel artesanal de dimensiones similares a esta para proteger a las plántulas de maiz de abrasiones al anclarlas sobre su superficie. Este procedimiento se repitió para cada parte **B** de las 16 cajas de prueba y en cada montaje, para luego ser empalmadas con su parte complementaria **A** e introducidas en posición vertical en el interior de la cámara acrílica transparente, sobre la solución de prueba (carbonato de potasio, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ReagentPlus, 99% Sigma–Aldrich o control (H<sub>2</sub>Od), bajo las condiciones del sistema y por el tiempo definido para el ensayo; los cuales, serán descritos en este capítulo y descritas con mayor detalle en el artículo escrito por Sáenz-Rodríguez & Cassab [14]

El volumen de las soluciones (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>Od) y la densidad del K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a usar en el sistema de ensayo fueron calculadas usando como referencia las descritas por Eapen., et al (2015) en su sistema [1] y escalando las cantidades en razón al espacio volumétrico de la cámara acrílica del ensayo. Adicionalmente, se probaron diferentes volúmenes de las soluciones (600 mL, 800 mL, 1000 mL, 1200 mL, 1400 mL y 1600 mL) al igual que densidades (1.450 g/cm<sup>3</sup>, 1.500 g/cm<sup>3</sup>, 1.550 g/cm<sup>3</sup>) lo que permitió definir estos parámetros del ensayo con base en la observación de la viabilidad de las plántulas hasta el periodo de emergencia dentro del sistema. De igual forma, se considero las dimensiones de la espuma floral verde marca Oasis®, las cuales se definieron en 1/3 de las usadas por el sistema de referencia y donde se corroboró la capacidad de absorción y la retención de agua al verificar la disponibilidad de la misma al final de cada ensayo [1-2].

Al término de cada ensayo de determinación de los rasgos fenotípicos en estudio (RH y EM), los componentes del sistema fueron lavados con agua corriente y secados a temperatura ambiente hasta el siguiente montaje.



**Figura 2.** Esquema del sistema de ensayo para la fenotipificación de la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en plántulas de maíz. (a. Caja acrílica transparente cerrada (21 cm x 29 cm x 46 cm con un volumen de 0.028 m<sup>3</sup> que contiene la solución de prueba (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) o control (H<sub>2</sub>O), b. Caja de acrílico negro de prueba compuesta por dos partes complementarias (**A**: 45 cm x 7.3 cm x 2.5 cm y **B**: 45 cm x 7.1 cm x 2.5 cm) ajustables y que se introducen verticalmente dentro de la cámara acrílica transparente y c. parte **B** de la caja de acrílico negro que soporta la espuma floral verde marca Oasis® (13 cm x 7 cm x 1 cm) que contiene a la solución hidroestimulante (H<sub>2</sub>O), soporta las plántulas de maíz a ensayar y es la única fuente de agua disponible para las plántulas de maíz).

### **1.1.6 Ensayo para la determinación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo.**

El montaje del ensayo de fenotipificación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo de los 72 híbridos DTMA de maíz bajo condiciones de estrés hídrico en el sistema diseñado para ese propósito (descrito en el numeral 1.1.5 y que se muestra en el esquema de la figura 2) fue definido tras numerosos ensayos de prueba; cuyos pasos procedimentales se resumen esquemáticamente en la figura 3.

Cada ensayo fenotípico inicio al termino del proceso de germinación (descrito en el numeral 1.1.4), a partir del cual se selecciono 15 plántulas de maíz con longitudes de raíz primaria entre los 2 y 5 cm para cada ensayo (criterio de selección). Este tamaño facilito la manipulación de las plántulas para el montaje y la observación de las variaciones fenotípicas en los órganos en estudio (raíz primaria y mesocotilo) dentro del sistema de ensayo. No se consideró el tamaño inicial del mesocotilo en las plántulas (su cuantificación es difícil en plántulas muy jóvenes, ya que su dimensión está en micrómetros, y aunque el nódulo escutelar es visible, el coleoptilar aún no es evidente) [13-15]. Con el material vegetal disponible para el montaje, se acotaron las **16** cajas acrílicas negras del sistema de ensayo, separando las partes (**A** y **B**) que las componen para depositar sobre los soportes plásticos presentes en **B** una espuma floral verde marca Oasis® cubierta con papel artesanal y previamente saturada con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> humedecido. Sobre cada espuma floral se fijo dos plántulas de maíz con ayuda de alfileres y alambres plastificados dejando las raíces orientadas hacia abajo y sus puntas aproximadamente a 1 mm del borde inferior de la espuma floral (Figura 2 byc). Tan pronto se realizo el montaje de la totalidad de las partes **B** se ensamblaron a sus complementarias **A** para introducir las dentro de la cámara de acrílico transparente del sistema de ensayo correspondiente (Figura 2a) [14].

Previamente fueron preparadas y etiquetadas dos cámaras acrílicas transparentes del sistema de ensayo fenotípico como: control y prueba, respectivamente (Tabla 3). Depositando en la cámara control **1600** mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y en la cámara prueba **800** mL de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con una densidad de 1.500 g/cm<sup>3</sup> para posteriormente introducir en cada una de ellas **8** cajas de acrílico negro con las plántulas fijadas cuidadosamente

(cajas prueba) evitando salpicaduras y manteniendo una posición vertical. Simultáneamente, ambas cámaras de acrílico transparente fueron cerradas con sus respectivas tapas y cubiertas con un paño negro para ser transportadas al cuarto de crecimiento donde se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad y por un periodo total de ensayo de 96 h (hasta la fase de emergencia).

**Tabla 3.** Condiciones diferenciales entre el sistema de ensayo control y prueba. En condiciones de prueba las plántulas de los 72 híbridos se exponen a una solución de 800 mL de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  con una densidad de  $1.500 \text{ g/cm}^3$  (solución higroscópica). El control del ensayo fenotípico mantiene disponible 1600 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (el doble del volumen de la anterior solución) con una densidad de  $1.000 \text{ g/cm}^3$  (solución hidroestimulante). Adicionalmente, en ambos sistemas de ensayo se cuenta con una espuma floral verde marca Oasis® saturada con  $\text{H}_2\text{O}$  que en condiciones de prueba es la única fuente de agua disponible para las plántulas y provocando un menor contenido hídrico en su interior con respecto al control.

Condiciones	Solución	Volumen (mL)	Densidad ( $\text{g/cm}^3$ )
<b>CONTROL</b>	$\text{H}_2\text{O}$	1600	1.000
<b>PRUEBA</b>	$\text{K}_2\text{CO}_3$	800	1.500

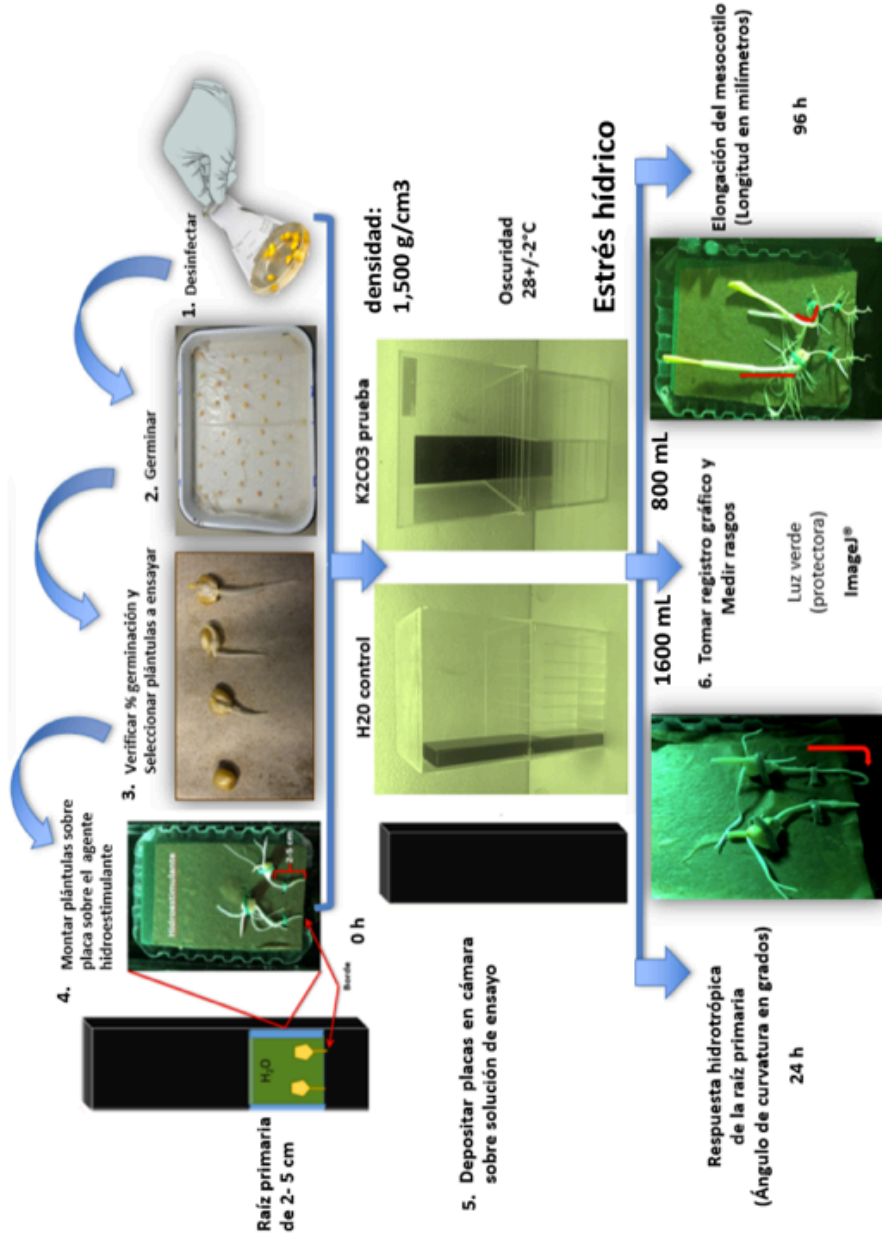
Los tiempo para la determinación de los rasgos fenotípicos de los 72 híbridos DTMA de maíz fueron definidos en primer lugar usando como referencia los descritos por Eapen et al., (2015) para la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (medida como ángulo de curvatura) en **24 h** y por Nieto-Sotelo et al., (2012) para la elongación del mesocotilo (longitud en milímetros) en 7 días a partir de la siembra [1,13]. No obstante, en ensayos realizados por triplicado, bajo las condiciones de prueba y usando los híbridos DTMA 12 (RH débil) y 181 (RH robusta ) se evaluó la pertinencia de los tiempos descritos con anterioridad, a través del análisis de curvas cinéticas de la respuesta hidrotrópica de la raíz (véase Anexo 3); donde, se encontró como el periodo ideal para su determinación el periodo comprendido entre 18 h y 24 h. Por su parte, por medio de la observación del crecimiento de las plántulas hasta el periodo de emergencia fue definido en 96 h el tiempo adecuado para medir la elongación del mesocotilo (aparición de la hoja plumular) periodo que sumado al ya destinado para la germinación suma 7 u 8 días encontrando

concordancia con reportado en ensayos en condición de siembra profunda y la fenología del maíz [13-17].

Por lo tanto, la determinación de la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo se realizó a las 24h y 96 h, respectivamente de estimulación bajo las condiciones del sistema de ensayo. Para el registro gráfico de las respuestas se usó una cámara digital Nikon D6000 con exposición a luz verde (protectora), sin flash para evitar la inhibición del mesocotilo y la elongación de la raíz, ya que estos tejidos son muy susceptibles a otras longitudes de onda [18-21]. Las fotografías fueron analizadas con el software ImageJ1x. Este software permitió medir la longitud del mesocotilo en milímetros y el ángulo de curvatura en grados para la respuesta hidrotrópica de la raíz después de establecer un estándar de medición [22].

Las condiciones de estrés hídrico a las cuales fueron sometidas las plántulas de los 72 híbridos de maíz dentro del sistema de ensayo y bajo las condiciones de prueba se midieron a través de la determinación del porcentaje de humedad relativa (%HR) durante el periodo de prueba (condiciones del control y prueba x triplicado en tres ocasiones diferentes) y mediante la determinación del potencial osmótico de los órganos de los rasgos de estudio (raíz primaria y mesocotilo). Procesos de determinación que se describen detalladamente por Sáenz-Rodríguez & Cassab (2021) [14].

**Nota:** La solución de  $K_2CO_3$  se preparó agregando 100 mg de  $K_2CO_3$  a 1000 ml  $H_2O_d$  hasta alcanzar una densidad de  $1.500\text{ g/cm}^3$  (medida por medio de un densitómetro); razón por la cual, era preparada con al menos dos días de antelación al montaje, almacenada a temperatura ambiente y reciclada al término del ensayo. De esta forma la densidad de la solución era medida al inicio y al final de cada prueba. Los requerimientos de  $H_2O_d$  fueron suplidos por el IBt (UNAM), el cual cuenta con equipo de destilación y de esterilización ( $121^\circ\text{C}$  a 15 libras de presión por 30 minutos en autoclave).

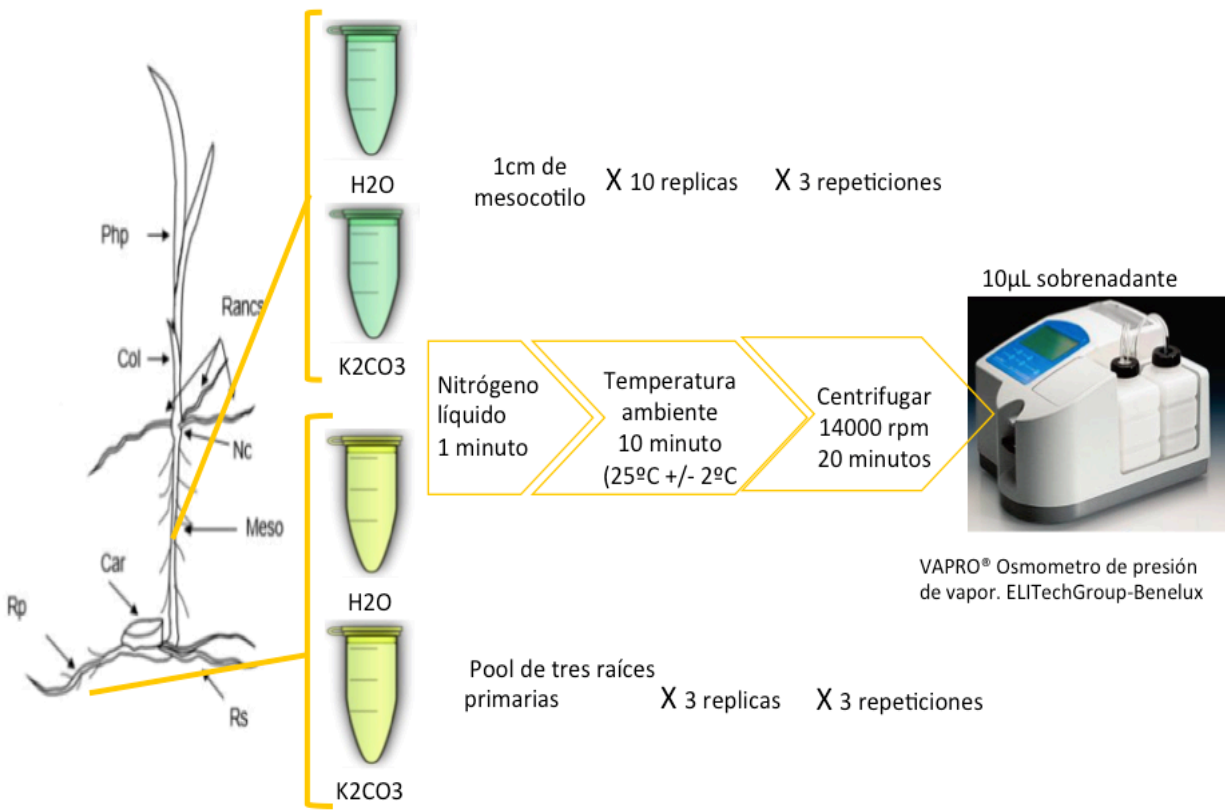


**Figura 3.** Resumen gráfico del ensayo de fenotipificación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo en híbridos DTMA de maíz. Se hace el montaje de dos cámaras del sistema de ensayo una control ( 1600 mL de H<sub>2</sub>O) y una prueba (800mL de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con una densidad de 1,500 g/cm<sup>3</sup>) sobre las que se introduce 8 placas de cajas de prueba para una n muestral de 15 plántulas de maíz analizadas . La respuesta hidrotrópica de la raíz primaria se mide a las 24 h de exposición a la condición de estrés hídrico y la elongación del mesocotilo a las 96h. Condiciones de oscuridad , a una temperatura de 26+/-2°C con exposición a luz verde protectora (longitud de onda).

## 1.2. Determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y el mesocotilo

Para determinar el potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ ) de las estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) en *Zea mays* L., se adaptó y estandarizó un protocolo a partir del descrito por Castro-Camus et al., (2013); para hojas caulinares de *Arabidopsis thaliana* [14,23]. Luego, se procedió a determinar el  $\Psi_{\pi}$  de la raíz primaria y el mesocotilo en plántulas de la línea endogámica B73 de referencia; para validar las condiciones hídricas a las cuales son sometidas las plántulas de maíz dentro del sistema diseñado para la determinación fenotípica de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo [14]. Para finalmente, seleccionar dos híbridos DTMA de maíz con respuestas fenotípicas contrastantes determinadas bajo el protocolo descrito en el numeral anterior. Así, fueron seleccionados los híbridos DTMA 12 de maíz (RH: Baja; EM: Alta) y DTMA 179 (RH: Alta; EM: Media); para medir el  $\Psi_{\pi}$  de sus estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) y establecer su capacidad para mantener la turgencia celular [23-26]. Para el ensayo de determinación del  $\Psi_{\pi}$ , se emplearon 10 plántulas por línea endogámica o híbrido DTMA de maíz por montaje; obteniendo tres réplicas para raíz primaria y diez réplicas para mesocotilo de cada ensayo (tres montajes distintos), bajo condiciones de control y estrés hídrico. Así, una vez finalizado el tiempo de ensayo (96h), se seleccionó el material vegetal a analizar y se desarrolló el protocolo que se describe a continuación (Figura 4).





**Figura 4.** Protocolo de determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y mesocotilo en híbridos DTMA de maíz [14].

**1.2.1. Protocolo de determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y el mesocotilo.** Las raíces primarias de cada plántula fueron cortadas desde su base, depositando tres de ellas por tubo eppendorf, mientras que para el mesocotilo se secciono 1 cm de este, tomando como referencia el nodo coleoptilar de cada plántula y depositando cada segmento en tubos eppendorf independientes debidamente rotulados y asegurándose que provenían de la misma condición de ensayo. Inmediatamente, el material vegetal fue congelado con nitrógeno líquido por 1 minuto, para luego ser mantenido a temperatura ambiente (25°C aproximadamente) por 10 minutos y posteriormente ser centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos (procesos repetidos cinco veces) (Figura 4). La osmolalidad de las muestras se determinó empleando un osmómetro de presión de vapor (Wescor VAPRO modelo 5600, Wescor, Inc., Logan UT

USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mediciones se obtienen en mmol/Kg por lo que para su conversión a bares se consideró que 1 OsM/Kg = - 25 bares. Los valores se validaron usando dos niveles de control, uno de 1000 mmol/Kg y otro de 290 mmol/Kg [14,23].

### 1.3. Determinación de iones solubles sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) por fotometría de llama.

Se determinó la concentración de los iones solubles sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) en los tejidos en estudio (raíz primaria y mesocotilo) de la línea endogámica B73 junto los híbridos DTMA 38 y 184 de maíz con respuestas fenotípicas contrastantes como se describe en la Tabla 4 [27-29].

**Tabla 4.** Respuestas fenotípicas de híbridos DTMA de maíz seleccionados para la determinación de sodio y potasio en los tejidos en estudio. (RH: respuesta hidrotópica; EM: elongación el mesocotilo). Se incluye a la línea endogámica B73\* referencia de los análisis genotípicos del estudio.

Maíz	Fenotipificación	
	RH	EM
B73*	Débil	Alta
DTMA 184	Robusta	Alta
DTMA 38	Débil	Baja

La determinación de los iones solubles Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en los tejidos en estudio se hizo mediante la técnica de fotometría de flama<sup>2</sup> y bajo la adaptación del protocolo descrito por López, E. (2018) para hoja, tallo y raíz de *Nicotiana tabacum* desarrollada en suelos salitrosos [30].

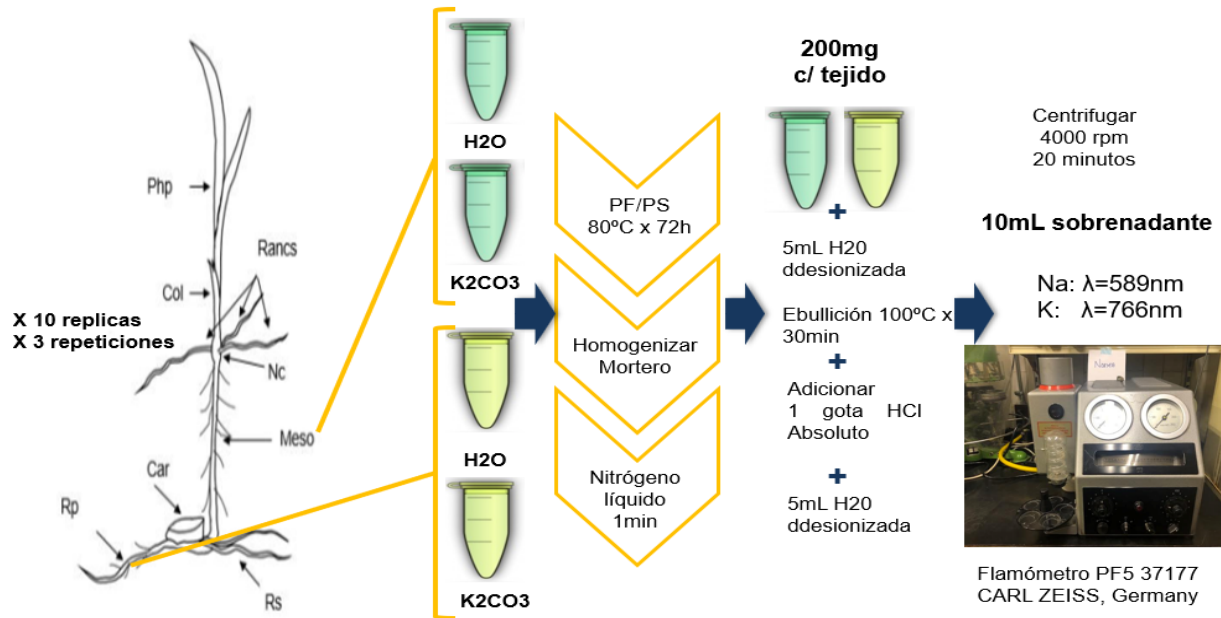
Se realizó el montaje de tres ensayos de fenotipificación bajo las condiciones de prueba,

<sup>5</sup> En la técnica de fotometría de llama... un átomo de un elemento se transforma en un ion por la pérdida de electrones, los cuales al ser recapturados desprende energía en forma de luz (fotones), con longitud de onda característica que permiten identificar al elemento y determinar su concentración; la cual es directamente proporcional a la intensidad de la luz del elemento en el fuego. Horneck & Hanson (1998) [29].

seleccionando diez plántulas de maíz de cada uno de ellos para su análisis y separando las estructuras de estudio (las raíces primarias desde su base y los mesocotilos desde el nodo escutelar hasta el coleoptilar) de las plántulas de maíz con ayuda del bisturí a las 24h y 96 horas de ensayo. De inmediato, se determinó el peso fresco de los tejidos con ayuda de la balanza analítica, depositando el material vegetal en bolsas de papel rotuladas con la identificación de la línea o híbrido DTMA de maíz de procedencia, la estructura pesada (raíz primaria o mesocotilo) y las condiciones de ensayo a la que estuvo expuesta. Para luego, ser sometidas a una temperatura de 80°C por un periodo de 72 h en el horno para su secado. Concluido este tiempo, se determinó el peso seco del material vegetal en la balanza analítica, se almacenó en tubos eppendorf rotulados bajo condiciones de oscuridad, a 4°C y en un ambiente seco hasta su procesamiento [27-30].

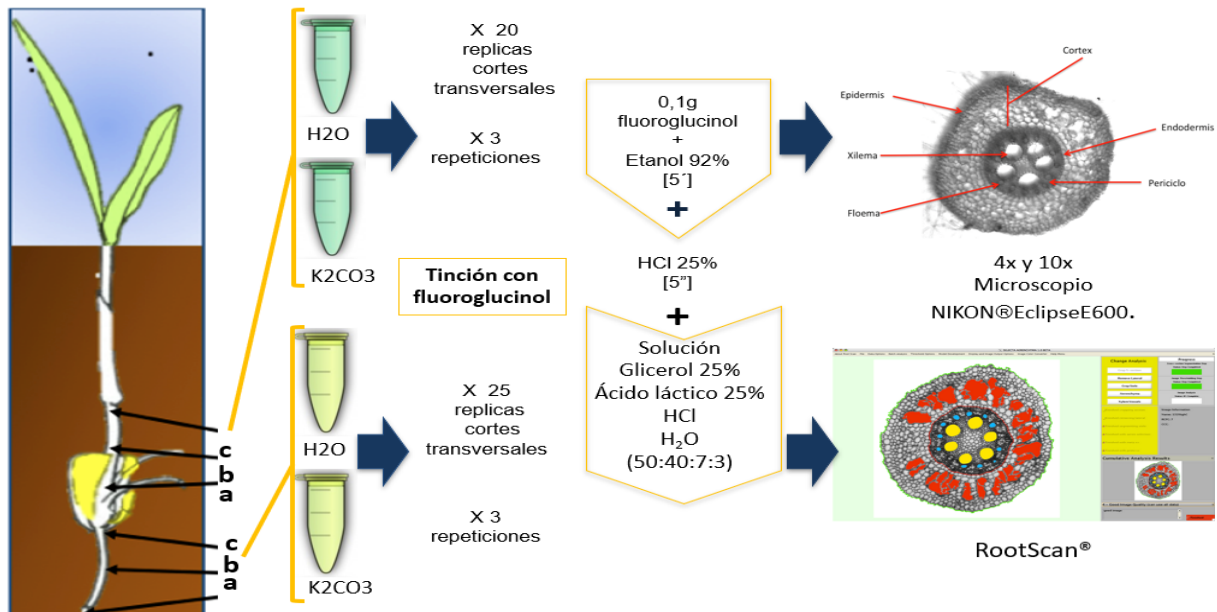
### **1.3.1. Protocolo de determinación de iones solubles sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) de la raíz primaria y el mesocotilo.**

El material vegetal correspondiente a las estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) fue macerado en mortero, homogenizado con ayuda del nitrógeno líquido; pesando y almacenado 200 mg de cada muestra homogenizada en tubos falcon de 15 mL. A continuación, se adicionó 5 mL de agua doblemente desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) a cada tubo, llevando a ebullición en baño maría por 30 minutos. Terminado el periodo de ebullición, se mantuvo a temperatura ambiente por 15 minutos y se adicionó una gota de HCl absoluto. Luego se agregó 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> adicionales, se llevó a centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos y finalmente se separó el sobrenadante en tubos falcon nuevos; para determinar la concentración de los iones en el Flamómetro PF5 37177 CARL ZEISS, Germany [23-28]. El flamómetro fue usado siguiendo las recomendaciones del fabricante y el protocolo de manejo del laboratorio del Dr. Peña en el Instituto de Fisiología, UNAM. Los patrones de análisis utilizados fueron: NaCl 1mM y KCl 1mM y las longitudes de onda ( $\lambda$ ) para la determinación de cada ion soluble fueron para Sodio (Na<sup>+</sup>): 589 nm y Potasio (K<sup>+</sup>): 766 nm (Figura 5) [25-26]. Las lecturas espectrofotométricas se convirtieron a mmol/mL y se multiplicaron por el peso seco en cada caso.



**Figura 5.** Protocolo de determinación iones solubles  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en la raíz primaria y mesocotilo en híbridos DTMA de maíz por fotometría de flama [27-30].


#### 1.4. Análisis histológico de la raíz primaria y el mesocotilo bajo condiciones de estrés hídrico.



**Figura 6.** Análisis histológico de la raíz primaria y mesocotilo en los híbridos DTMA de maíz por microscopía óptica.

Se realizó el análisis histológico de cortes transversales de tejido fresco de la raíz primaria y mesocotilo bajo las condiciones de estudio; con el propósito de visualizar posibles cambios anatómicos entre respuestas fenotípicas y condiciones de ensayo que puedan constituir rasgos fenotípicos de potencial interés [33-35]. Por lo tanto, se desarrollaron tres ensayos de fenotipificación usando la línea endogámica B73 de maíz (RH: Débil; EM: Alta), el híbrido DTMA 38 de maíz (RH: Débil y EM: Baja) y al híbrido DTMA 184 de maíz (RH: Robusta y EM: Alta) con respuestas contrastantes y bajo las condiciones de prueba a 24 h y 96 h de ensayo. Se seleccionó y colectó de cada montaje: 10 raíces primarias y 10 mesocotilos de los dos tiempos de ensayo. Las estructuras (raíz primaria y mesocotilo) fueron recuperadas y divididas longitudinalmente en tres fracciones de dimensiones similares con ayuda del bisturí, y transversalmente con ayuda del estereoscopio [15,33-36]. Cada fracción fue denominada y definida como se describe a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Fracciones de la raíz primaria y el mesocotilo analizadas histológicamente por microscopía óptica en bajo aumento (4X y 10X). Se incluye la descripción de las tres fracciones (A, B y C) seccionadas a lo largo de la extensión de los órganos en estudio, definiendo zonas de acuerdo a su localización y a la presencia de células específicas siguiendo como referencia para mesocotilo de maíz lo descrito por Niu et al.,(2020) [15]. Se observó un mínimo de 20 cortes transversales por zona para mesocotilo y de 25 para la raíz primaria provenientes de tres ensayos diferentes bajo las condiciones de estudio. Fracciones de la raíz primaria y el mesocotilo analizadas histológicamente por microscopía óptica en bajo aumento (4X y 10X)

Imagen	Estructura	Fracciones	Zona	Localización
	<b>Mesocotilo</b>	A	Presencia de células meristemáticas	Próximo al nodo coleoptilar
		B	Presencia de células de rápido crecimiento	Entre la fracción a y c
		C	Presencia de células maduras	Próximo al nodo escutelar
	<b>Raíz Primaria</b>	C	Presencia de células maduras	Próximo a la base de la raíz
		B	Presencia de células de rápido crecimiento	Entre la fracción a y c
		A	Presencia de células meristemáticas	Próximo al ápice de la raíz

Se analizaron por fracción: 20 cortes transversales para mesocotilo y 25 cortes transversales de raíz primaria de tres ensayos bajo condiciones de prueba. Para facilitar la visualización y análisis de las estructuras anatómicas se realizaron pruebas con diferentes tinciones (azul de metileno, safranina y floroglucinol, etc.) de las cuales fue seleccionada la tinción con floroglucinol; por observaciones histológicas previas en material vegetal de prueba y la cual es específica para los grupos hidroxicinamilaldehído presentes en las ligninas [36-38].

Los cortes histológicos fueron depositados en tubos eppendorf rotulados (estructura, fracción y repetición de procedencia) y conservados en una solución de etanol al 92% y ácido acético glacial en partes iguales (1:1) hasta su tinción [36-37]. El protocolo de tinción inició con la eliminación de la solución de conservación de cada tubo (proceso cuidadoso para no perder cortes histológicos). Luego, se adiciono 100µL de una solución de floroglucinol al 1% (en etanol al 92%) en cada tubo por 5 minutos y se descartó al terminar este lapso. Se continuó el proceso, agregando 100 uL de HCl al 25% por 5 segundos y eliminando al concluir el tiempo. Posteriormente, sumergió los cortes histológicos en 100µL de una solución con glicerol 25%, ácido acético glacial 25%, HCl al 25% y floroglucinol al 1% en etanol al 92% (en una proporción 50:40:7:3) que se mantuvo y uso para el montaje. Finalmente, se realizó el montaje de los cortes histológicos entre portaobjeto-cubreobjeto, separándolos con ayuda de una aguja para facilitar su observación microscópica en bajo aumento (4X y 10X), usando el microscopio óptico Nikon®ElipseE600, con registró fotográfico de cada imagen y analizándola posteriormente con ayuda del programa de software RootScan® (Figura 6) [37-39]. La tinción de floroglucinol, también conocida como coloración de Weisner, produce un color rosa cereza o fucsia donde están presentes los grupos aldehídos y su intensidad varía de acuerdo con el grado de lignificación [37-38]. El programa RootScan permite medir algunos parámetros de interés tales como: área transversal del corte (RXSA), área transversal del vástago (TSA), área del córtex (TCA), área del metaxilema (MXVA), número de vasos de metaxilema (MX\_num), número de filas celulares (CF\_num) y número de células del córtex (CC\_num); los cuales, se determinaron en los cortes histológicos de la raíz primaria y mesocotilo en bajo aumento (10X) [39].

## 1.5. Análisis estadístico de las respuestas fenotípicas

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos a partir de la fenotipificación (respuesta hidrotropica de la raíz y la elongación del mesocotilo) de los 72 híbridos DTMA de maíz y de las determinaciones realizadas para su desarrollo, fueron analizadas usando el entorno estadístico R versión 3.2.2 (R Core Team, 2015) y RStudio versión 1.0.153 © 2009-2017, Inc. de libre acceso packages: stat, pwr, ggplot2, corrplot [40-41].

El poder estadístico obtenido de la asociación fenotípica de los rasgos (respuesta hidrotropica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo); correspondió a:

Power = **0.9996272**

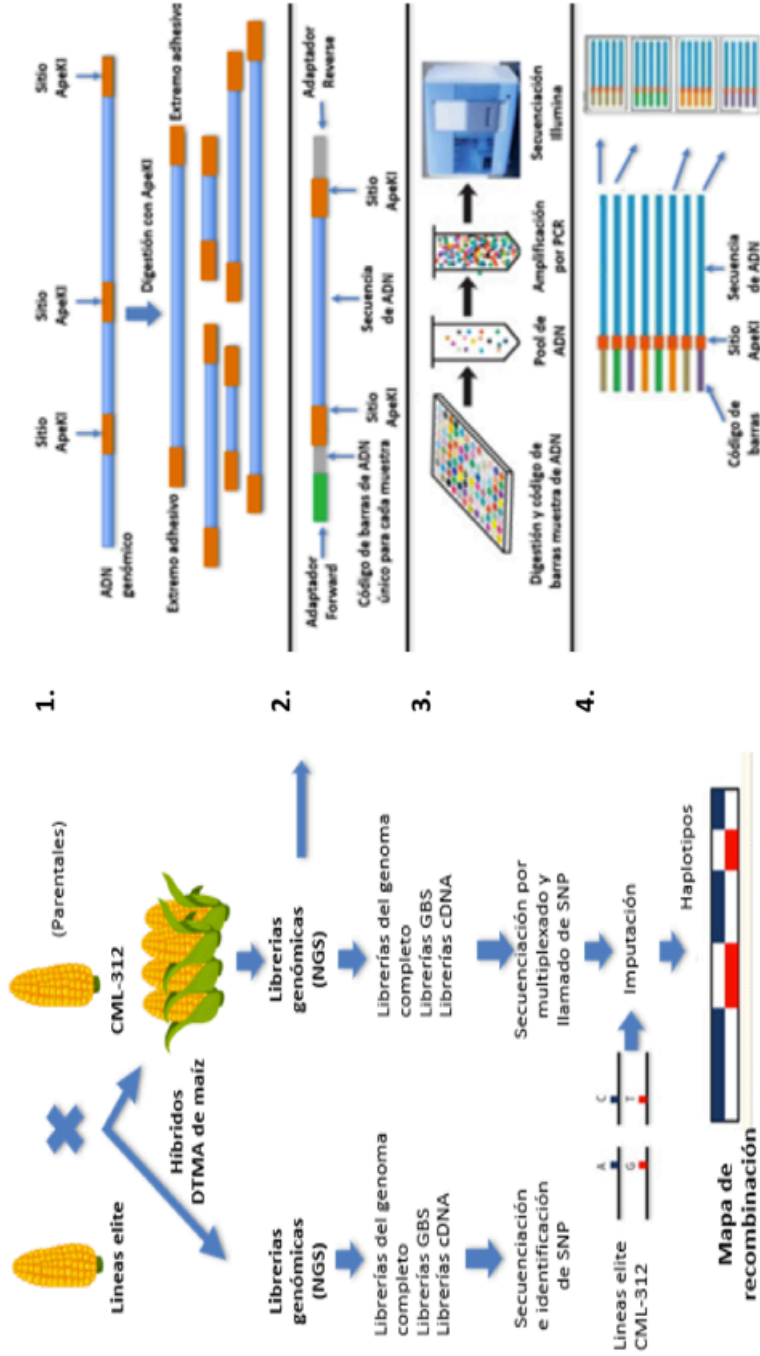
pwr.r.test (n = 72, r = 0.63, sig. level = .005, power = x)

H\_alternative = two.sided

(n = población de estudio seleccionada de una colección de 224 híbridos DTMA de maíz analizado por el laboratorio; r = índice de correlación de Pearson obtenido a partir del análisis entre rasgos sin puntos atípicos; sig.level = nivel de significancia estadística de  $\alpha$ : 0.005).



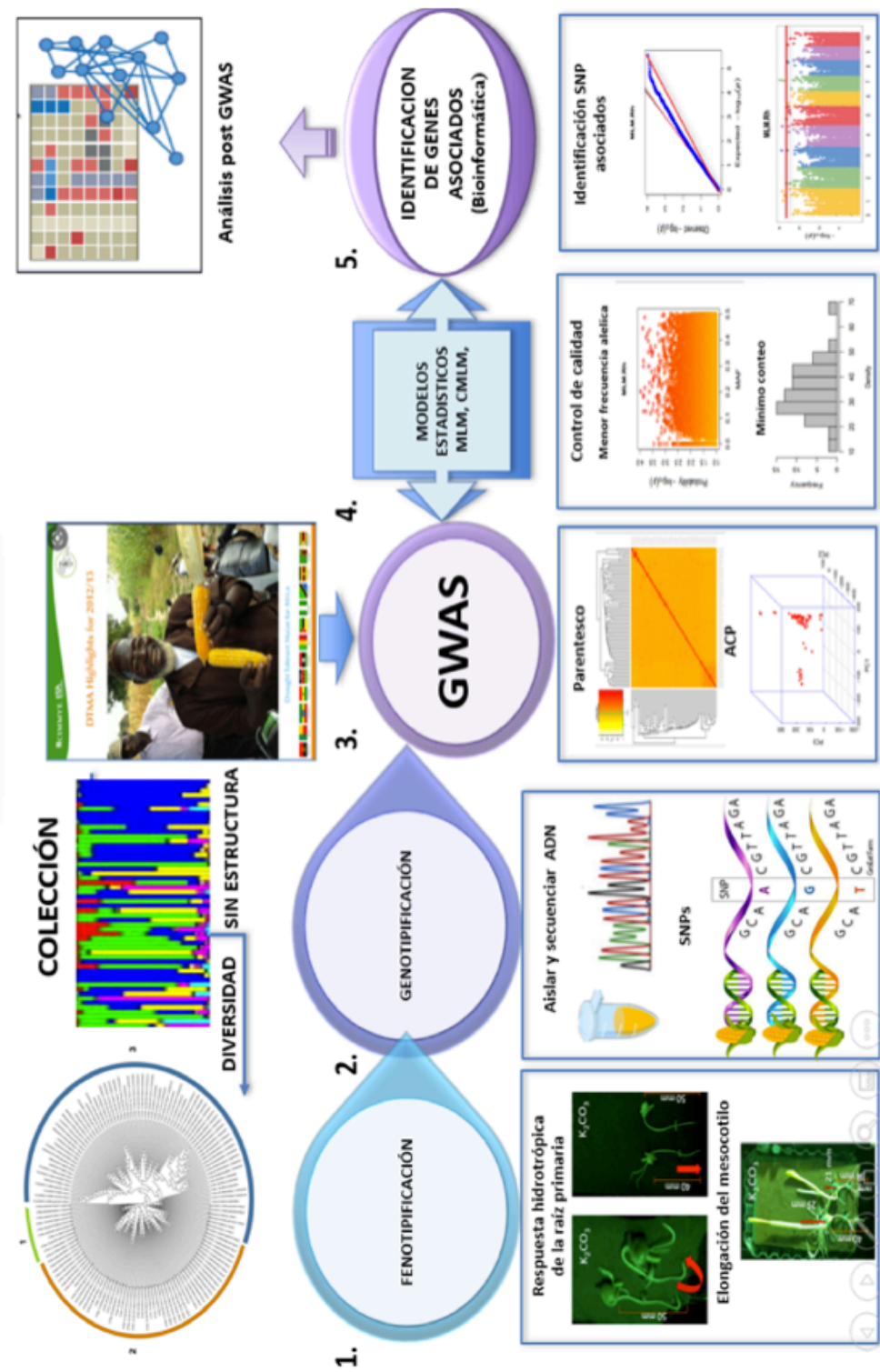
## 2. Genotipificación



**Figura 7.** Gráfico representativo del procedimiento genotipificación por secuenciación (GBS). Esta tecnología de nueva generación (NGS) se desarrolla siguiendo los siguientes pasos: 1. Construcción de una librería de representación reducida por digestión de cada muestra de ADN con una enzima de restricción; 2. Unión de adaptadores con código de barras personalizadas a los extremos adhesivos de sitios de restricción de los fragmentos obtenidos; 3. Pool de ADN digerido y marcado en tubos independientes. Amplificación del ADN, preparación de la librería y secuenciación en la plataforma Illumina; Paso 4. Asignación de secuencias usando el código de barras para cada muestra y agrupación de secuencias de ADN para cada muestra [42-44].



Los datos del genoma completo (genotipos) de la colección de híbridos DTMA de maíz, fueron determinados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Cornell, NY, USA mediante la técnica de genotipificación por secuenciación (GBS, *Genotyping By Sequencing*) a petición del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con sede en El Batán, Estado de México; quien los compartió amablemente para nuestro estudio (Figura 7) [4,42-44]. Los archivos fueron suministrados en extensión *HapMap* (.hmp); lo que hizo necesario el uso del programa de software *TASSEL*® (*Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage*) versión 5.2.50, para la visualización, selección y manipulación de los datos genotípicos correspondientes a los 72 híbridos DTMA de maíz fenotipificados [42-45]. El llamado de marcadores moleculares (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), proporcionó un total de 955.690 SNPs por híbrido DTMA de maíz, que fueron sometidos a dos filtros de control de calidad: el primer filtro [*MAF*, *Minor Allele Frequency*] descartó los marcadores moleculares con frecuencia alélica menor al 5% ( $\leq 0.05$ ), con la intención evitar la influencia de variaciones genéticas resultado de errores técnicos en la secuenciación y el segundo filtro [*MC*, *minimum count*], eliminó el exceso de datos faltantes, considerando únicamente los SNPs presentes en al menos 56 de los 72 híbridos en estudio; es decir en el 80% de datos presentes evitando posibles errores de secuenciación e inestabilidad en los resultados y siendo más restrictivo por el número de individuos a analizar [45-47]. Por lo tanto, del casi millón de marcadores obtenidos del llamado sin procesar, se consideró el uso del 35,15% de ellos que corresponde a 335.931 SNPs por híbrido DTMA de maíz, para la aplicación del análisis de GWAS [45-49].



**Figura 8.** Diagrama de pasos requeridos para el desarrollo de estudios de asociación del genoma completo (GWAS). 1. Fenotipificación; 2. Genotipificación; 3. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés); 4. Modelos estadísticos aplicados (MLM: Modelo Lineal Mixto y CMLM: Modelo Lineal Mixto Comprimido); 5. Identificación de genes asociados a través del mapeo de marcadores sobre las secuencias y en relación a su significancia estadística [45-77].

## **2.1. Estudios de asociación a nivel de genoma completo (GWAS) de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo de híbridos DTMA de maíz**

Para dar inicio a los GWAS se estableció la diversidad génica y la ausencia de estructura poblacional entre los 72 híbridos DTMA de maíz (individuos en estudio); por medio de la construcción de un cladograma que utilizó los datos fenotípicos (respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y elongación del mesocotilo) y genotípicos plataforma del programa *TASSEL*® versión 5.2.50, cladograma agrupamiento de sus SNPs por *neighbor-joining* (Figura 8) [45,50].

El análisis de asociación genómica se realizó sobre dos plataformas informáticas: la primera de ellas *TASSEL* versión 5.2.50 (*Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage*) desarrollada por el laboratorio *Maize Genetics and Diversity* del Dr. Edward Buckler de la Universidad de Cornell, en los Estados Unidos y la segunda denominada *GAPIT* (*Genome Association and Prediction Integrated Tool*); paquete desarrollado en lenguaje de R, publicado por Zhang., et al 2011 y mejorado por Lipka et al., 2012, desarrollado en la Universidad de Cornell, la Universidad de Illinois y la Universidad estatal de Washington en los Estados Unidos [45,51] El análisis GWAS en *TASSEL* v.5.2.50 se realizó usando el modelo lineal mixto (*MLM, Mixed linear model*) que incorpora simultáneamente tanto la estructura de la población como la relación críptica de su parentesco (kinship) y el análisis de componentes principales; como covariables de corrección de asociación, controlando efectivamente falsos positivos [45, 52-55]. Por su parte, el análisis de GWAS en la plataforma R se realizó implementando dos estrategias propias de la herramienta de asociación y predicción genómica: *GAPIT*; la primera estrategia basada en el modelo lineal mixto comprimido (*CMLM, Comprimide Mixed linear model*); el cual se caracteriza por agrupar a los individuos en grupos, ajustándolos como efecto aleatorio, lo que reduce el tiempo computacional y aumenta el poder estadístico, y una segunda estrategia denominada: *GAPIT SUPER*; donde, inicialmente se evalúan los efectos de los marcadores (como en los modelos GLM ó MLM), seguido de un análisis de parentesco optimizado que utiliza la máxima similitud en un modelo mixto y tiene en cuenta la relación desequilibrio de ligamiento (LD), para

finalizar con una nueva evaluación de los marcadores, junto con su parentesco derivado de los marcadores seleccionados excepto los que están en LD con los marcadores de prueba [56-59].

El punto de corte de asociación de los SNPs fue determinado a través del análisis del comportamiento de la distribución lineal de los datos en los gráficos de normalidad Q-Qplot y el comportamiento y distribución en los gráficos de *ManhattanPlot* a lo largo de los 10 cromosomas del maíz; con lo cual se estableció los valores de probabilidad de asociación ( $p \text{ valor} \geq 3.25$  en el GWAS con *MLM* y  $p \text{ valor} \geq 4,0$  para el que GWAS con *CMLM* y *GAPIT SUPER*) [52-60]. Los SNPs imputados como asociados a través del análisis de GWAS, fueron usados como puntos de referencia en la identificación de genes candidatos de asociación a los rasgos. Se localizaron aquellos genes cuya secuencia contenía SNPs y/o se localizaban cercanos a estos a no  $\pm 1$  Kpb corriente arriba y corriente debajo de estos. Usando para la exploración el entorno de *MaizeGDB* [<https://www.maizegdb.org/>] *Genome Browser*; que permite el rastreo, la selección del genoma de la línea endogámica B73 de referencia en su versión RefGen\_v3 que se ha utilizado durante el desarrollo del estudio (Lawrence *et al.*, 2004), con las versiones disponibles en la actualidad y la búsqueda de cada gen en diferentes bases de datos relacionadas con maíz [60-62].

## **2.2. Efecto fenotípico de los SNP asociados para los rasgos en estudio**

Se calculó el estado alélico de cada SNP asociado para determinar su efecto fenotípico a partir de los promedios de la respuesta de los rasgos en estudio; estimando así, para la respuesta hidrotópica de la raíz primaria (con relación al ángulo de su curvatura) un promedio de: 36.1° y para la elongación del mesocotilo un promedio de: 34.5 mm ambos resultados obtenidos bajo condiciones de estrés hídrico. Usando estos parámetros, se agruparon los 72 híbridos DTMA de maíz en las líneas homocigotas del alelo de mayor frecuencia, homocigotas del alelo de menor frecuencia y las heterocigotas. Y al promedio de sus respuestas fenotípicas, se restó el promedio ponderado de las respuestas de todos los híbridos en estudio para luego correlacionar estadísticamente sus efectos

fenotípicos y poder visualizarlos a través de mapas de calor (*HeatMap*) en RStudio versión 1.0.153© 2009-2017, Inc [63].

### 2.3. Identificación de los genes asociados a los rasgos en estudio

La identificación y designación de los genes asociados con la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo de los híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico se realizó utilizando la exploración de sus datos transcriptómicos en las siguientes bases de datos genómicos generales y específicos para maíz:

1. *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
2. *MaizeGDB*, Maize genetic and genomics database (Portwood et al., 2018) (<https://www.maizegdb.org>)
3. *Phytozome*, the plant genomics resource (Goodstein, 2012). (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)
4. *Gramene* (<http://www.gramene.org>) (Cold Spring Harbor Laboratory, Oregon State University y [EMBL-EBI](https://www.ebi.ac.uk/EMBL/EBI/)) [61-67].

Y por medio de las anotaciones de los genes asociados en términos de *Gene Ontology (GO: terms)* se definieron procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares que caracterizan a grupos de genes (Ashburner & others 2000) y en términos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) redes de interacciones moleculares (Kanehisa & Goto 2000); usando las bases de datos de:

1. *AmiGO 2* version: 2.5.12 (Carbon et al., 2009) con *PANTHER GO* versión 14 (Muruganujan et al., 2013)
2. *KEGG*, (<https://www.genome.jp/kegg>) ([Copyright](https://www.genome.jp/kegg) 1995-2020 [Kanehisa Laboratories](https://www.genome.jp/kegg)).
3. *UniprotKB*, (<https://www.uniprot.org>) [68-73].

## 2.4. Análisis de enriquecimiento con los genes asociados a los rasgos en estudio

Una vez finalizada la consulta en las diversas bases de datos de los genes asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo; que permitió obtener la identificación, localización y descripción funcional de aquellos genes anotados o caracterizados en ellas [74]. Se utilizó un software de libre acceso llamado: Camoco (Co-análisis de componentes moleculares) y su herramienta de coexpresión (COB) (<https://pypi.org/project/camoco-cob>); lo cual permitió la construcción de redes de interacción genómica entre ellos, utilizando las siguientes tres bases de datos específicas para maíz:

1. ZMPAN: Almacena datos genómicos de diversos rasgos y la variación en la expresión de diversas accesiones de maíz (pangenoma del maíz). (Hirsch et al., 2014).
2. ZMROOT: Datos genómicos de la variación de la expresión génica en las raíces maduras de maíces endogámicos genotípicamente diversos (Schaefer, 2016).
3. ZMSAM: Almacena datos genómicos del análisis de expresión génica de diferentes tejidos y fases de desarrollo del maíz (Stelpflug et al., 2016) [74-77].

## 2.5. Análisis estadístico de la genotipificación

Los análisis estadísticos de los datos fenotipo-genotipo (respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo) de los 72 híbridos DTMA de maíz, fueron analizadas usando el software *TASSEL*®, el entorno estadístico R versión 3.2.2 (R Core Team, 2015), RStudio versión 1.0.153 © 2009-2017, Inc. de libre acceso packages: GAPIT, ggplot2, corrplot [40-41]. Las redes de co-expresión génica COB (Co-expression Browser) del software CAMOCO® se realizó entre pares de genes y sus posibles combinaciones en términos de gene ontology (GO) a través de algoritmos de superposición; donde, calcula la interacción a través de la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson, la transformada de Fisher, normalizando a una distribución normal Z de los datos y con un *p-valor* de 0.05 corregido con Bonferroni [74-77].



## Capítulo II. Referencias.

1. Eapen, D., Martínez, J.J., Cassab, G.I. (2015). Assays for root hydrotropism and response to water stress. In: Blancaflor EB, ed. *Plant gravitropism: methods and protocols*. New York. Springer New York, pp. 133-142. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8_11).
2. Martínez-Guadarrama, J.J. (2019). Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotropica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS). [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)]. Repositorio UAEM, Cuernavaca-México.
3. The Drought Tolerant Maize for Africa project – The Drought Tolerant Maize for Africa project (cimmyt.org). <https://dtma.cimmyt.org>. (10/10/2017)
4. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). (2013). The Drought Tolerant Maize for Africa project. DTMA Brief, September. Disponible en: <http://dtma.cimmyt.org/index.php/about/background>. (10/10/2017).
5. Vergara, N., Rodríguez, S., Córdova, H. (2003). Potencial de líneas de maíz para mejorar híbridos. *Rev Fitotec Mex* 26 (4): 291 – 299.
6. Cairns, J. E., Crossa, J., Zaidi, P. H., et al. (2013). Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Sci* 53(4):1335–1346.
7. Elshire, R. J et al. 2011. Arobust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos One* 6(5): e19379.
8. Aguirre, R., Peske, S. T. (1983). Manual para operadores de unidades de beneficio de semillas (UBS). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Unidad de Semillas. Cali, Colombia. 253 p.
9. Blandon, H. (2004). Tratamiento químico para la preservación de semilla de maíz almacenada bajo condiciones de deterioro. [Tesis de Pregrado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro (UAAAN)]. Repositorio UAAAN, Coahuila-México.
10. Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S. et al. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Sci* 326(5956):1112-5. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>.
11. Lawrence, C.J., Seigfried, T.E., Brendel, V. (2005). The Maize Genetics and Genomics Database. The Community Resource for Access to Diverse Maize Data, *Plant Physiol* 138(1):55–58. <https://doi.org/10.1104/pp.104.059196>.
12. Embarcadero, A.G. (1971). Estudio del mesocotilo como característica en la clasificación biosistemática de maíz. [Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio UNAM, México.
13. Nieto-Sotelo, J., Cassab, G.I., Eapen D., et al. (2012). Informe técnico final del proyecto IMIC–2011–008: “Descripción de caracteres hidrotropicos y del desarrollo y crecimiento del mesocotilo y de las raíces adventicias en razas y líneas de maíz.
14. Sáenz-Rodríguez, M. N., & Cassab López, G. I. (2021). Assay system for mesocotyl elongation and hydrotropism of maize primary root in response to low moisture gradient. *BioTechniques*, 71(4), 516–527. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0034>
15. Sáenz-Rodríguez, M.N., Cassab, G.I. (2021). Primary Root and Mesocotyl Elongation in Maize Seedlings: Two Organs with Antagonistic Growth below the Soil Surface. *Plants (Basel)*:10 (7):1274. <https://doi:10.3390/plants10071274>.
16. Hoshie, O., Niño, P.M.C., Banaya, C., et al. (2018). Longer mesocotyl contributes to quick seedling establishment, improved root anchorage, and early vigor of deep-sown rice. *Field Crops Res* 228: 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.08.015>.
17. Niu, L., Hao, R., Wu, X., Wang, W. (2020). Maize mesocotyl: role in response to stress and deep-sowing tolerance. *Plant Breed* 00:1–8.
18. Idikut, L. (2013). The Effects of Light, Temperature and Salinity on Seed Germination of Three Maize Forms. *Greener J Agric Sci* 3:246-253. <https://doi.org/10.15580/GJAS.2013.3.08011232>.

19. Takaki, M. (2001). New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. *Braz J Plant Physiol* **13**:104-108.
20. Sommer, A.P & Franke, R-P. (2006). Plants grow better if seeds see green. *Naturwissenschaften* **93**: 334–337.
21. Folta, K.M & Maruhnich, S.A. (2007). Green light: a signal to slow down or stop. *J Exp Bot* **58**: 3099 – 3111.
22. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**(7), 671–675 (2012).
23. Camus-C. E., Palomar, M., Covarrubias, A. A. (2013). Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored in-vivo using terahertz time-domain spectroscopy. *J Sci Rep* **3**(1). <https://doi.org/10.1038/srep02910>.
24. Money, N. P. (1989). Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant physiol* **91**:766-799.
25. Moreno, Liz. (2009). Plant responses to water deficit stress. A review. *Agron Colomb* **27**: 179-191.
26. Kirkham, M.B. (2014). Principles of Soil and Plant Water Relation. 2<sup>nd</sup> Edit. *Academic Press*, p. 598.
27. Johanson, J.G., Cheeseman, J.M. (1983). Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings: I. Role of the mesocotyl in 'sodium exclusion'. *Plant Physiol* **73**:153-158. <https://doi.org/10.1104/pp.73.1.153>.
28. Aleman, F. (2009). Absorción de K<sup>+</sup> en plantas con diferente tolerancia a la salinidad. [Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia – Departamento de Nutrición Vegetal (CSIC)]. Repositorio Universidad de Murcia. España.
29. Horneck, D., Hanson, D. (1998) Determination of potassium and sodium by flame emission spectrophotometry. En: Kalra, Y.-P., Ed., Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, *CRC Press*, New York, USA, pp. 153-155.
30. López E. (2018). Crecimiento en suelos salitrosos de *Nicotiana tabacum* modificada con el gen ARO4 de la levadura halotolerante *Dabaryomyces hansenii*. Tesis. Facultad de estudios superiores Iztacala, Los Reyes Iztacala. Edo. México.
31. Taiz, L., Zeiger, E. (1991). Plant physiology. Ed. Benjamin Cummings Publishing Co.
32. Cheeseman, J. (1982). Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. *J Membr Biol* **70**:157-164.
33. Kadam, N. N., Tamilselvan, A., Lawas, L. M. F., et al. (2017). Genetic control of plasticity in root morphology and anatomy of rice in response to water-deficit. *Plant Physiol* **174**: 2302– 2315.
34. Schneider, H., Klein, S., Hanlon, M., et al. (2020). Genetic control of root anatomical plasticity in maize. *The Plant Genome* **13**: 1-14. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20003>.
35. Burton, A., Brown, K., Lynch, J. (2013). Phenotypic Diversity of Root Anatomical and Architectural Traits in Zea Species. *Crop Sci* **53**:1042. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.07.0440>.
36. Albornoz, P. (2018). Técnicas histológicas vegetal. [https://Técnicas\\_histológicas\\_vegetal\\_Histo-NOA.pdf\(unt.edu.ar\)](https://Técnicas_histológicas_vegetal_Histo-NOA.pdf(unt.edu.ar)).
37. Speer, E.O. (1987). A Method of Retaining Phloroglucinol Proof of Lignin, Stain *Technology* **62**(4): 279-280 <https://doi.org/10.3109/10520298709108008>.
38. Pomar, F., Merino, F., Barceló, A. (2002). O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* **220**: 0017–0028. <https://doi.org/10.1007/s00709-002-0030-y>.
39. Burton, A. L., Williams, M., Lynch, J., et al. (2012). RootScan: Software for high-throughput analysis of root anatomical traits. *Plant and Soil* **357**: 189– 203.
40. R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.



41. RStudio Team. (2015). RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA. Retrieved from <http://www.rstudio.com/>.
42. Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., et al. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* **6**(5): e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>.
43. Deschamps, S., Llaca, V., May, G.D. (2012). Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology (Basel)*. **1**(3):460-483. <https://doi.org/10.3390/biology1030460>.
44. Wang, N., Yuan, Y., Wang, H., et al. (2020). Applications of genotyping-by-sequencing (GBS) in maize genetics and breeding. *Sci Rep* **10**: 16308. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73321-8>.
45. Bradbury, P, J., Zhang, Z., Kroon, D.E., et al. (2007). [TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm108). *Bioinformatics* **23**:2633-2635.
46. Tabangin, M. E., Woo, J. G., Martin, L. J. (2009). The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. *BMC proceedings*, **3** Suppl 7(Suppl 7), S41. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-3-S7-S41>.
47. Turner, S., Armstrong, L. L., Bradford, Y., et al. (2011). Quality control procedures for genome-wide association studies. *Current protocols in human genetics, Chapter 1*, Unit1.19. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0119s68>.
48. Xiao Y, Liu H, Wu L, Warburton M, Yan J. Genome-wide Association Studies in Maize: Praise and Stargaze. *Mol Plant* **10**(3):359-374. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.008>.
49. Yan, Jianbing & Tan, Bao-Cai. (2019). Maize biology: From functional genomics to breeding application. *J Integr Plant Biol* **61**. <https://doi.org/10.1111/jipb.12819>.
50. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**(4):406-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
51. Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. et al. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* **38**: 203–208. <https://doi.org/10.1038/ng1702>.
52. Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, CQ. et al. (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat Genet* **42**:355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>.
53. Cardon, L.R., Palmer, L.J. (2003). Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* **361**(9357):598-604. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12520-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12520-2).
54. Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., Buckler, E.S. (2003). Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**:357-74. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907>.
55. Song M, Hao W, Storey JD. Testing for genetic associations in arbitrarily structured populations. *Nat Genet* **47**(5):550-4. <https://doi.org/10.1038/ng.3244>.
56. Lipka, A.E, F., Tian, Q., Wang, J., et al. (2012). GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics* **28**: 2397–2399. <https://www.maizegenetics.net/gapit>.
57. Wang, Q., Tian, F., Pan, Y., et al. (2014). A SUPER powerful method for genome wide association study. *PLoS One* **9**: e107684.
58. Kaler, A.S., Gillman, J.D., Beissinger, T., et al. (2020). Comparing Different Statistical Models and Multiple Testing Corrections for Association Mapping in Soybean and Maize. *Front Plant Sci* **10**:1794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01794>.
59. Wang, J., Zhang, Z. (2021). GAPIT Version 3: Boosting Power and Accuracy for Genomic Association and Prediction. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **S1672-0229(21)00177-7**. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.08.005>.
60. Schweder, T & Spjotvoll, E. (1982). Plots of *P*- values to evaluate many tests simultaneously. *Biometrika* **63** (3): 493-502.

61. Lawrence, C. J., Dong, Q., Polacco, M. L., et al. (2004). MaizeGDB, the community database for maize genetics and genomics. *Nucleic Acids Research* **32**(10).
62. Andorf C. M., Lawrence, C. J., Harper, L. C., Schaeffer, M. L., Campbell, D. A., y Sen, T. Z. 2010. The Locus Lookup tool at MaizeGDB: identification of genomic regions in maize by integrating sequence information with physical and genetic maps. *Bioinformatics* **26**(3):434– 436.
63. Adib, O., Molina, M.G., Bianchi, M., et al. (2019). Mejoramiento Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Producción Animal. Universidad de Cordoba, España.
64. Sayers, E.W., Beck, J., Bolton, E.E., et al. (2021). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **49**(D1): D10-D17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa892>.
65. Portwood, J.L., Woodhouse, M.R., Cannon, E.K., et al. (2018). MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res* **47**(D1): D1146-D1154. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1046>.
66. Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., eta al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40**(Database issue): D1178-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>.
67. Gupta, P., Naithani, S., Tello-Ruiz, M.K., et al. (2016). Gramene Database: Navigating Plant Comparative Genomics Resources. *Curr Plant Biol* **7-8**:10-15. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2016.12.005>.
68. Ashburner M, et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**(1):25-9.
69. Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., et al. (2009). AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **15;25**(2):288-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn615>.
70. Ye, J., Fang, L., Zheng, H., et al. (2006). WEGO: A Web Tool for Plotting GO Annotations. *Nucleic Acids Research* **34**: 293.
71. Muruganujan, A., Casagrande, J. T., y Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis whit the PANTHER classification system. *Nature protocols* **8**:1551-1566.
72. Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**(1):27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
73. Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., et al. (2007). UniProtKB/Swiss-Prot. *Methods Mol Biol* **406**:89-112. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-535-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-535-0_4).
74. Schaefer, R.J., Briskine, R., Springer, N.M., et al. (2016). Discovering functional 1339 modules across diverse maize transcriptomes using COB, the co-expression browser. Börnke F, 1340 editor. *PLoS One* **9**(6):99193. Available from: 1341 <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0099193>.
75. Schaefer, R.J., Michno, J.M., Jeffers, J., et al., (2018). Integrando redes de coexpresión con GWAS para priorizar genes causales en el maíz. *La célula vegetal* **30** (12): 2922–2942. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00299>.
76. Stelpflug, S.C., Sekhon, R.S., Vaillancourt, B., et al. (2016). An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development. *Plant Genome* **9**: 314–362.
77. Hirsch, C.N., Foerster, J.M., Johnson, J.M., et al. (2014). Insights into the maize pan-genome and pan-transcriptome. *Plant Cell* **26**:121–135.

## CAPITULO III. Resultados

### 1. Fenotipificación

Previó a dar inició a la fenotipificación de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria (RH) y la elongación del mesocotilo (EM) de los 72 híbridos DTMA de maíz en estudio, se determinó cuantitativamente las condiciones de estrés hídrico a las que fueron sometidas las plántulas de maíz; a través de la medición de dos indicadores hídricos: el porcentaje de humedad relativa (% HR) dentro del sistema de ensayo diseñado y el potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ ) de los tejidos analizados (raíz primaria y mesocotilo) [1-4].

Es así como, el %HR promedio medido con ayuda del higrómetro (Traceable Memory, Control Company, EE. UU.) en el interior de la cámara control (%HR: 86.5) y la cámara prueba (%HR: 39.7) del sistema de ensayo a una temperatura promedio de 27°C +/-2 permitió corroborar diferencias hídricas entre los dos ambientes (Tabla 1) junto con la formación de un gradiente de humedad en la ultima; como resultado de la actividad de la solución higroscópica (800 mL de solución de  $K_2CO_3$ ) sobre el agua presente en el medio [1,5].

**Tabla 1.** Porcentaje de humedad relativa promedio medido en el interior del sistema de ensayo para la determinación de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo. Se incluyen los datos de la cámara control y prueba del sistema de ensayo, la temperatura promedio junto con el volumen y densidad de las soluciones contenidas en cada cámara de ensayo. Los %HR se mantuvieron relativamente constantes durante el periodo total de prueba (96 h) oscilando entre 38%HR a 45%HR en la cámara de prueba.

Cámara	%HR	Temperatura promedio °C	Solución	Volumen (mL)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
CONTROL	86.5	27°C +/-2	H <sub>2</sub> O	1600	1.000
PRUEBA	39.7		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	800	1.500

El gradiente de humedad generado dentro de la cámara de prueba fue verificado midiendo el %HR de tres zonas (zona A: fondo de la cámara en contacto con la solución

de  $K_2CO_3$ , zona B: de 6 a 8 cm del fondo de la cámara y la zona C: a 19 cm del fondo de la cámara); encontrando, el menor %HR en la zona en contacto directo con el agente higroscópico concentrado e incrementado a medida que se distancia de este (se describe con detalle la metodología y los resultados de medir el %HR por Sáenz-Rodríguez & Cassab (2021) [1]).

Por su parte, el  $\Psi_{\pi}$  de las estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) bajo las condiciones hídricas de ensayo se midieron en términos de osmolalidad usando el osmómetro de presión de vapor (Wescor VAPRO Model 5600, Wescor, Inc., UT, USA) y cuyos resultados calculados en megapascales (MPa) mostraron marcadas diferencias entre los órganos expuestos a las condiciones de la cámara control ( $\Psi_{\pi}$ : entre -1.2 a -1.4 MPa) versus la cámara prueba ( $\Psi_{\pi}$ : entre -4 a -6 MPa) como resultado de la respuesta de las plántulas de maíz a las condiciones hídricas (Tabla 2) [4-8].

**Tabla 2.** Resultados de la determinación del potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ ) de la raíz primaria y el mesocotilo de plántulas de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo. Los datos expresados como potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) se relaciona con órganos con niveles hídricos óptimos en la condición control y en condiciones prueba con órganos sometidos a estrés hídrico extremo.

Condiciones	Órgano	Potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ )
Control	Raíz primaria	$\Psi_{\pi}$ : entre -1.2 a -1.4 MPa
	Mesocotilo	
Prueba	Raíz primaria	$\Psi_{\pi}$ : entre -4 a -6 MPa
	Mesocotilo	

Adicionalmente, considerando la ecuación general para la determinación del potencial hídrico:

$$\Psi_w = \Psi_{\pi} + \Psi_p + \Psi_m + \Psi_g$$

( $\Psi_w$ : Potencial hídrico =  $\Psi_{\pi}$ : Potencial osmótico +  $\Psi_p$ : Potencial de Presión +  $\Psi_m$ : Potencial matricial +  $\Psi_g$ : Potencial gravitacional).

Y relacionando la influencia de los potenciales descritos en ella dentro del sistema de ensayo diseñado para la determinación de los dos rasgos en estudio. Resultan insignificantes los efectos de los potenciales de presión atmosférica (poca altura de la plántula), el potencial matricial (ausencia de matriz) y del potencial gravitacional (poca

influencia de la gravedad); por lo que el  $\Psi_{\pi}$  obtenido en los tejidos de estudio resulta directamente proporcional a su  $\Psi_w$  ( $\Psi_{\pi} \approx \Psi_w$ ) [4-8].

### 1.1. Determinación de la respuesta hidrotrópica en la raíz primaria

**Tabla 3.** Resultados de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (ángulo de curvatura en grados) en los 72 híbridos DTMA analizados bajo las condiciones del sistema de ensayo a las 24h. Se incluye el número del DTMA, la clasificación de la respuesta y en negrita los ángulos con los dos valores más altos de respuesta (RH: Respuesta hidrotrópica). Estos datos fueron utilizados para realizar estudios de asociación genómica (GWAS).

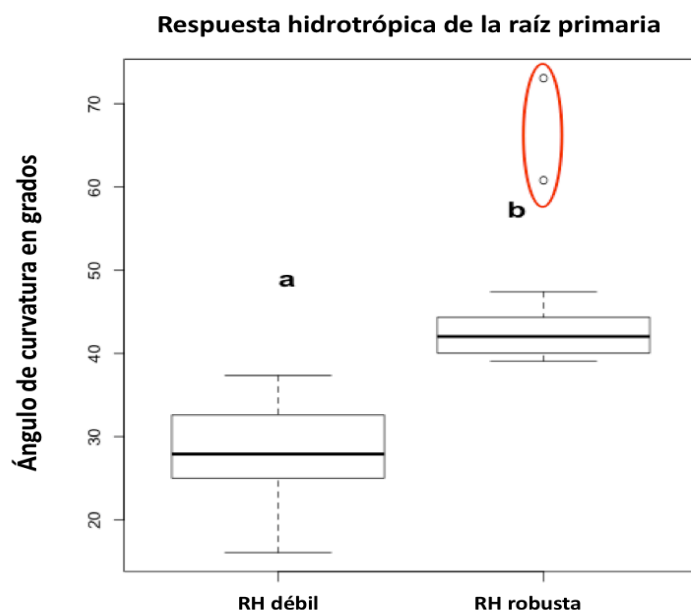
#	DTMA	RH: ROBUSTA	#	DTMA	RH: DEBIL
<b>1</b>	<b>270</b>	<b>73,07</b>	<b>1</b>	121	37,33
<b>2</b>	<b>181</b>	<b>60,80</b>	<b>2</b>	198	37,27
<b>3</b>	184	47,40	<b>3</b>	101	37,00
<b>4</b>	57	47,33	<b>4</b>	44	36,81
<b>5</b>	183	47,20	<b>5</b>	42	36,11
<b>6</b>	58	47,00	<b>6</b>	96	36,07
<b>7</b>	163	45,20	<b>7</b>	75	35,67
<b>8</b>	61	44,88	<b>8</b>	202	33,20
<b>9</b>	195	44,60	<b>9</b>	7	32,87
<b>10</b>	206	44,07	<b>10</b>	228	32,33
<b>11</b>	262	43,87	<b>11</b>	192	31,80
<b>12</b>	160	43,80	<b>12</b>	203	31,53
<b>13</b>	48	43,67	<b>13</b>	238	30,93
<b>14</b>	100	43,20	<b>14</b>	201	30,80
<b>15</b>	249	43,07	<b>15</b>	222	30,60
<b>16</b>	267	42,60	<b>16</b>	154	30,00
<b>17</b>	242	42,53	<b>17</b>	175	28,67
<b>18</b>	1	42,33	<b>18</b>	144	28,07
<b>19</b>	123	41,73	<b>19</b>	210	27,73
<b>20</b>	110	41,60	<b>20</b>	40	27,63
<b>21</b>	276	41,13	<b>21</b>	38	27,51
<b>22</b>	197	41,07	<b>22</b>	106	27,05
<b>23</b>	283	41,02	<b>23</b>	189	27,00
<b>24</b>	255	40,93	<b>24</b>	187	26,60
<b>25</b>	62	40,31	<b>25</b>	99	26,47
<b>26</b>	70	40,27	<b>26</b>	64	26,00
<b>27</b>	285	40,13	<b>27</b>	35	25,47
<b>28</b>	127	39,93	<b>28</b>	225	24,53
<b>29</b>	157	39,73	<b>29</b>	259	24,07
<b>30</b>	240	39,73	<b>30</b>	177	22,87
<b>31</b>	179	39,67	<b>31</b>	91	21,20
<b>32</b>	245	39,47	<b>32</b>	268	20,87
<b>33</b>	204	39,40	<b>33</b>	209	20,33
<b>34</b>	162	39,33	<b>34</b>	257	20,20
<b>35</b>	235	39,20	<b>35</b>	193	19,87
<b>36</b>	250	39,07	<b>36</b>	207	16,07

Dada la severidad de las condiciones hídricas del ensayo, los ángulos de curvatura obtenidos como medida de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria en los 72 híbridos DTMA de maíz en estudio (Tabla 3) resultaron menores a los reportados por Martínez (2019) en su estudio bajo condiciones de estrés hídrico en el sistema descrito por Eapen et al., (2015) y que sirvió de criterio de selección de la población para este estudio [5,9]; razón por la cual, se disminuyó en un grado (40° grados a 39°grados) el ángulo de curvatura de las raíces que permitió clasificar la respuesta hidrotrópica robusta y así conseguir la inclusión del grupo completo (Tabla 4) [1].

**Tabla 4.** Clasificación de la respuesta hidrotrópica de la raíz de acuerdo al ángulo de curvatura.

<b>Respuesta hidrotrópica (ángulo de curvatura en grados)</b>	
<b>RH Robusta</b>	> 39°
<b>RH Débil</b>	10-38°

La distribución de los datos fenotípicos de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de los 72 híbridos DTMA de maíz mostró un comportamiento normal; a pesar de la influencia de dos puntos atípicos, resultado de la RH robusta de los híbridos **DTMA 270 (73.07°)** y **181 (60.80°)**; cuya respuesta fue superior al promedio general de la población (43.62°). A la par, se verificó el comportamiento diferencial de datos entre el grupo con RH robusta (valor mínimo: 39.07; valor máximo: 73.07; mediana: **42.03** y media: 43.62) versus el grupo con RH débil (valor mínimo: 16.07; valor máximo: 37.33; mediana: **27.90** y media: 28.57); a través de la aplicación de un análisis de varianzas que corroboró diferencias estadísticamente significativas entre ellos en la RH con un  $p\text{-valor} \leq 0,001$  (Figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de la respuesta hidrotropica de la raíz primaria de 72 de los híbridos de DTMA de maíz. a. RH débil (valor mínimo: 16.07; valor máximo: 37.33; mediana: **27.90** y media: 28.57); b : RH robusta (valor mínimo: 39,07; valor máximo: 73.07; mediana: **42.03** y media: 43.62). Los dos grupos tras aplicar un análisis de varianza (ANOVA) resultaron diferentes estadísticamente con un *p*-valor  $\leq 0,001$ . (Valores atípicos: DTMA 270: 73.07° y DTMA181: 60.80°).

Continuando con el análisis de datos fenotipicos, se encontró un 100% de concordancia entre las respuesta hidrotropica de la raíz primaria de los 72 híbridos DTMA de maíz reportada por Martínez (2019) con las obtenidas en este estudio; usando dos sistemas de ensayo diferentes, con medias calculadas de:  $\mu$ :**36.095** y  $\mu$ :**33.024**, respectivamente; sin que se presentarán diferencias estadísticamente significativas entre ellas con un *p* valor de 0.2397 (ver Anexo 4) [1,9-10].

Asi mismo, los resultados fenotipicos de la RH del material vegetal usado como control mantuvo la clasificación descrita por Eapen et al., (2017) y Martínez (2019); donde se observó una RH débil (menor a  $<39^\circ$ ) por parte de la línea endogámica B73 de maíz (33.87°), la línea forrajera comercial ASH de maíz (28.87°), los híbridos DTMA 12 (18.47°) y 194 (10.47) junto a una RH: Robusta (mayor a  $>39^\circ$ ) por parte de la línea de maíz Chihuahua-338 (57.53°) y del maíz criollo M51(39.40°) [9-10].

## 1.2. Determinación de la elongación del mesocotilo.

**Tabla 5.** Resultados fenotípicos de la elongación del mesocotilo (longitud en milímetros) en los 72 híbridos DTMA analizados bajo las condiciones del sistema de ensayo a las 96 h. Se incluye el número de DTMA, promedio de la longitud del mesocotilo (EM baja:15, EM media:36 y EM alta:19) Los ángulos en negrita corresponden a los dos valores más altos de respuesta. Estos datos fueron utilizados para realizar estudios de asociación genómica (GWAS),

#	DTMA	EM: BAJA	#	DTMA	EM: MEDIA	#	DTMA	EM: ALTA
1	203	13,47	1	7	26,13	1	267	42,07
2	40	15,00	2	44	26,33	2	270	42,07
3	38	16,73	3	238	26,73	3	144	42,53
4	91	19,67	4	257	26,87	4	57	43,07
5	96	20,87	5	187	27,33	5	100	43,07
6	207	22,00	6	210	27,67	6	181	43,47
7	106	22,47	7	35	27,87	7	235	43,80
8	259	22,93	8	64	28,27	8	163	44,13
9	154	23,40	9	228	28,33	9	195	44,73
10	42	24,00	10	189	28,93	10	276	45,73
11	222	24,00	11	225	29,33	11	110	45,80
12	268	24,67	12	250	30,80	12	61	46,87
13	157	25,33	13	209	31,33	13	162	47,40
14	202	25,67	14	48	31,40	14	285	47,67
15	193	25,93	15	262	31,53	15	249	49,33
			16	75	31,93	16	240	51,60
			17	198	32,33	17	160	52,93
			18	183	32,40	18	<b>206</b>	<b>66,40</b>
			19	179	33,20	19	<b>70</b>	<b>68,40</b>
			20	201	33,20			
			21	62	33,73			
			22	123	34,07			
			23	197	34,53			
			24	245	35,47			
			25	121	35,73			
			26	192	35,80			
			27	127	37,07			
			28	101	37,47			
			29	204	38,20			
			30	1	38,60			
			31	242	38,67			
			32	283	39,07			
			33	58	39,47			
			34	99	39,67			
			35	184	40,00			
			36	255	40,07			



Los datos fenotípicos obtenidos de la determinación de la elongación del mesocotilo (EM), de los 72 híbridos DTMA de maíz en estudio después de 96 h de tratamiento en el sistema de ensayo (Tabla 5) se clasificaron en tres grupos de respuesta de acuerdo con el comportamiento observado en los datos y definiendo rangos con el propósito de facilitar su análisis (Tabla 6).

**Tabla 6.** Clasificación de la elongación del mesocotilo de acuerdo su longitud

<b>Elongación del mesocotilo (longitud en milímetros)</b>	
<b>EM alta</b>	53-41 mm
<b>EM media</b>	40-27 mm
<b>EM baja</b>	26-13 mm

Los resultados fueron los siguientes:

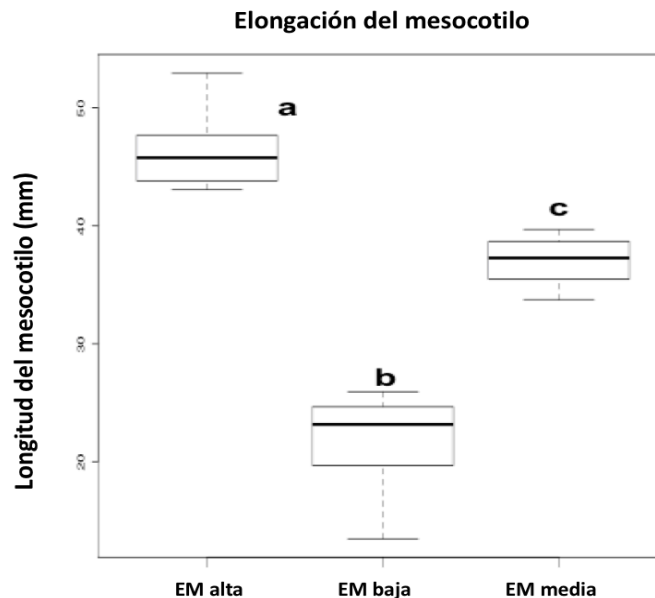
- a) 19 híbridos DTMA de maíz dentro del grupo con EM alta (53 a 41 mm)
- b) 36 híbridos DTMA de maíz dentro del grupo con EM media (40 a 27 mm)
- c) 15 híbridos DTMA de maíz dentro del grupo con EM baja (26 a 13 mm)

Se excluyeron del análisis de datos fenotípicos, dos puntos atípicos (valores extremos) que superaban la media poblacional ( $\mu$ : 34.54 mm) en más del doble de su valor, afectando la distribución normal de los mismos y que correspondieron a los híbridos **DTMA 70 y 206** (EM: **68.40** mm y **66.40** mm, respectivamente).

Los valores de elongación de mesocotilo determinados en los 72 híbridos DTMA de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo mostró un intervalo de respuesta entre: 13.47 mm a 68.40 mm; el cual resulta mucho menor al intervalo de elongación del mesocotilo reportado en algunos híbridos de esta población por Nieto–Sotelo et al., (2012) en condiciones de siembra profunda y riego óptimo (de: 38.3 mm a 113.6 mm) probablemente debido a las condiciones de baja humedad [1,11]. Por su parte, el material vegetal control se clasificó de acuerdo con la elongación del mesocotilo (EM) de la siguiente manera:

- a) EM alta por parte del maíz criollo M33 (63.87 mm) y M51 (49.93 mm), la línea endogámica B73 de maíz (41.47), los híbridos DTMA 266 (42.13 mm) y la línea de maíz palomero toluqueño Mex5 (45.67 mm).
- b) EM media por parte de los híbridos DTMA 12 (40.07 mm), DTMA 105 (36.40 mm), DTMA 208 (29.87 mm), DTMA 269 (30.33 mm), DTMA 194 (27.47 mm), junto con la línea forrajera comercial ASH de maíz (30.20 mm) y la línea de maíz Chihuahua-338 (33.20 mm).
- c) EM baja por parte del maíz criollo M70 (15.27 mm).

Los tres grupos de respuesta de elongación del mesocotilo de los híbridos DTMA de maíz mostraron diferencias estadísticamente significativas con un  $p$  valor  $\leq 0,001$  tras aplicar un análisis de varianza (ANOVA) a sus datos fenotípicos (Figura 2).



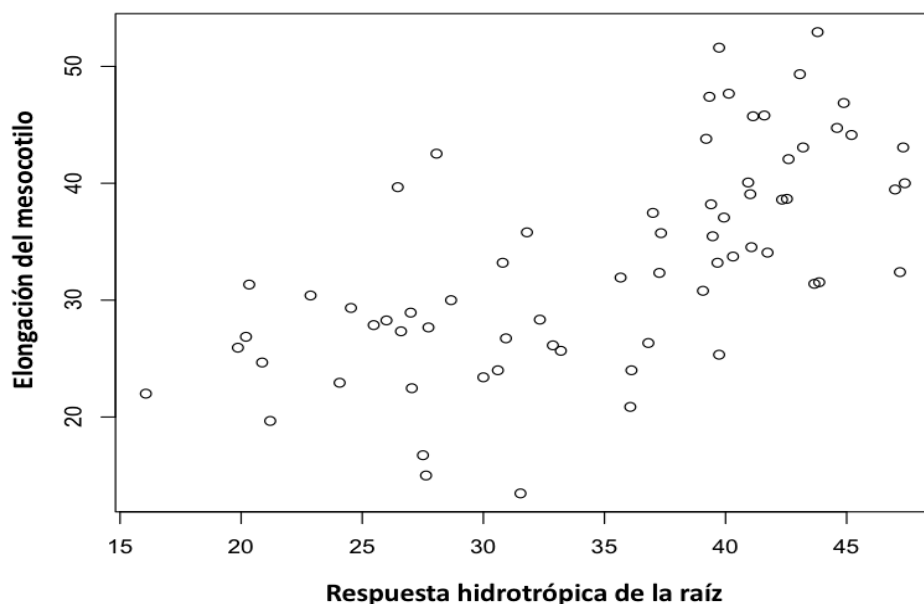
**Figura 2.** Clasificación fenotípica de la elongación del mesocotilo de los 72 híbridos de DTMA de maíz. a. EM alta (valor mínimo: 40.00; valor máximo: 52.93; mediana: **44.13** y media: 45.07); b : EM baja (valor mínimo: 39.07; valor máximo: 25.93; mediana: **22.93** y media: 21.74) y EM media(valor mínimo: 26.13; valor máximo: 39.67; mediana: **32.13** y media: 32.50). Los tres grupos categorizados tras aplicar un análisis de varianza (ANOVA) mostraron diferencias estadísticamente significativas con un  $p$ -valor  $\leq 0.001$ . (Valores atípicos: DTMA 70: 68.40 mm y DTMA 206: 66.40 mm).

### 1.3. Análisis de la respuesta hidrotrópica vs elongación del mesocotilo.

Los datos fenotípicos obtenidos a partir de la determinación de los dos rasgos en estudio (respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo), se agruparon entre sí para verificar posibles asociaciones entre sus respuestas; encontrando en los 19 híbridos DTMA de maíz con EM alta, una relación 18:1 con la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (RH robusta y RH débil, respectivamente), en los 15 híbridos DTMA de maíz con EM baja una relación 2:13 (RH robusta y RH débil, respectivamente) y en el tercer grupo constituido por 36 híbridos DTMA de maíz con EM media, una relación mixta con 15:22 (RH robusta y RH débil, respectivamente). De igual forma, se verificaron las respuestas fenotípicas presentadas por los híbridos DTMA de maíz considerados como puntos atípicos (valores extremos) en las dos respuestas fenotípicas; encontrando en los cuatro casos la misma combinación de respuestas: EM alta y RH robusta (híbrido DTMA de maíz 70 con EM: 68.40 y RH: 40.27; híbrido DTMA de maíz 206 con EM: 66.40 y RH: 44.07; híbrido DTMA de maíz 181 con EM: 43.47 y RH: 60.80; y el híbrido DTMA de maíz 270 con EM: 42.07 y RH: 73.07).

En respuesta a los anteriores resultados y bajo el precepto de normalidad en el comportamiento de los datos (confirmado tras aplicar la prueba estadística de *Kolmogorov-Smirnov*), se aplicó el estadístico de correlación de Pearson entre las dos respuestas (respuesta hidrotrópica de la raíz primaria vs la elongación del mesocotilo de los 72 híbridos DTMA de maíz). En esta prueba se estableció una correlación positiva alta entre las respuestas en estudio con un índice de correlación de: **0.63**; después de filtrar dos de los puntos atípicos (omitiendo el dato del híbrido DTMA 70 y 270 de maíz). Este ajuste mejoró la distribución normal de los datos y determinó un tamaño muestral de 70 híbridos DTMA en el análisis (Figura 3). No obstante, se continuó observando un índice de correlación alto: **0.58** con los datos sin procesar.

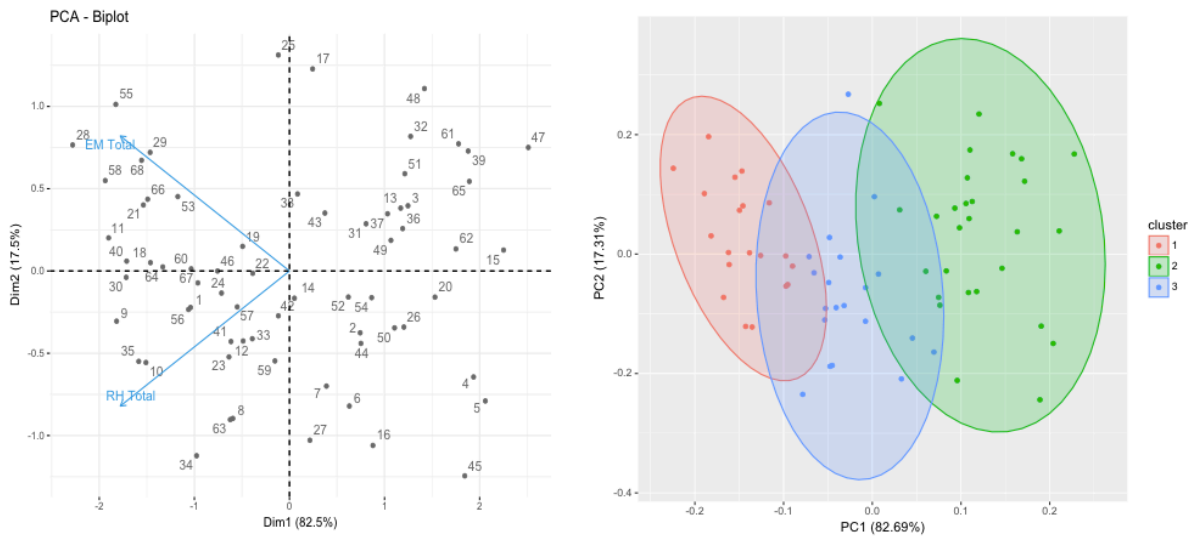
### Análisis de correlación de la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en 70 híbridos DTMA



**Figura 3.** Análisis de correlación de la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en 70 híbridos DTMA. Índice de correlación: sin correlación:  $r < |0.1|$ ; baja correlación:  $|0.1| < r \leq |0.3|$ ; correlación media:  $|0.3| < r \leq |0.5|$ ; alta correlación:  $r > |0.5|$ ). El índice de correlación de Pearson obtenido del análisis de datos filtrados fue de cor: 0.63816. ( Valores atípicos filtrados: DTMA 70 EM alta: 68.40 mm y DTMA 270 RH alta: 73.07°)

Adicionalmente, con la información de las varianzas de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo de los 72 híbridos DTMA de maíz se realizó un análisis de componentes principales (ACP), el cual permitió revalidar la correlación ya establecida entre los rasgos y el comportamiento diferencial de tres grupos de respuesta dentro de la población que asocia los dos rasgos en estudio. En este análisis, resultó de enorme interés el grupo de híbridos DTMA que combina una RH robusta con una EM alta en condiciones de estrés hídrico y que se ubica dentro de la elipse roja en la Figura 4 en relación a los resultados descritos en campo por Eapen et al (2017) [10].

## Análisis de componentes principales (ACP) de la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en los 72 híbridos DTMA

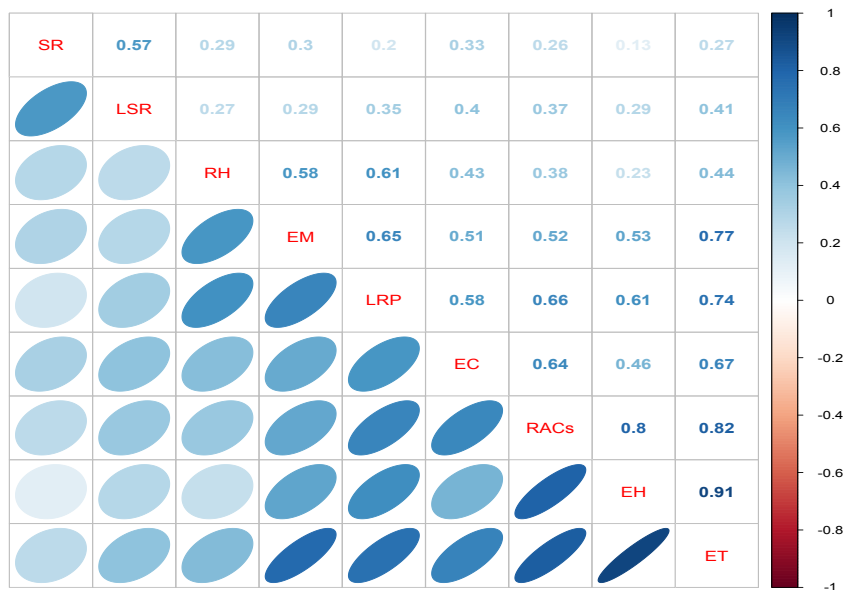


**Figura 4.** Análisis de componentes principales de los rasgos en estudio combinados. (PCA; RH: Respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y EM: Elongación del mesocotilo). (En rojo: híbridos DTMA de maíz con RH robusta y EM alta ; verde: híbridos DTMA de maíz con RH débil y EM baja y azul: Híbridos DTMA de maíz con RH y EM variable).

Sumado a los rasgos en estudio, el sistema de ensayo implementado permitió medir rasgos adicionales de las plántulas de maíz en condiciones de estrés hídrico durante la fase previa a la emergencia, los cuales correspondieron a: la longitud de la raíz primaria (LRP), de las raíces seminales (LSR), del coleóptilo (EC), la hoja (EH) y el tallo (ET), junto con el número de raíces seminales (SR) y el número de raíces asociadas al nodo coleoptilar (RACs) si estaban presentes. En el análisis fenotípico de los rasgos adicionales se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de ensayo: control (riego óptimo) y prueba (estrés hídrico); por comparación de medias en 8 de los 10 rasgos fenotípicos con un  $p\text{-valor} \leq 0.001$  y en los dos rasgos restantes (SR y RACs) con un  $p\text{-valor} \leq 0.005$  (véase Anexo 5). Adicionalmente, se encontró correlaciones positivas entre todos los rasgos medidos en las dos condiciones experimentales con alta significancia estadística ya que bajo condiciones de estrés hídrico y en orden descendente encontramos correlaciones superiores a 0.5 entre: la

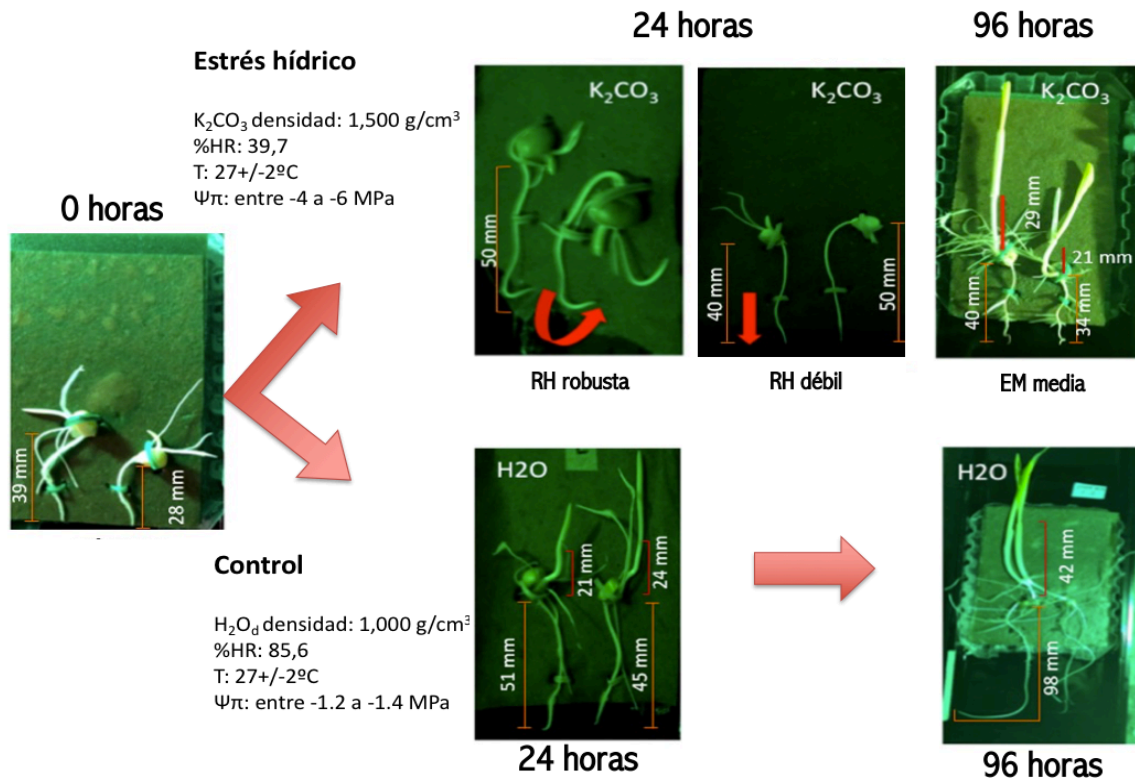
elongación de la hoja con la elongación del tallo (EH vs ET= 0.91), la elongación del mesocotilo con la elongación del tallo (ET vs EM= 0.77), la longitud de la raíz primaria con la elongación del tallo (LRP vs ET= 0.74), la longitud de la raíz primaria con la elongación del coleóptilo (LRP vs EC= 0.58) y la elongación del mesocotilo con la elongación del coleóptilo (EM vs EC= 0.51) ver Figura 5. En contraste, bajo condiciones control se encontró mayor correlación entre la elongación de la hoja con la elongación del tallo (EH vs ET= 0.96) y menor correlación entre la longitud de la raíz primaria con la elongación del tallo (LRP vs ET= 0.56), la longitud de la raíz primaria con la elongación del coleóptilo (LRP vs EC= 0.47) y la elongación del mesocotilo con la elongación del coleóptilo (EM vs EC= 0.47); no obstante, continúan manteniendo correlaciones positivas con índices de significancia media (ver Anexo 6).

### Correlación entre las respuestas de los rasgos fenotípicos medidos bajo las condiciones del sistema de ensayo



**Figura 5.** Análisis de correlación de nueve rasgos medidos en los 72 híbridos DTMA de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo. (SR: Numero de raíces seminales; LSR: Longitud máxima raíz seminal; RH: Respuesta hidrotópica de raíz primaria; EM: Elongación del mesocotilo; LRP: Longitud de la raíz primaria; EC: elongación del coleóptilo; RACs: número de raíces del nodo coleoptilar; EH: elongación de hoja; ET: Elongación del tallo). (Sin correlación:  $r < |0.1|$ ; baja correlación:  $|0.1| < r \leq |0.3|$ ; correlación media:  $|0.3| < r \leq |0.5|$ ; alta correlación:  $r > |0.5|$ )

A continuación, en la figura 6 se muestra un ejemplo del registro gráfico realizado a cada plantula de maíz de los 72 híbridos DTMA, bajo las condiciones de ensayo para la determinación de la RH y la EM hasta e termino del mismo a las 96 h de prueba [1].



**Figura 6.** Esquema de ejemplo del registro fotográfico de las respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de los 72 híbridos de DTMA de maíz bajo las condiciones de ensayo. Se fotografió la respuesta hidrotrópica de la raíz a las 24h y la elongación del mesocotilo a las 96h con exposición a luz verde protectora con longitud de onda: 495-570 nm. (RH: respuesta hidrotrópica de la raíz y EM: elongación del mesocotilo).

#### 1.4. Determinación del potencial osmótico de la raíz primaria y el mesocotilo

Las plantas, con el propósito de tolerar el estrés osmótico resultante del estrés hídrico, realizan ajustes osmóticos acumulando solutos que intervienen en la retención de agua en el citoplasma, el mantenimiento del volumen de protoplastos, la presión de turgencia y por ende la estabilidad de membranas; permitiéndoles continuar con su desarrollo habitual [4-8,12]. Por lo tanto, se determinó el potencial osmótico en términos de osmolalidad (mmol/Kg) de la raíz primaria y el mesocotilo en los híbridos DTMA seleccionados con respuestas fenotípicas contrastantes (DTMA 12 con RH débil y EM media, DTMA 179 con RH robusta y EM alta) a las 96 horas de ensayo; encontrando diferencias estadísticamente significativas entre la osmolalidad obtenida y las condiciones de ensayo para los dos órganos de estudio con un  $p\text{-valor} \leq 0.001$ . Donde, en la raíz primaria de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz se encontraron valores medios de osmolalidad de:  $\mu = 404$  mmol/Kg y  $\mu = 438$  mmol/Kg en condiciones óptimas que contrastaron con los valores medios obtenidos en condiciones de estrés hídrico que correspondieron a:  $\mu = 1855$  mmol/Kg y  $\mu = 2712$  mmol/Kg, respectivamente (Anexo 7). Paralelamente, se evidenció el mismo contraste entre los valores medios de las osmolalidades obtenidas de mesocotilos de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz con:  $\mu = 356$  mmol/Kg y  $\mu = 354$  mmol/Kg en condiciones óptimas y  $\mu = 491$  mmol/Kg y  $\mu = 594$  mmol/Kg en condiciones de estrés hídrico, respectivamente (Anexo 8). Estos resultados mostraron, a la raíz primaria como el órgano más impactado por el déficit hídrico, la cual dentro de su rol por restablecer el balance hídrico inhibió su crecimiento, probablemente debido al costo energético que implica la síntesis y acumulación de osmolitos orgánicos. De ahí que, la raíz primaria reportó osmolalidades por encima del triple de las obtenidas en condiciones hídricas óptimas [4-7,15].

Por su parte, las osmolalidades determinadas en las estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) mostraron ser estadísticamente diferentes ( $p\text{-valor} \leq 0.005$ ) en relación con la respuesta fenotípica descritas en los híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico; donde, los valores medios de las osmolalidades del híbrido DTMA 179 de maíz con RH robusta y EM alta (raíz primaria  $\mu = 2712$  mmol/Kg y mesocotilo  $\mu = 593$  mmol/Kg) son superiores a las reportadas en el híbrido DTMA 12 de maíz con RH débil



y EM media (raíz primaria  $\mu = 1855$  mmol/Kg y mesocotilo  $\mu = 491$  mmol/Kg)(ver Anexo 9). Estos resultados apoyarían los obtenidos por Eapen et al., (2017) en su estudio en campo; donde una respuesta hidrotrópica robusta tiene potencial uso como indicador de tolerancia al estrés hídrico en maíz [10]. Las osmolalidades (mmol/Kg) obtenidas se transformaron a unidades de potencial osmótico con el propósito de facilitar la comprensión del estado hídrico de la raíz primaria y el mesocotilo de las plántulas analizadas de los híbridos DTMA de maíz (Tabla 7) usando:

$$\text{Ecuación de van't Hoff: } \pi = -RTc$$

(Donde  $c =$  osmolalidad en moles  $\cdot$  Kg<sup>-1</sup> y  $RT = 2.446$  Kg\*MPa\*mol<sup>-1</sup> a 21°C)

**Tabla 7.** Potencial osmótico calculado de los órganos en estudio (raíz primaria y mesocotilo) de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz (RH débil y EM media; RH robusta y EM alta, respectivamente) bajo condiciones de estrés hídrico a las 96 h de ensayo. (1 MPa = 10 bares; 1OsM/Kg = - 25 bares.)

Estructuras	DTMA	Cálculos	Potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ )
Raíz Primaria	DTMA 12	<b>1854 mmol/Kg = 0.1854 OsM/Kg.</b> $\pi = -2.446 \text{ Kg*MPa*mol}^{-1} \times 0.1854$ OsM/Kg = -0.4534 MPa x 10 bares*MPa-1 = -4.53bares	<b><math>\Psi_{\pi} = -0.45 \text{ J m}^{-3}</math></b>
	DTMA 179	<b>2712 mmol/Kg=0.2712 OsM/Kg</b> $\pi = -2.446 \text{ Kg*MPa*mol}^{-1} \times 0.2712$ OsM/Kg = -0.6633 MPa x 10 bares*MPa-1 = -6.633bares	<b><math>\Psi_{\pi} = -0.66 \text{ J m}^{-3}</math></b>
Mesocotilo	DTMA 12	<b>490 mmol/Kg=0.490 OsM/Kg.</b> $\pi = -2.446 \text{ Kg*MPa*mol}^{-1} \times 0.490$ OsM/Kg = -1.19 MPa x 10 bares*MPa-1 = -11.9 bares	<b><math>\Psi_{\pi} = -1.19 \text{ J m}^{-3}</math></b>
	DTMA 179	<b>593 mmol/Kg=0.593 OsM/Kg.</b> $\pi = -2.446 \text{ Kg*MPa*mol}^{-1} \times 0.593$ OsM/Kg = -1.45 MPa x 10 bares*MPa-1 = -14.5bares	<b><math>\Psi_{\pi} = -1.45 \text{ J m}^{-3}</math></b>

Como se mencionó al iniciar este capítulo, el  $\Psi_{\pi}$  resultó directamente proporcional al  $\Psi_w$  bajo las condiciones de ensayo ( $\Psi_{\pi} \approx \Psi_w$ ); por lo tanto, el potencial híbrido en las estructuras de los dos híbridos analizados correspondió a:

1. Híbrido DTMA 12 de maíz:  $\Psi_w$ : -0.45 MPa (raíz primaria) y  $\Psi_w$ : -1.19 MPa (mesocotilo) con una diferencia de  $\Psi_w$ : -0.74 MPa entre las dos estructuras.
2. Híbrido DTMA 179 de maíz:  $\Psi_w$ : -0.66 MPa (raíz primaria) y  $\Psi_w$ : -1.45 MPa (mesocotilo) con una diferencia de:  $\Psi_w$ : -0.79 MPa.

Los niveles de  $\Psi_w$  obtenidos en los órganos de estudio (raíz primaria y mesocotilo) de los dos híbridos DTMA de maíz, favorece el flujo de agua a favor del gradiente de  $\Psi_w$  desde la raíz hacia el mesocotilo (desde  $\Psi_w$  menos negativos a  $\Psi_w$  más negativos, a través del xilema) siendo los órganos del DTMA 179 (RH robusta y EM alta) quienes reportan el potencial hídrico más negativos con respecto al híbrido DTMA 12 de maíz (RH débil y EM media) [4-8,13].

### **1.5. Determinación de iones solubles sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) de la raíz primaria y el mesocotilo por fotometría de llama**

Inicialmente, con el propósito de determinar la concentración de los iones solubles ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) de las estructuras en estudio (la raíz primaria y el mesocotilo) se evaluó el peso fresco requerido para obtener un peso seco equivalente a 200 mg para tal análisis; encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las medias de peso fresco en relación con las condiciones de ensayo (riego óptimo:  $\mu = 3000$  mg y estrés hídrico:  $\mu = 1557$  mg) para la raíz primaria con un *p-valor*  $\leq 0.01$  (Anexo 10). En el caso del mesocotilo y a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas, se mantuvo la tendencia observada en la raíz primaria; donde, se requirió un peso fresco menor del tejido proveniente de condiciones de estrés hídrico ( $\mu = 2080$  mg) versus condiciones de riego óptimo ( $\mu = 2400$  mg) para alcanzar el peso definido para la determinación de los iones solubles sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) en las estructuras en estudio (Anexo 11) [14-15].

Como ya ha sido mencionado, la disminución del  $\Psi_w$  induce a las plántulas a sintetizar compuestos osmoprotectores<sup>3</sup>; como parte del proceso de ajuste osmótico [7,12,16]. Proceso al que se puede sumar estrés iónico, el cual, juega un rol crítico la homeostasis de la concentración intracelular y extracelular de los iones solubles sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) [17]. Los iones solubles sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) resultan fundamentales para la fisiología de las células vivas (actividades enzimáticas, mantenimiento del potencial de membrana, el transporte de iones, etc.) [18-20]. Por lo tanto, se determinó su concentración en las estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) por fotometría de llama [21-22].

### **1.5.1 Determinación de iones solubles sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) de la raíz primaria.**

La concentración de iones solubles ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) se determinó a las 24 h (determinación de la RH) y 96 h (determinación de EM) de ensayo (Tabla 8); donde se encontraron concentraciones superiores del ion  $\text{K}^+$  comparado con las reportadas del ion  $\text{Na}^+$  en la raíz primaria de los híbridos DTMA 38 (RH débil y EM baja), DTMA 184 (RH robusta y EM alta) de maíz y de la línea endogámica B73 (RH débil y EM alta) en ambos periodos de tiempo e independiente de las condiciones hídricas del ensayo. La determinación de la concentración de ion  $\text{K}^+$  de la raíz primaria, mostro al DTMA 184 de maíz con niveles superiores en comparación con el DTMA 38 de maíz (180 mmol/mL\*mg > 100 mmol/mL\*mg, respectivamente) a las 24 h de ensayo en condiciones de estrés hídrico la cual se vio incrementada a las 96 h de determinación en ambos híbridos sin mostrar diferencias entre concentraciones (196 mmol/mL\*mg). Simultáneamente, la concentración del ion  $\text{Na}^+$  de la raíz primaria del DTMA 184 de maíz (120 mmol/mL\*mg a las 24 h >50 mmol/mL\*mg a las 96 h) resultó superior con respecto al híbrido DTMA 38 (60 mmol/mL\*mg a las 24 h > 26 mmol/mL\*mg a las 96 h) en los dos periodos medidos y disminuyendo al término del ensayo en ambos casos. El índice de relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  calculado a las 24 h de ensayo no mostró diferencias entre los híbridos DTMA 184 (1.7) y DTMA 38 (1.5) de maíz; lo cual contrastó con los índices superiores y diferenciales,

---

<sup>3</sup>Los solutos compatibles (osmolitos, citosolutos) son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol, iones ( $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y otros metabolitos de bajo peso molecular .Chen & Murata (2002) [16].

obtenidos a las 96 horas de ensayo ( $3.9 < 7.5$ , respectivamente) en raíz primaria bajo la influencia de la concentración del ion  $\text{Na}^+$  (Tabla 9). Por lo tanto, el adecuado suministro del ion  $\text{K}^+$  encontrado en las raíces primarias de los dos híbridos DTMA muestra su capacidad de adaptación a condiciones de estrés hídrico por lo que el DTMA con RH robusta y EM alta en relación con la influencia del ion  $\text{K}^+$  probablemente está mejor adaptado para desarrollar un movimiento trópico al mantener la presión de turgor, expansión celular y la capacidad de amortiguar altas concentraciones de ion  $\text{Na}^+$  [23-27]. Las condiciones hídricas de ensayo no influenciaron significativamente las concentraciones de los iones solubles ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), con un  $\alpha = 0.05$ ; mientras, que las concentraciones analizadas en términos de tiempo mostraron diferencias significativas y opuestas entre los iones solubles con  $p\text{-valor} \leq 0.05$  (ion  $\text{K}^+$  a las 24 horas  $<$  96 horas y la concentración de ion  $\text{Na}^+$  a las 24 horas  $>$  96 horas) (Tabla 8). Por otro lado, bajo condiciones hídricas óptimas las concentraciones de los iones solubles ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) resultaron muy variables, lo cual puede explicarse como resultado del papel biofísico y bioquímico de estos iones solubles sobre el crecimiento y desarrollo vegetal en las jóvenes plántulas de maíz [27-29].

**1.5.2 Determinación de iones solubles sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) de mesocotilo.** Las concentraciones del ion  $\text{K}^+$  en los mesocotilos de los híbridos DTMA analizados resultaron similares a las descritas en raíz primaria; donde, prevalece la superioridad en los niveles del ion  $\text{K}^+$  sobre el ion  $\text{Na}^+$  en la estructura (Tabla 9). Las concentraciones del ion  $\text{K}^+$  en mesocotilo del DTMA de 184 de maíz (232 mmol/mL\*mg a las 24 h  $>$  180 mmol/mL\*mg a las 96 h) registro valores superiores a los descritos por el DTMA 38 de maíz (160 mmol/mL\*mg a las 24 h  $>$  84 mmol/mL\*mg a las 96 h) bajo condiciones de estrés hídrico y en ambos periodos analizados, aunque a diferencia de lo descrito en raíz primaria, sus concentraciones se vieron disminuidas a las 96 h de determinación en ambos híbridos. Paralelamente, las concentraciones del ion  $\text{Na}^+$  obtenidas en mesocotilo resultaron menores a las descritas en raíz primaria; donde, DTMA 184 de maíz (con niveles de: 20 mmol/mL\*mg a las 24 h  $>$  8 mmol/mL\*mg a las 96 h) describe valores inferiores con respecto a los obtenidos del DTMA 38 de maíz (con niveles de: 24 mmol/mL\*mg a las 24 horas  $>$  26 mmol/mL\*mg a las 96 horas; siendo, las

concentraciones obtenidas a las 96 h de ensayo significativamente diferentes con  $p$ -valores  $\leq 0.05$ . El índice de relación  $K^+/Na^+$  calculado en mesocotilo a las 24 h de ensayo no mostró diferencias entre los híbridos DTMA 184 (8.0) y DTMA 38 (9.7) de maíz; contrastando con índices de relación  $K^+/Na^+$  superiores y diferenciales en la raíz primaria a las 96 horas de ensayo ( $10.5 < 6.9$ , respectivamente), bajo la influencia de la concentración del ion  $Na^+$  (Tabla 9). A pesar de encontrarse en mesocotilo índices  $K^+/Na^+$  superiores a los descritos en raíz primaria, este órgano no mostró el impacto que la raíz a las condiciones de estrés hídrico, la cual inhibió su crecimiento y desarrollo [13].

La relación  $K^+/Na^+$  *per se* es en sí más importante que la concentración de los elementos a nivel celular pues está determina la capacidad metabólica y la capacidad de tolerar ambientes con baja humedad y altos contenidos salinos, lo que indica que los dos fenotipos en estudio y en especial en el híbrido con RH: Robusta y EM: Alta son candidatos de analizar con más detalle [26-28].

**Tabla 8.** Resultados del análisis de iones solubles sodio y potasio en la raíz primaria de híbridos DTMA de maíz con respuestas fenotípicas contrastantes a las 24 y 96 hrs de ensayo. Se analizaron raíces del DTMA 38 con RH débil y EM baja (DB), del DTMA 184 con RH robusta y EM alta (RA) y de la línea endogámica B73 de maíz con RH débil y EM alta (DA). Los datos se reportaron en unidades de concentración: mmol/ml\*mg de peso seco, se incluyó la condición de procedencia del tejido (control :H<sub>2</sub>O y prueba: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y el índice de relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> calculada en cada caso.

Tejido	Condición	Maíz	Respuestas	24 horas		96 horas		Relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>
				Concentración K <sup>+</sup> (potasio)	Concentración Na <sup>+</sup> (sodio)	Concentración K <sup>+</sup> (potasio)	Concentración Na <sup>+</sup> (sodio)	
				mmol/ml*mg de peso seco	mmol/ml*mg de peso seco	mmol/ml*mg de peso seco	mmol/ml*mg de peso seco	
H <sub>2</sub> O		B73	DA	180	112	198	46	4,3
		DTMA 38	DB	154	124	180	63	2,9
		DTMA 184	RA	132	96	180	24	7,5
<b>Raíces</b>								
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		B73	DA	190	60	198	48	4,1
		DTMA 38	DB	100	60	196	26	7,5
		DTMA 184	RA	180	120	196	50	3,9

**Tabla 9.** Resultados del análisis de iones solubles sodio y potasio en mesocotilo a las 24 y 96 hrs de ensayo. Se analizaron mesocotilos del DTMA 38 con RH débil y EM baja (DB), del DTMA 184 con RH robusta y EM alta (RA) y de la línea endogámica B73 de maíz con RH débil y EM alta (DA). Los datos se reportaron en unidades de concentración: mmol/ml\*mg de peso seco, se incluyó la condición de procedencia del tejido (control :H<sub>2</sub>O y prueba: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y el índice de relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> calculada en cada caso.

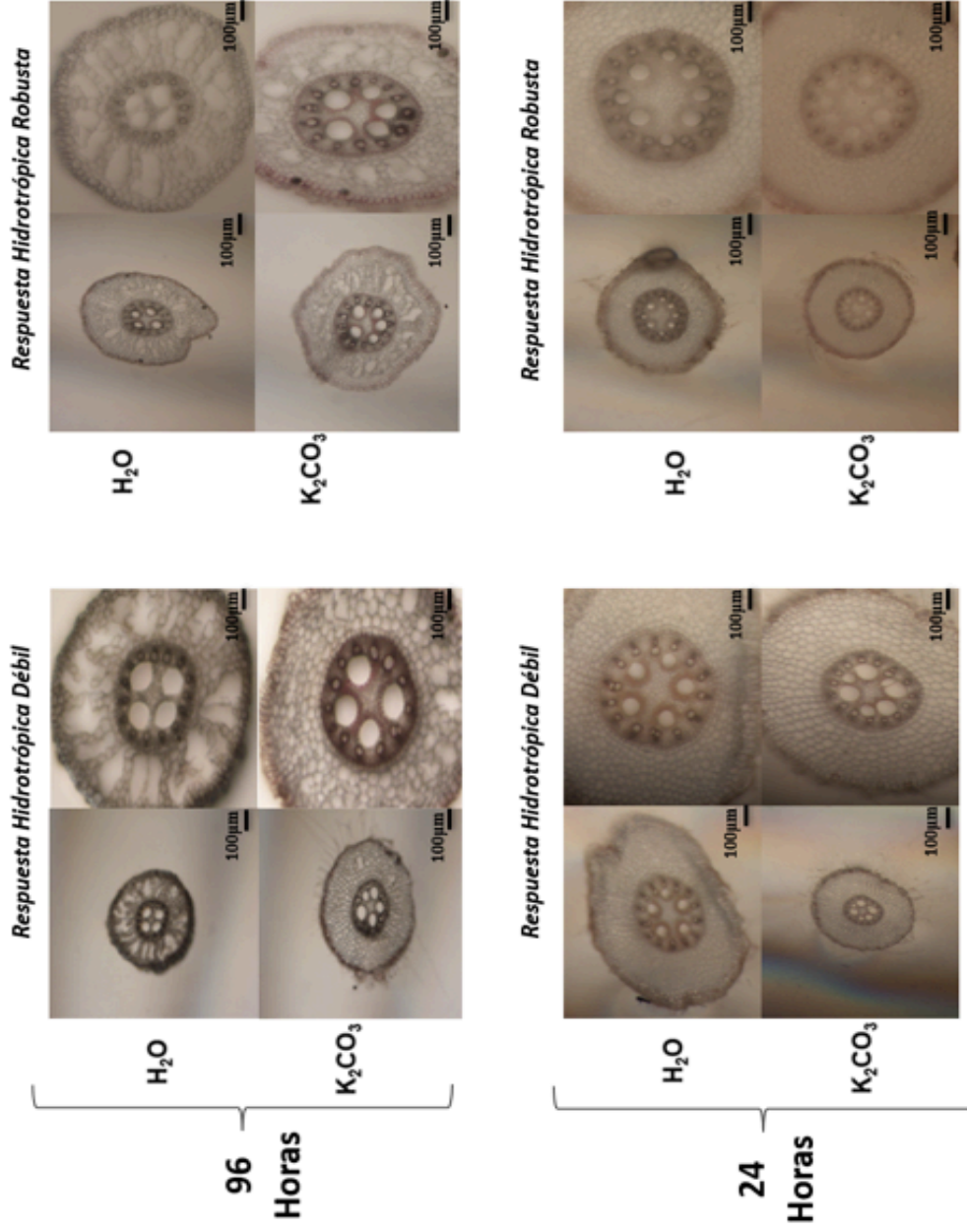
		Tiempo							
		24 horas		96 horas					
Tejido	Condición	Maíz	Respuestas	Concentración K <sup>+</sup> (potasio)	Concentración Na <sup>+</sup> (sodio)	Relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	Concentración K <sup>+</sup> (potasio)	Concentración Na <sup>+</sup> (sodio)	Relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>
				mmol/ml*mg de peso seco	mmol/ml*mg de peso seco		mmol/ml*mg de peso seco	mmol/ml*mg de peso seco	
		B73	DA	120	32	3,8	58	5	11,6
		DTMA 38	DB	100	28	3,6	144	16	9,0
		DTMA 184	RA	168	12	14,0	70	28	2,5
<b>Mesocotilo</b>									
		B73	DA	168	12	14,0	59	7	8,4
		DTMA 38	DB	160	20	8,0	84	8	10,5
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DTMA 184	RA	232	24	9,7	180	26	6,9

## **1.6. Análisis histológico de raíz primaria y mesocotilo sometidos a las condiciones del sistema de ensayo**

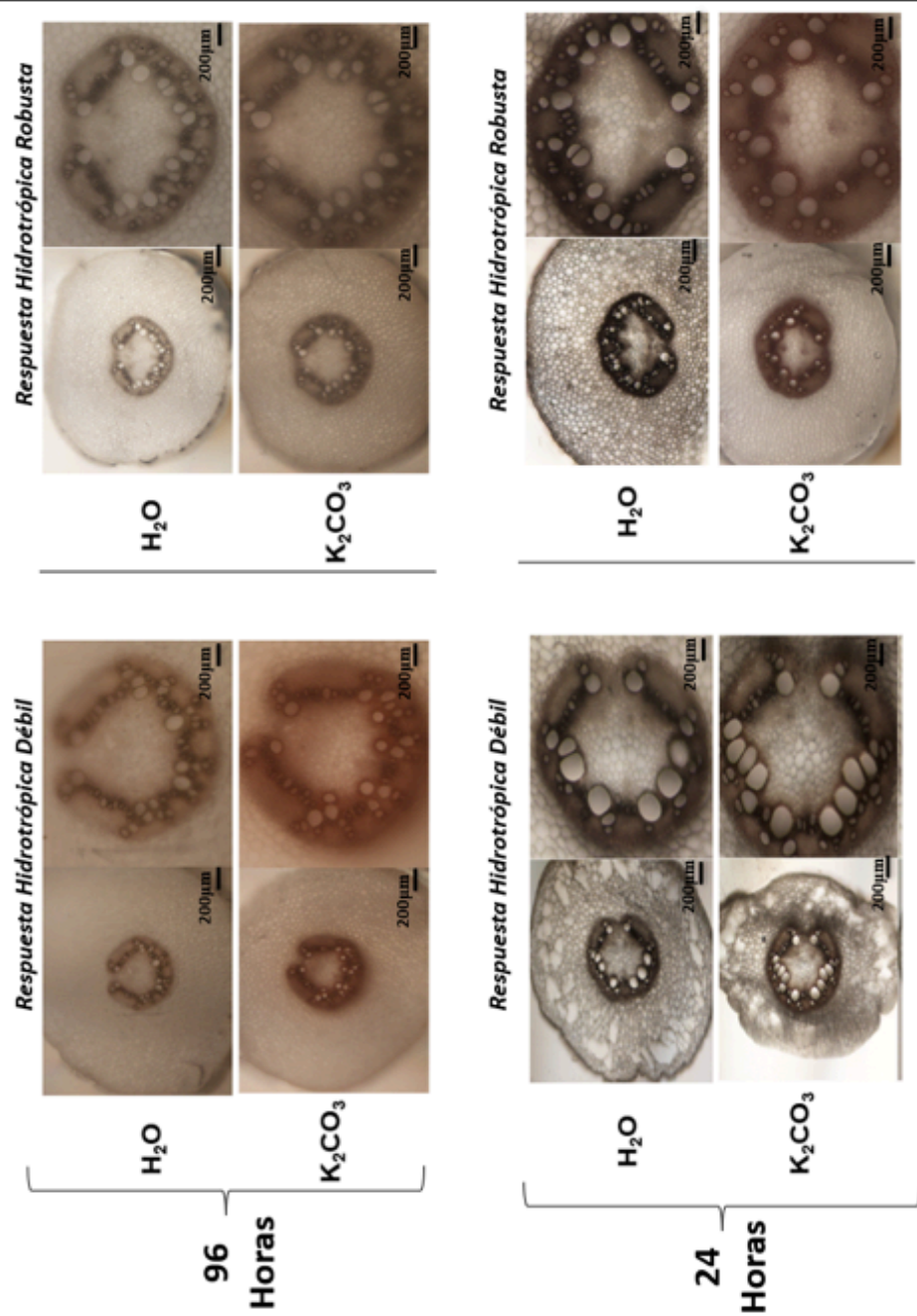
La observación microscópica de cortes transversales de las estructuras en estudio (raíz primaria y mesocotilo) se realizó en diferentes segmentos a lo largo de su arquitectura a las 24 h y al término de la fenotipificación (96 h); encontrando diferencias aparentes en el número de líneas celulares, los diámetros de áreas histológicas y vasculares, la formación de aerénquima en las dos condiciones de prueba con mayor proporción en tejidos provenientes del DTMA 38 (RH débil y EM baja) en comparación con el híbrido DTMA 184 (RH robusta y EM alta).

Los DTMA mostraron una mayor elongación de la raíz primaria en condiciones hídricas óptimas (longitudes entre 41mm a 161mm) en contraste con la condición de estrés hídrico (longitudes entre 5mm a 100 mm); lo que les permitió sumergirse en el agua depositada en el fondo de la cámara de prueba y alcanzar condiciones de estrés hídrico por inundación a las 96 h de ensayo. El mecanismo de formación de aerénquima en la raíz de maíz en respuesta a la inundación ha sido ampliamente descrito y no es propósito de este estudio [31-33]. No obstante, algunos DTMA bajo condiciones de estrés hídrico por déficit de humedad también mostraron formación de aerénquima sin entrar en contacto con fuentes hídricas adicionales, con evidente inhibición en el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria como respuesta a la baja humedad a las 96 h de prueba y en mesocotilo donde no hay reportes al respecto (Figura 7 y 8) [34-36]. Por lo tanto, se decidió realizar nuevas observaciones y mediciones a las 24 h de ensayo, periodo que aparentemente no permitió desencadenar los mecanismos requeridos para evidenciar la formación de aerénquima en los tejidos analizados, lo que se convierte en una pregunta de investigación para estudios futuros. Sin embargo, estos análisis permitieron encontrar correlaciones positivas entre la totalidad de parámetros medidos en los cortes de raíz primaria de los híbridos DTMA en condiciones hídricas óptimas con un índice de correlación superior a: 0.85 y el cual, disminuyó con respecto al número de vasos del metaxilema y el número de células corticales versus el resto de los parámetros medidos bajo condiciones de estrés hídrico. Además, no se observaron correlaciones entre el número de vasos de xilema (MX\_num) con el área transversal del vástago (TSA) con un índice de: 0.





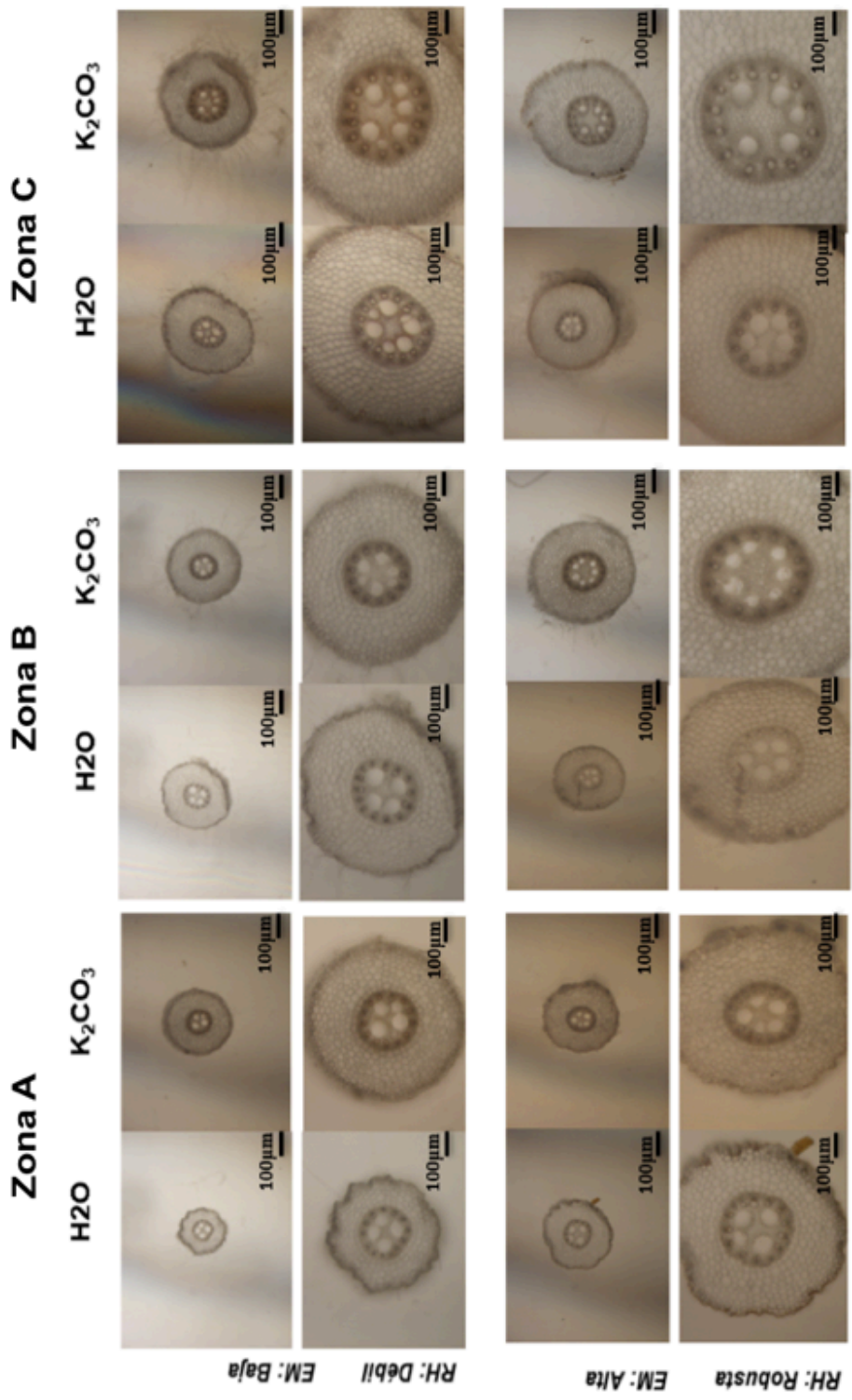
**Figura 7.** Imágenes de cortes transversales de raíz primaria del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H<sub>2</sub>O y prueba: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 96 h y 24h. Los híbridos DTMA 38 y DTMA 184 se clasificaron con RH débil y RH robusta, respectivamente. Los cortes se tiñeron con fluoroglucinol al 1% , se observaron por microscopía óptica en bajo aumento (4X y 10X), usando el microscopio Nikon®EclipseE600, registrando fotográficamente y analizando las imágenes con ayuda del programa de software RootScan®. (Barra: 100µm ).



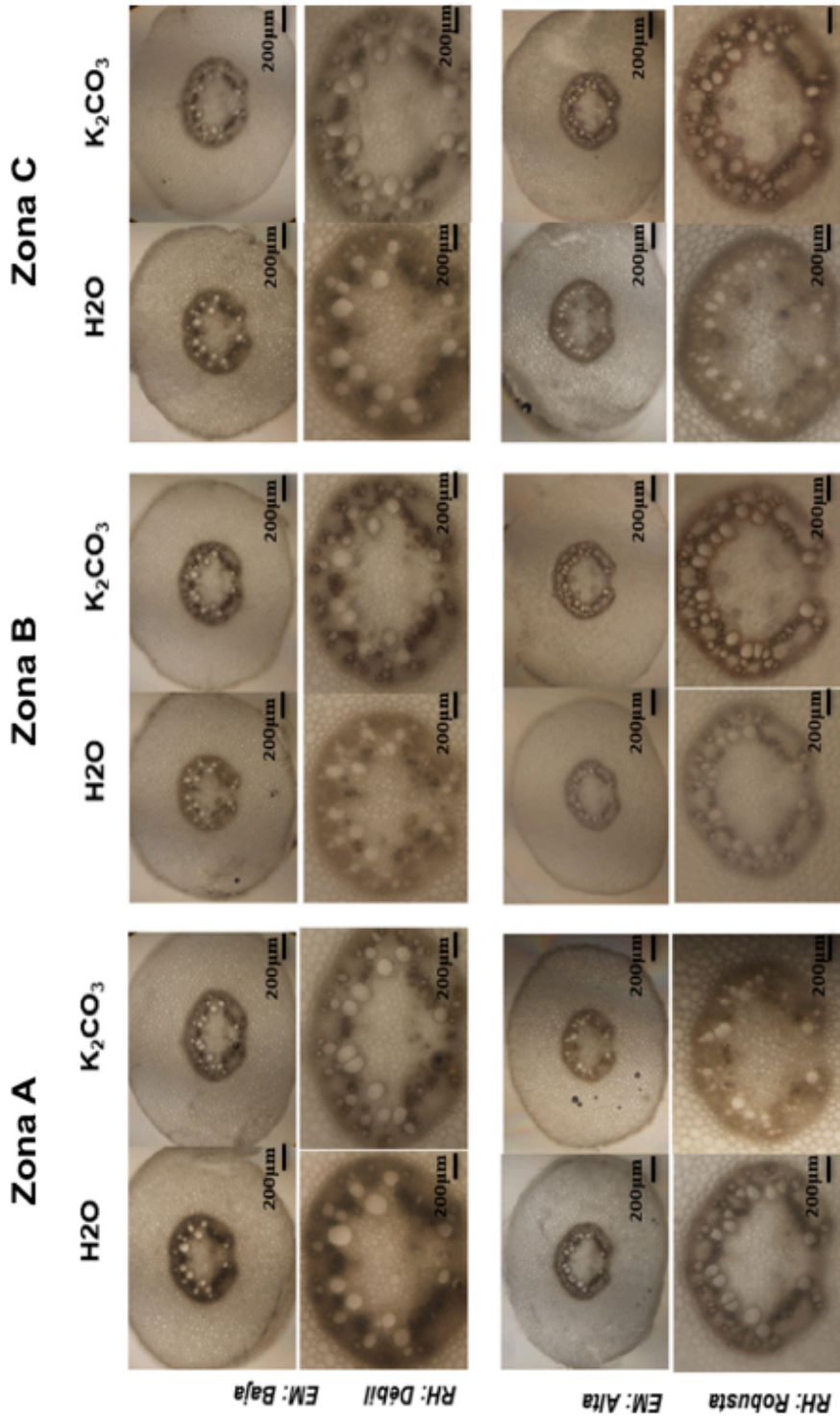
**Figura 8.** imágenes de cortes transversales de mesocotilo del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hidricas (control: H<sub>2</sub>O y prueba: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 96 h y 24 h. Los híbridos DTMA 38 y DTMA 184 se clasificaron con EM baja y EM alta, respectivamente. Los cortes se tiñeron con fluoroglucinol al 1% , se observaron por microscopía óptica en bajo aumento (4X y 10X), usando el microscopio Nikon®ElipseE600, registrando fotográficamente y analizando las imágenes con ayuda del programa de software RootScan® (Barra: 200µm ).

La tinción de fluoroglucinol en raíz primaria y mesocotilo permitió visualizar diferencias cualitativas en la acumulación de lignina en las condiciones hídricas de ensayo durante los dos periodos de análisis (24 y 96 h). La tinción de lignina (coloración rojiza) en los cortes transversales de las tres zonas analizadas de raíz primaria y mesocotilo (zona A: presencia de células meristemáticas; zona B: presencia de células de rápido crecimiento y zona C: presencia de células maduras) fue superior en regiones de la epidermis, el periciclo y los haces vasculares bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 9 y 10) [41]. Observación que corrobora la importancia de la lignina en procesos encaminados a tolerar el déficit hídrico desde su rol de barrera impermeable (manteniendo la integridad de la membrana celular y el equilibrio osmótico e hídrico), y/o a través de la intervención potencial de genes y sus transcritos relacionados con la biosíntesis de lignina en vías de tolerancia a la sequía [42-49]. Apoyados en antecedentes relacionados con la expresión diferencial de genes asociados con la biosíntesis de lignina en hojas de maíz (Hu et al., 2009) y la identificación de genes a través del análisis de GWAS y RNAseq en raíces de maíz (Hao et al., 2020); resultando de interés el análisis de su rol en las estructuras en estudio bajo condiciones de déficit hídrico [48-49]. No hay reportes del rol de la lignina en las paredes celulares del mesocotilo bajo condiciones de estrés hídrico; sin embargo, resulta de interés su estudio en relación con lo reportado por Schopfer et al., (2001) quienes demostraron que la inhibición de la extensión de células de la zona de elongación del mesocotilo en plántulas de maíz inducida por la exposición a luz azul se con el incremento en la rigidez de la pared celular a expensas del aumento de lignina extraíble en los tejidos externos (corteza y epidermis) sin evidenciar cambios en sus propiedades en haces vasculares y cuyo fenómeno se revirtió al retomar las condiciones de oscuridad [50].





**Figura 9.** imágenes de cortes transversales de la raíz primaria del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H<sub>2</sub>O y prueba: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 96 y 24h. Los cortes transversales corresponden a la zona A: próxima al ápice de la raíz (presencia de células meristemáticas) ; zona B: entre la zona A y B (presencia de células maduras) y zona C: próxima a la base de la raíz (presencia de células maduras). Se usó tinción de fluoroglucinol al 1% , se realizó observación en bajo aumento (4X y 10X), usando el microscopio óptico Nikon®ElipseE600, se registro fotográficamente y analizo las imágenes con ayuda del programa de software RootScan® (Barra: 100µm ).



**Figura 10.** imágenes de cortes transversales de la raíz primaria del híbrido DTMA 38 y 184 de maíz bajo dos condiciones hídricas (control: H<sub>2</sub>O y prueba: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 96 y 24h. Los híbridos DTMA 38 y DTMA 184 se clasificaron con EM baja y EM alta, respectivamente. Los cortes transversales corresponden a la zona A: próxima al ápice de la raíz (presencia de células meristemáticas) ; zona B: entre la zona A y B (presencia de células de rápido crecimiento) y zona C: próxima a la base de la raíz (presencia de células maduras). Se usó tinción de fluoroglucinol al 1% , se realizó observación en bajo aumento (4X y 10X), usando el microscopio óptico Nikon®EclipseE600, se registro fotográficamente y analizo las imágenes con ayuda del programa de software RootScan® (Barra: 100µm ).

## 2. Genotipificación

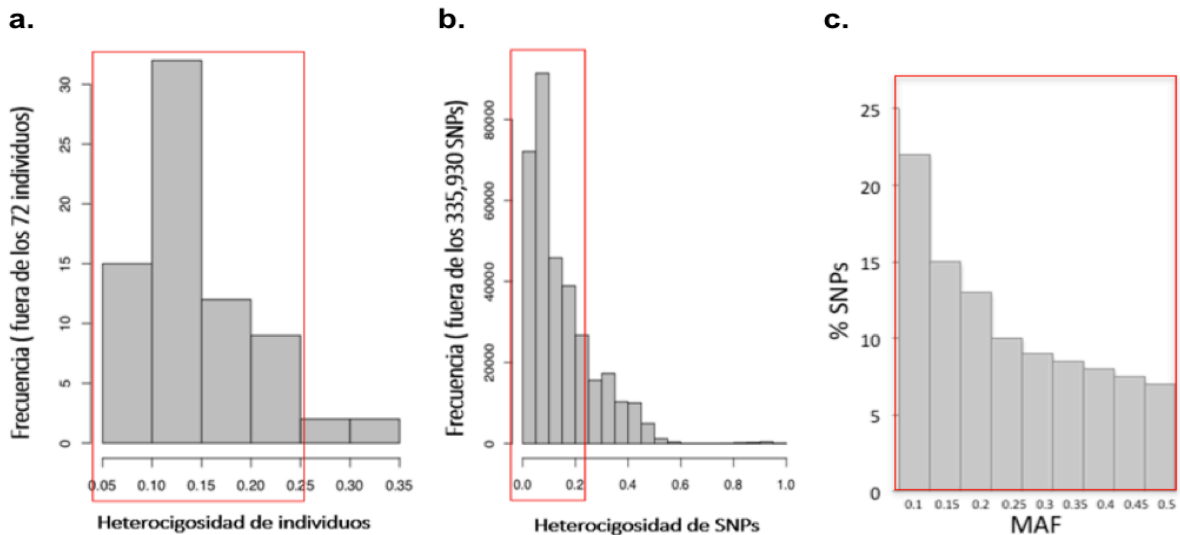
La secuenciación del genoma completo de la colección de líneas endogámicas DTMA de maíz se obtuvo a través del método GBS; usando la versión B73\_V2 del genoma de maíz como referencia, con un rendimiento total por línea de: 955.690 SNPs distribuidos a lo largo de sus 10 cromosomas y codificados según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) en formato HapMap [51-53]. De estos datos se identificaron los SNPs correspondientes a los 72 híbridos DTMA de maíz en estudio incluyéndose 37 SNPs provenientes de regiones no mapeadas en el genoma de referencia B73 y agrupados bajo la denominación de cromosoma 0. Dos filtros de control de calidad (MAF: *Minor Allele Frequency* y MC: *Minimum Count*) se aplicaron a los datos genómicos con herramientas propias del software de libre acceso: TASSEL versión 5.2.50, el cual, permitió eliminar SNPs con frecuencias alélicas menores a 0.05 y datos faltantes superiores al 40% (resultado de posibles errores de secuenciación, de baja calidad, raros y poco informativos) [54-57]. De esta forma, se obtuvo un total de 335.931 SNPs presentes en al menos 56 de los 72 DTMA, lo cual correspondió al 35.15% del total de SNPs y cuya distribución mostró una relación directa con la longitud cromosómica. El cromosoma 1 con mayor longitud, mostró la mayor abundancia de marcadores moleculares (52.279 SNPs) contrastando con los 23.170 SNPs localizados en el cromosoma 10 (menor longitud) (Tabla 10) [51,58-59].

El nivel de heterocigosidad de individuos y marcadores moleculares se definió alto con índices entre 0.20 y 0.25; no obstante, el mayor porcentaje de SNPs (90%) se reportó con índices de heterocigosidad entre 0.0 y 0.1 (Figura 11). Adicionalmente, la frecuencia de alelos menores (MAF) para los SNPs en la población osciló entre 0.05 y 0.5., lo que redujo la presencia de falsos positivos como resultado de alelos raros dentro de la población de estudio [54].



**Tabla 10.** Número de SNPs obtenidos a través del método de genotipificación por secuenciación masiva (GBS) de los 72 híbridos DTMA de maíz y el número de SNPs resultantes por cromosoma al aplicar dos filtros de calidad; el primer filtro de 0,05 mínima frecuencia alélica (MAF: 0,05) y un segundo filtro de mínimo conteo (MC: 56). De esta forma el número de SNPs usados para el análisis de asociación genómica (GWAS) de los 72 híbridos DTMA correspondió a: 335,931 SNPs distribuidos a lo largo de los 10 cromosomas del maíz como lo indica la columna denominada Filtro MC. Los filtros se aplicaron usando el software TASSEL v.5.2.50. (Bradbury, et al. ,2007) [53].

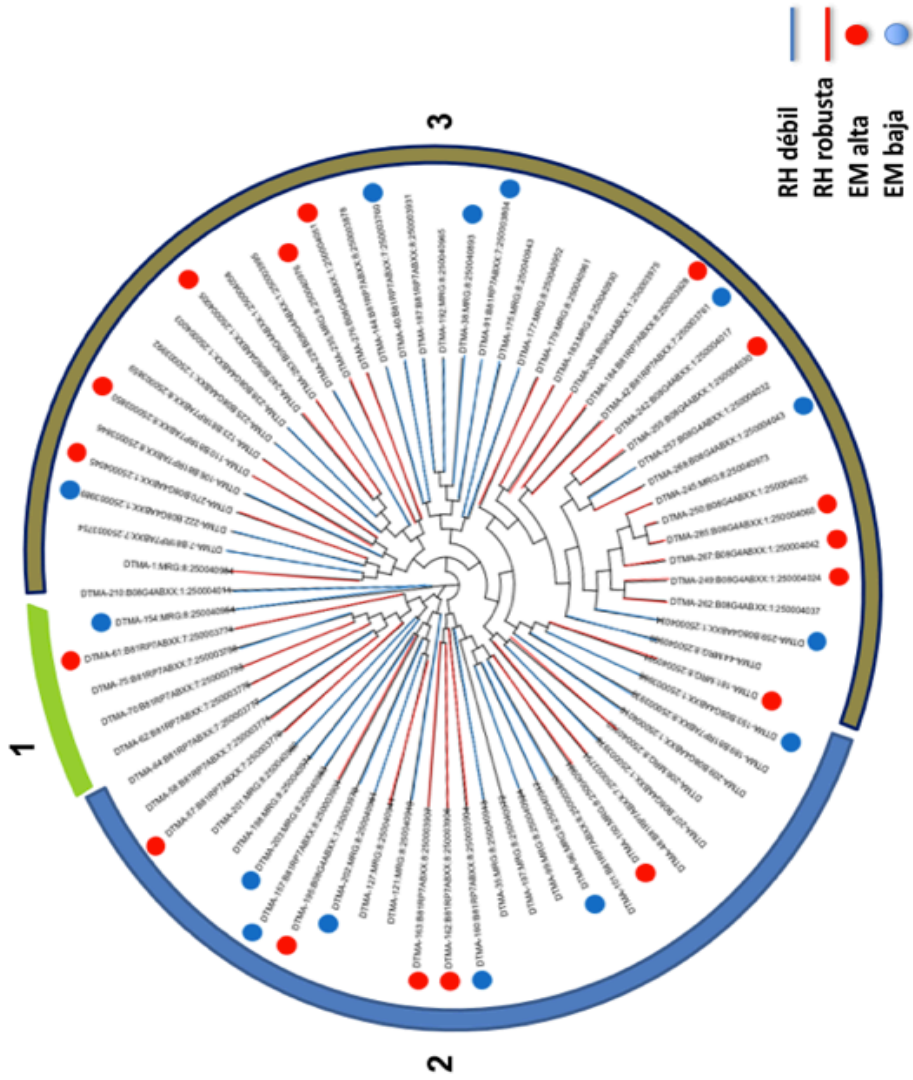
Cromosoma	SNPs	MAF 0,05	Filtro MC	Sitios
0	570	76	37	0(1731005)-36(6592711)
1	148,752	57,212	52,279	37(10045)-52315(301331020)
2	115,173	46,325	41,802	52316(10056)-94117(236974206)
3	108,224	42,325	38,588	94118(81926)-132705(232096209)
4	94,726	34,216	31,132	132706(28990)-163837(241402815)
5	110,328	43,664	39,821	163838(313)-203658(217748593)
6	76,475	29,729	27,123	203659(120318)-230781(169106169)
7	80,517	31,218	28,373	230782(32523)-259154(176759698)
8	81,431	31,199	28,332	259155(17988)-287486(175732930)
9	72,368	27,919	25,274	287487(66696)-312760(1565722550)
10	67,126	25,815	23,17	312761(230914)-335930(150107267)
<b>Total</b>	<b>955,690</b>	<b>369,824</b>	<b>335,931</b>	
<b>Porcentaje</b>	<b>100</b>	<b>38,69</b>	<b>35,15%</b>	



**Figura 11.** Análisis de los 335.931 SNPs de los 72 híbridos DTMA de maíz. (a. Heterocigocidad entre individuos; b. Heterocigocidad entre marcadores moleculares (SNPs). Índice de heterocigocidad alta: 0.20-0.25; Muy alta: >0.25; c. Porcentaje de SNPs con diferentes frecuencias de alelos menores: entre 0.05 a 0.5).

La disponibilidad de datos fenotípicos (respuesta hidrotópica de la raíz primaria y elongación del mesocotilo) y genotípicos (SNPs de calidad), correspondientes a los 72 híbridos DTMA de maíz; permitió verificar la diversidad genética y la ausencia de estructura de la población de estudio, dos requerimientos básicos para la aplicación de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) [57-60]. Para tal efecto, se construyó un cladograma de distancias génicas usando el software TASSEL versión 5.2.50, mediante el método de vecino más cercano (neighbor joining), junto con un diagrama de parentesco (Kindship) por el método de Van Raden y un gráfico de análisis de componentes principales (ACP) obtenidos a partir de scripts del paquete GAPIT en el software RStudio, los cuales, evidenciaron una población de líneas endogámicas DTMA de maíz genéticamente diversa, agrupadas en tres grandes grupos con respuestas fenotípicas variadas y sin estructura génica entre individuos a pesar de compartir uno de sus parentales (Figura 12). Por lo tanto, se identificaron individuos con RH robusta y RH débil junto con EM alta y EM baja dentro de un mismo grupo, lo cual indicó la ausencia de patrones fenotípicos y de dependencia con la distancia genética de las líneas endogámicas DTMA de maíz [53,61]. Por su parte, Cairns et al., (2003) ya habían descrito la diversidad de la población DTMA de maíz y su potencial uso sobre otras variedades de maíz para mejoramiento vegetal; atribuida a su origen e historia evolutiva compleja [62-63].

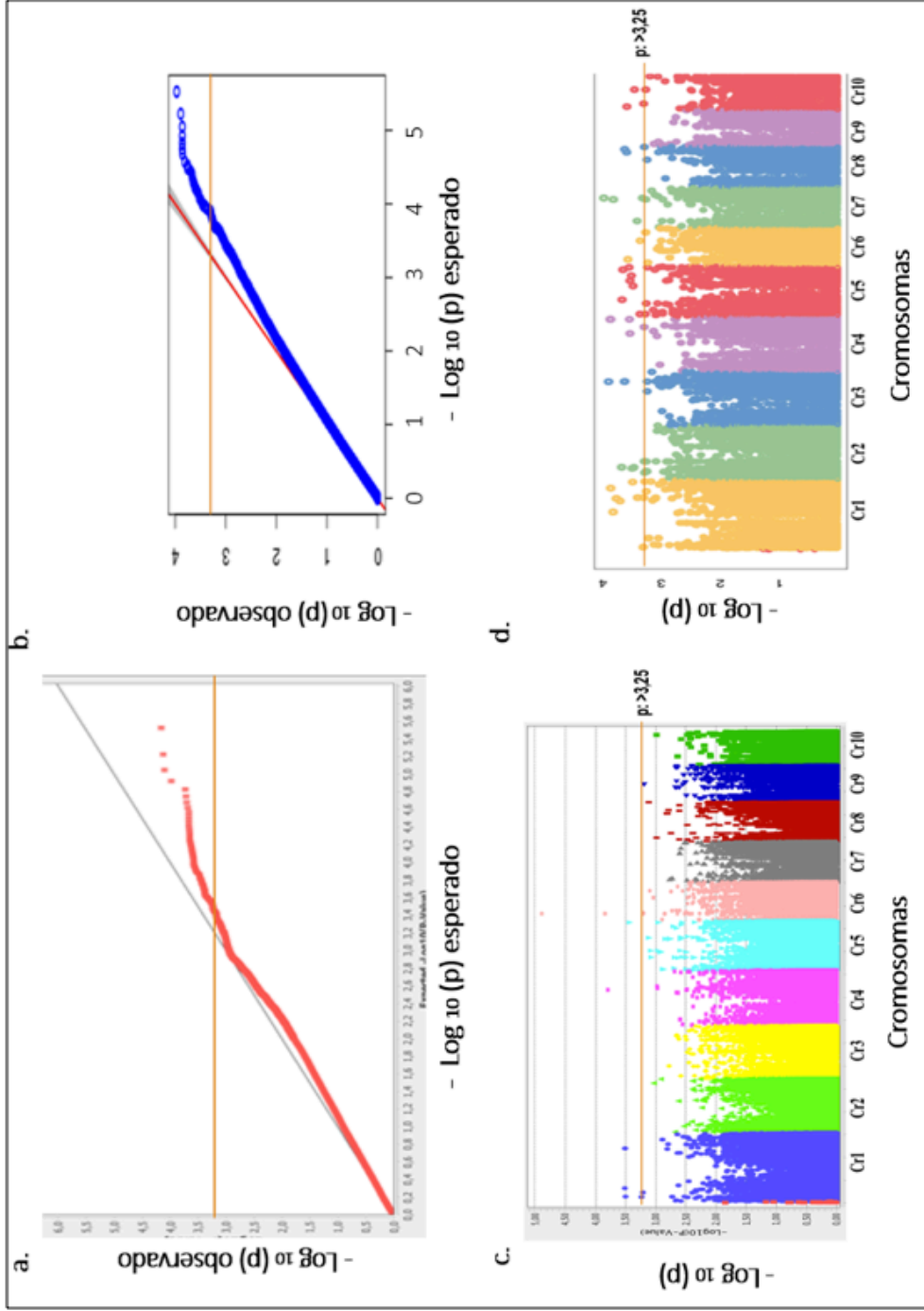




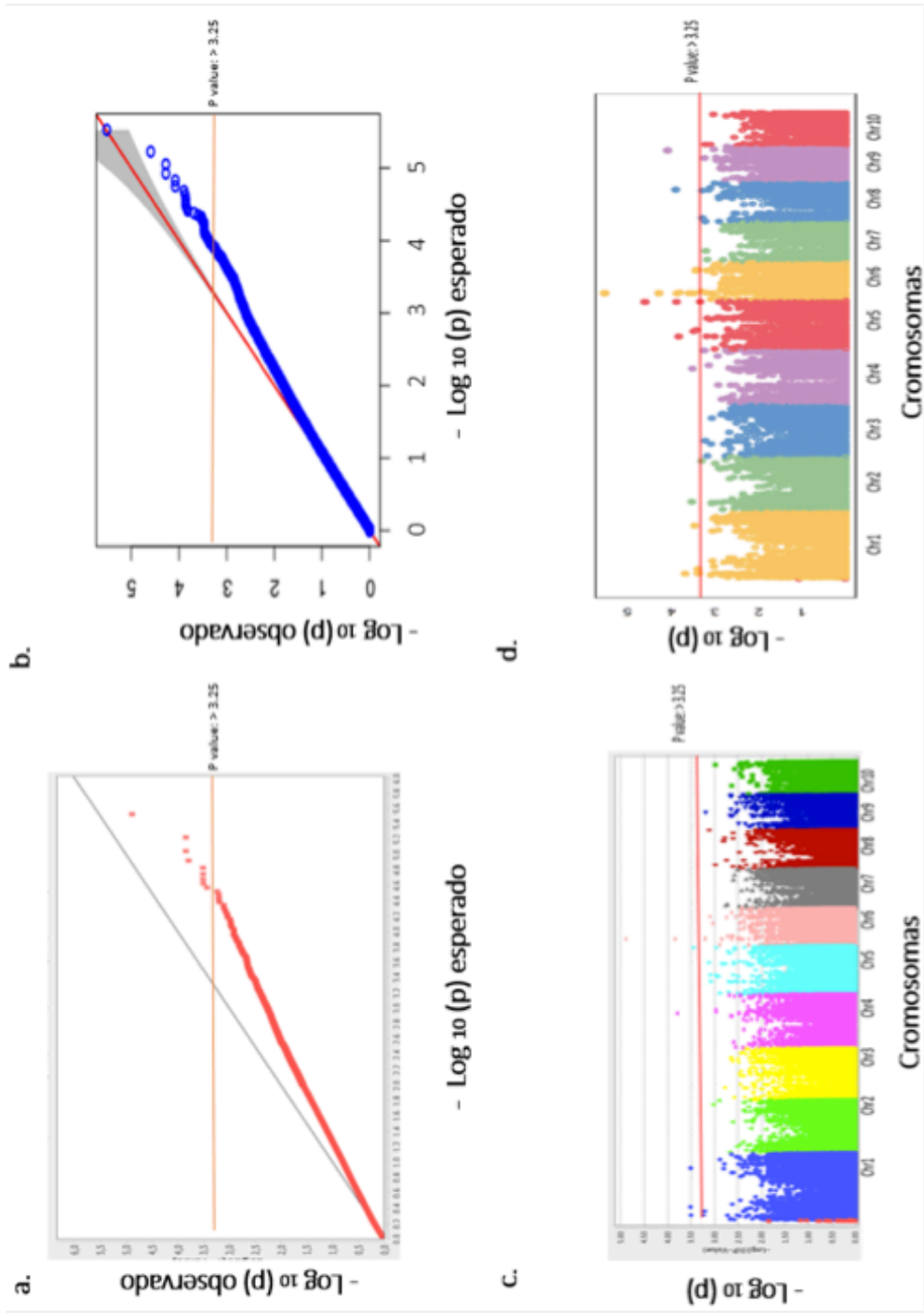
**Figura 12.** Cladograma de distancias genéticas entre los 72 DTMA analizados (datos filtrados) construido mediante el método de vecino más cercano. Se observó tres grupos genéticamente diferentes (grupo 1 en verde; grupo 2 en azul y el grupo 3 en café) cuyos individuos mostraron diversas respuestas fenotípicas (RH: respuesta hidrotrópica de la raíz y EM: elongación del mesocotilo). Donde, se reconoce la RH por líneas continuas de color azul para RH débil y de color rojo para RH robusta y la EM con círculos de color rojo para EM alta y de color azul EM baja.

## 2.1. Estudios de asociación a nivel de genoma completo (GWAS) de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo

Inicialmente, se verificó el comportamiento normal de los datos asociados fenotipo-genotipo (GWAS), por medio de los modelos matemáticos aplicados a través de las dos plataformas de software usadas y mediante el análisis de gráficos cuantil-cuantil (QQ *plot*) para cada fenotipo, el cual simultáneamente permitió definir el umbral de aceptación para los marcadores probablemente relacionados con las respuestas fenotípicas en estudio [53,61]. De este modo, la desviación de la tendencia lineal entre valores  $p$  [ $-\text{Log}_{10}(p)$  observados vs  $-\text{Log}_{10}(p)$  esperados] se usó como criterio de inclusión, lo cual, correspondió a valores de  $p$  observado  $\geq 3.25$ . Adicionalmente, se aplicó la prueba estadística de ajuste de Bonferroni, sobre la totalidad de marcadores analizados con un  $p$  valor de 0.05 ( $335.931/0.05 = p \leq 1.5 \times 10^{-7}$ ) como criterio adicional para la definición del umbral de aceptación de marcadores asociados; con el propósito de controlar errores tipo I (falso rechazo de hipótesis nula). Sin embargo, no se consideró el valor del umbral calculado a partir del logaritmo negativo en base 10 del valor de  $p$  del dato ajustado [ $-\text{Log}_{10}(1.5 \times 10^{-7}) = 6.82$ ] considerando la alta dependencia del estadístico por el número de marcadores asociados y su nivel astringencia, el cual arrojó un valor de significancia que excedió los niveles más altos registrado de los SNPs asociados por los dos fenotipos en estudio [64-65]. El SNP con mayor nivel de asociación para la RH (S1\_293634495), localizado en el cromosoma 1 reportó un valor de logaritmo negativo en base 10 igual a 4.1 y el asociado a EM (S6\_30191692), ubicado en el cromosoma 6, mostró un valor de logaritmo negativo en base 10 igual a 5.5. A la par, se visualizó la distribución de los marcadores imputados para cada fenotipo a lo largo de los 10 cromosomas del maíz por medio de gráficos de salida tipo *Manhattan* (cada cromosoma con un color distintivo y cada punto un polimorfismo); donde, las asociaciones más significativas se ubicaron en la región superior de la gráfica sobre la paralela definida como umbral de aceptación y en razón al menor *valor de p* expresado en logaritmo negativo (Figuras 13 y 14) [53,61].



**Figura 13. a y b.** Gráficos cuantil-cuantil QQ plot que muestran los valores esperados de  $p$  y los valores observados para los SNPs usados en el GWAS. **c y d.** Diagramas tipo Manhattan plot de los SNPs asociados por MLM (Modelo Lineal Mixto) a la respuesta hidrotérmica de la raíz primaria por GWAS en 72 híbridos DTMA de maíz. (a y c: TASSEL v.5.2.50; b y d: GAPIT R package. La línea naranja indica el valor mínimo de aceptación para los SNPs ( $p = 3.25$ ) [53,61].



**Figura 14.** a y b. Gráficos cuantil-cuantil QQ plot que muestran los valores esperados de p y los valores observados para los SNPs usados en el GWAS. c y d. Diagramas tipo Manhattan plot de los SNPs asociados por MLM (Modelo Lineal Mixto) con la elongación del mesocotilo por GWAS en 72 híbridos DTMA de maíz. (a y c: TASSEL v.5.2.50; b y d: GAPIT R package. Línea naranja: valor mínimo aceptado de  $p \geq 3.25$ ) [53,61].

Inicialmente, se asociaron 98 SNPs a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria a través de GWAS (TASSEL v.2.5.50) a lo que se sumaron los 62 SNPs obtenidos por medio de GWAS (GAPIT RStudio), lo cual resultó en 146 SNPs asociados a este fenotipo con 12 SNPs comunes en los dos métodos aplicados (Anexo 14). Los SNPs comunes: S4\_167074670 y S8\_163214768 (ubicados en el cromosoma 4 y 8, respectivamente) permitieron bajo los criterios de mapeo, asociar a los genes GRMZM2G015049 (saur42 - small auxin up RNA42) y al gen AC183950.2\_FG004 (harpin-induced protein) respectivamente; siendo, el primero de ellos miembro de la familia más abundante de genes de respuesta temprana a auxina e implicados en múltiples procesos biológicos de regulación de crecimiento y desarrollo vegetal en respuesta a señales hormonales y ambientales [66-68]. Por su parte, aunque el segundo gen no ha sido caracterizado posee un dominio conservado LEA\_2, el cual, está presente en proteínas expresadas durante procesos de embriogénesis tardía de semillas e inducidas en maíz junto con otras LEAs bajo condiciones de estrés hídrico, salino, osmótico, bajas temperaturas [69-70].

Los SNPs asociados a RH con los niveles de significancia más elevados se ubicaron en el cromosoma 7 (S7\_127889081: 4.16 y S7\_127888869: 3.97) que asociaron a través del mapeo de la secuencia al gen AC196112.3\_FG004; el cual, aun no caracterizado y cuya función es desconocida [53,61].

Por su parte, 9 SNPs se asociaron con la elongación del mesocotilo a través de GWAS (TASSEL v.2.5.50) y 39 SNPs por medio de GWAS (GAPIT en RStudio); encontrando, los primeros 9 SNPs comunes en los dos estudios aplicados (Anexo 15). Los SNPs comunes S1\_19979857 y S4\_156024285 (ubicados en el cromosoma 1 y 4); permitieron asociar los genes AC166636.1\_FG008 (IDP871/Ras-related protein Rab-6A/proteína no caracterizada LOC100281229) y GRMZM2G028438 (gras76 - GRAS- factor de transcripción 76 ), respectivamente al fenotipo. El primer gen correspondió a una pequeña proteína de unión a GTP aún no caracterizada y cuyo principal dominio conservado, Rab6 agrupa proteínas relacionadas con el transporte dependiente de microtúbulos y por endosomas a través del aparato de Golgi [71-72]. Este tipo de pequeñas proteínas de unión a GTP resultan de interés ya que se ha descrito en

*Arabidopsis thaliana*, su actividad regulatoria en la línea de señalización por ABA bajo condiciones de estrés por sequía y su abundantemente expresión en las células guardia. El segundo gen pertenece a la familia de factores transcripcionales GRAS que se han relacionado con procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas que incluyen la transducción de señales de giberelina, la transducción de señales del fitocromo A, la iniciación del meristemo axilar, el mantenimiento del meristemo de brotes y el patrón radial de la raíz [73].

Los SNPs (S6\_30191692, S6\_30191664, S6\_30191671 y S6\_30191676) localizados en el cromosoma 6 se asociaron a la elongación del mesocotilo con los mayores valores de  $p$  a través de GWAS (TASSEL: 4.89 y GAPIT: 5.51; datos del primer SNP), los cuales permitieron asociar un gen de baja confianza identificado como: AC206660.4\_F6010 [53,61].

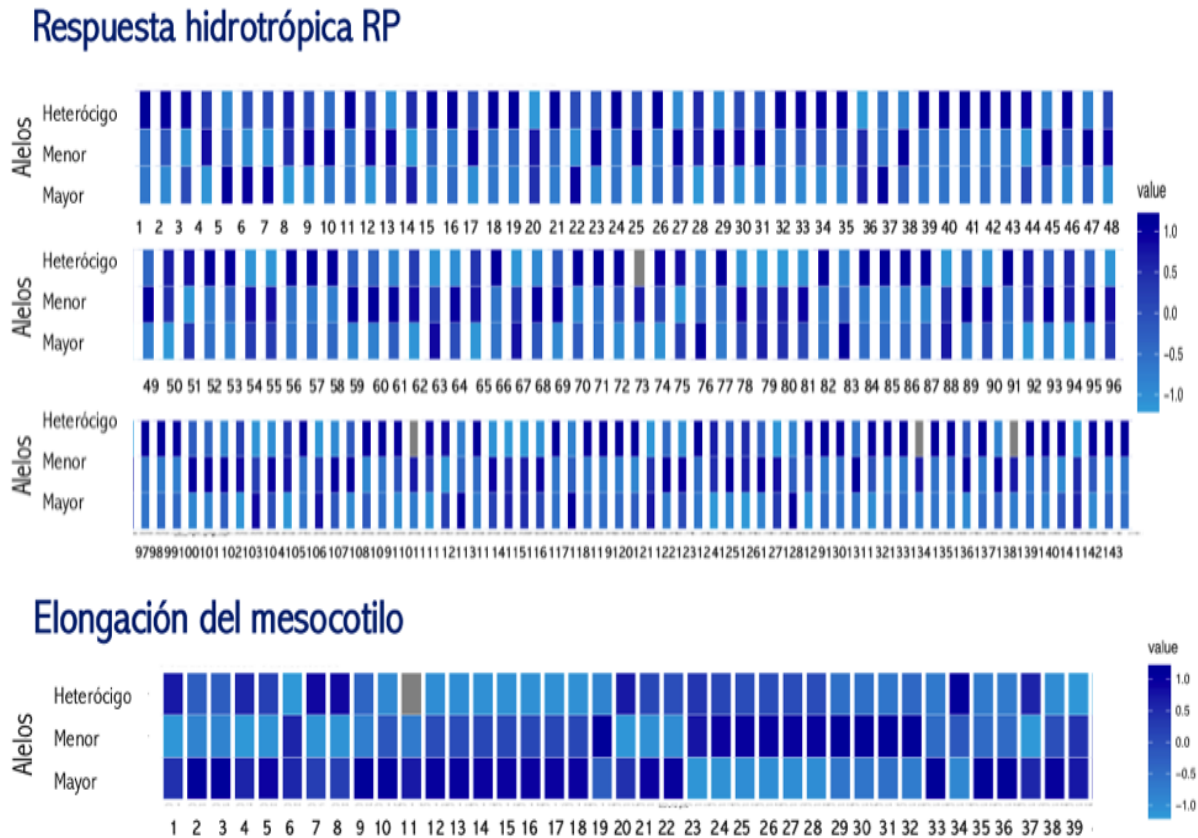
No se encontraron SNPs que asociaran genes comunes a los rasgos en estudio (la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo).

## **2.2. Efectos fenotípicos de los SNP asociados a la respuesta hidrotópica y elongación de mesocotilo**

El efecto fenotípico ( $E_f$ ) de los SNPs asociados con mayor nivel de significancia a los fenotipos en estudio (RH: 143 SNPs y EM: 39 SNPs de 42 SNPs asociados) se determinó a partir su frecuencia alélica, la cual resultó de calcular la diferencia entre la media general de cada respuesta en la población ( $\mu_{RH}$ : 36.1° y  $\mu_{EM}$ : 34.5mm) y la media de la respuesta de cada individuo [ $E_f = \mu_{RH}(\text{DTMAs}) - \mu_{RH}(\text{cada DTMA})$ ] y [ $E_f = \mu_{EM}(\text{DTMAs}) - \mu_{EM}(\text{cada DTMA})$ ]. De esta manera, se identificaron las posibles combinaciones alélicas para cada SNP asociado a las respuestas fenotípicas (RH robusta o RH débil; EM alta, EM media o EM baja); permitiendo la determinación de los alelos de mayor frecuencia, menor frecuencia y los heterocigotos en cada caso junto con su efecto fenotípico (positivo: valores  $> 0$ , neutro: 0, o negativo: valores  $< 0$ ) (Figura 15). En este análisis se



encontró una mayor prevalencia de alelos heterocigos con relación a los alelos menores y mayores en los SNPs asociados en ese orden [74-75].



**Figura 15.** Mapa de calor del efecto fenotípico de los SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo seleccionados por GWAS de los 72 híbridos DTMA de maíz (TASSEL v.5.2.50 y GAPIT R package). (Efecto fenotípico positivo: valor cercano a 1.0 con azul intenso; Efecto fenotípico negativo: valor cercano a -1.0 con azul celeste). Se observó una mayor prevalencia de alelos heterocigos con relación a los demás alelos en los SNPs asociados sin evidenciarse un haplotipo específico para una respuesta fenotípica específica [53,61].

Adicionalmente, se filtraron las secuencias de los 72 híbridos DTMA de maíz junto con los SNPs asociados a los fenotipos, lo cual permitió evidenciar variantes alélicas contrastantes en los 4 híbridos DTMA de maíz definidos como puntos extremos o atípicos altos para las respuestas fenotípicas (RH robusta: DTMA 270: 73.07° y DTMA 181: 60.80° ; EM alta: DTMA 70: 68.40 mm y DTMA 206: 66.4 mm) dentro de la población en estudio

(Anexo 16). El poco contraste evidenciado se correlaciona con la reducción de varianza fenotípica ya descrita por parte de líneas híbridas provenientes de cruzas con un probador común [76-77]. No obstante, continuar el estudio de estos híbridos resulta de interés; ya que, dos de ellas (DTMA 206 y DTMA 181) en el estudio reportado por Eapen et al., (2017) y Martínez, (2019) mostraron tolerancia a condiciones de sequía en campo en concordancia con respuesta hidrotrópica robusta por parte de sus raíces primarias y elongaciones del mesocotilo alta en este estudio [9,10].

La identificación de haplotipos relacionados significativamente con las respuestas fenotípicas, el cálculo de índices de heredabilidad a través de la varianza alélica para su posterior uso en procesos de predicción y selección genética a través de alelos favorables con fines de mejoramiento en maíz no fue posible en consideración a una  $n$  poblacional baja para estos propósitos [56,74].

### **2.3. Resultados de otros análisis bioinformáticos.**

La implementación del GWAS basado en modelo estadístico GAPITSuper asoció 26 SNPs extras a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y 48 SNPs con la elongación del mesocotilo usando un umbral más restringido ( $valor\ de\ p \geq 4.0$ ) y distribuidos en los 10 cromosomas de maíz (Tabla 11). Estos datos que se sumaron a los reportados previamente y dan un total de: 172 SNPs asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y 90 SNPs asociados a la elongación del mesocotilo (Anexo 17) [93-94]. Se mantuvo el comportamiento observando con los GWAS previamente aplicados; encontrando, la mayor abundancia de marcadores moleculares en el cromosoma 1 para la RH y para la EM en los cromosomas 5 y 6. De igual forma GWASsuper asoció con un  $p\ valor$  de 7.0 al SNP S6\_30191692 a la elongación del mesocotilo; convirtiéndolo en el único marcador común identificado por los tres métodos usados y el de mayor grado de significancia estadística [53,61].



La totalidad de marcadores moleculares relacionados a través de los estudios de asociación (GWAS) a los fenotipos con elevada significancia estadística se mapearon en busca de genes asociados a lo largo de la secuencia de referencia.

**Tabla 11.** SNPs adicionales asociados a través de GWAS aplicado con GAPITsuper a la respuesta hidrotrópica de la raíz (RH) y la elongación del mesocotilo (EM) de los 72 híbridos DTMA de maíz. (SNPs asociados a RH: 26 y SNPs asociados a EM: 48). La S inicial indica el cromosoma en que se encuentra ubicado el SNP y la localización exacta es el del número después de barra al piso.

GAPIT SUPER					
RH		EM			
#	[26 SNPs]	#	[48 SNPs]	#	
1	S1_196428801	1	S1_10582816	25	S8_118167216
2	S1_196428836	2	s1_106045998	26	S8_118167221
3	S1_47476131	3	S2_148879068	27	S8_122753007
4	S2_18001359	4	S2_15730445	28	S8_122753009
5	S3_1571609	5	S3_12291222	29	S8_122753017
6	S3_1571610	6	S3_127100473	30	S8_122753021
7	S3_1571612	7	S3_127100524	31	S8_122753023
8	S3_1571614	8	S3_127100823	32	S8_147066006
9	S3_1571618	9	S3_1571470	33	S9_107311600
10	S3_1571620	10	S3_1633331	34	S9_107311601
11	S3_1571621	11	S3_168838689	35	S9_107311603
12	S3_1571625	12	S3_173205767	36	S9_107311604
13	S4_228847292	13	S4_166924923	37	S9_107311605
14	S4_131765127	14	S5_10857945	38	S9_107311606
15	S5_15190946	15	S5_10857951	39	S9_107311607
16	S5_15463402	16	S5_132171155	40	S9_138499145
17	S5_15463392	17	S5_142485704	41	S9_138555786
18	S5_15956749	18	S6_105080714	42	S9_146872997
19	S5_179010871	19	S6_148780018	43	S9_147411634
20	S5_186796501	20	S6_148780022	44	S9_147411635
21	S6_154314919	21	S7_126522352	45	S10_133817611
22	S6_155249693	22	S7_126522353	46	S10_134584864
23	S8_159255324	23	S7_129344449	47	S10_134584872
24	S8_151907047	24	S7_140056212	48	S10_146120407
25	S9_104878133				
26	S10_135610577				

## 2.4. Identificación de genes asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo.

La localización física de los SNP asociados a las respuestas fenotípicas se realizó por medio de la herramienta *Genome Browsers* ([https://maizegdb.org/gbrowse/maize\\_v4](https://maizegdb.org/gbrowse/maize_v4)) que pertenece a la página de *MaizeGDB* (<https://maizegdb.org>) la cual, permitió seleccionar la versión de la secuencia del genoma de maíz de referencia utilizado para la secuenciación por GBS (Maize B73 RefGen\_v2) y mapear cada marcador molecular a lo largo de la misma [80-81]. La localización de los genes se usó como criterio de asociación a los rasgos fenotípicos (RH y EM); siendo, aceptados todos los genes dentro  $\pm 1$  Kpb corriente arriba y/o corriente a bajo de cada SNP mapeado en la secuencia de referencia. Adicionalmente, se verificó la posición de los genes sobre la última versión de la secuencia de maíz (Maize B73 RefGen\_v4) disponible a la fecha en la base de datos. También, se tuvo en cuenta la información publicada en estudios centrados en la tolerancia y/o resistencia al estrés hídrico en maíz y en los modelos experimentales de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* L. *ssp japonica*; donde, fueron descritos genes ortólogos y proteínas aún no caracterizadas en maíz e identificadas en el mapeo de asociación [82-83]. De este modo, se asociaron 86 genes a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y 47 genes a la elongación del mesocotilo a partir de los 172 SNPs y 90 SNPs rastreados respectivamente para cada fenotipo en la secuencia de referencia (Tablas 12 y 13). No se encontraron genes comunes asociados a los dos rasgos fenotípicos; sin embargo, no se descartó su participación en mecanismos y/o funciones conjuntas relacionadas con la respuesta al estrés hídrico, las cuales se explorarán más adelante en este capítulo.

**Tabla 12.** (Inicio) Listado de ochenta y seis genes candidatos de estar asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria en los 72 híbridos DTMA. Se incluye el número de asignación en las bases de datos de Maize GDB, Gramine y NCBI, la localización cromosómica, el nombre o sinónimo del gen, la familia de proteínas a la que pertenece si tiene (PFAM) y la actividad que ha sido reportada en la que se ha implicado. Datos asociados por GWAS con valor de  $p \geq 3,25$  y  $\geq 4.0$  usando el software TASSEL v.5.2.50 (Bradbury P.J. et al 2007; GAPIT R package Lipka et al., 2011 y GAPITSuper Wang et al., 2014) [53,61,79].

No.	Maize GDB	Gramine	NCBI	Chr	Nombre y símbolo del gen	Familia y sub-familia	Actividad
1	GRMZM2G138338	Zm00001eb140560	LOC100216746	3	Putative inactive leucine rich repeat receptor like protein kinase	LRR_8_LRR_4_Pkinase PK_Tyr_Ser-Thr_LRR_6_LRRNT_2_Adeno_E3_CR2	Unión ATP
2	GRMZM2G094879	Zm00001eb360860	LOC103636204	8	DUF1754 superfamily protein	FAM32A	
3	GRMZM2G114692	Zm00001eb063600	LOC100191998	1	Pumilio homolog 24	PUM-HD_CPL_PUF	Unión RNA
4	GRMZM2G472096	Zm00001eb19214	LOC103633769	7	Agamous like MADS-box protein AGL29	MADS-box_SRF (serum response factor)	Unión DNA
5	GRMZM2G060516		LOC100275629	8	EMP16-empty pericarp 16 Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	PPR_Pentatricopeptide repeat	
6	GRMZM2G106560	Zm00001eb112840	LOC103648003	2	WRKY transcription factor 108	WRKY; DNA binding domain	Unión DNA
7	AC183950.2	FG004	Zm00001eb365110	8	Harpin induced protein (LEA)	LEA_2 (DUF1511)	
8	GRMZM2G181251	Zm00001eb409170	LOC100279192	10	Thioredoxin M1	LIM_bind	
9	GRMZM2G145825	Zm00001eb066590	LOC103648331	2	Uncharacterized protein LOC103648331	Zinc_ribbon_10	Predicted integral membrane zinc ribbon metal binding protein
10	GRMZM2G157679	Zm00001eb148290	LOC100279528	3	GRAS transcription factor 23	Gras domain	Unión DNA
11	GRMZM2G045270	Zm00001eb359800	LOC103636155	8	60S ribosomal protein L18a like protein	Glycoside hydrolase family 17	Metabolismo carbohidratos
12	GRMZM2G846916	Zm00001eb106410	LOC103647733	2	Glucan endo 1,3 beta glucosidase 7		
13	GRMZM2G073700	Zm00001eb279420	LOC100280521	6	RNA binding region containing protein 1	RRM_1_RRM_7_Nup35_RRM_Nup35_RRM_2	Unión RNA
14	GRMZM2G138382	Zm00001eb0653220	LOC103644282	1	Anthranilate synthase alpha subunit 1, chloroplast	Chorismate_bind Anth_synt_1_N	Sintasa
15	GRMZM2G104658	Zm00001eb434290	LOC100281808	10	Authphagy1t, serine/threonine protein kinase STY46	PK_Tyr_Ser-Thr_Pkinase ABC1_ACT_Pkinase_fungal_Pex14_N	Unión ATP
16	GRMZM2G028779	Zm00001eb365790	LOC103636408	8	Uncharacterized protein LOC103636408	RINGV_DUF3675_EGF_allinase	
17	GRMZM2G035256	Zm00001eb120460	LOC103649606	3	Lectin choleresterol acyltransferase like 1	LCAT_hydrolase_4_DUF3089_His_Phos_1_Abhydrolase_6_LIDHydrolase	Metabolismo lípidos
18	GRMZM2G078650	Zm00001eb082840	LOC100284615	2	Phospholipase C	TIR_2	Metabolismo lípidos
19	GRMZM2G030717	Zm00001eb364860	LOC100280555	8	Cystatin 10	SOAPI_Cystatin	Inhibidor proteasa
20	GRMZM2G025127	Zm00001eb209350	LOC100280731	4	Serine/threonine protein kinase OX32	PK_Tyr_Ser-Thr_Pkinase APH_DUF3439	Unión ATP
21	GRMZM2G118104	Zm00001eb178700	LOC100280946	4	Cleavage and polyadenylation specificity factor 5	NUDX_2_NUDIX	
22	GRMZM2G114276	Zm00001eb073370	LOC103646048	2	Probable LRR receptor like serine/threonine protein kinase precursor	LRR_8_LRR_4_Pkinase PK_Tyr_Ser-Thr_LRR_6_TCAD9_kinase_like	Unión ATP
23	GRMZM2G132019	Zm00001eb002550	LOC100277112	1	Uncharacterized protein LOC100277112	RRNT_2_DUF2207_APH	
24	GRMZM2G028969	Zm00001eb074750	LOC103648466	2	Ethylene responsive transcription factor ERF023	EF_hand_7_EF_hand_1_EF_hand_6_EF_hand_8_EF_hand_4	Unión iones calcio
25	GRMZM2G075368	Zm00001eb191130	LOC103654108	4	Ethylene receptor homolog 6/ etr6	AP2	Unión DNA
26	GRMZM2G153200	Zm00001eb146110	LOC103650940	3	Beta galactosidase 7	GAF_response_reg_HisKA_HATPase_c	Unión etileno
27	GRMZM2G170559	Zm00001eb240050	LOC103627097	5	bHLH transcription factor 72	Glyco_hydro_35_GDH_Gal_Lectin_Glyco_hydro_42_BetaGal_dom4_5	Metabolismo carbohidratos
	GRMZM2G701900		LOC103627097	5	bHLH transcription factor 72	Lactamase_B	
28	GRMZM2G102183	Zm00001eb079170	LOC10542252	2	mas-1 malate synthase 1	HLH_TlH2	Unión DNA
29	GRMZM2G102238	Zm00001eb079180	LOC100272300	2	Acid phosphatase/vanadium dependent haloperoxidase related	DUF212_PAP2	Metabolismo piruvato Peroxidasa

**Tabla 12.** (continuación) Listado de ochenta y seis genes candidatos de estar asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria en los 72 híbridos DTMA. Se incluye el número de asignación en las bases de datos de Maize GDB, Gramine y NCBI, la localización cromosómica, el nombre o sinónimo del gen, la familia de proteínas a la que pertenece si tiene (PFAM) y la actividad que ha sido reportada en la que se ha implicado. Datos asociados por GWAS con valor de  $p \geq 3,25$  y  $\geq 4.0$  usando el software TASSEL v.5.2.50 (Bradbury PJ., et al 2007; GAPIT R package Lipka et al., 2011 y GAPITSuper Wang et al., 2014) [53,61,79].

No.	Maize GDB	Gramine	NCBI	Chr	Nombre y símbolo del gen	Familia y sub-familia	Actividad
30	GRMZM2G169695	Zm00001eb368560	LOC100280849	2	Pyrobractin resistance like 2	Polyketide_cyc2	Defensa y traducción hormonal (ABA)
31	GRMZM2G145944	Zm00001eb097160	LOC103647321	2	pld12 phospholipase D12	PLD_C1 PLDc_PLDc_2	Metabolismo glicofosfolípidos
32	GRMZM2G6847599	Zm00001eb1314160	LOC100285835	7	Uncharacterized protein LOC100285835 (guanine nucleotide binding protein subunit gamma 3, plant)	Gamma; GGL domain	Procesos de señalización celular
33	GRMZM2G172320	Zm00001eb177360	LOC100285835	7	Uncharacterized protein LOC100285835 (guanine nucleotide binding protein subunit gamma 3, plant)	TAXI_N TAXI_C Asp	
34	GRMZM2G038046	Zm00001eb177360	LOC103653344	4	Aspartic proteinase nefenethin 1	BSD PH_TF IHH	Reparación
35	GRMZM2G0870572	Zm00001eb172700	LOC100193949	4	BSD transcription factor 3	DHO_dh Glu_synthase Dis	Metabolismo nucleótidos y aminoácidos
36	GRMZM2G181505	Zm00001eb253890	LOC100274265	5	Uncharacterized protein LOC100274265 dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP+)	RoboRhorin_1 Fib_alpha LgV	Biosíntesis y metabolismo carbohidratos
37	GRMZM2G032409	Zm00001eb002220	LOC100285254	1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase 67KDa subunit	Exe84_C Vps51 COG2 Gcd 10p Nr1f1	Trafico de membrana
38	GRMZM2G457534	Zm00001eb302800	LOC103632095	7	Exocyst complex component EXO84	GDP_Min_Dehyd Epimerase 3beta_HSD Polysac_synt_2 RmiD_sub_bind NAD_binding_10 NAD_binding_8	Metabolismo carbohidratos
39	GRMZM2G006632	Zm00001eb014110	LOC100304323	1	UDP arabinose 4 epimerase	zf-RING_2 zf_RING_11 zf-C3HC4_2 zf-rbx1 zf-C3HC4 zf-RING_5 zf-C3HC4_3 zf-ANAPC11	Inducción apoptosis
40	GRMZM2G449875	Zm00001eb319810	LOC103633095	7	Probable E3 ubiquitin protein ligase ATL44	IU_nuc_hydro	Hidrolasa
41	GRMZM2G134149	Zm00001eb127230	LOC100193643	3	Nucleoside N ribohydrolyase 2	Lipase_GDSL	Metabolismo lípido
42	GRMZM2G134178	Zm00001eb127240	LOC103649937	3	GDSL esterase/lipase AT1G33811	Peptidase_C1 Inhibitor_129 Peptidase_C1_2	Metabolismo proteínas
43	GRMZM2G038636	Zm00001eb314220	LOC542451	7	ccp2-cysteine protease 2	HMG_box HMG_box_2 Yoldates YABBY	Unión DNA asociado con cromosomas
44	GRMZM2G125648	Zm00001eb198700	LOC541952	4	rfd106 nucleosome/chromatin assembly factor D	B3	Unión DNA
45	GRMZM2G125598	Zm00001eb198710	LOC100272565	4	abi47 - ABI3-VPI-transcription factor 47	P450	Actividad monooxigenasa, unión a iones hierro
46	GRMZM2G181236	Zm00001eb043620	LOC100279598	1	putative cytochrome P450 superfamily protein	Auxin inducible	Respuesta a auxinas
47	GRMZM2G015049	Zm00001eb190310	LOC100381449	4	saur42 - small auxin up RNA42	START Homeodomain Homeobox_KN ZapB GHMP_kinases_N	Unión DNA
48	GRMZM2G386276	Zm00001eb151130	LOC103651123	3	hb118 - Homeobox-transcription factor 118	Suf DUF1951	
49	GRMZM2G088663	Zm00001eb042590	LOC103643333	1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	DNAJ Nitrate_red_dcl	Unión DNA
50	GRMZM2G059502	Zm00001eb040580	LOC100192597	1	chaperone protein dnaJ	Unión nucleótidos	
51	GRMZM2G017643	Zm00001eb083240	LOC100278053	2	uncharacterized LOC100278053	TRM Cons_hyponth95 ADH_zincM Methyltransf_31 Methyltransf_25 Met_50 PrmaA Methyltransf_11 MTS Methyltransf_24 Methyltransf_16	Unión RNA, Transferasas
52	GRMZM2G6858310	Zm00001d015086	LOC100274276	5	uncharacterized LOC100274276	FA_desaturase DUF1474	Unión nucleótidos
53	GRMZM2G056252	Zm00001eb252720	LOC100191328	5	fad2 - fatty acid desaturase2	PPP_2_PPR_PPR_3_PPR_1_PPR_long	
54	GRMZM2G386261	Zm00001eb151120	LOC103651122	3	pentatricopeptide repeat-containing protein AT1G69290	SNAKE_assoc	
55	GRMZM2G054811	Zm00001eb151530	LOC100272491	3	pentatricopeptide repeat-containing protein AT1G69290	K-box SRF-TF bZIP_1 ZapB KASH_CCD Stn1 AAA_22 Omph DUF6779	Unión nucleótidos
56	GRMZM2G316366	Zm00001eb245070	LOC541764	5	mads19 - MADS-transcription factor 19	IPPT IPT AAA_33 AAA_25 AAA_16 PhofH AAA_28	Unión nucleótidos
57	GRMZM2G116878	Zm00001eb062030	LOC103644233	1	ip16 - isopenemyl transferase6	MRP_L53	Metabolismo terpenoides
58	GRMZM2G111022	Zm00001eb237200	LOC100276733	5	uncharacterized LOC100276733		Ribosoma

**Tabla 12.** (final) Listado de ochenta y seis genes candidatos de estar asociados a la respuesta hidrotónica de la raíz primaria en los 72 híbridos DTMA. Se incluye el número de asignación en las bases de datos de Maize GDB, Gramine y NCBI, la localización cromosómica, el nombre o sinónimo del gen, la familia de proteínas a la que pertenece si tiene (PFAM) y la actividad que ha sido reportada en la que se ha implicado. Datos asociados por GWAS con valor de  $p \geq 3.25$  y  $\geq 4.0$  usando el software TASSEL v.5.2.50 (Bradbury P.J., et al 2007; GAPIT R package Lipka et al., 2011 y GAPITSuper Wang et al., 2014) [53,61,79].

No.	Maize GDB	Gramine	NCBI	Chr	Nombre y símbolo del gen	Familia y sub-familia	Actividad
59	GRMZM2G138252	Zm00001eb018070	LOC103641387	10	putative PWWP domain family protein	CAF1A AAA_23	Asociado a cromosoma
60	GRMZM2G17051	Zm00001eb304780	LOC103632188	7	chromatin assembly factor 1 subunit FSM	CHASE HATPase_c Response_reg HisKA	Señalización
61	GRMZM2G5833140	Zm00001eb216090	LOC732835	5	histidine kinase	MCM MCM_OB MCM_lid Mg_chelatase AAA_5 AAA MCM_N AAA_16 RuwB_N Vire AAA_3	Replicación DNA
62	GRMZM2G534116	Zm00001eb279300	LOC103631348	6	probable DNA helicase MCM9	Cyclin_N Cyclin_C	Ciclo celular
63	GRMZM2G140633	Zm00001eb315430	LOC100283538	7	cyclin delta-2	ROH1-like DUF677 BPS1	Actividad monoingenasa
64	GRMZM2G002898	Zm00001eb043640	LOC100192620	1	putative cytochrome P450 superfamily protein	FnsdA_AmudA	Metabolismo de carbohidratos
65	GRMZM2G424857	Zm00001eb370290	LOC100274074	8	uncharacterized LOC100274074-Acetamidase/Formamidase superfamily protein	AA_kinase Peptidase_577	Unión ATP, biosíntesis terpenoides
66	GRMZM2G424873	Zm00001eb370300	LOC100191244	8	uncharacterized LOC100191244-Isopentenyl phosphate kinase superfamily protein	Mn3_siv PQ-loop	Transporte de azúcares
67	GRMZM2G153358	Zm00001eb288410	LOC100281296	6	sweet1b - sugars will eventually be exported transporter2b	HP1_cloth_bdg ATG17-like Transcrip_act DUF1216	Unión DNA
68	GRMZM2G367330	Zm00001eb024836	LOC103642617	10	protein SRC2 homolog	RNase_H2-Yr279 Yr279_N	Replicación y reparación DNA
69	GRMZM2G388045	Zm00001eb314230	LOC100382002	7	gex1 - gamete expressed1	Hydrolase E1-E2_ATPase Hydrolase_3 DUF6553	Metabolismo, trosocinas
70	GRMZM2G148211	Zm00001eb079750	LOC100216620	2	ribonuclease H2 subunit B	DUF212 PAP2	Actividad peroxidasa
71	GRMZM2G099191	Zm00001eb226870	LOC100501494	5	hma2 - heavy metal ATPase2	DUF936	
72	GRMZM2G102238	Zm00001eb079180	LOC00280563	2	acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase related	DUF6633 SAP130_C	
73	GRMZM2G069476	Zm00001eb037300	LOC100275431	1	uncharacterized protein LOC100275431	Amino_oxidase NAD_binding_8 SWIRM Py_redox_2 DAO FAD_oxidoreductase FAD_binding_2 Alahb_PNT_C Th14 HI0933 like Py_redox FAD_binding_3 GIDA LSDAT_prok Rhv 2-Hacid_dh_C NAD_binding_9 Lycopene_cycl Shikimate_DH Py_redox_3 Thif Dnal_CXXCGXG Exotow-A_cataly	Unión a flavin adenine dinucleotide, actividad monoingenasa, modificación histonas
74	GRMZM2G175031	Zm00001eb118980	LOC100276603	3	uncharacterized protein LOC100276603	Zein-binding	Metabolismo glicerol
75	GRMZM2G019863	Zm00001eb074140	LOC100281678	2	flowering locus D	Lyase_aromatic	Metabolismo fenilalanina
76	GRMZM2G038801	Zm00001eb218270	LOC100276646	4	Dnal/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	Thioredoxin Thioredoxin_2 Thioredoxin_7 Redoxin Thioredoxin_8 Thioredoxin_9 OST3_OST6 AbpC-TSA kaib	
77	AC23885.L_FG001	Zm00001eb218460	LOC100277588	5	uncharacterized LOC100277588-Myosin-binding protein 7	Maelctln_like Kinase PK_Tyr_Ser-Thr LRR_8 LRR_4 LRR_6 LRR_1 ABC1 SKG6 Phinase_Jungal Pgsl	Unión ATP, biosíntesis terpenoides
78	GRMZM2G170692	Zm00001eb247670	LOC100381820	5	pa17 - phenylalanine ammonia lyase7	Af SRPB Roc Ras G-alpha Gr1_RagA MMR_HSR1_6PF2K	Transporte, unión a GTP y actividad GTPasa
79	GRMZM2G701204	Zm00001eb290740	LOC103630494	6	thioredoxin H5	Histone CBFD_MFYB_HMF_CENP-T_C THID-31kDa	Unión DNA, asociado con cromosomas
80	GRMZM2G701201	Zm00001eb290720	LOC100275543	6	Putative leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19230	Esterase Peptidase_59 Hydrolase_4 Chlorophyllase2 DH	Hidrolasa, Metabolismo
81	GRMZM2G157596	Zm00001eb291210	LOC100384428	6	ADP-ribosylation factor 2-like; uncharacterized protein LOC100384428	Abhydrolase_1 Chlorophyllase DUF915 PGAP1	Unión ATP
82	GRMZM2G158526	Zm00001eb291210	LOC542500	6	centH3 - centromeric histone H3	PK_Tyr_Ser-Thr Kinase WAK_assoc GUB_bind ABC1 APH	Hidrolasa, peptidasa e inhibidores
83	GRMZM2G046558	Zm00001eb363250	LOC100282053	8	esterase D	Hydrolase_4 Abhydrolase_1 DH Abhydrolase_6 DUF818 FSH1	
84	GRMZM2G144028	Zm00001eb360620	LOC100273535	8	rll8 - receptor-like protein kinase8	Peptidase_59 BAAT_C DUF1057	
85	GRMZM2G144021	Zm00001eb360610	LOC100285590	8	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	PCC	Unión ADN, regulador de transcripción
86	GRMZM2G086541	Zm00001eb428380	LOC103641941	10	AT-hook motif nuclear-localized protein 23		

**Tabla 13.** (Inicio) Listado de cuarenta y siete genes candidatos de estar asociados con elongación del mesocotillo en los 72 híbridos DTMA. Se incluye el número de asignación en las bases de datos de Maize GDB, Gramine y NCBI, la localización cromosómica, el nombre o sinónimo del gen, la familia de proteínas a la que pertenece si tiene (PFAM) y la actividad que ha sido reportada en la que se ha implicado. Datos asociados por GWAS con valor de  $p \geq 3,25$  y  $\geq 4.0$  usando el software TASSEL v.5.2.50 (Bradbury PJ., et al 2007; GAPIT R package Lipka et al., 2011 y GAPITSuper Wang et al., 2014) [53,61,79].

No.	Maize GDB	Gramine	NCBI	Chr	Nombre y símbolo del gen	Familia y sub-familia	Actividad
1	GRMZM2G305526	Zm00001eb012250	LOC100193025	1	lac11 - lacase11	Cu-oxidase_2 Cu-oxidase_3 Cu-oxidase	Oxidoreductasa, catabolismo de lignina
2	GRMZM2G086604	Zm00001eb007310	LOC103632043	1	CASP-like protein 5A2	CASP_dom ECH_1	Componentes de membrana
3	AC166636.1_FG008	Zm00001eb111390	LOC100281229	2	ras-related protein Rab-6A	Ras Rac Arf SRPRB GTP_EFTU Gtr1_RagA MMR_HSR1 AAA_7	Transporte, Unión a GTP, actividad GTPasa
4	GRMZM2G001247	Zm00001eb187310	LOC100281548	4	gras76 - GRAS-transcription factor 76	GRAS DUF1015	Unión DNA, factor de transcripción
5	GRMZM2G152703	Zm00001eb255960	LOC100277102	5	uncharacterized protein LOC100277102	DUF1685	
6	GRMZM2G313027	Zm00001eb255590	LOC100273763	5	uncharacterized protein LOC100273763	Phage_int_SAM_5	
7	GRMZM2G015784	Zm00001eb255600	LOC542519	5	peptidylprolyl isomerase	FKBP_C	Catalítica
8	GRMZM2G180211	Zm00001eb233290	LOC103628328	5	ALA-interacting subunit 3	CD50	Componentes de membrana
9	GRMZM2G067313	Zm00001eb232340	LOC100304423	5	exocyst subunit exo70 family protein G1	Exo70	Exocitosis, transporte de proteínas
10	GRMZM2G367431	Zm00001eb232330	LOC100500712	5	cnr11 - Cell Number Regulator11	PLAC8	
11	GRMZM2G099255	Zm00001eb226850	LOC100501364	5	Core-2/-branching beta-16-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	Branch	
12	GRMZM2G099413	Zm00001eb226840	LOC100275318	5	uncharacterized LOC100275318-DUF4228 domain protein	PADRE	
13	GRMZM2G062333	Zm00001eb284360	LOC100279753	6	DNA replication licensing factor MCM6	MCM MCM_OB MCM_lid MCM6_C MCM_N Mg_chelatase AAA_5 AAA_3 Sigma54_activat Lipoprotein_2	Unión ATP
14	GRMZM2G131609	Zm00001eb283410	LOC103630103	6	rlk4 - receptor-like protein kinase4	LRR_8 LRR_4 Pkinase PK_Tyr_Ser_Thr LRRNT_2 APH Kinase-like Pkinase_fungal	Procesos metabólicos primarios, actividad transferasas
15	GRMZM2G069162	Zm00001eb266800	LOC100501573	6	Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBAT31-uncharacterized protein LOC100501573	Ank_2 Ank_4 Ank_5 Ank_3 Ank_zf-C3HC4_3	Unión DNA, procesamiento RNAm
16	GRMZM2G075628	Zm00001eb259840	LOC100384540	6	ENHANCER OF AG-4 protein 2	CID PWWP CTK3	Corosomas y proteínas asociadas
17	AC212565.3_FG001	Zm00001eb336310	LOC103634846	8	histone H4	CENP_T_C TAF CENP_S Histone CBFD_NFYB_HMF Bromo_TP TF1ID-31kDa	
18	GRMZM2G320799	Zm00001eb356690	LOC03637334	8	uncharacterized protein At1g51745 isoform X2	PWWP	Componente de membrana
19	GRMZM2G150925	Zm00001eb003860	LOC100216943	1	UPF0496 protein	DUF677 RasGAP_C	Actividad proteasa
20	GRMZM2G147420	Zm00001eb093510	LOC103647124	2	uncharacterized LOC103647124-Ulp1 protease family C-terminal catalytic domain containing protein expressed	DUF5714	Actividad anti-porter
21	GRMZM2G066413	Zm00001eb122890	LOC103649694	3	phosphoenolpyruvate/phosphate translocator 3, chloroplastic	TPT EamA CPP1-like	Glucosiltransferasa
22	GRMZM2G066362	Zm00001eb122900	LOC100276684	3	alpha-1,3-mannosyltransferase	ALG3	Actividad proteasa-proteolisis
23	GRMZM2G060680	Zm00001eb136650	LOC100279940	3	Eukaryotic aspartyl protease family protein	TAXI_N TAXI_C Asp	Componente integral de membrana
24	GRMZM2G175031	Zm00001eb118980	LOC100276603	3	uncharacterized protein LOC100276603	DUF6633 SAP130_C	

**Tabla 13.** (final) Listado de cuarenta y siete genes candidatos de estar asociados con elongación del mesocotilo en los 72 híbridos DTMA. Se incluye el número de asignación en las bases de datos de Maize GDB, Gramine y NCBI, la localización cromosómica, el nombre o sinónimo del gen, la familia de proteínas a la que pertenece si tiene (PFAM) y la actividad que ha sido reportada en la que se ha implicado. Datos asociados por GWAS con valor de  $p \geq 3,25$  y  $\geq 4.0$  usando el software TASSEL v.5.2.50 (Bradbury P.J., et al 2007; GAPIT R package Lipka et al., 2011 y GAPITSuper Wang et al., 2014) [53,61,79].

No.	Maize GDB	Gramine	NCBI	Chr	Nombre y símbolo del gen	Familia y sub-familia	Actividad
25	GRMZM2G090963	Zm00001e0119060	LOC103649536	3	sina1 - seven in absentia1	Lipoxygenase PLAT	Metabolismo de lípidos
26	GRMZM2G156861	Zm00001e0144960	LOC541856	3	lox1 - lipoxygenase1	Glyco_hydro_35 GHD Gal_Lectin Glyco_hydro_42 BetaGal_dom4_5 Lactamase_B	
27	GRMZM2G153200	Zm00001e0146110	LOC103650940	3	beta-galactosidase 7		
28	GRMZM2G063473	Zm00001e01190190	LOC100194271	4	ap03 - accumulation of photosystem I_3	APO_RNA-bind	Unión RNA
29	GRMZM2G063464	Zm00001e01190200	LOC03654071	4	GDSL esterase/lipase At5g37690	Lipase_GDSL	Hidrolasa, acción sobre enlaces ester
30	GRMZM2G109383	Zm00001e0216260	LOC 542721	5	pgm2 - phosphoglucomutase2	PGM_PMM_I_PGM_PMM_III_PGM_PMM_II PGM_PMM_IV	Metabolismo de carbohidratos, unión a magnesio
31	GRMZM2G111022	Zm00001e0237200	LOC100276733	5	large subunit ribosomal protein L53	MRP_L53	
32	GRMZM2G010075	Zm00001e0238340	LOC103626987	5	transcription factor GTE4 isoform X1	BET Bromodomain UPF0240 TAF8_C DUF2868	
33	GRMZM2G093391	Zm00001e0277550	LOC541859	6	krp5 - kinesin-related protein5	Kinesin Microtub_bd CH	Crosqueleto, señalización
	GRMZM2G575566	Zm00001e0277550	LOC541859	6	protein OCTOPUS	DUF740	
34	GRMZM2G084899	Zm00001e0288720	LOC103630391	6	uncharacterized protein LOC100276620		
35	GRMZM2G076778	Zm00001e0315050	LOC100276620	7	uncharacterized protein LOC100276620	SCAI	Transcripción
36	GRMZM2G115304	Zm00001e0315760	LOC100278917	7	protein SCAI homolog	X8	
37	GRMZM2G154936	Zm00001e010728	LOC100284436	8	uncharacterized protein LOC100284436 isoform 1 precursor	DHDPS	Biosíntesis de metabolitos secundarios
38	GRMZM2G027835	Zm00001e0389290	LOC542379	9	dps1 - dihydrodipicolinate synthase1	PPR_3_PPR_2_PPR_PPR_1_PPR_long ECSIT	Unión RNAm
39	GRMZM2G092123	Zm00001e0397200	LOC103639281	9	Pentatricopeptide repeat-containing protein At5g02830, chloroplastic isoform X1	Hydrolase_6 Hydrolase_like Cytocrom_C552	
40	GRMZM2G030097	Zm00001e0397220	LOC 100285799	9	uncharacterized protein LOC100285799	Ribosomal_L10	
41	GRMZM2G030203	Zm00001e0397230	LOC100281347	9	large subunit ribosomal protein L10	Rep_fac-A_c REPA_OB_2 Rep-A_N tRNA_anti-codon DUF223 CDC24_OB3	Replicación DNA
42	GRMZM2G086934	Zm00001e0400180	LOC100273584	9	rfa1 - replication factor A homolog1	DUF538 Apoc1 DUF4279	
43	GRMZM2G113159	Zm00001e0400480	LOC100285567	9	uncharacterized protein LOC100285567	OPT	
44	GRMZM2G026391	Zm00001e0427720	LOC100273385	10	ysl3 - yellow stripe-like transporter3	PK_Tyr_Ser-Thr_GUB_WAK_bind Kinase	
45	GRMZM2G22582	Zm00001e0427960	LOC100281092	10	ATP binding protein precursor	AP2	Unión DNA
46	GRMZM2G104260	Zm00001e0432460	LOC103642141	10	ereb190 - AP2-EREBP-transcription factor 190		
47	GRMZM2G104199	Zm00001e0432470	LOC100275558	10	mkaku41 - Maize KAKU4-Like1		

Dando continuidad al análisis de los **172** SNPs mapeados para la respuesta hidrotópica de la raíz primaria se evidenció la presencia de 7 transiciones (4 purina/purina y 3 pirimidina/pirimidina) y 10 transversiones (4 purina/pirimidina y 6 pirimidina/purina) en la secuencia entre los híbridos DTMA de maíz clasificados con RH robusta y RH débil; los cuales, se localizaron fuera del marco abierto de lectura, aunque dentro del rango de aceptación de genes asociados (Tabla 14) [84-85].

**Tabla 14.** Clasificación de SNPs asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria en relación a variaciones mapeadas entre híbridos clasificados con RH robusta e híbridos con RH débil. Se incluye el cromosoma, la variación, la localización y el nombre del gen candidato de asociación por su proximidad al SNP asociado. (RNC: regiones no codificantes).

Transiciones						
#	Chr	Variación	Localización	Maize GDB	NCBI	Nombre
1	1	T C	209127422	GRMZM2G059502	LOC100192597	chaperone protein dnaJ
2	1	G A	291559401	GRMZM2G116878	LOC03644233	ipt6 - isopentenyl transferase6
3	2	G A	20097706	GRMZM2G028969	LOC103648466	ereb185 - AP2-EREBP-transcription factor 185
4	4	C T	74594661	GRMZM2G118104	LOC100280946	cleavage and polyadenylation specificity factor 5
5	5	T C	155096308	GRMZM2G170559	LOC103627097	bhlh72 - bHLH-transcription factor 72
6	5	A G	30191692	AC204435.2_FG001	N/A	transposable_element
7	6	A G	147913803	GRMZM2G153358	LOC100281296	sweet1b - sugars will eventually be exported transporter1b
				GRMZM2G153333	LOC103630377	gras69 - GRAS-transcription factor 69
Transversiones						
#	Chr	Variación	Localización	Maize GDB	NCBI	Nombre
1	2	A C	170876422	GRMZM2G145895	LOC100272300	Thioredoxin superfamily protein
			103647321	GRMZM2G145944	LOC103647321	pld12 - phospholipase D12
2	3	C A	140462435	GRMZM2G344339	LOC100278865	uncharacterized protein, protein of unknown function DUF688
3	3	T A	191195655	GRMZM2G054811	LOC100272491	Vacuole membrane protein KMS1; uncharacterized protein(P450)
4	4	C G	63911971	GRMZM2G038046	LOC103653344	Aspartic proteinase nepenthesin-1
5	4	C G	63911998			
6	4	C A	74594663	GRMZM2G118104	LOC100280946	cleavage and polyadenylation specificity factor 5
7	4	G C	228847273	RNC	RNC	RNC
8	5	T C	155096305	GRMZM2G170559	LOC103627097	bhlh72 - bHLH-transcription factor 72
9	5	A C	15956749	AC233885.1_FG001	LOC100277588	Myosin-binding protein 7 (GTD-binding domain)
10	6	G C	147913800	GRMZM2G153358	LOC100281296	sweet1b - sugars will eventually be exported transporter1b
				GRMZM2G153333	LOC103630377	gras69 - GRAS-transcription factor 69

Los genes asociados a la RH con transiciones en uno o más SNPs correspondieron a:

1. **La proteína chaperona DnaJ**, cuya acumulación en compañía de la proteína de choque térmico Hsp70 ha sido reportada en raíces de frijol sometido a condiciones de déficit hídrico por Colmenero-Flores *et al.*, (1997) [86-87].



2. **La Isopentenil transferasa 6 ipt6 (IPT)**, enzima relacionada con la biosíntesis de citocininas (CK) en plantas con repercusión indirecta sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz [88-89].
3. **El factor de transcripción ereb185-AP2-EREBP 185**, perteneciente a la familia de respuesta APETALA 2/etileno (AP2/EREBP) que se ha implicado en la señalización hormonal del azúcar y en actividades de oxido-reducción en respuesta a condiciones de estrés abiótico tales como el frío y la sequía [90].

Por su parte, las transversiones en uno o más SNPs se asociaron con los genes:

1. **Superfamilia de thio-redoxinas**, este diverso grupo de oxidoreductasas ha sido implicado en la escisión de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en proteínas blanco y como responsables de la homeostasis redox a base de tiol en los tejidos vegetales sometidos a condiciones de estrés abiótico. [91-92].
2. **Proteína de función desconocida con dominio conservado DUF688**, pertenece a una familia de proteínas aun no caracterizada y en la que se ha descrito a uno de sus miembros: At3g61840 en *Arabidopsis thaliana* con función putativa de respuesta a auxina por minería de datos en la plataforma ThaleMine (<https://www.bar.utoronto.ca/thalemine/begin.do>) [93-94].
3. **pId12 - fosfolipasa D12**, miembro de la familia más abundante de fosfolipasas que hidrolizan fosfolípidos para producir ácido fosfatídico y un grupo libre en plantas. Se ha descrito su participación en múltiples procesos de regulación en metabolismo lipídico, transducción de señales, muerte celular programada, crecimiento, desarrollo y en respuesta a varios estreses [95].
4. **Proteína de membrana de vacuola KMS1**, proteína probablemente transmembranal asociada con funciones tales como: autofagia, adhesión celular y el tráfico de membrana. [96]
5. **Proteinasa aspártica nepenthesin-1**, miembro de la segunda familia más abundante de proteasas vegetales. Las enzimas de esta familia se han implicado en funciones de procesamiento de proteínas de almacenamiento, re movilización de nitrógeno, reproducción, senescencia, muerte celular programada y respuesta a estrés biótico y abiótico [97]

**6. Proteína 7 de unión a miosina (GTD-binding domain)**, esta familia de proteínas actúan sobre las miosinas que son proteínas de unión a superficies externas de los orgánulos e interactúan con la proteína citoesquelética actina, que organiza y dirige el movimiento intracelular [98].

A su vez, se identificaron los dos tipos de clasificaciones de SNPs (transiciones y transversiones) en los siguientes cuatro genes:

- 1. El factor 5 específico de clivaje y poliadenilación**, este tipo de proteínas están involucradas en el procesamiento final del pre- RNA<sub>m</sub> y desempeñan un rol importante en la regulación de la selección de sitios poli(A) [99].
- 2. El factor de transcripción bHLH072 de unión a DNA**, este es un factor de transcripción tipo hélice-bucle-hélice. Sus ortólogos en eucariotas se relacionan con la producción y conversión de energía, localizándose en pared y membrana celular que han sido implicados en la biogénesis y en el metabolismo y transporte de nucleótidos [100].
- 3. Transportador bidireccional de azúcares sweet 1b**, miembro de la familia de transportadores tipo uniporters SWEET en plantas, cuyos genes se expresan dinámicamente bajo condiciones de estrés abiótico y facilitan la difusión de moléculas de azúcar a través de las membranas celulares. El azúcar es la principal fuente de energía en los organismos vivos y desempeña un rol crucial en procesos de regulación osmótica, señalización celular y almacenamiento de energía [101].
- 4. El factor de transcripción gras69**, miembro de una familia de factores de transcripción que actúan sobre la señalización de la giberelina y por ende se involucra en el desarrollo, crecimiento vegetal, traducción de la señales de fitocromo A y el mantenimiento meristemo apical y radical [73,102].

Con respecto a la elongación del mesocotilo, se identificaron 7 transiciones (2 purina/purina y 5 pirimidina/pirimidina) junto con 5 transversiones (1 purina/pirimidina y 4 pirimidina/purina) en los **90** SNPs asociados para el fenotipo. Estos se localizaron fuera del marco abierto de lectura, pero dentro del rango de aceptación de genes asociados (Tabla 11) [84-85].

**Tabla 15.** Clasificación de SNPs asociados con la elongación del mesocotilo en relación a variaciones mapeadas entre híbridos clasificados con EM alta y EM baja. Se incluye el cromosoma, la variación, la localización y el nombre del gen candidato de asociación por su proximidad al SNP asociado. (RNC: regiones no codificantes).

Transiciones							
#	Chr	Variación		Localización	Maize GDB	NCBI	Nombre
1	5	G	A	129344449	GRMZM2G541947	N/A	transposable_element
2	6	T	C	29745911	AC203242.3_FG002	N/A	Model Type: low_confidence
3	6	T	C	29745913			
4	6	T	C	29745945			
5	6	T	C	30191664	AC206660.4_FG010	N/A	Model Type: low_confidence
6	6	T	C	30191671			
7	6	A	G	30191692			

Transversiones							
#	Chr	Variación		Localización	Maize GDB	NCBI	Nombre
1	6	G	C	105080714	GRMZM2G575566	LOC541859	krp5 - kinesin-related protein5
2	6	C	A	29745903	AC203242.3_FG002	N/A	Model Type: low_confidence
3	6	T	G	29745910			
4	6	C	G	37902501	GRMZM2G069162	LOC100501573	E3 ubiquitin-protein ligase XB3
5	8	T	G	147066006	GRMZM2G317641	N/A	transposable_element

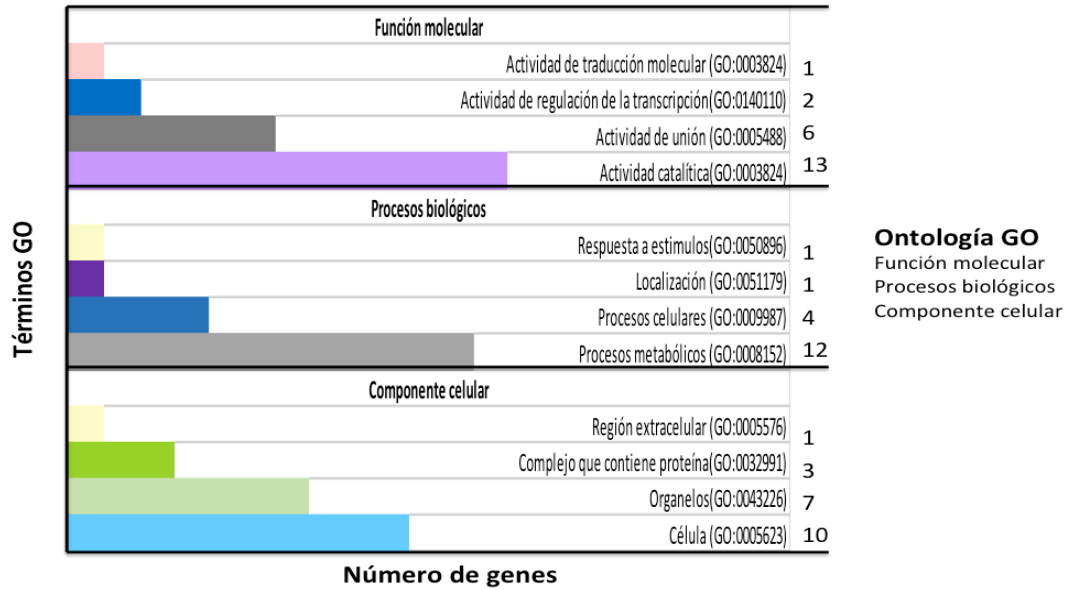
Las transiciones y transversiones identificadas para la EM se localizaron en su mayoría en el cromosoma 6; el cual, también corresponde al cromosoma con mayor abundancia de SNPs asociados y donde se encontraron genes de baja confianza, transposones y adicionalmente se identificaron los siguientes dos genes con transversiones:

- 1. Proteína relacionada con kinesina- krp5**, donde, las kinesinas han sido reconocidas como moléculas involucradas en la correcta localización espacio-temporal de organelos y motores que facilitan su movimientos en s cortas distancias a lo largo de los microtúbulos [103].
- 2. E3 ubiquitin-protein ligasa XB3**, este componente central del sistema de ubiquitinación cumple un rol crucial en la modulación de la respuesta de las plantas a condiciones de estrés abiótico a través de la unión y/o degradación a elementos reguladores. Se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* y en *Oryza sativa* su rol regulador en la señalización de ABA; hormona implicada en la respuesta en plantas a diversos estreses abióticos que incluyen: sequía, salinidad, alta temperatura y frío [104-105].

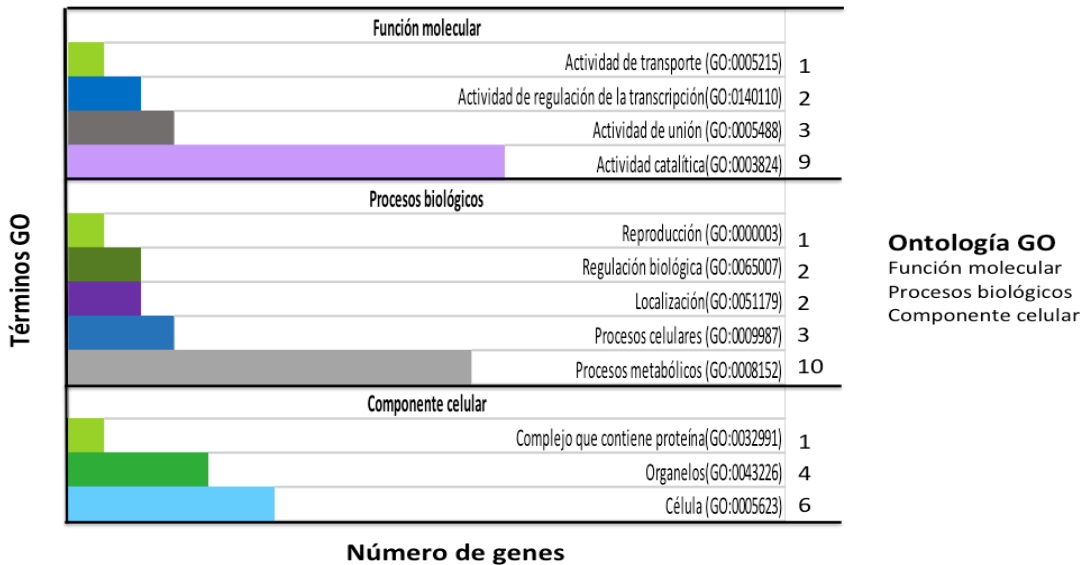
## 2.5. Identificación de genes asociados a los rasgos en estudio en términos genómicos (GO: terms)

Una vez identificados los genes asociados a los fenotipos se estableció su función molecular, biológica y localización celular en términos ontológicos usando las bases de datos: AmiGO 2 ([AmiGO2:Welcome \(geneontology.org\)](http://AmiGO2:Welcome_geneontology.org)), PANTHER 17.0 ([pantherdb.org](http://pantherdb.org)), Phytozome v13, the plant genomics resource (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) , KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>) y UniprotKB (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>); donde, mediante un análisis de enriquecimiento se predijo la función de los genes mediante alineamientos de las secuencias en árboles filogenéticos (*Go: terms*) (Figura 16) [106-107]. De este modo, los genes asociados a los fenotipos (RH: 86 y EM: 46) a través de los GWAS aplicados (TASSEL, GAPIT y GAPITsuper) se rastrearon en términos ontológicos; siendo, identificados claramente 44 genes para la RH y 29 genes para la EM con ausencia de información y/o caracterización de los genes restantes (RH:42 y EM:17). A partir de estos datos, se definió la actividad catalítica como la principal función molecular de los genes asociados a los dos fenotipos destacando las actividades de transferasas, hidrolasas, oxidorreductasas, liasas, ligasas e isomerasas en ese orden. En segundo lugar, se encontró las funciones de unión (ácidos nucleicos, iones calcio, etc.) y en tercer lugar los procesos de regulación de la transcripción y la traducción [108-109].

a. Respuesta hidrotrofica de la raíz primaria



b. Elongación del mesocotilo



**Figura 16. a.** Clasificación en términos ontológicos (*Go: terms*) de las funciones moleculares, biológicas y la localización de los genes asociados a la respuesta hidrotrofica de la raíz primaria para los 72 híbridos DTMA; **b.** Clasificación en términos ontológicos (*Go: terms*) de las funciones moleculares, biológicas y localización de genes asociados a la elongación del mesocotilo para los 72 híbridos DTMA de maíz. Se indica el número de genes asociados en cada categoría.

Adicionalmente, se encontraron genes con función de transporte relacionadas con la elongación del mesocotilo [106-107]. Por su parte, los procesos biológicos correspondieron a actividades metabólicas y procesos celulares sumados a actividades de respuesta a estímulos. En términos de localización, la abundancia de productos de los genes se ubicó a nivel de membrana celular, organelos, formando complejos con proteínas con una pequeña representación ubicada extracelularmente [107-108].

Los órganos analizados (raíz primaria y mesocotilo) en respuesta a las condiciones de estrés hídrico del ensayo; mostraron, elevada plasticidad y capacidad de ajuste; donde, a pesar de no compartir genes asociados entre los dos fenotipos, si describieron funciones moleculares, procesos biológicos y localizaciones similares en términos ontológicos [109-110].

## **2.6. Análisis de enriquecimiento con los genes asociados a los rasgos en estudio**

Los genes asociados a los rasgos de estudio (RH: 86 y EM:46) a través de GWAS se usaron para identificar redes de co-expresión estadísticamente significativas a través del co-análisis de componentes moleculares (CAMOCO) descrito por Schaefer et al., (2018); donde, a través del navegador web de co-expresión (COB), se realizó la consulta interactiva de genes asociados en redes del genoma completo sobre tres “datasets” para su análisis (ZmPAN: datos genómicos de diversos rasgos analizados en maíz; ZmROOT: datos genómicos de rasgos en raíz de maíz; ZmSAM: datos genómicos del atlas de tejidos de maíz) [111-115]. De esta forma, los genes asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria se conectaron y/o coexpresaron con 5147 genes perteneciente a la base de datos de ZmPAN, 3743 genes de la base de datos ZmSAM y 4150 genes de la base de datos ZmROOT a diferentes niveles y donde las actividades con mayor significancia estadística ( $p \text{ valor} \leq 0.05$ ) en términos de GO correspondió a lo descrito a continuación:

**ZmPAN:**

<b>ID</b>	<b>P Valor</b>	<b>Nombre</b>
GO:0006928	0.01487928	Movimiento de componentes celulares y subcelulares
GO:0006298	0.01967957	Reparación de no coincidentes
GO:0030983	0.01967957	Unión de DNA no coincidente
GO:0016485	0.023305346	Procesamiento de proteínas
GO:0051604	0.023305346	Maduración proteínas
GO:0007018	0.02838545	Movimiento basado en microtúbulos
GO:0003690	0.044966915	Unión a DNA de doble cadena
GO:0008081	0.049036645	Actividad de la hidrolasa fosfórica
GO:0006558	0.049930294	Procesos metabólicos L-fenilalanine Eritrosa 4-fosfato/fosfoenolpiruvato
GO:1902221	0.049930294	Procesos metabólicos de familias de aminoácidos

**ZmSAM:**

<b>ID</b>	<b>P Valor</b>	<b>Nombre</b>
GO:0008081	0.003603285	Actividad hidrolasa fosfórico diester
GO:0008889	0.014178621	Actividad glicerol fosfodiéster y fosfodiéster
GO:0006071	0.016587367	Procesos metabólicos glicerol
GO:0019400	0.016587367	Procesos metabólicos alditol
GO:0006066	0.025260892	Procesos metabólicos alcohol
GO:0004185	0.039931475	Actividad carboxipeptidasa tipo serina
GO:0070008	0.039931475	Actividad exopeptidasa tipo serina
GO:0019751	0.048646104	Procesos metabólicos poliol

**ZmROOT:**

<b>ID</b>	<b>P Valor</b>	<b>Nombre</b>
GO:0006207	0.017660453	Procesos biosintéticos pirimidina 'de novo'
GO:0006206	0.026161522	Procesos metabólicos pirimidina
GO:0019856	0.026161522	Procesos biosintéticos pirimidina
GO:0032502	0.041410587	Procesos de Desarrollo
GO:0044767	0.041410587	Procesos de desarrollo de un solo organismo
GO:0006260	0.041934462	Replicación del DNA

Por su parte, los genes asociados a la elongación del mesocotilo se conectaron y/o coexpresaron con 6353 genes perteneciente a la base de datos de ZmPAN, 2421 genes de la base de datos ZmSAM con los siguientes resultados:

**ZmPAN:**

<b>ID</b>	<b>P Valor</b>	<b>Nombre</b>
GO:0008471	0.013386118	Actividad lacasa obsoleta
GO:0009698	0.013386118	Procesos metabólicos fenilpropanoides
GO:0009808	0.013386118	Procesos metabólicos lignina
GO:0046271	0.013386118	Procesos catabólicos fenilpropanoides
GO:0046274	0.013386118	Procesos catabólicos lignina
GO:0019748	0.030063233	Procesos metabólicos secundarios
GO:0006260	0.042155772	Replicación del ADN

**ZmSAM:**

<b>ID</b>	<b>P Valor</b>	<b>Nombre</b>
GO:0034357	0.005727374	Membrana fotosintética
GO:0042651	0.005727374	Membrana tilacoidal
GO:0005199	0.023686104	Componente estructural de la pared
GO:0051213	0.035014892	Actividad dioxigenasa
GO:0044436	0.036510193	Parte del tilacoide
GO:0006643	0.042200942	Procesos metabólicos lipídicos de membrana

Se exploraron posibles redes funcionales con genes de la base de datos ZmROOT específica para rasgos en raíz encontrando 4898 genes relacionados y donde las funciones estadísticamente significativas correspondieron a lo descrito a continuación.

**ZmROOT:**

<b>ID</b>	<b>P Valor</b>	<b>Nombre</b>
GO:0015491	0.024230763	Actividad antiporter catión: catión
GO:0046912	0.030284066	Actividad transferasa, transferencia de grupos acil y alquilo

Las bases de datos implementadas por la herramienta de co-expresión (COB), al contener información específica para maíz, permitió corroborar y definir el grado de significancia estadística de los datos obtenidos en términos ontológicos en relación con las funciones moleculares, biológicas y de localización de los genes asociados a los fenotipos en estudio y su relación con otros genes con los cuales tiene el potencial de formar redes funcionales [111-115]. De esta forma, se encontraron los genes asociados a los fenotipos involucrados con procesos biosintéticos, metabólicos y enzimáticos de



elementos propios de pared celular, membranas y movimiento celulares. Al igual que hay actividades de replicación, reparación y mantenimiento de ácidos nucleicos que ya han sido descritas en otros estudios en maíz como respuesta a condiciones de estrés hídrico que muy probablemente favorecen la resistencia a este estrés y brindan continuidad a procesos de crecimiento y desarrollo vegetal con mediación de hormonas vegetales [116-119].

Cabe resaltar la necesidad de establecer perfiles de expresión génica través de metodologías de cuantificación y secuenciación fina que permitan corroborar los resultados obtenidos para avanzar en nuestra comprensión de estos dos rasgos complejos en maíz y que puedan ser usados como predictores y/o potenciales marcadores en el mejoramiento vegetal.

### Capítulo III. Referencias

1. Sáenz-Rodríguez, M.N & Cassab, G.I. (2021). Assay system for mesocotyl elongation and hydrotropism of maize primary root in response to low moisture gradient. *BioTechniques* 71(4): 516-527.
2. Hawkins, H.J., Hettasch, H., West, A.G., Cramer, M.D. (2009). Hydraulic redistribution by Protea “Sylvia” (Proteaceae) facilitates soil water replenishment and water acquisition by an understorey grass and shrub. *Funct Plant Biol* 36(8): 752–760.
3. Cooper, J.D. (2016). Soil Water Measurement: A Practical Handbook. Wiley, NJ, USA.
4. FAUBA. (2004). Catedra de Fisiología Vegetal. Las plantas y el agua. CEABA. 12 p.
5. Eapen, D., Martínez, J.J., Cassab, G.I. (2015). Assays for root hydrotropism and response to water stress. In: Blancaflor EB, ed. Plant gravitropism: methods and protocols. New York. Springer New York, pp. 133-142. [https://doi.org/ 10.1007/978-1-4939-2697-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8_11).
6. Scholander, P. F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A., Hammel, H.T. (1965). Sap pressure in vascular plants. Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339-346.
7. Squeo, F.A. (2007). El Agua y el Potencial Hídrico. En: Fisiología vegetal. Squeo F.A. y L. Cardemil eds. Ediciones Universidad de La Serena.
8. Castro-Camus, E., Palomar, M., Covarrubias, A. (2013). Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored in-vivo using terahertz time-domain spectroscopy. *Sci. Rep.* 3:2910.
9. Martínez-Guadarrama, J.J. (2019). Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotropica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS). [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)]. Repositorio UAEM, Cuernavaca-México.
10. Eapen, D., Martínez, J.J., Hernández, O., et al. (2017). Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Sci* 265:87-99. [https://doi.org /10.1016/j.plantsci.2017.09.016](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.016).
11. Nieto-Sotelo, J., Cassab, G.I., Eapen D., et al. (2012). Informe técnico final del proyecto IMIC-2011-008: “Descripción de caracteres hidrotropicos y del desarrollo y crecimiento del mesocotilo y de las raíces adventicias en razas y líneas de maíz.
12. Carrasco-Sánchez, J. (2017). Respuesta al estrés hídrico en plantas mediterráneas. Perspectiva frente al cambio climático. [Tesis de Pregrado. Universidad Complutense]. Repositorio, Facultad de Farmacia. Madrid- España.
13. Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agron Colomb* 27(2):179-191. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012099652009000200006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012099652009000200006&lng=en&tlng=es)
14. Kalra, Y.P. (1998). Handbook of reference methods for plant analysis. *Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA*, p.300.
15. Sadzawka, A., et al. (2004). Métodos de análisis de tejidos vegetales. CNA-Comisión de normalización y acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del suelo. Chile.
16. Chen, T.H & Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Biotech* 5: 250-257.
17. Bartels, D & Sunkar, R. (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants, Critical Reviews in *Plant Sci* 24(1):23-58. [https://doi.org/ 10.1080/07352680590910410](https://doi.org/10.1080/07352680590910410).
18. Azcón-Bieto, J & Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal 2ªEd. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., Madrid.
19. Rodríguez-Pérez, L. (2006). Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agron Colomb* 24(1): 28–37. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/20003>

20. Bartels, D & Ramanjulu, S. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sci* **24**: 23-58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>
21. Arronte C. Bioquímica clínica especializada. Manual de prácticas. Facultad de bioanálisis campus Xalapa. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.2004.
22. López E. (2018). Crecimiento en suelos salitrosos de *Nicotiana tabacum* modificada con el gen ARO4 de la levadura halotolerante *Dabaryomyces hansenii*. [Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Los Reyes Iztacala. Edo. México-México.
23. Johanson, J.G. & Cheeseman, J.M. (1983). Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings. I. The role of the mesocotyl in "sodium exclusion". *Plant Physiol* **73**: 153-158.
24. Johanson, J.G., Enkoji, C., Cheeseman. (1983). Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings. II. Distribution between stele and cortex of ions absorbed from the transpiration stream. *Plant Physiol* **73**:159-164.
25. Aleman, F. (2009). Crecimiento en suelos salitrosos de *Nicotiana tabacum* modificada con el gen ARO4 de la levadura halotolerante *Dabaryomyces hansenii*. [Tesis Doctoral. Universidad de Murcia (CEBAS-CSIC)]. Repositorio Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-Nutrición Vegetal. Murcia-España.
26. Premachandra, G.S., Saneoka, H., Ogata, S. (1991). Cell membrane stability and leaf water relations as affected by potassium nutrition of water-stressed maize. *J Exp Bot* **42**: 739-45.
27. Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci* **14**(4):7370-7390. <https://doi.org/10.3390/ijms14047370>.
28. Chen, H & Jian-Guo, J. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ Rev* **18**: 309-319. <https://doi.org/10.1139/A10-014>.
29. Munns, Rana. (2002). Munns, R.: Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant Cell Environ* **28**: 239-250. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>.
30. Smirnoff, N Crawford, R.M.M. (1983). Variation in the Structure and Response to Flooding of Root Aerenchyma in some Wetland Plants. *Ann Bot* **51**(2): 237–249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086462>
31. Mano, Y., Omori, F., Muraki, M., & Takamizo, T. (2005). QTL mapping of adventitious root formation under flooding conditions in tropical maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Breeding Sci* **55**: 343–347.
32. Striker, G.G. (2008). Visiting the methodological aspects of flooding experiments: Quantitative evidence from agricultural and ecophysiological studies. *J Agron Crop Sci* **194**: 249–255.
33. Yamauchi, T., Noshita, K., Tsutsumi, N. (2021). Climate-smart crops: key root anatomical traits that confer flooding tolerance. *Breeding Sci* **71**(1): 51–61. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.20119>.
34. Chimungu, J. G., Maliro, M. F. A., Nalivata, P. C., et al. (2015). Utility of root cortical aerenchyma under water limited conditions in tropical maize (*Zea mays* L.). *Field Crops Res* **171**: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.10.009>.
35. Schneider, H.M., Klein, S.P., Hanlon, M.T., et al. (2020). Genetic control of root anatomical plasticity in maize. *Plant Genome* **13**(1): e20003. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20003>.
36. Lynch, J.P. (2015). Root phenes that reduce the metabolic costs of soil exploration: opportunities for 21st century agriculture. *Plant Cell Environ* **38**: 1775-1784.
37. Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci* **5**:537–542.
38. Burton, A.L., Lynch. J.P., Brown, K.M. (2012). RootScan: Software for high-throughput analysis of root anatomical traits. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1138-2>.

39. Zhao, J., Xiue, Q., Jessup, K.E., et al. (2018). Shoot and root traits in drought tolerance maize (*Zea mays* L.) hybrids. *J Integr Agric* **17**(5):1093-1105.
40. Zhan, A., Liu, J., Yue, S., et al. (2019). Architectural and anatomical responses of maize roots to agronomic practices in a semi-arid environment. *J Plant Nutr Soil Sci* **182**:751-762.
41. Speer, E.O. (1987). A method of retaining phloroglucinol proof of lignin. *Stain Technol* **62**: 279-280. <https://doi.org/10.3109/10520298709108008>.
42. Klein, S., Reeger, J. E., Shawn, K., et al. (2020). Shared genetic architecture underlying root metaxylem phenotypes under drought stress in cereals. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.02.365247v2>.
43. Roberts, K., McCann, M.C. (2000). Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol* **3**(6):517-522. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00122-9).
44. Schuetz, M., Smith, R., Ellis, B. (2013). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J Exp Bot* **64**(1):11–31. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.365247>.
45. Liu, W., et al. (2020). Lignin synthesized by *CmCAD2* and *CmCAD3* in oriental melon (*Cucumis melo* L.) seedlings contributes to drought tolerance. *Plant Mol Biol* **103**:689-704. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01018-7>.
46. Alvarez, S., et al. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell Environ* **31**(3):325-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01770.x>.
47. Bang, S.W., et al. (2022). Transcriptional activation of rice CINNAMOYL-CoA REDUCTASE 10 by OsNAC5, contributes to drought tolerance by modulating lignin accumulation in roots. *Plant Biotechnol J* **20**(4):736-747. <https://doi.org/10.1111/pbi.13752>.
48. Hu, Y., et al. (2009). Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves. *J Appl Genet* **50**(3):213-23. <https://doi.org/10.1007/BF03195675>.
49. Hao, L., et al. (2020). Genome-wide identification and comparative analysis of drought related genes in roots of two maize inbred lines with contrasting drought tolerance by RNA sequencing. *J Integr Agric* **19**(2):449-464. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62660-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62660-2).
50. Schopfer, P., Lapiere, C., Nolte, T. (2001). Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: Mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification. *Physiol Plant* **111**: 83–92. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110111.x>.
51. Wang, N., et al. (2020). Applications of genotyping-by-sequencing (GBS) in maize genetics and breeding. *Sci Rep* **10**:16308. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73321-8>.
52. Vasquez, L. (2018). Estudios de asociación genómica (GWAS) relacionados a la elongación del mesocotilo en maíz y su validación mediante análisis de ligamiento de genes candidatos [Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio UNAM-CU/CDMX, México.
53. Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D.E., et al. (2007). [TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples](https://www.maizegenetics.net/tassel). *Bioinformatics* **23**:2633-2635. <https://www.maizegenetics.net/tassel>. [Maize Genetics | TASSEL](https://www.maizegenetics.net/tassel).
54. Tabangin, M. E., Woo, J. G., Martin, L. J. (2009). The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. *BMC proceedings*, **3** Suppl 7(Suppl 7), S41. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-3-S7-S41>.
55. Turner, S., Armstrong, L. L., Bradford, Y., et al. (2011). Quality control procedures for genome-wide association studies. *Current protocols in human genetics, Chapter 1*, Unit1.19. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0119s68>.
56. Crossa, J., et al. (2013). Genomic prediction in maize breeding populations with genotyping-by-sequencing. *G3 (Bethesda)* **3**(11):1903-26. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008227>.
57. Soto-Cerda, B. J., & Cloutier, S. (2012). Association mapping in plant genomes. *Genetic Diver Plants*. 29–54.
58. Uffelmann, E., Huang, Q.Q., Munung, N.S. et al. (2021). Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers* **1**: 59. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>.

59. Xiao, Y., Liu, H., Wu, L., et al. (2017). Genome-wide Association Studies in Maize: Praise and Stargaze. *Mol Plant* **10**(3):359-374. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.008>.
60. Shikha, K., Shahi, J.P., Vinayan, M.T., et al. (2021). Genome-wide association mapping in maize: status and prospects. *Biotech* **11**(5):244. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02799-4>.
61. Lipka, A.E., Tian, F., Wang, Q., et al. (2012). GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics* **28**(18):2397-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts444>.
62. Cairns, J. E., Crossa, J., Zaidi, P. H. (2013). Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Sci* **53**(4):1335–1346.
63. Gowda, M., Das, B., Makumbi, D., et al. (2015). Genome-wide association and genomic prediction of resistance to maize lethal necrosis disease in tropical maize germplasm. *Theor Appl Genet* **128**:1957–1968. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2559-0>.
64. Gao, X., Becker, L.C., Becker, D.M. (2010), Avoiding the high Bonferroni penalty in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol.* <https://doi.org/10.1002/gepi.20430>.
65. Kaler, A.S., Purcell, L.C. (2019). Estimation of a significance threshold for genome-wide association studies. *BMC Genomics* **20**:618. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5992-7>.
66. Chen, Y., Hao, X., Cao, J. (2014). Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: identification, evolution, and its phylogenetic comparison with Arabidopsis, rice, and sorghum. *J Integr Plant Biol* **56**(2):133-50. <https://doi.org/10.1111/jipb.12127>.
67. Wang, P., Lu, S., Xie, M., et al. (2020). Identification and expression analysis of the small auxin-up RNA (SAUR) gene family in apple by inducing of auxin. *Gene* **5**(750):144725. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144725>.
68. Chuang, H.W., Hamrak, A., Chen, Y.C., Hsu, C.M. (2010). A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* **402**(2):414-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>.
69. Li, X., Cao, J. (2016). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Gene Family in Maize: Identification, Evolution, and Expression Profiles. *Plant Mol Biol Rep* **34**: 15–28. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0901-y>.
70. Nagaraju, M., Palakolanu, S., Anil K., et al. (2018). Genome-wide in silico analysis of dehydrins in *Sorghum bicolor*, *Setaria italica* and *Zea mays* and quantitative analysis of dehydrin gene expressions under abiotic stresses in *Sorghum bicolor*. *Plant Gene* **13**: 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.01.004>.
71. Hall, A. (1993). Ras-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **5**(2):265-8. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90114-6](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90114-6).
72. Chen, D., He, L., Lin, M., et al. (2021). A ras-related small GTP-binding protein, RabE1c, regulates stomatal movements and drought stress responses by mediating the interaction with ABA receptors. *Plant Sci* **306**:110858. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110858>.
73. Guo, Y., Wu, H., Li, X., et al. (2017) Identification and expression of *GRAS* family genes in maize (*Zea mays* L.). *PLoS ONE* **12**(9): e0185418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185418>.
74. Guo, M., Rupe, M.A., Zinselmeier, C., et al. (2004). Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell* **16**(7):1707-16. <https://doi.org/10.1105/tpc.022087>.
75. Yang, J., Mezouk, S., Baumgarten, A., et al. (2017). Incomplete dominance of deleterious alleles contributes substantially to trait variation and heterosis in maize. *PLoS Genet* **13**: e1007019.
76. Liu, N., Du, Y., Warburton, M. L., et al. (2021). Phenotypic Plasticity Contributes to Maize Adaptation and Heterosis. *Mol Biol Evol* **38**(4):1262-1275. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa283>.
77. Fultona, T & Koebner, R.(2018). Mejoramiento de plantas. Conceptos y métodos. Cornell University. Crop Gen International, UK. The IntegratedBreeding Platform (IBP) [Online]. Disponible. En: <https://www.integratedbreeding.net/>.



78. Olukolu, B.A., Wang, G.F., Vontimitta, V., et al. (2014). A Genome-Wide Association Study of the Maize Hypersensitive Defense Response Identifies Genes That Cluster in Related Pathways. *PLoS Genet* **10**(8): e1004562. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004562>.
79. Wang, J., Zhang, Z. (2021). GAPIT Version 3: Boosting Power and Accuracy for Genomic Association and Prediction. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **19**(4):629-640. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.08.005>.
80. Woodhouse, M.R., Cannon, E.K., Porywood, J.L., et al. (2021). A pan genomic approach to genome databases using maize as a model system. *BMC Plant Biol* **21**: 385. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03173-5>.
81. Tello-Ruiz, M.K, Naithani, S., Gupta, P., et al. (2021). *Gramene 2021: Harnessing the power of comparative genomics and pathways for plant research*. *Nucleic Acids Res* **49**(D1): D1452-D1463. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa979>.
82. Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40** (D1): D1178-D1186.
83. Zdobnov, E.M., et al. (2020). OrthoDB in 2020: evolutionary and functional annotations of orthologs. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1009>.
84. Rafalski, A & Tingey, S. (2008). SNPs and their use in maize. *CABI Books*. CABI International. <https://doi.org/10.1079/9781845933821.0030>.
85. Jukes, T.H. (1987). Transitions, transversions, and the molecular evolutionary clock. *J Mol Evol* **26**(1-2):87-98. <https://doi.org/10.1007/BF02111284>.
86. Pulido, P., Leister, D. (2018). Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **217**(2):480-490. <https://doi.org/10.1111/nph.14827>.
87. Colmenero-Flores, J. M., Campos, F., Garcarrubio, A., Covarrubias, A.A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* **35**(4):393-405. <https://doi.org/10.1023/a:1005802505731>.
88. Ma, Q.H., Liu, Y.C. (2009). Expression of isopentenyl transferase gene (ipt) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Rep* **28**(11):1759-65. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0776-1>.
89. Merewitz, E.B., Gianfagna, T., Huang, B. (2011). Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis. *J Exp Bot* **62**(15):5311-33. <https://doi.org/10.1093/jxb/err166>.
90. Kizis, D., Lumberras, V., Pagès, M. (2001) Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett* **498**(2-3):187-9. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02460-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02460-7).
91. Sytykiewicz, H., Łukasik, I., Goławska, S., et al. (2020). Expression of Thioredoxin/Thioredoxin Reductase System Genes in Aphid-Challenged Maize Seedlings. *Int J Mol Sci* **21**(17):6296. <https://doi.org/10.3390/ijms21176296>.
92. Liu, Q., Liu, H., Gong, Y., et al. (2017). An Atypical Thioredoxin Imparts Early Resistance to Sugarcane Mosaic Virus in Maize. *Mol Plant* **10**(3):483-497. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.02.002>.
93. Krishnakumar, V., Contrino, S., Cheng, C.Y., et al. (2017). ThaleMine: A Warehouse for Arabidopsis Data Integration and Discovery. *Plant Cell Physiol* **58**(1): e4. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw200>.
94. Pasha, A., et al. (2020). Araport Lives: An Updated Framework for Arabidopsis Bioinformatics. *Plant Cell* **32**(9):2683-2686.
95. Exton, J.H. (2000). Phospholipase D. *Ann N Y Acad Sci* **905**:61-8. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06538.x>.
96. Calvo-Garrido, J., Carilla-Latorre, S., Escalante, R. (2008). Vacuole membrane protein 1, autophagy and much more. *Autophagy* **4**(6):835-7. <https://doi.org/10.4161/auto.6574>.

97. Bekalu, Z.E., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, A.H. (2020). Molecular Properties and New Potentials of Plant Nepenthesins. *Plants (Basel)* **c9**(5):570. [https://doi.org/ 10.3390/plants9050570](https://doi.org/10.3390/plants9050570).
98. Shimmen, T., Ridge, R., Lambiris, I., et al. (2000). Plant myosin. *Protoplasma* **214**:1-10. <https://doi.org/10.1007/BF02524256>.
99. Kim, S., Yamamoto, J., Chen Y., et al. (2010). Evidence that cleavage factor Im is a heterotetrameric protein complex controlling alternative polyadenylation. *Genes Cells* **15**: 1003-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01436.x>.
100. Li, Z., Liu, C., Zhang, Y., et al. (2019). The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* **70**(19):5471-5486. [https://doi.org/ 10.1093/jxb/erz307](https://doi.org/10.1093/jxb/erz307).
101. Gautam, T & Gahlaut, V & Jaiswal, V & Zinta, G. (2022). Emerging Roles of SWEET Sugar Transporters in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Cells* **11** <https://doi.org/10.3390/cells11081303>.
102. Leng, P., Zhao, J. (2020). Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize. *Theor Appl Genet* **133**(5):1455-1465. [https://doi.org/ 10.1007/s00122-019-03494-y](https://doi.org/10.1007/s00122-019-03494-y).
103. Ali, I & Yang, W. (2020). The functions of kinesin and kinesin-related proteins in eukaryotes. *Cell Adh Migr* **14**:139-152. [https://doi.org/ 10.1080/19336918.2020.1810939](https://doi.org/10.1080/19336918.2020.1810939).
104. Yang, Q., Zhao, J., Chen, D., Wang, Y. (2021). E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed* **2**(1):23. <https://doi.org/10.1186/s43556-021-00043-2>.
105. Yang, L., Wu, L., Chang, W., et al. (2018). Overexpression of the maize E3 ubiquitin ligase gene ZmAIRP4 enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* **123**:34-42. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.017>.
106. Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., et al. (2009). AmiGO Hub; Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**(2):288-9. [https://doi.org/ 10.1093/bioinformatics/btn615](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn615).
107. Kanehisa, M & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **28**:27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
108. The UniProt Consortium. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* **49**: D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
109. Kano, M., Inukai, Y., Kitano, H. et al. (2011). Root plasticity as the key root trait for adaptation to various intensities of drought stress in rice. *Plant Soil* **342**: 117–128. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0675-9>
110. Zhao, J., Qing-wu, X, Kirk, E. J., et al. (2018). Shoot and root traits in drought tolerant maize (*Zea mays* L.) hybrids. *J Integr Agric* **17** (5): 1093-1105. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61869-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61869-0).
111. Schaefer, R.J., Michno, J.M., Jeffers, J., et al. (2018). Integrating Coexpression Networks with GWAS to Prioritize Causal Genes in Maize. *Plant Cell* **30**(12):2922-2942. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00299>.
112. Hirsch, C.N., Foerster, J.M., Johnson, J.M., et al. (2014). Insights into the maize pan-genome and pan-transcriptome. *Plant Cell* **26**(1):121-35. [https://doi.org/ 10.1105/tpc.113.119982](https://doi.org/10.1105/tpc.113.119982).
113. Stelpflug, S.C., Sekhon, R.S., Vaillancourt, B., et al. (2016). An Expanded Maize Gene Expression Atlas based on RNA Sequencing and its Use to Explore Root Development. *Plant Genome* **9**(1). [https://doi.org/ 10.3835/plantgenome2015.04.0025](https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025).
114. Baxter, I. (2010). Ionomics: The functional genomics of elements. *Brief Funct Genomics* **9**(2):149-56. [https://doi.org/ 10.1093/bfgp/elp055](https://doi.org/10.1093/bfgp/elp055).
115. Baxter, I., Dilkes, B.P. (2012). Elemental profiles reflect plant adaptations to the environment. *Sci* **336**(6089):1661-3. <https://doi.org/10.1126/science.1219992>.
116. Schaefer, R. J, Briskine, R., Springer, N.M., Myers, C.L. (2014). Discovering functional modules across diverse maize transcriptomes using COB, the Co-expression Browser. *PLoS One* **9**(6): e99193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099193>.

117. Liu, W., Li, S., Zhang, C., et al. (2021). Identification of Candidate Genes for Drought Tolerance at Maize Seedlings Using Genome-Wide Association. *Iran J Biotechnol* **19**(3): e2637. [https://doi.org/ 10.30498/ijb.2021.209324.2637](https://doi.org/10.30498/ijb.2021.209324.2637).
118. Zenda, T., Liu, S., Wang, X., ET AL. (2019). Key Maize Drought-Responsive Genes and Pathways Revealed by Comparative Transcriptome and Physiological Analyses of Contrasting Inbred Lines. *Int J Mol Sci* **20**(6):1268. [https://doi: 10.3390/ijms20061268](https://doi:10.3390/ijms20061268).
119. Zhang, Q., Liu, H., Wu, X. et al. (2020). Identification of drought tolerant mechanisms in a drought-tolerant maize mutant based on physiological, biochemical and transcriptomic analyses. *BMC Plant Biol* **20**: 315. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02526-w>.



## CAPITULO IV. DISCUSIÓN

Este estudio tuvo como propósito “*identificar genes asociados con la respuesta hidrotropica de la raíz primaria y la variación en la elongación del mesocotilo en híbridos DTMA de maíz bajo condiciones de estrés hídrico*”. En especial, se pretendió encontrar genes comunes o su participación en actividades biológicas asociadas a las respuestas de los órganos en estudio frente a la escasez de agua y cuyo potencial permitiera considerar su uso en planes de mejoramiento vegetal.

A continuación, se discutirán los principales hallazgos de este estudio.

### 1. Fenotipificación

La fenotipificación es una etapa critica en el desarrollo de estudios de asociación genómica, cuya eficiente ejecución, garantiza la calidad de los resultados, el aporte de nuevos y valiosos conocimientos con potencial uso en planes de mejoramiento vegetal [1-3].

Al desarrollar el primer objetivo particular del estudio “*fenotipificar la respuesta hidrotropica de la raíz primaria (RH) y la elongación del mesocotilo (EM) en los híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico*”, se encontró que en conjunto los valores fenotípicos resultaron considerablemente menores comparados con los reportados en los estudios de Martínez (2019) para la RH en condiciones de estrés hídrico (valor máximo de RH: 74.36°) y de Vázquez (2018) para la EM bajo condiciones de siembra profunda (valor máximo de EM: 113.6 mm) en la población DTMA usando dos sistemas de ensayo independientes. Por lo tanto, se considero que los resultados fenotípicos (valores máximos de RH: 43.40° y EM: 52.93 mm, sin considerar valores atípicos) dependieron en gran medida de las condiciones de estres hídrico alcanzadas dentro del sistema diseñado para este fin y las cuales fueron catalogadas como severas a través de la determinación de los indicadores hídricos: porcentaje de humedad relativa (%HR) en la cámara de ensayo y el potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ ) en los órganos en estudio (raíz primaria y mesocotilo) [4-6]. Donde, se determino que las plántulas de maíz de los 72

híbridos DTMA dentro del sistema de ensayo diseñado para la fenotipificación de la RH y la EM en este estudio se sometieron a %HR que oscilaron entre los 38%HR y 45%HR en condiciones de estrés hídrico; los cuales resultan bajos frente al 86.5%HR promedio encontrado en el sistema con condiciones hídricas óptimas (control) y a los descritos como ideales para el crecimiento y desarrollo vegetal (60%HR y 70%HR). De igual forma, los  $\Psi_w$  mantuvieron valores en condiciones hídricas óptimas entre  $\Psi_w$ : -1.2 a -1.4 MPa) y en condiciones de estrés hídrico entre  $\Psi_w$ : - 4 a - 6 MPa. Datos que fueron obtenidos al establecer las condiciones hídricas del sistema de ensayo usando la línea endogámica B73 de maíz y donde el potencial osmótico medido resulto ser directamente proporcional al hídrico ( $\Psi_{\pi} \approx \Psi_w$ ) en los órganos analizados [7-9]. Por su parte, Scholander et al., (1965) en análisis de tejidos provenientes de manglares *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle* reportaron potenciales hídricos similares a los registrados en este estudio, con un  $\Psi_w$  de -5.5 MPa en plantas halófitas costeras, en el arbusto *Batis marítima* de  $\Psi_w$ : -6 MPa y en la planta de desierto *Larrea tridentata* (la gobernadora) de  $\Psi_w$ : -8 a - 1 MPa (el potencial hídrico más negativo que ha sido reportado) [7-8,10]. Así, los  $\Psi_w$  medidos en los órganos en estudio (raíz primaria y mesocotilo) en el sistema de ensayo bajo condiciones de estrés hídrico son comúnmente encontrados en tejidos de plantas propias de ecosistemas desérticos y los valores registrados superan por mucho el punto de marchitez permanente descrito para plantas en el suelo, el cuál ha sido definido a partir de un  $\Psi_w$ = -1.5 MPa que dista del  $\Psi_w$ = -2.5 MPa calculados para el agua de mar (1MPa = 10 bares) [8,11].

Por otro lado, no se descarta el impacto potencial de la exposición de las plántulas de los 72 híbridos DTMA de maíz a luz verde “protectora” y por ende sobre las respuestas fenotípicas, lo cuál surgió como una pregunta a responder en futuros estudios al no ser parte de nuestros objetivos y al no haber detectado ningún efecto sobre el porcentaje de germinación de las semillas en pruebas adicionales realizadas en el laboratorio [12]. El interés por evaluar el impacto de la luz verde se sustenta en los resultados descritos por Hernández (2014) quien describió el aumento de los ángulos de curvatura de la raíz primaria (RH) en individuos de la colección DTMA expuestos a luz blanca comprados con aquellos sometidos a condiciones de oscuridad total bajo condiciones de ensayo

similares a 24 h de prueba. En presencia de luz, las raíces acumularon antocianinas, lo cual aparentemente es regulado por fitocromos, los que además estarían influenciando negativamente la respuesta gravitrópica de forma similar a la obtenida por Feldman *et al.* (1987) en maíz (variedad Merit) y que contradice lo descrito en raíces de *A. thaliana* donde el ángulo de curvatura hidrotópica es superior en condiciones de oscuridad [13-14]. Aunque, la fotobiología no ha evaluado el impacto de la luz verde en la misma medida que lo ha hecho con los fitocromos (rojo y rojo-lejano), los fotorreceptores de luz azul y la luz ultravioleta (UV) sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria y el mesocotilo, el interés por su estudio ha aumentado y se ha visto reforzado con estudios como el descrito por Zhang *et al.* (2022) quien encontró interacción entre los efectos de la luz verde y luz roja lejana sobre la elongación del tallo en tomate asociado a un valor más bajo del estado fotoestacionario del fitocromo y donde la luz verde podría desencadenar un “síndrome de evitación a la sombra” de manera similar que la luz roja lejana [15-16].

El tiempo para la determinación fenotípicas de los dos rasgos en estudio (RH y EM) es otra variable relevante que pudo influir sobre las respuestas fenotípicas obtenidas en los DTMA y el cuál se estableció a través de la evaluación cinética de la RH y la observación de la EM en plántulas de los híbridos DTMA 12 y 181 de maíz (RH débil y RH robusta, respectivamente). Se definió el tiempo para la determinación de la RH en relación con aquel en el cual se alcanzó el máximo ángulo de curvatura de la raíz primaria a las 24 h (RH débil:  $\geq 10^\circ$  y RH robusta:  $\geq 39^\circ$ ) y la EM en referencia a la elongación del mesocotilo (fase de emergencia) a las 96 h de exposición, bajo las condiciones del sistema de ensayo y a una temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  [6]. Los tiempos definidos resultaron equiparables a los ya establecidos por Eapen *et al.* (2015) y Nieto-Sotelo (2012) en sus estudios con híbridos DTMA bajo sistemas independientes de ensayo; donde, los primeros determinaron la RH en condiciones de estrés hídrico a las 24 h de exposición y los segundos midieron la EM a los 7 días de siembra en condiciones de siembra profunda, obteniendo respuestas fenotípicas mayores a las reportadas en este estudio [4,6,17-18]. Por su parte, Antoni *et al.* (2016) para la determinación de la respuesta de raíces de *Arabidopsis thaliana* a condiciones de estrés hídrico simulada en placas de

Petri con D-sorbitol (medio sólido) dentro de una cámara de crecimiento a 22°C y en condiciones de oscuridad definió como el tiempo óptimo de medida de la RH entre las 8 h y 13 hrs a través del análisis de curvas cinéticas [19]. Por lo anteriormente mencionado, el tiempo óptimo de determinación para cualquier rasgo fenotípico se convierte en una variable crítica que puede o no garantizar la utilidad, calidad y reproducibilidad de los datos a coleccionar.

Continuando con el análisis de los resultados fenotípicos de la RH y la EM en los 72 híbridos DTMA de maíz bajo las condiciones de ensayo, se encontró que estos resultan mucho menores a los obtenidos en maíces criollos valorados usando el sistema reportado por Eapen *et al.* (2015) en condiciones de estrés hídrico en el laboratorio; siendo, descritos ángulos de curvatura superiores a los 90° para la RH en maíces criollos provenientes de Zacualpan, Mor. (datos no publicados) [17]. Sumado a lo anterior, Embarcadero (1971) tras analizar la EM en 25 variedades de maíz mexicano reportó como promedio mínimo y máximo de respuesta: longitudes de 61.0 mm en maíces de la raza Olotillo y de 320 mm en maíces de la raza Cacahuacintle, respectivamente; donde, aún el valor promedio mínimo resulta superior al valor máximo obtenido en este estudio (52.9 mm) y el valor máximo dobla el reportado por Vázquez (2018) en condiciones de siembra profunda con 113.5 mm en la población DTMA [5,17,20]. Entonces, la colección de híbridos DTMA a pesar de ser el resultado de cruces entre líneas de maíz elite provenientes de diversos programas de tolerancia a diversas condiciones de estrés, no superaron la enorme diversidad genética de los maíces nativos y a la cual se le atribuye mejores respuestas fenotípicas junto con una alta variabilidad de estas entre individuos de una misma población [21-22]. Por lo tanto, la conservación y mantenimiento de maíces nativos resulta fundamental para el desarrollo de maíces adaptados a diversos ambientes de cultivo sacando partido de su amplia diversidad genética.

### 1.1. Grupos de clasificación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo en los híbridos DTMA

El proceso de fenotipificación permitió clasificar la respuesta de los 72 híbridos DTMA de maíz analizados de acuerdo a la variación de cada uno de los rasgos estudiados en categorías. Así, la RH se clasificó como: RH robusta (ángulo de curvatura  $>39^{\circ}\text{C}$ ) con 36 DTMA y en RH débil (ángulo de curvatura de  $10^{\circ}\text{C}$  a  $38^{\circ}\text{C}$ ) con 36 DTMA, respectivamente. Por su parte, la EM se agrupó en tres categorías: 1. EM baja (13 a 26 mm) con 15 DTMA, 2. EM media (27 a 40 mm) con 36 DTMA y 3. EM alta (41 a 53 mm): 19 DTMA. A través del análisis de correlación de las variaciones fenotípicas de ambas respuestas (RH y EM), se encontró un alto grado de correlación positiva entre sus datos ( $r > 0,5$ ), lo que permitió agrupar las dos respuestas fenotípicas (RH y EM) en tres grupos de respuestas combinadas: 1. RH robusta y EM alta conformado por 18 DTMA; 2. RH mixta<sup>4</sup> y EM media con 36 DTMA y 3. RH débil y EM baja constituida por 13 DTMA [6, 23-25]. Los grupos de respuesta resultaron estadísticamente diferentes entre sí con un  $p$  valor  $\leq 0.001$  aún con la presencia de datos extremos para cada caso en híbridos diferentes [RH: DTMA 270 ( $73.07^{\circ}$ ) y 181 ( $60.80^{\circ}$ ); EM: DTMA 70 ( $68.40$  mm) y 206 ( $66.40$  mm)] que superaron en más del doble las medias poblacionales (RH  $\mu$ :  $43.62^{\circ}$  y EM  $\mu$ :  $34.54$  mm) y donde la calidad de los datos fenotípicos se garantizó con una potencia estadística calculada de 0.99% [23-25].

En la actualidad, no hay referencia de reportes sobre el estudio de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo determinados bajo condiciones de estrés en plántulas de maíz, lo que eleva el interés por su estudio y el de cada grupo definido a partir de la asociación de las variaciones fenotípicas de ambos rasgos. No obstante, se decidió profundizar en el análisis del grupo denominado: RH robusta y EM alta, considerando como primer criterio de selección los antecedentes de tolerancia a la sequía de dos de los DTMA pertenecientes a este grupo (DTMA 283 y 285) en pruebas de campo descritas por Eapen et al. (2017); los cuales, alcanzaron

---

<sup>4</sup> RH mixta (RH robusta vs RH débil en una razón 15:21)

rendimientos superiores en comparación a los DTMA con RH débil (DTMA 12, 194) analizados y que se usaron como control en este estudio [4,26].

Adicionalmente, incremento el interés por profundizar en el estudio del grupo con RH robusta y EM alta al verificar que 8 de los 18 DTMA que lo integran y que cuentan con las respuestas fenotípicas más altas del estudio provienen del programa de mejoramiento vegetal, denominado: Fisiología; cuyo propósito fue el desarrollo de híbridos tolerantes a sequía y a bajos niveles de nitrógeno en el suelo (Tabla 1) [21]. Este grupo de híbridos se desarrolló a partir de la cruce entre poblaciones parentales de maíz DTP (Drought Tolerant Population, *por sus siglas en inglés*) y LPS (La Posta Sequía) con el *testcross* común (CML-312), las cuales también fueron usadas por Cairns., (2013) en el desarrollo de híbridos tolerantes a condiciones de sequía y calor con el *testcross* CML-539 con buenos resultados en campo; lo cual, indica el potencial genético de las líneas parentales y los híbridos desarrollados a partir de ellas que las convierte en blanco de estudio de marcadores moleculares con potencial uso en planes de mejora y donantes a incorporar a líneas de producción de maíz [21,27]. Sin embargo, el profundizar en el estudio de los demás grupos clasificados podrían aportar información de interés sobre las respuestas fenotípicas, el efecto de algunos genes potencialmente asociados con la tolerancia al estrés hídrico y donde resulta llamativa la presencia de la mitad de la población de híbridos DTMA (36) dentro del grupo de RH mixta y EM media. Aún queda mucho por explorar sobre la respuesta hidrotrópica y la elongación del mesocotilo tanto de forma independiente como asociada.

**Tabla 1.** Clasificación de la respuesta hidrotrópica (RH) y elongación del mesocotilo (EM) de 70 híbridos DTMA de maíz analizados bajo las condiciones del sistema de ensayo diseñado por referenciando su origen [6,21]. Se incluye el objetivo del programa de mejoramiento al que pertenecen los híbridos DTMA e indica en el recuadro rojo de mayor tamaño los 8 DTMA con respuestas fenotípicas más altas y los cuales provienen del mismo grupo de origen denominado: Fisiología\* y el cual tuvo como propósito el desarrollo de híbridos tolerantes a la sequía y a bajo contenido de nitrógeno en el suelo. Por su parte el recuadro rojo de menor tamaño indica que de los 19 DTMA clasificados con EM alta 18 mostrarán una RH robusta. El porcentaje resaltado con color rojo (50%) indica que la mitad de los 70 DTMA considerados se agruparon con una EM media (longitud de: 40-27 mm). Los porcentajes resaltados en negrita indican el grupo de RH con el mayor porcentaje de híbridos DTMA.

Origen	E.Mesocotilo			R.Hidrotrópica			Programa			
	BAJA	R	D	MEDIO	R	D	ALTA	R	D	
Zimbawe	3		3	4	1	3				Sequía y Bajo N
Nigeria				1	1					Sequía y Bajo N
Colombia				4	2	2	2	2		Suelos ácidos
Entomología	2		2	6	2	4	2	2		Resistencia a plagas
Fisiología*	3		3	9	5	4	8	8		Sequía y Bajo N
Sub-tropica	2	2					4	3	1	Alto rendimiento
Tropical	4		4	13	4	9	3	3		Alto rendimiento
Porcentaje EM	20,83%			50,0%			26,36%			
Porcentaje RH		13,3%	86,6%		41,6%	58,3%		94,7%	5,3%	
Total EM	15	2	13	36	15	21	19	18	1	
Total DTMA	70									

(E: elongación; EM: elongación del mesocotilo; R.Hidrotrópica y RH: respuesta hidrotrópica; R: robusta; D: débil; N: nitrógeno)

**1.1.1 Análisis del grupo DTMA con RH robusta y elongación del mesocotilo alta.** La evaluación del potencial de tolerancia de los DTMA pertenecientes al grupo con RH robusta y EM alta a las condiciones de estrés hídrico en el sistema de prueba fue dependiente de la disponibilidad de germoplasma y de porcentajes de germinación superiores al 80% para su desarrollo; razón por la cuál, se tuvo que limitar al análisis comparativo entre individuos con respuestas fenotípicas opuestas [(RH robusta y EM alta

RH) versus (RH débil y EM baja)]. A partir de los cuales, se obtuvo del DTMA 179 con RH robusta y EM alta concentraciones de osmolalidad superiores y potenciales osmóticos e hídricos ( $\Psi_w$ ) más negativos en la raíz primaria y mesocotilo en comparación con los determinados en los mismos órganos del DTMA 12 con RH débil y EM alta; lo cuál, indica la capacidad del DTMA 179 para tolerar las condiciones a las que fue sometido en el ensayo mediante un eficiente ajuste osmótico a través de la acumulación de osmolitos, el aumento en la concentración simple o pasiva de algunos solutos, la síntesis de proteínas y enzimas necesarias para el ablandamiento de la pared celular como parte de al verse afectada la turgencia celular y con el propósito de mantener su sostenibilidad [7, 28-32]. De igual forma, el mesocotilo en las condiciones de ensayo describió potenciales hídricos ( $\Psi_w$ ) más negativos, lo que indica la importancia de su respuesta al estrés en las plántulas de maíz al ejercer presión sobre la raíz con el propósito de estimular el flujo de agua; donde, la raíz desde su rol en la percepción y absorción brinda protección a los tejidos aéreos dando continuidad a su desarrollo y crecimiento [33]. Y es que, el potencial hídrico obtenido en el mesocotilo del híbrido DTMA 179 ( $\Psi_w$ : -1.45 MPa), indicaría una alta tolerancia de su parte a la desecación; ya que algunas plántulas cultivadas bajo condiciones de deficiencia hídrica alcanzan el punto de marchitez permanente, en el rango entre  $\Psi_w$ : -1.3 a -1.5 MPa. Este rango de potencial hídrico no permite la recuperación celular, aun cuando se restituya el riego porque están afectados procesos enzimáticos esenciales que ocasionan daños severos e irreversibles; sin embargo, para corroborar esta suposición, es necesario hacer pruebas de recuperación que no se contemplaron dentro de este estudio [34-35].

La raíz fue el órgano de los DTMA más impactado por las condiciones de estrés, en el cuál se observó inhibición del crecimiento con diferencias significativas con respecto a las raíces sometidas a condiciones control con *p* valor  $\leq 0,001$  y que a su vez se evidenció en las diferencias encontradas entre peso fresco y peso seco de la raíz primaria bajo condiciones de estrés hídrico como resultado del incremento en la síntesis y la acumulación de solutos (osmoprotectores), en respuesta al potencial hídrico negativo y con el propósito de evitar la pérdida de agua y con el propósito de mantener la homeostasis vegetal [28,36-37]. Por su parte, el no encontrar diferencias



estadísticamente significativas entre el peso fresco y seco del mesocotilo se explicaría en gran medida como resultado del rol protector de la raíz primaria al sistema aéreo, llegando incluso a inhibir su crecimiento para mantener del movimiento del agua y la continuidad en el desarrollo vegetal [37-39].

Las plántulas de los híbridos DTMA 12 y 179 mostraron en ambos casos un “patrón fenotípico” similar al descrito por Vescio et al., (2020), quienes reportaron un aumento inicial de la densidad y elongación de la raíz primaria en respuesta al déficit hídrico con la posterior inhibición en su crecimiento y desarrollo, acompañado con un mayor desarrollo de las raíces seminales y laterales para el sostenimiento vegetal [28,36-40].

Por otro lado, la determinación de la relación  $K^+/Na^+$  resulta un indicador de actividad metabólica de gran utilidad en glicofitas como el maíz, donde la exclusión de iones tóxicos es el principal mecanismo de tolerancia a condiciones de estrés hídrico y donde, el aumento de la relación entre los iones solubles puede facilitar el desarrollo y supervivencia de las plantas [41-43]. Es así como, la relación  $K^+/Na^+$  medida en los

DTMA 38 con RH débil y EM baja y el DTMA 184 con RH robusta y EM alta en raíz primaria y mesocotilo a las 96h de análisis mostró una tasa superior por parte del primero, lo que indicaría su alta capacidad metabólica mediada por la concentración presente de ion  $K^+$  en condiciones de estrés; no obstante, la relación  $K^+/Na^+$  del DTMA 184 fue suficiente para tolerar concentraciones superiores del ion tóxico  $Na^+$  sin que se marcaran diferencias significativas en la concentración del ion  $K^+$  presente que en el caso opuesto pondría en riesgo la supervivencia de la planta como efecto del desplazamiento del ion  $Na^+$  por el ion  $K^+$  en sus funciones [41-44]. Por lo tanto, los dos DTMA fueron capaces de mantener altas relaciones  $K^+/Na$ , las cuales facilitan una mejor respuesta a condiciones de estrés y estimulan la acumulación de osmolitos a través de una eficiente absorción del ion  $K^+$  [32].

Las concentraciones de los iones solubles ( $Na^+$  y  $K^+$ ) en raíz primaria y mesocotilo se encontraron más altas en el DTMA 184 con respecto al DTMA 38 en los dos tiempos definidos para su medición (24h y 96h), sin que las concentraciones del ion  $K^+$  mostraran ser superiores entre ellos en pro de contrarrestar las concentraciones del ion  $Na^+$  pero si suficientes en ambos casos para dar respuesta a las condiciones de estrés y como

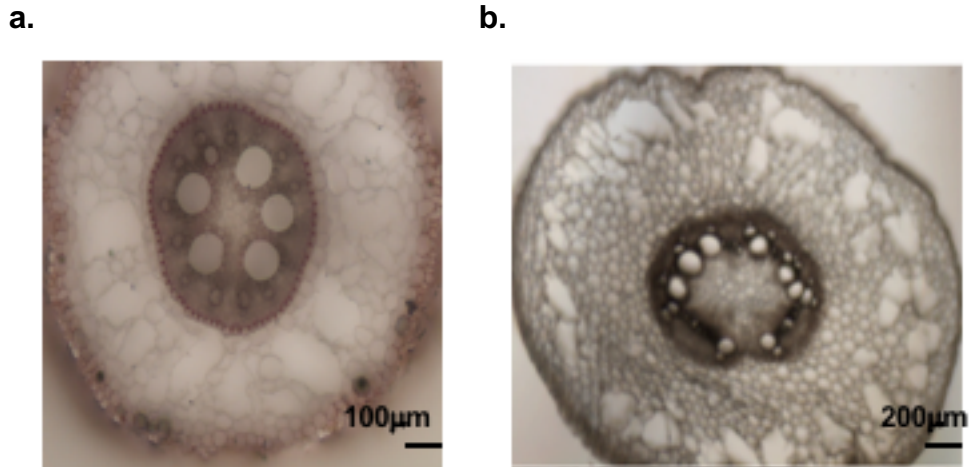
resultado de la selectividad natural que inició con el cambio evolutivo de la vida marina a la terrestre y que hizo al ion  $K^+$  esencial para la vida celular con el propósito de facilitar la adaptación vegetal al estrés abiótico [41-47]. Los resultados obtenidos se correlacionaron con los descritos por Johanson et al., (1983) en sus estudios en plántulas de maíz de 8 días de desarrollo bajo diferentes concentraciones de NaCl, donde describen una mayor selectividad de la raíz primaria por el ion  $K^+$  [43-46]. Siendo, apoyados por los resultados descritos por Premachandra et al., (1991) en plantas de maíz sometidas a estrés hídrico; donde, tras aplicar altas concentraciones de potasio se facilitó la adaptación vegetal al estrés abiótico y cuya concentración se ha estimado puede llegar a constituir hasta el 10% del peso seco total de una planta [45-46].

El mesocotilo por otro lado, a pesar de alcanzar índices de relación  $K^+/Na^+$  superiores a los descritos en raíz primaria, no mostró el impacto que sí fue evidente en la raíz primaria al inhibir su crecimiento y desarrollo en las condiciones de estrés hídrico [18]. Lo cual podría ser explicado como resultado de la combinación entre las altas concentraciones de ion  $K^+$  presentes, contrarrestando a su antagonista el ion  $Na^+$  y a la capacidad del mesocotilo para actuar como su sumidero en plántulas de maíz, como lo describió Johanson et al., (1983) en su estudio en plántulas de maíz, donde propuso que posiblemente el mesocotilo mantiene viable el desarrollo del sistema aéreo al protegerlo de la toxicidad del  $Na^+$  [43-44]. Y es que altas concentraciones del ion  $Na^+$ , impactan negativamente a las plantas sustituyendo al ion  $K^+$  e impidiendo a este elemento esencial cumplir sus funciones, lo cual afectaría la activación de numerosas enzimas, la biosíntesis de proteínas, la permeabilidad de paredes y membranas celulares lo que dificultaría el balance iónico y desencadenaría estrés oxidativo [32,47-49].

El interés por indagar la presencia de posibles variaciones anatómicas en los órganos en estudio (raíz primaria y del mesocotilo) como respuesta a las condiciones del sistema de ensayo, las cuales pudieran ser consideradas potenciales indicadores de tolerancia a condiciones de estrés hídrico llevó a su análisis histológico por medio de microscopía óptica de bajo aumento [50]. Donde, se observó en los órganos en estudio, bajo las condiciones

de estrés hídrico y a las 96 h de exposición la formación de aerénquima (Figura 1); sin embargo, estas observaciones no pudieron ser corroboradas al no contar con un control adecuado de ensayo (control en condiciones de estrés hídrico por inundación) y al no ser evidente su formación a las 24h de ensayo tiempo en que se contaba con un control valido. Y es que, la formación de aerénquima ha sido ampliamente explorada y reportada en especial bajo condiciones de estrés hídrico por inundación por lo que se requiere indagar mas sobre las observaciones obtenidas en este estudio [32,51-54]. No obstante, Zhu et al., (2010) reportó la formación de aerénquima cortical en maíz en pruebas de laboratorio y en campo bajo condiciones de sequía, el cuál, se relacionó con el aumento en la tolerancia al estrés como resultado de la reducción de la respiración de la raíz, al reemplazar el volumen del tejido cortical vivo por aire; lo cuál, disminuye los costos metabólicos de la raíz, favorece su crecimiento y mejora la adquisición de agua del suelo [55].

En mesocotilo, no se encontró información sobre reportes de formación de aerénquima en maíz, lo que continúa despertando el interés por el estudio de este órgano en condiciones de estrés hídrico y plantea varias preguntas a resolver en estudios a futuro, entre ellas ¿ En condiciones de estrés hídrico los híbridos DTMA de maíz son capaces de formar aerénquima como respuesta a condiciones de estrés hídrico ?.



**Figura 1.** Formación de aerénquima en cortes transversales de raíz primaria (a) y mesocotilo (b) de híbridos DTMA de maíz en condiciones de estrés hídrico a 96 horas de exposición, 10X. (a. Barra = 100  $\mu\text{m}$ ; b. Barra = 200  $\mu\text{m}$ ) [50-55].

Por su parte, al encontrar mayor acumulación de lignina en los tejidos de sometidos a condiciones de estrés hídrico versus condiciones óptimas, se confirmó su ya reportada participación en el mantenimiento de la turgencia celular como mecanismos de contención del estrés que evita la pérdida de agua [56-61]. Sin embargo, no fue posible evidenciar diferencias relacionadas con a la variación fenotípica de la respuesta hidrotópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en los DTMA; por lo que, debe ser considerada su valoración a través de determinaciones cuantitativas que permitan definir potenciales cambios en su composición como resultado de su respuesta [56-58]. Actualmente, se ha descrito y corroborado la participación activa de la lignina y de elementos necesarios para su biosíntesis en respuesta a estreses bióticos, abióticos en estudios nivel omico [61-63].

En cuanto a los rasgos anatómicos medidos en los tejidos de raíz primaria y mesocotilo (RXSA, TSA, TCA, MXVA, MX\_num, CF\_num y CC\_num) , no se encontró diferencias significativas de los rasgos en la raíz en los grupos de variación fenotípica; lo cuál, se atribuyó a las condiciones severas de estrés que al afectar su crecimiento no permitieron evidenciar cambios a nivel histológico en respuesta al estrés. En contraste, se encontró una significativa correlación negativa entre el número de vasos de metaxilema (MX\_num) y el número de células del córtex (CC\_num) en tejidos de mesocotilo con una  $r > 0.5$

(correlación de Pearson) bajo condiciones de estrés hídrico. Donde, el DTMA 184 con RH robusta y EM alta mostró un mayor número de vasos de metaxilema (MX\_num) acompañado de un menor número de células del córtex (CC\_num) en contraposición con lo observado en el DTMA 38 (RH débil y EM baja) con un menor número de vasos de metaxilema (MX\_num) y un mayor número de células del córtex (CC\_num) variaciones anatómicas que hasta la fecha no habían sido descritas en mesocotilo pero si en numerosos estudios en raíz primaria en respuesta a condiciones de estrés hídrico por sequía. Donde, se ha descrito que filas reducidas de células corticales se correlacionan con una mejor adquisición de agua y nutrientes en suelos secos, como resultado de la disminución en el costo metabólico de exploración del suelo [57,64-67]. De igual forma, el número y diámetro de xilema en raíz han sido considerados factores determinantes en la conductividad hidráulica (ley de Hagen-Poiseuille<sup>5</sup>); donde, incluso una pequeña diferencia en el diámetro medio de los vasos conduce a cambios en esta [68]. Así, estudios realizados por Richards & Passioura., (1989) y Watt et al., (2013) relacionaron un menor diámetro de vasos de xilema en raíz, con una pequeña mejora en el rendimiento del cultivo de trigo bajo condiciones de sequía [68-69]. El fenotipo opuesto (raíces con un mayor diámetro en vasos de xilema) fue asociado a raíces de mayor diámetro y profundidad por Yambao et al., (1992) y Kondo et al., (2000) en Asia; como criterio de selección del cultivo de arroz para condiciones de escasez hídrica [70-71]. Se ha descrito gran variabilidad fenotípica en vasos de metaxilema (Richards y Passioura, 1989; Sperry y Saliendra, 1994; Vilagrosa et al., 2012; Guet et al., 2015); donde, vasos estrechos en raíces de arroz, en vid y *Paspalum dilatatum* reducen la conductibilidad hidráulica, aunque mantienen un uso eficiente del agua y una mayor resistencia a la cavitación en condiciones de sequía [68,72-77]. Mientras que en árboles de álamo ha sido descrita la presencia de vasos de metaxilema mucho más grandes en raíces poco profundas bajo condiciones similares, lo cual indica una estrecha relación entre rasgos

---

<sup>5</sup> Flujo=  $K_h \Delta P / \Delta x$  con  $K_h = (\pi / 128 \eta) \sum (d_i^4)$ .

$K_h$  (Kg s<sup>-1</sup> MPa<sup>-1</sup> m) : Conductividad hidráulica

$\Delta P$ : Diferencia de presión de agua

$\Delta x$ : Diferencia de resistencia de viscosidad

De acuerdo con la ley de Hagen-Poiseuille, la  $K_h$  debería aumentar si el número de conductos  $n$  por unidad o segmento, o si el promedio de diámetro de los elementos aumenta. Carrasco (2006).

anat6micos y arquitect6nicos de la raiz en respuesta a condiciones de estr6s h6drico [78]. Por su parte, Prince et al., (2017) describi6 el aumento en el n6mero y di6metro de vasos del metaxilema, con un mayor rendimiento y resistencia a la sequia en soya [79]. Y Klein et al., (2020), a trav6s del an6lisis GWAS de cambios arquitect6nicos del metaxilema bajo condiciones de sequia en cereales, se identific6 genes asociados a la formaci6n de vasos de metaxilema que intervienen en se6alizacion de fitohormonas, bios6ntesis de lignina, formaci6n de pared celular, expansi6n y muerte celular programada [80-82]. Estos antecedentes que elevan el inter6s por el an6lisis de las respuestas fenot6picas anat6micas y arquitect6nicas de la raiz primaria y el mesocotilo para el mejoramiento vegetal en maiz [75-82].

Los rasgos anat6micos (RXSA, TSA, TCA, MXVA, MX\_num, CF\_num y CC\_num) junto con los rasgos arquitect6nicos (LRP, SR, LSR, RH, EC, RACs, EH y ET) medidos mostrar6n correlaciones positivas altas bajo las dos condiciones h6dricas de ensayo (H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) con valores de r superiores a 0.5; las cuales, se atribuyeron a la participaci6n de estos 6rganos, estructuras y tejidos en actividades que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal a6n en condiciones de estr6s [83-86]. Por ende, cada vez son m6s frecuentes los estudios que miden la variaci6n del mayor n6mero de rasgos fenot6picos en 6rganos vegetales de inter6s que en conjunto permitan explicar la complejidad de los mecanismos de sus respuestas a diversas condiciones de estr6s.

La fenotipificaci6n de los 72 h6bridos DTMA de maiz bajo las condiciones del sistema de ensayo permiti6 evidenciar su capacidad para percibir y responder a condiciones de estr6s h6drico promoviendo la tolerancia osm6tica, la exclusi6n i6nica y la protecci6n de estructuras celulares a trav6s del transporte de solutos y agua en las c6lulas con el prop6sito de mantener la homeostasis, el desarrollo y el crecimiento vegetal [27,86-87]. Donde, todos estos procesos fisiol6gicos descritos desencadenan la expresi6n de numerosos genes cuya participaci6n y mecanismos de se6alizacion a6n no se conocen con claridad [87].

Los resultados obtenidos a partir de la fenotipificación de los dos rasgos en estudio (RH y EM) permitiría corroborar la hipótesis planteada en este estudio, donde: ***“se estima que en híbridos DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) se encuentre sinergia entre la respuesta hidrotrópica de raíz y la elongación del mesocotilo en condiciones de estrés hídrico”*** al describir la correlación entre sus respuestas y permitiría ACEPTAR la hipótesis alternativa que afirma que: ***“H<sub>a</sub>= En híbridos DTMA de maíz la respuesta hidrotrópica robusta de la raíz primaria y la alta elongación del mesocotilo se relacionan con tolerancia a condiciones de estrés hídrico.”*** A lo que se sumaría la identificación de genes asociados con las respuestas fenotípicas o implicados en procesos biológicos comunes.

## 2. Genotipificación

A través del genotipado por secuenciación (GBS) tecnología de secuenciación de DNA de próxima generación (NGS) se obtuvo un rendimiento por línea DTMA de maíz de 955.690 SNPs distribuidos a lo largo de sus 10 cromosomas; número que se vio reducido a un total de 335.931 SNPs tras su llamado y procesamiento a través de las herramientas provistas por el software TASSEL v.2.5.50 con el propósito de garantizar su calidad [88-89]. Así, con el propósito de alcanzar el segundo objetivo particular del estudio: *“identificar SNPs asociados con la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo en condiciones de estrés hídrico”* se hizo el llamado de los marcadores moleculares pertenecientes a la población bajo análisis (72 híbridos DTMA de maíz) y se aplicó el estudio de asociación genómica (GWAS) usando tres modelos matemáticos diferentes para dar robustez al estudio y a sus resultados [88-91]. Esta potente herramienta permite el análisis de rasgos fenotípicos completos hasta su origen genéticamente subyacente; donde, el maíz resulta ser un excelente modelo para su implementación debido a la diversa variabilidad genética, el rápido deterioro del enlace de equilibrio, disponibilidad de distintas subpoblaciones y abundante información SNP [87-92].

En el análisis inicial de los SNPs asociados a los rasgos fenotípicos no se encontró haplotipos ni variaciones alélicas significativamente relacionadas con la variación de las

respuestas fenotípicas, estando el efecto fenotípico caracterizado por la abundancia de alelos heterocigos [93-94]. No obstante, no se puede descartar la potencial presencia de haplotipos relacionados con las respuestas fenotípicas, lo que sería una pregunta a resolver en estudios futuros con poblaciones robustas que permitan evidenciarlos y a la vez calcular su heredabilidad con potencial uso en procesos de predicción y selección genética con fines de mejoramiento en vegetal [95-96].

De cualquier manera, se rastrearon las muy pocas variaciones alélicas encontradas en los marcadores moleculares (SNPs) asociados a los rasgos; encontrando, en el grupo con respuestas fenotípicas de interés (RH robusta y EM alta), el mayor porcentaje de cambios que fueron más frecuentes en las líneas con respuestas extremas. Así, para la RH se pudieron asociar 13 genes involucrados en procesos de transcripción (GRMZM2G028969 factor de transcripción ereb185-AP2-EREBP 185; GRMZM2G118104 factor 5 específico de clivaje y poliadenilación; GRMZM2G170559 factor de transcripción bHLH072 de unión a DNA; GRMZM2G153333 factor de transcripción gras69), transporte de azúcares (GRMZM2G153358 transportador bidireccional de azúcares sweet 1b), metabolismo de lípidos (GRMZM2G344339 pld12 - fosfolipasa D12), movimiento celular (AC233885.1\_FG001 proteína 7 de unión a miosina GTD-binding domain), crecimiento y desarrollo (GRMZM2G116878 sopentenil transferasa 6 ipt6), homeostasis redox (GRMZM2G145895 superfamilia de thioredoxinas), autofagia (GRMZM2G054811 proteína de membrana de vacuola KMS1), movilización y almacenamiento de nitrógeno (GRMZM2G038046 proteinasa aspártica nepenthesin-1), una proteína chaperona (GRMZM2G059502 proteína chaperona DnaJ) y una proteína con función desconocida cuyo dominio conservado DUF688 se ha relacionado con respuesta a auxinas (GRMZM2G145944) [97-111].

Por su parte, se pudieron asociar 2 genes, uno de ellos relacionado con movimiento celular (GRMZM2G575566 proteína relacionada con kinesina- krp5) y el segundo en procesos de ubiquitinación (GRMZM2G069162 E3 ubiquitin-protein ligasa XB3) [73,88-89]. Los genes identificados a partir de las variaciones alélicas en las secuencias genómicas de la población DTMA, han sido descritos por diversos estudios como actores involucrados en mecanismos de crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés abiótico en



diferentes especies vegetales, lo cuál apoya los resultados obtenidos en este estudio en una población limitada [95-115].

## **2.1. SNPs y genes asociados a las respuestas fenotípicas a través del estudio de asociación de genoma completo (GWAS)**

A partir del estudio GWAS se identificó un total de 172 SNPs relacionados con la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria que asociaron potencialmente 86 genes al rasgo fenotípico, mientras que, para la elongación del mesocotilo se identificaron 90 SNPs que permitieron asociar 47 genes bajo condiciones de estrés hídrico. No se encontraron genes comunes asociados a los dos fenotipos en estudio lo que se relacionaría con la ausencia de estructura genética y a la complejidad evolutiva de los dos rasgos descrita en la población DTMA de maíz [5,21]. Y donde, se encontró impacto órgano específico al estrés como lo describió Ahmad et al., (2016) en su estudio con raíces y hojas de maíz sometidas a condiciones de estrés hídrico y cuyas respuestas combinadas brindaron una respuesta eficiente que beneficio la sostenibilidad de toda la planta [116]. No obstante, se observó convergencia entre las actividades biológicas y moleculares que activa la raíz primaria y el mesocotilo en respuesta a las condiciones de estrés hídrico que deben ser exploradas a profundidad en futuros estudios para corroborar o contradecir lo descrito por Gargallo-Garriga et al., (2014) y Zhao et al., (2018) en maíz; donde, describen respuestas metabólicas opuestas entre la raíz y el tallo atribuidas al impacto diferencial en los órganos bajo condiciones de sequía y que involucraría una eficiente comunicación entre ellos potencialmente mediada por hormonas que favorecen la supervivencia de la planta [65,117-119].

Los resultados obtenidos en este estudio aumentan el interés por el análisis de múltiples rasgos fenotípicos (anatómicos, arquitectónicos, fisiológicos y fisicoquímicos) y su variación en respuesta a condiciones de estrés a través de estudios de asociación el genoma completo que implementen el uso de diversos modelos matemáticos y estadísticos en busca de genes candidatos que puedan ser aprovechados en procesos de selección genómica y mejoramiento vegetal [33,90,96]. Los 3 modelos estadístico-matemáticos de GWAS aplicados en este estudio permitieron asociar potencialmente en

conjunto 12 genes a la RH y 9 genes con la EM en los 72 híbridos DTMA de maíz, donde la participación de algunos de ellos ya ha sido reportada en procesos de respuesta a diversas condiciones de estrés en plantas. Entre los genes asociados con la respuesta hidrotónica de la raíz primaria (RH) se describe a:

1. LEA (Harpin-induced protein): AC183950.2\_FG004 con un  $p$  valor entre 3.62 y 2.64 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Gen perteneciente a un grupo de genes que codifican para una familia de proteínas que se encuentran acumuladas durante las últimas etapas de la embriogénesis, al igual que en tejidos vegetativos durante periodos de estrés osmótico por sequía, bajas temperaturas, salinidad o tratamiento con la fitohormona ABA y el cual, también se asocia a desecación de embriones de semillas [119-120]. Estas proteínas en su mayoría hidrófilas, permiten a las células resistir en forma directa el estrés ambiental y su uso brinda potenciales herramientas para el desarrollo de programas de mejoramiento vegetal [119]. Es así como, Wang., et al (2013) a través del análisis transcriptómico de tejidos específicos de maíz reportaron la expresión de un gen sensible a la sequía denominado: *ZmNHL1* con capacidad para promover tolerancia al estrés por sequía en plantas transgénicas 35S::*ZmNHL1* de maíz al mejorar la eliminación de ROS (reactive oxygen species, *por sus siglas en inglés*) y mantener la permeabilidad de la membrana celular [121]. Por su parte, Minh et al., (2019) en plantas transgénicas de tabaco y maíz con alta expresión del gen *ZmLEA14tv* bajo condiciones de sequía simulada mostrarán mejores porcentajes de germinación de semillas en comparación con las plantas de control no transgénicas al igual que el doble del porcentaje de supervivencia de las plántulas de maíz transgénico *ZmLEA14tv* en relación al control. Los resultados obtenidos en su estudio indicaron que el gen *ZmLEA14tv* podría estar involucrado en la tolerancia a la sequía de las plantas y un candidato para el desarrollo de cultivos mejorados [122]. Así, el interés por la identificación y uso de proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA) es creciente con miras al desarrollo de germoplasma elite tolerante a diversas condiciones ambientales [119-122].

2. Thioredoxin M1: GRMZM2G181251 con un  $p$  valor entre 3.58 y 2.64 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas multifuncionales que participan en procesos de oxidoreducción y juegan un papel

esencial en la síntesis de hormonas, la activación enzimática, la traducción, el metabolismo y la respuesta al estrés abiótico [123]. Kocsy., et al (2004) en su estudio con líneas puras de maíz Z7 (tolerante al frío) y Penjalinan (sensible al frío) reportaron una mayor tolerancia al estrés por frío relacionada con la expresión de genes de tiorredoxina [124]. De igual forma, se ha descrito mayor tolerancia a condiciones de alta salinidad con la expresión de diversos genes tiorredoxina en plantas de tamarisco de kashgar (*Tamarix hispida* W.) con el gen *ThTrx*, en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con el gen *TRXh* y en arroz (*Oryza Sativa* L.) con el gen *OSTRXh1* [125-126].

3. Fosfolipasa C: GRMZM2G078650 con un *p* valor entre 3.47 y 2.49 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Las fosfolipasas bajo condiciones de estrés tales como: la sequía, la salinidad, el ataque de patógenos y la acumulación de metales escinden fosfolípidos de membrana provocando frecuentemente alteraciones en su fluidez y estimulando la formación de moléculas señalizadoras (segundos mensajeros) que activan la respuesta de la planta al estrés [127-128]. Así, grupos de investigación pertenecientes al instituto de investigación CINVESTAV-LANGEBIO en México, han estudiado el papel de los lípidos y sus cambios de perfil por acción de las fosfolipasas en procesos de adaptación y tolerancia en maíces nativos a valles altos y condiciones de estrés por frío dentro de sus líneas de investigación [129].

4. Factor D Nfd106 nucleosoma/cromatina ensamble: GRMZM2G125648 con un *p* valor entre 3.28 y 3.29 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). A pesar de no encontrar información específica sobre el papel del gen asociado en respuesta a condiciones de estrés, su asociación y estudio resulta de enorme interés, ya que numerosos elementos del nucleosoma y la cromatina, tales como: las proteínas modificadoras de histonas han sido descritas en procesos de reprogramación transcripcional en respuesta a señales ambientales que ayuda a modular la expresión génica específica de tejido y el silenciamiento génico global [130-131].

5. abi47 - ABI3-VP1-transcription factor 47: GRMZM2G125596 con un *p* valor entre 3.28 y 3.29 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Se ha reportado en *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* la presencia de factores de transcripción insensibles al ácido abscísico (ABI3)/VIVVIPAROUS1(VP1)(RAV) que codifican un dominio B3 específico de plantas y

un dominio AP2 (APETALA2) pertenecen al factor de unión APETALA2/elemento sensible al etileno (AP2/ERF) o superfamilia B3 jugando un papel importante en la regulación de respuesta a estrés biótico y abiótico, crecimiento y desarrollo [132-135].

6. Putativa citocromo 450: GRMZM2G181236 con un  $p$  valor entre 3.28 y 3.39 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Esta familia de proteínas (CYP450) se encuentra involucrada en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos (fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos) que participan en procesos moleculares de interacción planta-patógeno al igual que en procesos evolutivo de tolerancia de las plantas vasculares a factores bióticos y abióticos [136]. Es así como, Li & Wei, (2020) describieron en tejidos de trigo y maíz sometidos a condiciones de estrés hídrico la expresión diferencial de 89 y 39 genes CYP450 respectivamente, los cuales estarían potencialmente implicados en funciones de protección a daños provocados por sequía [137].

7. Saur 42-small auxin up RNA42: GRMZM2G015049 con un  $p$  valor entre 3.27 y 3.53 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). La familia multigénica *SAUR* involucra un gran grupo de ARN pequeños regulados por el aumento de auxinas e involucrados con la regulación del crecimiento adaptativo al estrés en *Arabidopsis*, arroz, sorgo y maíz [138-140]. En *Arabidopsis thaliana*, se ha descrito a AtSAUR32 como un miembro de la familia SAUR con el potencial de disminuir el impacto negativo del estrés por sequía mediado por la transducción de señales ABA, no obstante la función exacta y el modo de acción siguen sin estar claros [138-140]. El aporte potencial de los miembros de la familia SAUR en el mejoramiento vegetal resulta de interés y su estudio un campo aun por explorar.

En referencia a los 9 genes comunes asociados con la elongación del mesocotilo (EM) se encontró a 2 de ellos reportados con potencial intervención en procesos de tolerancia a condiciones de estrés de forma directa o a través de procesos donde han sido asociada su participación. Así, encontramos a:

1.IDP871/Ras-related protein rab-6A/ proteína no caracterizada: AC166636.1\_FG008 con un  $p$  valor entre 3.24 y 3.69 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Está proteína no caracterizada pertenece a una gran familia de proteínas G pequeñas codificadas por genes Ras, las cuales desempeñan roles fundamentales en procesos de diferenciación celular y transporte vesicular que son cruciales para el desarrollo

numerosas funciones celulares y donde participarían dentro de mecanismos de respuesta a condiciones de estrés que aun están por determinar [141-142].

2. GRAS76 chitin-inducible giberellin response protein 2: GRMZM2G028438: GRMZM2G313027 con un  $p$  valor entre 3.51 ( $\geq 3.25$  punto de corte en los GWAS aplicados). Jaiswal et al., (2022) describen el alto potencial de aplicación de numerosos factores de transcripción tipo GRAS aun no caracterizados a través de estudios de genómica funcional en plantas que pueden ser aprovechados en planes de mejora de características agronómicas y para el desarrollo de cultivos resistentes a diferentes condiciones climáticas [143-144].

Adicionalmente, los análisis de asociación genómica (GWAS) de la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo permitieron asociar potencialmente a diversos factores de transcripción tales como: el factor de transcripción *ereb185-AP2-EREBP185* (GRMZM2G028969), el factor 5 específico de clivaje y poliadenilación (GRMZM2G118104) el factor de transcripción *bHLH072* de unión a DNA (GRMZM2G170559), el factor de transcripción GRAS 69 (GRMZM2G153333), el factor de transcripción 23-GRAS 23 (GRMZM2G157679), factor de transcripción GRAS 76 (GRMZM2G02843), el factor de transcripción *WRKY 108* dependiente de ABA (GRMZM2G106560), el factor de transcripción de respuesta a etileno-*ERF023* (GRMZM2G028969), el factor de transcripción 3-BSD GRMZM5G5870572-GRMZM2G390096), factor de transcripción 47 - *abi47 - AB13 -VP1* (GRMZM2G386276), el factor de transcripción *MADS19* (GRMZM2G492156), el factor de transcripción *erb190-AP2-EREBP* (GRMZM2G104260) y el factor de transcripción *GTE4* (GRMZM2G010075) [144-147]. La actividad de estos factores de transcripción ya ha sido descrita dentro de mecanismos de respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico en plantas al igual que participando en numerosos procesos biológicos de desarrollo, crecimiento y respuesta al estrés hídrico en maíz [148]. Los resultados obtenidos confirman el valor de los datos obtenidos por medio de la aplicación de estudios de asociación del genoma completo en la exploración de potenciales genes candidatos con propósitos de mejoramiento vegetal.

## **2.2. Análisis de enriquecimiento y co-expresión de genes asociados a las respuestas fenotípicas en condiciones de estrés hídrico**

Con el propósito de alcanzar el tercer objetivo particular del estudio: “determinar el patrón de expresión de genes seleccionados a partir de la asociación de genoma completo (GWAS) asociados con la respuesta hidrotópica y elongación del mesocotilo en híbridos de maíz DTMA en condiciones de estrés hídrico” se exploró la ontología de los genes asociados y su co-expresión por medio de análisis de enriquecimiento; que vincularon a los genes con alta significancia estadística ( $p \text{ valor} \leq 0,05$ ) con actividades catalíticas, metabólicas, crecimiento y desarrollo, unión, reparación, transcripción y replicación de ácidos nucleicos, señalización hormonal, movimiento y transporte celular [149-152]. De igual forma, se aprovechó la disponibilidad de bases de datos específicas de maíz, las cuales almacenan numerosa información de genes procedentes de experimentos liberados por la comunidad científica con un nivel aceptable de fiabilidad, significancia estadística y que superan cualquier revisión (aunque no significa que la información este completa), para corroborar a través de métodos de enriquecimiento funcional y co-expresión, la funcionalidad del grupos de genes identificados con respecto a los descritos, elevado su nivel de calidad y rigor científico [150,153-156]. De esta manera, se lograron identificar genes asociados a la respuesta a condiciones de estrés hídrico en los 72 híbridos DTMA analizados en etapas tempranas de su desarrollo, a través del análisis de la variación fenotípica de la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo; donde, las plántulas de maíz activaron numerosos mecanismos a nivel celular, fisiológico, bioquímico y molecular en respuesta al estrés hídrico, las cuales fueron dependientes de la duración e intensidad de exposición y específicas a la etapa de desarrollo de la plántula (7 días).

Para finalizar, los resultados obtenidos por este estudio incentivan la exploración y desarrollo de metodologías que contrarresten la limitación de analizar grandes poblaciones, garantizando la recuperación de datos confiables y de calidad soportados por modelos estadísticos más astringentes y pruebas adicionales. Este tipo de estudios permiten identificar genes, rutas y mecanismos que las plántulas de maíz son capaces de activar en etapas tempranas en respuesta a condiciones adversas pudiendo impactar

en el desarrollo del cultivo para profundizar en su conocimiento y ser aprovechadas en programas de mejoramiento [157-160].

## CONCLUSIONES

1. La respuesta hidrotrópica robusta y la elongación del mesocotilo son dos rasgos fenotípicos que en plántulas de híbridos DTMA de maíz mostrarán estar correlacionados con el mantenimiento del crecimiento y desarrollo de la plántula, bajo condiciones hídricas óptimas y de estrés hídrico.
2. De igual forma, la respuesta hidrotrópica robusta asociada a una elongación del mesocotilo alta resultó ser una variación fenotípica que brindó una ventaja potencial a las plántula de los híbridos DTMA de maíz que permite tolerar mejor condiciones de estrés hídrico.
3. El índice de  $K^+/Na^+$  medido en la raíz primaria y el mesocotilo de plántulas de híbridos DTMA de maíz con respuesta hidrotrópica robusta asociada a una elongación del mesocotilo alta resultó ser un indicador clave para determinar su alta capacidad metabólica, que se asoció con mayor tolerancia a condiciones de estrés hídrico y altos contenidos de sodio.
4. La presencia de un número reducido de células corticales y un mayor número de vasos de metaxilema en mesocotilos de plántulas de híbridos DTMA de maíz con respuesta hidrotrópica robusta asociada a una elongación del mesocotilo alta, son dos rasgos anatómicos potencialmente relacionados con la tolerancia al estrés hídrico, los cuales mejorarían la conductibilidad hidráulica en la plántula de maíz y cuyo fenómeno hasta ahora solo ha sido descrito en sistema radical.
5. El estudio de asociación del genoma completo a través de los modelos aplicados permitió proponer la potencial asociación de 86 genes a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria y 47 genes a la elongación del mesocotilo, donde ninguno fue común para los dos rasgos. Estos genes se encontraron involucrados principalmente en actividades catalíticas, procesos metabólicos, unión y reparación de ácidos nucleicos y procesos que involucran a la membrana y la pared celular, donde aún es necesario contar con más información para establecer sus perfiles de expresión.



## PERSPECTIVAS

1. El presente estudio permitió identificar genes asociados a la variación de respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo, bajo condiciones de estrés hídrico, a través de un acercamiento a los análisis de asociación de diversos rasgos fenotípicos con el genotipo de una población de estudio, con el propósito de explorar a través de la variación genética potenciales rutas y mecanismos alternativos de respuesta. Resulta importante continuar con la determinación del perfil de expresión diferencial de las respuestas fenotípicas y por ende de los genes asociados a través de estudios de RNAseq, para seleccionar aquellos con potencial uso en planes de mejoramiento vegetal.
2. De igual forma, resulta de interés el corroborar la información obtenida por medio del análisis de poblaciones más robustas, aplicando estudios de asociación en maíces con mayor diversidad genética, donde se pueda identificar loci, alelos, SNPs, o haplotipos involucrados en la variación de la respuesta junto con sus frecuencias alélicas, para realizar análisis predictivos y de heredabilidad.
3. Por otro lado, el GWAS realizado bajo diferentes modelos matemáticos resultó ser una buena aproximación para detectar genes candidatos asociados a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria y la elongación del mesocotilo, lo que incentiva a explorar y desarrollar metodologías que hagan frente a la limitación de trabajar con grupos de muestreo muy grandes, mediante modelos estadísticos más astringentes y pruebas adicionales que garanticen la obtención de datos confiables y de calidad.
4. Es necesario profundizar en el estudio celular y molecular de la naturaleza de la correlación entre la respuesta hidrotópica y el crecimiento de mesocotilo para definir los actores implicados al igual que propósitos adicionales de la misma.
5. Adicionalmente, resulta de interés el estudio a profundidad del efecto de la exposición de las plántulas a luz verde “protectora” durante las determinaciones fenotípicas para descartar su potencial impacto sobre las variaciones y mecanismos de respuesta a las condiciones de estrés.

6. La potencial formación de aerenquima y la variación fenotípica de rasgos anatómicos relacionada con la respuesta a las condiciones de ensayo en los órganos estudiados son interrogantes para resolver en investigaciones futuras que pueden sumarse como potenciales marcadores de selección a tener en cuenta para el desarrollo de programas de mejoramiento vegetal.

## Capítulo IV Referencias.

1. Shikha, K., Shahi, J.P., Vinayan, M.T., et al. (2021). Genome-wide association mapping in maize: status and prospects. *3 Biotech* **11**(5):244. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02799-4>.
2. Reynolds, M., Chapman, S., Crespo-Herrera, L., et al. (2020). Breeder friendly phenotyping. *Plant Sci* **295**:110396. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110396>.
3. Araus, J.L., Serret, M.D., Edmeades, G.O. (2012). Phenotyping maize for adaptation to drought. *Front Physiol* **3**:305. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00305>.
4. Martínez-Guadarrama, J.J. (2019). Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotropica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS). [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)]. Repositorio UAEM, Cuernavaca-México.
5. Vásquez, L. (2018). Estudios de asociación genómica (GWAS) relacionados a la elongación del mesocotilo en maíz y su validación mediante análisis de ligamiento de genes candidatos [Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio UNAM-CU/CDMX, México.
6. Sáenz-Rodríguez, M.N., Cassab-López, G.I. (2021). Assay system for mesocotyl elongation and hydrotropism of maize primary root in response to low moisture gradient. *Biotechniques* **71**(4):516-527. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0034>.
7. Squeo, F.A. (2007). El agua y el potencial hídrico En: Fisiología Vegetal F.A. Squeo & L. Cardemil, eds. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile **2**: 47-66.
8. Bartolo-Mateos, O. (2015). Potencial hídrico en *Avicennia germinans* (L.) en sitios estables y deteriorados de la zona de reserva ecológica de la CTPALM, Tuxpan, Veracruz, México. [Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana (UV)]. Repositorio UV, Veracruz-México.
9. Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S. et al. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**(5956):1112 <https://doi.org/10.1126/science.1178534>.
10. Scholander, P.F., Ha, H.T., Bradstreet, E.E., Hemmingsen, E.A. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science* **148**: 339-345.
11. Mariño, Y.A. (2006). Evaluación del punto de marchitez permanente bajo condiciones de invernadero como variable para la asignación de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) a sitios potenciales de plantación. [Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana (PUJ)]. Repositorio PUJ/Bogotá, Colombia.
12. Folta, K.M., Maruhnich, S. A. (2007). Green light: a signal to slow down or stop. *J Exp Bot* **58**(12):3099-111. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm130>.
13. Hernandez, O (2014). Análisis del hidrotropismo en diferentes híbridos de *Zea mays* L. [Tesis de Licenciatura Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)]. Repositorio UAEM-Cuernavaca/Morelos, México.
14. Feldman, L.J., Briggs, W.R. (1987). Light-regulated gravitropism in seedling roots of maize. *Plant Physiol* **83**(2):241-3. <https://doi.org/10.1104/pp.83.2.241>.
15. Zhang, X., Heuvelink, E., Melegkou, M., et al. (2022). Effects of Green Light on Elongation Do Not Interact with Far-Red, Unless the Phytochrome Photostationary State (PSS) Changes in Tomato. *Biology* **11**: 151. <https://doi.org/10.3390/biology11010151>.
16. Sáenz-Rodríguez, M.N, Cassab-López, G.I. (2021). Primary Root and Mesocotyl Elongation in Maize Seedlings: Two Organs with Antagonistic Growth below the Soil Surface. *Plants* (Basel) **10**(7):1274. <https://doi.org/10.3390/plants10071274>.
17. Eapen, [Martínez, J.J., Cassab, G.I. \(2015\)](#). Assays for root hydrotropism and response to water stress. *In*: Blancaflor EB, ed. Plant gravitropism: methods and protocols. New York. Springer New York, pp. 133-142. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8_11).

18. Nieto–Sotelo, J., Cassab, G.I., Eapen D., et al. (2012). Informe técnico final del proyecto IMIC–2011–008: “Descripción de caracteres hidrotropicos y del desarrollo y crecimiento del mesocotilo y de las raíces adventicias en razas y líneas de maíz.
19. Antoni R., et al. (2016). Environmental Responses in Plants Methods and Protocols. En *Hydrotropism: Analysis of the Root Response to a Moisture Gradient*. (cap. I). *Humana Press*. Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras-Portugal.
20. Embarcadero, A.G. (1971). Estudio del mesocotilo como característica en la clasificación biosistemática de maíz. [Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio UNAM, México.
21. Cairns, J. E., Crossa, J., Zaidi, P. H., et al. (2013). Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Sci* **53**(4):1335–1346.
22. González-Castro, M.E., Palacios, N., Espinoza, A., Bedoya, C. A. (2013). Diversidad genética en maíces nativos mexicanos tropicales. *Rev Fitotec* **36**(Supl.3-a):239-338.
23. R Core Team (2013). R: A language and environmental for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
24. Peña D. Análisis de datos multivariados. Madrid: McGraw Hill; 2002.
25. Di Masso, R.J., Pippa, C., Silva, O.S., Font, M.T. (2010). Componentes principales como fenotipos de sistemas biológicos complejos. Relación músculo–hueso en el ratón (*Mus musculus*) BAG, *J Basic Appl Genet* **21**:1852–1857.
26. Eapen, D., Martínez, J.J., Hernández, O., et al. (2017). Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Sci* **265**:87-99. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.016>.
27. Monneveux, P., Sánchez, C., Tiessen, A. (2008). Future progress in drought tolerance in maize need new secondary traits and cross combinations. *J Agri Sci* **146**(3):287-300. <https://doi.org/10.1017/S0021859608007818>.
28. Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agron Colomb* **27**(2): 179-191.
29. Rodríguez-Pérez, L. (2006). Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agron Colomb* **24**(1): 28–37. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/20003>.
30. Bartels, D & Ramanjulu, S. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24. 23-58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>.
31. Castro-Camus, E., Palomar, M., Covarrubias, A. (2013). Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored in-vivo using terahertz time-domain spectroscopy. *Sci. Rep.* 3:2910.
32. Chen, H & Jian-Guo, J. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ Rev* **18**: 309-319. <https://doi.org/10.1139/A10-014>.
33. Campos-Flores, A. (2015). Estrés osmótico durante la germinación, emergencia y desarrollo fenológico del maíz. [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro (UAAAN)]. Repositorio UAAAN, Coahuila, México.
34. Alegría, W. (2016). Texto básico para profesionales en ingeniería forestal. En el área de fisiología vegetal. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. (FCF-UNAP). Iquitos-Perú.
35. Martínez, D. (2016). Manual Teórico: Fisiología vegetal. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla. Escuela de Biología. Puebla-México.
36. Carrasco-Sánchez, J. (2017). Respuesta al estrés hídrico en plantas mediterráneas. Perspectiva frente al cambio climático. [Tesis de Pregrado. Universidad Complutense]. Repositorio, Facultad de Farmacia. Madrid- España.
37. Camacho, R. & Caraballo, D. (1994). Evaluation of morphological characteristics in Venezuelan maize (*Zea mays* L.) genotypes under drought stress. *Sci Agric (Piracicaba)* **51**: 453-458. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161994000300012>.

38. Johnson, W. & Davis, R. (1973). Sugar beet response to irrigation as measured with growth sensors. *Agron J* **65**: 789-794.
39. Balaguera, H. E., Herrera, J. G. Á., Rodríguez, J. D. (2008). Efecto del déficit de agua en el trasplante de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Agron Colomb* **26**(2): 246-25. <https://doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500050035x>.
40. Vescio, R., Abenavoli, M.R., Sorgonà, A. (2020). Single and Combined Abiotic Stress in Maize Root Morphology. *Plants (Basel)* **10**(1):5. <https://doi.org/10.3390/plants10010005>.
41. Arronte C. Bioquímica clínica especializada. Manual de prácticas. Facultad de bioanálisis campus Xalapa. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.2004.
42. López E. (2018). Crecimiento en suelos salitrosos de *Nicotiana tabacum* modificada con el gen ARO4 de la levadura halotolerante *Dabaryomyces hansenii*. [Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Los Reyes Iztacala. Edo. México-México.
43. Johanson, J.G. & Cheeseman, J.M. (1983)a. Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings. I. The role of the mesocotyl in "sodium exclusion". *Plant Physiol* **73**: 153-158.
44. Johanson, J.G., Enkoji, C., Cheeseman. (1983)b. Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings. II. Distribución between stele and cortex of ions absorbed from the transpiration stream. *Plant Physiol* **73**:159-164.
45. Aleman, F. (2009). Crecimiento en suelos salitrosos de *Nicotiana tabacum* modificada con el gen ARO4 de la levadura halotolerante *Dabaryomyces hansenii*. [Tesis Doctoral. Universidad de Murcia (CEBAS-CSIC)]. Repositorio Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-Nutrición Vegetal. Murcia-España.
46. Premachandra, G.S., Saneoka, H., Ogata, S. (1991). Cell membrane stability and leaf water relations as affected by potassium nutrition of water-stressed maize. *J Exp Bot* **42**: 739-45.
47. Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci* **14**(4):7370-7390. <https://doi.org/10.3390/ijms14047370>.
48. Munns, Rana. (2002). Munns, R.: Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant Cell Environ* **28**: 239-250. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>.
49. Lynch, J & Lauchli, A. (2004). Potassium transport in salt-stressed barley roots. *Planta* **161**: 295-301.
50. Albornoz, P. (2018). Técnicas de histología vegetal. [https://Técnicas\\_histológicas\\_vegetal\\_HistoNOA.pdf\(unt.edu.ar\)](https://Técnicas_histológicas_vegetal_HistoNOA.pdf(unt.edu.ar)).
51. Smirnof, N Crawford, R.M.M. (1983). Variation in the Structure and Response to Flooding of Root Aerenchyma in some Wetland Plants. *Ann Bot* **51**(2): 237–249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086462>
52. Drew, M. C., He, C., & Morgan, P. W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* **5**:123– 127.
53. Evans, D. E. (2003). Aerenchyma formation. *New Phytol* **161**: 35– 49.
54. Lenochová, Z., Soukup, A., Votrubová, O. (2009). Aerenchyma formation in maize roots. *Biol Plant* **53**: 263-270.
55. Zhu, J., Brown, K.M., Lynch, J.P. (2010). Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environ* **33**(5):740-9. <https://doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02099.x>.
56. Speer, E.O. (1987). A Method of Retaining Phloroglucinol Proof of Lignin, Stain Technology **62**(4): 279-280. <https://doi.org/10.3109/10520298709108008>.
57. Burton, A., Brown, K., Lynch, J. (2013). Phenotypic Diversity of Root Anatomical and Architectural Traits in Zea Species. *Crop Sci* **53**:1042. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.07.0440>.

58. Alvarez, S., et al. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell Environ* **31**(3):325-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01770.x>.
59. Hu, Y., et al. (2009). Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves. *J Appl Genet* **50**(3):213-23. <https://doi.org/10.1007/BF03195675>.
60. Lugo, E. (2014). Efecto del estrés hídrico sobre componentes de la pared celular en pericarpio de maíz (*Zea mays L.*). [Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)]. Repositorio Facultad de Agronomía. Nuevo León, México.
61. Niu, L., Hao, R., Wu, X., Wang, W. (2020). Maize mesocotyl: role in response to stress and deep-sowing tolerance. *Plant Breed* **00**:1-8.
62. Zhao, X., Zhong, Y., Zhou, W. (2021) Molecular mechanisms of mesocotyl elongation induced by brassinosteroid in maize under deep-seeding stress by RNA-sequencing, microstructure observation, and physiological metabolism *Genomics* **113**(6):3565-3581. <https://doi.org/10.1016/j.>
63. Schopfer, P., Lapierre, C., Nolte, T. (2001). Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: Mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification. *Physiol Plant* **111**: 83-92. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110111.x>.
64. Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci* **5**:537-542.
65. Chimungu, J.G., Brown, K.M., Lynch, J.P. (2014). Large root cortical cell size improves drought tolerance in maize. *Plant Physiol* **166**(4):2166-78. <https://doi.org/10.1104/pp.114.250449>.
66. Chimungu JG, Brown KM, Lynch JP. (2014). Reduced root cortical cell file number improves drought tolerance in maize. *Plant Physiol* **166**:1943-55. <https://doi.org/10.1104/pp.114.249037>.
67. Carrasco, M.R. (2016). Estructura hidráulicas en arboles. [Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Navarro”]. Repositorio (UAAAN), Coahuila-México.
68. Richards, R.A., Passioura, J.B. (1989). A breeding program to reduce the diameter of the major xylem vessel in the seminal roots of wheat and its effect on grain-yield in rain-fed environments. *Aust J Agric Res* **40**: 943-950.
69. Watt, M., Wasson, A., Chochois, V. (2013). Root-based solutions to increasing crop productivity. En: Eshel, A., Beeckman, T., eds. *Plant roots: the hidden half*. Boca Raton, FL : CRC Press, 21-1-21-17.
70. Yambao, E.B., Ingram, K.T., REAL, J.G. (1992). Root Xylem Influence on the Water Relations and Drought Resistance of Rice. *J Exp Bot* **43**(7):925-932. <https://doi.org/10.1093/jxb/43.7.925>.
71. Kondo, M., Aguilar, A., Abe, J., Morita, S. (2000). Anatomy of Nodal Roots in Tropical Upland and Lowland Rice Varieties, *Plant Prod Sci* **3**(4): 437-445. <https://doi.org/10.1626/pps.3.437>.
72. Sperry, J.S., Saliendra, N.Z. (1994). Intra- and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant Cell Environ* **17**: 1233-1241.
73. Vilagrosa, A., Chirino, E., Peguero-Pina, J.J., et al. (2012). Xylem Cavitation and Embolism in Plants Living in Water-Limited Ecosystems. En: Aroca, R. Ed, *Plant Responses to Drought*. Springer-Verlag, pp 63-109.
74. Guet, J., Fichot, R., Ledee, C., et al. (2015). Stem xylem resistance to cavitation is related to xylem structure but not to growth and water-use efficiency at the within population level in *Populus nigra L.* *J Exp Bot* **66**: 4643-4652.
75. Henry, A., Cal, A.J., Batoto, T.C., et al. (2012). Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. *J Exp Bot* **63**: 4751-4763.
76. Mapfumo, E., Aspinall, D., Hancock, T.W. (1994). Vessel-diameter distribution in roots of grapevines (*Vitis vinifera L.* cv. Shiraz). *Plant soil* **160**: 49-55. <https://doi.org/10.1007/BF00150345>.
77. McElrone, A.J., Pockman, W.T., Martínez-Vilalta, J., Jackson, R.B. (1999). Variation in xylem structure and function in stems and roots of trees to 20 m depth. *New Phytol* **163**: 507-517.



78. Vasellati, V., Oesterheld, M., Medan, D., et al. (2001). Effects of Flooding and Drought on the Anatomy of *Paspalum dilatatum*. *Ann Bot* **88**(3): 355–360. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1469>.
79. Prince, S.J., Murphy, M., Mutava, R.N., et al. (2017). Root xylem plasticity to improve water use and yield in water-stressed soybean. *J Exp Bot* **68**: 2027–2036.
80. Klein, S., Reeger, J. E., Shawn, K., et al. (2020). Shared genetic architecture underlying root metaxylem phenotypes under drought stress in cereals. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.02.365247v2>.
81. Roberts, K., McCann, M.C. (2000). Xylogenesis: the birth of a corpse. *Current Opinion in Plant Biol* **3**(6):517-522. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00122-9).
82. Schuetz, M., Smith, R., Ellis, B. (2013). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J Exp Bot* **64**(1):11–31. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.365247>.
83. Lynch, J.P. (2015). Root phenes that reduce the metabolic costs of soil exploration: opportunities for 21st century agriculture. *Plant Cell Environ* **38**: 1775-1784.
84. Garcia, M., Medina, E., Jáuregui, D. (2011). Cambios anatómicos inducidos por la salinidad en raíces de dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum sp.*, Poaceae). *Acta Bot Ven* **34**(1): 177-198. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S008459062011000100008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S008459062011000100008&lng=es&tlng=es).
85. Schneider, H.M., Klein, S.P., Hanlon, M.T., et al. (2020). Genetic control of root anatomical plasticity in maize. *Plant Genome* **13**(1): e20003. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20003>.
86. Zhao, J., Xiue, Q., Jessup, K.E., et al. (2018). Shoot and root traits in drought tolerance maize (*Zea mays* L.) hybrids. *J Integr Agric* **17**(5):1093-1105.
87. Zhang Q, Liu H, Wu X, Wang W. (2020). Identification of drought tolerant mechanisms in a drought-tolerant maize mutant based on physiological, biochemical and transcriptomic analyses. **20**(1):315. <https://doi:10.1186/s12870-020-02526-w>.
88. Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., et al. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* **6**(5): e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>.
89. Deschamps, S., Llaca, V., May, G.D. (2012). Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology (Basel)* **1**(3):460-483. <https://doi.org/10.3390/biology1030460>.
90. Bradbury, P, J., Zhang, Z., Kroon, D.E., et al. (2007). **TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples**. *Bioinformatics* **23**:2633-2635. <https://www.maizegenetics.net/tassel>. [Maize Genetics | TASSEL](https://www.maizegenetics.net/tassel).
91. Kaler, A.S., Gillman, J.D., Beissinger, T., et al. (2020). Comparing Different Statistical Models and Multiple Testing Corrections for Association Mapping in Soybean and Maize. *Front Plant Sci* **10**:1794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01794>.
92. Lipka, A.E, F., Tian, Q., Wang, J., et al. (2012). GAPIT: genome association and prediction integrated tool, *Bioinformatics* **28**: 2397–2399. <https://www.maizegenetics.net/gapit>.
93. Wang, Q., Tian, F., Pan, Y., et al. (2014). A SUPER powerful method for genome wide association study. *PLoS One* **9**: e107684.
94. Yu, J., Buckler, E.S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr Opin Biotech* **17**:55-160.
95. Mayer, M., Hölker, A.C., González-Segovia, E. et al. (2020). Discovery of beneficial haplotypes for complex traits in maize landraces. *Nat Commun* **11**:4954. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18683-3>
96. Beló, A., Zheng, P., Luck, S., et al. (2008). Whole genome scan detects an allelic variant of fad2 associated with increased oleic acid levels in maize. *Mol Genet Genomics* **279**: 1-10.
97. Fritsche-Neto, R., Galli, G., Borges, K.L.R., et al. (2021). Optimizing Genomic-Enabled Prediction in Small-Scale Maize Hybrid Breeding Programs: A Roadmap Review. *Front Plant Sci* **12**:658267. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.658267>.

98. Tonello, L., Oliveira, R., Lübberstedt, T. (2022). Combining datasets for maize root seedling traits increases the power of GWAS and genomic prediction accuracies, *J Exp Bot* **73** (16):5460–5473, <https://doi.org/10.1093/jxb/erac236>
99. Jukes, T.H. (1987). Transitions, transversions, and the molecular evolutionary clock. *J Mol Evol* **26**(1-2):87-98. <https://doi.org/10.1007/BF02111284>.
100. Leng, P., Zhao, J. (2020). Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize. *Theor Appl Genet* **133**(5):1455-1465. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03494-y>.
101. Kizis, D., Lumberras, V., Pagès, M. (2001) Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett* **498**(2-3):187-9. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02460-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02460-7).
102. Kim, S., Yamamoto, J., Chen Y., et al. (2010). Evidence that cleavage factor Im is a heterotetrameric protein complex controlling alternative polyadenylation. *Genes Cells* **15**: 1003-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01436.x>.
103. Li, Z., Liu, C., Zhang, Y., et al. (2019). The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* **70**(19):5471-5486. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz307>.
104. Guo, Y., Wu, H., Li, X., et al. (2017) Identification and expression of *GRAS* family genes in maize (*Zea mays* L.). *PLoS ONE* **12**(9): e0185418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185418>.
105. Gautam, T & Gahlaut, V & Jaiswal, V & Zinta, G. (2022). Emerging Roles of SWEET Sugar Transporters in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Cells* **11** <https://doi.org/10.3390/cells11081303>
106. Exton, J.H. (2000). Phospholipase D. *Ann N Y Acad Sci.* **905**:61-8. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06538.x>.
107. Shimmen, T. & Ridge, Robert & Lambiris, I., et al. (2000). Plant myosin. *Protoplasma.* **214**:1-10. <https://doi.org/10.1007/BF02524256>.
108. Ma, Q.H., Liu, Y.C. (2009). Expression of isopentenyl transferase gene (*ipt*) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Rep* **28**(11):1759-65. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0776-1>.
109. Sytykiewicz, H., Łukasik, I., Goławska, S., et al. (2020). Expression of Thioredoxin/Thioredoxin Reductase System Genes in Aphid-Challenged Maize Seedlings. *Int J Mol Sci* **21**(17):6296. <https://doi.org/10.3390/ijms21176296>.
110. Calvo-Garrido, J., Carilla-Latorre, S., Escalante, R. (2008). Vacuole membrane protein 1, autophagy and much more. *Autophagy* **4**(6):835-7. <https://doi.org/10.4161/auto.6574>.
111. Bekalu, Z.E., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, A.H. (2020). Molecular Properties and New Potentials of Plant Nepenthesins. *Plants (Basel)* **9**(5):570. <https://doi.org/10.3390/plants9050570>.
112. Pulido, P., Leister, D. (2018). Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **217**(2):480-490. <https://doi.org/10.1111/nph.14827>.
113. Krishnakumar, V., Contrino, S., Cheng, C.Y., et al. (2017). ThaleMine: A Warehouse for *Arabidopsis* Data Integration and Discovery. *Plant Cell Physiol* **58**(1): e4. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw200>.
114. Ali, I & Yang, W. (2020). The functions of kinesin and kinesin-related proteins in eukaryotes. *Cell Adhesion & Migration* **14**:139-152. <https://doi.org/10.1080/19336918.2020.1810939>.
115. Yang, L., Wu, L., Chang, W., et al. (2018). Overexpression of the maize E3 ubiquitin ligase gene ZmAIRP4 enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **123**:34-42. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.017>.
116. Ahmad, N., Malagoli, M., Wirtz, M. et al. (2016). Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots. *BMC Plant Biol* **16**:247. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0940-z>.
117. Liu, S., Qin, F. (2021). Genetic dissection of maize drought tolerance for trait improvement. *Mol Breeding* **41**:8. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01194-w>.



118. Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M. *et al.* (2014). Opposite metabolic responses of shoots and roots to drought. *Sci Rep* **4**: 6829. <https://doi.org/10.1038/srep06829>.
119. Jiménez, E. (2008). Mecanismos de la regulación mediada por ABA sobre la expresión de un gen *LEA* inducido por sequía. [Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)]. Repositorio UNAM-CU/CDMX, México.
120. Amara, I., Capellades, M., Ludevid, M. D., et al. (2013). Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing *LEA* Rab28 gene. *J Plant Physiol* **170**(9):864–873. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.004>.
121. Wang, G., Su, H., Abou-Elwafa, S. F., Zhang, P., Cao, L., Fu, J., Xie, X., Ku, L., Wen, P., Wang, T., & Wei, L. (2023). Functional analysis of a late embryogenesis abundant protein ZmNHL1 in maize under drought stress. *J Plant Physiol* **280**:153883. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153883>.
122. Minh, B. M., Linh, N.T., Hanh, H. H. (2019). A *LEA* Gene from a Vietnamese Maize Landrace Can Enhance the Drought Tolerance of Transgenic Maize and Tobacco. *Agronomy* **9**(2): 62. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020062>.
123. Vieira Dos Santos, C., & Rey, P. (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends Plant Sci* **11**(7): 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.05.005>.
124. Kocsy, G., Kobrehel, K., Szalai, G., et al. (2004). Abiotic stress-induced changes in glutathione and thioredoxin h levels in maize. *Environ Exp Bot* **52**(2):101-112. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.01.008>.
125. Chugh, V., Kaur, N., & Gupta, A. K. (2011). Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian journal of biochemistry & biophysics* **48**(1): 47–53.
126. Duan, X., Wang, Z., Zhang, Y., et al (2022). Overexpression of a Thioredoxin Protein-Encoding Gene, MsTRX, from *Medicago sativa* Enhances Salt Tolerance to Transgenic Tobacco. *Agronomy* **12**:1467. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061467>.
127. Chávez, L & Ramírez, R. (2010). Mecanismos de transducción de señales en plantas afectadas por salinidad y sequía. *ITEA* **106**(3):157-169.
128. Singh, A., Bhatnagar, N., Pandey, A., & Pandey, G. K. (2015). Plant phospholipase C family: Regulation and functional role in lipid signaling. *Cell calcium* **58**(2): 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.04.003>
129. Cid, P., Estévez, J., Aguilar, R. (2017). Investigación en genética y genómica del maíz para su adaptación a deficiencias de nutrientes y condiciones ambientales de valles altos. Conferencia: VII Reunión nacional de maíces nativos. Jala y Jalisco, México.
130. Cambiagno, D.A. (2016). Alteraciones de la cromatina de *Arabidopsis* inducidas por infecciones bacterianas y sus efectos en la activación de las defensas. [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba (UNC)]. Repositorio UNC, Córdoba-Argentina.
131. Agreda, K.A. (2018). Obtención de variedades híbridas asexuales de maíz tolerantes a sequía. [Tesis de Doctorado en Ciencias de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional (IPN)]. Repositorio Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Ciudad de México-México.
132. Suzuki, M., Kao, C. Y., Cocciolone, S., & McCarty, D. R. (2001). Maize VP1 complements *Arabidopsis* *abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *Plant J: for cell and molecular biology* **28**(4): 409–418. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01165.x>.
133. Wang, S., Guo, T., Wang, Z., et al. (2020). Expression of Three *Related to ABI3/VP1* Genes in *Medicago truncatula* Caused Increased Stress Resistance and Branch Increase in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **25**:11:611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00611>.

134. Hu Y. X., Wang Y. X., Liu X. F., Li J. Y. (2004). *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res* **14**: 8–15. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290197>.
135. Li C. W., Su R. C., Cheng C. P., Sanjaya, You S. J., Hsieh T. H., et al. (2011). Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway. *Plant Physiol* **156**: 213–227. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174268>.
136. Gonzalez-Mendoza, D. (2007). El complejo enzimático citocromo P450 en las plantas. *Rev Int de Contam* **23**(4): 177-183. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018849992007000400003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992007000400003&lng=es&tlng=es).
137. Li, Y., Wei, K. Comparative functional genomics analysis of cytochrome P450 gene superfamily in wheat and maize. *BMC Plant Biol* **20**:93 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2288-7>.
138. Li, X., Liu, G., Geng, Y. et al. (2017). A genome-wide analysis of the small auxin-up RNA (SAUR) gene family in cotton. *BMC Genomics* **18**:815 <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4224-2>.
139. Chen, Y., Hao, X., & Cao, J. (2014). Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: identification, evolution, and its phylogenetic comparison with Arabidopsis, rice, and sorghum. *J Integr Plant Biol* **56**(2): 133–150. <https://doi.org/10.1111/jipb.12127>.
140. He, Y., Liu, Y., Li, M., et al. (2021). The Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA32 Protein Regulates ABA-Mediated Responses to Drought Stress. *Front Plant Sci* **12**:625493. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.625493>.
141. Okekeogbu, I.O., Aryal, U.K., Fernández-Niño, S.M.G., et al. (2019). Differential distributions of trafficking and signaling proteins of the maize ER-Golgi apparatus. *Plant Signal Behav.* **14**(12):1672513. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1672513>.
142. Palme, K., Diefhenthal, T., Moore, I. (1993). The ypt Gene Family from Maize and Arabidopsis: Structural and Functional Analysis. *J Exp Bot* **44**:183–195. <http://www.jstor.org/stable/23694154>.
143. Jaiswal, V., Kakkar, M., Kumari, P., et al. (2022). Multifaceted roles of GRAS transcription factors in growth and stress responses in plants. *iScience* **25**(9):105026. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105026>.
144. Zhang, J., Liao, J., Ling, Q. et al. (2022). Genome-wide identification and expression profiling analysis of maize AP2/ERF superfamily genes reveal essential roles in abiotic stress tolerance. *BMC Genomics* **23**, 125. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08345-7>.
145. Wang, T., Ru, J.N., Liu, Y.W., et al. (2018). Maize WRKY Transcription Factor ZmWRKY106 Confers Drought and Heat Tolerance in Transgenic Plants *Int J Mol Sci* **19**(10):3046. <https://doi.org/10.3390/ijms19103046>.
146. Guo, Y., Wu, H., Li, X., et al. (2017). Identification and expression of GRAS family genes in maize (*Zea mays* L.). *PLoS One* **12**(9): e0185418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185418>.
147. Li, Z., Liu, C., Zhang, Y., et al. (2019). The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* **70**(19):5471-5486. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz307>.
148. Kimotho, R.N., Baillo, E.H., Zhang, Z. (2019). Transcription factors involved in abiotic stress responses in Maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era. *PeerJ* **7**: e7211. <https://doi.org/10.7717/peerj.7211>.
149. Schaefer, R. J, Briskine, R., Springer, N.M., Myers, C.L. (2014). Discovering functional modules across diverse maize transcriptomes using COB, the Co-expression Browser. *PLoS One* **9**(6): e99193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099193>.
150. Schaefer, R.J., Michno, J.M., Jeffers, J., et al. (2018). Integrating Coexpression Networks with GWAS to Prioritize Causal Genes in Maize. *Plant Cell* **30**(12):2922-2942. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00299>.

151. Wang, Q. J., Yuan, Y., Liao, Z., et al. (2019). Genome-wide association study of 13 traits in maize seedlings under low phosphorus stress. *Plant Genome* **12**:190039. [https://doi.org/ 10.3835/plantgenome2019.06.0039](https://doi.org/10.3835/plantgenome2019.06.0039).
152. Gupta, N., Zargar, S.M., Salgotra, R.K. et al. (2019). Identification of drought stress-responsive proteins in common bean. *J Proteins Proteom* **10**: 45–53. <https://doi.org/10.1007/s42485-019-00005-x>.
153. Hirsch, C.N., Foerster, J.M., Johnson, J.M., et al. (2014). Insights into the maize pan-genome and pan-transcriptome. *Plant Cell* **26**(1):121-35. [https://doi.org/ 10.1105/tpc.113.119982](https://doi.org/10.1105/tpc.113.119982).
154. Stelpflug, S.C., Sekhon, R.S., Vaillancourt, B., et al. (2016). An Expanded Maize Gene Expression Atlas based on RNA Sequencing and its Use to Explore Root Development. *Plant Genome* **9**(1). [https://doi.org/ 10.3835/plantgenome2015.04.0025](https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025).
155. Baxter, I. (2010). Ionomics: The functional genomics of elements. *Brief Funct Genomics* **9**(2):149-56. [https://doi.org/ 10.1093/bfgp/elp055](https://doi.org/10.1093/bfgp/elp055).
156. Baxter, I., Dilkes, B.P. (2012). Elemental profiles reflect plant adaptations to the environment. *Science* **336**(6089):1661-3. <https://doi.org/10.1126/science.1219992>.
157. Liu, S., Zenda, T., Dong, A., et al. (2021). Global Transcriptome and Weighted Gene Co-expression Network Analyses of Growth-Stage-Specific Drought Stress Responses in Maize. *Front Genet* **2**:645443. [https://doi.org/ 10.3389/fgene.2021.645443](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.645443).
158. Cao, L., Lu, X., Wang, G., et al. (2021). Transcriptional regulatory networks in response to drought stress and rewatering in maize (*Zea mays*L.). *Mol Genet Genomics* **296**: 1203–1219 <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01820-y>.
159. Guo, M., Rupe, M.A, Dieter, J.A., et al. (2010). Cell Number Regulator1 affects plant and organ size in maize: implications for crop yield enhancement and heterosis. *Plant Cell* **22**(4):1057-73. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073676>.
160. Garcia, F (2016). Métodos de análisis de enriquecimiento funcional en estudios genómicos. [Tesis de Doctorado. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia (UV)]. Repositorio UV-Valencia, España.



**ANEXOS**

**UNAM**

Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# Anexo 1.

## Reports

BioTechniques

### Assay system for mesocotyl elongation and hydrotropism of maize primary root in response to low moisture gradient

Mery Nair Sáenz-Rodríguez<sup>1</sup> & Gladys Iliana Cassab López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., 62210, México; \*Author for correspondence: mery.saenz@mail.ibt.unam.mx

BioTechniques 71: 517–527 (October 2021) 10.2144/btn-2021-0034

First draft submitted: 12 April 2021; Accepted for publication: 19 August 2021; Published online: 7 October 2021

#### ABSTRACT

We designed and validated a test system that simulates a growth environment for *Zea mays* L. maize seedlings under conditions of low moisture gradient in darkness. This system allowed us to simultaneously measure mesocotyl elongation and the primary root hydrotropic response in seedlings before the emergence phase in a collection of maize hybrids. We found great variation in these two traits with statistically significant reduction of their elongations under the low moisture gradient condition that indicate the richness of maize genetic diversity. Hence, the objective of designing a new test system that evaluates the association between these underground traits with the potential use to measure other traits in maize seedlings related to early vigor was achieved.

#### METHOD SUMMARY

We describe a new *in vitro* assay system that allows measuring traits of two organs (mesocotyl and primary root) with underground growth in maize seedlings under conditions of low moisture gradient.

#### KEYWORDS:

low moisture gradient • mesocotyl elongation • osmotic potential • potassium carbonate ( $K_2CO_3$ ) • primary root hydrotropism • relative humidity • water potential • *Zea mays* L.

Limited water resources and the ever-growing world population make it mandatory to improve the use of water for cultivated crops to ensure food availability [1–3]. World food depends mostly on the cultivation of cereals, with maize being the third most important food crop after wheat (*Triticum aestivum* L.), and rice (*Oryza sativa* L.), whose productivity is threatened mostly by drought [4,5]. The timing and intensity of the water stress are critical for maize growth, as they are more sensitive to drought at pre-anthesis and grain-filling periods compared with the vegetative growth stages [6–9].

However, the water deficit before and during the vegetative phase can also be devastating. Despite the lower water requirement of young maize seedlings [5,6], water deficit hampers early crop establishment and negatively impacts grain yield potential as a consequence of premature tasseling and a prolonged anthesis-silk interval. In addition, it has been reported that prolonged drought at the seedling stage causes total crop failure [10–12].

The root is the main organ of perception and signaling in response to drought conditions; its function guarantees the survival of the plants. In addition, these are essential for adaptation against other biotic and abiotic stresses [11–15]. In general, plants with deeper root systems extract water from deeper soil layers and help the plants avoid drought stress [13–18]. Both the mesocotyl and the root help establish the emerging seedlings and give a major area of exploration of water sources under deep sown conditions. Furthermore, the mesocotyl directly pushes the shoot tip above the soil surface during germination for its emergence [16–20]. Therefore, untangling the phenotypes and genotypes of these two traits in maize seedlings submitted to water deficit remains pertinent in maize breeding programs for improving early crop establishment in the many arid and semi-arid drought-prone regions of the world [10,21–23]. Phenotyping is a complex process that requires efficiency, speed, thoroughness and great precision to obtain representative data to the breeder on the target traits. This information contributes to understanding the genetics of the tolerance to several types of abiotic and biotic stresses. Unfortunately, scrutiny of underground traits, such as mesocotyl elongation and root hydrotropic response, under realistic field conditions is even more difficult. However, this obstacle becomes a challenge to overcome that stimulates the development of new systems for analysis given the importance of phenotyping and its valuable contribution to breeding programs. Since many component traits of drought tolerance are controlled quantitatively, increasing the accuracy of phenotyping has acquired much attention for improving the



# Reports

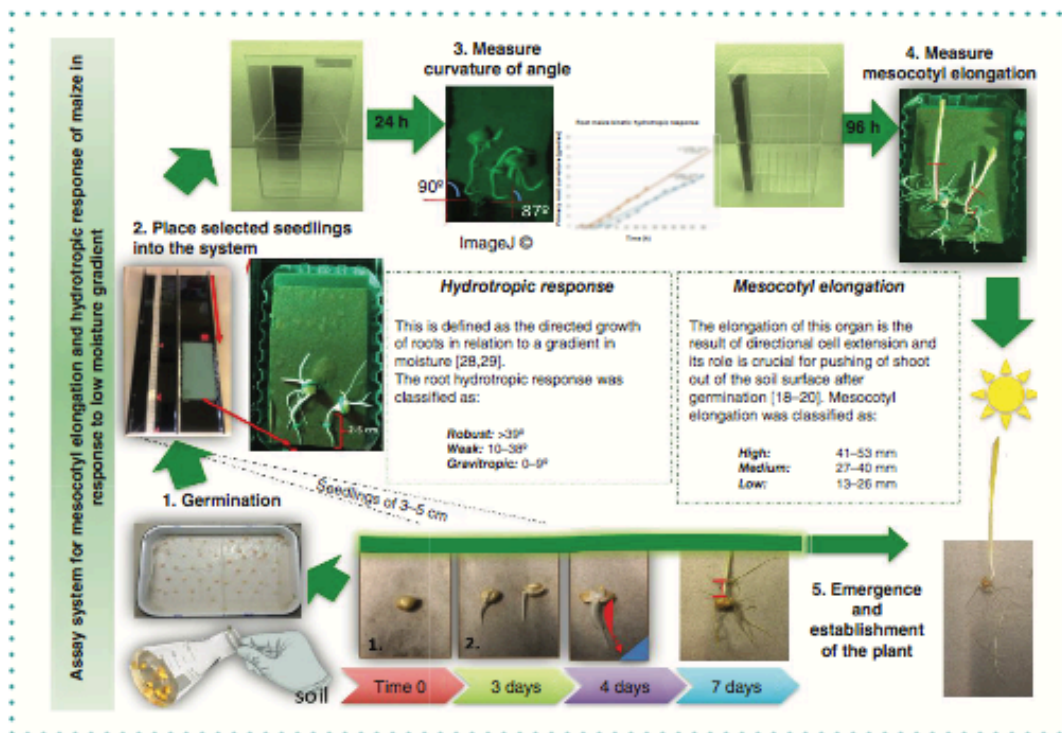


Figure 1. Graphical abstract of the steps of the assay system for mesocotyl elongation and hydrotropic response of maize in response to low moisture gradient. 1. Germination; 2. Place selected seedlings into the system; 3. Measure curvature of angle; 4. Measure mesocotyl elongation; 5. Emergence and establishment of the plant. See the Materials & methods section for more details.

heritability of traits [21-25]. The nondestructive measurement of root capacitance with a portable capacitance meter offers a feasible way of approximating relative differences in the extension of root systems [26-29].

Based on these observations, we first designed an experimental system for simultaneously testing the mesocotyl elongation and the root hydrotropic response in maize seedlings in which the seedling was placed vertically onto a hydrostimulant positioned above the hygroscopic solution to create a moisture gradient [29]. The conditions of our assay have been validated by determining the osmotic potential of the two organs tested under low moisture gradient and control condition (water) (see Supplementary 1) [30,31].

The aim of this study was to understand the effect of low moisture gradient in the development of seedlings and to reveal variations in the mesocotyl elongation and the hydrotropic response of several maize hybrid seedlings, which might arise from their genetic variability in controlled conditions [18-22,32].

The assay system for mesocotyl elongation and hydrotropism of maize primary root in response to low moisture gradient that is described in this article is a novel experimental system since it allows measurement of different traits of maize seedlings such as mesocotyl elongation and root hydrotropic response, as well as other phenotypes like number and length of seminal roots, as well as length of the coleoptile and the plumule, which were not considered for examination in this work (Figure 1). Furthermore, since in this particular assay the height of the acrylic chambers is higher (45 cm) than those reported in 1991 by Takahashi and Scott [28] (24 cm) and in 2015 by Eapen et al. [29] (25 cm), the moisture gradient developed inside the chambers also differed quite substantially because we measured its stability during the test and its relationship with external conditions. In addition, we demonstrated that exposure of mesocotyls and roots to extreme conditions in this assay corresponded directly with their osmotic potential. The characteristics of the analysis indicate that the osmotic potential was also directly proportional to the water potential in them.

However, our assay system allows the analysis of several seedlings simultaneously, and we could change the planting depth of the seedlings, which is not possible in the system that simulates deep planting reported earlier by Boussetol et al. [32] and Nieto-Sotelo et al. [33].

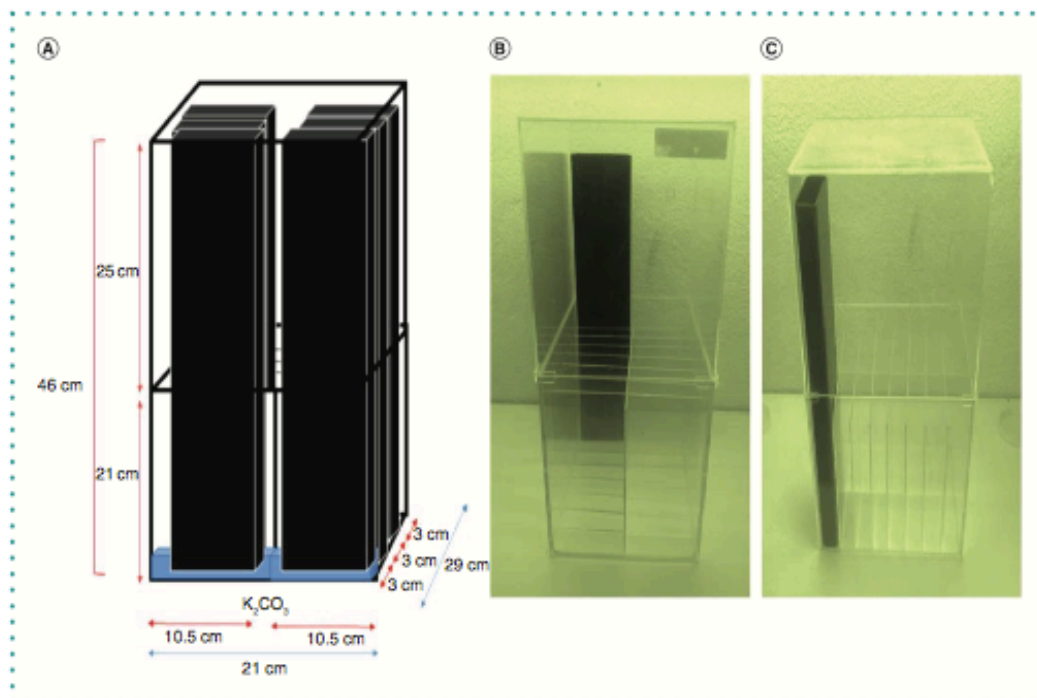


Figure 2. Assay system for measuring mesocotyl elongation and the root hydrotropic response. Cartoon, front and lateral view of the transparent assay acrylic chamber that holds 16 sets of testers.

## Materials & methods

### Plant materials

Maize seeds of 72 hybrid DTMA lines (Drought Tolerant Maize for Africa) were used for this study, which were supplied by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Texcoco, México [34]. In addition, seeds of the inbred line B73 were used as a reference to measure the mesocotyl elongation and the hydrotropic response of the primary root, as well as for future genomic studies given the availability of its complete genome in maize databases [35].

### Reagents & preparation conditions

Reagents used were potassium carbonate ( $K_2CO_3$ ) (ReagentPlus), 99% Sigma-Aldrich and distilled water ( $dH_2O$ ).

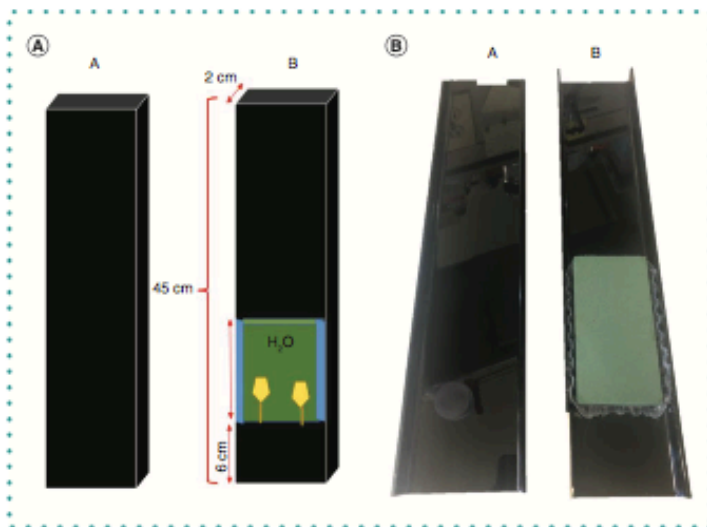
The  $K_2CO_3$  stock solution must be prepared 2 d prior to the start of the test. The solution is prepared by adding 100 mg of  $K_2CO_3$  to 1000 ml  $dH_2O$ , and the salt is added until the solution attains a density of  $1.50 \text{ g/cm}^3$ . The solution was stored at room temperature until used. After finishing the assay, the solution was recycled by re-adjusting the aforementioned density.

### Equipment

We designed an enclosed assay system for maize seedlings, which allowed examining the mesocotyl elongation and the root hydrotropic response in the same seedling. It was inspired by the pot culture comprising a PVC pipe that is regularly used for deep planting at various deep lengths by Ali *et al.* [36] and by the Takahashi and Scott [28] assay system reported in 1991, and modified by Eapen *et al.* [29,37].

Our system consists of a transparent acrylic chamber of 3.0 mm of thickness and a volume space of  $0.028 \text{ m}^3$  (its dimensions are 21 cm of length x 29 cm of width x 46 cm of height) (Figure 2) with a lid that contained 16 black acrylic boxes with two complementary parts (A and B), such as a sandwich that is adjusted and inserted vertically in it (Figure 3A). The black acrylic boxes have a part A (45 cm in height, 7.3 cm in width, 2.5 cm in depth) and a part B (45 cm in height, 7.1 cm in width, 2.5 cm in depth), which are placed opposite to each other (Figure 3B). Additionally, the B part has a plastic support for a floral foam (hydrostimulant agent). This is located at 6 cm of the bottom chamber and at 26 cm of its upper edge that enables mesocotyl elongation and development of other organs, such as the coleoptile, the plumule, and lateral and seminal roots [18–20,38].

## Reports



**Figure 3.** Black acrylic boxes used for testing. (a) Cartoon of the boxes utilized in the assay. Every box contained two complementary parts (A: 45 cm in height, 7.3 cm in width, 2.5 cm in depth; B: 45 cm in height, 7.1 cm in width, 2.5 cm in depth) in a sandwich style that are adjusted and inserted vertically in a transparent acrylic chamber with a lid. (b) Photograph of the boxes showing how the hydrostimulant is placed in part B.

A piece of green floral foam (Oasis®; 13 cm in height, 7 cm in width, 1 cm in depth) was completely saturated for 10 min with distilled water as the only source of water for the maize seedlings. This foam represents the hydrostimulant factor within the system. The floral foam was covered with a sheet of craft paper with dimensions similar to this in order to protect the seedling from abrasion during assembly (Figure 4). We use plasticized pins and wires to fix the seedlings to the floral foam.

Humidity inside the chamber was monitored with a hygrometer (Traceable Memory, Control Company, USA), and the environmental data was collected to calculate the relative humidity (RH). The Vapor Pressure Osmometer (Wescor VAPRO Model 5600, Wescor, Inc., UT, USA) was used for measuring the osmolality of the plant tissues following the instructions of the manufacturer, and we standardized a protocol for mesocotyl and root tissues [30,31].

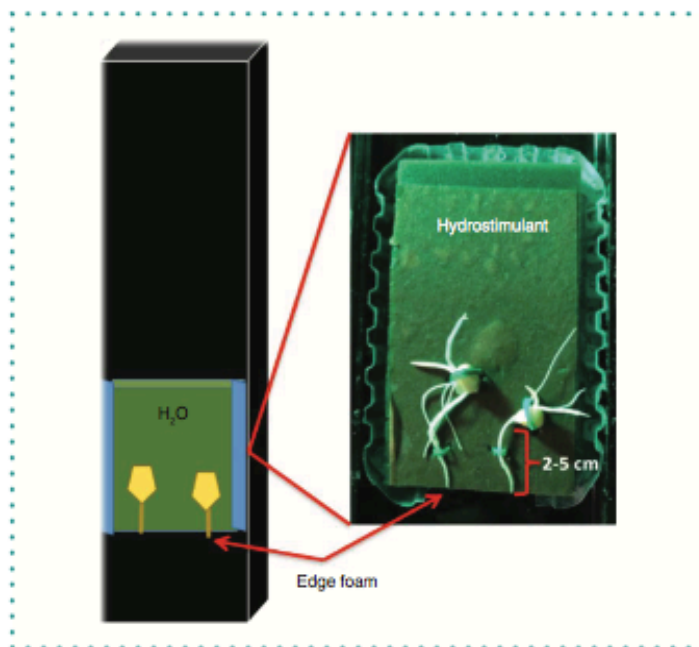
A digital Nikon camera D6000 was used for taking photographs of the root hydrotropic response and mesocotyl elongation after 24 and 96 h of stimulation, respectively. The images were taken in the presence of green light and without flash to avoid the inhibition of mesocotyl and root elongation since these tissues are highly susceptible to other wavelengths [37–41]. The photographs were analyzed with ImageJtx software. This software measured the mesocotyl length in millimeters and the curvature angle in degrees for the root hydrotropic response after establishing a standard of measurement [41].

### Growth conditions

Initially, 45 maize seeds from 72 hybrid DTMA were selected for every line, and they were washed with distilled water and shaken three-times to remove impurities. They were disinfected in 25 ml of sodium hypochlorite (NaClO) at 15% (v/v) for 4 min, then this solution was discarded and washed with distilled water five-times. Subsequently, the seeds were immersed in 15 ml of 0.17% (v/v) fungicide solution (BANROT) for 15 min, then the solution was poured into a special container due to its toxicity. While the seeds were in contact with the fungicidal solution, the germination bed was prepared. To do this, a metal tray was flamed with absolute ethanol, and when the temperature dropped, it was covered with three layers of paper towels, which were moistened with 200 ml of distilled water to keep the seeds moist.

The seeds were interspersed at a distance of 3 cm on the paper towels in the tray with the radicle down, then it was covered with aluminum foil, labeled and placed at an angle of inclination between 30 and 40° in darkness. The temperature was maintained at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  for 3 days of incubation or more, until the primary roots were between 2 and 5 cm long. At the end of the process, the germination percentage was calculated. (See the protocol for maize seed germination where it is described in more detail in Supplementary Data 2).





**Figure 4.** Hydrostimulant is a green floral foam (Oasis®) saturated in water. The hydrostimulant is 13 cm in height, 7 cm in width and 1 cm deep, and it was wrapped with a piece of craft paper to protect maize seedling from abrasion during assembly. Paper and floral foam were saturated for 10 min with distilled water before use. The kernel was fixed with the help of pins and plasticized wires. The root was oriented downward, and its tip was placed approximately 1 mm down the edge of the floral foam.

#### Development of the assay

Seedlings with primary roots between 2 and 5 cm long was a selection criterion to begin the trial. The initial size of the mesocotyl in the seedlings was not considered (its quantification is difficult in very young seedling since its dimension is in micrometers, and although the scutellar node is visible, the coleoptilar node is not yet evident) (18–20).

Two seedlings were mounted on each hydrostimulant foam adhered to the wall support in the B part of the black acrylic boxes until 10 seedlings were available for each test. The seedlings were fixed with the help of pins and plasticized wires, and the roots were oriented downward and their tips were placed approximately to 1 mm below the bottom edge of the floral foam. Then, the A part was ensembled with the B part for introducing them later into the transparent acrylic chamber (Figures 2 & 3).

Previously, we carefully added 800 ml of  $K_2CO_3$  solution into the large acrylic chamber, then the black acrylic boxes with the seedlings fixed were cautiously placed vertically inside this chamber for avoiding splashes. The distance between the edge of the hydrostimulant and the level of the solution surface was kept at 6 cm and confirmed with a marker. The control experimental condition contained 1600 ml of distilled water instead of the saturated  $K_2CO_3$  solution and the same numbers of seedlings under the same test conditions. Simultaneously, both transparent acrylic chambers were mounted and closed with their respective lids and covered with a black cloth.

The experiment was carried out at  $26^\circ C \pm 2^\circ$  for 96 h in the dark with a unique interruption of the dark condition after 24 h of the process for a period of less than 20 min when the seedlings were exposed to green light with the purpose of taking the photographs for the analysis of the hydrotropic response of the root (angle of curvature) (see Supplementary Data 3).

The time established to measure mesocotyl elongation was defined in relation to previous tests in pots, where it was observed that the emergence period in DTMA hybrids occurred approximately 7 days after sowing. Therefore, we define the time for the determination of this trait after 96 h in the system since by adding the 3 days of germination gives a total test time of 7 days.

In addition, we measured the percentage of relative humidity (%RH) of the system during the entire period of the experiment in three specific zones to verify the stability of the gradient and the percentage of humidity within the chambers (Figure 5). The areas measured were the following:

- Zone A: area corresponding to the bottom of the chamber and where the hygroscopic solution was deposited;
- Zone B: area of the floral sponge where the seedlings were attached, between 6 and 8 cm from the bottom of the chamber;

## Reports

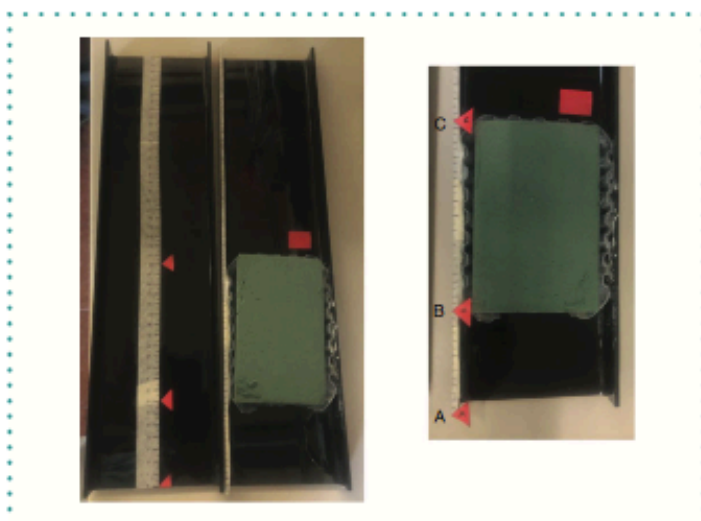


Figure 5. Floral foam zones measured for the percentage of relative humidity (% RH): zones A, B and C. Zone A: chamber bottom (hydrotropic solution); zone B: area of the seedling where they were attached, between 6 and 8 cm from the bottom of the chamber; zone C: upper area of the floral sponge (hydrostimulant), 19 cm above the chamber bottom.

Table 1. Percentage of relative humidity (%RH) measured in three zones of the black box into the test system.

Zone	A	B	C
Temperature °C	27 ± 2	27 ± 2	27 ± 2

Zone A: area corresponding to the bottom of the chamber and where the hygroscopic solution was deposited; Zone B: area of the floral sponge where the seedlings were attached and located between 6 and 8 cm from the bottom of the chamber; Zone C: upper area of the floral sponge (hydrostimulant) located 19 cm above the chamber bottom.

- Zone C: upper area of the floral sponge (hydrostimulant), 19 cm above the chamber bottom.

Finally, the plant material was recollected after 96 h to validate the conditions of the assay system by measuring the osmotic potential in both mesocotyls and primary root tissues submitted to the experimental conditions (see Supplementary Data 4).

## Results & discussion

### Measurement of RH percentage

The conditions in the assay chambers quickly reached an RH of 100%, which in the control system remained at levels higher than 98% during the test period given the water saturation environment. The test chamber containing 800 ml of  $K_2CO_3$  solution maintained a relatively stable humidity gradient during the total time of the assay. We measured three specific zones to verify the stability of the gradient and the degree of humidity within the chambers (Figure 5). The results obtained from the measured areas are shown in Table 1. Zone A showed the minor %RH since it was in direct contact with the concentrated hygroscopic agent. Zone B presented %RH levels higher than the previous one and was defined by the presence of seedlings subjected to the hydrostimulant (water saturated foam), which together with the water vapor present in the system are the sources of water in the test chamber. The hygroscopic solution absorbed the water molecules available in the chamber, and this made it possible to simulate an environment with a low humidity gradient [42–44]. Zone C exhibited RH levels above 98% that corresponded to the upper edge of the water-saturated floral foam, which was farther away from the seedlings/foam and the hygroscopic solution.

Our test system is not airtight or totally enclosed, and therefore it is influenced by external environmental conditions [43–45]. Therefore, to establish the %RH within it, we used the average data of temperature and external humidity during the assay period (Table 2).

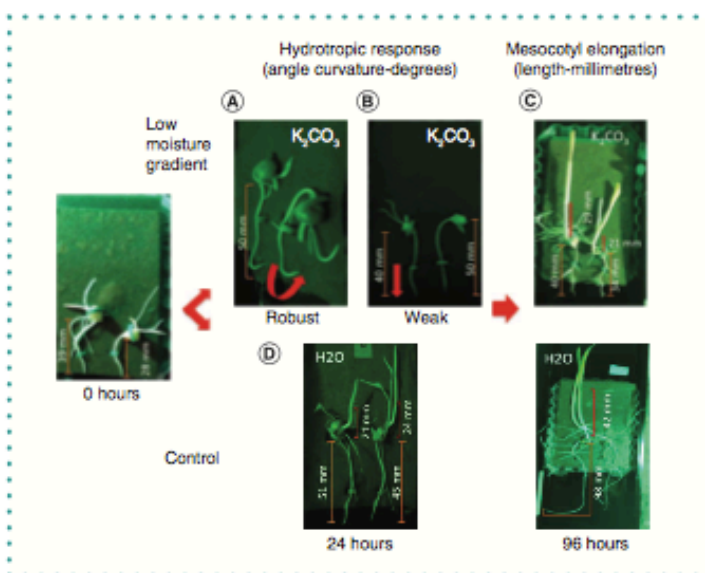
The calculated a %RH of 39.7 was compared with the data from the records of the test area that were between 30 and 40% RH. However, this result must be handled with care since we found fluctuations between 38 and 45% RH, probably due to changes in the external temperature [43–46].

Humidity is an important environmental factor for the growth and development of plants, which has been not been fully studied in seedlings, and it is a parameter difficult to control in field conditions [44–46].

**Table 2. External and internal parameter calculations of the test system.**

Calculus	
External data	
Temperature	25° C
% RH	45%
H <sub>2</sub> O g/kg of air	8.98 g/kg
Chamber assay	
Temperature inside chamber	27° C
%RH inside chamber	39.70%
Volume	0.028 m <sup>3</sup>

Temperatures in Celsius degrees, percentages of relative humidity, calculation of water in g/kg of external air and volume of the assay chamber in cubic meters.



**Figure 6. Measurement of hydrotropic curvature and mesocotyl elongation.** Hydrotropic response after 24 h (angle curvature in degrees): robust response (angle curvature of more than 39° (A); weak response (angle curvature of less than 39°) (B). Mesocotyl elongation after 96 h (length-mm): this was grouped into high (41–53 mm), medium (27–40 mm) and low (13–26 mm) elongation (C); for control treatments, water was used instead of the saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution in which seedling roots did not develop a hydrotropic curvature and their growth mostly followed the gravity vector (D).

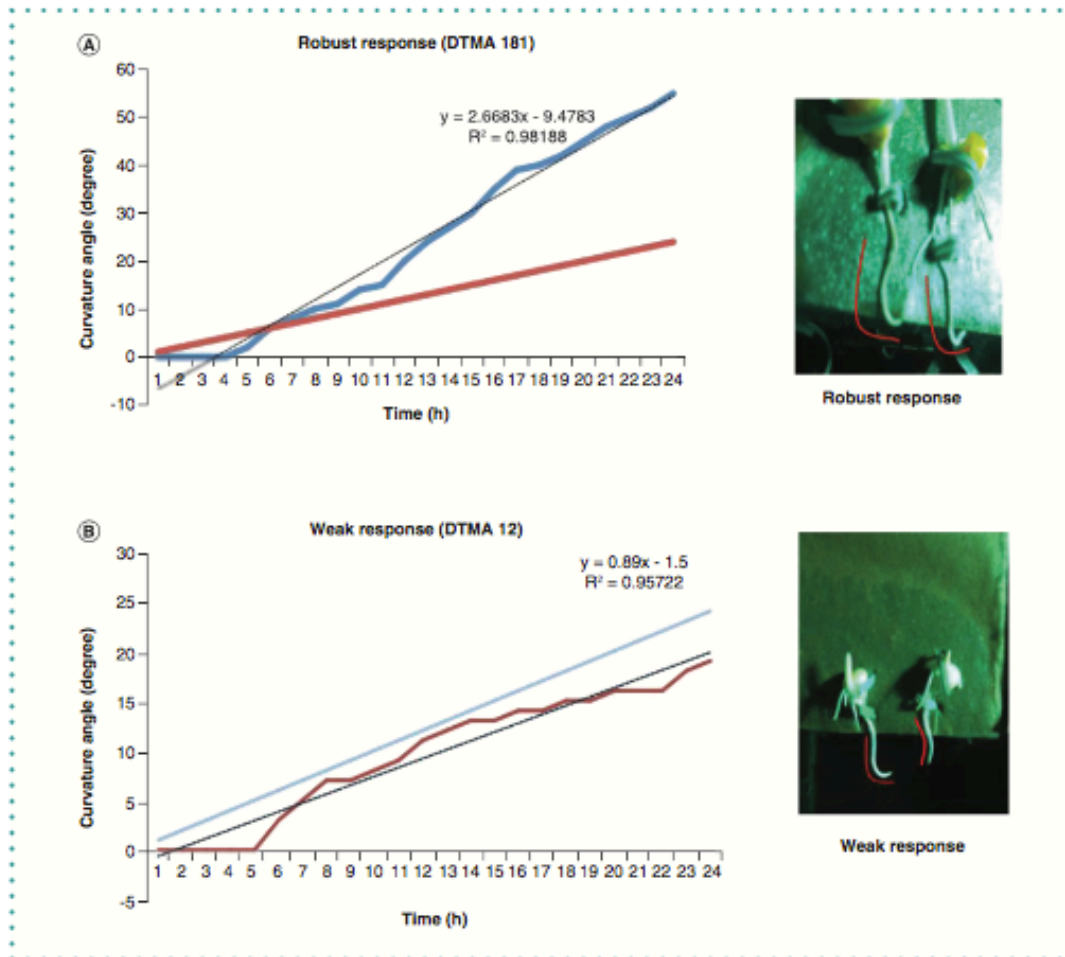
**Table 3. Classification for the root hydrotropic response and mesocotyl elongation in the two-trait assay in the presence of a saturated solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.**

Trait	Hydrotropic response (angle of curvature-degree)		Mesocotyl elongation (mm)	
Groups	Robust	>39°	High	41–53 mm
	Weak	10–38°	Medium	27–40 mm
	Gravitropic	<10°	Low	13–26 mm

of 12

Initially, we determined the root hydrotropic response, using 10 seedlings from each maize line after 24 h from the start of the test (Figure 6). The magnitude of the hydrotropic response varied among the DTMA maize hybrids, which allowed classifying their response into two groups. The first group called robust hydrotropic response corresponds to maize roots with curvature angles greater than 39°, and a second group of maize roots that developed curvatures of less than 39° are designated with a weak hydrotropic response within the test system toward the hydrostimulant agent. Few cases of maize roots without response to hydrotropic stimulation were observed, which was related to complete inhibition of their root growth (Table 3). All maize roots tested in the control test system in the

## Reports



**Figure 7. Kinetic curves of the primary root hydrotropic response.** Graphs of curvatures angles (degrees) during 24 h. Hydrotropic curvatures were measured hourly on two DTMA maize hybrids with contrasting hydrotropic responses (DTMA 181 with a robust hydrotropic response and DTMA12 with weak hydrotropic response). (A) DTMA 181 with a linearity of  $R^2$ : 0.98 (solid blue line: linear behavior of the experimental data; solid red line: theoretical linearity). (B) DTMA 12 with a linearity of  $R^2$ : 0.95 (solid red line: linear behavior of the experimental data; solid blue line: theoretical linearity).

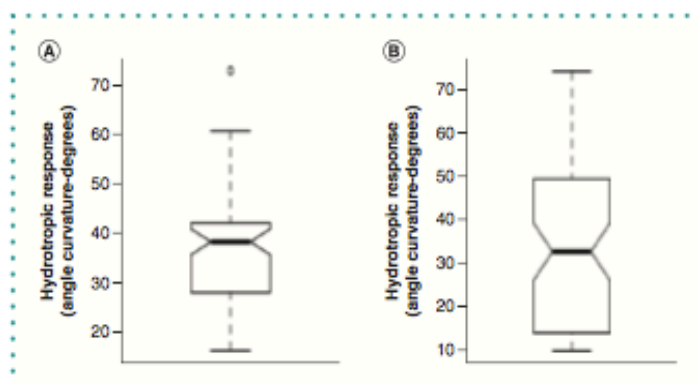
presence of water showed orthogravitropic growth (the parallel alignment of growth with the gravity vector) [42–44,47].

The time course used (after 24 h) was established taking as a parameter the kinetic curve previously carried out with the DTMA 183 that was drawn along the kinetic curve reported for *Arabidopsis thaliana* in other experimental systems (see Supplementary Data 2) [47]. This study showed the importance of verifying and evaluating the hydrotropic response in relation to other plant species and the experimental method for data collection [42–48].

We simultaneously performed the kinetic curves of hydrotropic responses between individuals with contrasting responses (Figure 7A). We selected the DTMA 181 with a robust response and the DTMA 12 with a weak response, which had already been tested in field conditions by Eapen et al. [29]. There were no significant differences in the curvature of the root toward the greater water gradient (floral foam) or in the times of its development. Furthermore, root elongation after 24 h did not show differences with the final elongation with a mean of 35.81 mm (weak response) and 38.65 mm (robust response), respectively.

However, a predominant gravitropic growth was observed in weak DTMA hybrids, whereas in some robust DTMA hybrids, a curvature with high affinity to the hydrostimulant agent was observed (Figure 7B).





**Figure 8.** Box plot of the comparative hydrotropic response of this new two-trait assay with the single-trait assay used in our laboratory. (A) Hydrotropic response in the new two traits assay (mean: 36.09°). (B) Hydrotropic response in the assay for only one trait (mean: 33.02°). The hydrotropic response data from DTMA hybrids in the two assays did not show statistically significant differences between them ( $p: 0.2397$ ;  $t: 1.1825$ ). Therefore, the hydrotropic responses were reproducible in both assays, and the hybrids were classified into the same hydrotropic response groups (either robust or weak).

**Table 4.** Hydrotropic curvature and mesocotyl elongation observed in the two-trait assay for the 72 DTMA hybrids.

Hydrotropic response (angle of curvature-degree)		Responses			DTMA total
Robust	Weak	Low	Medium	High	
36	36	16	38	18	72

The hydrotropic response showed 36 DTMA hybrids of maize with robust hydrotropic response and 36 DTMA with weak hydrotropic response, whereas for mesocotyl elongation they were grouped into low elongation: 16 DTMA hybrids, medium elongation: 38 DTMA hybrids, and high elongation: 18 DTMA hybrids of maize.

We compared our data from the same DTMA hybrids that were obtained using the experimental system reported by Eapen et al., and we did not find statistically significant differences among them (Figure B) [42–44]. Hence, the responses were reproducible and the hybrids were classified into the same hydrotropic response groups (either robust or weak). One of the advantages of our new system assay is that it allows us to measure the traits of the entire seedling over a period of more than 24 h [28,42].

#### Determination mesocotyl elongation at 96 h

We then analyzed the mesocotyl elongation of the 72 DTMA hybrids of maize at 96 h in the assay system using 10 seedlings from each line (Figure 5). The magnitude of their elongation response varied among the DTMA lines since some mesocotyls showed higher length (mm), whereas others exhibited medium length (mm) or lower length (mm) and the direction of their growth was in the opposite direction of the gravity vector (negative gravitropism) (Table 4).

The mesocotyl elongation of DTMA hybrids compared with mesocotyl elongation greater than 20 cm reported in native maize such as Hopi maize and some races of Palomero toluqueño turns out to be very low [32,48]. This trait places hybrids at a disadvantage since they do not have the capacity to take advantage of soil resources under the deep seeding practice and indicates the need to explore genetic diversity for the benefit of modern maize breeding [32,33,48].

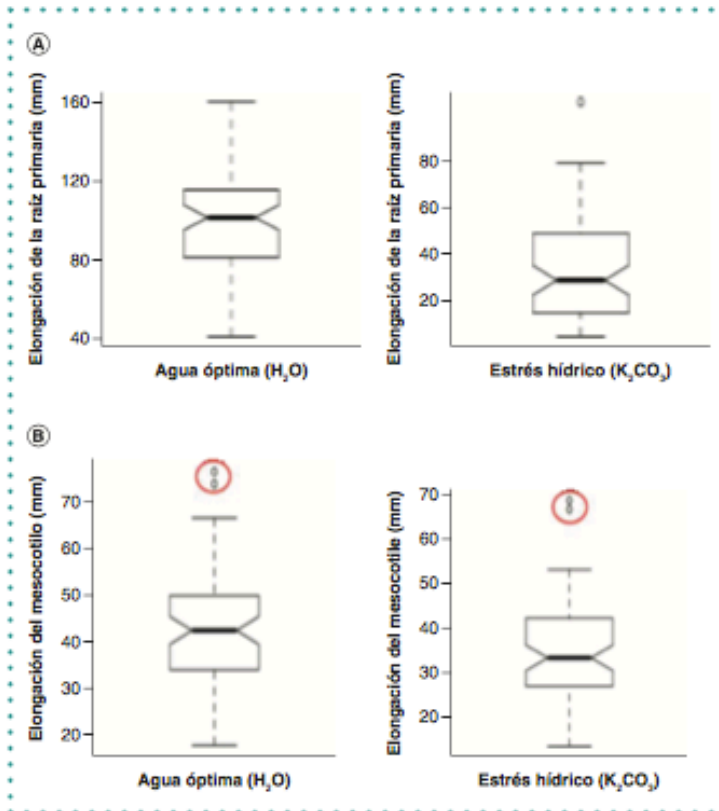
The design of the assay system permits the growth of organs such as mesocotyls greater than 20 cm in length and also gives the possibility of playing with the anchor distance of maize seedlings to the hydrostimulant. It could also be used in future tests to measure the growth of mesocotyl of seedlings placed at different heights, simulating different planting depths [41,49].

Furthermore, the experimental conditions permit evaluation of statistically significant differences in the elongation of the two organs analyzed. The low humidity gradient reduced the growth of seedlings in comparison with those in the control system with water. Primary root growth was much more inhibited than the mesocotyl in the presence of the low humidity since roots were exposed to the lowest %RH in the chamber (Figure 9) [26,36].

#### Determination of osmotic potential

To tolerate osmotic stress resulting from water stress, seedlings make osmotic adjustment by accumulating solutes to maintain pro-toplast volume and turgor pressure [30,31]. Hence, to validate the consequences of exposing maize seedlings to low moisture gradient conditions in our assay system, we measured the osmotic potential of the primary root and the mesocotyl. Therefore, we tested two

## Reports



**Figure 9.** Growth of primary root and mesocotyl in the assay with low moisture gradient conditions (saturated solution K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) and in control conditions (water). (a) Root elongation in control (mean: 99, 0') and in low moisture (mean: 33, 1') conditions. Their elongation shows statistically significant differences between them ( $p$ : 0,001;  $t$ : 16,619). (b) Mesocotyl elongation in control (mean: 42, 3 mm) and in low moisture (mean: 33, 2 mm) conditions. Elongation of mesocotyl was not negatively influenced by the presence of the low moisture gradient conditions as was those of roots ( $p$ : 0,001;  $t$ : 4,6).

DTMA corn hybrids with contrasting hydrotropic responses (DTMA 12: weak hydrotropic response and DTMA 179: robust hydrotropic response) under low-moisture gradient conditions (see Supplementary Data 3). In our case, the osmotic potential was comparable to the water potential ( $\Psi_w$ ) due to the nature of the study since it was considered the influence of atmospheric pressure, the matrix and gravitational potentials to be insignificant due to the absence of the matrix, the low influence of gravity and low seedling height. The results expressed as water potential in optimal water conditions (control) were  $\Psi_w$ : -1.2 to 1.4 J m<sup>-3</sup>, and in extreme water stress conditions in the low moisture gradient system, the results were  $\Psi_w$ : -4 to -6 J m<sup>-3</sup>, which are levels similar to those conditions found inside the tissues of the plants living in deserts [30–48].

The mesocotyl elongation and the root hydrotropic response are fundamental processes in plants, which can be used as indicators for the implementation of deep planting and tolerance to conditions of low moisture gradient [19,20,43].

The molecular mechanisms that regulate these two traits are still not entirely clear and their study in their natural environment is expensive and difficult to control, thus the design and implementation of this new *in vitro* assay system provide statistically sound data collection whose variables are controlled. In addition, this experimental assay could take advantage of new bioinformatic tools to predict possible mechanisms and molecular networks involved [39–42].

The success of our assay system depended on establishing the right conditions to quantify the two traits of interest. However, the determination of the effects related to the interaction between neighboring plants, the rhizosphere, and the micro and macro fauna that turn out to be key factors in the water acquisition and flow processes are limiting within most *in vitro* systems and ours. There is still much to optimize to achieve an ideal system [50,51].

This new assay system fulfills the purpose for which it was designed since its simplicity makes it a versatile and economical tool to measure more traits, such as seminal and lateral root length in maize seedlings. We consider that this system could also improve and maximize control variables for measuring other conditions of underground traits that contribute to early vigor.

There is currently no ideal system yet; our system was specifically designed for the pre-emergence period. Based on our observations, it is possible to maintain the growth of the plant for a month and maintain the conditions of low humidity gradient. However, under control conditions (water), the size of the chamber affects the elongation of its organs. We do not know yet whether the conditions of our assay can be applicable to measure the traits analyzed under field conditions. We are planning to perform a field experiment in the near future in which we will apply deep seeding and decrease irrigation of different maize lines.

#### Executive summary

- The phenotyping of both mesocotyl elongation and hydrotropic root response can be used as traits for genomic studies and plant breeding of maize.
- The water flow is dynamic, and its relationship with the hygroscopic agent, air, temperature and the seedling maintains the stability of the low humidity gradient and therefore the experimental conditions of the assay system.
- The external conditions must be considered since they exert pressure on the internal conditions of the assay system and thus on the development and growth of seedlings.
- Mesocotyl elongation was more resistant to the low humidity gradient than roots.
- Maize plasticity is reflected in the variety of responses to the low humidity gradient condition, which are of interest to understand the mechanism of the plant's capability to grow differentially toward water and to survive.

#### Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: [www.future-science.com/doi/suppl/10.2144/btn-2021-0034](http://www.future-science.com/doi/suppl/10.2144/btn-2021-0034)

#### Author contributions

MN Sáenz-Rodríguez and GI Cassab established the protocol and the conditions for determining both the mesocotyl elongation and the root hydrotropic response under the presence of a low moisture gradient. In addition, the authors refined the protocol for measuring osmotic potential in the tissues analyzed. MN Sáenz-Rodríguez wrote the manuscript, and GI Cassab edited it.

#### Acknowledgments

The authors are very grateful to CIMMYT for maize seed donation. We sincerely thank Jorge Nieto-Sotelo and his colleagues at the Institute of Biology, Botanical Garden, UNAM for introducing us to the spellbinding world of maize deep planting. We also acknowledge Delfeena Eapen and M. C. Jesus Martínez for their preliminary work in the design of the hydrotropic assay system for maize and their continuous support during the development of this work. We would like to express our enormous gratitude to Alejandra Covarrubias and her colleagues, who allowed us to use their osmometer equipment and their facilities. We are also extremely grateful to the maize team of the laboratory, especially to María Eugenia Campos, Laura Noriega-Calixto, Claudia Puentes and Carmela Gante for their invaluable support. We would also like to express our enormous gratitude to Juan Manuel Hurtado for his excellent computer assistance.

#### Financial & competing interests disclosure

This work was supported in part by a grant of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México: PN 247732, and by a grant of Dirección General de Asuntos del Personal Académico: PAPIIT-UNAM #IN 214119. MN Sáenz-Rodríguez was supported by a fellowship from Becas Rodolfo Llinás para la promoción de la formación avanzada y el espíritu científico en Bogotá, Fundación Ceiba: SGR Colciencias DNP: BPIN 2013000100210 and from PAPPIT-UNAM #IN 214119. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

#### References

Papers of special note have been highlighted as: ✦ of considerable interest

1. Messmer R, Fracheboud Y, Bänziger M, Vargas M, Stamp P, Ribaut JM. Drought stress and tropical maize: QTL by environment interactions and stability of QTLs across environments for yield components and secondary traits. *Theor. Appl. Genet.* 119(5), 913–930 (2009).
2. Sawkins MC, Julien DM, Ribaut JM. Drought adaptation in maize. In: *Drought Adaptation in Cereals*. Ribaut JM (Ed.). CRC Press, FL, USA, 259–299 (2006).
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Database. Rome, Italy: FAO. <http://faostat.fao.org/default.aspx>



# Reports

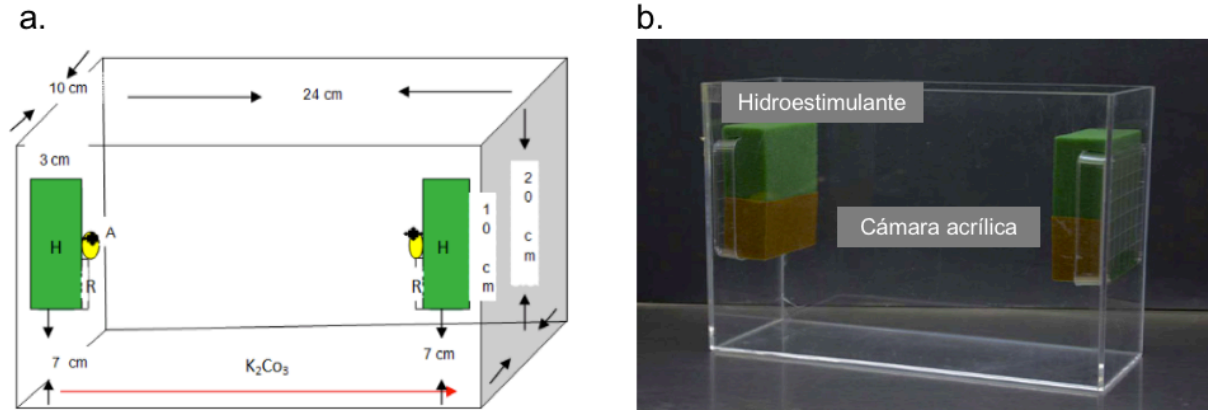
- Fahad S, Bajwa AA, Nazir U et al. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Front. Plant Sci.* 8, 1147 (2017).
- Song L, Jiming J, Jianqiang H. Effects of severe water stress on maize growth processes in the field. *Sustainability* 11(18), 1–18 (2019).
- Çakir R. Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn. *Field Crops Res.* 89, 1–16 (2004).
- Li Y, Tao H, Zhang B, Huang S, Wang P. Timing of water deficit limits maize kernel setting in association with changes in the source-flow-sink relationship. *Front. Plant Sci.* 9, 1326 (2018).
- Moser SB, Boy F, Jampatong S, Stampa P. Effects of pre-anthesis drought, nitrogen fertilizer rate, and variety on grain yield, yield components, and harvest index of tropical maize. *Agr. Water Manage.* 81, 41–58 (2006).
- Sah RP, Chakraborty M, Prasad K et al. Impact of water deficit stress in maize: phenology and yield components. *Sci. Rep.* 10, 2944 (2020).
- Edmeades GO, Bolanos HR, Lafitte S et al. Traditional approaches to breeding for drought resistance in cereals. In: *Drought Resistance in Cereals*. Baker FW (Ed.), ICSU and CAB, Wallingford, UK, 27–52 (1989).
- Zenda T, Liu S, Wang X et al. Key maize drought-responsive genes and pathways revealed by comparative transcriptome and physiological analyses of contrasting inbred lines. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1258 (2019).
- Avramova V, Kerstin AN, AbdElgawad H et al. Screening for drought tolerance of maize hybrids by multi-scale analysis of root and shoot traits at the seedling stage. *J. Exp. Bot.* 67, 2453–2466 (2016).
- Kymast RO. Handbook of maize: its biology. *Ann. Bot.* 109(7), 590 (2012).
- Akinwale RO, Awosanni FE, Ogunniyi OO, Fadoju AO. Determinants of drought tolerance at seedling stage in early and extra-early maize hybrids. *Maydica* 62, 1–9 (2017).
- Lamers J, Van der Meer T, Testerink C. How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiol.* 182, 1624–1635 (2020).
- Wasaya A, Zhang X, Fang Q, Yan Z. Root phenotyping for drought tolerance: a review. *Agronomy* 8, 241 (2018).
- Sánchez-Blanco MJ, Alvarez S, Ortúño MF, Ruiz-Sánchez MC. Root system response to drought and salinity: root distribution and water transport. In: *Root Engineering: Soil Biology*. Morla A, Varma A (Eds.), Springer, Heidelberg, Germany, 325–352 (2014).
- Sáenz-Rodríguez MN, Cassab GI. Primary root and mesocotyl elongation in maize seedlings: two organs with antagonistic growth below the soil surface. *Plants* 10, 1274 (2021).
- Ohn H, Banayo N, Bueno CS et al. Longer mesocotyl contributes to quick seedling establishment, improved root anchorage, and early vigor of deep-sown rice. *Field Crops Res.* 228, 84–92 (2018).
- Niu L, Hao R, Wu X, Wang W. Maize mesocotyl: role in response to stress and deep-sowing tolerance. *Plant Breed.* 139(3), 456–473 (2020).
- Maiti RK, Maiti LE, Sonia M et al. Genotypic variability in maize (*Zea mays* L.) for resistance to drought and salinity at the seedling stage. *J. Plant Physiol.* 148, 741–744 (1996).
- Hallauer AR, Carena MJ. Maize breeding. In: *Handbook of Plant Breeding: Cereals*. Carena MJ (Ed.), Springer, NY, USA, 3–128 (2009).
- Tuberosa R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front. Physiol.* 3, 347 (2012).
- Sah RP, Chakraborty M, Prasad K et al. Impact of water deficit stress in maize: phenology and yield components. *Sci. Rep.* 10, 2944 (2020).
- Li Z, Xu W, Xue B, Cao P. Discuss on evaluating method to drought-resistance of maize in seedling stage. *J. Maize Sci.* 12, 73–75 (2004).
- Judd LA, Jackson BE, Forteno WC. Advancements in root growth measurement technologies and observation capabilities for container-grown plants: a review. *Plants* 4, 369–392 (2015).
- Paez-Garcia A, Motes CM, Scheible WR et al. Root traits and phenotyping strategies for plant improvement. *Plants* (Basel, Switzerland) 4, 334–355 (2015).
- Takahashi H, Scott TK. Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiol.* 96, 558–564 (1991).
- Eapen D, Martínez J, Cassab GI. Assays for root hydrotropism and response to water stress. In: *Plant Gravitropism Methods and Protocols*. Blancafor E (Ed.), Springer, NY, USA, 133–142 (2015).
- Ogawa A, Yamachi A. Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings 1. Transient change of growth and water relations in roots in response to osmotic stress. *Plant Prod. Sci.* 9, 27–38 (2006).
- Castro-Camus E, Palomar M, Covarrubias A. Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored in-vivo using terahertz time-domain spectroscopy. *Sci. Rep.* 3, 2510 (2013).
- Boussetlot J, Muenchrath D, Knapp A, Reeder J. Emergence and seedling characteristics of maize native to the southwestern US. *Am. J. Plant Sci.* 8, 1304–1318 (2017).
- Nieto-Sotelo J, Martínez DA, Cruz CA, Vazquez L. Prácticas agrícolas tradicionales y la conservación de maíces nativos en México. In: *Sistemas Agroalimentarios Localizados y prácticas agrícolas tradicionales. Hacia una propuesta de política pública para el desarrollo rural*. Tolentino JM, Larrea RM, Renard MC, Del Valle MC (Eds.), Red SIAL-México, Ciudad de México, México, 176–200 (2018).
- Cairns JE, Crossa J, Zaidi PH et al. Identification of drought, heat and combined drought and heat tolerance donors in maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 53, 1335–1346 (2013).
- Portwood JL, Woodhouse MR, Cannon EK et al. MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res.* 47(D1), D1146–D1154 (2018).
- Ali ML, Laetichens J, Singh A et al. Greenhouse screening of maize genotypes for deep root mass and related root traits and their association with grain yield under water-deficit conditions in the field. *Euphytica* 207, 79–94 (2016).
- Eapen D, Martínez JJ, Hernández O, Flores L, Nieto Sotelo J, Cassab GI. Synergy between root hydrotropic response and root biomass in maize (*Zea mays* L.) enhances drought avoidance. *Plant Science* 265, 87–99 (2017).
- Lee HS, Sasaki K, Kang JW et al. Mesocotyl elongation is essential for seedling emergence under deep-seeding condition in rice. *Rice* 10, 32 (2017).
- Martínez JJ. Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotópica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS) (tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca-Morelos, México (2019).
- Castro J, López MC, González VA. Evaluación morfo-fisiológica de brotes de maíz sometidos a selección in vitro bajo estrés osmótico. *Rev. Fitotec. Mex.* 32, 281–288 (2009).
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9(7), 671–675 (2012).
- Perez-Harguindeguy N, Diaz S, Garnier E et al. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* 61, 167–234 (2013).
- Cooper JD. *Soil Water Measurement: A Practical Handbook*. Wiley, NJ, USA (2016).
- Hawkins HJ, Hettasch H, West AG, Cramer MD. Hydraulic redistribution by Protea "Sylvia" (Proteaceae) facilitates soil water replenishment and water acquisition by an understory grass and shrub. *Funct. Plant Biol.* 36(8), 752–760 (2009).
- Lind KR, Lee N, Sizmur T et al. Plant growth environments with programmable relative humidity and homogeneous nutrient availability. *PLoS One* 11(6), e0155960 (2016).
- Tricker PJ, Gibbins JG, Rodríguez López CM, Hadley P, Wilkinson MJ. Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J. Exp. Bot.* 63(10), 3799–3813 (2012).
- Antoni R, Dietrich D, Bennett MJ, Rodríguez PL. Hydrotropism: analysis of the root response to a moisture gradient. *Methods Mol. Biol.* 1398, 3–9 (2016).
- Kramer PJ, Boyer JS. *Water Relations of Plants*. Academic Press, FL, USA (1983).
- Boussetlot JM, Muenchrath D, Knapp AD, Reeder JD. Emergence and seedling characteristics of maize native to the southwestern US. *Am. J. Plant Sci.* 8, 1304–1318 (2017).
- Talib L, Zeiger E. Mineral nutrition. In: *Plant Physiology*. B. Cummings Publishing, CA, USA, 100–119 (1991).
- Ni J, Ng CWW, Gao Y. Modelling root growth and soil suction due to plant competition. *J. Theor. Biol.* 7, 484 (2020).



## Anexo 2.

### Ensayo de la respuesta hidrotrópica Eapen., et al (2015)

Ensayo de la respuesta hidrotrópica. Se realizará en plántulas de maíz o teocintle de tres días de edad obtenidas en condiciones asépticas. Se usará un sistema experimental que establece un gradiente de humedad por medio de la interacción entre un agente hidroestimulante (espuma floral oasis verde saturada con agua) y una solución saturada de carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) colocados dentro de una caja cerrada de acrílico de 24 x 20 x 10 cm. Los componentes del sistema experimental para el estudio del hidrotropismo en raíces de maíz se muestra a continuación:



**a y b).** Diagrama e imagen fotográfica del sistema experimental para el estudio del hidrotropismo en raíces de maíz. El mencionado sistema se compone de una caja acrílica (24 cm x 20 cm x 10 cm); H: una espuma floral verde saturada con agua (agente hidroestimulante) que soporta las plántulas de prueba y una solución higroscópica saturada ( $K_2CO_3$  con una densidad de  $1,500 \text{ g/cm}^3$ ) depositada en el fondo de la cámara acrílica.

Las plántulas de maíz se encajan con un alfiler en el oasis con la raíz primaria hacia abajo y paralela al vector de la gravedad. Las raíces crecen hasta alcanzar el borde inferior del oasis y se curvan hacia la pared de la cámara para evitar la desecación, suprimiendo el gravitropismo. La hidroestimulación se generará en el sistema vertiendo 200 mL de solución saturada de  $K_2CO_3$  con una densidad de  $1,500 \text{ g/cm}^3$  en el fondo de la caja y colocando un bloque de espuma floral (*Oasis*) saturado con agua en dos lados

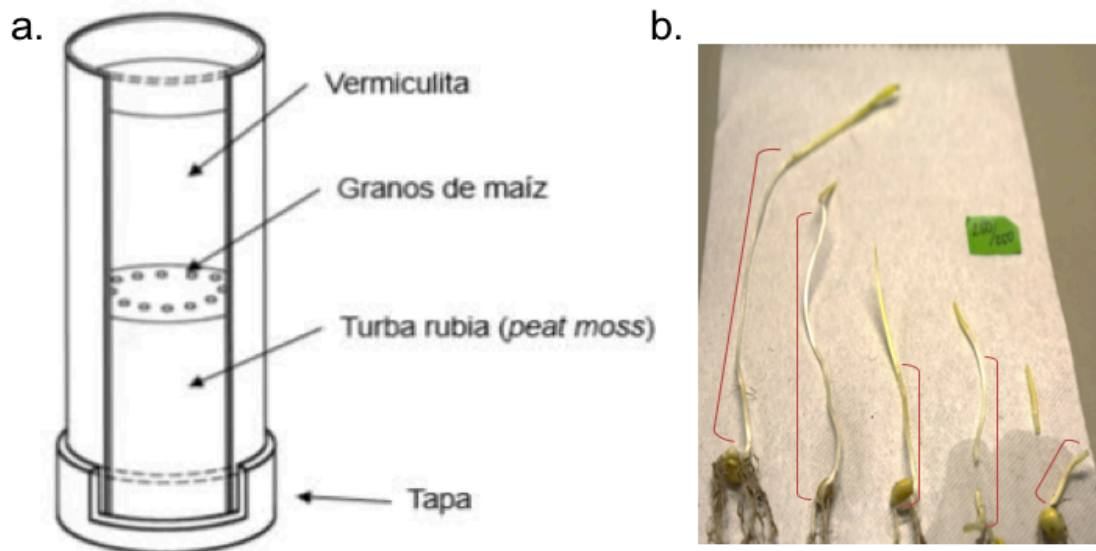
de la caja como se señala en el diagrama anterior. Las plántulas de maíz, con raíz primaria de 3 cm de longitud aproximadamente, se colocan paralelamente sobre al hidroestimulante. Este sistema experimental se instalará en un cuarto de crecimiento con temperatura controlada (26°C y en oscuridad total). Se usará un sensor de temperatura y humedad marca para verificar el establecimiento del gradiente de humedad. Las raíces se fotografían al inicio del ensayo: 0 h y a las 24 h de hidroestimulación con una cámara digital Nikon (modelo D7000). Las imágenes serán procesadas y se medirán los ángulos de curvatura con el software *ImageJ*© (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

### **Anexo 3.**

## **Ensayo de Elongación del mesocotilo. Nieto-Sotelo et al. (2012)**

Ensayo de elongación del mesocotilo. Como controles positivos para el estudio del alargamiento del mesocotilo, se sembrarán granos maíz de la raza Palomero Toluqueño, los cuales desarrollan un mesocotilo muy largo y pueden emerger sin dificultad cuando se siembran a profundidades de hasta 34 cm (Nieto-Sotelo *et al.*, datos no publicados). En cada ensayo se usarán 15 granos. Se realizarán de 2 a 3 ensayos con cada tipo de maíz o teocintle (30 a 45 plántulas de cada genotipo). Las semillas serán desinfectadas e inmediatamente después colocadas sobre la superficie de una capa de 20 cm de profundidad de turba rubia (nivel de descomposición media-baja libre de cal y fertilizantes de la marca Terracult, Alemania) colocada dentro de tubos de PVC hidráulico (RD 26) de 36 cm de altura, con un diámetro interior de 10 cm y con una tapa de PVC hidráulico en el fondo para evitar la fuga del agua. La turba será hidratada con 500 mL de agua corriente para posteriormente cubrir las semillas con una capa superior de vermiculita (exfoliada de grano medio seca de la marca Agrolita, México) hasta quedar cubiertas por una capa de 16 cm. Se hidratará la capa de vermiculita con 500 mL de agua corriente y los tubos se incubarán en un cuarto de crecimiento a una temperatura constante de 28°C en la oscuridad, rehidratándose cada 2 días con 100 mL de agua corriente y monitoreándose diariamente durante 7 días. Durante el monitoreo, el cuarto se iluminará durante algunos minutos con la luz emitida por un foco de color verde de baja intensidad luminosa (modelo LD1018, tipo E26, 18 LEDS), para evitar la inhibición del crecimiento del mesocotilo mediado por los fitocromos, los cuales se activan con la luz roja (Ino.,1982). Se sabe que la luz verde es la que causa menores efectos fotomorfogénicos en las plantas, por lo que la usaremos como “luz de seguridad”. El cuarto de crecimiento se acondicionó con una antecámara aislada lumínicamente del exterior, la cual se iluminará con un foco verde, idéntico al anteriormente mencionado, antes de abrir la puerta del cuarto de crecimiento. Al final de los períodos de incubación respectivos, se determinará el porcentaje de plántulas emergidas. Posteriormente todas las plántulas se extraerán de los tubos y se medirá la longitud de sus mesocotilos. La

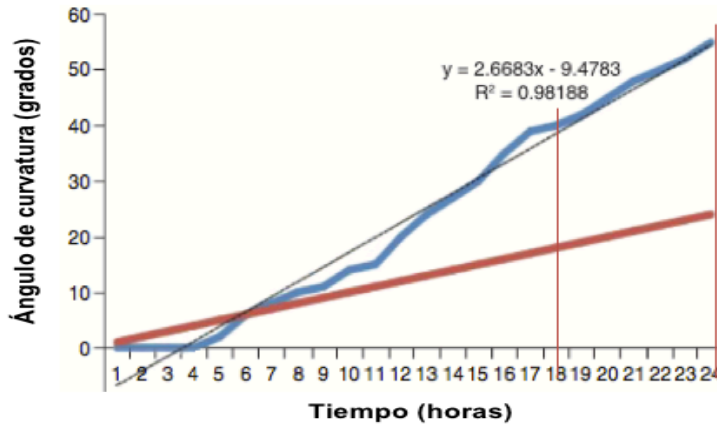
ventaja de este ensayo es que es el más rápido que hemos diseñado y permite ver claramente las diferencias entre híbridos con mesocotilo corto o largo.



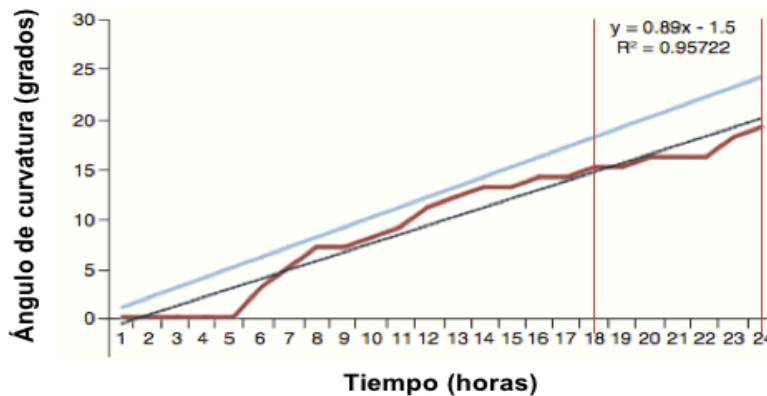
**a).** Diagrama del sistema experimental para el estudio de la elongación del mesocotilo en plántulas de maíz en condiciones de siembra profunda. El mencionado sistema consta de tubo de PVC hidráulico (RD 26) (36 cm x 10 cm) que contiene dos sustratos inertes (vermiculita y turba rubia) que cubren las semillas con una profundidad de siembra de 16 cm. **b).** Imagen fotográfica de plántulas de maíz al término de la prueba (7 días) en las cuales se mide la elongación del mesocotilo (longitud en milímetros).

## Anexo 4. Curvas cinéticas de la respuesta hidrotrópica

a. Respuesta hidrotrópica robusta DTMA 181

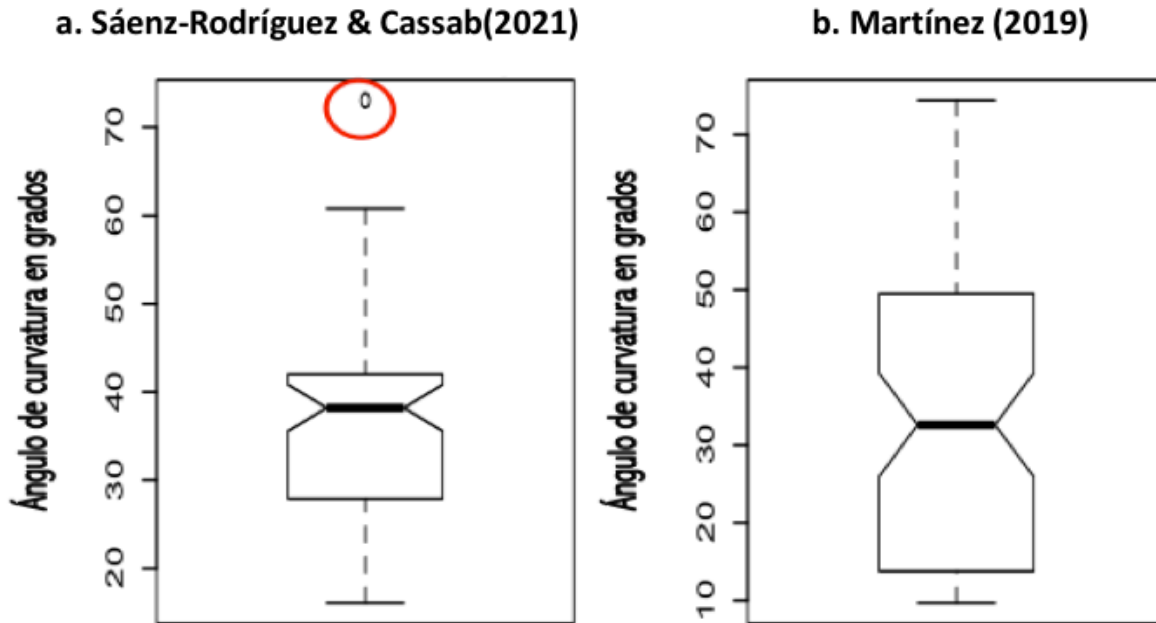


b. Respuesta hidrotrópica débil DTMA 12



Curva cinética de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (RH) de los híbridos DTMA 181 y 12 de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo descrito por Sáenz-Rodríguez & Cassab (2021). **a).** Curva cinética de la RH robusta del DTMA 181 (RH robusta  $>39^\circ$ ); **b).** Curva cinética de la RH débil del DTMA 12 (RH débil entre  $10^\circ$ -  $38^\circ$ ). La líneas verticales de color rojo indican el intervalo definido para la determinación de la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria (entre 18 h y 24h) , tiempo en el que se obtuvo los valores que definidos para la clasificación de sus respuestas en referencia a el ángulo de curvatura en grados de la raíz primaria en dirección al agente hidroestimulante (agua destilada) en un ambiente con una humedad relativa promedio baja (%HR 39.7) y un potencial hídrico negativo ( $\Psi_w$ : -4 a -6 MPa).

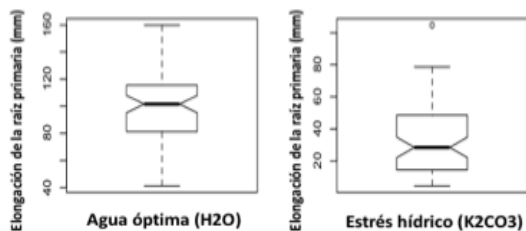
## Anexo 5. Respuesta hidrotónica de la raíz primaria bajo dos sistemas de ensayo diferentes



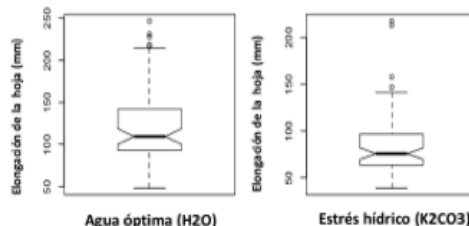
Resultados de la respuesta hidrotónica de la raíz primaria (RH) en 72 híbridos DTMA de maíz sometidos a condiciones de estrés hídrico en dos periodos de tiempo diferentes y usando dos sistemas de ensayo independientes. **a)** Resultados de la RH (medida como ángulo de la curvatura) obtenidos a partir del uso del sistema de ensayo descrito por Sáenz-Rodríguez & Cassab (2021); **b)** Resultados de la RH (medida como ángulo de la curvatura) obtenidos a partir del uso del sistema de ensayo descrito por Martínez (2019). La aplicación de la prueba estadística *t-Student* de comparación de medias ( $\mu = 36.09542$  y  $\mu = 33.02486$ , respectivamente) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos a partir del uso de ambos sistemas ( $t = 1.1825$ ,  $p$ -valor **0.2397**,  $\alpha=0.05$ ). ( $n = 15$  plántulas,  $r = 3$ ).

## Anexo 6. Respuestas de los rasgos fenotípicos medidos bajo las condiciones del sistema de ensayo

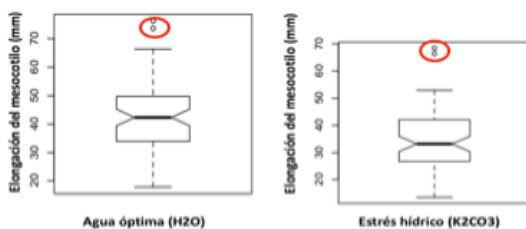
a. Elongación de la raíz primaria (longitud en milímetros)



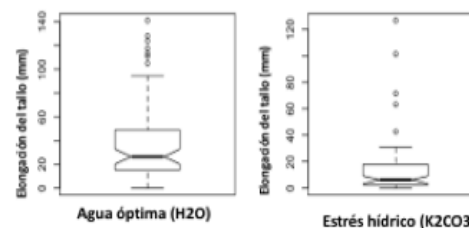
e. Elongación de la hoja (longitud en milímetros).



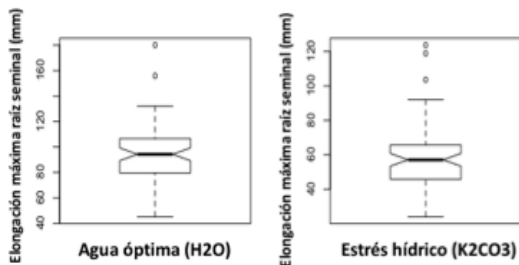
b. Elongación del mesocotilo (longitud en milímetros)



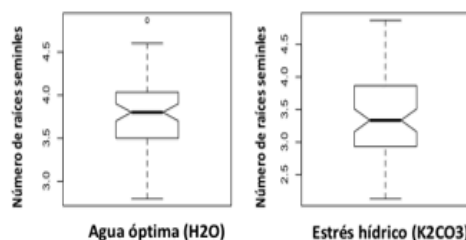
f. Elongación del tallo (longitud en milímetros).



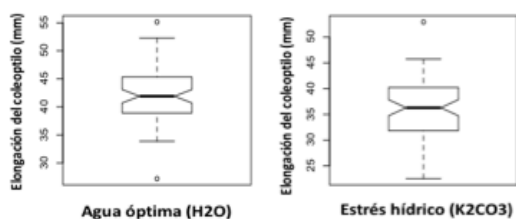
c. Elongación máxima raíz seminal (longitud en milímetros)



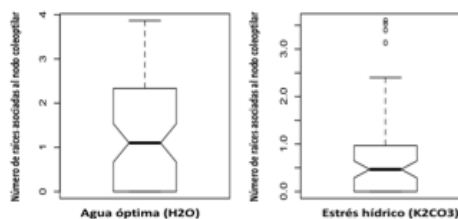
g. Numero de raíces seminales.



d. Elongación del coleoptilo (longitud en milímetros).



h. Numero de raíces asociadas al nodo coleoptilar .



Resultados de las respuestas fenotípicas de ocho rasgos medidos en los 72 híbridos DTMA de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo descrito por Sáenz-Rodríguez & Cassab (2021) en condiciones control (riego óptimo) y estrés hídrico ( $K_2CO_3$ ). Se aplico pruebas de comparación de medias a través de la prueba estadística de t-Student en todos los casos entre el control versus prueba. **a)** Resultados de la determinación de la elongación de la raíz primaria (longitud en milímetros) donde se encontraron ( $\mu = 9900$  mm y  $\mu = 33.16$  mm, respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente

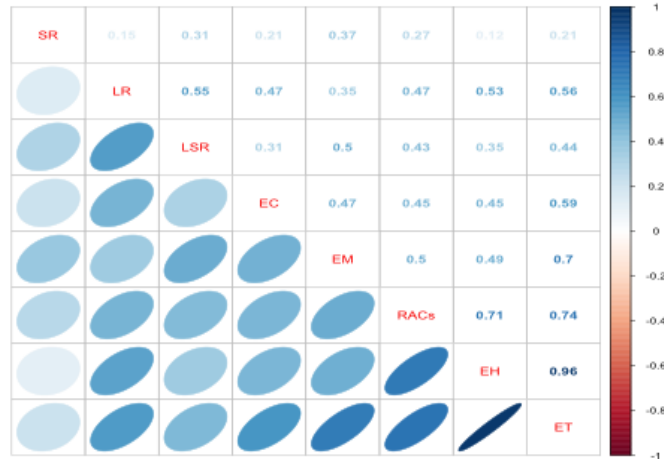
significativas entre ambas condiciones ( $t = 6.619$ ,  $p\text{-valor} = <2.2e-16$ ,  $\alpha=0.05$ ); **b**). Resultados de la determinación de la elongación del mesocotilo (longitud en milímetros) donde se encontraron ( $\mu = 43.13 \text{ mm}$  y  $\mu = 34.54 \text{ mm}$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 4.675$ ,  $p\text{-valor} \leq 6.8e-6$ ,  $\alpha=0.05$ ); **c**). Resultados de la determinación de la elongación máxima de la raíz seminal (longitud en milímetros) donde se encontraron ( $\mu = 95.40 \text{ mm}$  y  $\mu = 54.52 \text{ mm}$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 10.906$ ,  $p\text{-valor} \leq 2.2e-16$ ,  $\alpha=0.05$ ); **d**). Resultados de la determinación de la elongación del coleóptilo (longitud en milímetros) donde se encontraron ( $\mu = 42.14 \text{ mm}$  y  $\mu = 36.03 \text{ mm}$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 7.0118$ ,  $p\text{-valor} \leq 9.666e-11$ ,  $\alpha=0.05$ ); **e**). Resultados de la determinación de la elongación de la hoja (longitud en milímetros) donde se encontraron ( $\mu = 37.92 \text{ mm}$  y  $\mu = 14.26 \text{ mm}$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 4.9729$ ,  $p\text{-valor} \leq 2.194e-06$ ,  $\alpha=0.05$ ); **f**). Resultados de la determinación de la elongación del tallo (longitud en milímetros) donde se encontraron ( $\mu = 123.17 \text{ mm}$  y  $\mu = 84.47 \text{ mm}$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 5.9886$ ,  $p\text{-valor} 1.846e-08$ ,  $\alpha=0.05$ ); **g**). Resultados de la determinación del número de raíces seminales donde se encontraron ( $\mu = 3.75$  y  $\mu = 3.39$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 3.9811$ ,  $p\text{-valor} \leq 0,00011$ ,  $\alpha=0.05$ ); **h**). Resultados de la determinación del número de raíces asociadas al nodo coleoptilar donde se encontraron ( $\mu = 1.31$  y  $\mu = 0.74$ , respectivamente) lo que indico diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones ( $t = 3.2155$ ,  $p\text{-valor} \leq 0.001629$ ,  $\alpha=0.05$ ). ( $n = 15$  plántulas,  $r = 3$ ).



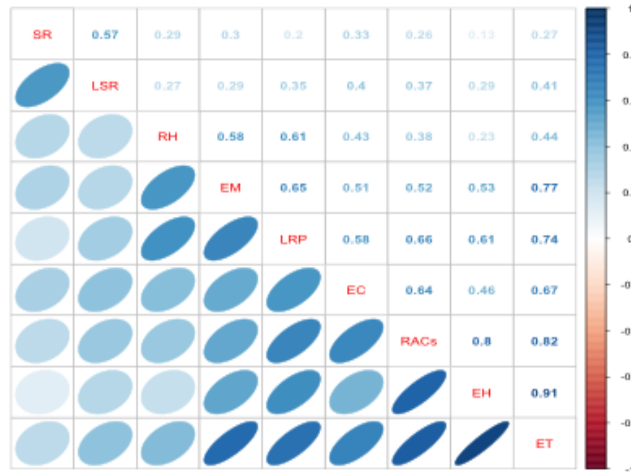
## ANEXO 7.

### Correlación entre las respuestas de los rasgos fenotípicos medidos a las condiciones del sistema de ensayo

#### a. Condiciones hídricas óptimas.



#### b. Condiciones de estrés hídrico.



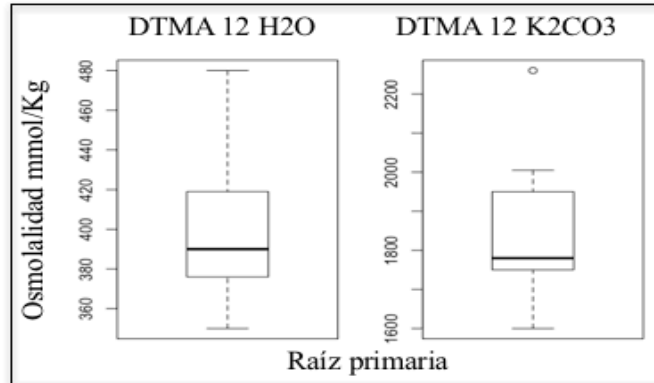
Análisis de correlación de nueve rasgos medidos en los 72 híbridos DTMA de maíz bajo las condiciones del sistema de ensayo. a.) Condiciones hídricas óptimas ;b.) Condiciones de estrés hídrico. La totalidad de los rasgos evidenciaron correlaciones positivas entre ellos en ambas condiciones.(SR: Numero de raíces seminales; LSR: Longitud máxima raíz seminal; RH: Respuesta hidrotropica de raíz primaria; EM: Elongación del mesocotilo; LRP: Longitud de la raíz primaria; EC: elongación del coleóptilo; RACs: número de raíces del nodo coleoptilar; EH: elongación de hoja; ET: Elongación del tallo). (Sin correlación:  $r < |0.1|$ ; baja correlación:  $|0.1| < r \leq |0.3|$ ; correlación media:  $|0.3| < r \leq |0.5|$ ; alta correlación:  $r > |0.5|$ ). ( $n = 15$  plántulas,  $r = 3$ ).

## ANEXO 8.

### Potencial osmótico de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz

a.

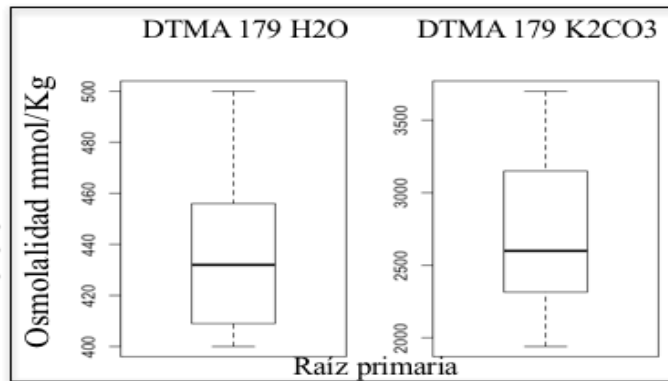
DTMA 12 Raíz primaria (Osmolalidad: mmol/Kg)						
#	H2O			K2CO3		
	I	II	III	I	II	III
1	466	350	480	1600	1950	1780
2	419	390	380	1750	2005	1678
3	359	415	376	1900	2260	1771
<b>Mean</b>	<b>404</b>			<b>1855</b>		
<b>DE</b>	45.4			199.2		



Datos de osmolalidad en raíz primaria (mmol/Kg) del híbrido **DTMA 12** de maíz (RH débil y EM media ). **a.** Tabla y boxplot de datos de osmolalidades obtenidas bajo condiciones óptimas y de estrés con valores medios de  $\mu = 404$  mmol/Kg y  $\mu = 1855$  mmol/Kg [ $n = 3$  (pool de 3 raíces primarias),  $r = 3$ ]. *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = -21.30$ ,  $df = 8.827$ ,  $p\text{-valor} \leq 6.789e-09$ . **Diferentes con significancia estadística.**

b.

DTMA 179 Raíz primaria (Osmolalidad: mmol/Kg)						
#	H2O			K2CO3		
	I	II	III	I	II	III
1	409	432	500	1940	2600	3150
2	400	440	456	2100	2456	3700
3	429	400	478	2315	2700	3450
<b>Mean</b>	<b>438.2</b>			<b>2712</b>		
<b>DE</b>	34.7			604		



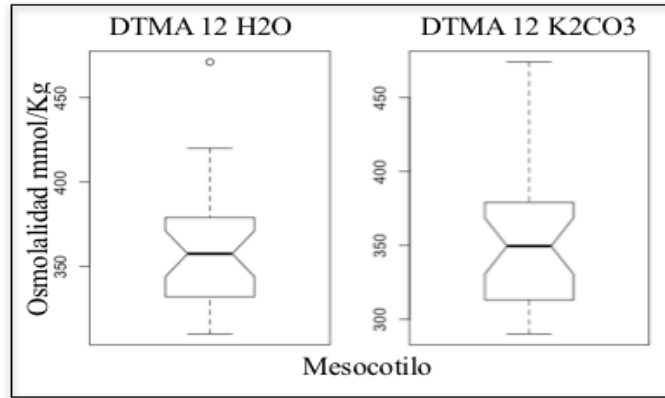
Datos de osmolalidad en raíz primaria (mmol/Kg) del híbrido **DTMA 179** de maíz (RH robusta y EM alta ). **b.** Tabla y boxplot de datos de osmolalidades obtenidas bajo condiciones óptimas y de estrés con valores medios de  $\mu = 438$  mmol/Kg y  $\mu = 2712$  mmol/Kg [ $n = 3$  (pool de 3 raíces primarias),  $r = 3$ ]. *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = -11.30$ ,  $df = 8.0527$ ,  $p\text{-valor} \leq 3.264e-06$ . **Diferentes con significancia estadística.**

## ANEXO 9.

### Potencial osmótico del mesocotilo bajo las condiciones del sistema de ensayo de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz

a.

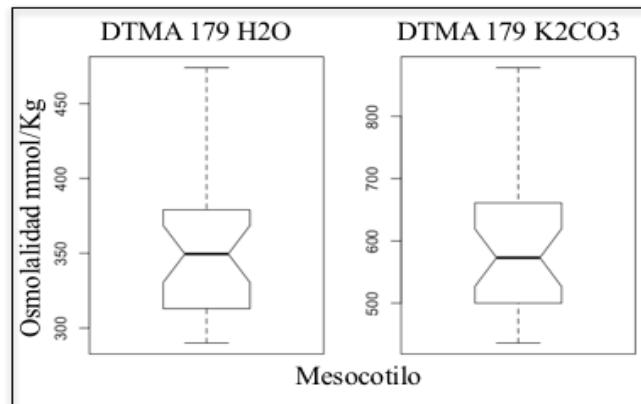
DTMA 12 Mesocotilo (Osmolalidad: mmol/Kg)						
#	H2O			K2CO3		
	I	II	III	I	II	III
1	332	315	330	428	522	500
2	379	315	360	404	464	480
3	375	341	335	525	597	479
4	471	406	361	373	557	467
5	355	324	343	406	463	561
6	381	420	415	485	489	501
7	379	361	355	536	469	450
8	374	310	380	471	473	489
9	380	326	320	446	585	590
10	351	260	352	475	558	485
<b>Mean</b>	<b>360</b>			<b>491</b>		
<b>DE</b>	<b>35.8</b>			<b>55.2</b>		



Datos de osmolalidad en mesocotilos (mmol/Kg) del híbrido **DTMA 12** de maíz (RH débil y EM media ). a. Tabla y boxplot de datos de osmolalidades obtenidas bajo condiciones óptimas y de estrés con valores medios de  $\mu = 360$  mmol/Kg y  $\mu = 491$  mmol/Kg [ $n = 3$  (pool de 3 raíces primarias),  $r = 3$ ]. *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = 0.5464$ ,  $df = 50.798$ ,  $p\text{-valor} \leq 0.5872$  . Sin diferencia estadística significativa.

b.

DTMA 179 Mesocotilo (Osmolalidad: mmol/Kg)						
#	H2O			K2CO3		
	I	II	III	I	II	III
1	453	308	332	540	631	832
2	308	295	379	626	469	512
3	463	290	375	878	652	600
4	367	300	315	674	786	535
5	436	319	315	539	522	661
6	365	400	371	659	481	537
7	319	408	381	546	457	487
8	474	295	355	436	671	671
9	290	315	374	626	484	500
10	348	313	351	500	620	684
<b>Mean</b>	<b>354</b>			<b>594</b>		
<b>DE</b>	<b>53.2</b>			<b>110.9</b>		

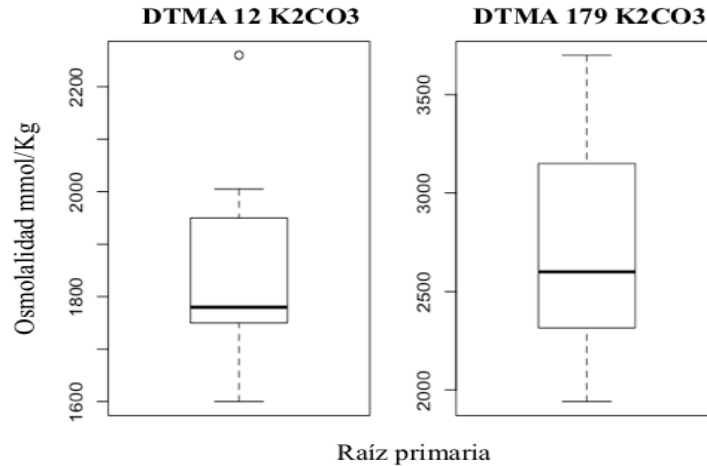


Datos de osmolalidad en mesocotilos (mmol/Kg) del híbrido **DTMA 179** de maíz (RH robusta y EM alta ). a. Tabla y boxplot de datos de osmolalidades obtenidas bajo condiciones óptimas y de estrés con valores medios de  $\mu = 354$  mmol/Kg y  $\mu = 594$  mmol/Kg [ $n = 3$  (pool de 3 raíces primarias),  $r = 3$ ]. *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = -10.886$ ,  $df = 41.675$ ,  $p\text{-valor} \leq 1.6453 \cdot 10^{-13}$  . Diferentes con significancia estadística

## ANEXO 10.

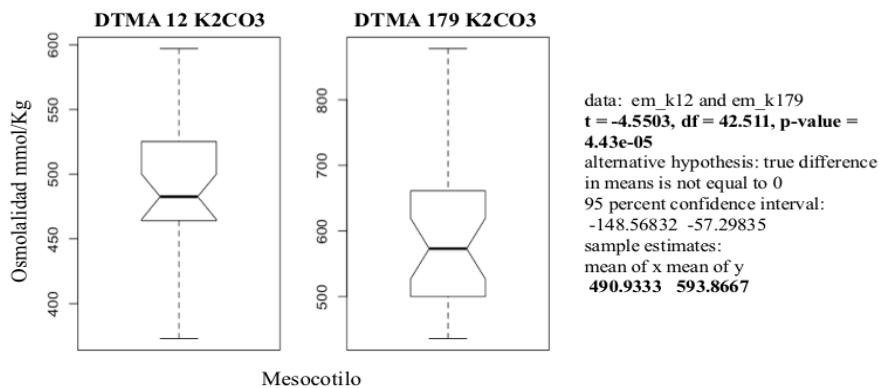
### Potencial osmótico en raíz primaria y mesocotilo de los híbridos DTMA 12 y 179 de maíz bajo condiciones de estrés

a.



Datos de osmolalidad en raíz primaria (mmol/Kg) del híbrido **DTMA 12** de maíz (RH débil y EM media ). a. Boxplot de datos de osmolalidades obtenidas en raíz primaria bajo condiciones de estrés con valores medios de  $\mu = 1854$  mmol/Kg y  $\mu = 2712$  mmol/Kg [ $n = 3$  (pool de 3 raíces primarias),  $r = 3$ ]. *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = -4.0441$ ,  $df = 9.7207$ ,  $p\text{-valor} \leq 0.002485$ . **Diferentes con significancia estadística.**

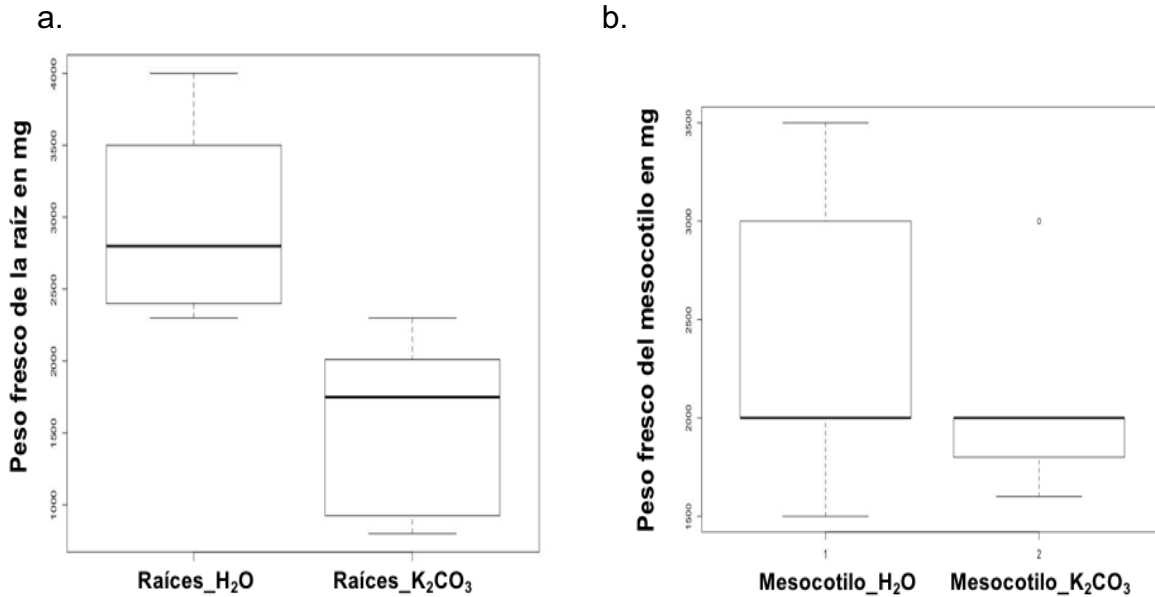
b.



Datos de osmolalidad en mesocotilos (mmol/Kg) del híbrido **DTMA 12** de maíz (RH débil y EM media ). a. Boxplot de datos de osmolalidades obtenidas bajo condiciones de estrés con valores medios de  $\mu = 490$  mmol/Kg y  $\mu = 593$  mmol/Kg [ $n = 3$  (pool de 3 raíces primarias),  $r = 3$ ]. *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = -4.5503$ ,  $df = 42.511$ ,  $p\text{-valor} \leq 4.43e-05$ . **Diferentes con significancia estadística.**

## ANEXO 11.

### Peso fresco vs peso seco de raíz primaria y mesocotilo bajo las condiciones hídricas del ensayo

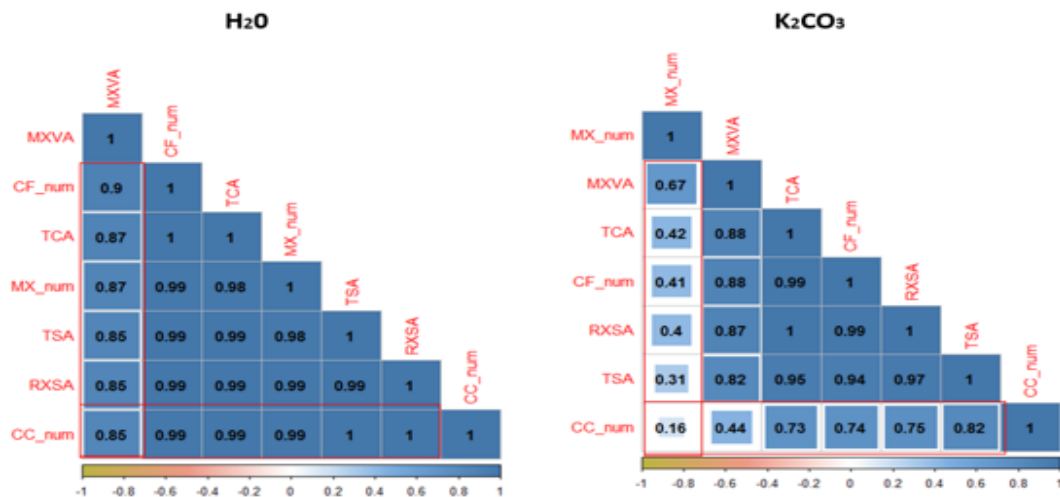


Datos de la determinación de peso fresco y peso seco en raíz primaria y mesocotilo (200 mg) de los **DTMA 38** (RH débil y EM baja) y **DTMA 184** (RH robusto y EM alta). **a.** Pesos de la raíz primaria en dos condiciones hídricas (con valores medios en  $\mu\text{H}_2\text{O} = 3000$  mg y  $\mu\text{K}_2\text{CO}_3 = 1557$  mg). *T-test Student* estadístico aplicado igual  $t = 3.2648$ ,  $df = 7.9277$ ,  $p\text{-valor} \leq 0.01159$ . **Diferentes con significancia estadística.** **b.** Pesos del mesocotilo en dos condiciones hídricas (con valores medios en  $\mu\text{H}_2\text{O} = 2400$  mg y  $\mu\text{K}_2\text{CO}_3 = 2080$  mg). *T-test Student* estadístico igual  $t = 0.72765$ ,  $df = 6.9152$ ,  $p\text{-valor} \leq 0.4907$ . **No se observa diferencias estadísticamente significativas.**

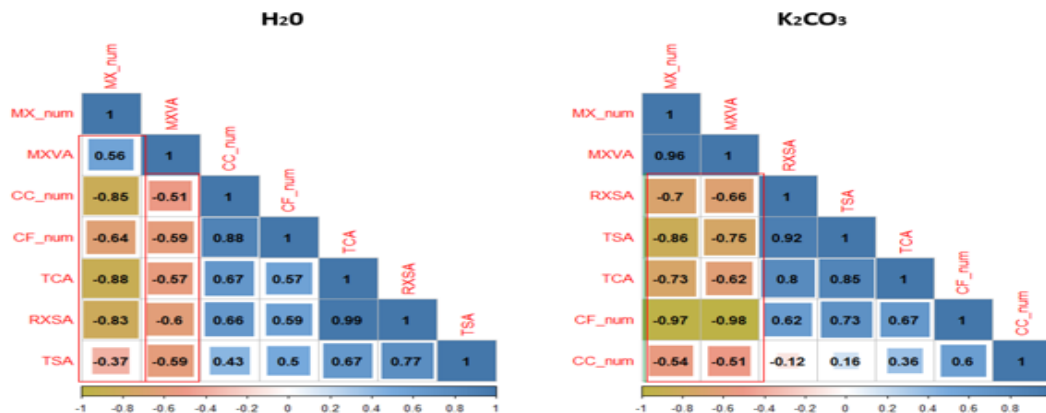
## ANEXO 12.

### Correlación entre las respuestas de los rasgos anatómicos medidos en cortes de raíz primaria y mesocotilo bajo las condiciones del sistema de ensayo

#### a. Raíz primaria



#### b. Mesocotilo

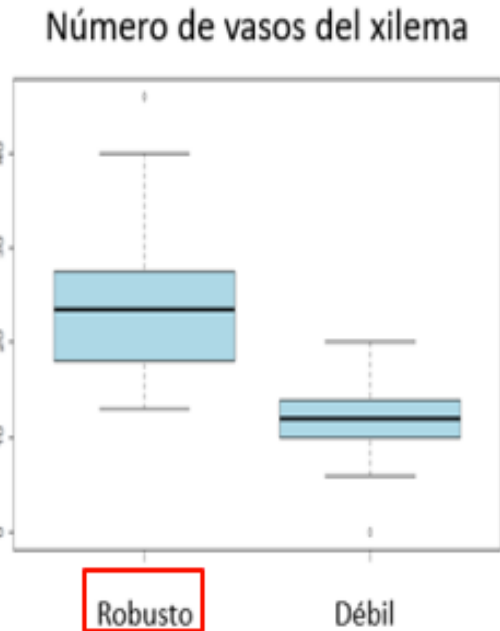


Gráficas de correlación de Pearson de siete rasgos anatómicos medidos en raíz primaria y mesocotilo de los **DTMA 38** (RH débil y EM baja) y **DTMA 138** (RH robusto y EM alta) en bajo aumento (10X) bajo las condiciones de ensayo. [ RXSA área transversal del corte, TSA: área transversal del vástago, TCA: área del córtex, MXVA: área del metaxilema, MX\_num: número de vasos de metaxilema, CF\_num : número de filas celulares y CC\_num :número de células del córtex ; los cuales, se determinaron en los cortes histológicos de la raíz primaria y mesocotilo. (Sin correlación:  $r < |0.1|$ ; baja correlación:  $|0.1| < r \leq |0.3|$ ; correlación media:  $|0.3| < r \leq |0.5|$ ; alta correlación:  $r > |0.5|$ ).

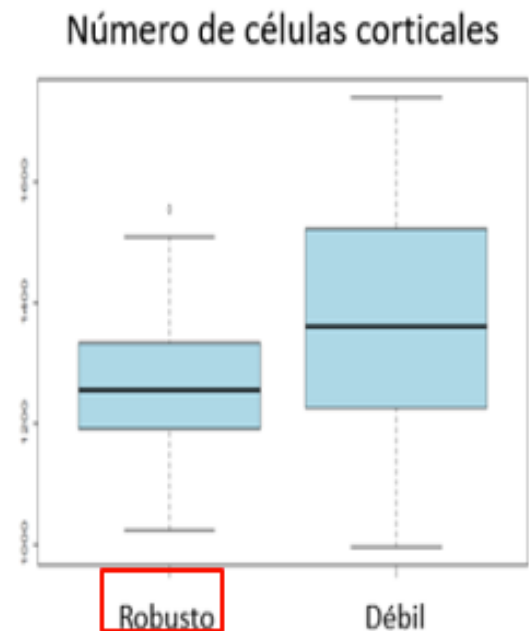
### ANEXO 13.

## Respuestas fenotípicas anatómicas que difieren en mesocotilo bajo las condiciones del sistema de ensayo

a.



b.



Rasgos fenotípicos anatómicos medidos en mesocotilos de los **DTMA 38** (RH débil y EM baja) y **DTMA 184** (RH robusto y EM alta) en condición de estrés hídrico con diferencias estadísticamente significativas. [a. Número de vasos del xilema (RH robusto y EM alta):  $\mu=23.71667$  y (RH débil y EM baja):  $\mu=11,06667$  con un  $p$  valor  $\leq 2,2 e-16$ ].  
b. Número de células corticales (RH robusto y EM alta):  $\mu =1261$  y (RH débil y EM baja):  $\mu=1380$  con un  $p$  valor  $\leq 0,0001186$ ]. **Diferentes con significancia estadística.**

## ANEXO 14.

# Marcadores comunes potencialmente asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo por los estudios de asociación (GWAS) aplicados

### a. Respuesta hidrotrópica

#	Cr	Marcador	TASSEL	GAPIT	Pos	ID	Pfam
1	1	S1_293634495	4,12	3,27	IV	N/A	N/A
2	8	S8_149888462	3,65	3,58	M	GRMZM2G060516	EMP16 empty pericarp 16
						AC196465.3_FG002	Proteína DMP6 DUFF579
3	8	S8_163214768	3,64	3,62	M	GRMZM5G836928 AC183950.2_FG004	Elemento transponible harpin-induced protein (LEA)
4	10	S10_16212246	3,64	3,58	M	GRMZM2G181251	(pza02961 - ) thioredoxin M1
5	1	S1_264987086	3,61	3,85	IV	N/A	N/A
6	7	S7_127888869	3,59	3,97	IV	AC196112.3_FG004	gen de baja confianza
7	2	S2_51332018	3,49	3,47	M	GRMZM2G078650	Fosfolipasa C
8	4	S4_195380475	3,29	3,28	M	GRMZM2G125648	nfd106 nucleosome/chromatin assembly factor D
						GRMZM2G125596	Putativa B3 DNA binding domain family protein
9	1	S1_223784890	3,28	3,39	M	GRMZM2G181236	Putativa citocromo P450 superfamily protein (proteína no caracterizada)
10	1	S1_223784899	3,28	3,39			
11	4	S4_167074670	3,27	3,53	IN	GRMZM2G015049	saur42 - small auxin up RNA42
12	5	S5_213266148	3,26	3,54	IN	GRMZM2G318662	No gen conocido (proteína única en maíz)

### b. Elongación del mesocotilo

#	Marcador	Pos	-log10(p)		Gen	Pfam
			GAPIT	TASSEL		
1	S6_30191692	IV	5,51	4,89	AC206660.4_F6010*	Gen de baja confianza
2	S6_30191664		4,28	3,84		
3	S6_30191671		4,28	3,80		
	S6_30191676		3,52	3.21**		
4	S5_209261903	M	4,59	3,43	GRMZM2G313027	Oryza sativa japónica: proteína expresada (LOC_Os02g52280)
5	S1_19979857	IV	3,69	3,24	AC166636.1_FG008	IDP871/Ras-related protein Rab-6A/uncharacterized protein LOC100281229
6	S4_156024285	M	3,51	3,51	GRMZM2G028438	GRAS76 chitin-inducible gibberellin-responsive protein 2
7	S1_232843346	IV	3,47	3,51		Elemento transponible
8	S1_232843349				GRMZM2G514373	
9	S1_22316485	IV	3,38	3,50	N/A	N/A

90 SNP relacionados se asociaron 47 genes con 9 comunes entre modelos de GWAS.

Genes asociados a las respuestas fenotípicas bajo las condiciones del sistema de ensayo a través de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) por medio de tres métodos matemáticos y estadísticos aplicados (MLM: Modelo Lineal Mixto, CMLM: Modelo Lineal Comprimido y ECMLM: ). (a. 12 genes comunes asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria; b. 9 genes comunes asociados a la elongación del mesocotilo bajo condiciones de ensayo con un punto de corte  $p$  valor  $\geq 3.25$  en los GWAS aplicados).





## ANEXO 16.

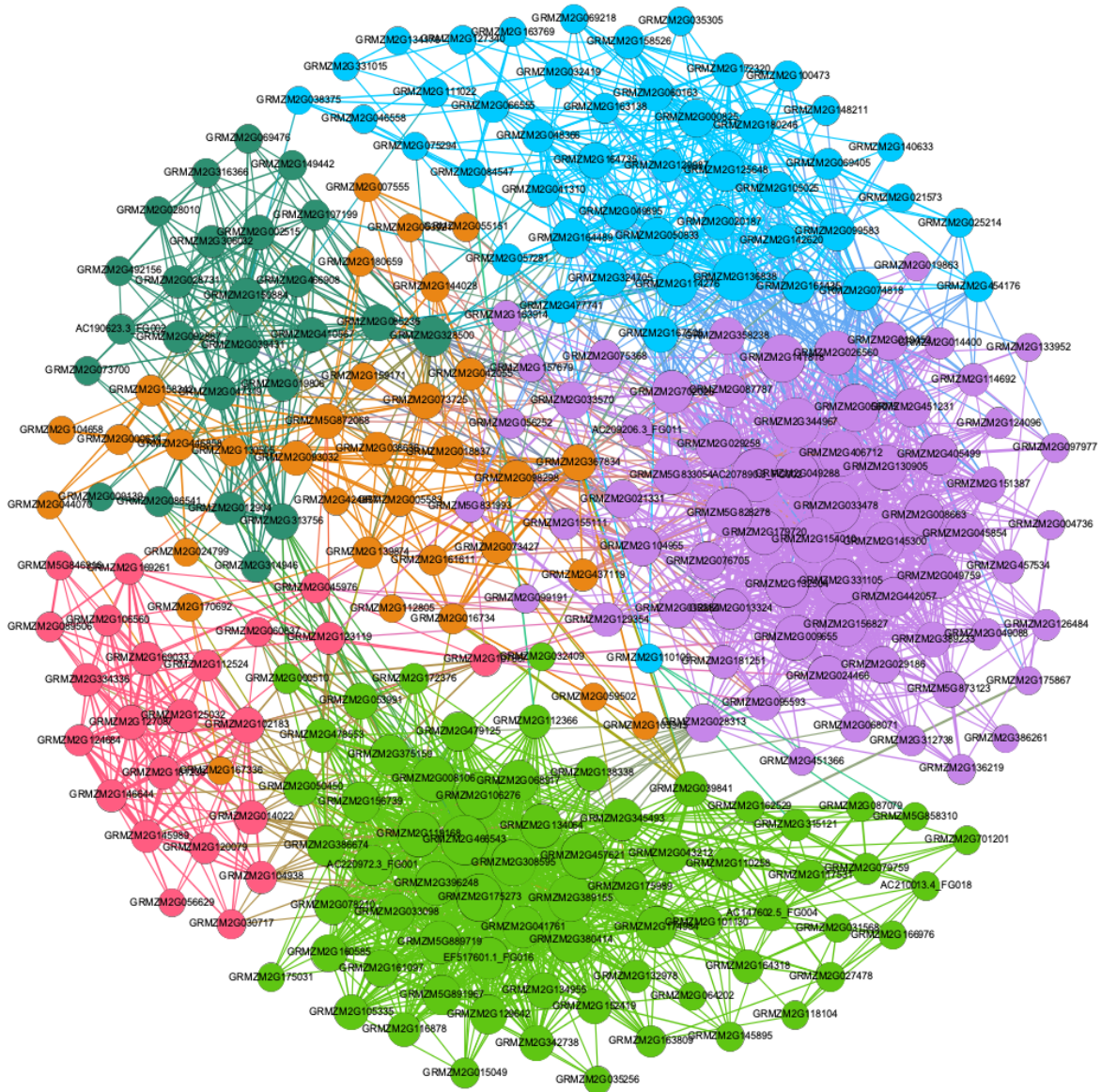
### SNPs potencialmente asociados a la respuesta hidrotrópica de la raíz y la elongación del mesocotilo por los estudios de asociación (GWAS) aplicados

#	TASSEL/GAPIT/GAPITsuper		#	TASSEL/GAPIT/GAPITsuper		#	TASSEL/GAPIT/GAPITsuper		#	TASSEL/GAPIT/GAPITsuper	
	RH	EM		RH	EM		RH	EM		RH	EM
1	S1_293634488	S1_232843349	44	S2_80122063	S6_129514193	87	S4_156511978	S10_146120407	130	S7_143750780	
2	S1_293634495	S1_232843346	45	S2_79754902	S6_129514189	88	S4_131765127	S10_134584872	131	S7_127889081	
3	S1_295003443	S1_106045998	46	S2_54260681	S6_105080714	89	S4_74594663	S10_134584864	132	S7_127888869	
4	S1_295764935	S1_58645939	47	S2_54260663	S6_37902501	90	S4_74594661	S10_133817611	133	S7_127891185	
5	S1_291559401	S1_39930508	48	S2_54260632	S6_32895266	91	S4_74594629		134	S7_122065384	
6	S1_264987086	S1_22316485	49	S2_51332018	S6_30191692	92	S4_74594604		135	S7_121982564	
7	S1_251172506	S1_21543879	50	S2_49698353	S6_30191671	93	S4_63911998		136	S7_121677185	
8	S1_239814134	S1_21543880	51	S2_44374109	S6_30191676	94	S4_63911971		137	S7_121673953	
9	S1_223825781	S1_19979857	52	S2_44374107	S6_30191664	95	S4_33704514		138	S7_121673954	
10	S1_223825671	S1_10582816	53	S2_44374105	S6_29745945	96	S5_213266148		139	S7_28013109	
11	S1_223825669	S2_216666023	54	S2_38102874	S6_29745913	97	S5_205342003		140	S7_21135216	
12	S1_223825667	S2_148879068	55	S2_36319540	S6_29745911	98	S5_203039742		141	S7_21135215	
13	S1_223784899	S2_36831651	56	S2_30563024	S6_29745910	99	S5_203039741		142	S7_16344105	
14	S1_223784890	S2_15730445	57	S2_2110833	S6_29745903	100	S5_194691379		143	S7_16343871	
15	S1_219793288	S3_173205767	58	S3_191195655	S7_140056212	101	S5_186796501		144	S7_16279815	
16	S1_219793113	S3_168838689	59	S3_180746275	S7_126522352	102	S5_179010871		145	S7_14901573	
17	S1_209127422	S3_127100823	60	S3_189691561	S7_126522353	103	S5_177221424		146	S7_14901619	
18	S1_196428801	S3_127100524	61	S3_189691507	S7_129344449	104	S5_15956749		147	S8_173077137	
19	S1_196428836	S3_127100473	62	S3_173208783	S8_147066006	105	S5_15463402		148	S8_169995847	
20	S1_161228009	S3_12291222	63	S3_147406244	S8_141083285	106	S5_15463392		149	S8_169995842	
21	S1_47476131	S3_1633331	64	S3_140462435	S8_137317672	107	S5_15190946		150	S8_164446828	
22	S1_47475039	S3_1571470	65	S3_33744545	S8_122753023	108	S5_155096308		151	S8_163214768	
23	S1_9424411	S4_166924923	66	S3_5578799	S8_122753021	109	S5_155096305		152	S8_162579388	
24	S1_8035082	S4_156024285	67	S3_5578738	S8_122753017	110	S5_132171155		153	S8_159255324	
25	S1_7396737	S5_210019929	68	S3_4546471	S8_122753009	111	S5_74655857		154	S8_151907047	
26	S1_7299687	S5_209261903	69	S3_1571625	S8_122753007	112	S5_72821682		155	S8_156875321	
27	S2_221779455	S5_209261775	70	S3_1571621	S8_118167221	113	S5_56426267		156	S8_152764456	
28	S2_221753625	S5_86151558	71	S3_1571620	S8_118167216	114	S5_28022467		157	S8_149888462	
29	S2_221753596	S5_80191689	72	S3_1571618	S8_16165926	115	S5_17979441		158	S8_149259765	
30	S2_221753590	S5_80191682	73	S3_1571614	S9_147411635	116	S5_12191923		159	S8_145311557	
31	S2_205062101	S5_80191670	74	S3_1571612	S9_147411634	117	S5_10279108		160	S8_145311521	
32	S2_204167386	S5_80191669	75	S3_1571610	S9_146872997	118	S5_10276413		161	S9_99024407	
33	S2_170876422	S5_80191662	76	S3_1571609	S9_138555786	119	S6_163457876		162	S9_104878133	
34	S2_170876420	S5_80191661	77	S4_239728918	S9_138499145	120	S6_155249693		163	S9_99024398	
35	S2_170876412	S5_56370983	78	S4_228847304	S9_138430662	121	S6_154314919		164	S10_148972668	
36	S2_170876409	S5_142485704	79	S4_228847292	S9_138430666	122	S6_147913803		165	S10_143770676	
37	S2_170876400	S5_132171155	80	S4_228847284	S9_107311607	123	S6_147913800		166	S10_141543690	
38	S2_109852828	S5_10857951	81	S4_228847282	S9_107311606	124	S6_112005827		167	S10_135610577	
39	S2_51332018	S5_10857945	82	S4_228847273	S9_107311605	125	S6_112005826		168	S10_90245328	
40	S2_18001359	S6_148780022	83	S4_195380475	S9_107311604	126	S6_111153617		169	S10_90044656	
41	S2_15994872	S6_148780018	84	S4_175127153	S9_107311603	127	S6_105323264		170	S10_42583811	
42	S2_20097706	S6_133479052	85	S4_170793157	S9_107311601	128	S6_30191692		171	S10_28747335	
43	S2_36319540	S6_134106380	86	S4_167074670	S9_107311600	129	S7_147195867		172	S10_16212246	

**a. Respuesta hidrotrópica: 172 SNPs asociados y b. Elongación del mesocotilo: 90 SNPs asociados a la elongación del mesocotilo (software TASSEL v.5.2.50;; GAPIT R package).**

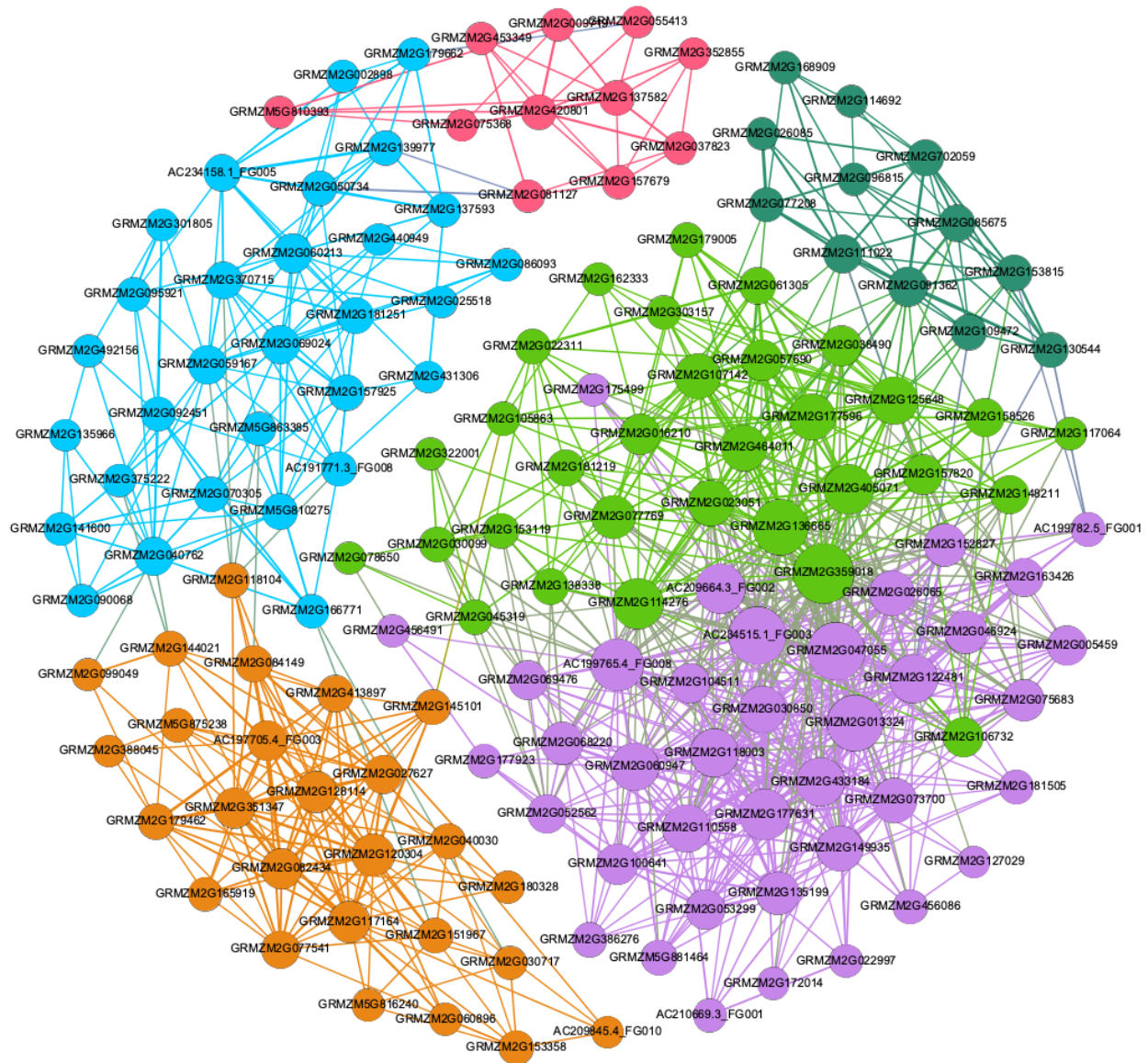
## ANEXO 17.

### Gráficas de enriquecimiento y co-expresión de genes asociados a la respuesta hidrotrópica

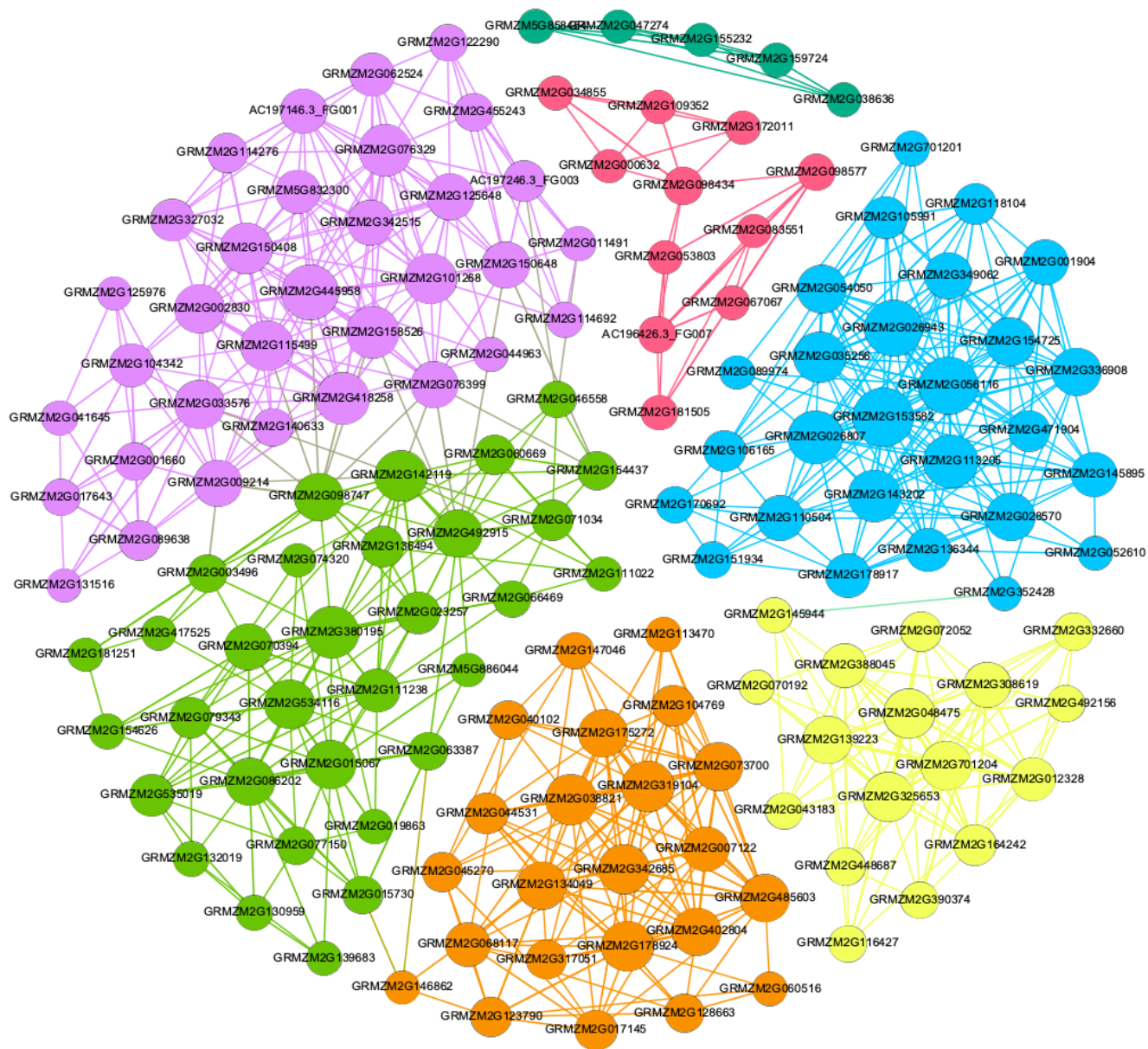


Red de genes obtenidos a través del análisis de enriquecimiento de los 172 genes asociados a través de GWAS a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo. El número total de genes asociados usando las bases de datos ZmPAN = 5147. Cada color corresponde a un nodo de conexión estadísticamente significativa en relación a términos ontológicos con un p valor de  $\leq 0.05$ . Los genes aparecen con su código de identificación de la base de datos de MAIZEGDB. [ZmPAN: datos genómicos de diversos rasgos analizados en maíz Schaefer, R.J., et al. (2018)].





Red de genes obtenidos a través del análisis de enriquecimiento de los 172 genes asociados a través de GWAS a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo. El número total de genes asociados usando las bases de datos ZmROOT = 4150. Cada color corresponde a un nodo de conexión estadísticamente significativa en relación a términos ontológicos con un p valor de  $\leq 0.05$ . Los genes aparecen con su código de identificación de la base de datos de MAIZEGDB. [ZmROOT: datos genómicos de rasgos en raíz de maíz. Stelpflug, S.C., et al. (2016)].



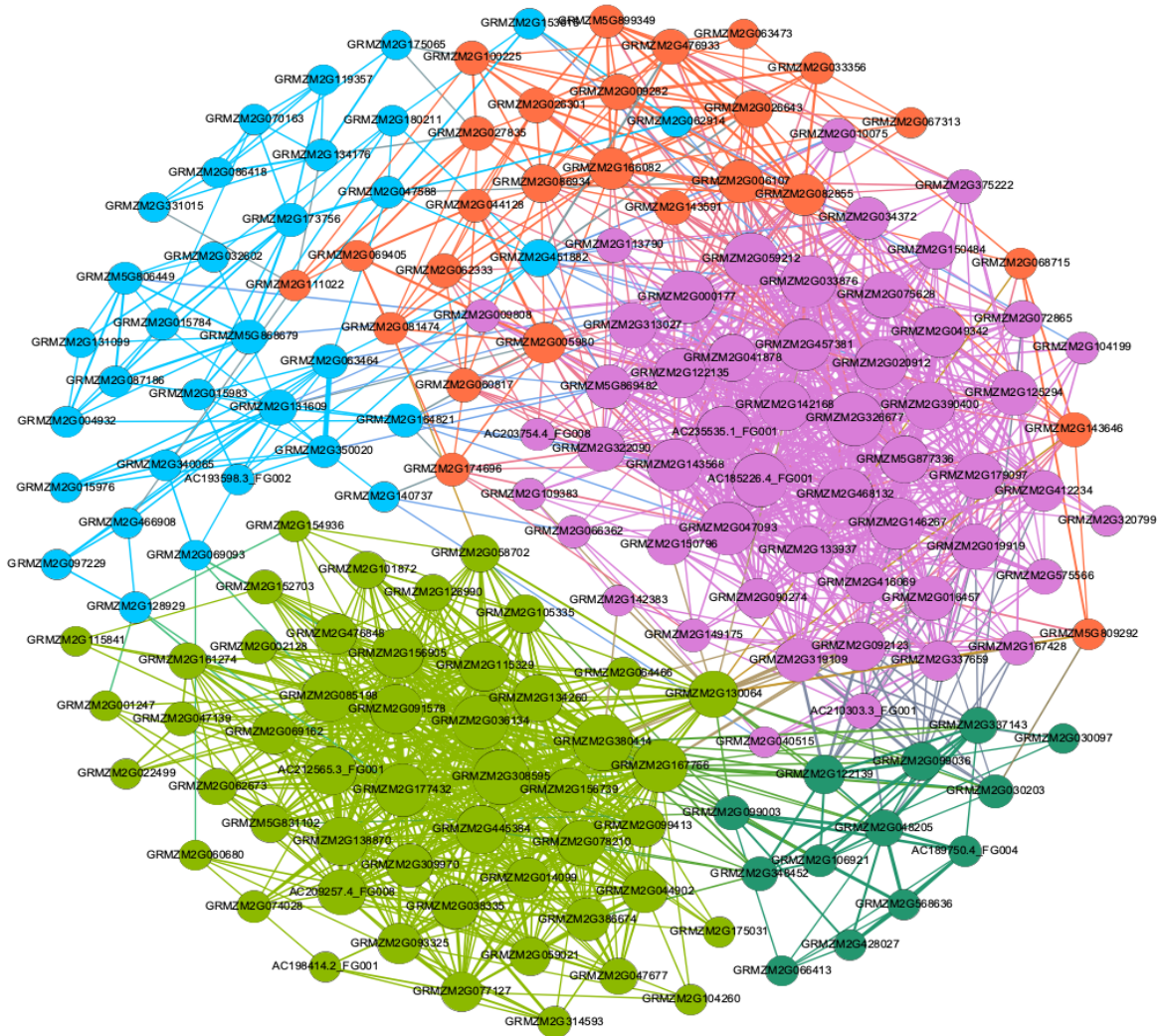
Red de genes obtenidos a través del análisis de enriquecimiento de los 172 genes asociados a través de GWAS a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo. El número total de genes asociados usando las bases de datos ZmSAM = 3743. Cada color corresponde a un nodo de conexión estadísticamente significativa en relación a términos ontológicos con un p valor de  $\leq 0.05$ . Los genes aparecen con su código de identificación de la base de datos de MAIZEGDB. [ZmSAM: datos genómicos del atlas de tejidos de maíz. Hirsch, C.N., et al (2014)].



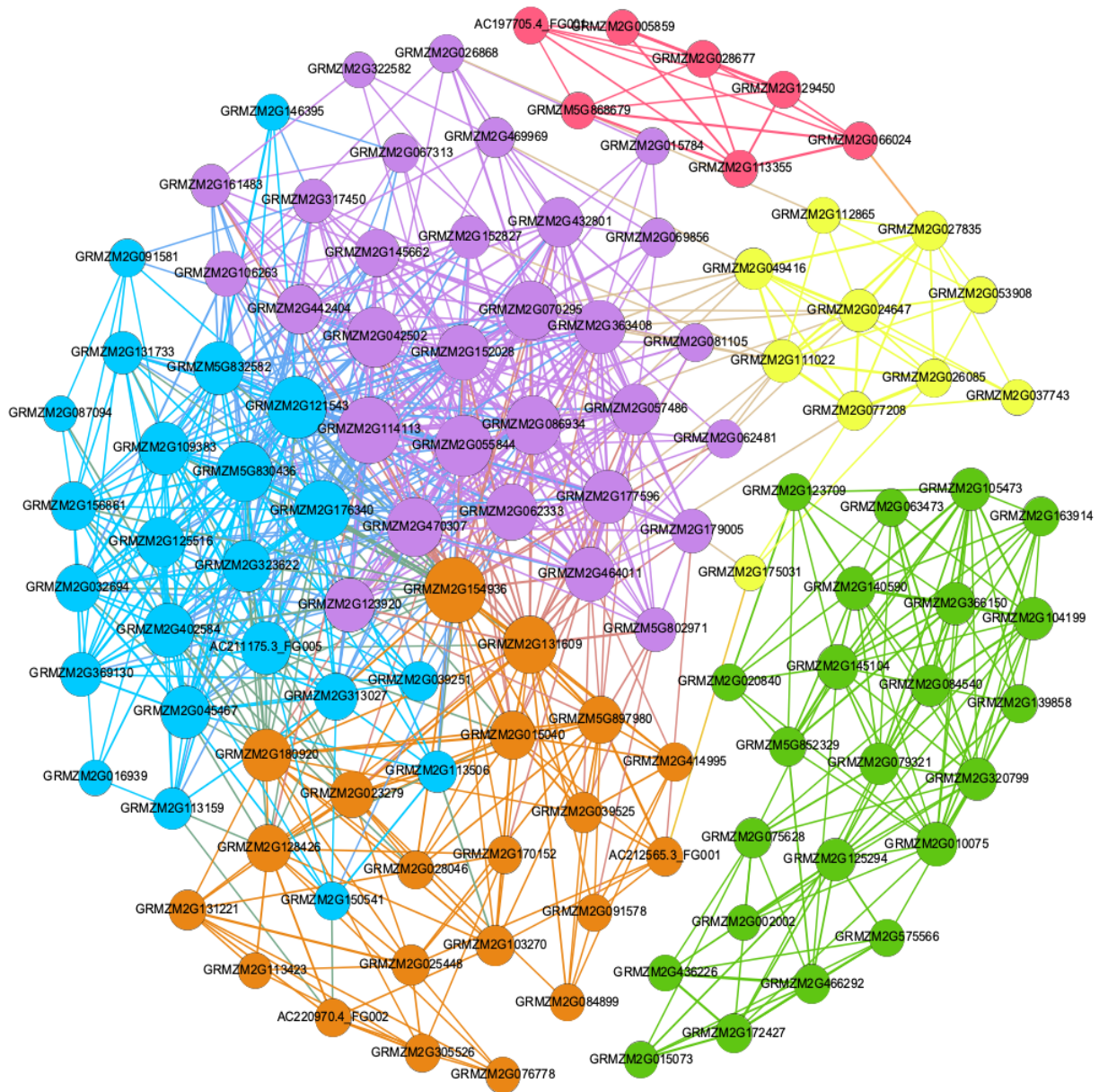
## ANEXO 18.

### Gráficas de enriquecimiento y co-expresión de genes asociados a la elongación del mesocotilo

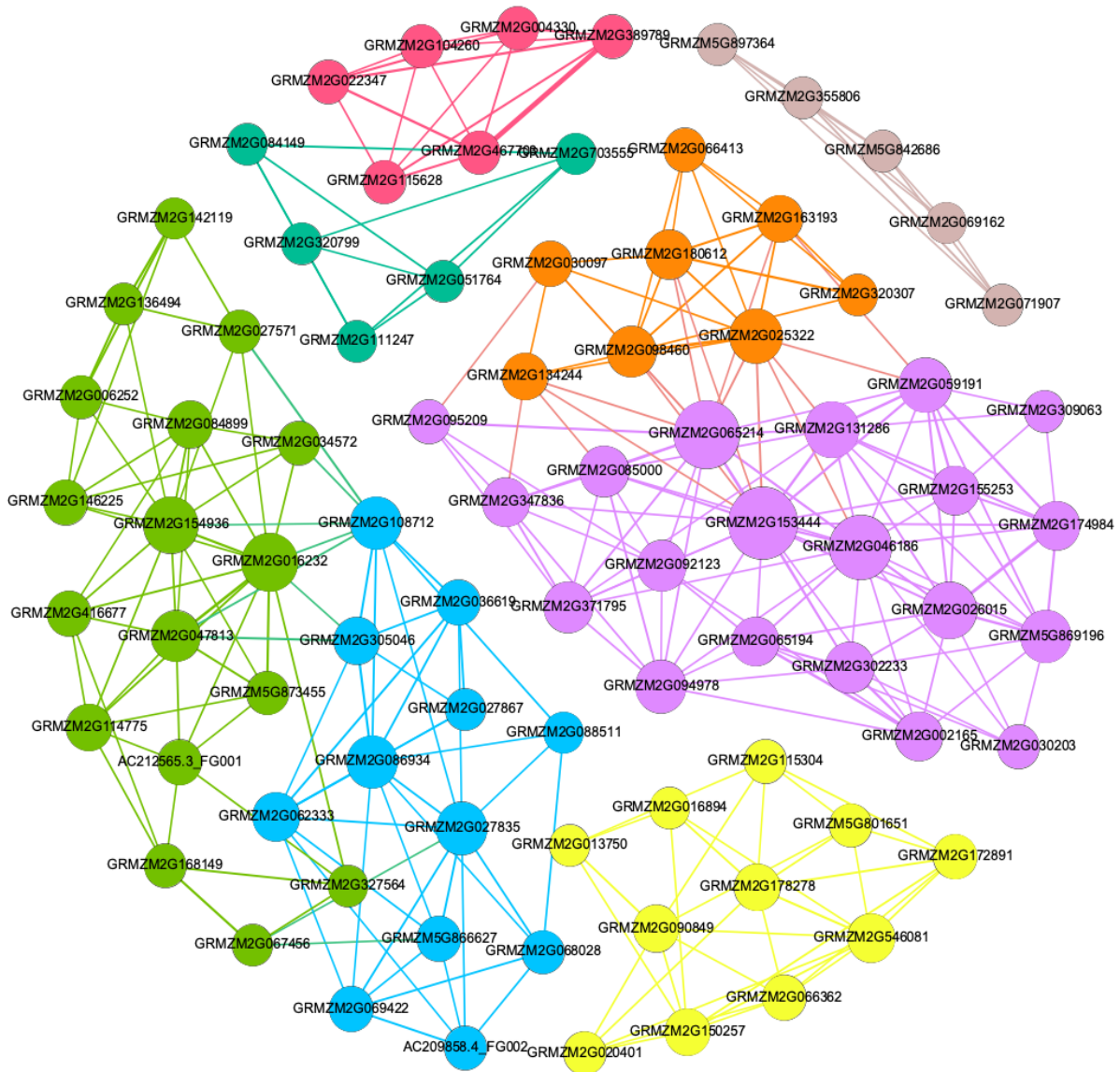
a.



Red de genes obtenidos a través del análisis de enriquecimiento de los 172 genes asociados a través de GWAS a la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo. El número total de genes asociados usando las bases de datos ZmPAN = 6353. Cada color corresponde a un nodo de conexión estadísticamente significativa en relación a términos ontológicos con un p valor de  $\leq 0.05$ . Los genes aparecen con su código de identificación de la base de datos de MAIZEGDB. [ZmPAN: datos genómicos de diversos rasgos analizados en maíz Schaefer, R.J., et al. (2018)].



Red de genes obtenidos a través del análisis de enriquecimiento de los 172 genes asociados a través de GWAS a la respuesta hidrotónica de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo. El número total de genes asociados usando las bases de datos ZmROOT = 4898. Cada color corresponde a un nodo de conexión estadísticamente significativa en relación a términos ontológicos con un p valor de  $\leq 0.05$ . Los genes aparecen con su código de identificación de la base de datos de MAIZEGDB. [ZmROOT: datos genómicos de rasgos en raíz de maíz. Stelpflug, S.C., et al. (2016)].



Red de genes obtenidos a través del análisis de enriquecimiento de los 172 genes asociados a través de GWAS a la respuesta hidrotópica de la raíz primaria bajo las condiciones del sistema de ensayo. El número total de genes asociados usando las bases de datos ZmSAM = 2421. Cada color corresponde a un nodo de conexión estadísticamente significativa en relación a términos ontológicos con un p valor de  $\leq 0.05$ . Los genes aparecen con su código de identificación de la base de datos de MAIZEGDB. [ZmSAM: datos genómicos del atlas de tejidos de maíz. Hirsch, C.N., et al (2014)].



