



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

“Evaluación del efecto de *Rhodotorula* sp. (Rh4) en la germinación y crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* L.”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

Dulce Alejandra Franco Castillo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

COTUTOR DE TESIS

Dr. José Fernando Lledías Martínez

CUERNAVACA, MORELOS

Junio de 2023.

“Evaluación del efecto de *Rhodotorula* sp. (Rh4) en la germinación y crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* L.”

Tesis realizada por **Dulce Alejandra Franco Castillo** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: Dr. Jorge Luis Folch Mallo

Título académico, nombre completo

Codirector de tesis: Dr. José Fernando Lledías Martínez

Título académico, nombre completo

Revisor: Dra. Gladys Iliana Cassab López

Título académico, nombre completo

Revisor: Dr. José De Jesús Arellano García

Título académico, nombre completo

Revisor: Dra. Susana Valencia Díaz

Título académico, nombre completo

Agradecimientos institucionales

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma de Morelos, por permitirme aprender y trabajar en sus aulas y laboratorios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Agradecimientos a título personal

A mi mamá Rosa María Castillo Sánchez y mi hermana Araceli Franco Castillo por su apoyo incondicional, su paciencia, por alentarme siempre a continuar; y a toda mi familia por creer siempre en mí. A mi padre por estar presente hasta que pudo hacerlo.

Al Dr. José Fernando Lledías Martínez por su soporte y asesoría en todas las técnicas durante mi posgrado.

A la Dra. Gladys Iliana Cassab López por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol, por sus aportaciones en el desarrollo del proyecto y su apoyo.

Al Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís y su grupo, en especial a la MC. Sofía J. Catalan Figueroa por apoyarme con la cepa control para este proyecto, los medios de cultivo para esta cepa y la asesoría sobre el manejo de la misma.

A los miembros del comité tutorial por su valioso aporte, su acompañamiento y apoyo.

*A la MC. María Eugenia Campos por su ayuda en la realización de las técnicas de cultivo *in vitro*. Además de su apoyo a nivel personal, académico y con la administración del laboratorio.*

*A la MC. Elda Patricia Rueda Benítez por su asesoría en la preparación de medios de cultivo y cultivo *in vitro*.*

Al Dr. Arnaud Jacques Marcel Ronceret por compartirme un espacio de su laboratorio para trabajar.

A la Dra. Mery Nair Saenz por su ayuda con el análisis estadístico.

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 durante el desarrollo de este proyecto.

A Carmelita por su amistad, sus regañones atinados, gran soporte en mis actividades académicas y personales y su ayuda con las actividades del laboratorio.

A mis compañeros y amigos Mery, Mayra, Paty, Tomás, Tania, Alberto, Paty.

A Gary, mi novio, mi compañero y soporte de vida.

*A Gely y Hector, por apoyarme siempre y considerarme una integrante más de su familia.
Y a todos con quienes he compartido este proceso.*

Dedicatoria

A aquellos que representan armonía en mi vida.

Contenido

1	RESUMEN	7
2	INTRODUCCIÓN	8
3	MARCO TEÓRICO	9
3.1	<i>Zea mays</i> , cultivo de interés económico en el mundo	9
3.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9
3.3	Microorganismos promotores de crecimiento vegetal y su uso en cultivos de maíz	10
3.4	Sistema de reto hidrotrópico en raíz primaria de maíz	11
3.5	Microorganismos degradadores de plaguicidas	11
3.6	<i>Rhodotorula sp</i>	12
4	JUSTIFICACIÓN	13
5	HIPÓTESIS	13
6	OBJETIVOS	13
6.1	OBJETIVO GENERAL	13
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
7	MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1	MICROORGANISMOS.	14
7.2	Curva de crecimiento de Rh4.	14
7.5	<i>Zea mays</i> L.	14
7.6	Evaluación del efecto de Rh4 en el crecimiento post-germinación de la raíz.	14
7.7	Evaluación de la respuesta hidrotrópica de la raíz en presencia y ausencia de Rh4.	15
7.8	Presencia de Rh4 en las plántulas después de germinación y de reto hidrotrópico	15

7.9 Pruebas <i>in vitro</i> de desarrollo de la raíz primaria de <i>Zea mays</i> en presencia de Rh4 en medio semi solido	15
7.10 Evaluación de la respuesta de <i>Arabidopsis thaliana</i> en presencia de Rh4.	17
7.11 Toma de evidencias para análisis de los resultados	17
7.3 Plaguicida Metil Paratión.	17
7.4 Evaluar de degradación de paratión metílico en presencia de Rh4.	17
8. RESULTADOS	18
8.1 <i>Rhodotorula</i> Rh4.	18
8.2 Curva de crecimiento de Rh4.	18
8.3 Recuento en placa.	19
8.5 Efecto post-germinación:	19
8.6 Evaluación de la respuesta hidrotópica de raíz en presencia y ausencia de Rh4.	23
8.7 Recuperación de Rh4 de las plántulas después de la germinación y del reto hidrotópico.	25
8.8 Evaluación del desarrollo de la raíz primaria de <i>Zea mays</i> L. en presencia de Rh4 en medio semi solido en diferentes ángulos.	27
8.9 Evaluación del desarrollo de la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i> en presencia de Rh4 en medio semi solido	31
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIONES	35
11. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	35
12. BIBLIOGRAFÍA	7

“Evaluación del efecto de *Rhodotorula* sp. (Rh4) en la germinación y crecimiento de la raíz de *Zea mays* L. y *Arabidopsis thaliana*”

1 Resumen

Se ha demostrado que hongos y bacterias tienen estrechas relaciones con las plantas hospederas que las alojan y que esto permite la promoción del crecimiento de la planta, así como la protección de plantas patógenas en los cultivos. La importancia radica en la asociación simbiótica que se establece entre las raíces de la planta y los microorganismos, donde estos actúan como fijadores de nitrógeno atmosférico, transportadores de nutrientes y de agua a la planta, entre otros, además algunos juegan un rol muy importante en la degradación de plaguicidas usados comúnmente en los campos de cultivo, factores que tienen un gran impacto en la agricultura. Un ejemplo es la levadura *Rhodotorula*. La levadura *Rhodotorula* sp. Rh4 aislada por Tapia I., *et al.*, 2020 de la planta *Arenaria* *genus* que habita el cráter del volcán Xinantécatl ha sido caracterizada como promotora del crecimiento vegetal (PCV) para *Solarum persicum* además se caracterizó por su capacidad para solubilizar fosfatos, y tener actividad de xilanasas, quitinasas, celulasas y proteasa.

Ya que no encontramos referencias sobre la capacidad de Rh4 como promotor de crecimiento de maíz, nos propusimos como objetivo principal en este trabajo, evaluar el efecto de *Rhodotorula* en maíz durante su germinación, en el desarrollo post-germinación y en la respuesta hidrotropica. Aunque no se observó un efecto de *Rhodotorula* Rh4 sobre las semillas mejorando la germinación y en las plántulas de maíz en su respuesta al estrés hídrico pudimos identificar mediante el cultivo de explantes en medio sólido, que Rh4 sigue presente en las plántulas después de 72h de germinación y después de 24h de su exposición al reto hidrotópico. Lo anterior sugiere que hay una relación simbiótica que pudiera ser de provecho para el maíz en siguientes etapas de desarrollo.

La contradicción observada entre los resultados obtenidos entre plántulas de jitomate y maíz, nos llevaron a evaluar los efectos de Rh4 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Rh4 tuvo un efecto negativo en el desarrollo post-germinación en la raíz primaria de *A.thaliana* al inhibir su crecimiento y modificar la orientación de su crecimiento evitando el área del inóculo comparado con el crecimiento vertical normal de las plántulas control. Estos resultados sugieren que diferentes factores como la acidificación del medio y la producción de ácido indol acético tienen efectos distintos que dependen de la especie vegetal en la que se ponga a prueba Rh4.

2 Introducción

Desde que los ecosistemas originales naturales fueron transformados en ecosistemas cultivados, fabricados y explotados por el hombre, la agricultura ha conquistado el mundo y se ha convertido en el principal factor de transformación de la ecosfera; además, su ganancia en producción y productividad ha influenciado respectivamente en el incremento del número de personas y el desarrollo de grupos sociales que no producen su propio alimento (Mazoyer M. and Roudart L., 2006). La producción mundial de alimentos agrícolas debe impulsarse para alimentar a una población en crecimiento. La agricultura sostenible y rentable es un desafío global que ha atraído cada vez más atención entre los científicos. La situación actual ha motivado a los científicos a investigar microorganismos que exhiben rasgos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) y explorar las numerosas interacciones mutualistas entre las raíces de las plantas y el microbioma (Fernández I., *et al.*, 2020). Los PGPM facilitan el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos: fijación de nitrógeno, producción de hormonas de plantas como ácido indol-3-acético (IAA), mejoran la absorción de nutrientes, solubilización de minerales inorgánicos, quelación de hierro, producción de amonio (NH₃) o competencia directa con otros microorganismos patógenos (Fernández I., *et al.*, 2020). La mayoría de los PGMP que han sido descritos son bacterias y poca atención se ha dado a los hongos (con excepción de *Trichoderma* o *Micorizae*) y menos a los hongos extremófilos (Tapia I., *et al.* 2020).

Algunos trabajos han descrito el potencial de las levaduras como PGPM, porque pueden sintetizar compuestos como IAA, solubilizan fosfato inorgánico, excretan sideróforos y producen enzimas funcionales con actividad fitopatógena (Tapia I., *et al.*, 2020). Las levaduras son hongos unicelulares que proliferan principalmente por medios asexuales y crecen rápidamente en carbohidratos simples, a menudo a través de vías fermentativas y respiratorias. Como consecuencia de su preferencia nutricional, las poblaciones de levadura son generalmente un orden de magnitud más altas en la rizosfera a diferencia que en la mayor parte del suelo. Una diversa gama de levaduras exhibe características promotoras del crecimiento de las plantas, incluida la inhibición de patógenos, producción de fitohormonas, solubilización de fosfato, oxidación de N y S, producción de sideróforos y la estimulación de la colonización de raíces micorrícicas (Amrayn K., *et al.*, 2012). Un ejemplo de ello es *Rhodotorula* que es una levadura ambiental común que se encuentra en el aire, el suelo, los lagos, entre otros, y que demostró promover el crecimiento de plantas de jitomate (Tapia I., *et al.*, 2020).

Adicionalmente desde el nacimiento de la actividad agrícola probablemente el hombre tuvo que manejar los daños provocados por las plagas y las enfermedades. Una manera de prevenirlos fue mediante el uso de compuestos que afectaban a estas plagas: los plaguicidas (Fernández M., 2017). El uso indiscriminado que en el pasado se ha dado a estos compuestos, ha propiciado que en la actualidad se detecten residuos de estos en el ambiente y se asocien con riesgo potencial a la salud pública (Castrejón M., *et al.*, 2019). Cuando los plaguicidas se dispersan en el ambiente, se convierten en contaminantes de los sistemas bióticos y abióticos, amenazando la existencia de plantas y animales además de representar un peligro para la salud humana (Castrejón M., *et al.*, 2019). Son necesarias tecnologías de remediación

para removerlos parcial o completamente de la naturaleza, diferentes microorganismos han sido reportados por tener capacidad de hidrolizar plaguicidas además de participar como promotores de crecimiento vegetal durante su simbiosis con la planta hospedera.

Por ello además de estudiar el efecto de *Rhodotorula* como promotor de crecimiento en maíz y *A. thaliana*, realizamos una serie experimental para ver si Rh4 posee la capacidad de degradar al paratión y pueda ser considerado como un posible biorremediador.

3 Marco teórico

3.1 *Zea mays*, cultivo de interés económico en el mundo

El maíz, uno de los tres granos básicos que alimentan a la humanidad, tuvo su origen y diversificación inicial en las montañas y valles de México por medio de la intervención de los antiguos pobladores de este territorio en un proceso coevolutivo que condujo a la formación de una de las plantas cultivadas de mayor diversidad genética cuya riqueza aún se mantiene en este país, principalmente por los productores del medio rural (Yamakake K., 2009). El maíz es la forma cultivada del género *Zea* y los investigadores involucrados en su estudio han reconocido que el teocinte es su ancestro (Yamakake K., 2009). El género *Zea* pertenece a la familia Poaceae que comprende más de 600 géneros. *Zea mays* L., es la especie a la que corresponde el maíz (forma cultivada del género), la cual debido a su estrecha relación biológica ha sido agrupada con los teocintes de las subespecies *parviglumis* y *mexicana*. El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual.

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 (Saenz, M., 2023 y Chaw, S., 2003). El tallo es cilíndrico y sin ramificaciones está formado por una sucesión de nudos que varía entre 8 y 25. Sus hojas nacen en dichos nudos alternadamente en dos filas a lo largo del tallo, pueden llegar a medir 1.5m de largo y 10cm de ancho, se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo, y sus nervaduras son paralelas y distintivas de las monocotiledóneas (Yamakake K., 2009 y Martines J, 2019). El maíz es el tercer cereal más importante después del arroz y el trigo, el cual se cultiva ampliamente en el mundo y es usado como un alimento primario en muchos países en desarrollo. Las prácticas de gestión basadas en la agricultura de conservación (labranza mínima/cero) son las nuevas tecnologías emergentes que atraen la atención en todo el mundo debido a los mayores beneficios económicos, la mejora en la salud del suelo y al ser más amigables con el medio ambiental reduciendo los gases de efecto invernadero (Hossain A., *et al.* 2020).

3.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta dicotiledónea con flores de la familia de las brassicáceas, con un tiempo de generación corto (cuatro a cinco semanas), la capacidad de polinización cruzada o autopolinización, y un número de cromosomas haploides de solo cinco. Se ha utilizado en una serie de experimentos en genética clásica y bioquímica (Leutwiler, L., 1984). En diversas investigaciones se ha hecho uso de esta planta ya que tiene un genoma extraordinariamente pequeño (aproximadamente 7×10^7 pares de nucleótidos) y poco ADN repetitivo. Esto confirma su potencial como organismo para su uso en la

experimentación genética molecular, y proporciona información básica como base para tales estudios (Kornneef, M., 2004 y Leutwiler, L., 1984).

Los rasgos analizados hasta ahora describen importantes características adaptativas de las plantas, como la latencia de las semillas, la floración y la tolerancia a factores abióticos y bióticos, y son relevantes en ecología y fitomejoramiento. Se espera que los métodos y el conocimiento generados en *Arabidopsis thaliana* ayuden a acelerar el análisis de rasgos y genes similares en otras plantas, incluidas las especies de cultivos silvestres y domesticados (Kornneef, M., 2004).

Las características de *Arabidopsis* la hacen una buena fuente de estudio en su interacción con microorganismos de interés biotecnológico, un ejemplo es lo que reporta Pelagio, R. *et al* 2017 al estudiar el efecto de del hongo *Trichoderma atroviride* como detonante del crecimiento temprano de raíces laterales en *Arabidopsis*, reporta que la promoción del crecimiento de *Arabidopsis* se observa claramente durante las primeras etapas de la interacción y que la acidificación por *T. atroviride* juega un papel esencial en la interacción *Trichoderma*-planta. La acidificación de la rizosfera por *T. atroviride* puede influir en la respuesta del desarrollo de la raíz a las auxinas y otras moléculas bioactivas y estimular o reprimir diferentes procesos de la planta de una manera específica y dependiendo de las características del suelo (Pelagio, R *et al*, 2017)

3.3 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal y su uso en cultivos de maíz

Diversas investigaciones repetidamente han demostrado que los hongos y las bacterias tienen estrechas relaciones con las plantas hospedadoras que las alojan y que esto permite la promoción del crecimiento de la planta, así como la supresión de plantas patógenas en los cultivos (Ortíz M., *et al.*, 2014).

Muchas especies de hongos, particularmente los micorrízicos, se encuentran asociados con la mayoría de las especies de plantas, comúnmente se les encuentra en la mayoría de los ambientes (Caballero J., 2006). Su importancia en la agricultura se fundamenta en la asociación simbiótica que se establece entre las raíces de las plantas y los microorganismos, donde estos actúan como fijadores de nitrógeno atmosférico, transportadores de nutrientes y de agua a la planta, y en la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, factores que tienen un impacto ecológico y económico (Díaz A., *et al.*, 2005).

Se han reportado incrementos significativos de biomasa y proteína soluble en las plantas de maíz cuando se inoculan con hongos micorrízicos. También se ha indicado que con la colonización micorrízica se ha incrementado el contenido de fósforo foliar, el peso radical y el rendimiento de grano de maíz (Aguirre J., 2002).

Las plantas son sésiles y han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten responder a los cambios en su entorno (Wang Y., 2020). El crecimiento es fundamental en la vida de las plantas (Cassab *et al.*, 2013). Uno de estos mecanismos es el crecimiento dirigido de los órganos vegetales lejos de los estímulos ambientales. Las respuestas de las plantas a la gravedad (gravitropismo) y la luz (fototropismo) se han estudiado ampliamente. El hidrotropismo es otro mecanismo fundamental en las plantas que facilita que las raíces

adquieran agua de manera efectiva en el suelo (Wang Y., *et al.*, 2020). En nuestro grupo de trabajo se ha fenotipificado la respuesta hidrotrópica de la raíz de maíz usando un sistema experimental diseñado con un gradiente de humedad generado por una solución higroscópica y un hidroestimulante.

3.4 Sistema de reto hidrotrópico en raíz primaria de maíz

Aunado a las evidencias sobre promoción de crecimiento a plantas de maíz por parte de hongos micorrícicos, hay evidencia de que la punta de la raíz del maíz es la más sensible a un hidroestimulante y se produce una distribución asimétrica de IAA en las raíces hidrotrópicas antes de que ocurra una flexión de forma inesperada (Wang Y., *et al.*, 2020).

Como reportan Eapen *et al.* 2015, el sistema de reto hidrotrópico de raíz de maíz está adaptado del sistema de gradiente de humedad reportado por Takahashi y Scott. Este sistema consiste de una caja acrílica transparente con tapa, dos hidroestimulantes adaptados a las dos paredes laterales de la cámara y carbonato de potasio como una solución higroscópica en el fondo de la cámara (Figura 1.B), y para el sistema control se utiliza agua en el fondo de la cámara (Figura 1.A).

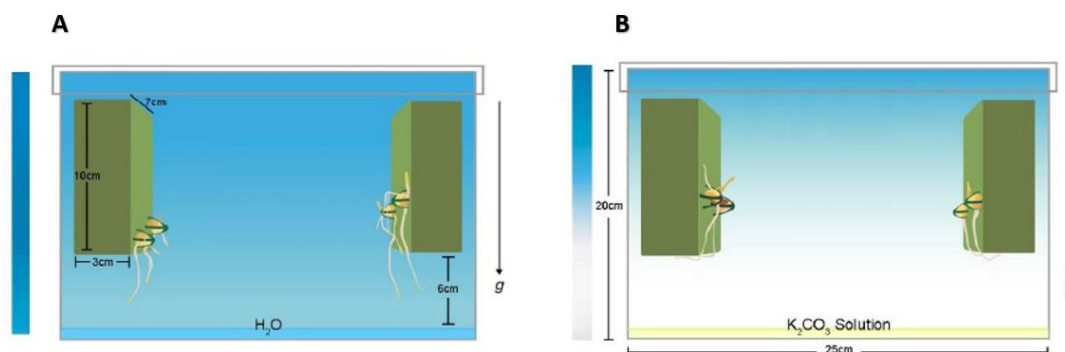


Figura 1. Representación esquemática del sistema para analizar la respuesta hidrotrópica de la raíz primaria de maíz. A) sistema control, en el cual se coloca agua en el fondo de la caja. La flecha indica la dirección del vector de gravedad y la barra degradada de azul a blanco ejemplifica el gradiente de humedad de mayor a menor y B) Sistema de reto hidrotropico con carbonato de potasio (K_2CO_3) para generar el gradiente de humedad en el cual se espera que las raíces crezcan hacia el hidroestimulante (espuma floral, representada con bloques verdes) (modificado de Eapen *et al.*, 2015).

3.5 Microorganismos degradadores de plaguicidas

La presencia de sustancias húmicas, péptidos, azúcares y fenoles de la materia orgánica en descomposición permiten el crecimiento poblacional de organismos autóctonos y que también es atractiva para otros de fuera o alóctonos, adaptados al cambio en los horizontes superficiales del suelo. Otras de las adaptaciones de organismos que permiten aprovechar óptimamente el recurso edáfico son las simbiosis, como las asociaciones planta-hongo o micorrizas, donde es eficiente el consumo de nutrientes minerales del suelo (Ortíz M., *et al.*, 2014). Los microorganismos del suelo juegan un rol muy importante en la degradación de los plaguicidas antes de que alcancen las aguas sub-superficiales (Sandoval F., *et al.*, 2017). Los plaguicidas son inevitablemente detectados en los suelos y aguas que son elementos

fundamentales para la productividad primaria de los ecosistemas, de tal manera que muchos de los elementos biológicos son, frecuentemente y de manera crítica, contaminados con plaguicidas organofosforados y carbamatos, por ello, es muy importante conocer la interacción que existe entre los microorganismos, el plaguicida y el suelo (Sánchez E., *et al.*, 2011, Badii M., *et al.*, 2007).

3.6 *Rhodotorula* sp.

Rhodotorula es una levadura ambiental común que se encuentra en el aire, el suelo, los lagos, el océano, la leche y el jugo de frutas. Las especies de *Rhodotorula*, parte del filo Basidiomiceta, colonizan plantas, humanos y otros mamíferos. *Rhodotorula* produce colonias de color rosa a rojo y blastoconidias que son unicelulares, sin hifas. Varios autores describen el aislamiento de este hongo de diferentes ecosistemas, incluidos sitios con condiciones desfavorables (Wirth F. y Goldani L., 2012).

Tapia I., *et al.*, 2020 aislaron algunas cepas de levadura de la planta *Arenaria genus*, que habita el cráter del volcán Xinantécatl, este ecosistema probablemente es una fuente de microorganismos capaces de mostrar algunos rasgos particulares como la promoción del crecimiento de las plantas, protección a baja temperatura e inhibir el ataque de fitopatógenos, entre otros (Tapia I., *et al.*, 2020) algunas cepas de levadura que aislaron demostraron ser promotoras de crecimiento vegetal, un ejemplo de ellas es la levadura *Rhodotorula* sp Rh4 que caracterizaron como una cepa psicotolerante por tener un rango de temperaturas de 3-37°C siendo 28°C su temperatura óptima de crecimiento. Este ecosistema probablemente es una fuente de microorganismos capaces de mostrar algunos rasgos particulares como la promoción del crecimiento de las plantas, protección a baja temperatura e inhibir el ataque de fitopatógenos, entre otros (Tapia I., *et al.*, 2020). Además, la cepa de *Rhodotorula* sp Rh4 ha sido caracterizada en cuanto a su capacidad para solubilizar fosfatos, producir hormona de crecimiento vegetal ácido indol acético (IAA) y tener actividad de xilanasas, quitinasas, celulasa y proteasa.

A pesar de que la levadura *Rhodotorula* fue aislada de plantas del volcán en un ambiente de bajas temperaturas, ha demostrado tener efecto como microorganismo promotor de crecimiento vegetal en plantas de Chile. *Rhodotorula* también mejoró la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* y estimuló el desarrollo de raíces laterales y pelos radiculares en *Nicotiana benthamiana* mediante la producción de IAA. Además, se comprobó su capacidad como biodegradador por tener actividad de proteasa, quitinasa y xilanasas (Tapia I., *et al.*, 2020, Fernández I., *et al.*, 2020). Esto habla del gran potencial de Rh para promover el crecimiento de plantas no relacionadas a la planta de la que se aisló originalmente, que incluso son de uso comercial o de importancia mundial para la alimentación humana y de ganado. Es escasa la información sobre el papel de Rh4 en la germinación y crecimiento de plantas y nula sobre su efecto en la respuesta hidrotropica. Por ello surge el interés de evaluar el efecto de Rh4 en maíz no sólo durante su germinación y desarrollo post-germinación, sino también si puede mejorar la respuesta hidrotropica de la raíz de maíz mejorando su respuesta durante estrés hídrico. A la par de evaluar su potencial como posible degradador de plaguicidas usados comúnmente en cultivos de maíz.

4 Justificación

El agua es vital para la vida y la falta de este recurso en cultivos agrícolas trae consigo severas consecuencias que en muchas ocasiones son irreparables, una consecuencia de este déficit es el estrés hídrico, que puede llevar a la pérdida total de cultivos (Martínez J., 2019). 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 la respuesta hidrotónica robusta de la raíz; donde se redirige el crecimiento de la raíz en busca de fuentes de agua, evadiendo bajos potenciales hídricos (Sáenz M., 2023).

Aunque experimentos de nuestro laboratorio han mostrado que *Rhodotorula sp.* es un promotor de crecimiento en tomate y chile, su papel como promotor de crecimiento en la germinación, desarrollo postgerminación y en la respuesta hidrotónica en plantas de maíz no ha sido estudiado. Uno de los efectos por los cuales Rh4 puede actuar como promotor de crecimiento vegetal, es influyendo en la respuesta hidrotónica de la raíz que también fue estudiado. Es por ello que en un sistema experimental establecido en el laboratorio (Eapen *et al.*, 2015), evaluaremos si la presencia de la levadura modifica el crecimiento diferencial de las raíces de *Zea mays* L. en favor de un gradiente de humedad.

5 Hipótesis

H La cepa de levadura *Rhodotorula sp. Rh4* tiene un efecto positivo en el desarrollo de la raíz de *Zea mays* L.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la cepa de *Rhodotorula sp. Rh4* en el desarrollo de la raíz de *Zea mays* L.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de Rh4 en la germinación, el crecimiento y respuesta hidrotónica de la raíz de *Zea mays* L.
2. Evaluar el efecto de Rh4 en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
3. Identificar la capacidad de degradación de paratión metílico por Rh4.

7. Materiales y métodos

7.1 Microorganismos.

Se usó la cepa de levadura *Rhodotorula* Rh4, aislada por Tapia-Vázquez, *et al.*, 2020 del cráter del volcán Xinantécatl. Se inició con un pre-inóculo en Caldo Papa Dextrosa (PDB) incubado a 28°C durante 48h, midiendo Densidad Óptica hasta $[O.D(600\text{ nm})]=0.4$, después se mantuvo en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y en refrigeración a 4° C hasta su uso.

Como control positivo para la degradación de paratión metílico se usó la cepa de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB s4-3, proporcionada por Dra. Patricia Mussali Galante, usando Caldo de Triptona de Soya (TSB) y Agar Triptona de Soya (TSA) para su crecimiento.

Se prepararon gliceroles de ambas cepas, en tubos eppendorf de 1.5mL con glicerol estéril al 50%, para almacenarse a -80° C.

7.2 Curva de crecimiento de Rh4.

A partir de una colonia aislada de Rh4, se preparó un pre-inóculo, el cual se mantuvo en incubación a 28°C y 150 rpm durante 48h. Con este pre-inóculo se prepararon 100mL de cultivo en PDB de Rh4 y se ajustó a una OD = 0.1 a 600 nm. Enseguida, se repartió en tubos de cultivo con un volumen de 5mL por tubo. Se dejaron los tubos en incubación a 28°C y agitación de 150rpm, tomando un tubo cada lapso y se midió la OD a 600 nm, con estos valores se realizó la curva graficando OD (600 nm) vs tiempo.

7.5 *Zea mays* L.

Se usó la línea de maíz ASH previamente caracterizada por tener respuesta hidrotropica débil.

7.6 Evaluación del efecto de Rh4 en el crecimiento post-germinación de la raíz.

Las semillas fueron hidratadas durante 2h, en agua destilada en un matraz con agitación constante a 24°C.

Posteriormente, se agregaron 50mL de hipoclorito de sodio al 15%, durante 3 minutos con agitaciones pausadas y enseguida se desechó el hipoclorito. Después se hicieron 3 enjuagues con agua destilada estéril, o hasta no percibir olor a cloro.

Previamente se prepararon dos charolas con papel absorbente, cubiertas con aluminio y se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C; estas charolas se usaron para la germinación de la semilla., Cada charola fue humedecida con 200mL de agua destilada estéril. Enseguida, en una charola se colocaron las semillas que fueron inoculadas con colonias de Rh4 crecidas en medio PDA durante 48h a 28°C; se inocularon en la coleorriza de la semilla, tomando el inóculo del centro de una colonia con un palillo estéril. Mientras que en la otra charola se colocaron las semillas control, sin inóculo. Se mantuvieron en incubación durante 72 h tomando medidas de raíz primaria cada 24 h para ambas charolas. Este proceso se realizó por triplicado utilizando la línea de maíz ASH.

La evaluación del crecimiento post-germinación, se hizo midiendo la longitud de la raíz primaria, el número de raíces, y finalmente mediante la obtención del peso seco de sistema aéreo y raíz, lo cual se realizó 96 h postgerminación.

Para la obtención de peso seco de follaje y raíces. El material vegetal se secó en un horno a 80°C hasta obtener peso constante.

7.7 Evaluación de la respuesta hidrotropica de la raíz en presencia y ausencia de Rh4.

Con el fin de evaluar si *Rhodotorula* tiene efecto sobre la respuesta hidrotropica de la raíz de maíz se llevó a cabo la metodología descrita por Martínez J., 2019 modificada de Eapen *et al.*, 2015, en un sistema experimental diseñado con un gradiente de humedad generado por una solución higroscópica y un hidroestimulante. El sistema consta de una caja de acrílico cerrada (20 x 25 x 10 cm), en la cual se colocan dos bloques de espuma floral [marca Oasis] que participan como hidroestimulantes (este material tiene la capacidad de absorber hasta 40 veces su peso en agua) a los cuales se anclan las plántulas de maíz, y en el fondo de la caja se depositan 200mL de una solución de carbonato de potasio a densidad 1.5 g/cm³, que actúa como agente higroscópico o 400mL de agua como control. Se estableció la siguiente clasificación de la respuesta hidrotropica, en base al ángulo de curvatura, de la manera siguiente: Débil (con ángulos de curvatura entre 10 y 39°), Robusta (crecimiento en dirección a la fuente de humedad, ángulos $\geq 40^\circ$), o Gravitropica (crecimiento en dirección al vector de la gravedad, ángulos $\leq 9^\circ$).

Se usaron plántulas que fueron inoculadas desde semilla antes de germinación, y otras sin inocular como control.

7.8 Presencia de Rh4 en las plántulas después de germinación y de reto hidrotropico

Para saber si *Rhodotorula* estaba presente en las plántulas y esto sugería su participación durante la germinación o el hidrotropismo de la raíz primaria de maíz, se inocularon las raíces de las plántulas provenientes del experimento de evaluación de la respuesta hidrotropica en medio PDA, después de cada proceso.

Se seleccionó la raíz de una plántula después de 72 h de germinación. Se colocó en una caja Petri con medio agar papa dextrosa, después esta misma raíz se esterilizó con 3 lavados de hipoclorito de sodio NaOCl al 5% durante 3 minutos cada uno, enseguida se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, después se trataron con etanol al 70% durante dos minutos, seguido de 5 lavados con agua destilada estéril. Para comprobar que el lavado fue eficiente, esa misma raíz se colocó en otra caja con medio PDA, después se molió la raíz con 500µL de agua destilada estéril y de esta mezcla se colocaron 6 gotas en otra caja con medio PDA. Esto también para verificar si *Rhodotorula* se internaliza en la raíz, o permanece en la superficie. Esto se realizó por duplicado.

7.9 Pruebas *in vitro* de desarrollo de la raíz primaria de *Zea mays* en presencia de Rh4 en medio semi solido

Con el objetivo de conocer el efecto de Rh4 en la fase inicial del desarrollo de las plantas, se hicieron pruebas de germinación y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) y *Arabidopsis thaliana* en placas de Petri. La inoculación se hizo siguiendo los dos modelos

experimentales descritos por Tapia I., 2020, uno utilizando cajas cuadradas de 100 X 100 X 15 mm. y otro en cajas de Petri circulares de 80 X 15 mm de diámetro con medio MS (Murashige y Skoog). Para ambas se inoculó Rh4 proveniente de un cultivo líquido ajustado a DO 600 nm 0.2. por estriado con asa de platino. En las cajas cuadradas se inoculó una línea en la orilla inferior mientras que en las redondas fue de manera circular.

Se dejó crecer Rh4 en el medio MS durante 6 días a 28°C, posteriormente se realizó la siembra de semillas previamente desinfectadas y germinadas con raíz primaria de 2mm de longitud. Para la siembra de la semilla se usaron tubos de cultivo esteriles para perforar el medio de cultivo y colocar ahí la semilla, se dejaron en incubación durante 72h a 28°C, con diferentes ángulos de inclinación.

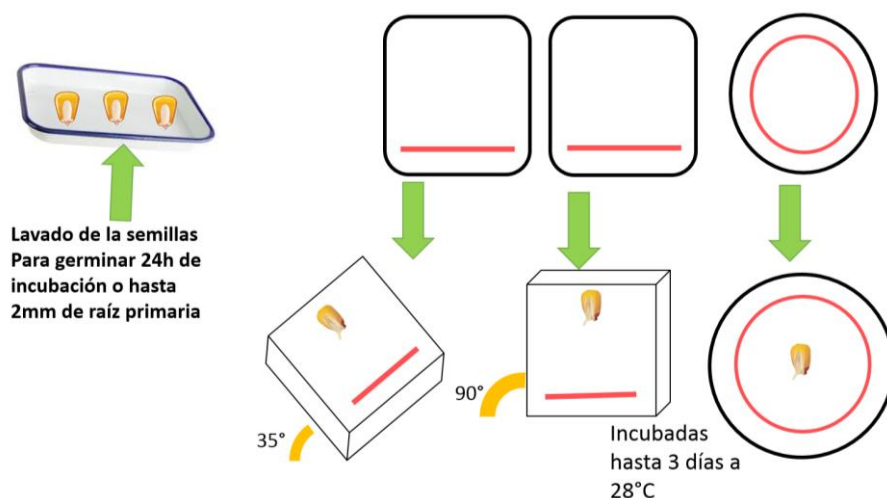


Figura 2. Modelos de inoculación para *Zea mays* L.

7.10 Evaluación de la respuesta de *Arabidopsis thaliana* en presencia de Rh4.

Se hizo el mismo proceso de preparación de medio MS para evaluar el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en presencia de Rh4.

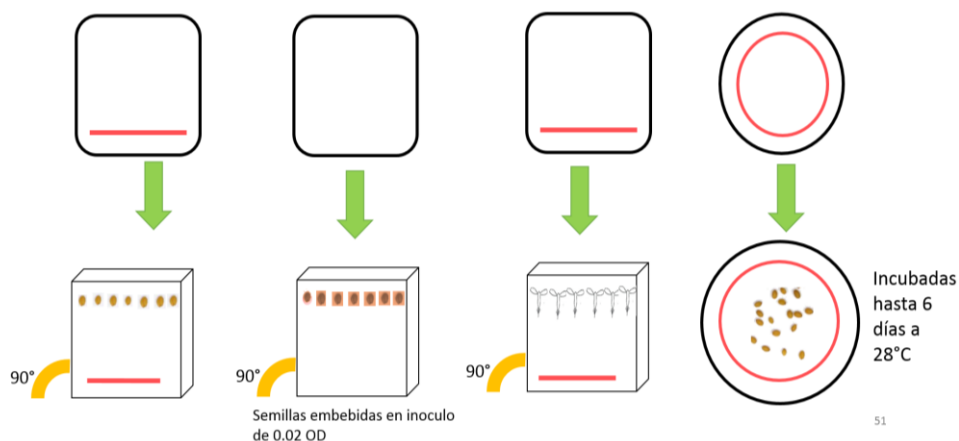


Figura 3. Modelos de inoculación para evaluar respuesta de *Arabidopsis thaliana*.

7.11 Toma de evidencias para análisis de los resultados

Todas las fotos se tomaron con una cámara de celular Xiaomi Redmi Note 9 de 48 MP, con zoom de 1x y 1.6x. Como referencia de medida se usó una regla de 15cm y las fotos a 30 cm de distancia del objeto de estudio. Las fotos se analizaron en el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), usando la regla milimétrica como medida conocida.

Las fotos del proceso de germinación, fueron tomadas a las 24, 48, 72 y 96 h en un cuarto oscuro con luz verde. Mientras que las fotos de las técnicas *in vitro* se tomaron en una campana de flujo laminar.

7.3 Plaguicida Metil Paratión.

Se usó metil paratión (O, O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorotioate) de grado analítico con 98% de pureza *Ultra Scientific, Analytical Standards, USA*.

Las pruebas preliminares se realizaron con un metil paratión de la marca comercial El Matabichos que contiene paration al 2% (peso/vol).

7.4 Evaluar de degradación de paratión metílico en presencia de Rh4.

Se preparó medio mínimo en cajas de Petri conteniendo paratión metílico, a diferentes concentraciones, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM y 0.5 mM, como única fuente de carbono, después se inoculó la cepa Rh4, en condiciones de esterilidad. Se incubaron a 28°C por 48hr. Detectando la hidrólisis de Paratión mediante aparición de halos amarillos, indicando la presencia de p-nitrofenol.

Se realizaron pruebas de espectrometría en cultivos líquidos para identificar la degradación de paratión metílico.

8. Resultados

8.1 *Rhodotorula Rh4*.

A partir de un cultivo de Rh4 en caja Petri (Figura 1), se seleccionó un borde del cultivo para obtener colonias aisladas utilizando un asa de platino el cual se estirió en medio PDA y se incubó por 48h (Figura 2). De este cultivo se seleccionó otra colonia para asegurarnos de tener un cultivo puro con colonias aisladas (Figura 3). Se seleccionó una colonia para preparar un pre-inoculo y realizar una curva de crecimiento (Figura 4).

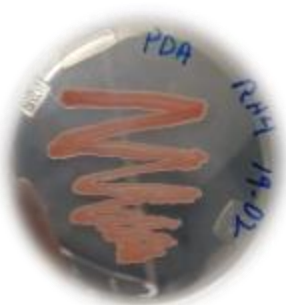


Figura 4. Cultivo de Rh4 en medio PDA, proporcionado por Dr. Jorge Folch.



Figura 5. Cultivo de Rh4 en medio PDA, obtención de colonias aisladas.

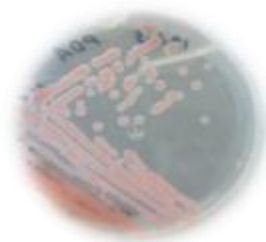


Figura 6. Cultivo de Rh4 en medio PDA, obtención de colonias aisladas.

8.2 Curva de crecimiento de Rh4.

Desde la OD inicial en el tiempo cero hasta las 5h de cultivo, se mantuvo la fase de latencia. Desde la hora 5, la levadura entro a la fase exponencial, aumentando su crecimiento hasta llegar a una OD = 2.407 (a 600 nm) a las 35 h de cultivo (Figura 4), después de 7 días de incubación, aún está en fase estacionaria.



Figura 7. Curva de crecimiento de Rh4 en medio PDB, cultivo en incubación a 28°C y 150rpm.

8.3 Recuento en placa.

Se eligió la OD = 0.4, después de 8 h de incubación para realizar diluciones dobles seriadas (Figura 6).

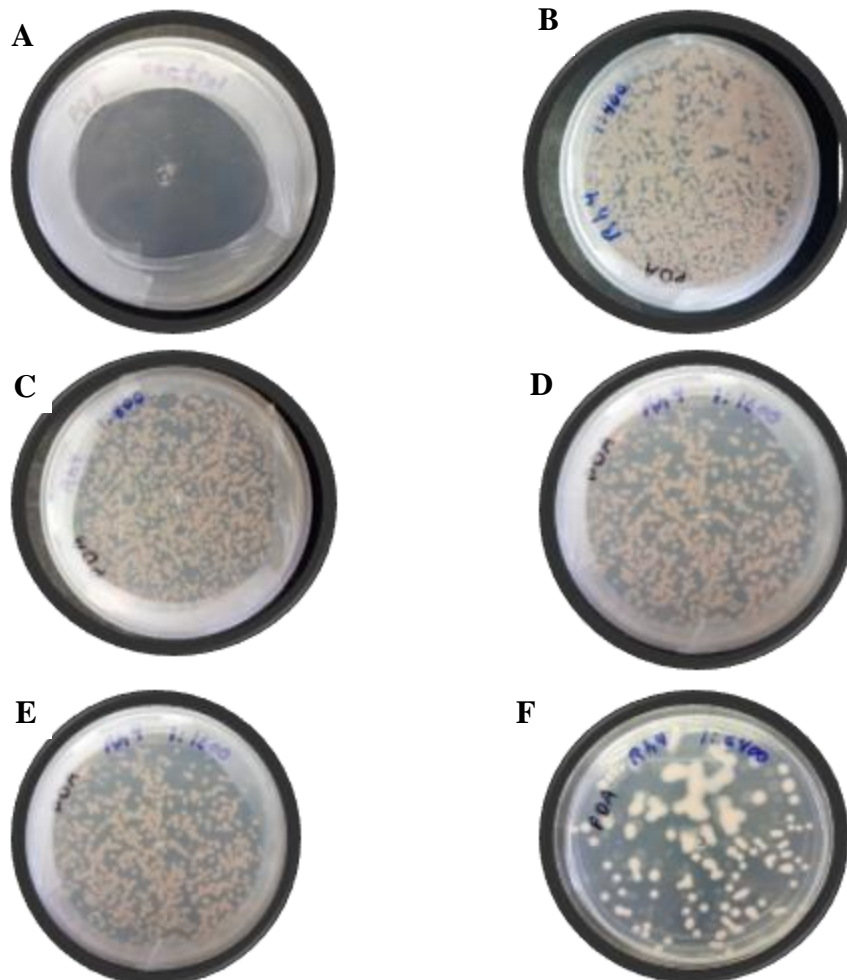


Figura 8. Diluciones dobles seriadas de *Rhodotorula sp* Rh4 en medio PDA, con incubación a 28°C durante 48h. A) control, B) dilución 1:400, C) dilución 1:800, D) dilución 1:1600, E) dilución 1:3200, F) dilución 1:6400.

8.5 Efecto post-germinación:

Debido a la poca disponibilidad de material biológico, se optó por trabajar únicamente con la línea de maíz ASH hidrotropicamente débil. Se pusieron a germinar 50 semillas de maíz inoculadas por contacto con una colonia de Rh4 en una charola y en otra charola el control sin inóculo. Esto se realizó por triplicado.

No se ve efecto de Rh4 sobre las semillas durante los primeros días de germinación. A las 72h, hay un cambio observable en el crecimiento de la radícula; sin embargo, el porcentaje de germinación fue de 75% para ambos tratamientos.

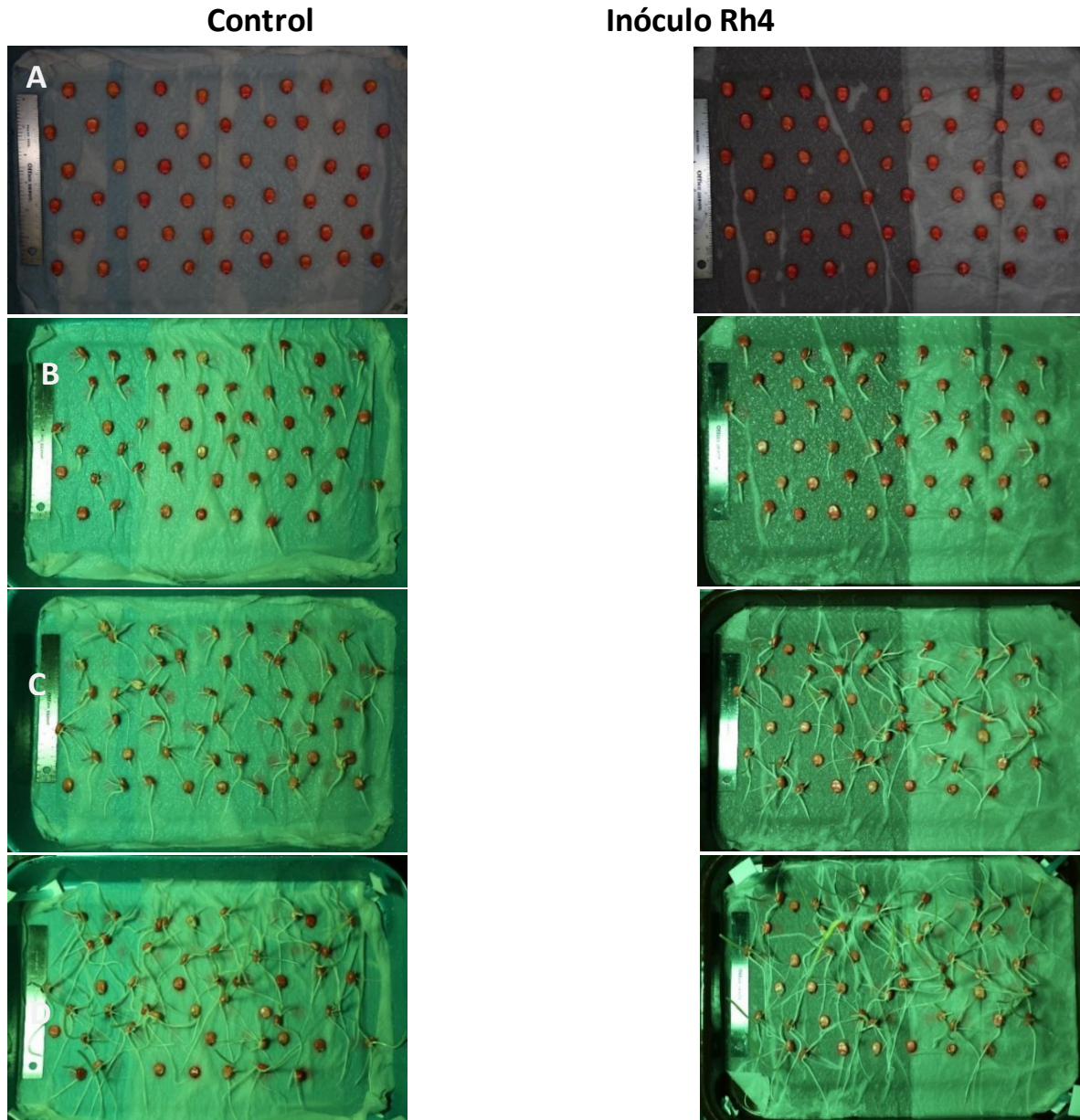


Figura 9. Semillas de maíz de la línea ASH. A) 24h de germinación. B), 48h de germinación C), 72h de germinación D), y 96 h de germinación, mostrando en la primera columna el control y en la segunda las semillas inoculadas con Rh4.

A las 97 h se sacaron las raíces de germinación, tanto el control como las inoculadas con Rh4, y se tomaron fotografías para medir longitud de raíz primaria, número de raíces embrionarias y raíces adventicias, además de medir peso fresco. Esto se realizó en cada una de las raíces y en cada réplica. Enseguida, las raíces se colocaron en un horno a 80°C por 72hr para obtener peso seco hasta peso constante. Este estudio se hizo por triplicado.

Inóculo



Control

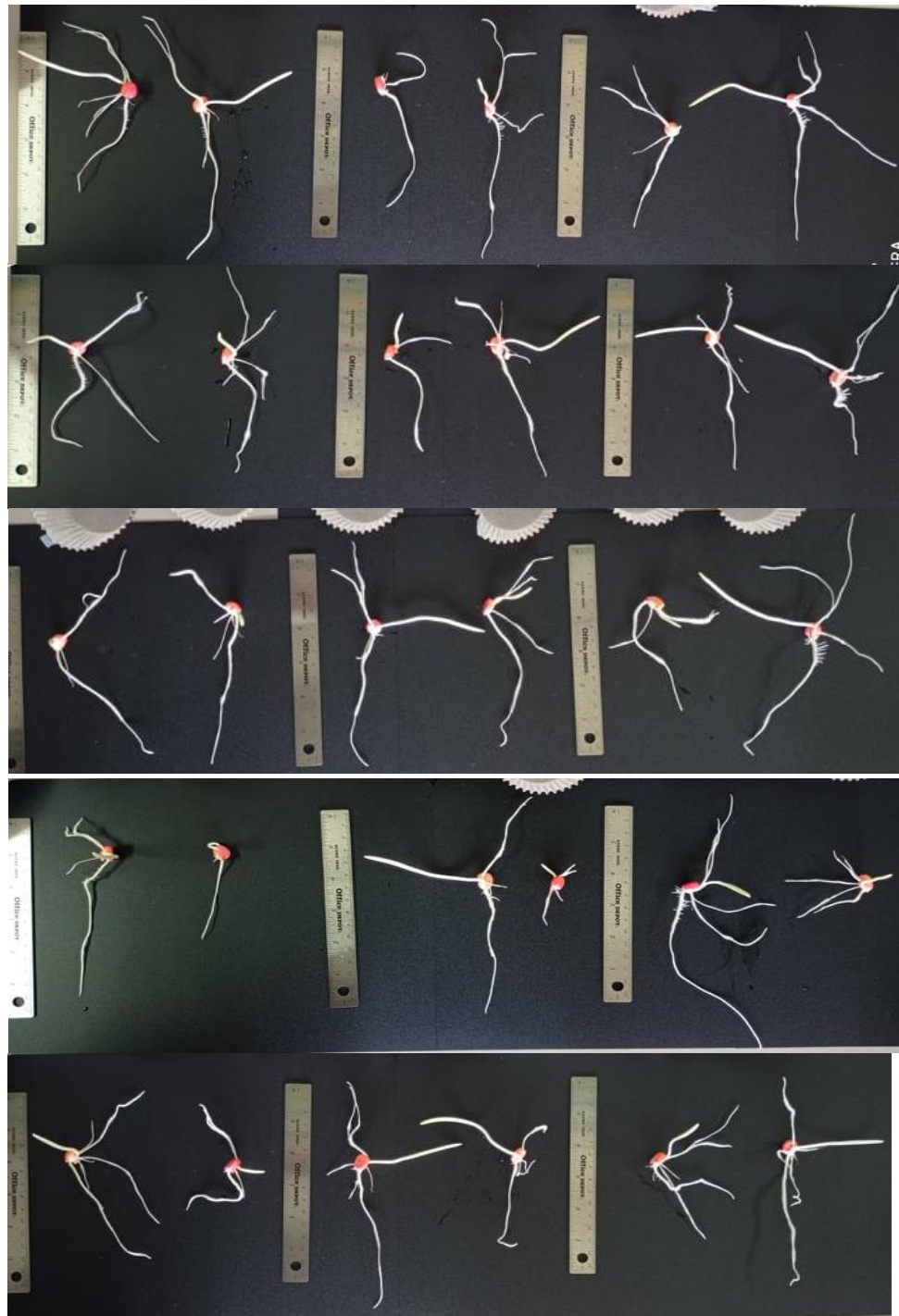


Figura 10. Semillas de maíz de la línea ASH a las 96h de germinación. A cada raíz se midió longitud de raíz primaria, número de raíces embrionarias y laterales, así como el peso fresco y peso seco.

La Figura 10 muestra las evidencias de la primera réplica del experimento. Notando el fenotipo de las raíces se observa que no hay diferencias significativas entre las raíces inoculadas y las raíces control, este comportamiento se conserva en las tres réplicas.

8.6 Evaluación de la respuesta hidrotrópica de raíz en presencia y ausencia de Rh4.

Con el objetivo de conocer el efecto de *Rhodotorula* Rh4 sobre la respuesta hidrotrópica de la raíz de maíz se usó el sistema experimental de reto hidrotrópico, se trabajó con 6 cajas enlistadas en la siguiente tabla:

Tabla 1. Etiquetado de cajas acrílicas usadas para el sistema de reto

		Numeración de cada plántula
Sistema control	ASH C H ₂ O	1, 2, 3, 4
	ASH C K ₂ CO ₃	5, 6, 7, 8
Sistema con plántulas inoculadas.	ASH R K ₂ CO ₃	9, 10, 11, 12
	ASH1 R K ₂ CO ₃	13, 14, 15, 16
	ASH R H ₂ O	17, 18, 19, 20
	ASH1 R H ₂ O	21, 22, 23, 24

Este análisis se realizó por triplicado, obteniendo resultados muy similares en todas las réplicas.

Comparando el sistema con agua sin inóculo y el sistema con agua y Rh4, se aprecian algunas diferencias entre la longitud de la raíz primaria y la longitud de algunas raíces adventicias. *Rhodotorula* favorece el crecimiento de raíces adventicias lo que nos indica un efecto en la anatomía de la planta. Recordando que ésta es una línea de maíz caracterizada como de respuesta hidrotrópica débil y viendo su respuesta en el sistema de reto con carbonato de potasio, se comprueba que durante el crecimiento de la raíz no se genera un ángulo de curvatura en favor de la fuente de agua al contrario se limita su crecimiento. Mientras que en las raíces en presencia de Rh4 que también fueron expuestas a estrés hídrico con el carbonato de potasio se puede observar mayor longitud de la raíz primaria en algunas plántulas.

Sistema control (H₂O) sin inóculo**Sistema control (H₂O) con Rh4****Sistema de reto (K₂CO₃) sin inóculo****Sistema de reto (K₂CO₃) con Rh4**

Figura 11. Respuesta hidrotropica de plántulas de maíz de la línea ASH, caracterizadas como débil hidrotropicamente. Se colocaron en el sistema de reto con inóculo de Rh4 que se colocó después de la germinación, las plántulas control son sin inóculo.

8.7 Recuperación de Rh4 de las plántulas después de la germinación y del reto hidrotrópico.

Las plántulas de maíz se colocaron sobre medio PDA con el objetivo de verificar que Rh4 se pueda recuperar de las plántulas tanto después de la germinación como después del reto hidrotrópico. Todas las plántulas seleccionadas fueron inoculadas al inicio de la germinación con Rh4. Las cajas se nombraron desde R1 hasta R6, que corresponden a: R1= medio PDA donde se puso en contacto una plántula después de 72h de germinación; R2= medio PDA donde se puso en contacto la misma plántula después de un lavado de tres minutos con NaOCl al 5%, tres enjuagues con agua destilada, dos minutos con etanol al 70% y tres enjuagues con agua destilada; R3= medio con 6 gotas de 20 μ L cada una de la misma plántula triturada durante 30s con 500 μ L de agua destilada estéril; R4= medio PDA donde se pusieron en contacto dos plántulas seleccionadas provenientes del sistema de reto, una del control (con agua) y la otra con K_2CO_3 ; R5= las mismas plántulas lavadas como se explica en R2 y colocadas sobre el medio; R6= gotas de cada una de las plántulas trituradas como en R3 y colocadas en el medio. Las cajas se incubaron durante 72h a 28°C. Este proceso se realizó por duplicado.

En todas las cajas se puede observar la aparición de bacterias, cuyo origen se desconoce, estas aparecieron desde las 24 h de incubación, mientras que Rh4 no se observa; sin embargo, a las 72 h ya se observa la presencia de colonias de Rh4. En R1 se observa que predomina el crecimiento de colonias color beige brillante con textura viscosa de borde ondular y hay la presencia de un pequeño barrido de colonias color rosa brillante que sugieren ser *Rhodotorula*. En R2 se observa la presencia de colonias beige de diferentes diámetros además pocas colonias rosas a pesar de haberse realizado el lavado de la raíz. En R3 se ve el crecimiento que se obtuvo de los goteos de la raíz triturada con agua destilada estéril y se observan colonias rosas dentro de un halo de crecimiento color beige. No se puede asegurar que estas colonias correspondan a colonias internas en la raíz, pero se hace la propuesta de que sean endófitas debido a que es mayor la presencia de Rh4 en los goteos del triturado a las obtenidas después del lavado de las raíces.

En los medios inoculados con las raíces que se obtuvieron del sistema de reto (Figura 21. R4), se puede observar presencia de Rh4 de las raíces que estuvieron en el sistema con K_2CO_3 y las que estuvieron en agua, aunque el crecimiento de Rh4 es mayor en las de carbonato, obteniendo lo mismo para R5 y R6, aunque de la misma forma se siguen observando estas colonias después de los lavados de la raíz, se ven menos colonias que después del triturado de la raíz, lo cual podría sugerir que Rh4 está internalizándose en la raíz de maíz.

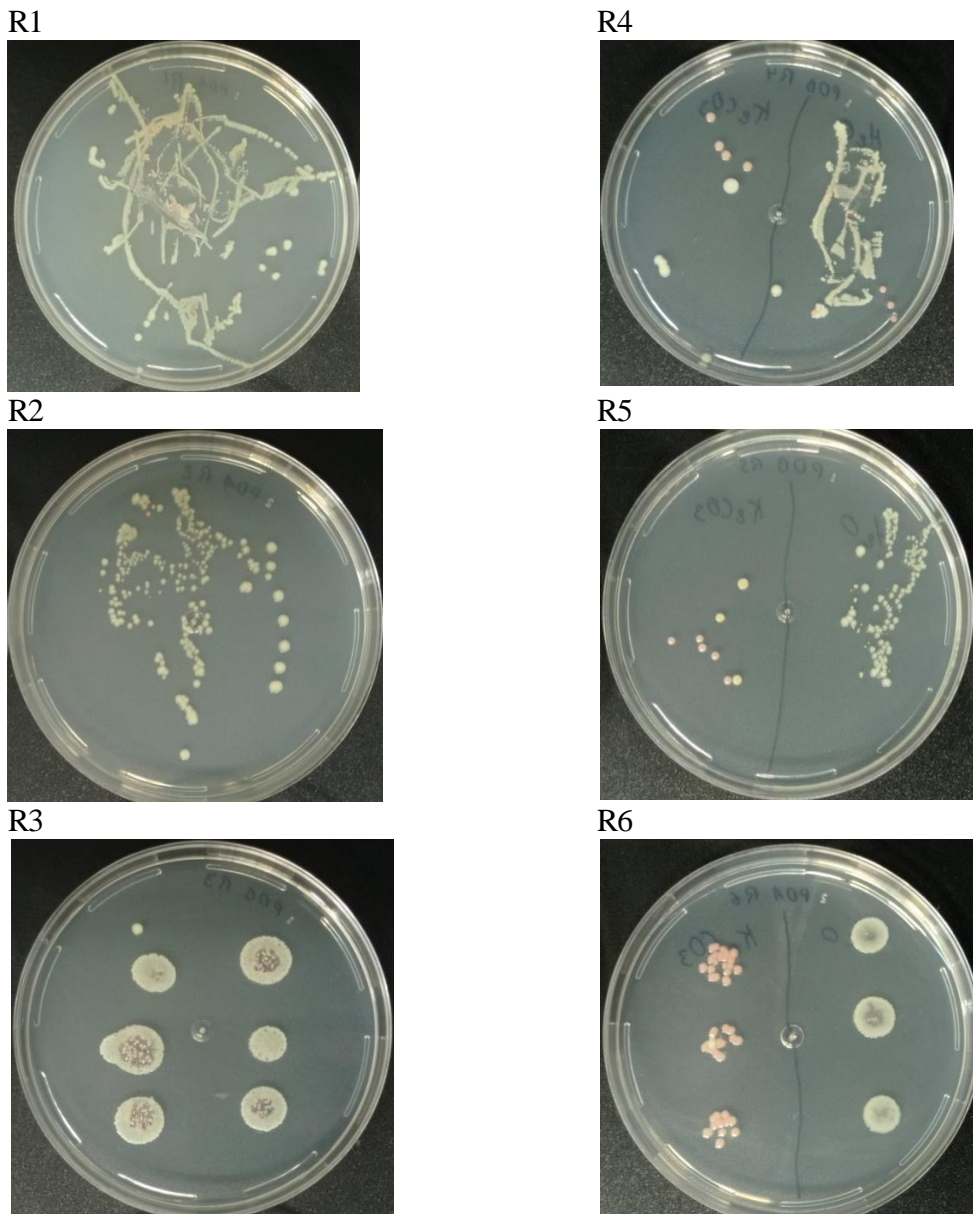


Figura 12. Plaqueo de las raíces obtenidas después de germinación y de sistema de reto hidrotópico. R1= plántula después de 72h de germinación; R2= la misma plántula después de un lavado de tres minutos con NaOCl 5% ; R3= 6 gotas de 20µL cada una de la misma plántula triturada durante 30s con 500µL de agua destilada estéril; R4=se seleccionaron dos plántulas que estuvieron en el sistema de reto, una como control (con agua) y la otra con K₂CO₃ y se colocaron sobre medio; R5= se realizó el lavado como se explica en R2 y se colocaron las plántulas sobre el medio; R6=cada plántula se trituró como en R3 y las gotas se colocaron en el medio. Todas las cajas son de medio PDA y se dejaron en incubación durante 72h a 28°C. este proceso se realizó por duplicado.

8.8 Evaluación del desarrollo de la raíz primaria de *Zea mays* L. en presencia de Rh4 en medio semi solido en diferentes ángulos.

En cada caja de Petri se colocó una semilla de maíz con raíz primaria de 2mm para evaluar el crecimiento postgerminación. En las cajas cuadradas se colocó la semilla en un extremo de la caja que ya tenía el inóculo en el extremo opuesto de la semilla, mientras que en las cajas redondas se colocó la semilla en el centro de la caja y el inóculo a manera de círculo rodeando la semilla. Las cajas de prueba ya tenían un inóculo de 6 días de Rh4, las control se manejaron sin inóculo. Seis cajas cuadradas (tres controles y tres prueba) se colocaron a 35° de inclinación, otras seis se colocaron a 90° de inclinación y las 6 cajas redondas se colocaron sin inclinación, esto se realizó por triplicado.

En este modelo *in vitro* es difícil observar un cambio entre el crecimiento de las plántulas en presencia del inóculo debido al tamaño de las semillas y la rapidez de crecimiento de la raíz primaria; además de que el crecimiento de todas las plántulas es muy variado aún en el control. Como ejemplo, algunas semillas colocadas a 90° de inclinación (Figura 24) se caen del sistema desde el primer día.

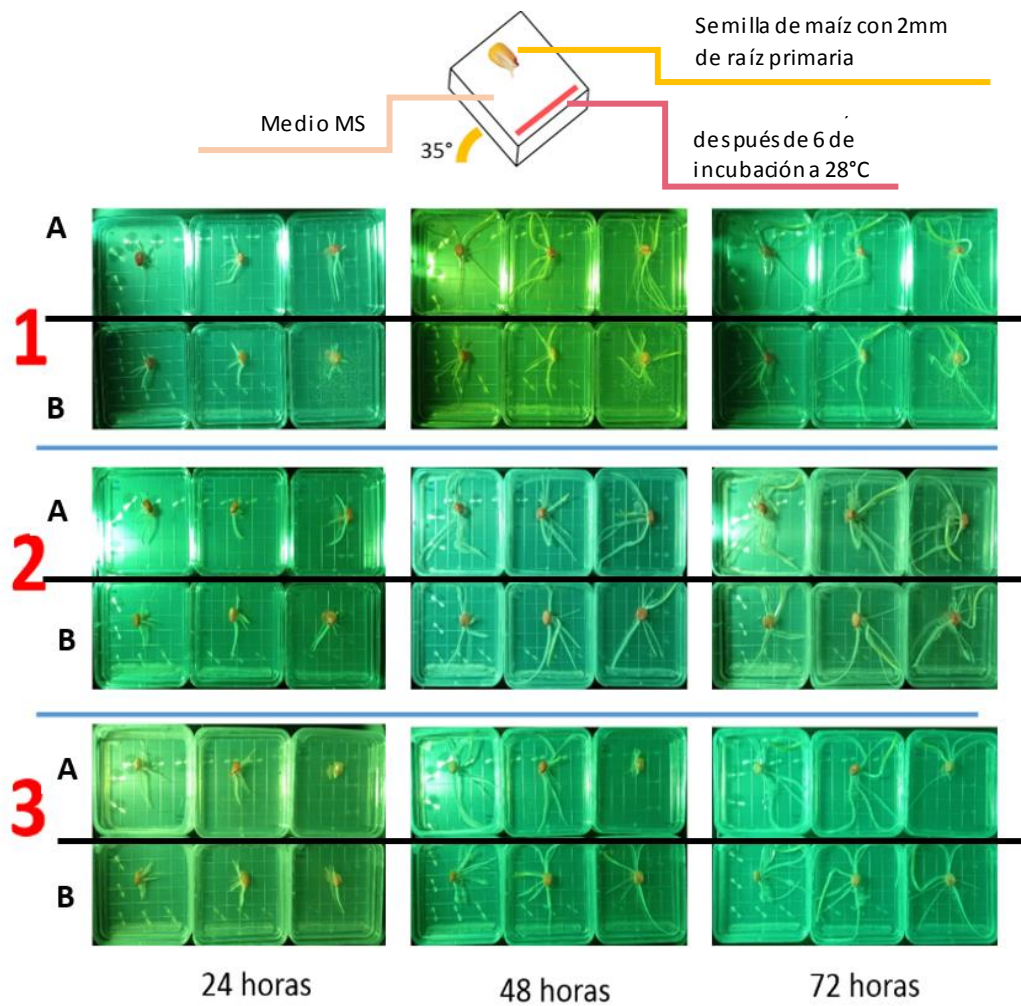


Figura 13. Prueba de germinación de *Zea mays* L. 1A, 2A, 3A) Control negativo; 1B, 2B, 3B) Medio con inóculo de Rh4 en la orilla inferior. Se mantuvieron en oscuridad y 28°C con 35° de inclinación durante 72h.

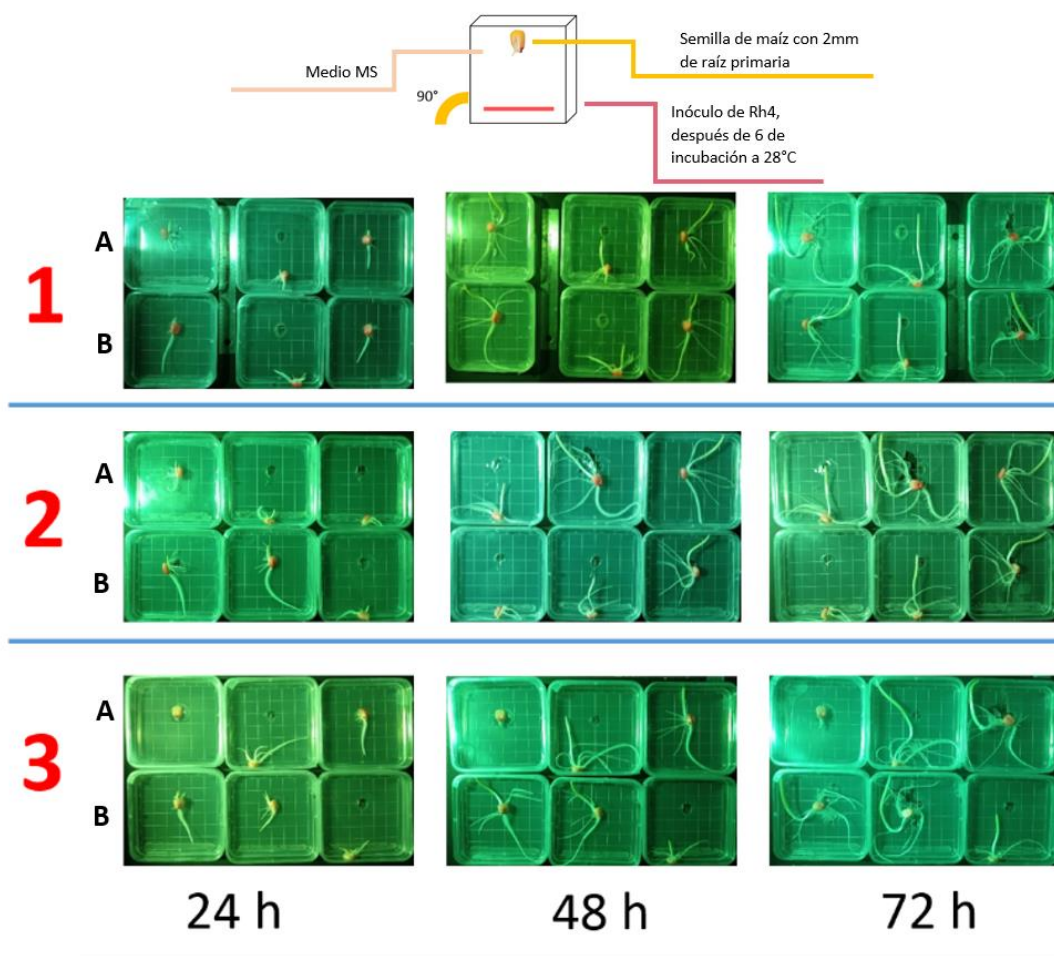


Figura 14. Prueba de desarrollo de raíz primaria de *Zea mays* L. 1A, 2A, 3A) Control negativo; 1B, 2B, 3B) Medio con inóculo de Rh4 en la orilla inferior. Se mantuvieron en oscuridad, 28°C y a 90° de inclinación durante 72h

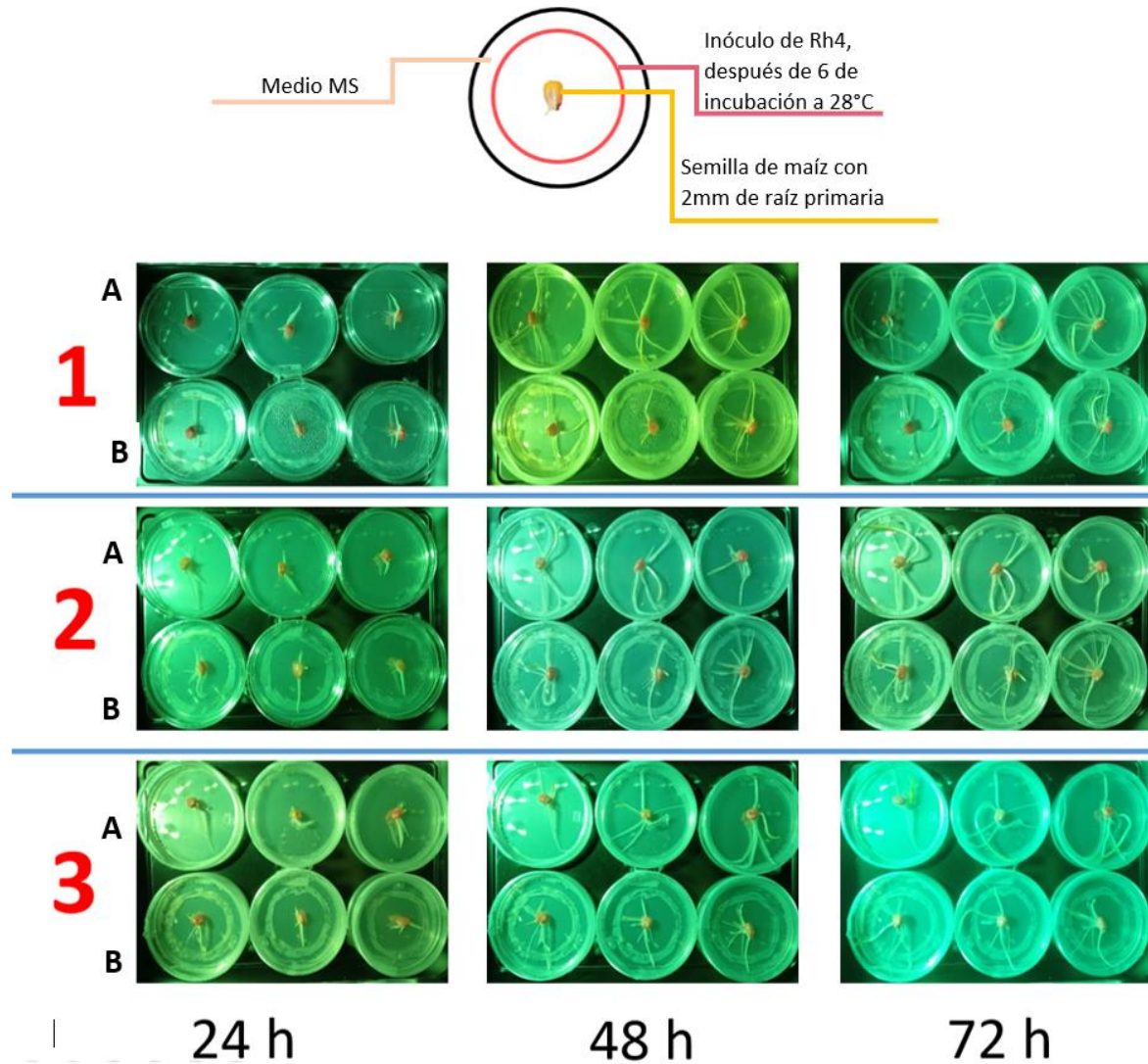


Figura 15. Prueba de desarrollo de raíz primaria de *Zea mays* L. 1A, 2A, 3A) Control negativo; 1B, 2B, 3B) Medio con inóculo de Rh4. Se mantuvieron en oscuridad, 28°C y sin inclinación durante 72h

8.9 Evaluación del desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* en presencia de Rh4 en medio semi sólido

En las pruebas A y B (Figura 16) para cada caja de Petri se colocaron 10 semillas de *Arabidopsis thaliana*, el modelo B con semillas embebidas en un preinóculo de 0.02OD y para el C se colocaron plántulas con raíz primaria de 2cm para evaluar germinación y el crecimiento postgerminación. En las cajas cuadradas se colocaron las semillas en un extremo de la caja y el inóculo en el extremo opuesto. Las cajas prueba ya tenían un inóculo de 6 días de Rh4, las control se manejaron sin inóculo. Se colocaron a 90° de inclinación.

En este modelo *in vitro* se puede observar la inhibición de crecimiento para *A. thaliana* en el modelo A y C donde se observó como las raíces primarias de las plántulas en presencia de Rh4 formaron un ángulo de curvatura evitando el inóculo; además, su longitud es menor en comparación con el control. Para el modelo B se observa la inhibición de crecimiento para las semillas embebidas en Rh4.

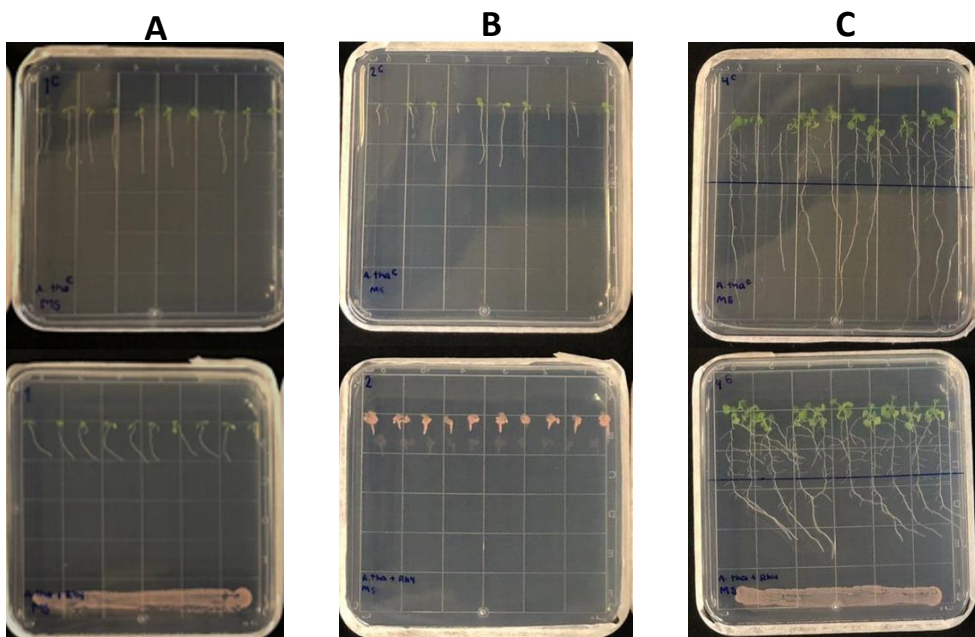


Figura 16. Semillas de *Arabidopsis thaliana*, primer fila controles y segunda fila inóculo de Rh4, sembradas sobre medio MS. A) Plántulas después de 6 días de germinación con inóculo en el extremo opuesto de las semillas. B) Semillas embebidas con preinóculo de Rh4 ajustado a 0.02OD. C) Plántulas colocadas 2 días post-germinación con inóculo de Rh4 en el extremo opuesto a las semillas.

8.4 Metil paratión.

Debido a la dificultad para encontrar el Metil Paratión de grado analítico con 98% de pureza, se optó por usar Paratión Metílico comercial con una concentración de 2%. Hasta los 4 días de incubación a 28°C, se ve muy poco crecimiento de la cepa Rh4 en las diferentes cajas con concentraciones diferentes del agroquímico, al igual que en el medio mínimo. Mientras que se observa buen crecimiento por parte de la cepa en PDA usado como control de crecimiento (Figura 17).

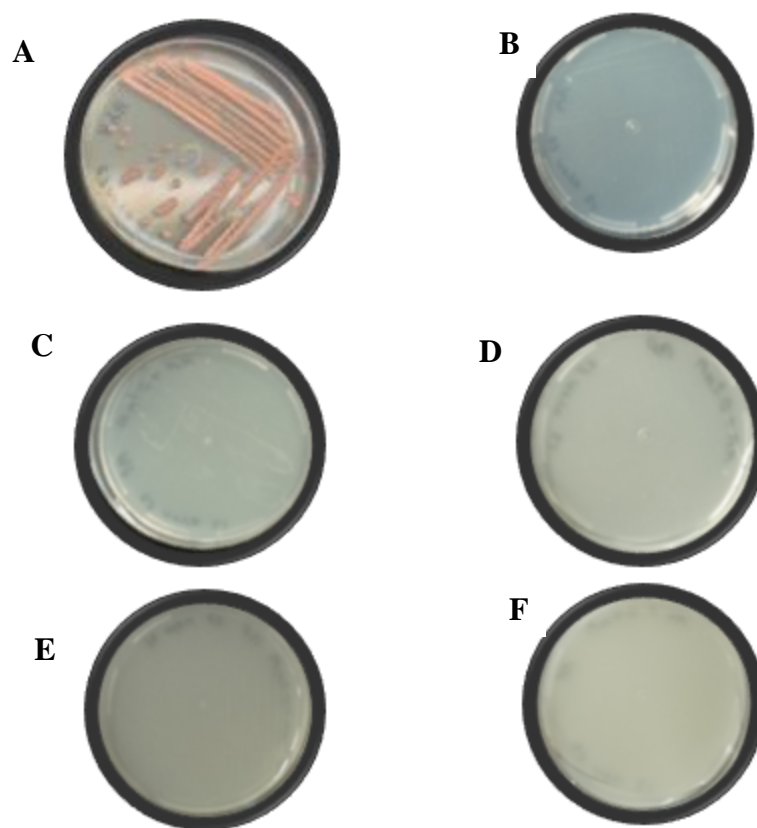


Figura 17. Estriado de la cepa de Rh4 en medio de cultivo. A) control, medio PDA; B) medio mínimo; C) medio mínimo adicionado con metil paratión 0.1 mM; D) mm + metil paratión 0.2 mM, E) mm + metil paratión 0.4 mM y F) mm + metil paratión 0.5 mM.

El Dr. Alexis Jovani Rodríguez del Centro de Investigación en Biotecnología nos proporcionó 500µL de una dilución de metil paratión con concentración de 20 mg/mL, los cuales fueron usados para preparar medio mínimo conteniendo metil paratión a diferentes concentraciones (1mM, 0.5mM, 0.2mM).

También se preparó medio mínimo con metil paratión comercial “El Matabichos” con una concentración del 2% de metil paratión, para comparar el efecto de la cepa control y de *Rhodotorula* con este agroquímico en estas dos diferentes presentaciones. La preparación de medio mínimo con “El Matabichos” se realizó a las mismas concentraciones que con el paratión grado reactivo, 0.2, 0.5 y 1.0 mM.

Se usaron como control negativo de crecimiento de las cepas medio mínimo sin fuente de carbono y como control positivo medios ricos PDA y TSA para *Rhodotorula* y *Burkholderia*, respectivamente.

Para el inóculo, a partir de un pre-inóculo de 0.4 OD a 600 nm, para ambas cepas se prepararon diluciones seriadas en base 10 (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y se inocularon en los medios antes descritos por goteo.

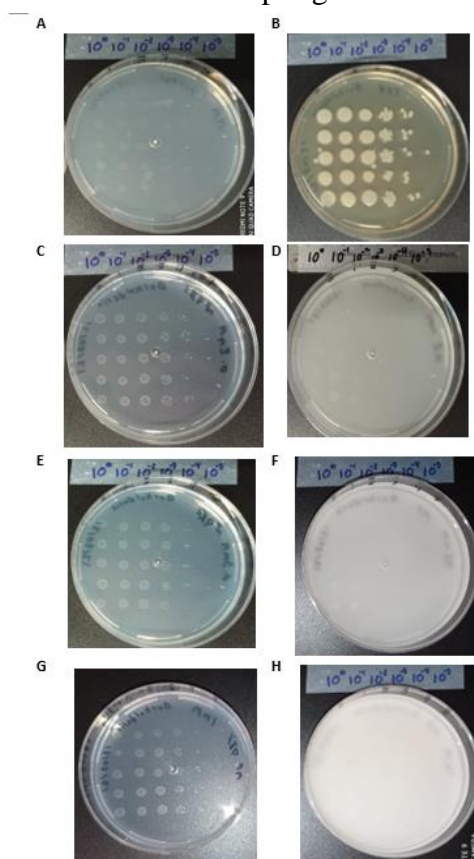


Figura 18. Inoculación por goteo de las cepas de *Burkholderia*, A) Medio mínimo, B) Medio rico TSA; C), E), G) Medio mínimo más metil paratión, a diferentes concentraciones 0.2 mM, 0.5 mM y 1.0 mM respectivamente. D-H) Medio mínimo más metil paratión El Matabichos a diferentes concentraciones de metil paratión 0.2mM, 0.5mM y 1.0 mM, respectivamente.

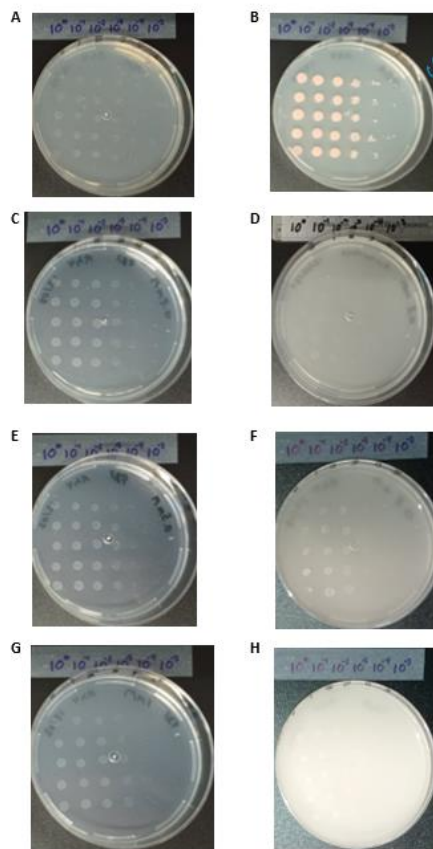


Figura 19. Inoculación por goteo de las cepas *Rhodotorula*, A) Medio mínimo, B) Medio rico TSA; C), E), G) Medio mínimo más metil paratión, a diferentes concentraciones 0.2 mM, 0.5 mM y 1.0 mM respectivamente. D-H) Medio mínimo más metil paratión El Matabichos a diferentes concentraciones de metil paratión 0.2 mM, 0.5 mM y 1.0 mM, respectivamente.

El preinoculo se hizo en medio rico para ambas cepas, eso sugiere el crecimiento de ellos aún en medio mínimo, pero no se observa degradación de paratión en ningún caso. Se observa también como disminuye el crecimiento de la bacteria y la levadura a medida que aumenta la concentración del paratión.

9. Discusión

En este trabajo se hipotetizó que *Rhodotorula* tendría un efecto positivo en el desarrollo de la raíz primaria de maíz, se trabajó sobre el objetivo de evaluar el efecto de la levadura *Rhodotorula sp* Rh4 como promotor de crecimiento en maíz, se evaluó su efecto desde la germinación, desarrollo postgerminación y efecto sobre la respuesta hidrotropica de la línea de maíz ASH con un fenotipo reportado de respuesta hidrotropica débil, esto se realizó con la metodología que se estableció en el laboratorio para el maíz, y según los resultados Rh4 no tiene un efecto positivo en las etapas evaluadas, ya que no hay diferencias con los resultados en el control pero se comprobó que la cepa sigue presente en la plántula después de 72h de germinación y 24h de reto hidrotropico sin afectar el desarrollo de la planta, lo que sugiere una interacción planta-microorganismo que pueda ser de provecho para la planta en etapas posteriores de crecimiento.

Se planteó analizar el efecto de la germinación y desarrollo de la raíz primaria *in vitro*, con las condiciones ideales para el microorganismo teniendo el punto de referencia el trabajo de Tapia I., *et al.*, 2020 y de igual forma no se observa promoción de crecimiento para la línea de maíz. A diferencia de lo que reporta Tapia I., *et al.*, 2020, donde es clara la promoción de germinación y crecimiento por parte de Rh4 en plantas de jitomate ya que desde el inicio mejora la germinación de las semillas. Llama la atención este resultado diferente entre *Zea mays* L. y *Solanum lycopersicum*, una de las diferencias entre estas dos plantas es que la primera es una planta monocotiledónea mientras que jitomate es dicotiledónea, posiblemente esto sea la razón de los efectos desiguales. Por ello se propuso usar a *A. thaliana*, al ser una planta dicotiledónea además de ser considerada como una planta modelo importante en el estudio de interacciones planta-microorganismo (Poveda J., 2022), el efecto que Rh4 pueda tener sobre su crecimiento sugiere una mejor comparación con el efecto reportado en jitomate. El estudio *in vitro* mostró resultados muy interesantes; las semillas embebidas en Rh4 germinaron y después se inhibió su crecimiento (Figura 16B), en el caso de las semillas que se colocaron en el medio semisólido con el inóculo previo de Rh4 (Figura 16A), después de la emergencia de la raíz primaria se modificó la dirección de crecimiento de esta, mientras que en el control se conserva la dirección vertical con raíces más largas, lo mismo sucedió con las plántulas colocadas en el medio semisólido con un inóculo previo de Rh4 (Figura 16C), las raíces primarias modificaron su dirección de crecimiento y se observa mayor emergencia de raíces laterales, mientras que en el control la raíz primaria sigue su crecimiento en dirección vertical. Este resultado difiere del obtenido por Tapia I., *et al.*, 2020 en semillas de jitomate ya que no sólo no promueve el desarrollo de la raíz de *A. thaliana* sino que inhibe su crecimiento. En 2017 Pelagio *et al* reportan su trabajo con un microorganismo altamente estudiado en la interacción con las plantas y que además ha comprobado ser promotor de crecimiento vegetal, *Trichoderma atroviride*. Ellos demuestran que *T. atroviride* y su acidificación gradual del medio juega un rol esencial en la interacción planta-

microorganismo, sus resultados sugieren que el pH podría ser detectado por las raíces para activar una cascada de señalización que modula el crecimiento de la raíz y su orientación, y posiblemente, para activar la iniciación de la raíz lateral, sus resultados además indican que las plantas pueden sentir los cambios graduales en el pH y ajustar el crecimiento de sus raíces para escapar de condiciones fuertemente ácidas. Este resultado podría explicar el efecto de Rh4 sobre *Arabidopsis*, aunque no se sabe si Rh4 está acidificando el medio, pero se ve una clara inhibición de crecimiento y modificación de la dirección de crecimiento de la raíz primaria.

Los mecanismos de degradación de compuestos organofosforados han sido muy estudiados debido a la necesidad de cultivos limpios que no afecten la salud humana, entre estos mecanismos resaltan la hidrólisis de estos compuestos por parte de microorganismos. Según lo reportado por Castrejón (2019), se conoce de muchos microorganismos que degradan paratión metílico, un ejemplo es *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, que es capaz de degradar metil paratión en medio líquido en 1h. Esta cepa fue usada como nuestro control de degradación, pero debido a que se usó medio sólido no fue posible observar la degradación de paratión por esta cepa, pasó lo mismo con las pruebas para Rh4 donde se observa el crecimiento de ambas cepas en todas las concentraciones de paratión metílico puestas a prueba, igual que en todas las concentraciones de inóculo usadas para ambas cepas, sugiriendo que están usando el paratión como fuente de carbono; sin embargo, no se logra apreciar el halo de degradación del paratión.

10. Conclusiones

- Evaluando el efecto de la inoculación de *Rhodotorula* sp Rh4 en la germinación de semillas de maíz, se comprobó que no hay efecto por parte de Rh4 al no haber diferencias significativas en las medias de longitud de raíz primaria, número de raíces secundarias y peso seco de raíz primaria y parte aérea.
- En el sistema de reto hidrotópico, Rh4 no demostró ser promotor de crecimiento vegetal en maíz ya que no se ven diferencias significativas en la respuesta hidrotópica de la raíz de *Zea mays* L.
- Rh4 se mantiene en las raíces después de 72h de germinación y después de 24h en el sistema de reto hidrotópico, comprobando la simbiosis entre planta-microorganismo.
- *Rhodotorula* tiene efecto sobre semillas y plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Con el análisis desarrollado en el laboratorio, se obtuvo un efecto negativo, ya que Rh4 inhibe el desarrollo de la raíz primaria y modifica su dirección de crecimiento.
- No se puede asegurar que *Rhodotorula* sp Rh4 esté degradando paratión metílico en medio sólido, se observó que lo usa como fuente de carbono, aunque no se detectó la presencia de P-nitrofenol.

11. Perspectivas del proyecto

- Aislar los microorganismos presentes en suelos de cultivo de maíz, también de sus raíces y otros tejidos, y evaluar si su presencia tiene algún efecto positivo en la respuesta hidrotópica de la raíz primaria de líneas de maíz con fenotipo de respuesta débil.
- Realizar una prueba de acidificación del medio MS por parte de *Rhodotorula*, a la par, caracterizar los compuestos o metabolitos de Rh4 que puedan estar inhibiendo o promoviendo el crecimiento en plantas de interés agrícola y biotecnológico, como *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana*.
- Poveda J., 2022 reporta un sistema llamado AtCube descrito como libre de contaminación, completamente controlado, autosuficiente, reproducible y estandarizado para ver el efecto de la interacción de *Arabidopsis* con patógenos. Todas estas características hacen el sistema AtCube una metodología que facilita considerablemente la estandarización y reproducibilidad de los ensayos de infección de racias de *A. thaliana* (Poveda J., 2022). Usar el sistema AtCube para ver la interacción entre *Arabidopsis* y *Rhodotorula* después de más días de crecimiento de la plántula.

12. Bibliografía

1. Abdel-Razek Saleh Abdel-Razek Mohamed, Folch-Mallol Jorge L., Perezgasga-Ciscomani Lucía, Sánchez-Salinas Enrique, Castrejón-Godínez Maria L., Ortiz-Hernández M. Laura (2013) Optimization of methyl parathion biodegradation and detoxification by cells in suspension or immobilized on tezontle expressing the opd gene, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48:6, 449-461, DOI: [10.1080/03601234.2013.761863](https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761863)
2. Aguirre JF., Kohashi J., (2002) Influencia de *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler en el rendimiento de maíz. *Agr. Téc. Méx.* 28:23-33.
3. Ampray K., Rose M., Kecskés M., Pereg L., Nguyen H., Kennedy I., (2012) Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *ELSERVIER. Applied Soil Ecology* 61 295-299.
4. Arabidopsis Genome Initiative (AGI). 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–15
5. Badii M.H., y Landeros J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT/Toxicología de Plaguicidas*. 4(19):21-34.
6. Caballero-Mellado, J. (2006) Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48, 154–155.
7. Cassab GI, Eapen D, Campos ME. 2013. Root hydrotropism: an update. *American Journal of Botany* 100: 14–24.
8. Castrejón M., Ortiz M., Salazar E., Encarnación S., Mussali P., Tovar E., Sanchez E., Rodríguez A., (2019). Transcriptional analysis reveal the metabolic state of *Burkholderia Zhejiangensis* CEIB S4-3 during metil parathion degatration. *PeerJ*, DOI [10.7717/peerj.6822](https://doi.org/10.7717/peerj.6822) 30pp.

9. Chaw, SM., Chang, CC., Chen, HL. et al. Dating the Monocot–Dicot Divergence and the Origin of Core Eudicots Using Whole Chloroplast Genomes . *J Mol Evol* 58, 424–441 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2564-9>
10. Díaz-Franco, A.; Alvarado-Carrillo, M.; Cantú-Almaguer, M. A. y Garza-Cano, I. (2005). Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. *Agric. Téc. Méx.* 31:153-163.
11. Ding S., Lange M., Lipp J., Schwarb V. F., Chowdhury S., Pollierer M. M., Krause K., Li D., Kothe E., Scheu S., Welti R., Hinrichs K., Gleixner G. (2020) Characteristics and origin of intact polar lipids in soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 151 (1080-45). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108045>.
12. Doebley, J.F. 1990b. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *BioScience* 40:443-448.
13. Eapen, D., Barroso. M.L., Ponce, G., Campos, M.E., & Cassab, G.I. (2005). Hiotropism: root growth responses to water. *Trends in Plant Science*. 10(1), 44-50.
14. Fernandez A., Farran I., Larraya L., Ancin M., Arregui L., Veramendi J., (2020) Plant growth-promoting traits of yeast isolated from Spanish vineyards: benefits of seedling development. *ELSERVIER. Microbiolofival Research* 237 126480.
15. Fernández M., Degradación de plaguicidas organofosforados por bacterias inmovilizadas en diferentes soportes: aspectos bioquímicos, toxicológicos y moleculares. (2017) Tesis de doctorado. Centro de investigación en Biotecnología UAEM.
16. Guo-Ross SX, Meek EC, Chambers JE, Carr RL. Effects of Chlorpyrifos or Methyl Parathion on Regional Cholinesterase Activity and Muscarinic Receptor Subtype Binding in Juvenile Rat Brain. *J Toxicol Pharmacol.* 2017;1:018.
17. Hossain, A., Tanjina Islam, Mst., Shohidul Islam, Md., Nurislam, Ahmed, S., Kumer Sarker, K., & Kumar Gathala, M. (2020). Chemical Weed Management in Maize (*Zea mays* L.) under Conservation Agricultural Systems: An Outlook of the Eastern Gangetic Plains in South-Asia. *Maize - Production and Use*. doi: 10.5772/intechopen.89030
18. Koornneef, Maarten, Blanco Carlos Aleonso, Vreugdenhil Dick., NATURALLY OCCURRING GENETIC VARIATION IN ARABIDOPSIS THALIANA *Annual Review of Plant Biology* 2004 55:1, 141-172
19. Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R. & Meyerowitz, E.M. The DNA of *Arabidopsis thaliana* . *Molec. Gen. Genet.* 194, 15–23 (1984). <https://doi.org/10.1007/BF00383491>
20. Mauch-Mani B., A.J. Slusarenko (1993), *Arabidopsis* as a model host for studying plant-pathogen interactions, *Trends Microbiol.* 1, 265–270, [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(93\)90049-W](https://doi.org/10.1016/0966-842X(93)90049-W).
21. Martínez J., (2019). Identificación de genes relacionados a la respuesta hidrotópica en maíz mediante estudios de asociación del genoma completo (Genome-Wide Association Studies, GWAS). Tesis Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

22. Mazoyer M, Roudart L, (2006). A history of world agriculture from the neolithic age to the current crisis. Earthscan, UK and USA.
23. Otero-Blanca Adriana, Folch-Malloi Jorge Luis, Lira-Ruan Verónica, Sánchez-Cabernte María del Rayo, Batist-Gacía Ramón Alberto. (2018) Chapter 5 Phytoremediation and Fungi: an Underexplored Binomial. Approaches in Bioremediation. The New Era of Environmental Microbiology. P 79-95. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02369-0_5
24. Poveda J. (2022) AtCube: Performing pathogen-root infection tests on *Arabidopsis thaliana* in a completely controlled way *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 117, Article 101780, 10.1016/j.pmpp.2021.101780
25. Rasul C., Ali, A., Wheeler, W. (1988). Isolation of a Methyl Paration-Degrading *Pseudomonas* sp. That Possesses DNA Homologous to the *opd* Gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 54, No. 2.
26. Sandoval L., et al. (2017). Flora microbiana y su comportamiento frente a los plaguicidas. *Los plaguicidas en México: aspectos generales, toxicológicos y ambientales*.
27. Sánchez-Salinas E., y Ortiz-Hernández M.L. (2011). Riesgos y estrategias en el uso de plaguicidas. *Inventio: La génesis de la cultura universitaria en Morelos*. 14:21-28.
28. Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., Abraham, J., Valentine, A., 2019. Simultaneous mitigation of aluminum, salinity and drought stress in *Lactuca sativa* growth via formulated plant growth promoting *Rhodotorula mucilaginosa* CAM4. *Ecotox. Environ. Safe*. 180, 63–72.
29. Singh, V., Van Oosterom, E.J., Jordan, D.R., Messina, C.D., Cooper, M., & Hammer, G.L. (2010). Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil*. 333: 287-299.
30. Tapia-Vázquez Irán, Sánchez-Cruz Ricardo, Arroyo-Domínguez Marisol, Verónica Lira-Ruan, Ayixón Sánchez-Reyes, María del Rayo Sánchez-Carbente, Daniel Padilla-Chacón, Batista-García Ramón Alberto, Folch-Malloi Jorge Luis. (2020). Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. *Microbial Research* 232 (126394). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126394>. ISSN 0944-5013
31. Tapia-Vázquez Irán, (2020). Prospección y caracterización de microorganismos psicrófilos y psicotolerantes promotores del crecimiento vegetal aislados del volcán xinantécatl. Tesis. Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
32. Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrullah, B.A., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*. 21, 573.
33. Wang Y., Afeworki Y., Geng S., Kanchupati P., Gu M., Martins C., Rude B., Tefera H. Kim Y. Ge X. et al. Hydrotropism in the primary roots of maize. *New Phytol*. 2020; 226: 1796-1808

34. Wirth F., and Goldani L., (2012) Epidemiology of Rhodotorula: An Emerging Pathogen. Hindawi Publishing Corporation. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases; 7 pages
35. Yamakake, K., Sánchez, T. Á. M., Ovando, C. M., & Hernández, L. M. S. (2009). Origen y diversificación del maízuna revisión analítica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 09 de junio del 2023.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **“Evaluación del efecto de *Rhodotorula sp. (Rh4)* en la germinación y crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays L.*”**, que presenta la **C. Dulce Alejandra Franco Castillo**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL y codirección del DR. JOSÉ FERNANDO LLEDIAS MARTINEZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL (DIRECTOR DE TESIS, CEIB UAEM)

DR. JOSÉ FERNANDO LLEDIAS MARTINEZ (CODIRECTOR DE TESIS, IBT UNAM)

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ (IBT UNAM)

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA (CEIB UAEM)

DRA. SUSANA VALENCIA DIAZ (CEIB UAEM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2023-06-14 13:15:19 | Firmante

NOsRPcN3/KNN5q4Ux7zev5jo1GMhYmyrfBxLxThVqIUqmmB8Up3og0JhSYU81mxNiiGnPazzo1oyn7iHCWqnUryXrPIR9SobvUekQPhVARcelPjJsrhV/tzXrcQhMTXCZg3d4EV BfvZjySTdWkbs+ivOSkXCCrLpNAQvXrEPjwObES72X3fx0HNmpOctGlfM96B/tvLCA3FaJkYeVsoj8Xx6BHUN4HENbtOip38Yu2e6lbKQ+9hcShr5HI1NGff/vXR7sMkRGqnpXps8 s9osBasQLfSLFUW5S71G1Tj4BOTILGLxZlq9uJ81XwxNABfHfCSmmazjnuAwmNXWGKw==

GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ | Fecha:2023-06-14 13:45:21 | Firmante

L2lrJd5cCzm2+InEeDdqzMbU6n3bIQLA7Y3MinO5caOP+OFI7c44P4BAIDnxKT/4BdeuCuHvl02+UdwiK7eC7RBei6udDau5CQQTnyVJmq6ELudCbfkUqDK84sZZGH8rP2W6zExj 0Rx4qll+D7wpzNL8U3RutY3OxNFRFp0By4aO6MiaASrGMvAHV6E+WwmECUgXllkq42DF4rSj57owvllqicGaLVN65XKR7GwRT1mui7rsmRk7TfT1ZeGrYB8bokw2vwtDtuH+ E15Wn4pl4x1zNB/05Wr0mOtXj/iGBmGSy77UaAo8h4JcdsulxVeU9YHwetUTPMvXXbQtrRQ==

JOSÉ FERNANDO LLEDIAS MARTINEZ | Fecha:2023-06-14 16:23:14 | Firmante

pXILifMYdB8IKF6HszFNRtDPJqEVSALig/q8YCqL950qkykpOb4aIUUytD1VrIF7K80jApmzGijERfOEh3YsXvtMVOFrCzeefh7AUt4CnQtvqdaZ/CDkrNKy2ceWb1j9Xfddc+1MCO6 TWrdOrWHUNQEPikBTbBl+hvzGhgg4FIEyBxetJEfogaH1f+pkEy8I0WXhLS63fjFz+iGtllNqs0OQoYkinvqeokNQ7rGBhkwsQpc5KSMN0T82QXY0JWGIzJCX9IzBqj2946iQKafB2 vL1jZeK3l3om4911WiwX1gYv0zVgG0296tg/+vKkvmAWE+uQbK1n9ti2zt5Jw==

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2023-06-14 16:34:46 | Firmante

OEOzoERzCJqHIBp9mtyy7UZLTb2WrGDP7/Gt4nJCUYDDIEIVS/72V8HGje5geX1p/3cQFm159AtpYw8roFirs8SPBotunqSavWxpB6sSfnXgTdpI56jTAN1Cjbgf9gFuAViCJGby h/sM79c2Pfmz65il+Td0pB+gaUMBb3+9Sj2fPmz0j/qpr0bBJVNiRkfCWUy/gWVd8z00bgjwLoob1NwP+dupArtXPSJynd8e0Thxt5veJuk92l6xROMUjC/+b4vOglwsa/y2/91w/gNfo GBKXUgSZ9hWM3sdrXb8aWms8jqdw2rCerYUWMOM/eEOOYtSdq6u30+pB87yew==

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2023-06-14 18:14:12 | Firmante

a/jsPdxv8w4TanNf+DW4B+z7XVzMnRB1urptlCHqaxujG0BA/19QXBxP5qGp1HhfpGYcczym9UvGZ3UxyymuQPGs/DCYccQwow7Y6NGQ9VCQ/MN7xF7qUipXNtnb4mFGCnGr KRUMqXGV9vr1iHNmqjpZBNUjjX9jWtj/raf2TiE28yEbuuM03i+upylraRO0m0PD/s1dyKPTq3TR1paYCx/CO1SU+KPRlaFbJ0+IVYhmdfGBO9//73K/UmYa9tA3w7MZRRyzzhXwp SaEgqUxR+MXnx5DZ/OqvBfPi7lli+/q7zTpB+qx3vldpcqfWxNeUTfmcQhIY6311vwBNOZw==

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



mXiAnB1js

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YepAU16MEZmUEKuiHt4DQyc1n4Ulxnf7>

