



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A
SEQUÍA Y SU RELACIÓN CON LA
CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS EN MAÍZ

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Gina Benítez Esquivel

Tutor:

Dr. Ernesto Moreno Martínez

Comité Tutorial:

Dra. Susana Patricia Miranda Castro
Dr. Irineo Torres Pacheco

Cuautlán Izcalli, México.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A Miguel Ángel Benítez, Gisela Martínez, Michelle Vallejo,
Adriana Benítez, Rocío Nolasco y Samantha Chapa. Y a todos
aquellos por quienes tratamos de mejorar el mundo.*

Agradecimientos

A la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS), de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por el apoyo logístico para la realización de la tesis, en cuanto a conocimientos básicos, tecnologías adecuadas e infraestructura experimental; en especial al Dr. Ernesto Moreno Martínez por su dirección, y a las Maestras en Ciencias Josefina Moreno y Lara Martha Quezada Viay, por su apoyo en las técnicas de laboratorio.

A los miembros del comité tutorial, Dra Patricia Miranda Castro y Dr. Irineo Torres Pacheco, por la guía tutorial que fue decisiva para poder alcanzar las metas propuestas en la presente investigación, así como por el apoyo material brindado para alcanzar dichas metas.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, al Dr. Ernesto Preciado Ortíz, investigador del programa de maíz del CIR-Centro por los maíces utilizados en la presente investigación. A los miembros de la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío CIR Centro, del INIFAP, Dr. Mario González Chavira, y Dr. José Luis Pons Hernández, al Biol. Emiliano Villordo Pineda y a la Ing. Blanca A. Amaro González.

A la Dra. Alma Virginia Lara Sagahón por el aporte de sus conocimientos y sus revisiones en la parte estadística de los resultados.

Al CONACYT, por el apoyo recibido a través del proyecto 43544 "Determinación de mecanismos hereditarios y moleculares en la pérdida de vigor, longevidad y contaminación por aflatoxinas maíz", bajo la responsabilidad del Dr. Ernesto Moreno Martínez.

Índice

Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Hipótesis	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos.....	10
Capítulo 1	11
1.1 Importancia del maíz	11
1.2 Estreses que afectan al maíz.....	12
1.2.1 Estrés biótico: Infección del maíz con el hongo <i>Aspergillus flavus</i> y contaminación con aflatoxinas.....	14
1.2.1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	14
1.2.1.2 Mecanismos de defensa y respuesta a la infección	14
1.2.1.3 Aflatoxinas.....	16
1.2.2 Estrés abiótico: La sequía	18
1.2.2.1 Estrés hídrico o déficit de agua.....	18
1.2.2.2 Mecanismos de tolerancia o resistencia a la sequía	19
1.3 Situación económica del maíz y sus afecciones debidas a ambos estreses.....	24
Capitulo 2. Metodologías experimentales	29
2.1 Cuadro metodológico	29
2.2 Unidades experimentales	29
2.3 Caracterización de la resistencia de las unidades experimentales	31
2.3.1 Prueba de resistencia a estrés hídrico.....	31
2.3.1.1 Prueba de germinación con estrés hídrico utilizando PEG 6000.....	31
2.3.2 Prueba de resistencia a la contaminación con aflatoxinas	32
2.3.2.1 Cultivo del hongo <i>A. flavus</i> y obtención de inóculo.	32
2.3.2.2 Determinación del contenido de humedad de las semillas.	33
2.3.2.3 Ajuste de humedad de las semillas e inoculación de las semillas.....	33
2.3.2.4 Cuantificación de la producción de aflatoxinas	34
2.3.2.5 Clasificación de resistencia y susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas.	35
2.3.3 Correlación entre la resistencia al estrés hídrico durante la germinación, y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas.	36
2.4 Detección de polimorfismos genéticos asociados con la evaluación de la resistencia a estrés osmótico de las semillas de maíz y la contaminación con aflatoxinas.....	36

2.4.1 Búsqueda bioinformática y selección de genes y marcadores moleculares involucrados en la resistencia al estrés hídrico.	36
2.4.2 Diseño de oligonucleótidos cebadores	37
2.4.3 Producción de tejido vegetal de las unidades experimentales	37
2.4.4 Extracción del ADN genómico de las unidades experimentales.....	38
2.4.4.1 Molienda y disgregación del tejido.....	38
2.4.4.2 Extracción de carbohidratos y proteínas.....	38
2.4.4.3 Degradación de ARN	38
2.4.4.4 Precipitación y lavado de ADN	38
2.4.5 Cuantificación de ADN y estandarización de concentraciones	39
2.4.6 Establecimiento experimental de Temperaturas de fusión de los oligonucleótidos diseñados	39
2.4.7. Amplificación de fragmentos de ADN asociados a los genes o marcadores moleculares seleccionados, utilizando PCR.....	40
2.4.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida	40
2.4.9 Obtención de matrices numéricas a partir de valores gráficos de amplicones.....	41
2.4.10 Determinación del % de frecuencia de amplicones	41
2.4.11 Correlación entre polimorfismo genético y fenotipo	41
Capítulo 3. Resultados.....	43
3.1 Clasificación de las unidades experimentales en base a su resistencia al estrés osmótico durante la germinación.	43
3.1.1 Descripción de los datos obtenidos.....	43
3.2 Clasificación de las unidades experimentales en base a su resistencia a la contaminación con aflatoxinas.	47
3.2.1 Descripción de los datos obtenidos.....	47
3.3 Relación entre la evaluación de la respuesta ante el estrés hídrico en la germinación y la contaminación con aflatoxinas	50
3.4 Búsqueda bioinformática y selección de genes y marcadores moleculares asociados con características de resistencia a sequía.	51
3.4.1 Búsqueda y selección de genes de resistencia a sequía	51
3.4.2 Búsqueda y selección de marcadores moleculares asociados a la resistencia a sequía. ...	53
3.4.3 Diseño de Oligonucleótidos para amplificación de secuencias de ADN por PCR	54
3.5 Establecimiento de temperaturas de fusión de los oligonucleótidos cebadores.	55
3.6 Búsqueda de polimorfismos de interés.....	56
Capítulo 4. Discusión	60
4.1 Clasificación en base a la resistencia a estrés hídrico en la germinación	60
4.2 Clasificación en base a la resistencia a la contaminación con aflataxinas	61
4.3 Relación entre la resistencia al estrés hídrico y la contaminación con aflatoxinas	61

4.4 Asociación de polimorfismos con las características fenotípicas	62
4.4.1 Asociación de polimorfismos con el nivel de resistencia al estrés hídrico	62
4.4.2 Asociación de polimorfismos con el contenido de aflatoxinas.	64
Capítulo 5. Conclusiones	65
Capítulo 6. Anexos	66
Capítulo 7. Referencias consultadas	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Límites máximos permitidos de aflatoxinas en diferentes tipos de productos para consumo humano.	18
Tabla 2. Estadísticas de producción de maíz en distintas áreas geográficas en México en superficies irrigadas y no irrigadas.	26
Tabla 3. Lista de materiales y región de origen de los maíces criollos.....	30
Tabla 4. Resultados de contenido de aflatoxinas en diversos genotipos de maíz según Williams 2003.....	35
Tabla 5. Resultados de la prueba de Tukey para el estrés inducido por PEG ($\alpha=0.05$).....	46
Tabla 6. Cuantificación de la producción de aflatoxinas producidas por los genotipos.	48
Tabla 7. Oligonucleótidos probados en PCR con gradiente de temperatura:	55
Tabla 8. Resumen de resultados de amplificación	56
Tabla 9. Resultados en términos de %Frecuencia y R2 en relación con ambas características fenotípicas.....	57
Tabla 10 (ANEXA). Detalle de las accesiones seleccionadas en la búsqueda bioinformática de genes.	66
Tabla 11 (ANEXA). Detalle de los marcadores moleculares seleccionados en la búsqueda bioinformática.	67
Tabla 12 (ANEXA). Características de oligonucleótidos de genes y marcadores moleculares desarrollados a partir del GenBank, así como los parámetros de PCR utilizados.	69

Índice de Figuras

Figura 1. Cambios bioquímicos, anatómicos y morfológicos inducidos por la deshidratación a favor de la adaptación. [Ramanjulu y Bartels 2002]	22
Figura 2. Ruta general para la transducción de las señales en el estrés abiótico.	23
Figura 3: Producción de maíz y Área cultivada en México. Datos obtenidos de la Organización para la alimentación y la agricultura (FAO).	25

Figura 4. Relación entre producción de maíz y su nivel de importaciones en México.	27
Figura 5: Monitor de Sequía en Norte América.....	28
Figura 6. Cuadro metodológico del proyecto.....	29
Figura 7. Proporción de semillas germinadas por genotipo en condiciones normales.	44
Figura 8. Proporción de semillas germinadas bajo condiciones de estrés osmótico inducido por Polietilenglicol.	45
Figura 9. Contenido de aflatoxinas producidas por los genotipos.....	49
Figura 10. Relación entre la resistencia al estrés hídrico inducido por PEG y la producción de aflatoxinas por genotipo.....	50

Resumen

La contaminación de semillas de maíz con aflatoxinas representa un riesgo para la salud animal y humana debido a sus propiedades carcinogénicas. Existe evidencia de que el hongo *Aspergillus flavus*, que produce las aflatoxinas, tiene la capacidad de infectar a las semillas de maíz cuando estas se encuentran combatiendo algún tipo de estrés abiótico como la sequía. Se piensa que existe relación entre la característica de resistencia a sequía y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas. La búsqueda de segmentos de genes o marcadores moleculares involucrados con moléculas participantes en la maquinaria de resistencia a estrés hídrico, o bien, asociados a características fenotípicas que proveen resistencia a dicho estrés, puede proveer de herramientas moleculares para el fitomejoramiento del cultivo. En el presente proyecto se realizó la caracterización y diferenciación fenotípica de 43 genotipos de maíz en cuanto a su resistencia al estrés hídrico durante la germinación, ocasionado por sustratos de alta presión osmótica y, a su vez, en cuanto a la resistencia a la contaminación con aflatoxinas de las semillas. Los 43 genotipos fueron sometidos a pruebas moleculares para determinar la existencia de polimorfismo genético en secuencias de genes y marcadores moleculares previamente seleccionados en base a accesiones referidas y consultadas en el banco de genes. Para los segmentos se diseñaron parejas de oligonucleótidos cebadores que se utilizaron para la amplificación de los segmentos polimórficos mediante PCR. En el presente proyecto se buscó la relación directa entre la resistencia al estrés hídrico y la contaminación con aflatoxinas, además de la asociación entre los polimorfismos producidos por la amplificación del DNA y ambas caracterizaciones fenotípicas realizadas con las semillas. Se encontraron diferencias significativas en la caracterización fenotípica, constatando la diversidad genética de la muestra. No se hallaron asociaciones concretas de los segmentos polimórficos amplificados con las diferencias fenotípicas de resistencia a estrés hídrico o contaminación con aflatoxinas. Se encontraron características moleculares de interés para el mejoramiento genético de maíz con relación a la resistencia a estrés hídrico en la etapa de germinación de maíz.

Abstract

Aflatoxin contamination of corn seeds represents a risk on animal and human health due to its carcinogenic properties. There is evidence that *Aspergillus flavus*, which produces the aflatoxins, has the potential to infect corn seeds while they are fighting against any sort of abiotic stress. It's been thought that a relation between the drought tolerance feature and the aflatoxin contamination resistance exists. Searching of genes and molecular markers segments involved with molecules participating with the drought tolerance machinery, or associated to the phenotype features providing resistance to the stress, can supply molecular tools for the cultivar breeding. In the current project a characterization and differentiation of 43 corn genotypes about their water stress tolerance produced with high osmotic pressure substrates during germination and about their aflatoxin contamination resistance has been made. The 43 genotypes were assayed under molecular tests to determine the evidence of genetic polymorphisms in genes and molecular markers sequences previously selected. The selection was based on referred accessions and taken up from the Gen Bank. For those segments, pairs of primers used to the amplification with PCR of the polymorphic segments were designed. In the current project, the direct relation between water stress and aflatoxin contamination, and the association between produced polymorphisms with DNA amplification and both phenotype characterizations made with the seeds, were searched. Significant differences of phenotype characterization were found, confirming the sample genetic diversity. Se encontraron diferencias significativas en la caracterización fenotípica, constatando la diversidad genética de la muestra. Specific association of the amplified polymorphic segments with the phenotype water stress or aflatoxin contamination resistances were not found. Molecular characteristics of interest for genetic corn breeding related to water stress tolerance on seed germination were found.

Capítulo 1

1.1 IMPORTANCIA DEL MAÍZ

El maíz es uno de los granos alimenticios más antiguos y más importantes que se conocen. La planta de maíz está completamente domesticada y es una de las especies más productivas. Actualmente es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar. Globalmente, el maíz se cultiva en 140 millones de hectáreas con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas. Por otro lado, el maíz ocupa el primer lugar en rendimiento de grano por hectárea, en promedio, el maíz presenta un rendimiento mundial de 4000 Kg./ha. [Paliwal, 2001]

El maíz es consumido como alimento por millones de personas especialmente en los países en desarrollo, su consumo per. cápita anual en algunos países excede los 100 Kg. Este cereal es probablemente el más ampliamente distribuido en todo el mundo. [Peña-Valdivia 1996]

El maíz tiene usos múltiples y variados. Es el único cereal que se utiliza en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las espigas de maíz cosechadas antes de la floración de la planta se utilizan como hortaliza. Las mazorcas tiernas de maíz dulce se consumen de muchas formas, mientras que las mazorcas verdes de maíz (elotes) se consumen asadas, hervidas o en forma de pasta blanda. La planta de maíz que está aún verde proporciona un buen forraje. El consumo de maíz en México es alto en comparación con otros países, siendo las tortillas el producto de mayor consumo. El rango de consumo de tortillas en México es aproximadamente de 325 g/día por persona. Actualmente el maíz es materia prima de una gran variedad de productos alimenticios de consumo humano y productos químicos, aunque su principal utilización sigue siendo la alimentación animal. [Paliwal, 2001, Plascencia, 2004].

Todos estos indicadores hacen que el maíz sea un cultivo que debe ser debidamente explotado a fin de alimentar la creciente población mundial. Más aun, dado que grandes masas poblacionales dependen de la producción de este cereal, surge la necesidad del cultivo de maíz con modelos más eficientes, cuya capacidad de resistir a condiciones climáticas adversas proporciona a los cosechadores una gran ventaja agro-económica.

El presente proyecto tiene como objetivo principal la identificación de genes que pudieran estar relacionados con la resistencia a la sequía y a su vez con la incidencia de

las aflatoxinas en el maíz, debido a la contaminación por el hongo *Aspergillus flavus*. Los resultados obtenidos contribuyen a la mejora del maíz en relación a la resistencia en diferentes estreses de tipo abiótico (en este caso a la sequía) y, consecuentemente, una mejora en su resistencia ante la infección del hongo *A. flavus*, de modo tal que el maíz mexicano siga representando un objeto costearable de producción y sustento. [Seki, 2003]

1.2 ESTRESSES QUE AFECTAN AL MAÍZ

La producción de maíz se ve afectada por diversos tipos de estrés, entre los cuales se pueden enumerar los estreses de tipo biótico y aquellos de tipo abiótico. El estrés biótico es ocasionado por un gran número de patógenos que ocasionan enfermedades a la planta y a su vez causan importantes daños económicos a su producción. Así pues, hay otra cantidad de estreses de tipo abiótico que, en su conjunto son adversidades de tipo climático que impiden que el maíz se desarrolle de manera adecuada y, al igual que las enfermedades, ocasionan pérdidas económicas y productivas importantes.

El estrés de tipo biótico resulta de una amplia gama de patógenos potenciales como hongos, bacterias, nemátodos e insectos que requieren e interceptan los productos de la fotosíntesis producidos por las plantas, y los virus que utilizan la maquinaria de replicación a expensas del huésped. [Dangl 2001]

Las enfermedades que afectan al maíz son muchas y muy variadas, muchas de ellas dependen de la etapa de crecimiento de la planta de maíz y de la zona de cultivo, por tanto, de las condiciones de temperatura y humedad de dicha zona.

Según Paliwal (2001), las enfermedades que afectan a los cultivos de maíz pueden ser clasificadas de acuerdo a la etapa en la que afectan a las plantas de la siguiente forma: enfermedades que ocasionan a) pudrición de la semilla y enfermedades de las plántulas, b) pudrición de las raíces, c) pudrición del tallo, d) pudrición del tallo después de la floración, e) enfermedades foliares, f) enfermedades de la inflorescencia, g) pudrición de la mazorca y h) pudrición de los granos durante el almacenamiento. [Paliwal 2001]

La mayoría de las enfermedades que afectan el maíz son causadas por un gran número de hongos patógenos, aunque algunas de ellas son ocasionadas por bacterias. Algunos de los hongos patógenos causantes de las enfermedades de la planta de maíz son las especies de los géneros *Pythium*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Gibberella*, *Cephalosporium*, *Colletotrichum*, *Helmintosporium*, *Puccinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Physalospora*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, y *Rhizotocnia*. Muchos de estos hongos atacan en más de una etapa a la planta de maíz, limitado por las condiciones climáticas, el estrés de la planta y la inocuidad del ambiente de cultivo. [Paliwal 2001, Mazzani 2000]

En cuanto a las enfermedades que afectan al maíz pudriendo los granos de la mazorca y durante el almacenamiento, se encuentra aquella causada por el hongo *A. flavus* que participa en la producción de micotoxinas (aflatoxinas en este caso). Normalmente los granos de la punta de la mazorca son los primeros que se infectan, produciendo un crecimiento fúngico de color verde amarillento. La infección debida a *A. flavus*, como se verá más adelante, se ve favorecida cuando el grano presenta humedades mayores a 15-18%, o cuando el grano infectado es almacenado en ambientes húmedos y cálidos. [Paliwal 2001]

En lo referente a los estreses de tipo abiótico que afectan al maíz se pueden enumerar, en primer lugar, a la sequía, que suele ser devastadora especialmente en las primeras etapas de crecimiento de la planta de maíz. Además pueden enumerarse situaciones específicas de deficiencia de nitrógeno (estrés de baja fertilidad), acidez del suelo y alta saturación de aluminio, temperaturas altas y/o bajas, inundaciones y la salinidad del suelo. [Laffite 2001]

La presencia de alguno de estos tipos de estrés afecta gravemente el desarrollo de los cultivos de maíz. Por supuesto, la severidad del daño ocasionado es proporcional a la severidad con la que el estrés se presente. Así pues, la combinación de dos o más estreses ocasiona una mayor afectación de los cultivos.

Los estreses abióticos mencionados pueden ocasionar reducción del crecimiento de las raíces, con lo que se perjudica su funcionamiento, o bien, pueden tener efectos negativos sobre el metabolismo (ej. fotosíntesis, fertilidad de las florecillas, polinización). Rangos inadecuados de temperatura ocasionan que las enzimas encargadas de ciertas funciones metabólicas no alcancen su actividad máxima y la velocidad de las reacciones sea baja, reduciendo la tasa de metabolismo, o bien, que simplemente no sean funcionales. [Laffite 2001].

La sequía, que tal vez sea el estrés abiótico más devastador, ocasiona una restricción de la fotosíntesis debida tanto a limitaciones de respiración como a limitaciones bioquímicas. Tales alteraciones pueden ser ocasionadas por altos niveles de salinidad del suelo, puesto que el alto contenido de iones impide la movilidad del agua debido al potencial osmótico, a lo que se conoce como sequía fisiológica, sin embargo, la salinidad del suelo también ocasiona toxicidad y, por tanto, marchitamiento de la planta. [Laffite 2001]

1.2.1 Estrés biótico: Infección del maíz con el hongo *Aspergillus flavus* y contaminación con aflatoxinas

1.2.1.1 *Aspergillus flavus*

El hongo *Aspergillus flavus* pertenece al género *Aspergillus*. Los mohos de este género causan deterioro a muchos productos alimenticios, produciendo metabolitos altamente tóxicos, tanto para el hombre como para los animales. Una característica importante de los hongos *Aspergillus* es que producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado, y finalmente podredumbre de las semillas. [Carrillo 2003, Pontón 2000]

El hongo *A. flavus* es capaz de crecer en un rango de 6 a 45°C, aunque la temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C. Así mismo, el actividad de agua mínima necesaria para su crecimiento es de 0.78, aunque la óptima es de 0.95. No obstante, la temperatura y actividad de agua óptimas para la producción de aflatoxinas es favorecida por una temperatura de 33°C y un actividad de agua de 0.99. Además se ha visto que el estrés de las plantas, especialmente el estrés de humedad antes de la cosecha, está asociado con un aumento en la incidencia de la infección de *A. flavus* [Carrillo 2003, Paliwal 2001, Hell 2003]

El crecimiento del hongo *A. flavus* no siempre condiciona la consecuente producción de aflatoxinas. Es muy posible que el crecimiento fúngico sea apreciable y que no se encuentre la cantidad de aflatoxina esperada. Para la síntesis de la micotoxina es necesario, por ejemplo, la disponibilidad de Zn. Una escasa disponibilidad de este elemento puede determinar la baja incidencia de este metabolito en algunos sustratos. [Carrillo 2003, Huang 1997]

1.2.1.2 Mecanismos de defensa y respuesta a la infección

Las plantas cuentan con una gran cantidad de mecanismos de defensa a nivel celular y molecular para combatir el ataque de organismos patógenos. Los genes de resistencia proveen un mecanismo por el cual la planta reconoce al patógeno y desencadena muchas respuestas de defensa en contra de éste. Tales respuestas pueden ser la fortificación de la pared celular, la producción de fitoalexina, la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, rápidos flujos de calcio y iones, la explosión oxidativa extracelular y la respuesta hipersensitiva o la muerte celular programada en el sitio de la infección. [Egea-Gilabert 2002, Boyes 1996, Belkhadir 2004, Huang 1997, Ronald 1998]

La respuesta hipersensitiva es un mecanismo inducido y controlado genéticamente para la resistencia al ataque del patógeno. La interacción planta patógeno en este tipo de respuesta es específica entre el gen de avirulencia del patógeno (*avr*) y los alelos del locus correspondiente a la resistencia a enfermedades por parte de la planta (*R*). Cuando ambos se encuentran presentes en el patógeno y en el huésped respectivamente, resulta la resistencia a la enfermedad. Por el contrario, si alguno de ellos está inactivo o simplemente no está presente, resulta la enfermedad. Esta interacción genética se lleva a cabo siempre que los productos de (*R*) reconozcan las señales provenientes de (*avr*) y desencadenen la transducción de señales que activan los mecanismos de defensa y arresten el crecimiento del patógeno. Leister D (1998) explica que este tipo de mecanismos se conservan en plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y plantas que dan flores. [Dangl 2001 Egea-Gilabert 2002, Kanazin 1996, Leister 1998]

Cabe señalar que las plantas tienen un sistema de defensa basal, de menor amplitud y más lento que la respuesta ocasionada por los genes (*R*). La defensa basal no prohíbe la colonización del patógeno, pero limita su expansión. La acción de las proteínas codificadas por (*R*) aparentemente acelera y amplifica las respuestas de defensa basal innata. [Belkhadir 2004, Guo 1997].

La mayoría de los genes (*R*) que se han caracterizado codifican proteínas que contienen un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR). Este dominio específico ha sido encontrado en diversas proteínas que funcionan en sitios de interacción proteína-proteína, proteína-ligando y proteína-carbohidrato. Así, los genes (*R*) que contienen LRR se han clasificado de acuerdo a la presencia o ausencia de un motivo conservado de sitio unión a nucleótido (NBS), ya sea ATP o GTP. La mayoría de los genes (*R*) codifican tanto el dominio LRR como el motivo NB y un gran número de ellos están asociados a la membrana celular. Bai J (2002) señala que el dominio LRR participa en el reconocimiento de ligandos patogénicos en evolución constante, mientras que el motivo NBS participa en el reconocimiento de la señalización. Las proteínas R, por tanto, reconocen la acción de los factores de virulencia siempre que modifican o perturban la acción celular del huésped. No se ha asignado ninguna otra función a esta amplia clase de genes. [Boyes 1996, Dangl 2001, Bai 2002, Belkhadir Y, 2004, Spielmeyer 2000, Wang 2004].

La clase de genes con dominio LRR y motivo NB pueden ser subclasificados en dos grupos, a lo que corresponde la identificación del dominio en el extremo amino terminal de la proteína. Dado que pueden diferir, se ha deducido que los dominios terminales de las proteínas participan en eventos de señalización. El primer grupo tiene un dominio con homología al dominio intracelular de *Drosophilla Toll* y a los dominios de señalización de los receptores de interleucina mamífera (IL)-1, a dicho dominio se le conoce como TIR (Toll Interleukin Receptors), por lo que a las proteínas de este

subgrupo se les ha nombrado (TIR-NB-LRR); Bai (2006) recalca que este grupo de proteínas sólo se ha encontrado en plantas dicotiledóneas. Por otro lado se encuentra el subgrupo de proteínas cuyo dominio terminal se encuentra enrollado (coiled-coil domain). A este subgrupo, por tanto, pertenecen las proteínas CC-NB-LRR. Dangl (2001) señala que este grupo de proteínas probablemente comprende múltiples subfamilias que varían en tamaño y locación del dominio CC. [Dangl 2001, Bai 2006, Wang 2004].

La información recopilada a partir de los mecanismos y genes de defensa ante estrés de tipo biótico de las plantas en general es de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos de resistencia propios del maíz. En este sentido, se ha encontrado una gran diversidad de genes de resistencia en muchas plantas. Genes que participan desde la percepción del estrés biótico (presencia y ataque del patógeno) hasta genes que muestran resistencia [Collins 1998].

1.2.1.3 Aflatoxinas

Las micotoxinas, en general son producidas por la estructura micelilal de los hongos filamentosos o, más específicamente, por los mohos. Las micotoxinas son metabolitos secundarios que no son bioquímicamente significativos para el crecimiento del hongo y su desarrollo. Sin embargo, ni todos los mohos son toxigénicos, ni todos los metabolitos secundarios de los mohos son tóxicos. Estos metabolitos enferman o matan a los animales que los consumen. [Hussein 2001, D'Mello 1997, Carrillo 2003].

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y secundaria al ingerir leche o carne de animales que comieron forrajes con micotoxinas. [Carrillo L, 2003]

La contaminación de los alimentos con micotoxinas puede suceder cuando la planta es infectada en el campo por el hongo patógeno, cuando el hongo productor de toxinas crece sobre los frutos y granos almacenados o bien cuando el desarrollo fúngico sucede durante el almacenamiento de los materiales ya procesados. [Carrillo 2003, Mendez-Albores 2004 (a)]

Las aflatoxinas, que son parte de la lista de micotoxinas de mayor interés público y agroeconómico, son clasificadas como metabolitos carcinogénicos a los humanos. Son 6 especies químicas diferentes, a las que se les ha nombrado B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂, de las cuales la aflatoxina B₁ es la más tóxica. [Hussein 2001] Las aflatoxinas M₁ y M₂ sólo han sido encontradas en alimentos lácteos procedentes de vacas que han ingerido alimento contaminado con la aflatoxinas B₁. [D'Mello 1997]

Las aflatoxinas B₁ y B₂ son producidas por *A. flavus*, aunque no son las únicas micotoxinas que este organismo produce. El riesgo de contaminación por *A. flavus* y su consecuente producción de toxinas es mucho mayor en productos provenientes de los trópicos. [D'Mello 1997]. Según Carrillo (2003), las aflatoxinas pueden encontrarse en alimentos como el ajo, almendras, arroz, arveja, avena, castañas, cebada, cebolla, embutidos curados, especias, habas, hierbas aromáticas, higos, huevos de gallina, leche de vaca, **maíz**, cacahuates, mijo, pastura, polen apícola, queso, salvado de maíz, soja, sorgo.

Una amplia variedad de factores físicos pueden favorecer la producción de micotoxinas en el campo y en el almacenamiento. Estos incluyen el tiempo, temperatura, humedad y la infestación de insectos. [D'Mello 1997]. El control de estos factores interactuantes puede reducir seriamente el acceso del hongo a los granos de maíz. En México, en la mayoría de las tierras de cultivo, la producción de maíz, por ejemplo, es caracterizada por ser de agricultura a baja escala y de labor intensiva, de temporal, no irrigada con fertilizantes y pesticidas. Tal situación implica que se reduzcan los rendimientos del maíz y *A. flavus*, un hongo débil y oportunista es capaz de infectar los cultivos y contaminar con aflatoxinas a la producción. [Plascencia 2004, Saleemullah 2006]

Es importante conocer que la presencia de *A. flavus* no asegura que existan aflatoxinas, y que la micotoxina continúa en el alimento aunque el moho haya desaparecido.

Carrillo (2003) indica que la aflatoxina B₁ puede inducir la aparición de cáncer hepático, ésta se excreta en la leche convertida en aflatoxina M₁. A su vez, la aflatoxina M₁ es cancerígena. Las aflatoxinas en general causan actividades carcinogénicas y mutagénicas, daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores, teratogénesis y acumulación en tejidos e incluso desórdenes de tipo hormonal e inmunosupresor. [Carrillo 2003, Sanchis 2000, Lucas Viñuela E, Saleemullah 2006].

Actualmente se están estudiando muchas estrategias para el manejo, reducción y eliminación de la contaminación con aflatoxinas de los cultivos, incluso el control biológico que considera la acción de bacterias, levaduras y hongos competitivos. [Dorner 2004]

Según la FAO las condiciones que han de cumplir los procesos de descontaminación de micotoxinas son: 1) destruir, inactivar o eliminar las micotoxinas, 2) No producir residuos tóxicos, 3) Retener el valor nutritivo y aceptabilidad del producto, 4) no alterar las propiedades tecnológicas del producto, 5) destruir el micelio y las esporas fúngicas y 6) ser respetuoso con el medio ambiente. La FAO, a través de la consultora Enedina Lucas Viñuela, propone un análisis de riesgos basado en conocimientos científicos para definir los niveles en alimentos (tolerancias, niveles de referencia y límites máximos

para residuos) que permitan armonizar los reglamentos y procedimientos de control sobre las micotoxinas y faciliten el comercio internacional de los alimentos. [Sanchis 2000, Lucas Viñuela, Van Egmond 1999]

En México, los límites máximos de aflatoxinas permitidos están dados por la NOM-188-SSA1-2002, además de establecer los requerimientos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. La tabla siguiente (tabla1) presenta los niveles máximos establecidos por la Secretaría de Salud con respecto al tipo de alimento.

TABLA 1. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFLATOXINAS EN DIFERENTES TIPOS DE PRODUCTOS PARA CONSUMO HUMANO.

Producto	Nivel máximo permitido ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Masa	12
Tortillas de maíz nixtamalizado	12
Tostadas de maíz nixtamalizado	12
Harina de maíz nixtamalizado para la producción de tortillas y tostadas	12
Tortillas de trigo	20
Tortillas de grano entero	20
Harina para la preparación de tortillas de trigo	20
Granos enteros para la preparación de tortillas	20

Fuente: Plascencia 2004.

La contaminación del maíz con aflatoxinas depende de varios factores de resistencia así como de las condiciones ambientales ocurrentes. Los genotipos de maíz que presentan menos contaminación con aflatoxinas son aquellos que muestran 1) resistencia al proceso de infección, 2) resistencia a la producción de toxinas, 3) resistencia al daño causado por insectos y 4) tolerancia a los estreses ambientales (abióticos).

1.2.2 Estrés abiótico: La sequía

1.2.2.1 Estrés hídrico o déficit de agua

La sequía, o escasez de lluvia, es una situación climatológica anormal que produce un desequilibrio ecológico grave, puesto que las cosechas sufren daños, se estresan. Aunque éste no es el único desequilibrio ocasionado, si es el que nos concierne. La sequía es uno de los principales estreses ambientales que limitan el crecimiento de las plantas.

El estrés hídrico en general es una forma de déficit de agua, el cual es una condición en la que el estado del agua de las plantas conduce pequeños cambios, relativamente. La deshidratación implica la pérdida de la mayoría del agua libre protoplásmica y

condiciona la supervivencia a partir del agua ligada, que es el agua asociada a la matriz celular. [Ramanjulu 2002]

El estrés hídrico restringe la fotosíntesis debido a limitaciones bioquímicas y en los estomas dado que la conductividad estomatal se ve fuertemente influenciada por la presencia y concentración de ácido abscísico como fitohormona presente en el xilema. [Laffite 2001] Así pues, existen genotipos que presentan una mejor capacidad de mantener esta fitohormona presente en el xilema, lo cual se ha visto fuertemente relacionado con la cantidad de nudos radiculares; tales genotipos muestran una mayor tolerancia a la deshidratación debida a la presencia de sequía en el ambiente.

Así pues, la tolerancia a la deshidratación es el resultado de un proceso dinámico y parece ser mediado por sistemas protectores que previenen el daño letal. [Ramanjulu 2002] La medida en la que el estrés hídrico impacta sobre el crecimiento de un cultivo está influenciada por numerosos factores, tales como la etapa de crecimiento del cultivo e historia del mismo, el área foliar, el volumen y firmeza de las raíces, el déficit de la presión de vapor atmosférica, la temperatura y la radiación. [Laffite 2001]

Cuando el estrés hídrico se presenta durante el establecimiento del cultivo, las plántulas son muy susceptibles y mueren, por lo que su población se reduce. Si este estrés se presenta cerca de la época de la floración las pérdidas son debidas primeramente a un decremento en el número de mazorcas por planta y de granos por mazorca, el número de granos puede reducirse a causa de dificultades en la polinización o porque los óvulos fertilizados detienen el crecimiento, incluso, si el estrés hídrico aparece durante la polinización, cuando los estambres están emergiendo puede suceder el aborto de los cigotos recién formados. La asincronía en el desarrollo de las flores, la pérdida de polen, pérdida de receptividad de los estambres, fallas de fertilización, así como el aborto de embriones mencionado arriba son fallas causadas por la sequía.[Laffite 2001, Westgate 1996]

1.2.2.2 Mecanismos de tolerancia o resistencia a la sequía

Los mecanismos principales mediante los cuales las plantas lidian con el estrés hídrico son, por un lado, la tolerancia y por el otro la evasión; este último está relacionado con las adaptaciones que la planta realiza en su arquitectura (ej. Decremento del grado de transpiración, reducción del área de las hojas, incremento de la longitud y densidad de la raíz, por mencionar algunas). [Ramanjulu y Bartels 2002]

Blum (1979) Describe el proceso de tolerancia a la sequía de la siguiente manera: Cuando la humedad del suelo decrece, es decir, cuando el estrés hídrico del suelo se incrementa, se retarda el crecimiento de la planta al grado de “**tolerancia**” de los tejidos

o la “**evasión de la sequía**” de todo el sistema. En un nivel crítico de estrés, el crecimiento cae a cero. El cese o el retraso del crecimiento permiten la osmoregulación. Siguiendo el cese del crecimiento, la fotosíntesis puede continuar hasta el punto en que los estomas se cierran completamente. Cuando el cierre estomatal está completo, el intercambio de gases es casi inexistente, pero la planta aún está viva. [Blum 1979, 1989]

La transpiración durante el estrés se mantiene con 1) el crecimiento de las raíces, lo que permite la maximización del aprovechamiento del agua disponible, 2) la osmoregulación, esto permite el mantenimiento del turgor y la protección de las membranas celulares. [Blum 1989].

En el punto del cierre estomatal y disminución de la transpiración, la capacidad de las plantas para permanecer vivas y continuar con el crecimiento hasta la desaparición del estrés, depende de los mecanismos de supervivencia. El mecanismo más importante es la hipersensibilidad, mencionado antes como mecanismo para la resistencia al estrés biótico. Tal mecanismo implica la reacción del tejido vegetal de manera muy sensible al déficit hídrico al entrar en un estado latente. [Blum 1979, 1989]

La resistencia durante la recuperación es otra manera de resistencia al estrés, y está relacionada con la acumulación de altos niveles de prolina, lo que promueve el ajuste osmótico y además otorga energía para los tejidos en recuperación. [Blum 1979]

La resistencia a la sequía involucra un rápido crecimiento inicial de la planta en conjunción con la menor reducción de la fotosíntesis durante el estrés. El proceso de escape de la sequía es realizado por variedades de plantas de maduración temprana para el escape de una sequía tardía, lo que les confiere mejor rendimiento. [Blum 1979]

La evasión del estrés es otra manera de resistencia a la sequía o estrés hídrico en la que se mantiene un alto potencial de agua en las hojas. Las plantas que son capaces de evadir el estrés presentan una mayor nivel de respiración en las raíces, en comparación con plantas no evasoras, lo cual está estrechamente relacionado con la integridad de las mitocondrias celulares. La cera epicuticular es un componente básico para la evasión del estrés pues reduce la transpiración cuticular y la consecuente pérdida de agua, además de que mejora el control estomatal.

La tolerancia al estrés hídrico, que para el caso es el mecanismo que nos concierne, resulta de la coordinación de alteraciones bioquímicas y fisiológicas a nivel celular y molecular, involucrando una gran cantidad de genes con diversas funciones, así como respuestas fisiológicas a dicho estrés.

De un modo muy general, tales genes pueden clasificarse en dos grupos principales, al primero pertenecen los genes encargados de proteger directamente a la planta contra el estrés ambiental, mientras que al segundo corresponden el resto de los genes involucrados en la regulación de la expresión génica [Seki 2003]. Tal clasificación aparece insuficiente dado que la regulación de la expresión génica es un proceso complejo. Ramanjulu (2002) propone una clasificación más estricta en la que los genes se separan en 5 cinco grupos principales (figura 1). El grupo 1 esta constituido por genes que se expresan estableciendo una respuesta especifica en la resistencia al estrés. Al grupo 2 pertenecen aquellos genes reguladores de la expresión génica relacionada con la resistencia (switches moleculares). Los genes de los grupos 3 y 4 están involucrados directamente con la señalización, esto es, la percepción de la señal que indica la existencia del estrés (grupo 3) y la transducción de la señal (grupo 4).

Y por ultimo, el grupo 5, tal vez el menos estudiado, está formado por genes que se apagan durante el estrés, modificando el metabolismo celular con un objetivo especifico en la resistencia. [Ramanjulu y Bartels 2002]

Dentro de los genes que se encienden durante el estrés estableciendo una respuesta específica se encuentran aquellos que expresan a) proteínas LEA (late embryogenesis-abundant) que se acumulan en las últimas etapas de la embriogénesis o en respuesta a la deshidratación, existe el supuesto de que las proteínas LEA juegan un papel protector a nivel celular en plantas estresadas [Xu 1996]. b) proteínas asociadas a canales de agua que contribuyen a facilitar el transporte de agua en las membranas y regular su conductividad, de modo que la permeabilidad de la membrana se incrementa [Ramanjulu y Bartels 2002]; c) proteínas que transfieren lípidos las cuales participan en la biosíntesis de cutícula y con esto se reduce la perdida de agua de la planta [Ramanjulu y Bartels 2002; Treviño y O'Connell 1998], aunque los lípidos sintetizados durante el estrés también han sido relacionados con la conservación de las membranas celulares y la defensa contra el ataque de organismos patógenos [Treviño y O'Connell 1998]; d) proteínas inhibidoras de proteasas, representadas por inhibidores de cistein proteinasas cuya función de inhibir la actividad de cistein proteinasas permite bloquear la muerte celular programada, por otro lado se ha reportado que la expresión de estas proteínas permite a la planta reducir el grado de transpiración y la actividad fotosintética [Ramanjulu y Bartels 2002, Massoneau 2005]; e) enzimas antioxidantes que contribuyen a evitar la foto oxidación mediante la detoxificación de los radicales de oxígeno presentes en las plantas estresadas; así, la planta evade la acumulación de especies reactivas de oxígeno que surgen tras las reacciones degenerativas [Ramanjulu y Bartels 2002. Massoneau 2005]; f) proteínas involucradas en la reparación de otras proteínas dañadas por el estrés, g) proteínas involucradas en la protección de estructuras fotosintéticas y h) en la acumulación de osmolitos, los cuales ayudan a mantener el

balance osmótico que se ve afectado durante la deshidratación. [Ramanjulu y Bartels 2002]

Los switches moleculares son en su mayoría factores de transcripción de cinco tipos diferentes: a) las proteínas que contienen un dominio de unión al DNA que es rico en residuos básicos y se encuentra adyacente a un dominio ‘sierre’ de leucinas (basic-leucine zipper proteins o b-ZIP proteins); b) las proteínas Myb, [Urao 1993] c) los factores de transcripción Myc-like bHLH (basic helix-loop-helix), d) las proteínas HD-ZIP (homeodomain-leucine zipper) e) las proteínas que contienen un dominio AP2/EREBP, que se unen a ABR (abscisic acid responsive element) [Seki 2003, Kizis 2001, Liu 1998, Park 2001]. Todas ellas identificadas por los tipos de dominios que contienen y que las hacen específicas.

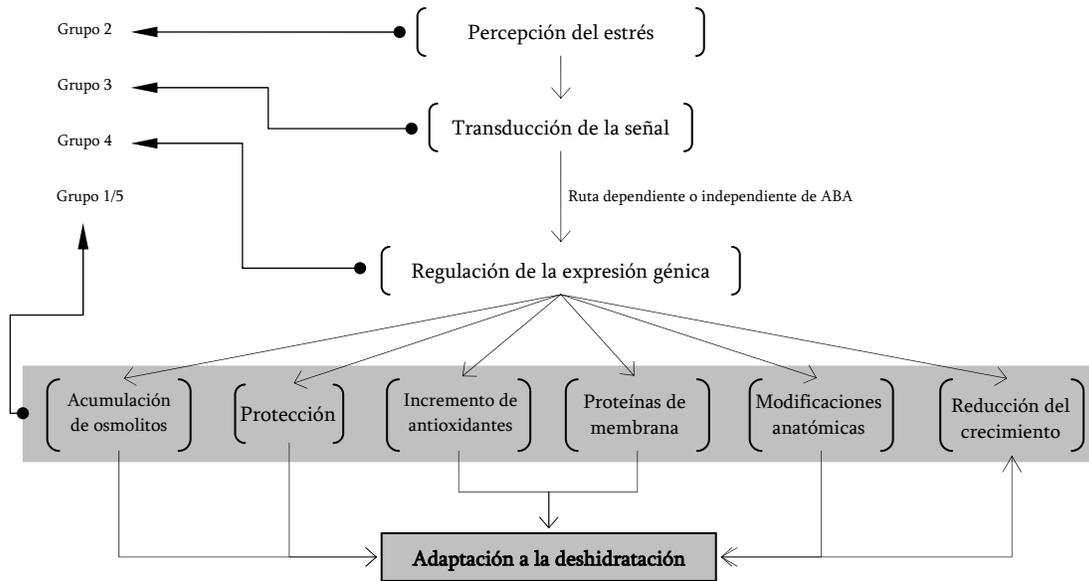


Figura 1. Cambios bioquímicos, anatómicos y morfológicos inducidos por la deshidratación a favor de la adaptación. [Ramanjulu y Bartels 2002]

La señalización ante el estrés es llevada a cabo por más de una ruta, no obstante comienza con la percepción de la señal (genes del grupo 3), seguida por la generación de segundos mensajeros (grupo 4) [Xiong 2002]. La percepción de la señal es llevada a cabo por moléculas asociadas a la membrana celular que contienen sitios sensibles al estrés hídrico, a los que se conoce como osmosensores. Existe el supuesto de que las células pueden tener una gran cantidad de sensores capaces de detectar cambios celulares importantes (ej. cambios en la fluidez de la membrana), y con ello percibir la condición ambiental y desencadenar la señal apropiada. Las moléculas que participan son canales

de iones, especialmente de Ca^{2+} (resaltando la función que este ion juega en muchas rutas de señalización), histidin cinasas, entre otras cinasas. [Xiong 2002, Ramanjulu y Bartels 2002, Xiong y Zhu 2001, Knight 1997]. Xiong (2001, 2002) menciona que a este grupo es importante agregar moléculas secundarias de señalización o ligandos que inducen la liberación iones de Ca^{2+} en los canales de Ca^{2+} . Ejemplos de estos ligandos incluyen inositol fosfatos, cuyos precursores son los fosfolípidos que conforman a la membrana plasmática, ribosa de ADP cíclico y ácido nicotínico-adenin dinucleótido fosfato. El mecanismo de transformación de fosfolípidos a inositol fosfatos implica la participación de enzimas fosfolipasas. [Ramanjulu y Bartels 2002, Xiong y Zhu 2001]

La transducción de la señal es llevada a cabo mediante cascadas de MAP cinasas, cinasas dependientes de calcio (CDPKs) y fosfolipasas. Las MAP cinasas son activadas por receptores/sensores tales como protein tirosin cinasas, receptores acoplados a proteínas G e histidin cinasas de dos componentes [Xiong 2002, Ramanjulu y Bartels 2002, Xiong y Zhu 2001, Saijo 2000]

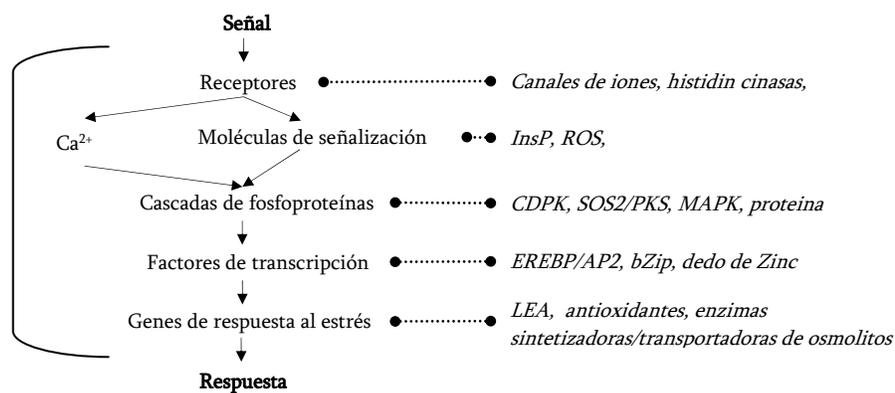


Figura 2. Ruta general para la transducción de las señales en el estrés abiótico. GPCR: G-protein coupled receptor. InsP: inositol polyphosphates, RLK: receptor-like kinase. [Xiong 2002]

Las moléculas participantes en la percepción y transducción de la señal, así como los factores de transcripción se presentan en la figura 2, donde se expone de modo general la ruta genérica de señalización ocasionada por la presencia de un estrés abiótico.

Por último, la función de aquellos genes del grupo 5 aun no es bien conocida, sin embargo se sabe que algunos de ellos se apagan para lograr la acumulación de metabolitos que funcionen como osmolitos como la prolina. [Ramanjulu y Bartels 2002]

1.3 SITUACIÓN ECONÓMICA DEL MAÍZ Y SUS AFECCIONES DEBIDAS A AMBOS ESTRESSES

México es el centro de origen del maíz, y su producción agrícola es caracterizada por una amplia diversidad de genotipos que son cultivados bajo condiciones de no irrigación. El cultivo de maíz se realiza principalmente para el consumo propio de los campesinos, como medio de subsistencia o para su venta en mercados locales. [Plascencia 2004]

Hablar de la situación económica del agro en México, así como hablar de la situación económica que concierne al maíz nos refiere en muchos aspectos a la situación económica del país en general, especialmente a la filosofía política por la cual se rige y que se llama neoliberalismo. El neoliberalismo está directamente asociado a los cambios en el manejo del ambiente más significativos. Así pues, está asociado con el libre comercio y a la creencia de que las soluciones a los problemas ambientales sean dadas por el mercado más que por el gobierno. El neoliberalismo se asocia a la privatización y comercialización de lo que es de nadie, de lo que es del estado o de los recursos que son propiedad común, como los bosques, agua y la biodiversidad. [Liverman 2006]

La influencia del neoliberalismo sobre las tierras agrícolas es muy extensa, como se mencionó arriba, está ampliamente asociada con la privatización de los recursos y de la producción de cultivos en un sistema globalizado. [Liverman 2006]. Finalmente, la influencia neoliberalista ha causado incrementos en la producción agrícola, pero tal incremento se confina a los grandes productores mientras que se ha reducido el empleo rural y de los pequeños productores, resultando en un incremento de la pobreza.

El Tratado de libre comercio entre Canadá, Estados Unidos y México provee un claro ejemplo de la liberación del mercado que ha causado impactos importantes en el ambiente, y en el sector agrícola. Liverman (2006) comenta que muchos investigadores aclaman el sufrimiento del sector bajo el TLC debido a las importaciones provenientes de los Estados Unidos y debido a que los productores de baja escala no han sido capaces de participar en la nueva economía abierta, especialmente porque se les han retirado los recursos. Los productores a gran escala, principalmente al norte del país, han sido capaces de incrementar su producción de vegetales, frutas y forraje a expensas del recurso hidráulico y con el uso de maquinaria y agroquímicos. Los productores pequeños y más pobres han encontrado difícil acceder a créditos, **agua**, y experiencia técnica, además de las dificultades económicas debidas a los bajos precios.

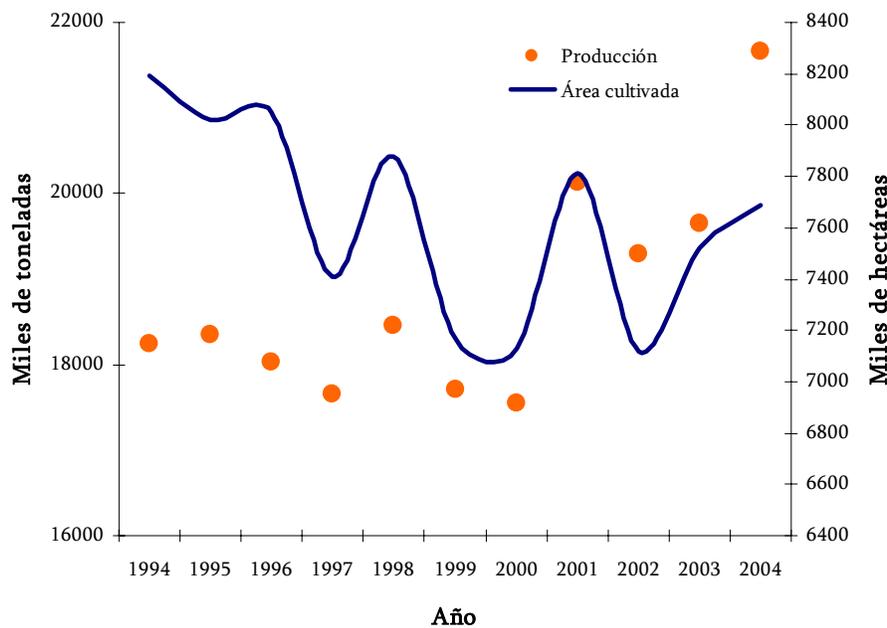


Figura 3: Producción de maíz y Área cultivada en México. Datos obtenidos de la Organización para la alimentación y la agricultura (FAO).

La producción de maíz refleja la situación económica planteada. La figura 3 refleja el comportamiento ascendente de la producción, que durante una década (1994-2004) aumentó por aproximadamente 2 millones de toneladas de maíz. Por el contrario, el área que se dedicaba al cultivo del maíz en 1994 se vio reducida de casi 8 millones 200 mil hectáreas, a 7 millones 100 mil en 2002, es decir, hubo una reducción de más de 1 millón de hectáreas. A partir de entonces se visualiza una cierta recuperación de las tierras de cultivo, sin embargo, es de suponerse que los grandes declives de áreas cultivadas en funcionamiento sean debidos a cambios ambientales drásticos, no obstante, un aumento de la producción indica en gran medida el aprovechamiento por parte de los neolatifundistas para la producción de dicho cereal, cuyos cultivos se encuentran protegidos ante las adversidades climáticas, puesto que cuentan con sistemas de riego y, más aún, se cuenta con las posibilidades de fertilización y combate de plagas que la producción rural no tiene. Es de esperarse que no sólo los cambios climáticos y las plagas hayan reducido el área cultivada, sino también la desaparición del agro rural mexicano. Sobre todo debido a las políticas neoliberales antes mencionadas que no otorgan oportunidades serias a los campesinos, mientras que les ofrecen la oportunidad de vender los ejidos.

Dadas las bajas oportunidades de los pequeños productores, los cultivos quedan condicionados a los fenómenos naturales. Los cultivos son de temporal, es decir, se espera que la lluvia sea quien mantenga la hidratación de los cultivos. Laffite (2001) ha

señalado que el maíz en las zonas tropicales raramente es cultivado bajo riego y la variabilidad natural en la cantidad y distribución de la lluvia significa que el estrés de sequía puede ocurrir en cualquier momento del ciclo de su cultivo. En general, el cultivo del maíz requiere al menos 500 mm de lluvia bien distribuida durante todo el ciclo. En la mayor parte del país, especialmente en el sur, la producción de maíz es caracterizada por ser de baja escala y de labor intensiva. Dicha situación se encuentra ampliamente polarizada en las diferentes regiones del país. Las estadísticas de producción bajo distintas condiciones en distintas regiones se muestran en la tabla 2. [Plascencia 2004]

Las zonas con mayor posibilidad de irrigación en los cultivos son aquellas en el noroeste, mientras que el resto de las superficies, principalmente al suroeste no cuentan con este método de cultivo. La superficie irrigada corresponde a la sexta parte del total de superficie sembrada en todo el país, la cual produce el 45% de la producción total. Lo que reitera la polarización económica en el país y la afcción de la sequía a las superficies no irrigadas.

TABLA 2. ESTADÍSTICAS DE PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN DISTINTAS ÁREAS GEOGRÁFICAS EN MÉXICO EN SUPERFICIES IRRIGADAS Y NO IRRIGADAS.

Región productora	Superficie irrigada			Superficie no irrigada		
	Área cultivada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)	Área cultivada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Noroeste	317,372	2'685,712	8.46	71,215	80,234	1.12
Noreste	121,104	636,593	5.30	446,462	422,637	0.94
Norte-centro	5,281	18,151	3.43	1,604	917	0.57
Sureste	101,407	304,189	2.99	2'981,047	5'057,125	1.69
Centro	237,694	1'109,276	4.66	1'362,064	3'353,222	2.46
Oeste	283,933	1'529,351	5.38	1'889,636	4'855,961	2.62
TOTAL	1'065,792	6'283,272		6'752,028	13'870,096	

Los datos corresponden a los ciclos de primavera-verano y otoño-invierno en 2001.

Fuente: Plascencia 2004.

En México, siglo 20, los impactos de la sequía pueden apreciarse en el declive de la producción y exportaciones de cultivos y ganado y los correspondientes aumentos en las importaciones, reducción del área de producción, declive en la producción de ganado e incremento de incendios forestales. [Liverman 2000]. Por ejemplo, los impactos de la sequía, en cultivos como el maíz, pueden ser apreciados en los niveles de importación y producción. (Figura 4)

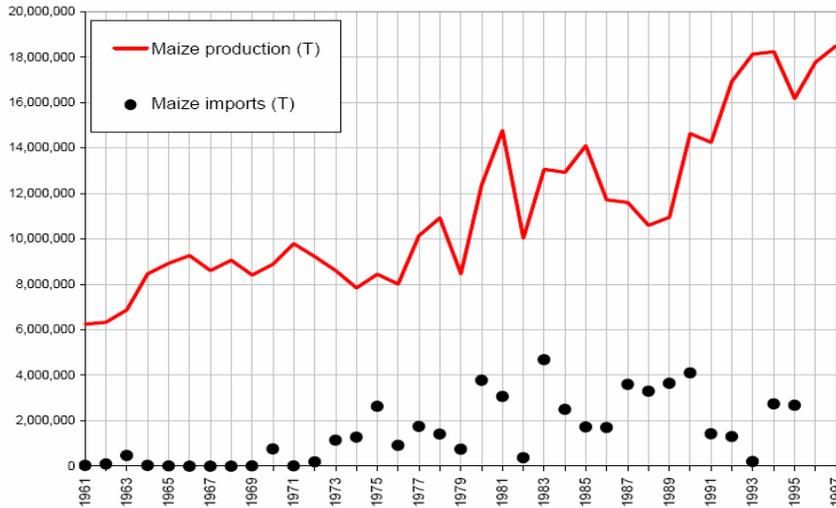


Figura 4. Relación entre producción de maíz y su nivel de importaciones en México.
[Liverman D. 2000]

La producción fue baja en los periodos 1973-1976, 1979, 1982, 1986 – 1989, debido en parte a la sequía en esos años, pero también debido a las crisis económicas. Las importaciones han crecido consistentemente en respuesta a la demanda creciente de la población, a su vez, la producción ha crecido débilmente debido a las condiciones climáticas adversas (principalmente a la sequía) y estreses que afectan al cultivo y a los declives de la producción. [Liverman 2000].

La geografía de los impactos de la sequía es revelada en los reportes climáticos. La siguiente figura (figura 5) arrojada por el monitor norte americano de sequía (North American Drought Monitor) [O' Brien 2006] muestra la severidad de este fenómeno en nuestro país. Es conveniente hacer notar que la mayor parte del área terrestre de nuestro país se encuentra bajo condiciones climáticas adversas en lo que a sequía se refiere. Es notable que estados como Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Michoacán, Colima y parte de los estados de Coahuila, Durango, Jalisco, Estado de México y Guerrero enfrentan intensidades moderadas de sequía. En estas zonas el impacto de la sequía es tanto agrícola como hidrológico. Por otro lado, estados como Baja California Norte y Sur, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Guanajuato, San Luis Potosí, Aguascalientes, Nayarit, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Distrito Federal, Campeche y partes del Estado de México, Durango, Coahuila, Jalisco. Oaxaca y Guerrero presentan un nivel menor de intensidad de la sequía, y el impacto de ésta es meramente agrícola, sin embargo, toda esta zona se encuentra delineada por un impacto dominante, esto es, se encuentra en un riesgo constante de aumentar el nivel de sequía ya presente.

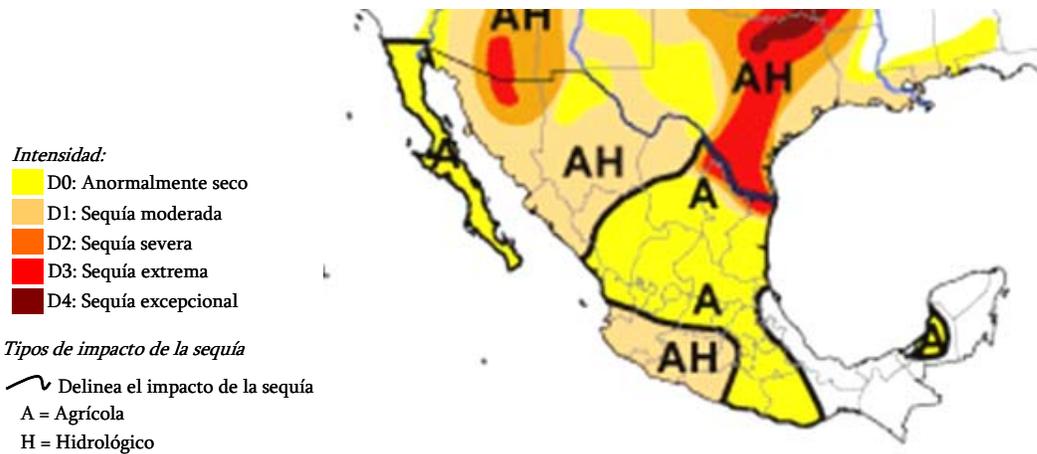


Figura 5: Monitor de Sequía en Norte América. [O'Brien T, 2006].

Debido a las adversidades climáticas de tipo hidráulico que aquí se describen, y debido a las adversidades económicas que impiden el desarrollo del agro mexicano, de la producción a baja escala, la necesidad de aportar genotipos de maíz resistentes al déficit de agua es vehemente, pues en presencia de esta clase de condiciones extremas de humedad y temperatura se han desarrollado hongos aflatoxigénicos que pueden llegar a ser competitivos y dominar a otras especies de hongos del suelo. La sequía puede comprometer la integridad y salud de los granos de la mazorca incrementando el grado de infección fúngica. [Brown 1999, 2003, Chen Z-Y(a,c), 2004]

Capítulo 2. Metodologías experimentales

2.1 CUADRO METODOLÓGICO

La metodología general que se siguió para alcanzar el objetivo del presente proyecto de investigación se representa en la siguiente figura.

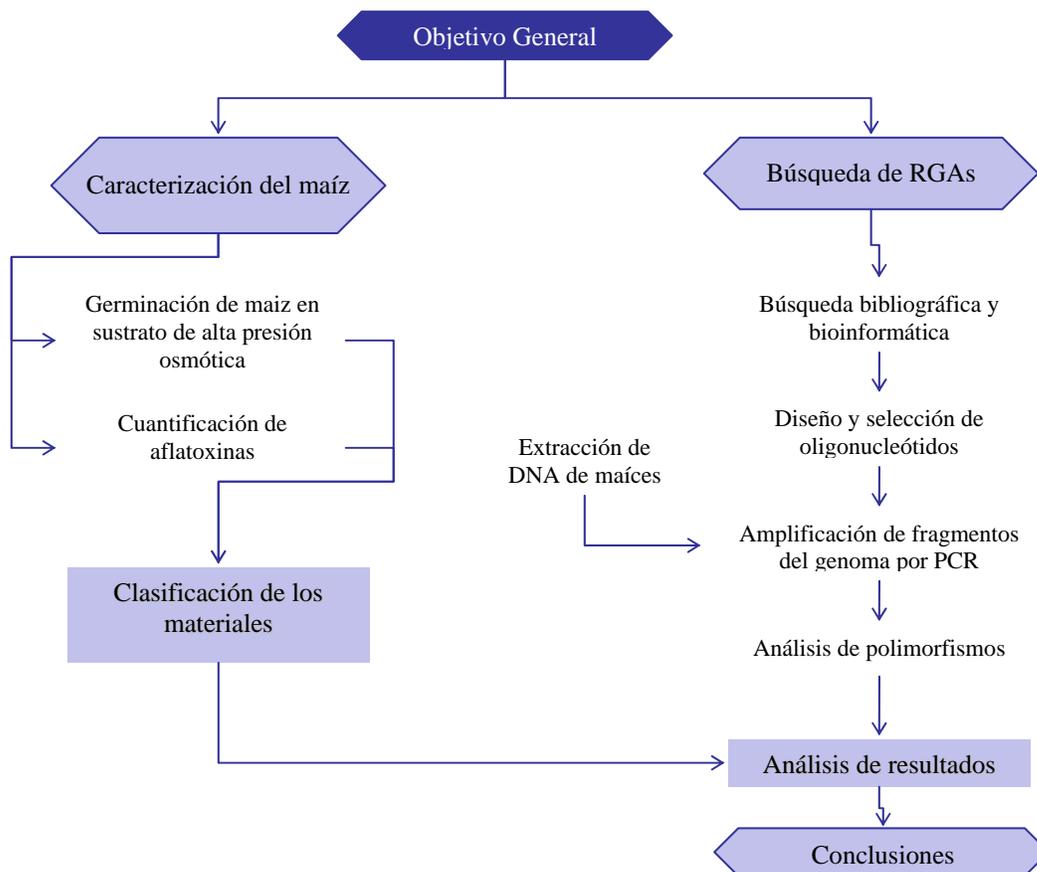


Figura 6. Cuadro metodológico del proyecto

2.2 UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales utilizadas como material biológico en el presente proyecto comprenden 43 genotipos de maíz proporcionados por el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

TABLA 3. LISTA DE MATERIALES Y REGIÓN DE ORIGEN DE LOS MAÍCES CRIOLLOS.

Clasificación	Clave	Región de origen
Colectas de maíz criollo (origen IG0405)	INIFAP-ZM-002	Bajío
	INIFAP-ZM-003.1	Bajío
	INIFAP-ZM-003.2	Bajío
	INIFAP-ZM-004	Bajío
	INIFAP-ZM-005	Bajío
	INIFAP-ZM-006	Bajío
	INIFAP-ZM-007	Sureste
	INIFAP-ZM-008	Sureste
	INIFAP-ZM-009	Norte
	INIFAP-ZM-010	Bajío
	INIFAP-ZM-011	Bajío
	INIFAP-ZM-012	Sureste
	INIFAP-ZM-013	Noreste
	INIFAP-ZM-014	Centro
	INIFAP-ZM-015	Noreste
	INIFAP-ZM-016	Norte
	INIFAP-ZM-017	Norte
	INIFAP-ZM-018	Sureste
	INIFAP-ZM-019	Bajío
	INIFAP-ZM-020	Bajío
	INIFAP-ZM-021	Bajío
	INIFAP-ZM-022	Noreste
	INIFAP-ZM-023	Centro
	INIFAP-ZM-024	Centro
	INIFAP-ZM-025	Bajío
	INIFAP-ZM-026	Sur
Materiales precoces seleccionados para sequía del CECAL CIR-NOC INIFAP	INIFAP-ZM-027	
	INIFAP-ZM-028	
	INIFAP-ZM-029	
	INIFAP-ZM-030	
	INIFAP-ZM-031	
	INIFAP-ZM-032	
	INIFAP-ZM-033	
	INIFAP-ZM-034	
Líneas y variedades mejoradas de Río Bravo	INIFAP-ZM-035	
	INIFAP-ZM-036	
	INIFAP-ZM-037	
	INIFAP-ZM-038	
	INIFAP-ZM-041	
	INIFAP-ZM-042	
Líneas QPM procedentes de CIMMYT	INIFAP-ZM-143	
	INIFAP-ZM-150	
	INIFAP-ZM-162	
	INIFAP-ZM-173	
	INIFAP-ZM-182*	

* Línea no QPM

Los materiales utilizados fueron cultivados en el mismo lote y con la misma fecha de siembra, evitando que afecten variables tales como la edad de las semillas, efectos del clima, zona de cultivo y la calidad del suelo de cultivo sobre las diferencias manifestadas en las pruebas experimentales. El manejo del cultivo desde la siembra hasta la etapa poscosecha fue el mismo para la muestra de genotipos seleccionada, esto es debido a que dichos factores afectan la calidad de las semillas y, a su vez, a los resultados de las pruebas fenotípicas ensayadas sobre éstas.

Los 43 genotipos se agruparon como sigue (tabla 3):

Maíz criollo de 25 diferentes colectas. De acuerdo con un trabajo previo, los genotipos seleccionados son aquellos tolerantes al desarrollo de hongos de almacén y al deterioro fisiológico ocasionado por condiciones de almacenamiento adversas. [Moreno, 2004].

8 materiales precoces seleccionados con tolerancia a sequía en etapas de floración y llenado de mazorcas provenientes del CIRNOC-INIFAP en Zacatecas.

3 líneas endogámicas y 2 variedades mejoradas procedentes de la zona de Río Bravo en la que prevalece una alta contaminación con aflatoxinas.

5 líneas aportadas por INIFAP, originarias de CIMMYT, de las cuales 4 son de tipo QPM. Genotipos de este tipo se han caracterizado por su rápida pérdida de vigor y longevidad.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

2.3.1 Prueba de resistencia a estrés hídrico

2.3.1.1 Prueba de germinación con estrés hídrico utilizando PEG 6000.

Se diseñó un experimento completamente aleatorio para un factor de variación que corresponde al genotipo de maíz. El modelo es de tipo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ representa el promedio de germinación de las 6 réplicas a examinar y α representa el efecto de la variación de genotipos sobre la media del porcentaje germinación resultante. ε corresponde al error aleatorio resultante. Este análisis se llevó a cabo en el programa SPSS ver 12.0.0 [Lead Technologies, USA 2003]. Se probó la hipótesis nula de que las medias de la proporción de semillas germinadas en cada caja petri para cada genotipo son iguales ($H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3=\dots=\mu_n$), contra la hipótesis alternativa

que implica que hay diferencias fenotípicas en la respuesta al estrés hídrico entre los genotipos, lo cual se ve influenciado por la diversidad genética de la muestra.

Se seleccionaron muestras de maíz limpio y entero o sin daños. Las muestras de maíz fueron desinfectadas con cloro al 3% en agitación durante 1 minuto. De éstas, se colocaron 30 semillas por cada genotipo de maíz en cajas petri con 15 ml PEG (polietilenglicol) 6000 en solución al 20% (w/v) con 750 ppm de captán para la inhibición de hongos. De cada genotipo se realizaron 6 réplicas. Las cajas con semilla se incubaron a 25°C por 6 días.

Además se utilizaron 60 semillas de cada genotipo como **testigos**. Es decir, se incubaron en ausencia de PEG, con agua destilada y 750 ppm de captán en solución (w/v).

Al sexto día de incubación se cuantificaron las semillas que germinaron durante la incubación. Las semillas que presentaron la aparición de radícula de al menos 2 mm de longitud se consideraron germinadas. Los genotipos con menor cantidad de semillas germinadas se consideran más susceptibles al estrés hídrico con este sustrato y, por tanto, las semillas con mayor número de semillas germinadas se consideran tolerantes al estrés.

2.3.2 Prueba de resistencia a la contaminación con aflatoxinas

La prueba se basó en la inoculación de muestras de semillas de maíz de cada uno de los genotipos. El experimento obedece a un diseño completamente aleatorio para un factor de variación que corresponde al genotipo de maíz. El modelo es de tipo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ representa el promedio del contenido de aflatoxinas en 3 réplicas y α representa el efecto de la variación de genotipos sobre la media del porcentaje germinación resultante. ε corresponde al error aleatorio resultante. Este análisis se llevó a cabo en el programa SPSS ver 12.0.0 [Lead Technologies, USA 2003]. Se probó la hipótesis nula de que las medias del contenido de aflatoxinas por genotipo son iguales ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$), contra la hipótesis alterna de que el contenido es diferente, es decir, que hay diferencias fenotípicas en la respuesta a la contaminación con aflatoxinas entre los genotipos, lo cual se ve influenciado por la diversidad genética de la muestra.

2.3.2.1 Cultivo del hongo *A. flavus* y obtención de inóculo.

Se utilizaron esporas de *A. flavus* cepa #25. Dicha cepa reporta una alta producción de aflatoxinas (Moreno J 2004). Las esporas fueron resembradas en placas de agar CZAPEK e incubadas a 28°C por aprox. 4 días. La cepa de *A. flavus* se dispersó utilizando agua con Tween-80 al 1%, aplicada directamente al hongo en la caja petri, raspando el hongo con un bisturí de modo que se obtuvo una solución con las esporas e hifas del hongo. La solución se filtró para recuperar una emulsión de esporas y desechar las hifas del hongo. Posteriormente se realizó un conteo de esporas en hematócmetro utilizando un Microscopio Óptico. De acuerdo al conteo, se diluyó la solución obtenida hasta alcanzar una concentración en el inóculo de 50 000 esporas/ml.

2.3.2.2 Determinación del contenido de humedad de las semillas.

Para controlar la homogeneidad con la que el hongo infectaría a los granos de maíz, se ajustó la humedad de cada muestra al 18.5%. Para ello se midió la humedad inicial del maíz mediante el método de estufa, esto es, se colocaron y pesaron 5 semillas de maíz en cajas de aluminio completamente libres de humedad y previamente pesadas y se mantuvieron en estufa a 110°C por 72 horas. Se utilizaron 3 réplicas del experimento. Al finalizar la prueba, se volvieron a pesar las cajas y se calculó el promedio del porcentaje de humedad por diferencia de peso como sigue:

$$\%H = \frac{A}{W_i} \times 100$$

Donde:

%H= Contenido de Humedad de las semillas

A= Pérdida de humedad (diferencia entre peso inicial y peso final)

Wi: Peso inicial de la muestra

2.3.2.3 Ajuste de humedad de las semillas e inoculación de las semillas.

Debido que había algunas variaciones en el contenido de humedad entre genotipos, se calculó la cantidad de agua a adicionar para cada genotipo de maíz para que éste alcanzara el 18.5% de humedad. El cálculo se hizo como sigue:

$$A = \left[\left(\frac{100 - \%H_d}{100 - \%H} \right) - 1 \right] \times W$$

Donde

A= Cantidad de agua a agregar

H_d= Contenido de humedad determinado

H= Humedad deseada (18.5%)

W= Peso de la muestra

El tamaño de muestra por cada genotipo fue de 50 g (por triplicado) y la cantidad de esporas agregada por muestra fue de 250,000, es decir, 5 ml del inóculo preparado. Las semillas inoculadas con la solución de esporas de *A. flavus* se agitaron perfectamente, hasta que no se detectaran indicios de líquido dentro del frasco, lo que indica que los granos de maíz absorbieron la humedad disponible. Los frascos se taparon con bolsas de polietileno. Los frascos con semilla e inóculo fueron incubados por 15 días a 28 °C y al 100% de humedad relativa.

2.3.2.4 Cuantificación de la producción de aflatoxinas

Para la cuantificación de la producción de aflatoxinas se utilizó el método *Aflatest* de VICAM [NOM-188-SSA1-2002], basado en la técnica de cromatografía líquida (HPLC) [Papp 2002, Pearson 1999, Sharma 2001].

Tras la incubación, los frascos fueron esterilizados (20lb/in², 20 min) y sometidos a secado en estufa a 50°C por 24 horas. Se extrajeron las aflatoxinas en tres réplicas por genotipo (50 g), para lo cual se molieron muestras de 50 gramos de semillas de maíz con 5 g de NaCl en licuadora hermética. Las porciones de toxina en la semilla se extrajeron al licuar el material molido con metanol al 80%. La mezcla se filtró a través de papel filtro Whatman No.1 y 10 ml del filtrado fueron diluidos con 40 ml de agua destilada. La preparación se filtró a través de papel de micro fibra, de los cuales 10 ml fueron agregados a la columna de inmunoafinidad específicas para aflatoxinas. Las columnas fueron lavadas con 20 ml de agua destilada en dos pasos. Se diluyeron las toxinas extraídas con 1 ml de metanol. Las toxinas fueron cuantificadas en un fluorómetro después de agregarles 1 ml de bromuro al 0.002%.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza en el que se determinaron las diferencias producidas por genotipo. De acuerdo con Williams, 2003, las medias calculadas se transformaron a porcentajes de contaminación para adecuar los datos a un comparativo con materiales control previamente publicados. El ajuste se aplicó como sigue:

$$\%A = \frac{a}{a_{\max}} \times 100$$

Donde:

%A= Porcentaje de contaminación con aflatoxinas
a= Promedio de la concentración de aflatoxinas
a_{max}= Valor máximo de contenido de aflatoxinas

2.3.2.5 Clasificación de resistencia y susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas.

La clasificación en base a la resistencia y a la susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas de los materiales se basó en los resultados de la prueba practicada como se describe en la metodología, utilizando como referencia de resistencia y/o susceptibilidad a 2 líneas de maíz de las cuales ya se ha reportado su comportamiento antes este tipo de estrés. La primera, la línea Mp339, ha exhibido altos niveles de aflatoxinas, por el contrario, la línea Mp313E es reconocida por su resistencia a dicha contaminación [Williams, 2003]. Williams reporta la utilización de dichas líneas como control en la evaluación de la resistencia a la contaminación con aflatoxinas de un grupo de 21 genotipos de maíz. En dicha publicación se corrobora la eficacia de la utilización de dichas líneas como controles del nivel de aflatoxinas producido. Los resultados obtenidos por Williams se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 4. RESULTADOS DE CONTENIDO DE AFLATOXINAS EN DIVERSOS GENOTIPOS DE MAÍZ SEGÚN WILLIAMS 2003.

Genotipo	Media del contenido de Aflatoxinas (ng/g)	%A
Mp715	14a	0.8
Mp494	83b	4.7
Mp92:673	97b	5.5
Mp313E*	100bc	5.7
Mp420	180b-d	10.2
Mp97:161	182b-d	10.3
Mp95:513	226c-e	12.8
Mp97:160	231d-e	13.1
Mp95:512	251d-e	14.3
Mp97:155	262d-f	14.9
Mp716	290d-g	16.5
(Mp305xT202)	463e-h	26.3
Mp95:519	573f-h	32.6
SC229	621gh	35.3
Ab24E	757hi	43.0
(Mp305xT202)-1-6-2-1-1-B	819h-j	46.5
GT-MAS:gk-5-3-1-1-1-B	826h-j	46.9
(Mp305xT202)-2-9-2-1-1-B	830h-j	47.2
Mp95:535	864h-j	49.1

Tex6	1560ij	88.6
Va35	106ij	91.3
Mp339**	1665ij	94.6
Mp714	1760j	100.0

*Control Resistente

**Control Susceptible

Los resultados se convirtieron a porcentaje de contaminación con aflatoxinas (%A), considerando como genotipos resistentes a los genotipos que no difieren significativamente del control resistente. Se realizó de igual manera para la clasificación de los genotipos susceptibles.

Los datos reportados en porcentaje de contaminación con aflatoxinas en dicho trabajo se utilizaron como referencia para la clasificación de nuestros materiales.

2.3.3 Correlación entre la resistencia al estrés hídrico durante la germinación, y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas.

El nivel de asociación de ambos factores representa una de las hipótesis que sustentan el presente proyecto. Para ello se realizó un análisis de regresión [SPSS ver 12.0.0 Lead Technologies, USA 2003], con el que se calcularon el coeficiente de correlación R y el coeficiente de determinación R² entre ambas variables, así como el nivel de significancia arrojado por un análisis de varianza de los datos, lo que indica la validez de los coeficientes calculados. Se relacionaron los resultados de ambas pruebas para cada genotipo, utilizando 41 parejas de datos.

2.4 DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS CON LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A ESTRÉS OSMÓTICO DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ Y LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS.

2.4.1 Búsqueda bioinformática y selección de genes y marcadores moleculares involucrados en la resistencia al estrés hídrico.

La búsqueda bioinformática de genes y marcadores moleculares implicó la búsqueda de reportes sobre la acción e importancia de genes que se han relacionado con la respuesta y resistencia a la sequía sin discriminar la especie vegetal en la que fueron estudiados. Tales genes y marcadores, como se menciona, han sido estudiados y su secuencia ha sido reportada en el banco de genes [GenBank].

Los genes buscados corresponden a secuencias de ADN que codifican una proteína o enzima específica y su rol en los mecanismos de resistencia a la sequía es conocido. Por otro lado, la búsqueda de marcadores moleculares se realizó a partir de secuencias asociadas a rasgos específicos de la planta que le confieren resistencia, sin embargo, no se conoce qué genes participan en la secuencia. Los marcadores moleculares incluyen microsatélites y sondas de RFLP diseñados por los autores de los reportes consultados, que permitieron asociar la secuencia con el rasgo esperado.

Las secuencias disponibles de marcadores moleculares y genes fueron obtenidas en Abril de 2006 del GenBank disponible en la página: <http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Las secuencias fueron almacenadas.

La selección de genes y marcadores moleculares implicó en primera instancia, la cercanía filogenética, así pues, sólo se consideraron genes y marcadores moleculares de plantas monocotiledóneas, como el maíz. Los genes y marcadores moleculares reportados para maíz se consideraron sobre los de especies ajenas. En segunda instancia, se seleccionaron secuencias con información y estrategias reportadas.

2.4.2 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el software Primer Select ver. 5.03 [DNASTAR Inc 1993-2003], utilizando las accesiones como fueron publicadas en el GenBank. Los criterios de diseño fueron los siguientes:

Tamaño de la molécula cebadora: 22 a 30 nt

T_m: 35 a 65°C

Contenido de G y C en la molécula: 40 a 60%

Número máximo de nucleótidos alineados cuando el oligonucleótido forma orquilla (*hairpin*): 4 consecutivos.

Número máximo de nucleótidos alineados cuando el oligonucleótido forma dímeros de tipo *self-* o *hetero-dimer*: 4 consecutivos.

Las dos últimas características enlistadas fueron revisadas en línea con el software Oligo Analyzer de idtDNA. [www.idtDNA.com]

Las 56 parejas de oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies, Inc. E.U.A.

2.4.3 Producción de tejido vegetal de las unidades experimentales

Previo a la extracción del ADN fue necesaria la obtención de tejido vegetal de cada genotipo, para lo cual se sembraron 10 semillas de cada uno en charolas de unicel con pozos de aproximadamente 2 cm² para cada semilla. Las semillas se regaron por 10 días y se obtuvieron plantas con tejido suficiente. A cada individuo se le cortaron las hojas obteniendo tejido vegetal de 1-2 cm², de modo que se obtuvo una única muestra de tejido vegetal por genotipo que incluía el tejido de los 10 individuos sembrados. Las hojas obtenidas fueron envueltas en papel aluminio y conservadas a -70°C.

2.4.4 Extracción del ADN genómico de las unidades experimentales

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método que utiliza sarcosina publicado por Lopes, MA (1995). El cual consiste en cinco etapas principales.

2.4.4.1 Molienda y disgregación del tejido

Esta etapa consiste en moler el tejido en mortero con nitrógeno líquido. Para ello se utilizaron morteros estériles, congelados a -70°C, colocados en bases de unicel para evitar su descongelación. Los pistilos y las muestras se mantuvieron en las mismas condiciones utilizando nitrógeno líquido en todo momento. El tejido vegetal se agregó al mortero y se molió agregando nitrógeno líquido en 3 etapas de la molienda, de modo que el tejido jamás se descongela y es posible la molienda hasta la obtención de un polvo fino que se recolecta en 3 viales distintos previamente congelados. Inmediatamente se agregan 200 µl solución de sarcosina cuya función es la lisis celular del tejido ya roto por la fuerza de cizalla y los cristales de hielo. Se deja reposar por aproximadamente 1 hora.

2.4.4.2 Extracción de carbohidratos y proteínas

Para la segunda etapa se agregan 600 µl de fenol por vial, en dos etapas. Esto es, se agrega el fenol, se agita el vial en vortex hasta obtener una solución lechosa y se centrifuga a 14 000 rpm durante 20 minutos. Se recupera el sobrenadante en un vial nuevo y se repite la operación.

2.4.4.3 Degradación de ARN

La tercera etapa implica la degradación de ARN presente en la solución, por lo que se agregan 2 µl de RNAsa [12 ng/µl] a los viales con el ADN libre de fenol, y se incuba por 12 horas a 37°C.

2.4.4.4 Precipitación y lavado de ADN

Finalmente se agregaron 600 μl de alcohol isoamílico-cloroformo y se dejó reposar por 20 minutos a -20°C logrando la precipitación del ADN en el vial. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 a 3 minutos y se decantó recuperando la pastilla de ADN ubicada en el fondo de cada vial. Posteriormente se adicionó etanol absoluto y se agitó la pastilla formada. Se repitió la centrifugación a las mismas condiciones y volvió a decantarse el ADN. La última centrifugación se realizó adicionando etanol al 70% siguiendo los mismos pasos y condiciones que las anteriores.

Finalmente, el ADN adherido al tubo se dejó secar invirtiendo el tubo a temperatura ambiente o 37°C . Una vez que se secó la pastilla de ADN formada, es decir, que ya no contenía restos de etanol, se adicionaron 500 μl de buffer TE (Tris-EDTA) $\text{pH}=8.0$ y se mezcló perfectamente.

2.4.5 Cuantificación de ADN y estandarización de concentraciones

Para calcular la concentración de ADN en los viales se preparó un gel de agarosa ultrapura [Invitrogen Life Technologies Inc, EUA] al 1% en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, donde se cargaron las muestras utilizando 2 μl de cada una con 5 μl de buffer de carga. Al inicio y final de cada línea de pozillos se colocaron 4 μl de DNA de lambda sin cortar en concentración de 25 ng/ml, esto es, se cargaron 100 ng de DNA de lambda sin cortar en cada extremo. La banda resultante sirve como referencia para el cálculo de la concentración obtenida en los pozos con muestra.

El revelado del gel se realizó mediante la tinción con BrEt por aproximadamente 15 minutos y se fotografió con luz UV en transiluminador Chemidoc XRS [Biorad]. El software de precisión y almacenamiento de imágenes fue Quantity One ver. 4.5.0. La imagen obtenida fue analizada con el software Kodak Digital Science para la cuantificación digital utilizando parámetros como el tamaño de la banda y la intensidad de color que presenta. Ambas características son contrastadas con aquellas mostradas por el lambda de concentración conocida. Las concentraciones de ADN fueron estandarizadas a una concentración final de 10 ng/ μL .

2.4.6 Establecimiento experimental de Temperaturas de fusión de los oligonucleótidos diseñados

La evaluación aquí planteada se realizó con el fin de conocer la temperatura óptima en la que el primer se alinea con el ADN, para lo cual se ensayaron doce temperaturas distintas. La prueba se realizó utilizando dos genotipos de maíz: INIFAP-ZM-012 y

INIFAP-ZM-019 que, de acuerdo a los resultados, se encuentran en los extremos de resistencia y susceptibilidad a estrés hídrico inducido por PEG, respectivamente.

El gradiente de temperatura se llevó a cabo en termociclador, en el que se programó la temperatura de fusión calculada de cada primer $\pm 4.5^{\circ}\text{C}$. En total se probaron doce temperaturas diferentes.

La reacción fue preparada en 25 μl de volumen total usando 1 unidad de enzima Taq Polimerasa Recombinante [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil] con 30 ng de ADN total. Se utilizó el buffer a 1X [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil], 2 mM de MgCl_2 [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil], 0.2 mM de una mezcla de los cuatro dNTPS [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil]. Los oligonucleótidos [Invitrogen Life Technologies Inc, EUA] se adicionaron en concentración de 0.2 μM .

Los gradientes de temperatura realizados fueron revisados mediante electroforesis horizontal [Horizon 11-14, Bethesda Research Laboratorios, Life Technologies Inc.] en agarosa ultrapura [Invitrogen Life Technologies Inc, EUA] al 1% con tinción en solución de Bromuro de Etidio [Sigma-Aldrich, Alemania] a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las fotografías se tomaron utilizando la cámara DC40 [Kodak Digital Science] utilizando iluminación UV con transiluminador [UVP].

2.4.7. Amplificación de fragmentos de ADN asociados a los genes o marcadores moleculares seleccionados, utilizando PCR

Utilizando las temperaturas óptimas obtenidas del gradiente de temperatura para cada oligonucleótido, se prepararon reacciones de PCR utilizando el ADN extraído de cada uno de los genotipos utilizados en las pruebas de resistencia o susceptibilidad a los estreses. Las reacciones se prepararon en 25 μl de volumen total usando 1 unidad de enzima Taq Polimerasa Recombinante [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil] con 30 ng de ADN total. Se utilizó el buffer de la enzima a 1X [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil], 0.2 mM de una mezcla de los cuatro dNTPS [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil], oligonucleótidos [Invitrogen Life Technologies Inc, EUA] a 0.2 μM y 2 mM de MgCl_2 [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil] y en algunos casos de utilizó 5 mM de MgCl_2 .

2.4.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida

El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 8.5% en solución de urea 8 M. Se ocupó TBE 1X como solución en la cámara [Maxi Vertical, Clever Scientific Ltd. Reino Unido.]. Se empleó como marcador de referencia

100 ng de 1Kb [Invitrogen Life Technologies Inc, Brasil]. El tiempo de corrida fue de 4 horas con corriente constante de 230 volts. Los geles se tiñeron con inmersión en solución de Sybr Green 1X [Invitrogen Life Technologies Inc, EUA] por 40 minutos y se fotografiaron utilizando iluminación UV con transiluminador [UVP].

2.4.9 Obtención de matrices numéricas a partir de valores gráficos de amplicones

El análisis de los geles de poliacrilamida arrojó tres resultados de interés en la búsqueda de polimorfismos asociados con la respuesta a la sequía y/o a la invasión de las aflatoxinas en los genotipos. Cada oligonucleótido puede generar en el gel uno o más amplicones al hibridarse con el DNA de las muestras. Para poder cuantificar y analizar los amplicones generados, se tomaron en cuenta sólo los amplicones polimórficos, esto es, que el tamaño en pb de cada uno variaba de genotipo a genotipo; para ello, la información del gel, registrada en bandas de diversos tamaños se convirtió a información numérica en matrices de datos donde se asignó el valor “1” a la presencia de banda y “0” a la ausencia.

2.4.10 Determinación del % de frecuencia de amplicones

La frecuencia de aparición de un amplicón se calcula a partir de la anotación de la presencia o ausencia de éste entre los patrones de bandas de los genotipos. Cuando el % de frecuencia de un amplicón está entre el 40 y el 60%, representa un interés potencial para su utilización como marcador molecular. El porcentaje de frecuencia se calculó como sigue:

$$\%F = \frac{a}{n} \times 100$$

Donde:

%F= Porcentaje de frecuencia del amplicón

a= total de bandas presentes entre materiales para un mismo amplicón

n= total de materiales evaluados

2.4.11 Correlación entre polimorfismo genético y fenotipo

Se buscó la relación de dichas bandas polimórficas con los valores de las pruebas fenotípicas realizadas antes y a partir de las cuales se clasificaron a los genotipos (tolerancia al estrés hídrico y a la invasión de aflatoxinas) por medio de un análisis

estadístico de correlación (R^2), que se realizó utilizando el software Microsoft Office Excel 2003. Para el análisis sólo se utilizaron parejas de datos dados entre la presencia/ausencia del amplicón y el valor de resistencia/susceptibilidad de la prueba fenotípica. No se utilizaron los datos de resistencia intermedia. Los espacios muestrales fueron de 20 pares de datos en cada prueba de correlación.

Capítulo 3. Resultados

3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES EN BASE A SU RESISTENCIA AL ESTRÉS OSMÓTICO DURANTE LA GERMINACIÓN.

3.1.1 Descripción de los datos obtenidos

El experimento control se llevó a cabo al mismo tiempo que la germinación de muestras de maíz bajo condiciones de estrés osmótico. Los datos hasta aquí presentados son utilizados para la corrección del dato de la germinación total obtenida en las muestras estresadas, es decir, si un genotipo específico sólo logró germinar el 90% de las semillas en condiciones normales, ese 90% se utilizó como 100% de germinación para las semillas estresadas.

Los resultados de evaluación a la resistencia ante el estrés osmótico en la germinación están dados en proporción de semillas germinadas. Es decir, el 100 % de germinación indica que germinó el número máximo de semillas posibles (esto de acuerdo al experimento control para cada genotipo).

De acuerdo con la figura 7 (página 33), los genotipos INIFAP-ZM-173 (maíz QPM), INIFAP-ZM-034, INIFAP-ZM-034 (mejorados en sequía), y INIFAP-ZM-026, INIFAP-ZM-024, INIFAP-ZM-021, INIFAP-ZM-020, INIFAP-ZM-034, INIFAP-ZM-011, INIFAP-ZM-008 y INIFAP-ZM-005 (del banco de germoplasma de INIFAP) presentan una germinación total menor a la que se esperaba (<90%), en condiciones normales. El genotipo INIFAP-ZM-034 presentó una germinación menor al 80% (figura 7).

El experimento realizado nos ha permitido clasificar a los diferentes genotipos en resistentes, intermedios y susceptibles al estrés osmótico durante la germinación de la semilla. Así pues, se utilizaron los siguientes parámetros de clasificación:

>75% de germinación: GENOTIPO RESISTENTE

40% < % germinación < 75%: GENOTIPO DE COMPORTAMIENTO INTERMEDIO

< 40 % de germinación: GENOTIPO SUSCEPTIBLE.

Los parámetros de clasificación fueron seleccionados de acuerdo con Moreno 1988.

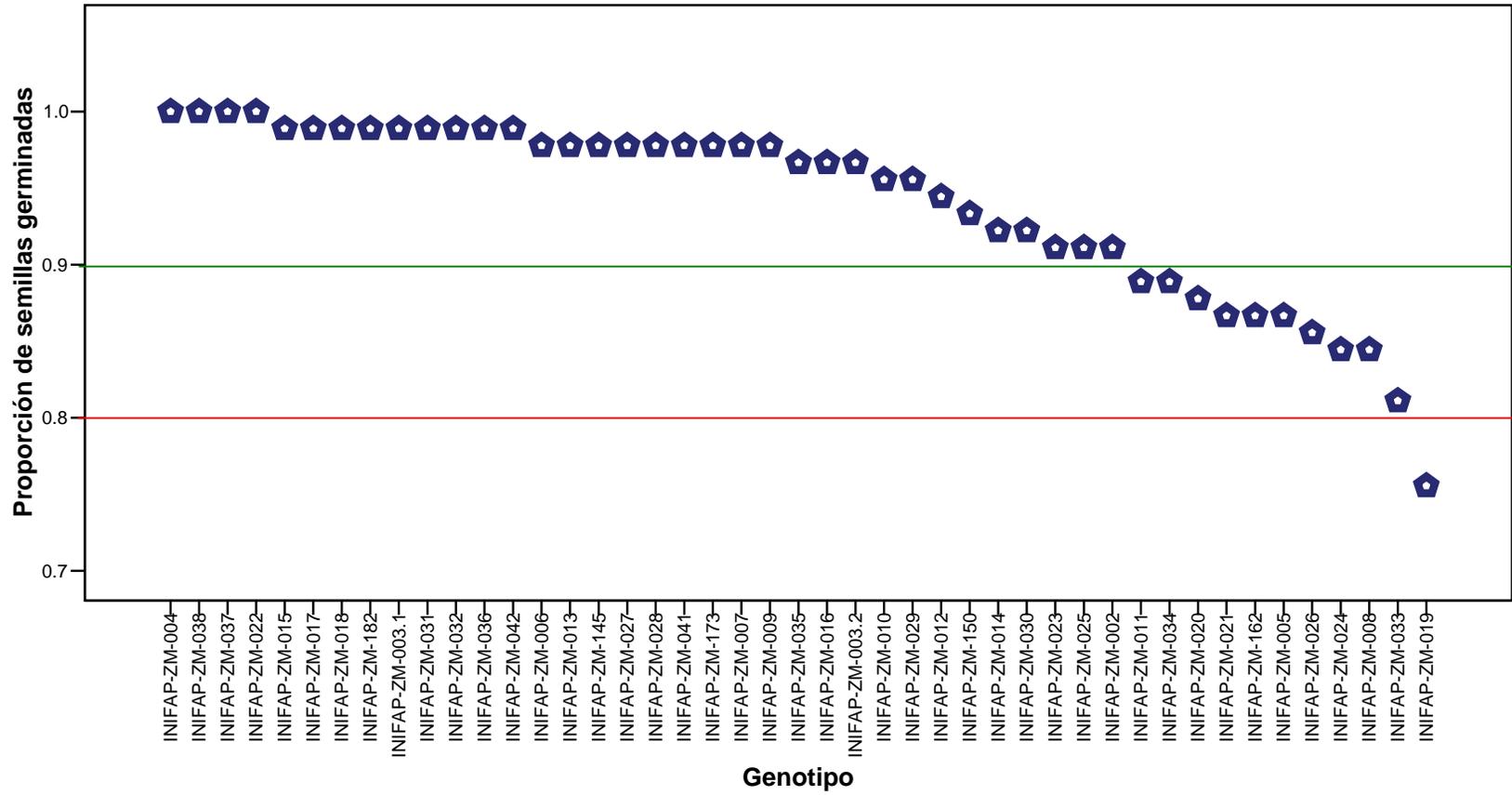


Figura 7. Proporción de semillas germinadas por genotipo en condiciones normales.

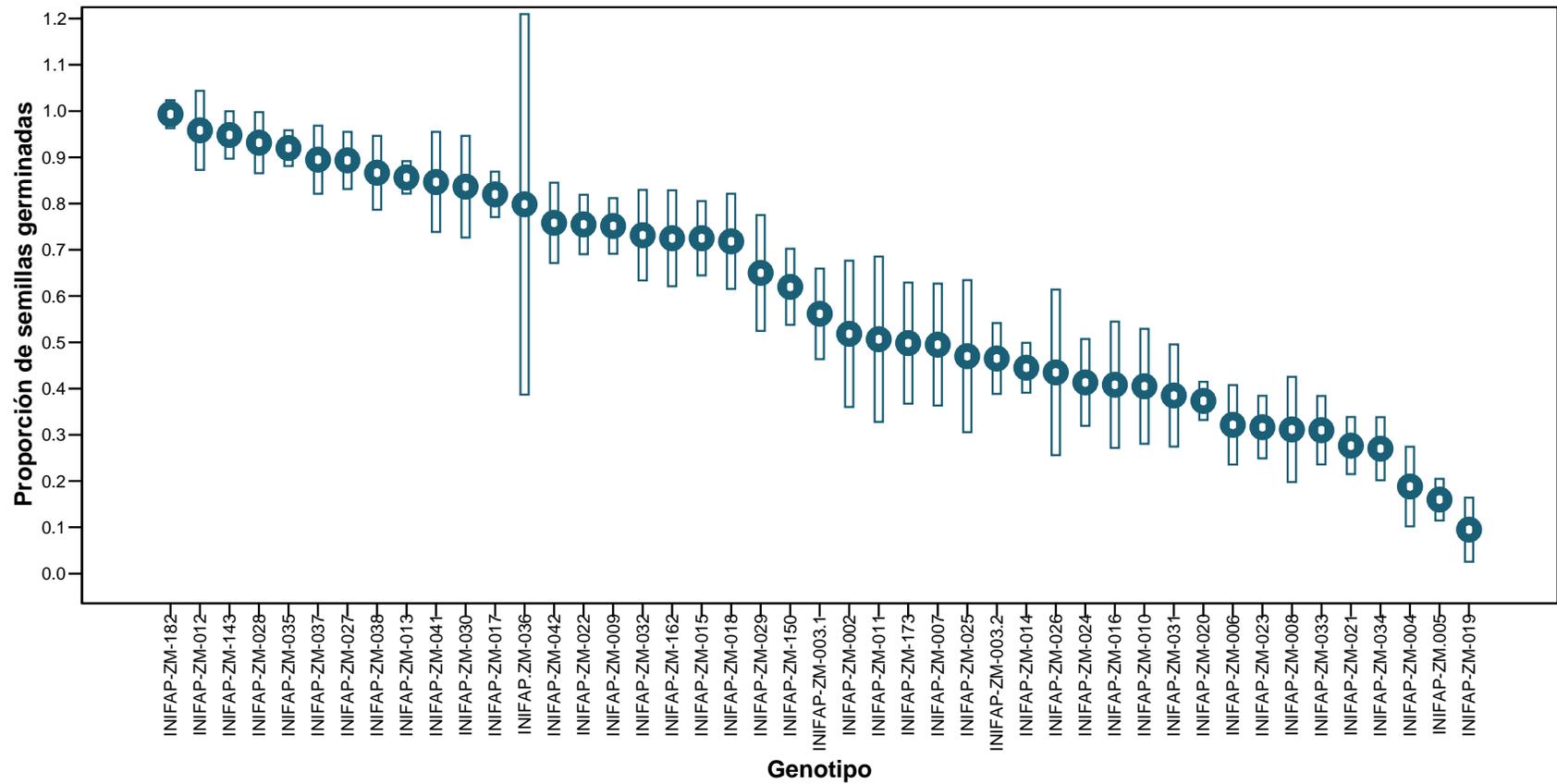


Figura 8. Proporción de semillas germinadas bajo condiciones de estrés osmótico inducido por Polietilenglicol.

TABLA 5. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TUKEY PARA EL ESTRÉS INDUCIDO POR PEG ($\alpha=0.05$).

Genotipo	Media de la proporción de semillas germinadas \pm SD	Subconjuntos homogéneos $\alpha>0.05$
INIFAP-ZM-019	0.095 \pm 0.065	a
INIFAP-ZM-005	0.16 \pm 0.042	ab
INIFAP-ZM-004	0.188 \pm 0.082	a-c
INIFAP-ZM-034	0.27 \pm 0.065	a-d
INIFAP-ZM-021	0.276 \pm 0.058	a-d
INIFAP-ZM-033	0.31 \pm 0.07	b-e
INIFAP-ZM-008	0.311 \pm 0.108	b-e
INIFAP-ZM-023	0.316 \pm 0.064	b-e
INIFAP-ZM-006	0.321 \pm 0.081	b-e
INIFAP-ZM-020	0.373 \pm 0.039	c-f
INIFAP-ZM-031	0.385 \pm 0.105	c-f
INIFAP-ZM-010	0.405 \pm 0.118	d-f
INIFAP-ZM-016	0.408 \pm 0.13	d-g
INIFAP-ZM-024	0.413 \pm 0.089	d-g
INIFAP-ZM-026	0.435 \pm 0.17	d-g
INIFAP-ZM-014	0.445 \pm 0.051	d-h
INIFAP-ZM-003.2	0.465 \pm 0.072	d-h
INIFAP-ZM-025	0.47 \pm 0.156	d-h
INIFAP-ZM-007	0.495 \pm 0.125	e-h
INIFAP-ZM-173	0.498 \pm 0.124	e-h
INIFAP-ZM-011	0.506 \pm 0.17	e-i
INIFAP-ZM-002	0.518 \pm 0.15	e-j
INIFAP-ZM-003.1	0.561	f-k
INIFAP-ZM-150	0.62 \pm 0.078	g-l
INIFAP-ZM-029	0.65 \pm 0.119	h-m
INIFAP-ZM-018	0.718 \pm 0.098	i-n
INIFAP-ZM-162	0.725 \pm 0.098	j-o
INIFAP-ZM-015	0.725 \pm 0.076	j-o
INIFAP-ZM-032	0.731 \pm 0.093	k-o
INIFAP-ZM-009	0.751 \pm 0.057	k-p
INIFAP-ZM-022	0.755 \pm 0.061	k-p
INIFAP-ZM-042	0.758 \pm 0.082	k-p
INIFAP-ZM-017	0.82 \pm 0.046	l-q
INIFAP-ZM-030	0.836 \pm 0.104	m-q
INIFAP-ZM-041	0.846 \pm 0.103	m-q
INIFAP-ZM-013	0.856 \pm 0.033	m-q
INIFAP-ZM-038	0.866 \pm 0.076	n-q
INIFAP-ZM-027	0.893 \pm 0.058	n-q
INIFAP-ZM-037	0.895 \pm 0.07	n-q
INIFAP-ZM-035	0.92 \pm 0.036	n-q
INIFAP-ZM-028	0.931 \pm 0.063	o-q
INIFAP-ZM-143	0.948 \pm 0.048	pq
INIFAP-ZM-036	0.958 \pm 0.39	pq
INIFAP-ZM-012	0.958 \pm 0.081	pq
INIFAP-ZM-182	0.993 \pm 0.028	q

El gráfico de la proporción de semillas germinadas en PEG por genotipo (figura 8, página 38), presenta la media de los resultados correspondientes a las 6 réplicas

realizadas para las pruebas de germinación bajo condiciones de estrés osmótico inducido por polietilenglicol. Las barras representan un intervalo de confianza del 95% de los datos obtenidos.

El resultado del análisis de varianza de los datos indica que el nivel de significación debido a la variación de maíz es mucho menor a 0.05, lo que implica que las medias de las proporciones de semillas sin germinar arrojadas por cada genotipo son diferentes y, además, que la diferencia en su comportamiento ante el estrés hídrico es significativa entre genotipos de maíz.

En la tabla 5 (página 39) se muestra la media de los resultados y los subconjuntos obtenidos tras la aplicación de la prueba de Tukey, que agrupa a los genotipos de maíz en subconjuntos homogéneos de acuerdo a su comportamiento ante el estrés osmótico.

Los genotipos que pertenecen al subconjunto **q** son los que reportan la mayor resistencia a la germinación bajo condiciones estresantes. El subconjunto **p** y **q** están formados por aquellos genotipos que lograron germinar al menos el 75% de las semillas bajo estrés. En el subconjunto **a**, **b** y **c** por el contrario, están agrupados los genotipos con la mayor susceptibilidad, esto es, la media estadística de la proporción de semillas germinadas bajo estrés osmótico menor a 40%.

3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES EN BASE A SU RESISTENCIA A LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS.

3.2.1 Descripción de los datos obtenidos

Los genotipos cuya humedad fue ajustada y fueron inoculados con esporas de *A. flavus* fueron sometidos a una cuantificación de aflatoxinas con el fin de observar si hay una relación entre la característica de resistencia al estrés osmótico y la infección por el hongo y su consecuente producción de toxina.

Los resultados de la cuantificación se muestran a continuación en la tabla 6 (página 41), donde se muestran las medias y la desviación estándar debida a las 3 réplicas del experimento realizadas.

En la tabla 6 se señalan los datos más cercanos a los niveles reportados por los controles de resistencia y susceptibilidad reportados por Williams 2003. Tomando en cuenta tales datos y los subconjuntos reportados en la segunda columna se realizó la clasificación de resistencia y susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas.

TABLA 6. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR LOS GENOTIPOS.

Genotipo	Contenido de aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) Media \pm SD	Contenido de Aflatoxinas (%)
INIFAP-ZM-033	23.33 \pm 5.03 a	2.21
INIFAP-ZM-015	34.71 \pm 30.99 a	3.29
INIFAP-ZM-042	66.00 \pm 71.07 ab	6.27
INIFAP-ZM-150	70.66 \pm 37.43 a-c	6.71
INIFAP-ZM-009	78.86 \pm 99.82 a-d	7.49
INIFAP-ZM-016	80.66 \pm 68.12 a-d	7.66
INIFAP-ZM-025	96.00 \pm 53.33 a-f	9.12
INIFAP-ZM-017	122.00 \pm 103.01 a-f	11.58
INIFAP-ZM-011	126.66 \pm 110.15 a-f	12.03
INIFAP-ZM-010	129.40 \pm 138.94 a-f	12.29
INIFAP-ZM-012	132.66 \pm 95.29 a-f	12.6
INIFAP-ZM-019	148.66 \pm 113.84 a-f	14.12
INIFAP-ZM-041	188.66 \pm 149.48 a-g	17.91
INIFAP-ZM-022	253.33 \pm 248.46 a-h	24.06
INIFAP-ZM-034	273.33 \pm 46.18 a-h	25.95
INIFAP-ZM-037	326.66 \pm 184.75 a-i	31.02
INIFAP-ZM-013	332.66 \pm 509.00 a-i	31.59
INIFAP-ZM-005	333.33 \pm 241.93 a-i	31.65
INIFAP-ZM-008	366.66 \pm 144.68 a-i	34.82
INIFAP-ZM-002	396.66 \pm 176.16 a-j	37.67
INIFAP-ZM-020	406.66 \pm 61.10 a-j	38.62
INIFAP-ZM-162	466.66 \pm 220.3 a-k	44.31
INIFAP-ZM-004	473.33 \pm 55.07 a-k	44.95
INIFAP-ZM-036	486.66 \pm 376.47 a-k	46.21
INIFAP-ZM-003	503.33 \pm 72.34 a-k	47.8
INIFAP-ZM-021	520.00 \pm 140.00 a-k	49.38
INIFAP-ZM-006	606.66 \pm 305.5 a-k	57.61
INIFAP-ZM-028	626.66 \pm 50.33 a-k	59.51
INIFAP-ZM-023	626.66 \pm 167.72 a-k	59.51
INIFAP-ZM-029	660.00 \pm 298.66 a-k	62.68
INIFAP-ZM-145	666.66 \pm 371.66 a-k	63.31
INIFAP-ZM-018	700.00 \pm 190.78 b-k	66.47
INIFAP-ZM-173	713.33 \pm 179.25 c-k	67.74
INIFAP-ZM-007	720.00 \pm 156.2 d-k	68.37
INIFAP-ZM-026	740.00 \pm 419.05 e-k	70.27
INIFAP-ZM-032	746.66 \pm 161.65 f-k	70.90
INIFAP-ZM-024	820.00 \pm 280.00 g-k	77.87
INIFAP-ZM-030	826.66 \pm 23.09 g-k	78.50
INIFAP-ZM-027	860.00 \pm 111.35 h-k	81.67
INIFAP-ZM-038	926.66 \pm 92.37 i-k	88.0
INIFAP-ZM-014	687.33 \pm 597.62 jk	96.23
INIFAP-ZM-031	1020.00 \pm 111.35 jk	96.86
INIFAP-ZM-182	1053.33 \pm 231.8 k	100.0

Fue posible corroborar que existen diferencias fenotípicas entre los materiales en la respuesta al estrés biótico provocado por el hongo *A. flavus* de acuerdo con el

análisis de varianza. El nivel de significancia en la diferencia otorgada por el genotipo es de 1.7×10^{-15} . Fueron 11 los subconjuntos homogéneos arrojados por la prueba de Tukey, utilizando un α de 0.05, apuntados con las letras **a** a la **k**.

Como se puede apreciar, hay un grupo de genotipos cuyos resultados los agrupan en todos los subconjuntos, marcados como a-k. Dichos genotipos son considerados como genotipos de respuesta intermedia. Así, los grupos superior e inferior, entre los que se agrupan los datos más cercanos a los controles, son considerados como genotipos resistentes y susceptibles respectivamente.

La siguiente gráfica (figura 9) nos permite apreciar los resultados con mayor claridad, en la que se muestra la media de la cuantificación de aflatoxinas las 3 réplicas utilizadas. La barra representa el error estándar. A través de éste se puede apreciar la variación de los resultados dentro de un mismo genotipo, variación que aparece ser muy contrastante de genotipo a genotipo. Así, mientras para el genotipo INIFAP-ZM-033 es de tan sólo 5 ng/g, para el genotipo INIFAP-ZM-013 y 014 es de más de 500 ng/g (ver tabla 6 para comparar resultados). La barra de error tan amplia producida por el genotipo INIFAP-ZM-013 es debida a que una de las réplicas resultó

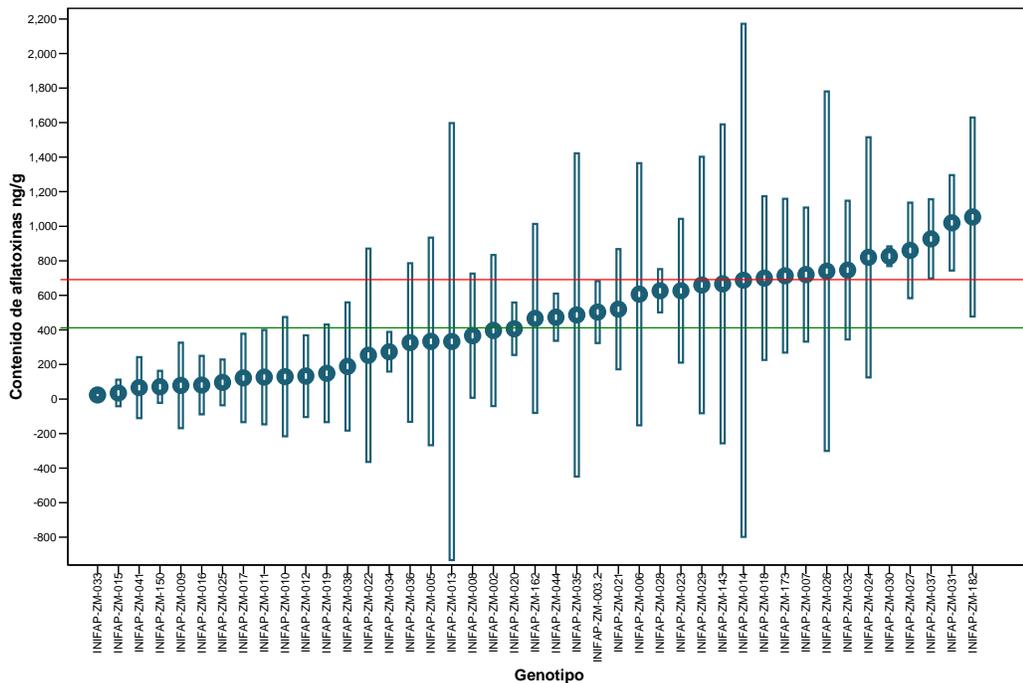


Figura 9. Contenido de aflatoxinas producidas por los genotipos

con más de 900 ng/g, mientras que las otras dos sólo produjeron alrededor de los 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Aunque el alto índice de aflatoxinas reportado por dicho genotipo puede

deberse a que el experimento se realizó con semillas dañadas en mayor grado que sus otras dos réplicas, esta gran diferencia no puede ser superada debido a que no es conveniente descartar el valor más alto por el peligro que esto representaría, esto es, catalogar a un genotipo susceptible como resistente sabiendo que una de las réplicas ha producido un alto índice de aflatoxinas.

3.3 RELACIÓN ENTRE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ANTE EL ESTRÉS HÍDRICO EN LA GERMINACIÓN Y LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS

Así bien, los genotipos INIFAP-ZM-006, INIFAP-ZM-023 e INIFAP-ZM-031 presentaron susceptibilidad a ambos estreses inducidos. Los genotipos INIFAP-ZM-009, 012, 017 y 041, presentaron la mayor resistencia ante la inducción del estrés reportando 1.0 como calificación general. Dichos genotipos han mostrado tener la capacidad de germinar al menos en un 75% en condiciones de estrés hídrico al tiempo que no han producido más de 400 ng/g de aflatoxinas tras la infección forzada del hongo *A. flavus*.

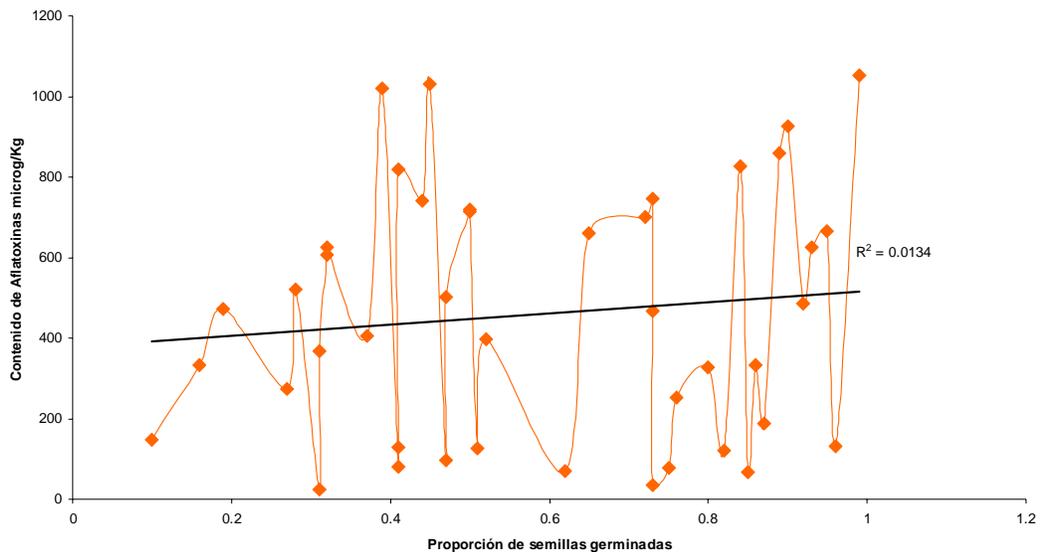


Figura 10. Relación entre la resistencia al estrés hídrico inducido por PEG y la producción de aflatoxinas por genotipo

La figura 10 presenta el gráfico de correlación de ambas variables evaluadas en condiciones de estrés. Para comprobar si la resistencia o susceptibilidad de los genotipos ante el estrés de tipo abiótico con el estrés biótico que representa el

aspecto de estudio primordial en el presente trabajo, se identifica el nivel de relación de ambas variables.

Los resultados del análisis estadístico de regresión indican un coeficiente correlación R de 11.56%, coeficiente de determinación² del 1.34% con nivel de probabilidad del 46% probado a un α del 5%.

La inducción de estrés hídrico utilizando polietilenglicol al 20% presenta una relación prácticamente nula con la producción de aflatoxinas. La relación entre ambas variables se presenta sólo en un 1.34% indicado por el coeficiente de determinación, no obstante dicha relación no es significativa.

Con un coeficiente de correlación tan bajo y con un índice de significancia alto no es posible aseverar la relación entre ambos estreses al menos con el tamaño de muestra utilizado y con los experimentos ensayados a los genotipos.

3.4 BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA Y SELECCIÓN DE GENES Y MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DE RESISTENCIA A SEQUÍA.

3.4.1 Búsqueda y selección de genes de resistencia a sequía

Se ha realizado una búsqueda de la mayoría de los genes que se encuentran reportados en la literatura relacionados con la respuesta y la resistencia a la sequía.

En total se encontraron 140 genes asociados a la respuesta a sequía. Tales genes pertenecen a diversas especies vegetales, principalmente *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays*, aunque también destacan *Nicotiana tabaccum* y *Lycopersicum esculentum*.

Los genes se han agrupado en 5 grupos principales:

- ✦ Grupo 1: genes que se expresan estableciendo una respuesta específica. (Ver apartado 1.2.2.2)
- ✦ Grupo 2: genes reguladores de la expresión génica relacionada con la resistencia (switches moleculares).
- ✦ Grupos 3 y 4: genes involucrados directamente con la señalización. Percepción de la señal que indica la existencia del estrés (grupo 3) y la transducción de la señal (grupo 4).

- ✍ Grupo 5: genes que se apagan durante el estrés, modificando el metabolismo celular con un objetivo específico en la resistencia.

En general se cuenta con 71 accesiones que corresponden a genes del grupo 1, es decir, que representan una respuesta específica al estrés. Esto incluye genes de transporte de lípidos (1), proteínas LEA (5), proteínas de protección a estructuras fotosintéticas (2), inhibidores de proteasas (8), enzimas antioxidantes (18), proteínas asociadas a canales de agua (2), biosíntesis de etileno y lípidos (6) y proteínas que permiten la acumulación de osmolitos (28). Así pues, se presentan 16 diferentes factores de transcripción, 9 proteínas involucradas en la percepción de la señal y 12 accesiones involucradas en la transducción de señales.

La lista de genes además incluye 6 genes candidatos propuestos por Wang (2005), es decir, que se supone su función en la respuesta a la deshidratación. Por otro lado, se incluyen 23 genes de los que se conoce que responden ante el estrés participando en la tolerancia, sin embargo no se sabe qué papel juegan.

Las accesiones seleccionadas se muestran en el anexo (tabla 10) para los cuales se diseñaron oligonucleótidos, son genes hallados y caracterizados en especies de plantas monocotiledóneas; 4 de ellos corresponden a genes de maíz, 1 de sorgo, 12 de arroz, 4 de cebada, 5 de trigo, 1 de soya y 1 de amaranto.

Las accesiones en la tabla 10 (anexo) se agruparon de acuerdo a su función, AM055633 [Massoneau 2005] corresponde a una proteína inhibidora de proteinasas encontrada en maíz, la cual pertenece a un grupo de 10 diferentes CC's (Corn Cystatins); el gen CA759417 [Wang 2005] corresponde a una proteína asociada a canales de agua, cuya función general es facilitar el transporte transmembranal de agua; accesiones D26448 [Ishitani 1995], CA754598 [Capell 1998], X57526 [Bartels 1991], X78205 [Straub 1994], CN845408 [Yang y McCormick 2004], AF023132 [Russell 1998] constituyen proteínas involucradas en el proceso de acumulación de osmolitos. Las accesiones M64267 [Rubio 2001] y M33119 [White 1988] codifican enzimas antioxidantes, mientras que AF117660 [Li y Chen 2000] y Z26867 [Van Breusegem 1994] presentan genes que codifican una proteína involucrada en la biosíntesis de etileno y, por último, la secuencia AY566607 [Jang y Seo] codifica para una proteína que transfiere lípidos. Todos los anteriores correspondientes al grupo 1 de genes.

Las secuencias en las accesiones CA762979 [Wang 2005], AY026332 [Lee 2001], AF300971 [Dubouzet 2003], X61121 [Didierjean 1992] codifican para factores de transcripción, el primero de tipo myb, y el segundo de tipo b-ZIP. X61121 es reportado como un factor que responde las proteínas de señalización CDPK's, aunque no se conoce a qué tipo de factor de transcripción corresponde.

Las accesiones BH246288 [Schloss 2002], CA764883, CA765415 [Wang 2005], AB042550 [Saijo 2000], AF519805 [Johnson 2002], Z26867 [Van Breusegem 1994], AP003406 locus B1070A12.14 [Choi 2002], AP003406 locus B1070A12.7, AP003406 locus B1070A12.2 [Xiong 2002] y AP003406 locus B1070A12.5 [Wang 2005], representan genes involucrados en las funciones de percepción y transducción de las señales celulares. Algunos de ellos corresponden a proteínas receptoras, mientras que otras son transmisoras de la señal, por tanto se engloban en los grupos 3 y 4 mencionados antes

Por último, las accesiones X78432 [Labhilili 1995] y X56547 [Dunn 1991] son genes cuya función aun no ha sido claramente elucidada, sin embargo se sabe que participan en la resistencia al estrés hídrico.

Los genes que fueron rechazados (cerca de 100 genes) pertenecen en su mayoría a especies de plantas dicotiledóneas, lo cual representa la primera razón por lo cual no se seleccionaron dado que son especies filogenéticamente alejadas. Entre las especies más estudiadas en este campo se localiza *A. thaliana* (20 genes), *C. plantagineum* (6 genes), *L. esculentum* (6 genes), *M. sativa* (7 genes), tabaco (11 genes), *O. sativa* (27 genes) y *Z. mayz* (24 genes). El resto de los genes corresponden a otras especies de plantas e incluso a la levadura *S. cerevisiae*, en las que se destacan no más de 4 genes por especie. Cabe resaltar la gran cantidad de genes correspondientes a las especies de arroz y maíz que, para el caso, instauran los principales genes elegibles en este proceso, sin embargo, muchos de ellos provienen de accesiones cuya información permanece sin publicar, o bien, el autor no manifiesta la relación del gen con la resistencia al estrés hídrico como se expone en el GenBank.

En resumen, se han seleccionado 28 genes involucrados en la resistencia a la sequía, todos ellos caracterizados a partir de plantas monocotiledóneas que participan en diferentes funciones en la resistencia, y para cada uno se ha registrado el rol que juegan dentro de la tolerancia al estrés hídrico y, por tanto, se ha diseñado una pareja de cebadores que amplifique el gen en forma representativa (máximo 1200 nt).

3.4.2 Búsqueda y selección de marcadores moleculares asociados a la resistencia a sequía.

La búsqueda de marcadores moleculares se realizó utilizando la base de datos de marcadores moleculares en gramíneas GRAMENE, disponible en Internet (www.gramene.org/).

En la búsqueda de marcadores moleculares se obtuvieron 31 marcadores previamente reportados. Todos ellos con el conocimiento previo de que corresponden a genes o QTLs ligados a la resistencia a la sequía. 22 de los marcadores

reportados están ligados a QTLs de dos rasgos principales, el primero es el ajuste osmótico que es una de las principales respuestas de las plantas para la tolerancia a la sequía, el segundo está vinculado con el sistema de raíces de la planta, de modo que se relacionan habilidades como el grosor de la raíz, el nivel de penetración de las raíces, la capacidad de la planta de crear raíces que no sean fácilmente arrancadas del suelo y en general la cantidad de raíces que la planta es capaz de producir bajo el estrés. Los otros 9 marcadores están ligados a un gen específico del que se conoce su papel dentro de la resistencia a la sequía.

Se encontraron dos marcadores de tipo SSR: RM263 [Zhang 2001; Chen 1997] y RM21 [Zhang 2001, Panaud 1996], con disponibilidad de oligonucleótidos. Se incluyeron 2 sondas de RFLP sin etiqueta, de las cuales no se reportan oligonucleótidos, aunque se tiene el número de accesión donde la secuencia está disponible. Estas son la RG109 [Zhang 2001; McCouch 1988] para sistema de raíces y RG214 [Zhang 2001, McCouch 1988] para balance osmótico. Del tipo RFLP que ya han sido etiquetadas se incluyeron 25 sondas. Los detalles se pueden apreciar en el anexo (tabla 11).

3.4.3 Diseño de Oligonucleótidos para amplificación de secuencias de ADN por PCR

Las accesiones seleccionadas fueron objetivo para el diseño de parejas de oligonucleótidos específicas a las cuales se les asignó un número tras el sufijo ZMS (Zea Mays Sequía).

Las secuencias de oligonucleótidos diseñadas para la amplificación de ADN se describen en la tabla 12 (anexo), así como las condiciones que se utilizaron para la amplificación por PCR y la accesión al que está asociada la pareja de oligonucleótidos.

De acuerdo con las características de los oligonucleótidos diseñados se calculó el gradiente de temperatura a ensayar para conocer la Tm óptima de cada una de las parejas. La Tm calculada (tabla 7 y tabla 12, anexo) fue obtenida por el software con el que se diseñaron los cebadores [Primer Select ver. 5.03, DNASTAR Inc 1993-2003] pues es uno de los criterios de diseño y selección de secuencias cebadoras. A su vez, la temperatura fue constatada con la reportada por el fabricante [Invitrogen, EUA] en los informes de síntesis de oligonucleótidos.

3.5 ESTABLECIMIENTO DE TEMPERATURAS DE FUSIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES.

Con esta actividad ha sido posible establecer la mayoría de las temperaturas de fusión de amplificación de los cebadores. Las temperaturas que no se reportan indican que tras varios ensayos, no se obtuvo hibridación de los oligonucleótidos contra el ADN diana por lo que no se obtuvieron bandas de amplificación en los geles de agarosa.

Las temperaturas de fusión ensayadas y obtenidas se muestran en la tabla 7.

TABLA 7. OLIGONUCLEÓTIDOS PROBADOS EN PCR CON GRADIENTE DE TEMPERATURA:

Pareja de Oligonucleótidos	Tm calculada	Gradiente ensayado	Tm seleccionada	Tamaño esperado de la banda
ZMS01	F: 59.8°C, R: 59.4°C	60°C ± 4.5°C	59.5	384 pb
ZMS02	F: 58.8°C, R: 58.6°C	60°C ± 4.5°C	59	365 pb
ZMS03	F y R: 59.5 °C	60°C ± 4.5°C	-----	398 pb
ZMS04	F y R 59.6 °C	60°C ± 4.5°C	60	765 pb
ZMS05	F: 64.9 °C, R: 65°C	65°C ± 6°C	65	311 pb
ZMS06	F: 59.6°C, R: 59.7°C	60°C ± 4.5°C	-----	780 pb
ZMS07	F: 58.6°C, R: 58.7°C	60°C ± 4.5°C	-----	931 pb
ZMS08	F: 59.4°C, R: 59.1°C	60°C ± 4.5°C	63	1020 pb
ZMS09	F y R: 62 °C	60°C ± 4.5°C	57.5	504 pb
ZMS10	F: 59.4°C, R: 59.6°C	60°C ± 4.5°C	-----	820 pb
ZMS11	F: 59.8°C, R: 60°C	60°C ± 4.5°C	58	1180 pb
ZMS12	F: 59.6°C, R: 59.5°C	60°C ± 4.5°C	62.5	528 pb
ZMS13	F: 59.6°C, R: 59.7°C	60°C ± 4.5°C	55.5	1180 pb
ZMS14	F: 59.8°C, R: 59.8°C	60°C ± 4.5°C	-----	394 pb
ZMS15	F: 59.8°C, R: 59.1°C	60°C ± 4.5°C	57	337 pb
ZMS16	F: 59.3°C, R: 59.2°C	60°C ± 4.5°C	57	1031 pb
ZMS17	F: 59.2°C, R: 59.3°C	60°C ± 4.5°C	----	503 pb
ZMS18	F: 59.6°C, R: 60°C	60°C ± 4.5°C	-----	1018 pb
ZMS19	F: 59.3°C, R: 59.3°C	60°C ± 4.5°C	-----	745 pb
ZMS20	F: 68.2°C, R: 66.8°C	67°C ± 8°C	-----	221 pb
ZMS21	F: 59.4°C, R: 59°C	60°C ± 4.5°C	56	651 pb
ZMS22	F: 59.9°C, R: 59.7°C	60°C ± 4.5°C	56.5	674 pb
ZMS23	F: 59.7°C, R: 59.6°C	60°C ± 4.5°C	-----	384 pb
ZMS24	F: 59.5°C, R: 59.6°C	60°C ± 4.5°C	-----	1033 pb
ZMS25	F: 59.5°C, R: 59.5°C	60°C ± 4.5°C	57.5	946 pb
ZMS26	F: 73.8°C, R: 72.5°C	73°C ± 8°C	68	693 pb
ZMS27	F: 59.3°C, R: 59.6°C	60°C ± 4.5°C	62.5	210 pb
ZMS28	F: 59.8°C, R: 59.7°C	60°C ± 4.5°C	64	422 pb
ZMS29	F: 59.3°C, R: 59.4°C	60°C ± 4.5°C	55.5	403 pb
ZMS30	F: 53.7°C, R: 50.3°C	52°C ± 4.5°C	47	no esp
ZMS31	F: 59.8°C, R: 60.5°C	60°C ± 4.5°C	57	no esp
ZMS32	F: 59.6°C, R: 56°C	60°C ± 4.5°C	60	no esp
ZMS33	F: 43.6°C, R: 33.3°C	37°C ± 8°C	47	66 pb

ZMS34	F: 67.2°C, R: 66.8°C	67°C ± 4.5°C	60	no esp
ZMS35	F: 59.1°C, R: 59.1°C	60°C ± 4.5°C	60	333 pb
ZMS36	F: 59.5°C, R: 59.4°C	60°C ± 4.5°C	60	260 pb
ZMS37	F: 59.4°C, R: 59.8°C	60°C ± 4.5°C	60	262 pb
ZMS38	F: 43.6°C, R: 33.3°C	37°C ± 8°C	37	no esp
ZMS39	F: 59.2°C, R: 58.9°C	60°C ± 4.5°C	60	387 pb
ZMS40	F: 59.8°C, R: 59.9°C	60°C ± 4.5°C	60	561 pb
ZMS41	F: 57.9°C, R: 57.5°C	60°C ± 4.5°C	-----	187 pb
ZMS42	F: 59.8°C, R: 60°C	60°C ± 4.5°C	-----	214 pb
ZMS43	F: 68.9°C, R: 71°C	70°C ± 8°C	70	120 pb
ZMS44	F: 59.8°C, R: 59.8°C	60°C ± 4.5°C	60	376 pb
ZMS45	F: 59.8°C, R: 59.9°C	60°C ± 4.5°C	60	304 pb
ZMS46	F: 59.2°C, R: 58.8°C	60°C ± 4.5°C	-----	408 pb
ZMS47	F: 56.5°C, R: 59.6°C	60°C ± 4.5°C	-----	232 pb
ZMS48	F: 59.9°C, R: 58.7°C	60°C ± 4.5°C	60	462 pb
ZMS49	F: 60°C, R: 59.8°C	60°C ± 4.5°C	-----	397 pb
ZMS50	F: 59.8°C, R: 59.7°C	60°C ± 4.5°C	60	229 pb
ZMS51	F: 51.7°C, R: 51°C	51°C ± 4.5°C	57	385 pb
ZMS52	F: 58.9°C, R: 59.2°C	60°C ± 4.5°C	-----	306 pb
ZMS53	F: 59.1°C, R: 59.2°C	60°C ± 4.5°C	-----	407 pb
ZMS54	F: 59°C, R: 59.6°C	60°C ± 4.5°C	60	202 pb
ZMS55	F: 59.2°C, R: 59.1°C	60°C ± 4.5°C	60	305 pb
ZMS56	F: 59.6°C, R: 59.5°C	60°C ± 4.5°C	60	189 pb

3.6 BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS DE INTERÉS

En las pruebas de PCR ensayadas con las muestras de ADN extraídas de los genotipos que conforman la muestra, se encontró que no todos los oligonucleótidos fueron capaces de generar amplicones de DNA, así mismo, no todos los amplicones reportados son polimórficos. Dado que son los amplicones polimórficos los que representan los datos de interés para la asociación genotípica con la respuesta reportada ante los estreses ensayados, los resultados presentados se enfocan únicamente a los oligonucleótidos que presentan amplicones de este tipo.

TABLA 8. RESUMEN DE RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN

Tipo de Oligonucleótido	Total de oligonucleótidos utilizados	Total de oligonucleótidos que presentaron amplicones	Total de oligonucleótidos que presentan amplicones polimórficos
Gen	29	9	2
Marcador tipo SSR	2	1	1
Marcador para sonda RFLP	25	13	6
Total	56	25	9

La tabla 8 muestra un resumen de los resultados obtenidos tras la amplificación con los oligonucleótidos diseñados.

Así pues, son 9 los oligonucleótidos que han producido bandas polimórficas entre genotipos. El resultado arrojado por dichos oligonucleótidos fue analizado en términos de frecuencia de aparición de cada amplicón, así como el coeficiente de determinación R^2 , que indica el nivel de relación entre la característica fenotípica y la aparición del amplicón, o característica genotípica.

Todos los amplicones fueron analizados para ambas características fenotípicas ensayadas en los genotipos: a) la resistencia/susceptibilidad al estrés hídrico ocasionado por sustratos de alta presión osmótica durante la germinación y b) la resistencia/susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas bajo la incidencia del hongo *A. flavus*.

La tabla 9 muestra el resumen de los resultados obtenidos con los oligonucleótidos de interés. La columna nombrada Probabilidad Amplicón vs. PEG, $\alpha=0.05$, muestra la posición de la relación encontrada entre las variables, dentro del nivel de significancia de la curva de probabilidad arrojada por el análisis de varianza, lo que permite explicar la validez de la relación obtenida. En la tabla se resaltan los resultados más significativos.

TABLA 9. RESULTADOS EN TÉRMINOS DE %FRECUENCIA Y R^2 EN RELACIÓN CON AMBAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS EVALUADAS.

Tipo de Oligonucleótido	Tamaño esperado (pb)	Amplicones generados (pb)	% F	R^2 . Amplicón vs. Aflatoxinas	R^2 . Amplicón vs. PEG	Probabilidad Amplicón vs. PEG, $\alpha=0.05$
Gen ZMS16	1031	2000	59.3	0.0028	0.0029	
		1800	9.3	0.1384	0.0612	
		1600	15.6	0.1120	0.0176	
		1300	28.1	0.0005	0.1133	
		1031	25	0.0666	0.2268	0.0215
		900	43.7	0.0028	0.3472	0.0030
		850	25	0.0355	0.0747	
		750	9.3	0.0427	0.0964	
		600	28.1	0.0079	0.1133	
		450	78.1	0.0431	0.0104	
		380	12.5	0.0233	0.0021	
		350	56.2	0.0044	0.0595	
		270	53.1	0.0092	0.1406	
Gen ZMS21	651	1000	14.2	0.0133	0.06	
		850	25.7	0.0109	0.0018	
		651	11.4	0.0625	0.3461	0.0129
		350	28.5	0.0416	0.003	
Marcador tipo		240	60	0.0476	0.0412	
		800	71.4	0.0074	0.2479	0.0183

SSR ZMS30	550	31.4	0.1427	0.1406	
	230	85.7	0.0233	0.071	
Sonda RFLP	2300	55.8	0.1241	0.0045	
ZMS31	800	44.1	0.0222	0.0727	
	550	47.0	0.0222	0.0769	
	300	5.8	0.0068	---	
	200	26.4	0.0157	0.2	
	150	73.5	0.0006	0.25	
Sonda RFLP	2500	40	0.0666	0.0027	
ZMS32	2000	45.7	0.0028	0.0357	
	1000	65.7	0.0938	0.071	
	900	42.8	0.0028	0.0964	
	800	17.1	0.0017	0.034	
	600	40	0.0001	0.0982	
	350	8.5	0.05	0.0027	
Sonda RFLP	1600	65.7	0.0011	0.1101	
ZMS33	1100	37.1	0.0999	0.0027	
	800	74.2	0.1138	0.0301	
	700	22.8	0.0074	0.0014	
	550	28.5	0.1976	0.1406	
	230	57.1	0.0375	0.0669	
	200	25.7	0.1138	0.0301	
Sonda RFLP	550	62.8	0.0493	0.0318	
ZMS40	400	14.2	0.0233	0.0124	
	350	31.6	0.0044	0.0085	
	200	37.1	0.0866	0.1101	
Sonda RFLP	2200	17.1	0.0233	0.0124	
ZMS45	2000	82.8	0.0431	0.2763	0.0119
	650	34.2	0.0139	0.0003	
	500	31.4	0.0001	0.0301	
	330	25.7	0.0375	0.0085	
Sonda RFLP	550	25.7	0.0666	0.0006	
ZMS48	450	77.1	0.0074	0.034	

Los resultados muestran amplicones con diversas frecuencias. Las frecuencias de interés se estiman en un rango de 40 al 60%, dado que indican que el fragmento de ADN amplificado se encuentra en la media aproximada de las muestras. Los fragmentos que aparecen en este rango pueden llegar a ser potencialmente utilizados como marcadores. Se encontraron 13 fragmentos contenidos en el rango medio de frecuencia, en su mayoría concentrados en los amplicones producidos por los oligonucleótidos ZMS16, 31 y 32.

De las 9 parejas de oligonucleótidos diseñados para genes involucrados en la respuesta o resistencia al estrés hídrico, sólo ZMS16 Y ZMS21 presentaron bandas polimórficas de interés. Los 7 oligonucleótidos restantes (ZMS01, 02, 11, 12, 15, 25 y 27) presentaron una banda única por genotipo del tamaño de fragmento esperado (ver lista de oligonucleótidos).

La pareja de oligonucleótidos ZMS16, diseñada en base a la accesión de un gen que codifica para una proteína dependiente de cinasa, presenta un conjunto de bandas polimórficas, incluyendo a aquella del tamaño esperado, según el diseño. Dicho amplicón, de 1031 pb, se presenta en una frecuencia relativamente baja y no parece tener relación alguna con la defensa ante la inminente contaminación con aflatoxinas. Por otro lado, a pesar de la baja frecuencia, presenta un coeficiente de determinación R^2 de 0.22, es decir, que la varianza de la variable independiente se relaciona en un 22% con la varianza de la variable dependiente. El resultado es relativamente alto, comparado con el conjunto de los resultados presentados. El fragmento de 900 pb producido por la misma pareja, presenta el coeficiente de determinación más alto obtenido en relación con la resistencia al estrés hídrico, dado por el 34.7%. A su vez, dicho amplicón se presenta en un rango de frecuencia medio.

El tamaño de fragmento esperado de 651 pb, según el diseño de la pareja de oligonucleótidos ZMS21, también está presente entre los amplicones producidos, con una frecuencia baja pero uno de los coeficientes de determinación más altos, de 34.6% en relación con la resistencia al estrés hídrico.

El marcador de tipo SSR mostró un amplicón de aprox. 800 pb relacionado en un 24.7% (R^2) con la respuesta al estrés hídrico. Por otro lado, los amplicones producidos por los oligonucleótidos diseñados para sondas de RFLP de regiones de ADN asociadas a características de resistencia, no mostraron tener relación con algún estrés, a excepción del fragmento de 2000 pb producido por la pareja de oligonucleótidos ZMS45 que presenta una relación del 27%.

Ninguno de los amplicones obtenidos y reportados presenta relación alguna con la resistencia a la contaminación con aflatoxinas.

Capítulo 4. Discusión

4.1 CLASIFICACIÓN EN BASE A LA RESISTENCIA A ESTRÉS HÍDRICO EN LA GERMINACIÓN

El análisis de varianza muestra diferencias significativas en la respuesta al estrés hídrico debidas al genotipo. Los resultados en proporción de semillas germinadas bajo condiciones estresantes varían en el rango del 99 al 9%. Esto resalta la diversidad genética presente en la muestra seleccionada.

La clasificación en base a la proporción de semillas germinadas en condiciones estresantes permite observar los genotipos resistentes y susceptibles del grupo muestral. En general, las líneas y variedades mejoradas de Río Bravo se concentran en el grupo de genotipos resistentes, así como los maíces criollos provenientes de las regiones norte y noreste. En ambos casos se vislumbra el efecto de la región sobre la resistencia presentada pues son regiones donde la sequía suele ser un factor climático adverso. Por otro lado, los genotipos provenientes de la región centro y bajío, donde la sequía no suele ser devastadora, se concentran en los subconjuntos de resistencia intermedia y susceptibilidad, especialmente en este último, lo que confirma la incidencia de la región como factor determinante en la resistencia al estrés hídrico durante la etapa de la germinación. Los resultados concuerdan con los estudios de sequía reportados por el Monitor de Sequía en Norteamérica (O'Brien 2006).

Lo que concierne a los genotipos mejorados para sequía, éstos se encuentran perteneciendo a los tres subconjuntos generados, esto es debido a que las mejoras proporcionadas no fueron dirigidas a la etapa de germinación, sino a otras etapas críticas como la floración o el llenado de mazorcas. Es evidente que la atención a dichas etapas es esencial, especialmente cuando se ha invertido en el desarrollo de plantas en los cultivos y se espera que estas produzcan el rendimiento de maíz esperado. No obstante, 3 de los materiales se encuentran en el rango de resistencia.

Los materiales QPM presentaron resistencia intermedia y alta, en contraste con lo que se esperaba para estos genotipos, pues suelen ser de baja viabilidad.

El material clasificado como no QPM (INIFAP-ZM-182) presentó la más alta resistencia al estrés hídrico al presentar la mayor proporción de semillas germinadas, de 99.3%.

4.2 CLASIFICACIÓN EN BASE A LA RESISTENCIA A LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS

La prueba de resistencia al contenido de aflatoxinas cuando se ha inducido el estrés biótico por la incidencia del hongo *A. flavus* ha arrojado un amplio rango de resultados en el contenido de aflatoxinas por genotipo. Las magnitudes obtenidas en el contenido de aflatoxinas muestran diferencias significativas tras el análisis de varianza, lo que corrobora la diversidad genética contenida en la muestra seleccionada. La prueba, además, presenta resultados con similitud a otros resultados reportados en proporción de contaminación (% de contaminación) lo que permitió la comparación con los resultados de referencia de dicho trabajo [Williams 2003].

La clasificación además resalta la resistencia adquirida en los materiales criollos provenientes de la región norte y noreste del país, pues todos ellos pertenecen al conjunto de los materiales resistentes. Esto indica la clara adaptación de las semillas ante la incidencia del hongo *A. flavus* en dicha región.

El resto de los grupos de genotipos no presentan relación alguna con la resistencia observada ante dicho estrés, sin embargo existe el caso del genotipo INIFAP-ZM-150 de alta calidad proteica, que presenta una alta resistencia a la contaminación con aflatoxinas, con lo que adquiere especial importancia por su contenido nutrimental y su baja producción de aflatoxinas en condiciones inadecuadas de almacenamiento.

El material clasificado como no QPM presentó el contenido de aflatoxinas más alto, el cual fue tomado como dato de proporción de 100% de contaminación.

4.3 RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS

La relación entre ambos estreses reportada es prácticamente nula, esto es, manifestando un coeficiente de determinación R^2 de 0.0134 con un índice de significancia del 46% (dentro del nivel de confianza de la curva de probabilidad), lo que indica que la relación obtenida no es significativa. Así, no es posible aseverar una tendencia en la relación de las variables evaluadas en ambos estreses.

Cabe señalar el caso del genotipo INIFAP-ZM-182, que presentó la mayor resistencia al estrés hídrico, y a su vez, la mayor susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas. Los genotipos INIFAP-ZM-027, 028, 030, 037, 143, 162 presentan resistencia al estrés hídrico inducido por el PEG al 20% durante la germinación, sin

embargo son los genotipos con alta susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas. Esto es completamente contrastante con la segunda hipótesis que da sustento a este trabajo.

Así es posible constatar que los mecanismos que defienden al organismo vivo de la infección contra el hongo *A. flavus* difieren de aquellos que le ayudan a germinar bajo condiciones de estrés hídrico, al menos en este genotipo. Más aún, cabe señalar que la semilla es un organismo vivo que mantiene sus procesos fisiológicos inactivos, procesos tales que se activan con la germinación, de esta forma, la semilla fue capaz de germinar bajo estrés hídrico pues sus procesos fisiológicos se activaron, sin embargo, en la inducción de estrés biótico la semilla no se vio más favorecida que el hongo para crecer y, probablemente los mecanismos de defensa se mantuvieron apagados mientras el hongo invadía a las semillas. Aún con todo, esta situación es cuestionable pues hay genotipos que, bajo las mismas condiciones fueron capaces de evitar la infección del hongo y su consecuente producción de aflatoxinas a estos niveles.

El genotipo que presentó resistencia a ambos estreses fue INIFAP-ZM-12, maíz criollo proveniente de la región Sureste. Por el contrario, la mayor susceptibilidad fue reportada por el genotipo INIFAP-ZM-006 de la región del Bajío.

4.4 ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS CON LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

La estrategia utilizada en este proyecto para la detección de polimorfismos, que abarcó desde la búsqueda de accesiones relacionadas con el estrés hídrico y el diseño de oligonucleótidos, hasta la amplificación por PCR y su consecuente apreciación y análisis en geles de poliacrilamida, nos permite confirmar la diversidad genética de la muestra, pues, si bien es cierto que un bajo número de oligonucleótidos fueron capaces de aparearse con el ADN y producir polimorfismos, los polimorfismos derivados son variables entre genotipos.

4.4.1 Asociación de polimorfismos con el nivel de resistencia al estrés hídrico

Los niveles de relación entre la característica fenotípica de tolerancia al estrés hídrico y la aparición de amplicones producidos por el apareamiento de oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias con asociación al estrés no son suficientemente altos para admitir que la relación es verdadera.

La maquinaria de respuesta y resistencia al estrés, que ya se ha explicado por varios autores y que se describe en el presente documento, involucra una gran cantidad de moléculas en la percepción del estrés, la transmisión de la señal y la consecuente activación de mecanismos de defensa y supervivencia bajo condiciones adversas. También es sabido que la complejidad de la evolución en los genomas permite a un gen ser el código de una molécula que participa no sólo ante una condición específica, ya sea de estrés o no. Por lo tanto, no es posible adjudicar la respuesta fenotípica expresada en condiciones estresantes por cada genotipo, a una molécula aislada representada por una secuencia específica en el genoma.

El estrés hídrico por altas presiones osmóticas en el sustrato en el que residen las semillas es una simulación del estrés que les ocasiona la sequía en el momento de la germinación. Dicha adversidad climática no sólo afecta al organismo en dicha etapa, sino en etapas posteriores que adquieren mayor interés económico por la inversión previa en el mantenimiento de la planta. Las etapas posteriores, como la floración y el llenado de granos en la mazorca pueden representar mecanismos celulares y moleculares que difieren de los de la germinación, especialmente de aquellos que involucran la participación de la luz. Los mecanismos involucrados en esta última etapa no se encuentran descritos de manera clara por lo que la selección de moléculas se basó en los mecanismos generales, sin embargo esto representa otra de las principales razones ante la obtención de bajos coeficientes de determinación de la relación entre las pruebas fenotípica y genotípica.

No obstante, los 5 coeficientes de determinación más altos deben ser tomados en cuenta para futuros estudios en un programa de mejoramiento asistido por marcadores moleculares, puesto que el nivel de probabilidad calculado en el análisis de varianza indica que la relación encontrada entre los amplicones polimórficos es significativa. Especialmente aquellos que arrojan una frecuencia de aparición media.

En el caso de los fragmentos asociados con los oligonucleótidos ZMS16 y 21, ambos asociados a genes involucrados en la transducción de la señal percibida de estrés hídrico, es conveniente su secuenciación para determinar el tipo de molécula a la que está asociado el fragmento amplificado por los oligonucleótidos diseñados. Lo mismo para los fragmentos asociados a sondas RFLP, pues, al estar disponible su secuencia será posible detectar si el fragmento amplificado es parte de la región descrita como marcador asociado a los rasgos de resistencia descritos.

4.4.2 Asociación de polimorfismos con el contenido de aflatoxinas.

El total de los coeficientes de determinación calculados son muy bajos. No es posible relacionar a nivel molecular la producción de polimorfismos con el contenido de aflatoxinas producido.

Bien es sabido que el hongo *A. flavus* es un organismo patógeno de tipo oportunista que es capaz de atacar a los granos y plantas de maíz cuando éstos se encuentran estresados por condiciones de tipo abiótico, pues aparentemente el organismo se encuentra ocupado combatiendo el estrés que aparece primero. La existencia de genotipos que son capaces de combatir al mismo tiempo ambos estreses y sobrevivir refiere a la idea de que el mecanismo activo de resistencia al estrés abiótico puede generar cierta sobrevivencia al estrés biótico involucrándose en su combate.

El resultado obtenido sugiere lo contrario. Ambos mecanismos difieren por completo a nivel molecular y la maquinaria de defensa al estrés biótico ocasionado por *A. flavus* es diferente a aquella responsable de la supervivencia bajo estrés hídrico. Así se visualiza la manera en que se acoplan ambas maquinarias de respuesta y resistencia a ambos estreses, que es cuando una de ellas llega a ser lo suficientemente eficiente para dar lugar al organismo de echar a andar la siguiente maquinaria de defensa, lo que implica que son maquinarias independientes.

Capítulo 5. Conclusiones

Las pruebas de evaluación de resistencia a contaminación con aflatoxinas y estrés hídrico en la germinación fueron adecuadas para la percepción de la diversidad genética contenida en la muestra. Dicha diversidad genética se ve asociada a las diferencias significativas y los niveles de variación producidos ante ambos experimentos de evaluación de resistencia en los diferentes genotipos de maíz evaluados.

Los resultados obtenidos no se adaptaron a la relación esperada entre la resistencia a al estrés hídrico durante la germinación de semillas de maíz y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas de las semillas.

El DNA genómico, proveniente de los genotipos de maíz muestra diversidad genética al producir polimorfismo con la utilización de oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias relacionadas a la respuesta y resistencia al estrés hídrico.

No se encontró relación significativa entre el polimorfismo generado en asociación con la característica fenotípica de resistencia al estrés hídrico en la germinación de semillas de maíz.

No se encontró relación entre el polimorfismo generado en asociación con la característica fenotípica de resistencia a la contaminación con aflatoxinas.

Se encontraron segmentos polimórficos en el ADN genómico de la muestra de maíz que pueden ser de utilidad para su utilización en programas de mejoramiento asistido por marcadores moleculares.

Capítulo 6. Anexos

TABLA 10 (ANEXA). DETALLE DE LAS ACCESIONES SELECCIONADAS EN LA BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA DE GENES.

Accesión	Tipo	Descripción	Tamaño de la accesión (pb)	Referencia
AM055633	Gen grupo 1	Corn cystatin. Cystein proteases inhibitor. (cc4 gene)	681	95
CA759417	Gen grupo 1	Secretory carrier membrane protein from <i>Oryza Sativa</i>	424	175
D26448	Gen grupo 1	Betaine aldehyde dehydrogenase from <i>Hordeum vulgare</i>	1826	63
CA754598	Gen grupo 1	Arginine decarboxylase from <i>Oryza sativa</i>	622	13
X57526	Gen grupo 1	Aldose reductase-related protein from <i>Hordeum vulgare</i>	1209	3
X78205	Gen grupo 1	<i>H. vulgare</i> (Himalaya) HVA1 gene. class 3 late embryogenesis-abundant protein.	1804	154
AF023132	Gen grupo 1	Choline monooxygenase from <i>Amaranth</i>	1020	139
M64267	Gen grupo 1	<i>Glycine max</i> iron superoxide dismutase (FeSOD) mRNA	1067	137
M33119	Gen grupo 1	<i>Zea mays</i> manganese superoxide dismutase (SOD-3) mRNA	1037	178
AF117660	Gen grupo 1	<i>Triticum aestivum</i> S-adenosylmethionine decarboxylase precursor	1386	86
CN845408	Gen grupo 1	<i>Zea mays</i> Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	715	194
AY566607	Gen grupo 1	<i>Triticum aestivum</i> lipid transfer protein (LPT1) gene	3448	66
CA762979	Gen grupo 2	Helicase-like transcription factor from <i>Oryza Sativa</i>	700	175
AY026332	Gen grupo 2	<i>Oryza sativa</i> Myb transcription factor JAMyb mRNA	1343	83
AF300971	Gen grupo 2	Dehydration-responsive element binding protein from <i>Oryza sativa</i>	1375	33
X61121	Gen grupo 2	<i>Zea mays</i> mRNA for glycine-rich protein	813	31
BH246288	Gen grupo 3-4	Similar to membrane associated salt-inducible protein-like from <i>Sorghum bicolor</i>	531	144
CA764883	Gen grupo 3-4	<i>Oryza sativa</i> Serine/threonine kinase receptor precursor	653	175
CA765415	Gen grupo 3-4	Serine/threonine kinase from <i>Oryza sativa</i>	607	175
AB042550	Gen grupo 3-4	<i>Oryza sativa</i> Ca ²⁺ dependent protein kinase	2126	140
AF519805	Gen grupo 3-4	<i>Triticum aestivum</i> putative serine/threonine protein kinase	1063	67

(PK4) mRNA.				
Z26867	Gen grupo 3-4	<i>Oryza sativa</i> (pRSAM-1) gene for S-adenosyl methionine synthetase	2063	167
AP003406 locus B1070A12.5	Gen grupo 3-4	<i>Oryza sativa</i> Auxin-responsive GH3	919	77
AP003406 locus B1070A12.14	Gen grupo 3-4	1,4-benzoquinone reductase from <i>Oryza sativa</i>	267	22
AP003406 locus B1070A12.2	Gen grupo 3-4	Receptor kinase from <i>Oryza sativa</i>	673	188
AP003406 locus B1070A12.7	Gen grupo 3-4	Receptor kinase from <i>Oryza sativa</i>	840	188
X78432	Gen sin grupo	<i>T.durum</i> Desf. (Siliana) Dehydrin mRNA	555	80
X56547	Gen sin grupo	<i>H. vulgare</i> BLT4 mRNA	724	34

TABLA 11 (ANEXA). DETALLE DE LOS MARCADORES MOLECULARES SELECCIONADOS EN LA BUSQUEDA BIOINFORMÁTICA.

Nombre/Tipo	Descripción	Tamaño del marcador (pb)	Referencia
RM263/SSR Acc: AF344082	Ligado a QTL para ajuste osmótico en <i>Oryza sativa</i> .	288	17
R3393/RFLP EST Acc: AU032057	Ligado a QTL para ajuste osmótico en <i>Oryza sativa</i> .	670	106, 78
C63/RFLP EST Acc: D15108	Ligado a QTL para ajuste osmótico en <i>Oryza sativa</i> . Ligado a QTL para conductancia estomatal, concentración de ABA en el xilema y fuerza en raíces en <i>Zea mays</i>		143, 78, 1
RG345/RFLP STS Acc: G73768	Ligado a QTL para raíces gruesas.	66	98, 99
RG109/RFLP probe. Acc: AQ074221	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	612	99
R2170/RFLP EST Acc: AU031852	Ligado a QTL para ajuste osmótico y habilidad para formar raíces penetradas en <i>Oryza sativa</i>	463	106, 78
RZ672/RFLP EST Acc: AA231801	Ligado a QTL para ajuste osmótico y habilidad para formar raíces penetradas en <i>Oryza sativa</i>	279	168, 16
RZ474/RFLP EST Acc: AA231787	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	307	168, 16
RG120/RFLP STS Acc: G73775	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	639	98, 99
RG476/RFLP STS Acc: AF490705	Ligado a QTL para el sistema de raíces en más de una característica en <i>Oryza sativa</i> .	436	98, 99

RG214/RFLP probe Acc: AQ074250	Ligado a QTL para ajuste osmótico en <i>Oryza sativa</i> .	657	99
CSU86/RFLP EST Acc: T12708	Ligado a QTL para sensibilidad a la sequía en <i>Zea mays</i>	210	4
RZ753/RFLP EST Acc: AA231808	Ligado a cinasa dependiente de calcio en <i>Oryza sativa</i>	266	168, 16
CSU223/RFLP EST Acc: T18803	Ligado a cistatina en <i>Zea mays</i> .	189	4
p-asg45/RFLP STS Acc: G10756	Ligado a región con homología a serin-treonin cinasa en <i>Zea mays</i>	402	48
p-asg8/RFLP STS Acc: G10762	Ligado a región con homología a proteína myb en <i>Zea mays</i>	361	48
R2549/ RFLP EST Acc: AU031913	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	455	118
G187/RFLP STS Acc: D13605	Ligado a QTL para ajuste osmótico en <i>Oryza sativa</i> .	384	106, 78
RZ997/ RFLP STS Acc: G73605	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	490	98, 16
RG553/RFLP STS Acc: AF490708	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	415	99
R41/RFLP EST Acc: AU031629	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	265	78
RM21/SSR STS Acc: AF344021	Ligado a QTL para ajuste osmótico en <i>Oryza sativa</i> .	385	118
C950/ RFLP EST Acc: D22697	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	422	78
RG9/RFLP GSS Acc: AQ074160	Ligado a QTL para el sistema de raíces en <i>Oryza sativa</i>	688	99
CSU924 Acc: W21638	Water-stress induced protein <i>Oryza sativa</i>	248	29
CSU222 Acc: T18802	Water-stress induced protein <i>Oryza sativa</i>	168	29
RGP C975 Acc: C98182	Zinc finger protein (<i>Hordeum vulgare</i>)	347	29
CSU182 Acc: T18842	Superoxide dismutase	241	29

TABLA 12 (ANEXA). CARACTERÍSTICAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE GENES Y MARCADORES MOLECULARES DESARROLLADOS A PARTIR DEL GENBANK, ASÍ COMO LOS PARÁMETROS DE PCR UTILIZADOS.

ID	Secuencia del Primer (5'---3') Forward	Secuencia del Primer (5'---3') Reverse	Accesión (GenBank)	ΔT °C	Condiciones de PCR				
					T _m óptima °C	Primer (μ M)	Mg ⁺⁺ (mM)	dNTP (μ M)	Taq (U)
ZMS01	AGCACAACAGGCGCGAGA	GATCGATTTACAGCATGGTG	AM055633	55-65	59.5	0.2	0.2	0.2	1
ZMS02	GAAAAGGGATGCAGCTTAATCAACAA	GACTTGATGTCTCGTTTCTAGCCTC	BH246288	55-65	59	0.2	0.2	0.2	1
ZMS03	TTAGGGCGGGAAAACCTTTACTTATA	GTCATAAACCTAGTCCATTTTGCCCTT	CA759417	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS04	GAGGGGAATTGGAATCACTTACCT	GTCATAAACCTAGTCCATTTTGCCCTT	D26448	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS05	TCCGGGGAGAAGGGCAAGTTCG	CTCCTCATGCGCCGCCGGCA	CA754598	60-70	65	0.2	0.2	0.2	1
ZMS06	CACGCTCAAGGATCTACAGTTGGACTAC	TAGGATACATTATTATTCGTGCCGACACAA	X57526	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS07	GGCGGTGATCTGATATGTTCTTCTGT	AACACAAAGTATCTATCACACCGGAAATTT	X78205	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS08	AGCCTGCCTTTTATTCCCATGAACT	CTTGAAAACGTCACATAAAGCCCTC	AF023132	55-65	63	0.2	0.2	0.2	1
ZMS09	GCTTCAACAATGCTAGCTACAGG	TCAAGGTAGTAAGCATGCTCCCA	M64267	55-65	57.5	0.2	5	0.2	1
ZMS10	ACTCCCGACCTCTCCTACGACTT	GGATCAAAACCGTAGTACAAATACAACT	M33119	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS11	ATCGGGTTTGAGGGCTACGAGAA	CTCACTTCTGACTAAACGACAGCGATA	AF117660	55-65	58	0.2	0.2	0.2	1
ZMS12	ATTGGGTGCTGAGGTAGGTCCTATCTT	TAGATCAACGAGCAAACTGGGCC	CN845408	55-65	62.5	0.2	0.2	0.2	1
ZMS13	AGAAGTTCGCGAGTTCGGAGAAGA	TTATGTCTTTTGATTAAGGGCGGGTAATA	AY566607	55-65	55.5	0.2	0.2	0.2	1
ZMS14	TTGGCGTCGTGGTTCTAGAAATCAT	CAGATTACGAAGAAGTTTAAACCGGTG	CA764883	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS15	ATCGGCCTACCATGACCGAGATAAT	CACCTATGTTAAAAGGGATTTTGTCG	CA765415	55-65	57	0.2	0.2	0.2	1
ZMS16	CACCTATGTTAAAAGGGATTTTGTCG	GAGCTACGTAATATGGGCTCCG	AB042550	55-65	57	0.2	0.2	0.2	1
ZMS17	GGCAACTGGTATCAGGAGTCAGCTACT	TACTTAGAGGGCCGAGTAGTATCG	AF519805	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS18	ATCCGGCAGAAAATTGTTAGATTCCT	GTTCACTGACAACCTCATGGCGTFACTC	Z26867	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS19	CGTAGTACCCGAAATATTTATCCCAACT	CCAATTAGAATAGTCAATCCGGCTAAACT	AP003406	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS20	GGAGGCGCGGACCCGTACTTCAT	CTTCTGCTACTGGCTCAGTTAATCGGTGC	AP003406	65-75	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS21	CTAAGCGCATCCCCTACTACCT	TTTAGTCGTATGATGCACGGCAACA	AP003406	55-65	56	0.2	0.2	0.2	1
ZMS22	GCACCCCATATGAGTTACCACAGGA	GAGGAGAAGGAGAAAAGGCCTCG	AP003406	55-65	56.5	0.2	0.2	0.2	1
ZMS23	GAAATGCGAAGCTCAAGATGAGTTAAGAT	CAGTTAGATCAAACCTACCCGTGGTCTA	CA762979	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS24	CATCGGCAATTTCAATCGGTAATAGTTA	ATGCAACTCTGTGAATTCAGAAACGGTT	AY026332	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS25	AGATCTGAACGGAGGAGGAATAGGAAG	GGATAATCTCATCATCAGTACGACGCCCA	AF300971	55-65	57.5	0.2	0.2	0.2	1
ZMS26	TCGAGATGGCGCGGTGCGGATGTTAGTACC	GACTGCGGATCGATGGATGCTGTTACCC	X61121	65-75	68	0.2	0.2	0.2	1
ZMS27	GCCGTGATGTTTACCCTAGTCCAGA	CACTGGGGGCGAGTCCGAAATAAGATTC	X61121	55-65	62.5	0.2	0.2	0.2	1

ZMS28	GAAGGCATCATGGAGAACATCAAG	GTGACAAAAGCAGATAAATGTGAGGCAGT	X78432	55-65	64	0.2	0.2	0.2	1
ZMS29	GAGTCAAGAGATTGGCCGGCTTAG	AAACTCCTGTGTCTGCCCTCAAAC	X56547	55-65	55.5	0.2	0.2	0.2	1
ZMS30	CCCAGGCTAGCTCATGAACC	GCTACGTTTGAGCTACCACG	AF344082	45-55	47	0.2	0.2	0.2	1
ZMS31	AGGAAGTTCCTGGACAAACTGAGG	CCGCCATCTTCTCATATCAAATGAAAATA	AU032057	55-65	57	0.2	0.2	0.2	1
ZMS32	CGCTACAAGCACAACATCAACAAG	ACTCAAGGCAGTAACAAGTAGTCAAAGTAA	D15108	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS33	TAAAACGACGGCCAGT	AACAGCTATGACCATG	G73768	27-47	47	0.2	0.2	0.2	1
ZMS34	AAACTGTGCCGGTTATGCCTGCCTGTTA	GCAGCTCCGTCCACCAGCTGTATAC	AQ074221	60-70	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS35	AAACTCCCATGTCTAATATGGCTTACC	TTACATTGCTGGTATTTGAGTGCATATAG	AU031852	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS36	CCTCGGCCTACTGTTCAACAACCT	CATGTAAATTCTCGTCTTGCGGTAACA	AA231801	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS37	TTTTAAGTCGCAACAAAAGGGATACAGT	AGTGCTCAGGAGGCATATGATGAG	AA231787	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS38	TAAAACGACGGCCAGT	AACAGCTATGACCATG	G73775	27-47	37	0.2	0.2	0.2	1
ZMS39	AAAGGCATAAAACTTCTCGACAACGTC	AATCAGTTCGTCCCAGATCAATTAAGG	AF490705	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS40	TTGGCTTGTCTTTTCGTTGATGTGTT	CCCTTTTCCCTTCAGGGTTTC	AQ074250	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS41	GGAAATACTCTCATGCTTACTTCTTGACAA	CTGATCCTAAACCGAATCCCTCTTC	T12708	55-65	-----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS42	ACATTTGCCATTTTATGGGAGTGATG	AAGTCAATCTCCCTTGAGAGTAGCATC	AA231808	55-65	-----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS43	CGTCTCGCTAGTGGCTGCCCTACTCGTG	CGTCCTTGATGCCGCTGCCAACATC	T18803	65-75	70	0.2	0.2	0.2	1
ZMS44	TAGCCTCCATCCTCGATCACCTACA	TTGCCATGATTACGCCAAGCTATTTA	G10756	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS45	CTGCAGACGAGGAAACAAGACTTCTACTAA	GTAGCTCACCAATCAAGCTGAGAATAAC	G10762	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS46	GGAGCCCCTCATATTATTTGTACTGC	TTGATGTACGATAAGAACATTCGTGTATCC	AU031913	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS47	TTTCTTGACACAAGGAAATGTCTAATCTA	TACGATCCAATCAAGAAAGTCTTCTACGAG	D13605	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS48	ATGGGTTATTGATCTTGACATCGAGTGA	ATATAGGATCCGAGTAGGAAAGAGATTG	G73605	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS49	CTTTTTCACAAAATCGGTCTGGAACC	TCTGAAGAACTTTGACGGCACTGAG	AF490708	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS50	GAGCTTTCAGGAGGAAGGAAAGAC	AAAGCTAACAATTCGGTGACCCCTCAC	AU031629	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS51	ACAGTATTCGCTAGGCACGG	GCTCCATGAGGGTGGTAGAG	AF344021	45-55	57	0.2	0.2	0.2	1
ZMS52	ATGTTGGTCTACCAGGATCTGCTTACC	ATCCAGCTTGCAGAAAGGTTCTT	D22697	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS53	TGTCCITAGCTTGGTTAGCTTACTGAGTTC	AATCCCCATGCAAACTTCTTTATTGA	AQ074160	55-65	----	0.2	0.2	0.2	1
ZMS54	AGTACAGGCCGATCCCTAACGTGTA	TCGTTGTAGATGACCACCCTTGTT	W21638	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS55	GTGGAGAAGCTCAAGCACAAGAAGAA	ACAGGCATTGCAAAAATTTTCAGACTAC	D15625	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1
ZMS56	GCATGTCAACTGGACCACACTACAATC	GAACAACAACAGCTCTGCCAATGATT	T18842	55-65	60	0.2	0.2	0.2	1

Capítulo 7. Referencias consultadas

1. Ahn S, Tanksley SD. 1993. Comparative Linkage Maps of the Rice and Maize Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:7980-7984.
2. Bai J, Pennill LA, Ning J, Weon Lee S, Ramalingam J, Webb CA, Zhao B, Sun Q, Nelson JC, Leach JE, and Hulbert SH. 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Research* 12:1871-1884.
3. Bartels D, Engelhardt, Roncarati R, Scheneider K, Rotter M, and Salamini F. 1991. An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *The EMBO Journal* 10:1037-1043.
4. Baysdorfer C. 1993. The maize cDNA Program. Unpublished. Accesoión T18803 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
5. Belkhadir Y, Subramaniam R, and Dangl JL. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* 7:391-399.
6. Blum A. 1979. Genetic improvement of drought resistance in crop plants: A case for sorghum. En: Mussel H, Staples RC. *Stress physiology in crop plants*. John Willey & Sons. NY. 229-245.
7. Blum A. 1989. Breeding methods for drought resistance. En: Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (editores). *Plants under stress*. Cambridge University Press. 197-215.
8. Boyes DC, McDowell JM, Dangl JL. 1996. Many roads lead to resistance. *Current Biology* 6:634-637.
9. Brown RL, Chen ZY and Cleveland TE. 2003. Using biotechnology to enhance host resistance to aflatoxin contamination of corn. *African Journal of Biotechnology* 2:557-562.
10. Brown RL, Chen ZY, Cleveland TE and Russin JS. 1999. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 89:113-117.
11. Bruce W. *et. al.* 2002. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53:13-25.
12. Campos H. *et. al.* 2004. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research* 90:19-34
13. Capell T, Escobar C, Liu H, Burtin D, Lepri O, Christou P. 1998. Over-expression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theoretical Applied Genetics* 97:246-254.
14. Carrillo L. 2003. Estructuras fúngicas. En: Carrillo, L. *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta. pp. 25-30.
15. Carrillo L. 2003. Mohos y micotoxinas. En: Carrillo, L. *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta. pp. 1-24.
16. Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Rondal PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD. Saturated Molecular Map of the Rice Genome Based on an Interspecific Backcross Population. *Genetics* 138:1251-1274.
17. Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics* 95:553-567.
18. (a) Chen Z-Y, Brown RL, and Cleveland TE. 2004. Evidence for an association in corn between stress tolerance and resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination. *African Journal of Biotechnology* 3: 693-699.

19. (b) Chen Z-Y, Brown RL, Damann KE and Cleveland TE. 2002. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology* 92:1084-1094.
20. (c) Chen Z-Y, Brown RL, Damann KE and Cleveland TE. 2004. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology* 94:938-945.
21. Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, and Loake GJ. 2004. Drought tolerance established by enhanced expression of the *CC-NBS-LRR* gene, *ADR1*, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *The Plant Journal* 38:810-822.
22. Choi D-W, Rodriguez EM, and Close TJ. 2002. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern and map location. *Plant physiology* 129:1781-1787.
23. Collins NC, Webb CA, Seah S, Ellis JG and Pryor A. 1998. The isolation of disease resistance gene analogs in maize. *MPMI* 11:968-978.
24. Cushman JC. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* 3:117-124.
25. Cushman JC, Bohnert HJ. 1989. Nucleotide sequence of the gene encoding a CAM specific isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Nucleic Acids Research* 17:6745-6746.
26. Cushman JC, Meyer G, Michalowsky CB, Scmitt JM, Bohnert HJ. 1989. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common Ice Plant. *The Plant Cell* 1:715-725.
27. D'Mello JPF and Macdonald AMC. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* 69:155-166.
28. Dangl JL and Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
29. Davis GL, McMullen MD, Baysdorfer C, Musket T, Grant D, Staebell M, Xu G, Polacco M, Koster L, Melia-Hancock S, Houchins K, Chao S, Coe EH. 1999. A Maize Map Standard with Sequenced Core Markers, Grass Genome Reference Points and 932 Expressed Sequence Tagged Sites (ESTs) in a 1736-Locus Map. *Genetics* 152: 1137-1172.
30. De Roover J, Vandenbranden K, Van Laere A, and Van den Ende W. 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 210:808-814.
31. Didierjean L, Frendo P, and Burkard G. 1992. Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. *Plant Molecular Biology* 18:847-849.
32. Dorner JW. 2004. Biological Control of Aflatoxin Contamination of Crops. *Journal of Toxicology* 23:425-450,
33. Dubouzet JG, Sakyma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *The Plant Journal* 33:751-763.
34. Dunn MA, Hughes MA, Zhang L, Pearce RS, Quigley AS, and Jack PL. 1991. Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced cereal gene, BLT4. *Mol Gen Genet* 229:389-394.
35. Egea-Gilabert C, Dickinson MJ, Bilotti G, Candela ME. 2003. Isolation of resistance gene analogs in pepper using modified AFLPs. *Biologia Plantarum* 47:27-32.
36. El-Maghraby MA. 2005. Combining ability under drought stress relative to SSR diversity in common wheat. *Euphytica* 141:301-308.
37. Espelund M, Sæbøe-Larssen S, Hughes DW, Galau GA, Larsen F, and Jakobsen KS. 1992. Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Journal* 2:241-252.

38. Fan F, Ghanem M, and Gadda, G. 2004. Cloning, sequence analysis, and purification of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*: a bacterial enzyme involved in osmotic stress tolerance. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 421:149–158.
39. Foolad MR, Subbiah P, Kramer C, Hargrave G, and Lin GY. 2003. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Euphytica* 130:199–206,
40. Forster B.P. 2004. Genotype and phenotype associations with drought tolerance in barley tested in North Africa. *Association of Applied Biologists*.
41. Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, and Ohme-Takagi M. 2000. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell* 12:393-404.
42. Gepts P. 2002. A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. *Crop Science* 42:1780–1790.
43. Gerhardt L, Magioli C, Perez ABUCM, Margis R, Sachetto-Martins G, Margis-Pinheiro M. 2004. *Atchit1V* gene expression is stimulated under abiotic stresses and is spatially and temporally regulated during embryo development. *Genetics and Molecular Biology* 27:118-123.
44. Goh C-H, Gil Nam H, and Park YS. 2003. Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of *rd22* gene to light in abscisic acid-entrained *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* 36:240-255.
45. Gomez J, Sánchez-Martínez D, Stiefel V, Rigau J, Puigdomènech P, and Pagès M. 1988. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334:262-264.
46. Gong M, Chen B, Li Z-G, and Guo L-H. 2001. Heat-shock-induced cross adaptation to heat. Chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *J Plant Physiol* 158:1125-1130.
47. González-Guzmán M, Abia D, Salinas J, Serrano R, and Rodríguez PL. 2004. Two new alleles of the *abscisic aldehyde oxidase 3* gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiology* 135:325-333.
48. Grant D. Helentjaris T. 1995. *Zea mays* RFLP probe. Unpublished. Acciones G10756, G10762 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
49. Guo BZ, Li RG, Widstrom NW, Lynch RE, and Cleveland TE. 2001. Genetic variation within maize population GT-MAS:gk and the relationship with resistance to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Theor Appl Genet* 103:533–539.
50. Guo, BZ, Chen Z-Y, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS, Mehta AD, and Selitrennikoff CP, and Widstrom NW. 1997. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology* 11:1174-1178.
51. Gupta PK, and Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomics* 4:139-162.
52. Hartman JL. 2001. Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291:1001-1004.
53. Hell K. *et.al.* 2003. Relationship between management practices, fungal infection and aflatoxin for stored maize in Benin. *J Phytopathology* 151:690–698.
54. Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, and Shinozaki K. 1995. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Scii USA* 92: 3903-3907.
55. Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, and Verma DPS. 2000. Removal of feedback inhibition of Δ -Pyrroline-5-carboxylate synthase results in increased praline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* 122:1129-1136.

56. Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, and Selvaraj G. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology* 122:747-756.
57. Huang L, and Gill BS. 2001. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theor Appl Genet* 103:1007-1013.
58. Huang Z, White DG, Payn GA. 1997. Corn Seed Proteins Inhibitory to *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Biosynthesis. *Phytopathology* 87(6):622-627.
59. Hussein HJ and Brassel J M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.
60. Ikeda A. 2001. Slender rice, a constitutive Gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLRI* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHTD8*. *Plant Cell* 13:999-1010.
61. Ingram J and Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:337-403.
62. Ingram J, Chandler JW, Gallagher L, Salamini F, and Bartels D. 1997. Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant physiology* 115: 113-121.
63. Ishitani M, Nakamura T, Han SY, and Takabe T. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 27:307-315.
64. Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, and Zhu J-K. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell* 9:1935-1949.
65. Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 27: 325-333.
66. Jang CS, Seo YW. 2004. Expression and promoter assay of the TaLTP 1 gene induced by drought- and salt-stress in wheat. Unpublished. Accessión: AY566607 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
67. Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK. 2002. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiology* 130:837-846.
68. Kamara AY, Menkir A, Badu-Apraku B, Ibikunle O. 2003. The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. *Journal of Agricultural Science* 141:43-50.
69. Kanazin V, Frederick L, Schoemaker RC. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11746-11750.
70. Kellermann E, Seeboth PG, Hollenborg CP. 1986. Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDCI) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 14:8963-8977.
71. Kelley PM, Godfrey K, Lal SL, Alleman M. 1991. Characterization of the maize pyruvate decarboxylase gene. *Plant Molecular Biology* 17:1259-1261.
72. Kiyosue T, Beetham JK, Pinot F, Hammock BD, Yanaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *The Plant Journal* 6:259-269.
73. Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. 1993. Characterization of two cDNAs (ERD11 and ERD13) for dehydration-inducible genes that encode putative glutathione *S*-transferases in *Arabidopsis thaliana* L. *Federation of European Biochemical Societies* 335:189-192.

74. Kizis D, Lumbreras V, and Pagès M. 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 498:187-189.
75. Kleines M, Elster RC, Rodrigo MJ, Blervacq AS, Salamini F, Bartels D. 1999. Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* 209:13-24.
76. Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* 12:1067-1078.
77. Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:2940-2945.
78. Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin S-Y, Inoue T, Fukuda A, Shimano T, Kuboki Y, Toyoma T, Miyamoto Y, Kirihara T, Hayasaka K, Miyao A, Monna L, Zhong HS, Tamura Y, Wang Z-X, Momma T, Umehara Y, Yano M, Sasaki T, Minobe Y. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 8:365-372.
79. Laberge S, Castonguay Y, and Vézina L-P. 1993. New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. *Plant Physiology* 101:1411-1412.
80. Labhili M, Joudrier P, Gautier M-F. 1995. Characterization of cDNAs encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science* 112:219-230.
81. Laffite HR. 2001. Estreses abióticos que afectan al maíz. En: Paliwal L, Granados G, Laffite HR, Violic AD, Marathée JP. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
82. Laffite HR. 2001. Fisiología del maíz tropical. En: Paliwal L, Granados G, Laffite HR, Violic AD, Marathée JP. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
83. Lee M-W, Qi M, and Yang Y. 2001. A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *MPMI* 14: 527-535.
84. Leister D, Kurth J, Laurie DA, Yano M, Sasaki T, Devos K, Graner A, and Schulze-Lefert P. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:370-375.
85. Li M, Wang GX, Lin JS. 2003. Application of external calcium in improving the PEG-induced water stress tolerance in liquorice cells. *Bot Bull Acad Sci* 44:275-284.
86. Li ZY, Chen SY. 2000. Isolation and characterization of a salt and drought-inducible gene for S-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Physiol* 156:386-393.
87. Liverman DM, Vilas S. Neoliberalism and the Environment in Latin America. *Annu. Rv. Environ. Resour.* 2006. 31:2.1-2.37.
88. Liverman DM. 2000. Adaptation to drought in Mexico. En: Whiltie, D. *Drought: a global assessment*. Volumen 2, Capítulo 31. Routtege, USA. pp. 33-45.
89. Liu Q. 1998. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 10:1391-1406.
90. Lopes MA, Larkins BA. 1995. Genetic analysis of opaque2 modifier gene activity in maize endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*. 91(2):274 – 281
91. Lozovaya VV, Waranyuwat A, and Widholm JM. 1998. β -1,3 glucanase and *Aspergillus flavus* infection. *Crop Science* 38:1255-1260.
92. Lucas Viñuela E. *Aspectos generales de las micotoxinas*. Evaluación según el codex alimentarius. FAO.

93. Malehorn DE, Borgmeyer JR, Smith CE, and Shah DM. 1994. Characterization and expression of antifungal Zeamatin-like protein (*Zlp*) gene from *Zea mays*. *Plant physiology* 106: 1471-1481.
94. Manonmani H.K. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*. 40:2859–2864
95. Massoneau A, Condamine P, Wisniewski J-P, Zivy M, and Rogowsky PM. 2005. Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. *Biochimica et Biophysica Acta* 1729:186-199.
96. Mayes S. 2005. Integrating genetic information into plant breeding programmes: how will we produce varieties from molecular variation, using bioinformatics? *Annals of Applied Biology*. 146:223–237
97. Mazzani C. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el Estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 17:185-195.
98. McCouch SR. 2002. *Oryza Sativa STS*. Unpublished. Acceso G73768 en www.ncbi.nlm.nih.gov
99. McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical Applied Genetics* 76:815-829.
100. McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, and Leprince O. 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology* 111:1177-1181.
101. Medici L.O. 2003/4. Glutamine synthetase activity, relative water content and water potential in maize submitted to drought. *Biologia Plantarum*. 47(2):301-304.
102. (a) Méndez-Albores J.A. 2004. Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International Journal of Food Microbiology*. 94:211 – 215
103. (b) Méndez-Albores J.A. 2004. Aflatoxin's fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *Journal of Stored Products Research*. 40:87–94.
104. Michelmore R. 2002. Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:125–131
105. Mie K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*. Volumen 17. 287-291.
106. Minobe Y, Sasaki T. 1995. Rice cDNA from root. Unpublished. Acceso AU032057 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
107. Moore KG, Price MS, Boston RS, Weissinger AK, Payne GA. 2004. A chitinase from Tex 6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 94:82-87.
108. Moreno J. 2004. *Estudio comparativo de Aspergillus flavus Link. y Aspergillus parasiticus Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura*. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM.
109. Moreno-Martínez E, Ramírez-González J, Mendoza-Ramírez M, Valencia Ramírez G. 1988. Comparison of Mexican Maize Races Stored Under Adverse Humidity and Temperature. *Recent Advances in the Conservation and Utilization of Genetic Resources: Proceedings of the Global Maize Germplasm Workshop*. CIMMYT México. 94-98.
110. Moreno-Martínez E. 2004. Determinación de mecanismos hereditarios y moleculares en la pérdida de vigor, longevidad, y contaminación con aflatoxinas en maíz. Proyecto de Investigación CONACYT.
111. Morris PC, Kumar A, Bowles DJ, and Cuming AC. 1990. Osmotic stress and abscisic acid expression of the wheat Em genes. *Eur j Biochem* 190:625-630.
112. Munkvold G. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:99-116
113. Murillo-Amador B, López-Aguilar R, Kaya C, Larrinaga-Mayoral J, Flores-Hernández A. 2002. Comparative effects of NaCl and Polyethylene Glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *J. Agronomy & Crop Science* 188:235—247.

114. Nigam S.N. 2005. Efficiency of physiological trait-based and empirical selection approaches for drought tolerance in groundnut. *Annals of Applied Biology*. Volumen 146. pp. 433-439.
115. O'Brien T, Chobanik D, Findlater K, Cortez M, Tinker R, Heim R. 2006. North American Drought Monitor. <http://www.ncdc.noaa.gov/nadm.html>
116. Paliwal RL. 2001. Morfología del maíz tropical. En: Paliwal L, Granados G, Laffite HR, Violic AD, Marathée JP *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
117. Paliwal RL. 2001. Origen, evolución y difusión del maíz. En: Paliwal L, Granados G, Laffite HR, Violic AD, Marathée JP. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
118. Panaud O, Chen X, McCouch SR. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 252:597-607.
119. Papp, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*. 73:39-46.
120. Park JM, Park C-J, Lee S-B, Ham B-K, Shin R, and Paek K-H. 2001. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in Tobacco. *The Plant Cell* 13: 1035-1046.
121. Parry M.A.J. 2004. Optimisation of Water Use by Plants. *Association of Applied Biologists*.
122. Pearson S.M. 1999. Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection. *Biotechnology Techniques* Volumen 13. pp. 97-99.
123. Peña-Valdivia CB, Raya P JC, Perales R H, Lotina H B, Merchant R. 1996. Biochemical characterization of drought tolerant and susceptible young maize plants under well-watered conditions. In: Edmeades, G.O.; Bänziger, Martin; Mickelson, H.R; Peña Valdivia, Cecilia Beatriz (eds.). *Developing drought-and low N-tolerant maize: Proceedings of a symposium*, March 25-29, 1996, CIMMYT, El Batán, Mexico
124. Piatkowsky D, Schneider K, Salamini F, and Bartels D. 1990. Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Cratogeomys plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiology* 94, 1682-1688.
125. Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Leuken MJW, Weisbeek PJ, and Smeekens SCM. 1995. improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* 107:125-130.
126. Plascencia J. 2004. Aflatoxins in Maize: A mexican perspective. *Journal of Toxicology* (23) 2-3:155-177.
127. Pontón J, y Cabañes, F.J. 2000. *Aspergillus* y aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*. 17: S77-S78.
128. Price AH, Cairns JE, Horton P, Jones HG, Griffiths H. 2002. Linking drought resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *Journal of Experimental Botany* 53:989-1004.
129. Quarrie S.A. 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany*. 50(337)1299-1306.
130. R. Chandra Babu 2003. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: Association between secondary traits and field performance. *Crop Science*. 43(4):1457-1469.
131. Ramalingam J. 2003. Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 16(1):14-24.
132. Ramanjulu S, and Bartels D. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25:141-151.
133. Ranjbarfordoei A, Samson R, Lemeur R, and Van Damme P. 2002. Effects of osmotic drought stress induced by a combination of NaCl and polyethylene glycol on leaf water status, photosynthetic gas exchange, and water use efficiency of *Pistacia* and *P. mutica*. *Photosynthetica* 40:165-169.

134. Rathinasabapathi B, Burnet M, Russel BL, Gage DA, Liao PC, Nye GJ, Scott P, Golbecj JH, Hanson AD. 1997. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3454-3458.
135. Ronald PC. 1998. Resistance gene evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 1:294-298.
136. Rossi M. 2003. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. *Mol Gen Genomics*. 269:406-419.
137. Rubio MC, Ramos J, Webb KJ, Minchin FR, González E, Arrese-Igor C, Becana M. 2001. Expression studies of superoxide dismutases in nodules and leaves of transgenic alfalfa reveal abundance of iron-containing isozymes, posttranslational regulation, and compensation of isozyme activities. *MPMI* 14:1178-1188.
138. Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, and Azcón R. 2001. Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. *Journal of Experimental Botany* 52:2241-2242.
139. Russell BL, Rathinasabapathi B, and Hanson AD. 1998. Osmotic stress induces expression of a choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiol* 116:859-865.
140. Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, and Izui K. 2000. Overexpression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal* 23:319-327.
141. Saleemullah, Iqbal A, Khalil IA, Shah H. 2006. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food chemistry* 98(4): 699-703.
142. Sanchis V, Marín S, y Ramos A. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Rev Iberoam Micol.* 17:S69-S75.
143. Sasaki T. 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* 420: 312-316.
144. Schloss S, Mitchell S, White G, Kukatla R, Bowers J, Paterson A, Kresovich S. 2002. Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theoretical and Applied Genetics*. 105:912-920.
145. Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spínola MC. A novel NADPH Thioredoxin reductase. Localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(42):43821-43824.
146. Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant production. *Current Opinion in Biotechnology* 14:194-199.
147. Sharma M. 2001. Determination of aflatoxinas in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology*. Volumen 93. pp. 109-114.
148. Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG. 1997. Increased salt and drought tolerance by D-Ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology* 115:1211-1219.
149. Shinozaki K. Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol.* 11(5):327-334
150. Shinozaki K. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and the cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:410-417.
151. Skinner JS, Zitzewits J, Szűcs P, Márquez-Cedillo L, Filichkin T, Amundsen K, Stockinger EJ, Thomashow EF, Chen THH, Hayes PM. 2005. Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Molecular Biology* 59:533-551.
152. Song J, Feng G, Tian C, Zhang F. 2005. Strategies for adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a saline environment during seed-germination stage. *Annals of Botany* 96:399-405.

153. Spielmeyer W, Huang L, Bariana H, Laroche A, Gill BS, Lagudah ES. 2000. NBS-LRR sequence family is associated with leaf and stripe rust resistance on the end of homoeologous chromosome group 1S of wheat. *Theor Appl Genet* 101:1139–1144.
154. Straub PF, Shen Q, Ho TD. 1994. Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, *HVA1*. *Plant Molecular Biology* 26:617–630.
155. Stroka, J. 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A*. 904:251–256.
156. Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H. 2003. Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *The Plant Journal* 36:830–841.
157. Taji T, Ohsumi C, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 29:417–426.
158. Takahashi Y, Sakai T, Ishida S, Nagata T. 1995. Identification of auxin-responsive elements of *parB* and their expression in apices of shoot and root. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6359–6363.
159. Tamura T, Hara K, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. 2003. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology* 131:454–462.
160. Tobe K, Zhang L, Omasa K. 2005. Seed germination and seedling emergence of three annuals growing on desert sand dunes in China. *Annals of Botany* 95:649–659.
161. Treviño MB, O'Connell MA. 1998. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiology* 116:1461–1468.
162. Tsang EWT, Bowler C, Hérouart D, Van Camp W, Villaroel R, Genetello, C, Van Montagu M, Inzé D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* 3:783–792.
163. Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M and Conti S. 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yields: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Annals of Botany* 89:941–963.
164. Türkan İ, Bor M, Özdemir F, Koca H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation in the leaves of drought-tolerant *P. acutofolis* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168:223–231.
165. Turner N.C. 2004. Sustainable production of crops and pastures under drought in a Mediterranean environment. *Association of Applied Biologists*.
166. Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, and Shinozaki K. 1993. An *Arabidopsis myb* is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell* 5:1529–1539.
167. Van Breusegem F, Dekeyser R, Gielen J, Van Montagu M, and Caplan A. 1994. Characterization of a S-Adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiology* 105:1463–1464.
168. Van Deynze AE, Sorrells ME, Park WD, Ayres NM, Fu H, Cartinhour SW, Paul E, McCouch SR. 1998. Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theoretical and Applied Genetics* 97:356–369.
169. Van Egmond H.P. 1999. Worldwide Regulations for Mycotoxins. *Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins*. Tunes. 7p.
170. Ventura M. 2004. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1048:25–29.

171. Vivas A, Marulanda A, Ruiz-Lozano JM, Barea JM, Azcón R. 2003. Influence of *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* 13:249-256.
172. Vollenweider P, Madeleine S. Günthardt-Goerg 2005. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution*. 137:455-465.
173. Walker RD, and White DG. 2001. Inheritance of resistance to *Aspergillus* ear rot and aflatoxin production of corn from CI2. *Plant Disease* 85:322-327.
174. Wang B, Wang Y, Wang Q, Luo G, Zhang Z, He C, Jie He S, Zhang J, Gai J, Chen S. 2004. Characterization of an NBS-LRR resistance gene homologue from soybean. *Journal of Plant Physiology* 161:815-822.
175. Wang X, Zhu J, Mansueto L and Bruskiewich R. 2005. Identification of candidate genes for drought stress tolerance in rice by integration of a genetic (QTL) map with the rice genome physical map. *Journal of Zhejiang University Science* 6B:382-388.
176. Webb CA, Richter TE, Collins NC, Nicolas M, Trick HN, Pryor T, and Hulbert SH. 2002. Genetic and molecular characterization of the maize *rp3* rust resistance locus. *Genetics* 162:381-394.
177. Westgate ME. 1996. Physiology of flowering in maize: Identifying avenues to improve kernel set during drought. In: Edmeades, G.O.; Bänziger, Martin; Mickelson, H.R; Peña Valdivia, Cecilia Beatriz (eds.). Developing drought- and low N-tolerant maize: Proceedings of a symposium, March 25-29, 1996, CIMMYT, El Batán, Mexico.
178. White JA, Scandalios JG. 1988. Isolation and characterization of a cDNA for mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD-3) of maize and its relation to other manganese superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 951:61-70.
179. Willenborg CJ, Wildeman JC, Miller AK, Rossnagel BG, Shirtliffe SJ. 2005. Oat germination characteristics differ among genotypes, seed sizes and osmotic potentials. *Crop Science* 45: 2023-2029.
180. Williams WP. 2003. Enhancing Maize Germplasm with Resistance to Aflatoxin Contamination. *Journal of Toxicology*. 22(2&3),175-193.
181. Windham GL. 2001. Evaluation of Corn Inbreds and Advanced Breeding Lines for Resistance to Aflatoxin Contamination in the Field. *Plant Disease*. 86(3) 232-234.
182. Windham GL, Williams WP, Buckley PM, Abbas HK. 2003. Inoculation Techniques Used to Quantify Aflatoxin Resistance in Corn. *Journal of Toxicology. Toxin Reviews* 22(2&3):313-325.
183. Winicov I, Bastola DR. 1999. Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiology* 120:473-480.
184. Wu JL. 2004. Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice. *Theor Appl Genet*. 108:1024-1032
185. Xiao FH, Xue GP. 2001. Analysis of the promoter activity of late embryogenesis abundant proteins in barley seedlings under conditions of water deficit. *Plant Cell Rep* 20:667-673.
186. Xie Y. 1991. Maize and Sorghum Simulations with CERES-Maize, SORKAM, and ALMANAC under Water-Limiting Conditions. *Agronomy Journal*, 93:1148-1155.
187. Xiong L, Lee M-W, and Yang Y. 2001. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *MPMI* 14:685-692.
188. Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell Supplement*: S165-S183.
189. Xiong L, Yang Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell*. 15:745-759.
190. Xiong L, Zhu JK. 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum* 112: 152-166.

191. Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho THD, Wu R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110:249-257.
192. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiology* 101:1119-1120.
193. Yan Z. 2005. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theor Appl Genet.* 110:766-777
194. Yang H, McCormick S. 2004. Transcriptome of *Zea mays* embryo sac. Unpublished. Accesión: CN845408 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
195. Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, and Shinozaki K. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal* 7:751-760.
196. Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Z-X, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata, N, Sasaki T. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1663-1668.
197. Young TE. 2004. ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *The Plant Journal.* 40:813-825.
198. Yu Y, Tomkins JP, Waugh R, Frisch DA, Kudrna D, Kleinhofs A, Bruggeman RS, Muehlbauer GJ, Wise RP, Wing RA. 2000. A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor Appl Genet* 101:1093-1099.
199. Zhang J, Zheng HG, Aarti A, Pantuwan G, Nguyen TT, Tripathy JN, Sarial AK, Robin S, Babu RC, Nguyen BD, Sarkarung S, Blum A, Nguyen HT. 2001. Locating genomic regions associated with components of drought resistance in rice: comparative mapping within and across species. *Theoretical and Applied Genetics* 103:19-29
200. Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, Neergard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H. 1998. Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiology* 117:33-41.
201. Zhu D, Scandalios JG. 1993. Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9310-9314.
202. Zhu J-K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology.* 53: 247-273.