



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Identificación de Genes Relacionados a Vigor,
Longevidad y Contaminación con Aflatoxinas en Semillas
de Maíz”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA:

GABRIEL COBIELLES CASTREJÓN

Comité tutorial

Dr. Ernesto Moreno Martínez¹, Dra. S. Patricia Miranda Castro¹ y Dr. Irineo Torres Pacheco²

Colaboradores y guías en el proyecto:

Dr. Ernesto Preciado Ortíz², Dr. Mario González Chavira², Dr. José L. Pons Hernández², Ing. Blanca A. Amaro González², Biol. Emiliano Villordo Pineda², M. en C. Martha Y. Quezada Viay¹. M. en C. Josefina Moreno Lara¹

¹Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México

²Unidad de Biotecnología, Campo experimental Bajío, CIR Centro, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

*Cuautitlán Izcalli, Edo de México
Septiembre 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.

AGRADECIMIENTOS

- A la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por la aportación en conocimiento, tecnología e infraestructura para la evaluación fenotípica de los materiales.
- A la Unidad Sede de Biotecnología del CIR-Centro del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por la aportación en conocimiento, tecnología e infraestructura para la evaluación molecular de los materiales.
- Al Dr. Ernesto Preciado Ortiz del CIR-Centro, y el banco de germoplasma del INIFAP por la aportación de los materiales objeto de estudio en este trabajo.
- A CONACYT por su apoyo al proyecto: “Determinación de mecanismos hereditarios y moleculares en la pérdida de vigor, longevidad y contaminación por aflatoxinas en maíz” clave SEP-CO2-43544.
- A CONACYT por su apoyo a través de la beca para estudiantes de maestría con No. de registro 193610.

CONTENIDO

i. ÍNDICE DE CUADROS

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

iii. RESUMEN

I. ANTECEDENTES

1.1 Importancia del maíz en el mundo

1.2 Importancia del maíz en México

1.3 Aflatoxinas en maíz

1.3.1 Riesgos a la salud

1.3.2 Niveles máximos permitidos

1.3.3 *Aspergillus flavus*

1.3.4 Tipos y estructura química de las aflatoxinas

1.3.5 Condiciones que favorecen la infección y contaminación

1.3.6 Medidas de control

1.4 Mecanismos de resistencia a infecciones

1.4.1 Genes R

1.4.2 Análogos a genes de resistencia

1.4.3 Estructura de los RGAs

1.4.4 RGAs como estrategia

1.4.5 Genes de defensa

1.4.6 Marcadores de tipo microsatélite

1.5 Vigor y longevidad

1.6 Una solución biotecnológica

II. HIPÓTESIS

III. OBJETIVOS

IV. MATERIALES

V. MÉTODOS

5.1 Diferencias en el nivel de vigor y longevidad

5.1.1 Prueba de germinación

5.1.2 Prueba de envejecimiento acelerado

5.1.3 Clasificación de los materiales en vigorosos y no-vigorosos

5.2 Diferencias en la resistencia a la contaminación con aflatoxinas

5.2.1 Determinación de humedad en las semillas

5.2.2 Inoculación con *Aspergillus flavus* y ajuste de humedad

5.2.3 Incubación con *Aspergillus flavus*

5.2.4 Extracción y determinación de aflatoxinas

5.2.6 Clasificación de los materiales en resistentes y susceptibles

5.3 Correlación entre nivel de vigor y longevidad y resistencia a la contaminación con aflatoxinas

5.4 Detección de polimorfismos

5.4.1 Obtención de oligonucleótidos para amplificación de RGAs

5.4.2 Obtención y diseño de oligonucleótidos para amplificación de genes

5.4.3 Obtención de oligonucleótidos para amplificación de microsatélites

5.4.4 Métodos comunes a las tácticas de RGAs, genes y microsatélites

5.4.4.1 Obtención de muestras de tejido

5.4.4.2 Extracción de DNA genómico

- 5.4.4.3 Electroforesis en gel de agarosa
- 5.4.4.4 Cuantificación y calidad de DNA
- 5.4.4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- 5.4.4.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida
- 5.4.4.7 Amplicones y su conversión de valor gráfico a matriz numérica
- 5.4.4.8 Determinación de % de frecuencia de bandas
- 5.4.4.9 Correlación entre el polimorfismo genético y el fenotipo
- 5.4.5 Métodos en RGAs
- 5.4.6 Métodos en genes
- 5.4.7 Métodos en microsatélites

VI. RESULTADOS

- 6.1 Diferencias en el nivel de vigor y longevidad
 - 6.1.1 Prueba de germinación y de envejecimiento acelerado
 - 6.1.2 Clasificación de los materiales en vigorosos y no-vigorosos
- 6.2 Diferencias en la resistencia a la contaminación con aflatoxinas
 - 6.2.1 Determinación de contenido de aflatoxinas
 - 6.2.2 Clasificación de los materiales en resistentes y susceptibles
- 6.3 Asociación entre el nivel de vigor y longevidad y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas
- 6.4 Detección de polimorfismos
 - 6.4.1 Obtención de oligonucleótidos
 - 6.4.2 Cuantificación y calidad de DNA
 - 6.4.3 PCR en gradiente
 - 6.4.4 Polimorfismos de interés
 - 6.4.4.1 Frecuencia de amplicones y R^2
 - 6.4.4.2 RGAs
 - 6.4.4.3 Genes de defensa
 - 6.4.4.4 Microsatélites

VII. DISCUSIÓN

- 7.1 Diferencias en el nivel de vigor y longevidad
- 7.2 Diferencias en la resistencia a la contaminación con aflatoxinas
- 7.3 Asociación del vigor y longevidad con la resistencia a contaminación con aflatoxinas
- 7.4 Detección de polimorfismos
 - 7.4.1 Asociación del polimorfismo con el nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas
 - 7.4.2 RGAs
 - 7.4.2 Genes
 - 7.4.3 Genes de defensa
 - 7.4.4 Genes de tolerancia a estrés abiótico (frío y calor)
 - 7.4.5 Genes asociados con vigor y longevidad
 - 7.4.6 Microsatélites asociados a contaminación con aflatoxinas

VIII. CONCLUSIONES

IX. REFERENCIAS

i. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Lista de materiales

Cuadro 2. Resultados de aflatoxinas en diversos genotipos de maíz según Williams, y colaboradores (2003).

Cuadro 3. Resultados de las pruebas de Germinación y de Envejecimiento Acelerado

Cuadro 4. Resultados de la determinación de aflatoxinas y de humedad en las semillas inoculadas con *A. flavus* en orden creciente de concentración

Cuadro 5. Resumen general de resultados de amplificación

Cuadro 6. Frecuencia de aparición y R^2 de amplicones polimórficos producidos en todos los materiales.

Cuadro 7. Resultados de amplificación para genes de función y secuencia conocida

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de los principales cereales.

Figura 2. Producción anual de maíz y otros cultivos en México

Figura 3. Límites máximos permitidos de aflatoxinas en alimento para animales

Figura 4. Estructura química de los principales tipos de aflatoxinas

Figura 5. Representación gráfica de la ubicación y estructura de las principales clases de proteínas R en plantas

Figura 6. Criterio de evaluación de semillas germinadas

Figura 7. Nube de dispersión de la *concentración de aflatoxinas y % de semillas normales* de la prueba de Envejecimiento Acelerado

Figura 8. Ejemplo de la verificación de calidad de DNA en gel de agarosa 1% posterior a las diluciones de DNA concentrado (10 ng/ μ L)

Figura 9. Imagen ejemplo de un gel de poliacrilamida con productos de amplificación con un oligonucleótido de la estrategia de RGAs

Figura 10. Imagen ejemplo de un gel de poliacrilamida con productos de amplificación con un oligonucleótido para un gen de defensa

Figura 11. Imagen ejemplo de un gel de poliacrilamida con productos de amplificación con un oligonucleótido para microsatélites

Figura 12. Imagen ejemplo de una matriz numérica creada a partir de las bandas obtenidas en un gel producido por el oligonucleótido ZMA16 para microsatélites

Figura 13. Cantidad de amplicones polimórficos generados en cada material con diferentes oligonucleótidos de la estrategia de RGAs

Figura 14. Nube de dispersión de la cantidad de amplicones polimórficos producidos con los oligonucleótidos XLRR y S2/AS1

iii. RESUMEN

Se realizó la caracterización y clasificación de 43 genotipos de maíz en base al nivel de vigor en sus semillas y a su resistencia a la infección contaminación con aflatoxinas (pruebas fenotípicas). Los mismos materiales se sometieron a pruebas moleculares para determinar la existencia de polimorfismo en su DNA genómico basado en estrategias de búsqueda de genes, RGAs y microsatélites. Se buscaron asociaciones entre los resultados moleculares y la caracterización fenotípica de las semillas. Se hallaron diferencias significativas en las características fenotípicas evaluadas. Se encontró polimorfismo genético entre los materiales. No se hallaron asociaciones claras entre los resultados moleculares y las características fenotípicas. Se encontraron características moleculares de interés para pruebas de mejoramiento genético del maíz con relación a resistencia biótica.

I. ANTECEDENTES

1.1 Importancia del maíz en el mundo

A partir del año 2001 el maíz se convirtió en el cultivo número uno en el mundo (ver Figura 1), superando la producción de arroz y trigo con más de 700 millones de toneladas métricas anuales (FAOSTAT, 2005). Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea con 1,800 kg/ha en los trópicos y 7,000 kg/ha en zonas templadas (Paliwal, 2001). En superficie de cultivo ocupa más de 120 millones de hectáreas anualmente (Munkvold, 2003). La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Hoy en día el maíz se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile. La mayor parte del maíz es cultivado a altitudes medias, pero se cultiva también por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3,800 msnm en la cordillera de los Andes. Mas aún, el cultivo continúa expandiéndose a nuevas áreas y a nuevos ambientes (Paliwal, 2001).

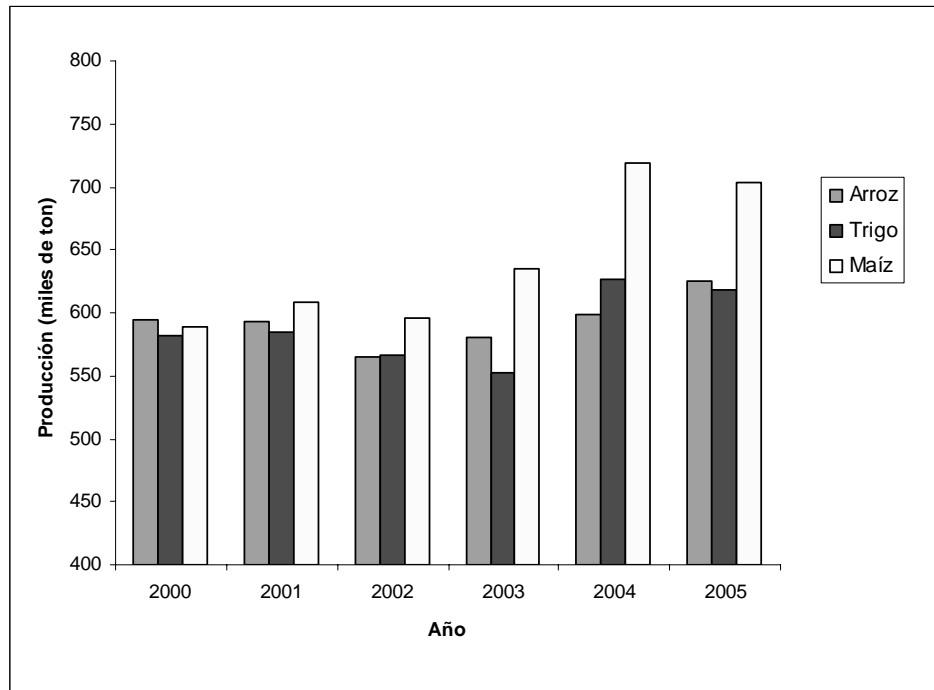


Figura 1. Producción mundial de los principales cereales. (Fuente: FAOSTAT, 2005)

1.2 Importancia del maíz en México

México es el centro de origen del maíz y su producción agrícola se caracteriza por una amplia diversidad de genotipos cultivados bajo distintas condiciones ambientales. La mayoría de las variedades producidas son razas de polinización abierta que son genotipos de maíz localmente adaptados seleccionados empíricamente por muchos años cuyas semillas son guardadas y plantadas en la siguiente temporada (Plasencia, 2004).

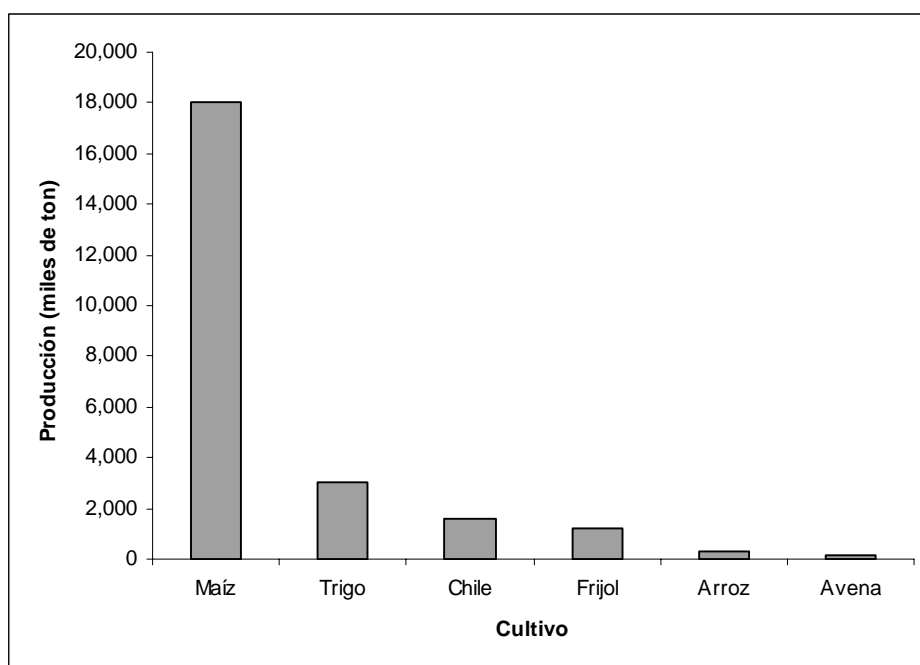


Figura 2. Producción anual de maíz y otros cultivos en México (Fuente: FAOSTAT, 2005).

El consumo de maíz en México es muy alto en comparación con otros cereales (ver Figura 2), su producción alcanza los 18 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2005). Gran parte es consumido en forma de productos cocidos alcalinamente como las tortillas. El consumo promedio de tortillas por habitante se estima hasta en 325 g/día (Plasencia, 2004). En México el 64% de la producción de maíz se destina para consumo humano, 22% para alimentación animal y el 14% restante para otros usos alimenticios e industriales (Ripsuduan, 2001).

1.3 Aflatoxinas en Maíz

La contaminación de granos de maíz con aflatoxinas es un problema serio que compromete la seguridad de alimentos y alimento para animales en todo el mundo (Bruns, 2003). La contaminación ocurre durante el cultivo y el almacenamiento. En México se tienen datos sobre algunos periodos de cultivo de maíz en los cuales se detectó contaminación con aflatoxinas. Así, en Tamaulipas, en 1989, se observó que el maíz estaba contaminado desde el campo, ya que muestreos previos a su almacenamiento reflejaron concentraciones de 45-65 ng/g. El mismo maíz, después de estar almacenado dos meses en condiciones de alta temperatura y humedad, alcanzó concentraciones de más de 250 ng/g (Anguiano-Ruvalcaba, 2005).

1.3.1 Riesgos a la salud

Las aflatoxinas se refieren a un grupo de cuatro micotoxinas (*B1*, *B2*, *G1*, y *G2*), siendo la aflatoxina B1 (*AFB1*) la de mayor interés por su elevada toxicidad y mayor incidencia. La ingestión de AFB1 se asocia con toxicidad hepática en humanos y en animales de granja. Estudios epidemiológicos realizados en África y Asia, indican que existe una correlación positiva entre cáncer hepático y consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas. La aflatoxina puede actuar como iniciadora y promotora de cáncer en humanos y en diversas especies animales. Cuando los organismos superiores ingieren alimentos contaminados con AFB1, esta micotoxina se absorbe en el intestino, entra al torrente sanguíneo, llega al hígado y ahí se convierte en epoxi-AFB1. Este compuesto se une covalentemente a macromoléculas celulares como las proteínas, DNA y RNA. El compuesto formado por AFB y el DNA se conoce como el dihidro-8-(N7-guanil)-9hidroxi-1-AFB1-N7-guanidina; es el que se forma en mayor cantidad cuando se consume aflatoxina B1 y llega a encontrarse en hígado, riñón y pulmones de las especies susceptibles. Se ha estudiado ampliamente el papel que juega el complejo AFB1-DNA en el mecanismo de carcinogénesis de la AFB1 y se ha demostrado que la replicación de DNA que contiene el complejo AFB1-N7-guanidina induce mutaciones de guanina-timina (Anguiano-Ruvalcaba, 2005).

1.3.2 Niveles máximos permitidos

La concentración de aflatoxinas en alimentos es regulada en la mayoría de los países del mundo. En México, la norma oficial establece como límite máximo de aflatoxinas 20 ng/g en alimentos de consumo humano, en el caso de alimento para animales varía desde 100 hasta 300 ng/g dependiendo de la especie animal y el tipo de producto final (ver Figura 3).

32 (Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 15 de octubre de 2002	
APENDICE NORMATIVO A	
A. De los límites permitidos para consumo animal.	
Los cereales con una concentración mayor de 20 µg/kg de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la siguiente tabla.	
Especie/etapa de producción	Límite máximo µg/kg
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

Figura 3. Fracción del apéndice “A” de la NOM-188-SSA1-2002 con los límites máximos permitidos de aflatoxinas en alimento para animales.

1.3.3 *Aspergillus flavus*

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por el hongo patógeno *Aspergillus flavus*. Los hongos del género *Aspergillus* son altamente aerobios y son encontrados en casi todos los ambientes ricos en oxígeno, donde normalmente crecen como mohos en la superficie de sustratos. Las especies de *Aspergillus* comúnmente contaminan alimentos ricos en almidón y crecen dentro o sobre plantas (Carrillo, 2003).

En el maíz en desarrollo, particularmente durante el crecimiento reproductivo, la sequía, el calor excesivo, la nutrición inadecuada de la planta, el ataque por insectos a los granos en

desarrollo, las hierbas, y diferentes enfermedades pueden causar el estrés de la planta. *Aspergillus flavus*, siendo un hongo saprófito oportunista, aprovecha el estado vulnerable de la planta para infectarla y contaminar los granos con la consecuente producción de aflatoxinas (Bruns, 2003).

1.3.4 Tipos y estructura química de las aflatoxinas

A. flavus produce aflatoxinas B1 y B2 principalmente, pudiendo algunas cepas producir aflatoxina G1. Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (celestes y verdosa) observada bajo luz UV mientras que los índices 1 y 2 indican componente mayor y menor respectivamente. Estas toxinas se encuentran con más frecuencia sobre oleaginosas aunque también en cereales, especialmente los de zonas cálidas. Las aflatoxinas M1 y M2 son el producto metabólico hidroxilado de las B1 y B2. Alrededor del 1% de la aflatoxina B1 consumida con el forraje en la alimentación de animales es excretada en leche como M1. (Carrillo, 2003).

Químicamente, las aflatoxinas están formadas por un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en aflatoxinas G. Estos metabolitos secundarios cuyas estructuras se observan en la Figura 4, son producidos por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina, a partir de un precursor policetónico (Carrillo L, 2003).

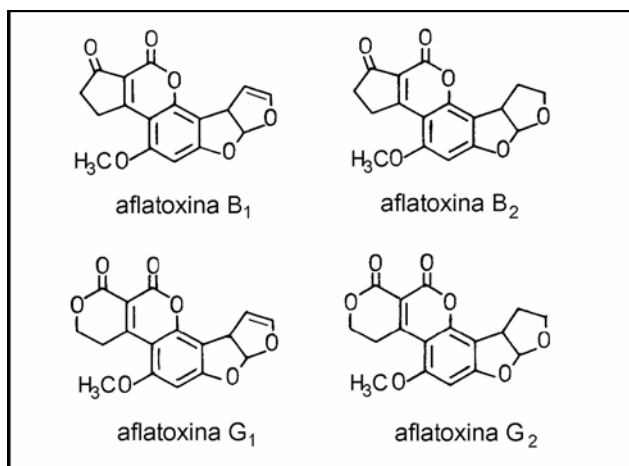


Figura 4. Estructura química de los principales tipos de aflatoxinas.

1.3.5 Condiciones que favorecen la infección y contaminación

En condiciones favorables *A. flavus* produce al cabo de 15 días, unos 300 ng de aflatoxinas por mL de medio YES (15% de sacarosa y 2% de extracto de levadura), a 30 °C y actividad del agua de 0,990. El rango de temperatura para la producción de aflatoxinas va de 7,5-12 a 40-41 °C según los hongos y las condiciones experimentales. Una humedad relativa menor del 85% detiene el crecimiento de los hongos productores de estas toxinas, lo que corresponde a un contenido de humedad del maíz de 16% y una actividad del agua igual a 0,85. La elaboración de las toxinas se produce poco después de la infección de las mazorcas a la temperatura ambiente y en dos días puede alcanzar una concentración de 200 ng/g, llegando a 2.000 ng/g luego de nueve días a 26-34 °C. (Carrillo, 2003)

En casi todo México, el maíz es producido en condiciones de riego por lluvia, con bajas aplicaciones de fertilizante y pesticidas y con consecuentes rendimientos bajos, probablemente albergando infección por *A. flavus* en plantas estresadas por sequía. (Plasencia, 2004). El mejoramiento de las condiciones de cultivo resulta excesivamente costoso en la mayoría de los casos.

Adicionalmente a esta problemática, existen estudios medioambientales asistidos por modelos informáticos que pronostican incrementos de temperaturas y cambios en los patrones de lluvia como consecuencia del calentamiento global. Se estima que durante las próximas décadas estas nuevas condiciones climáticas afectarán negativamente diversas regiones de América causando la pérdida de alrededor del 10% de la producción total de maíz (Jones, 2003). Este escenario futuro plantea también un potencial incremento de contaminaciones de cultivos con aflatoxinas.

1.3.6 Medidas de control

La necesidad de controlar la contaminación con aflatoxinas en alimentos y granos para alimentación animal está ampliamente reconocida. Se han aplicado prácticas de cultivo en

el maíz, entre ellas, las establecidas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); como lo son la rotación de cultivos, la fecha de siembra, la densidad de siembra, el manejo del riego y la fertilización. Estas medidas han limitado los efectos en la infección y la acumulación de la micotoxina en el maíz, pero sin resolver satisfactoriamente el problema (Moreno, 2004).

La prevención pre-cosecha, especialmente a través de la resistencia en el hospedero es probablemente la mejor estrategia y la más explorada ya que *A. flavus* infecta en todos los casos a los cultivos previo a su cosecha (Brown, 2003). Por lo tanto se hace indispensable establecer programas de mejoramiento genético tradicional, basados en la gran diversidad genética de maíz con que cuenta México.

1.4 Mecanismos de resistencia a infecciones

En el sistema patológico maíz-*A. flavus*, los factores que contribuyen a la resistencia en los granos de maíz y a la acumulación de aflatoxinas incluyen componentes del sub-pericarpio como proteínas preformadas o inducidas que inhiben el crecimiento del hongo o la producción de aflatoxinas (Guo, 1997). En el presente trabajo los genes que codifican a las proteínas preformadas son referidos como genes R y los que codifican a las proteínas inducidas son referidas como genes de defensa.

1.4.1 Genes R

La habilidad de una planta para resistir la infección por un patógeno potencial frecuentemente requiere de un alelo dominante o semi-dominante de un *gen de resistencia* (*R*). El producto proteico de dicho gen reconoce directa o indirectamente una señal generada vía un producto de gen de avirulencia (*avr*) codificado por el patógeno. Un modelo para explicar la base molecular de este fenómeno de reconocimiento ‘gen-por-gen’ declara que el producto del gen R es un receptor que específicamente se une al correspondiente ligando dependiente de *avr* derivado del patógeno. La formación de este supuesto complejo receptor-ligando inicia una cascada de señalización que culmina en

respuestas de defensa que combaten el progreso del patógeno. Estas respuestas comprenden la rápida muerte celular en el sitio de infección (respuesta hipersensible), una explosión oxidativa, endurecimiento de pared celular y la inducción de expresión de genes de defensa (Boyes, 1996), siendo estos últimos el segundo grupo de genes de interés particular en el presente trabajo (léase sección *Genes de defensa*).

1.4.2 Análogos a Genes de Resistencia

En fitopatología las iniciales RGA (*resistance gene analog*) hacen referencia a aquellos genes R que codifican proteínas con dominios conservados entre diferentes especies vegetales. El término en inglés *Resistance Gene Analogs* se traduce al español como *Análogos a Genes de Resistencia*. En biología molecular, análogos son genes o proteínas que muestran la misma actividad pero carecen de suficiente similitud para implicar un origen común (Fitch, 1970).

1.4.3 Estructura de los RGAs

Análisis estructurales y funcionales de los principales análogos a genes de resistencia a patógenos han mostrado que codifican proteínas con dominios conservados como son el sitio de unión a nucleótido (*nucleotide binding site o NBS*), dominios de cinasa y repeticiones ricas en leucina (*leucine rich repeat LRR*) (ver Figura 5). Son dominios responsables del reconocimiento de ligandos y transducción de señales. La secuencia de la porción central de los genes NBS-LRR, incluyendo al dominio NBS, han sido utilizados extensamente para identificar y clasificar a estos genes (Bai, 2002). Las secuencias de motivos conservados en los dominios NBS en diferentes clases de genes utilizadas para la búsqueda de RGAs en el presente trabajo son las secuencias de tipo P-loop, cinasa, LRR, GLPL, MHD, entre otras (Bai, 2002; Collins, 1998; Chen, 1998).

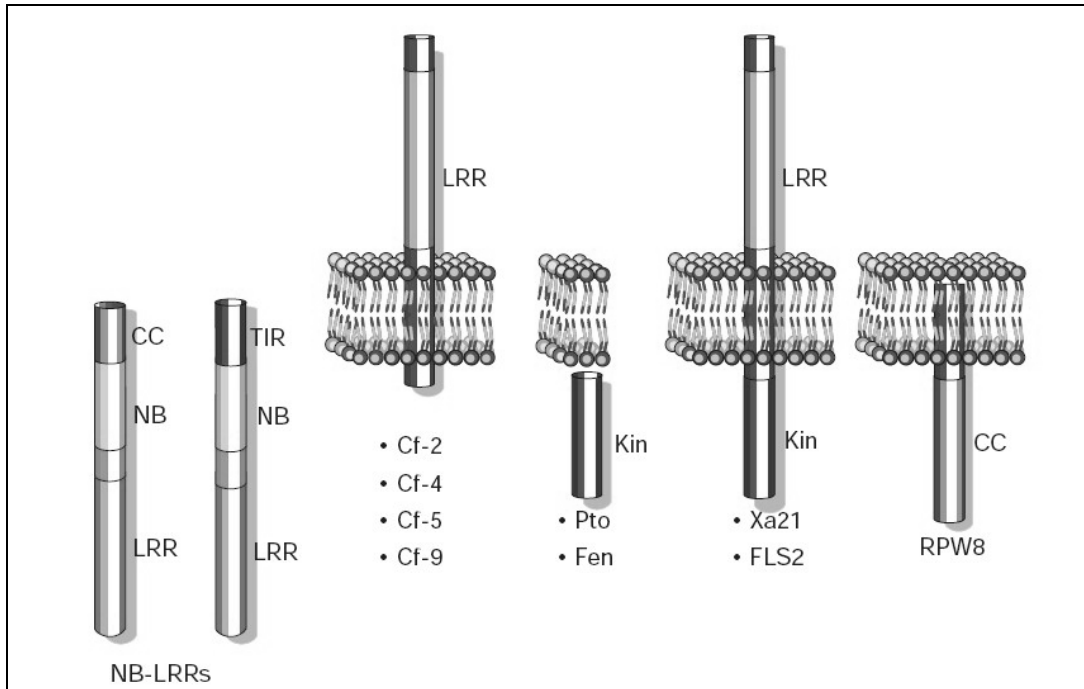


Figura 5. Representación gráfica de la ubicación y estructura de las principales clases de proteínas R en plantas. Las proteínas Xa21 y Cf-X llevan dominios transmembranales y LRRs extracelulares. El gen *Pto* codifica una kinasa Ser/Thr citoplasmática pero puede estar asociado a membrana. La clase más amplia de proteínas R, la clase NBS-LRR, son citoplasmáticas y llevan diferentes dominios N-terminales, la asociación de éstas a membrana es posible. Fuente: Dangl, 2001.

1.4.4 RGAs como estrategia

La búsqueda de RGA's puede ser una estrategia útil para la identificación de genes de resistencia que han sido identificados en una especie y se desean buscar en otra. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito para aislar genes de resistencia en plantas y para desarrollar marcadores moleculares. Por ejemplo, se ha reportado que la utilización de oligonucleótidos degenerados basados en dominios conservados como los LRR en especies como *Arabidopsis thaliana* o han sido útiles para la amplificación de productos homólogos en papa o en soya asociados a la resistencia contra hongos, virus y nemátodos. Otros trabajos reportan el uso exitoso de oligonucleótidos diseñados en base a cinasas de proteínas del tipo serina/treonina para aislar genes de resistencia a hongos patógenos en trigo (Chen, 1998). La identificación de RGAs también ha sido posible en maíz. Se ha reportado la identificación de loci cercanos a regiones de resistencia conocidas con la ayuda de sondas de RGAs y se sugiere el uso de poblaciones diferentes para ampliar el número de

éxitos y su aprovechamiento para su uso como marcadores moleculares para la selección de genes de resistencia en programas de mejoramiento convencional de cultivos (Collins, *et al.* 1998).

La búsqueda por RGAs es sencilla y rápida en comparación con otras estrategias ya que utiliza técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual se aplica sobre la totalidad del DNA genómico en una muestra. Al no requerir del uso de mRNA, síntesis de cDNA o la selección de muestras en estados de desarrollo específicos o de tejidos específicos, la búsqueda de RGAs se convierte en una estrategia confiable y fácil de aplicar.

1.4.5 Genes de defensa

Diferentes proteínas codificadas por genes de defensa han sido reportadas como elementos importantes de respuesta en las plantas frente al ataque de patógenos. En el maíz las proteínas de defensa incluyen hidrolasas como la quitinasa y glucanasa- β -1,3, las cuales degradan polisacáridos estructurales de la pared celular de hongos (Lozovaya, 1998; Wu, 1994); proteínas inactivadoras de ribosomas, que modifican e inactivan ribosomas extraños (Bass, 2004); zeamatina, la cual incrementa la permeabilidad de la membrana celular de hongos (Guo, 1997) y la proteína constitutiva inhibidora de tripsina de 14kDa que inhibe la amilasa fúngica (Chen, *et al.* 1998; Brown, 2003). En otros casos se han descubierto enfermedades nuevas inducidas por la mutación dirigida de determinados genes, como es el caso del gen *Hml* del maíz, el cual le confiere resistencia a la infección por el hongo patógeno *Cochliobolus carbonum*. (Multan, 1998).

La identificación de los genes correspondientes a estas proteínas, pueden proveer marcadores moleculares útiles para programas de mejoramiento o para facilitar la introducción de genes antifúngicos a través de ingeniería genética en cultivos susceptibles a aflatoxinas (Brown, 2003).

1.4.6 Marcadores de tipo Microsatélite

En los genomas existe un DNA ubicuo y abundante denominado "microsatélite" que consiste en mono-, di-, tri- y tetranucleótidos repetidos en tándem. Este DNA, que es muy polimórfico, se ha utilizado como marcador. Otro nombre común para los microsatélites es SSRs debido a su nombre en inglés (*single sequence repeats*) (Díaz, 1998)

Dada la longitud típica de los oligonucleótidos iniciadores para SSRs, los productos de la amplificación por PCR son altamente reproducibles y pueden ser usados confiablemente como marcadores moleculares de genomas de plantas siempre que revelen polimorfismo. Estos marcadores suelen "mapear" con loci específicos. Si dichos loci están ligados a genes involucrados en la expresión de alguna característica de interés, es posible, entonces, usar los correspondientes marcadores para la selección de esa característica (Ribaut, 1997). Los microsatélites, al no pertenecer necesariamente a secuencias de genes, no pueden considerarse secuencias codificantes de proteínas asociadas a alguna característica. Su uso en el caso de este trabajo se limitó a buscar polimorfismo entre genotipos y analizar los patrones de bandeo producidos para encontrar relaciones entre éstos y la clasificación de los materiales como resistentes o susceptibles.

Existen oligonucleótidos tipo SSR asociados a contaminación con aflatoxinas (Brooks, 2006), sus secuencias se encuentran disponibles en el banco de datos MaizeGDB en internet y algunos de ellos se mandaron sintetizar para ocuparse en el presente trabajo.

1.5 Vigor y longevidad

Existe evidencia de que las plantas de maíz provenientes de semillas vigorosas y longevas desarrollan una mayor resistencia a distintos tipos de estrés, bióticos y abióticos, lo cual incrementa las posibilidades de resistir a la infección por *A. flavus* y la contaminación por aflatoxinas.

El vigor de una semilla está dado por aquellas propiedades intrínsecas de las semillas, que determinan el potencial para el desarrollo rápido, la emergencia uniforme y desarrollo de

plántulas normales, bajo una amplia gama de condiciones de campo (AOSA, 2002). Una semilla longeva es aquella que, relativa a otras semillas, se mantiene viable durante tiempos largos de almacenamiento o bajo condiciones adversas de almacenamiento como alta temperatura y/o alta humedad. La habilidad de las semillas para soportar diferentes tipos de estrés que ocurren durante el almacenamiento es un aspecto de la longevidad en semillas. Hasta cierto punto, estos tipos de estrés se asemejan a aquellos que ocurren cuando las semillas embebidas son expuestas a condiciones desfavorables durante la germinación (Clerkx, 2004), es por esto que vigor y longevidad se consideran dos cualidades fuertemente ligadas y, comúnmente, son consideradas como una misma característica agronómica.

Una forma tradicional y ampliamente aceptada de determinar la longevidad de las semillas es la prueba de envejecimiento acelerado (*EA*). La prueba de *EA* somete a las semillas a un estrés abiótico de alta humedad y temperatura durante un tiempo definido, el efecto de dicho estrés y la capacidad de tolerancia al mismo se observan después aplicando la tradicional prueba de germinación de las semillas (AOSA, 2002).

Se han descrito genes o grupos de genes responsables de proporcionar a las semillas sus características de vigor y longevidad. Algunos autores han reportado candidatos de este tipo de genes, como la familia de genes del aseguramiento de longevidad (Yang and McCormick, 2004). Dado que la tolerancia al frío y al calor están asociadas también a la resistencia contra patógenos y que ambas condiciones son aplicadas en pruebas para la determinación de vigor y de longevidad (Clerkx, 2004; Munamava, 2004). Se ha considerado también la búsqueda de genes que codifican para las proteínas chaperoninas o proteínas de choque térmico (*hsp*s) (Bates, 1994), o las proteínas asociadas con la tolerancia a bajas temperaturas (Massonneau, 2005).

1.6 Una solución biotecnológica

Actualmente el fitomejoramiento genético se considera como el método de solución más factible. En México la amplia diversidad genética del maíz podría ser aprovechada para el desarrollo y explotación de nuevos híbridos de maíz que sean más resistente al estrés y a la

contaminación con aflatoxinas si se buscan e identifican genes de resistencia a la infección por *A. flavus* y genes asociados a vigor y longevidad. Las estrategias basadas en la búsqueda de amplicones asociados a genes R, genes de defensa, microsatélites y genes asociados a vigor, longevidad y tolerancia a estrés abiótico en el genoma del maíz pueden arrojar información de gran utilidad para dicha identificación.

II. HIPÓTESIS

- 1) La diversidad genética entre los materiales de maíz seleccionados es suficiente para determinar diferencias significativas en sus niveles de vigor y longevidad.
- 2) La diversidad genética entre los materiales de maíz seleccionados es suficiente para determinar diferencias significativas en sus niveles de resistencia a la contaminación con aflatoxinas.
- 3) Existe una relación directa entre el nivel de vigor y longevidad de los materiales y su nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas.
- 4) Existe suficiente diversidad genética en la capacidad de resistencia biótica de los materiales de maíz seleccionados para detectar polimorfismo genético.
- 5) Existe relación entre el polimorfismo genético en los materiales y su nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas.
- 6) Existe relación entre el polimorfismo genético en los materiales y su nivel de vigor y longevidad.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar diferencias entre genotipos de maíz en base al vigor y longevidad de sus semillas y a la resistencia de éstas a la contaminación con aflatoxinas, encontrar polimorfismo en su material genético asociado a dichas características y encontrar características moleculares de con potencial para su uso en programas de mejoramiento asistido por marcadores.

Objetivo específico 1:

Determinar diferencias entre genotipos en base a la resistencia de sus semillas a condiciones de envejecimiento acelerado (vigor y longevidad).

Objetivo específico 2:

Determinar diferencias entre genotipos en base a la resistencia de sus semillas a la infección por *A. flavus* y la contaminación con aflatoxinas.

Objetivo específico 3:

Encontrar polimorfismo genético en productos de amplificación con oligonucleótidos diseñados en base a: (1) secuencias conservadas de genes de resistencia (RGAs); (2) genes que codifican para proteínas de defensa, genes asociados con vigor y longevidad, y genes que codifican proteínas de tolerancia a estrés por frío y calor; y (3) microsatélites asociados a contaminación con aflatoxinas.

Objetivo específico 4:

Determinar la relación entre los polimorfismos detectados y las características fenotípicas evaluadas.

IV. Materiales

Los materiales comprenden semillas de 43 genotipos diferentes de maíz (ver Cuadro 1), proporcionadas por el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Juntos, componen una muestra amplia y representativa de la diversidad genética del maíz en México. Los materiales forman parte de los siguientes grupos:

- 25 colectas de maíz criollo seleccionadas con base en un trabajo previo en el que se encontraron colecciones de razas de maíz tolerantes al desarrollo de los hongos de almacén y al deterioro fisiológico producto de condiciones de almacenamiento adversas (Moreno, 2004)
- 8 materiales precoces seleccionados para sequía provenientes del CIRNOC-INIFAP en Zacatecas
- 3 líneas endogámicas y 2 variedades mejoradas procedentes de Río Bravo, zona donde la contaminación con aflatoxinas es prevalente
- 5 líneas aportadas por INIFAP, originarias del CIMMYT, de las cuales 4 son de alta calidad proteica o QPM. Estos maíces frecuentemente presentan genotipos débiles que pierden su vigor y longevidad con rapidez

Todos los materiales seleccionados para este trabajo fueron cultivados en el mismo lote y en la misma fecha de siembra. Lo anterior, para evitar que las diferencias que se manifiesten sean debidas a edad de las semillas, efectos del clima y de la calidad del suelo de la zona de producción o cualquier contingencia climática, así como para eliminar el efecto de diferentes formas de manejo del cultivo desde la siembra hasta el manejo poscosecha, ya que son factores que inciden en la calidad de la semilla y por lo tanto pueden crear confusiones al evaluar los resultados de resistencia o de susceptibilidad al envejecimiento.

Cuadro 1. Lista de materiales

Clasificación	Clave
Colectas de maíz criollo (origen IG0405)	INIFAP-ZM-002
	INIFAP-ZM-003
	INIFAP-ZM-004
	INIFAP-ZM-005
	INIFAP-ZM-006
	INIFAP-ZM-007
	INIFAP-ZM-008
	INIFAP-ZM-009
	INIFAP-ZM-010
	INIFAP-ZM-011
	INIFAP-ZM-012
	INIFAP-ZM-013
	INIFAP-ZM-014
	INIFAP-ZM-015
	INIFAP-ZM-016
	INIFAP-ZM-017
	INIFAP-ZM-018
	INIFAP-ZM-019
	INIFAP-ZM-020
	INIFAP-ZM-021
	INIFAP-ZM-022
	INIFAP-ZM-023
	INIFAP-ZM-024
	INIFAP-ZM-025
	INIFAP-ZM-026

Cuadro 1. (continuación)

Clasificación	Clave	
Materiales genéticos 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-036
		INIFAP-ZM-037
INIFAP-ZM-038		
INIFAP-ZM-041		
INIFAP-ZM-042		
Líneas QPM procedentes de CIMMYT	INIFAP-ZM-145	
	INIFAP-ZM-150	
	INIFAP-ZM-162	
	INIFAP-ZM-173	
	INIFAP-ZM-182*	

*Línea no QMP

V. MÉTODOS

5.1 Diferencias en el nivel de vigor y longevidad

5.1.1 Prueba de germinación. Se llevó a cabo la prueba de germinación de semillas en rollos de papel descrita por Moreno, 1996. Los rollos se incubaron durante 4 días a 27°C. Se cuantificaron semillas normales, anormales y muertas; el *% de semillas con germinación normal* es igual al cociente de semillas normales entre semillas totales multiplicado por 100. Las plántulas se consideraron normales o anormales conforme a Moreno, 1996. (ver figura 1). El experimento consistió de un diseño completamente aleatorio con 4 repeticiones de 100 semillas. La variable independiente fue el genotipo; la variable de respuesta fue el *% de semillas con germinación normal*.

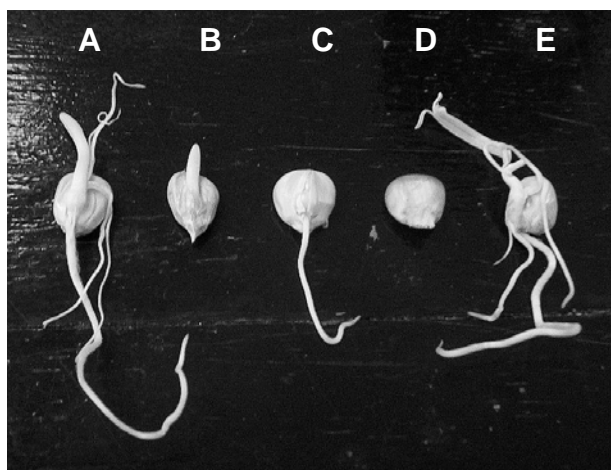


Figura 6. Criterio de evaluación de semillas germinadas. A es normal; B y C son anormales, D es semilla muerta y E es anormal (por plúmula dividida).

5.1.2 Prueba de envejecimiento acelerado (EA). La prueba se desarrolló como se describe en Moreno, 1996. Las muestras se ingresaron en cámaras a 40 °C y 100% HR durante 6 días. Posteriormente se aplicó la prueba de germinación descrita en el apartado 5.1.1. El experimento consistió de un diseño completamente aleatorio con 4 repeticiones de 50 semillas. Nuevamente la variable independiente fue el genotipo y la variable de respuesta fue el *% de semillas con germinación normal*. Con el fin de eliminar la influencia que ejerce la capacidad germinativa de las semillas sobre el resultado en las pruebas de

vigor, los valores de *% de semillas normales* obtenidos en la prueba de envejecimiento acelerado se ponderaron con los valores de *% de semillas normales* obtenidos en la prueba de germinación, para reportarse así como *media ponderada de % de semillas normales*.

5.1.3 Clasificación de materiales vigorosos y no-vigorosos

Para buscar asociaciones entre los resultados de nivel de vigor y longevidad y otras características fenotípicas y moleculares evaluadas, los materiales se clasificaron en vigorosos, intermedios y no-vigorosos. Se consideraron como genotipos vigorosos a todos aquellos que no difirieron significativamente del valor máximo obtenido de *% de germinación* en la prueba de envejecimiento acelerado y se consideraron como no-vigrosos a aquellos genotipos que no difirieron significativamente del valor mínimo en la misma prueba. Los valores restantes se clasificaron como intermedios.

5.2 Diferencias en la resistencia a la contaminación con aflatoxinas

5.2.1 Determinación de humedad en las semillas. La prueba obedeció a la prueba de contenido de humedad con base en peso húmedo descrito por Moreno, 1996. Se realizó por triplicado tomando 5 semillas por muestra. Tiempo, 72 horas a temperatura de 103 °C. Esta prueba se aplicó a los materiales previo a su inoculación con el hongo y después de la incubación con el hongo. La finalidad de esta prueba es conocer la humedad de la semilla antes de inocular para determinar la cantidad de agua para el ajuste y para verificar que se haya mantenido la humedad adecuada hasta el final de la incubación. El cálculo de humedad se hizo como sigue:

$$\%H = \frac{A}{Wi} * 100$$

Donde

%H = contenido de humedad

A = pérdida de agua (diferencia de peso húmedo y peso seco)

Wi = peso húmedo de la muestra

5.2.2 Inoculación con *Aspergillus flavus* y ajuste de humedad. Para la inoculación de las semillas se ocupó la cepa #45 de *A. flavus* (mayor productora de aflatoxinas), la cual se cultivó primero en medio Czapek. De la cepa sembrada se extrajo una suspensión de esporas que se diluyó hasta una concentración de 500 mil esporas/mL, cuantificada en hemocitómetro. Cada muestra de 150g de semillas de maíz se introdujo en un frasco de vidrio y se le vertió 1 mL de la suspensión de esporas mas la cantidad necesaria de agua para ajustar el contenido de humedad hasta 18.5%. Los frascos de vidrio que contenían las semillas se mantuvieron en agitación continua hasta alcanzar la completa incorporación del agua. El cálculo para agregar agua se hizo como sigue:

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

Donde

A = cantidad de agua a agregar

H_d = humedad determinada

H = humedad deseada (18.5%)

W = peso de la muestra

5.2.3 Incubación con *Aspergillus flavus*. Una vez ajustadas e inoculadas las semillas, se separaron las muestras en 3 repeticiones de 50g cada una dentro de frascos de vidrio con respiraderos para su incubación a 28°C y a 100% de humedad relativa durante 15 días.

5.2.4 Extracción y determinación de aflatoxinas. Todas las muestras fueron esterilizadas en autoclave previo a la extracción de aflatoxinas. La molienda de las muestras, la extracción y la lectura de aflatoxinas se llevó a cabo como se describe en la NOM-188-SSA1-2002 apéndice C.0 al C.3. La prueba generó lecturas por triplicado para cada genotipo en ng/g de aflatoxinas totales. Se hizo un análisis de varianza con las medias de concentración de aflatoxinas. Para homogenizar las varianzas, los datos se transformaron sumando 1 y calculando el logaritmo a cada número [$\log (y + 1)$] antes del análisis estadístico. Las medias se compararon con la prueba *post-hoc* de LSD ($P = 0.05$) (Williams, 2003). Para permitir la comparación de los resultados con otros trabajos referenciados, se convirtió el dato de media a porcentaje de contaminación con aflatoxinas (%A).

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

Donde

$\%A$ = porcentaje de contaminación con aflatoxinas

a = valor de concentración de aflatoxinas

a_{\max} = valor máximo de contenido de aflatoxinas

5.2.6 Clasificación de materiales en resistentes y susceptibles. Para poder clasificar los materiales como resistentes y susceptibles en base al resultado de la prueba de determinación de aflatoxinas, se compararon con datos de pruebas similares previamente reportados. Una línea que ha sido ocupada como control susceptible es la Mp339, la cual ha exhibido elevados niveles de contaminación con aflatoxinas (Williams, 2003). Por otro lado, la línea Mp313E, es ampliamente reconocida como fuente de resistencia a aflatoxinas (Brooks, 2005; Brown, 1998; Williams, 2003). En un trabajo reportado por Williams y colaboradores (2003), las líneas Mp339 y Mp313E se usaron como control junto con otros 21 genotipos en un trabajo de evaluación de germoplasma de maíz en base a la resistencia a la contaminación con aflatoxinas. La prueba reportada confirma la naturaleza de ambos controles al colocarse en extremos contrarios dentro del rango de resultados. Estos resultados se convirtieron a porcentaje de contaminación con aflatoxinas ($\%A$) como se describe en el apartado 5.2.4. De esta forma se seleccionaron como resistentes todos los genotipos que no difieren significativamente del control resistente; de forma similar se seleccionaron los genotipos susceptibles (ver Cuadro 2). De esta manera, se formaron rangos de porcentaje de resistencia y de susceptibilidad. Estos rangos de porcentaje en los datos de la referencia se extrapolaron a los resultados del propio trabajo para hacer la clasificación de los materiales.

Cuadro 2. Resultados de aflatoxinas en diversos genotipos de maíz según Williams, y colaboradores (2003). Aparecen sombreados los controles y los genotipos con resultados no significativamente diferentes a éstos.

Genotipo	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-5-3-1-1-1-1-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

5.3 Correlación entre nivel de vigor y longevidad y resistencia a la contaminación con aflatoxinas.

Con el propósito de determinar si existe asociación entre el nivel de vigor de las semillas y su tolerancia a la contaminación con aflatoxinas se calculó el coeficiente de correlación R^2 entre ambas variables mediante los puntos de datos de la variable *% de germinación* y la variable *contenido de aflatoxinas*. El valor R^2 puede interpretarse como la proporción de la varianza de la primera variable que puede atribuirse a la varianza de la segunda. Para los cálculos de R^2 se consideraron sólo los materiales que se evaluaron en ambas pruebas. De esta manera, la R^2 se calculó a partir de un espacio muestral de 40 pares de datos. El tratamiento de los datos para el cálculo de R^2 se hizo con el software *Microsoft Office Excel ver. 2003*.

5.4 Detección de polimorfismos

5.4.1 Obtención de oligonucleótidos para amplificación de RGAs

Se realizó una búsqueda bioinformática para la obtención de artículos científicos sobre de RGAs en diversas especies de cultivos. Las herramientas de búsqueda fueron los buscadores *Google Scholar* (www.scholar.google.com) y *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov). El producto de la búsqueda fueron artículos que contienen secuencias de oligonucleótidos para la amplificación de genes R usados con éxito previamente en especies de cultivos diferentes al maíz.

5.4.2 Obtención y diseño de oligonucleótidos para amplificación de genes

Se realizó una búsqueda bioinformática para la obtención de información para la amplificación de genes de defensa a estrés biótico, genes asociados a vigor y longevidad, y genes de tolerancia al estrés por calor y frío. Las herramientas de búsqueda fueron los buscadores *Google Scholar* (www.scholar.google.com) y *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov). El producto de búsqueda fueron accesiones a secuencias de DNA y cDNA (todas de *Zea mays*) en los bancos de datos *NCBI*, en su mayoría referidas en artículos de investigación.

Para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores se utilizaron las secuencias completas de DNA o cDNA encontradas en *NCBI* y se ingresaron al programa de software *DNASar PrimerSelect v5.06* en el cual se desarrollaron las secuencias de oligonucleótidos más adecuadas para cada gen en base a los siguientes criterios:

- Tamaño de oligonucleótido iniciador: 22-30 pb
- Tamaño de producto de amplificación: 250-1200 pb
- T_m (*melting point*): 35-65°C
- %CG: 40-60

Posteriormente, cada oligonucleótido se verificó en línea para asegurar que no existieran riesgos de hibridación entre los pares de oligonucleótidos (Mullis et al. 1994). Para esto se ocupó el software en línea *OligoAnalyzer* de *idtDNA* con los siguientes criterios.

- Apareamiento en orquilla o *hairpin*: 4 pb máximo
- Auto apareamiento (auto-dímero y hetero-dímero): 4 pb máximo

Para obtener complementos inversos se ocupó el programa de software en línea *Reverse Complement* de *Bioinformatics*.

5.4.3 Obtención de oligonucleótidos para amplificación de microsatélites

Se realizó una búsqueda bioinformática para la obtención de información para la amplificación de microsatélites asociados a la contaminación con aflatoxinas en *Zea mays*. La herramienta de búsqueda fue el sitio *MaizeGDB* (www.maizegdb.org) de *USDA-ARS*. El producto de búsqueda fueron secuencias de oligonucleótidos para la amplificación de secuencias de microsatélites.

Una vez obtenidas todas las secuencias necesarias de oligonucleótidos se mandaron sintetizar con un proveedor externo (*Accesolab S.A.de C.V.* representante en México de *Invitrogen Life Technologies, Inc. E.U.A.*).

5.4.4 Métodos comunes a las tácticas de RGAs, genes y microsatélites

Para lograr la obtención de las imágenes que permiten la detección y análisis de polimorfismos, se requirió realizar cada una de las siguientes pruebas en común para todas las tácticas moleculares.

5.4.4.1 Obtención de muestras de tejido. Se obtuvieron muestras de tejido foliar a partir de plantas con 20 días de edad siendo una muestra por cada genotipo. Cada muestra consistió de 10 fragmentos de 1 cm² cada uno, a partir de hojas jóvenes, limpias y sanas

provenientes de 10 individuos diferentes. Las muestras se congelaron con N₂ líquido inmediatamente después del corte y se almacenaron a -70 °C.

5.4.4.2 Extracción de DNA genómico. Cada muestra fue molida en frío en mortero con pistilo hasta obtener un polvo fino que se repartió en tubos *ependorf* por triplicado en volúmenes de 300 µL aproximadamente. Cada muestra se sometió a proceso de extracción según el método de sarcosina descrito por Lopes y Larkins, 1995. Los extractos de DNA se almacenaron a 4 °C en tubos *ependorf*.

5.4.4.3 Electroforesis en gel de agarosa. El producto de las extracciones se visualizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en solución de TAE 1X. Se emplearon 100 ng de marcador lambda (λ) como referencia. El tiempo de corrida fue de 2 horas a un voltaje constante de 80 voltios. El equipo utilizado fue una cámara modelo A4 de *Owl Separation Systems*. La fotografía y tratamiento de imágenes se realizó con los mismos equipos y programas antes mencionados.

5.4.4.4 Cuantificación y calidad de DNA. La calidad de DNA se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en solución de TAE 1X. Se cargaron 2 µL del extracto obtenido de DNA de cada muestra. Se tiñó el gel en solución de bromuro de etidio y se fotografió con un transiluminador *Chemidoc XRS*, marca *Biorad*. El almacenamiento de imagen con el software *Quantity One V.4.5.0*. La cuantificación de DNA se hizo de forma digital sobre fotografía TIF con el software *Kodak Digital Science V.3.0.1*. Una vez que se determinó la concentración de DNA en las soluciones stock se diluyeron para obtener una concentración estandarizada final de 10 ng/µL.

5.4.4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las pruebas de PCR se llevaron a cabo bajo las condiciones y concentraciones que se muestran en el Anexo 1. A todos los oligonucleótidos se les realizaron pruebas previas de PCR en gradiente de temperatura para determinar su *T_m* más adecuada. La temperatura media programada en cada gradiente se eligió previamente en base al promedio de las *T_m* del oligonucleótido directo y reverso calculadas con ayuda del software en línea *IDT-DNA OligoAnalyzer* donde se ingresó la

secuencia de cada oligonucleótido. La información de los oligonucleótidos que se probaron en el presente trabajo aparece en el anexo 2. El equipo utilizado fue un termociclador de 96 pozos marca *Hybaid*, modelo *PCR Express*. El material usado como control para el PCR en la estrategia RGAs con oligos S2/AS1 fue el chile híbrido Coloso serrano, el cual se conoce que produce bandas definidas al amplificarse con dichos oligonucleótidos. Los materiales usados como control para el PCR en la estrategia de Microsatélites fueron los maíces B73, Mo17 y Tx303, las cuales son líneas con resultados reportados para esta misma prueba en la base de datos *MaizeGDB*.

5.4.4.6 Electroforesis en gel 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. Se empleó como marcador de referencia 100 ng de 1Kb plus de *Invitrogen*. El tiempo de corrida fue de 2 horas a un voltaje constante de 250 voltios. El equipo utilizado fue una cámara con capacidad de 60 pozos, fabricada en los laboratorios de la Unidad Sede de Biotecnología del INIFAP (patente pendiente). La fotografía y tratamiento de imágenes se realizó con los mismos equipos y programas mencionados en el apartado 5.4.4.4.

5.4.4.7 Amplicones y su conversión de valor gráfico a matriz numérica. La detección de polimorfismo entre materiales se logró por medio del análisis de los amplicones producidos con cada oligonucleótido. Para fines de este trabajo, se consideraron amplicones a aquellas bandas que en un gel se encuentran a la misma altura entre diferentes genotipos, es decir, que tienen el mismo tamaño en pares de bases. Estos amplicones pueden o no ser polimórficos. Se consideraron amplicones polimórficos a aquellos que están presentes en algunos materiales y ausentes en otros, por la misma razón, los amplicones no polimórficos son aquellos que están presentes en todos los genotipos. Para poder cuantificar y analizar los amplicones generados, se tomaron en cuenta sólo los amplicones polimórficos.

La información gráfica en el gel se convirtió en información numérica transfiriéndola a matices de datos donde se asignó el valor “1” a la presencia de banda y un “0” a la ausencia. Esta labor se llevó a cabo por medio de observación de las imágenes digitales de

geles en pantalla. Las escaleras de DNA *phiX174* y *1 Kb plus* se usaron como referencia en los geles para determinar el tamaño en pares de bases de cada amplicón.

5.4.4.8 Determinación de % de frecuencia

Una variable de interés es la frecuencia de aparición de un amplicón, la cual se calcula en base a su presencia/ausencia entre genotipos. Un amplicón que aparece en pocos genotipos tendrá un valor bajo de frecuencia, un amplicón que aparece en casi todos los genotipos tendrá un valor elevado de frecuencia. Un amplicón tiene mayores posibilidades de uso como marcador cuando su valor está entre 40 y 60%. El *porcentaje de frecuencia* se calculó para cada amplicón de acuerdo con la siguiente ecuación.

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

Donde:

$\%F$ = porcentaje de frecuencia del amplicón

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

n = total de materiales evaluados en la amplificación

5.4.4.9 Correlación entre el polimorfismo genético y el fenotipo

Con el propósito de determinar si existe asociación entre el polimorfismo detectado y las características fenotípicas evaluadas, para cada amplicón polimórfico se calculó el coeficiente de correlación R^2 entre la variable de presencia/ausencia de banda (obtenido de las matrices de datos) y el nivel del valor fenotípico. Para determinar la correlación del polimorfismo genético y el nivel vigor y longevidad, los pares de datos se formaron sólo con genotipos clasificados como vigorosos y como no-vigorosos (sin considerar intermedios); para determinar la correlación del polimorfismo genético y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas, los pares de datos se formaron sólo con genotipos clasificados como resistentes y como susceptibles (sin considerar intermedios); los espacios muestrales fueron de 20 pares de datos en cada prueba de correlación. El tratamiento de los datos se hizo con el software *Microsoft Office Excel ver. 2003*.

5.4.5 Métodos en RGAs

Además de la determinación de polimorfismo, los resultados de la táctica de RGAs, en su forma de matriz numérica, se utilizaron para la búsqueda de genotipos con mayor número de amplicones o “unos” producidos por oligonucleótido. Aquellos genotipos que presentan mayores cantidades de amplicones son considerados como mejores fuentes de material genético asociado a la resistencia biótica.

5.4.6 Métodos en genes

El caso de la táctica de amplificación de genes es el único en el que se puede esperar un tamaño de banda específico. Cuando se genera una banda que coincide con el tamaño esperado, es señal de un probable hallazgo exitoso del gen. Aún así, no debe restarse importancia a los amplicones que aparecen con tamaños superiores al esperado, ya que, las secuencias en las que se basa el tamaño esperado provienen en muchos casos de accesiones reportadas como mRNA o cDNA (especificados en el Anexo 1), lo que implica la posible existencia de intrones eliminados y consecuentes cambios de tamaño. Por tanto, además de la determinación de polimorfismo y búsqueda de asociaciones con el fenotipo, una actividad adicional en la táctica de genes es la determinación de *amplicones candidatos a la secuenciación* para confirmar el hallazgo de los genes buscados.

5.4.7 Métodos en microsatélites.

Los resultados de la táctica de microsatélites, en su forma de matriz numérica, se utilizaron para la búsqueda de *patrones de bandeo* relacionados a la resistencia o susceptibilidad a contaminación con aflatoxinas. Esto se hizo observando cuáles de los amplicones generados coinciden entre los grupos de materiales clasificados como resistentes o entre los clasificados como susceptibles. Aquel amplicón que aparece en todos o en la mayoría de los materiales de un grupo pero no en el otro es considerado como un buen candidato para utilizarse como marcador molecular asociado a la característica.

VI. RESULTADOS

6.1 Diferencias en el nivel de vigor y longevidad

6.1.1 Prueba de germinación y de envejecimiento acelerado

Los resultados de la prueba de Envejecimiento Acelerado (EA) se presentan en forma de *porcentaje de semillas con germinación normal*, el cual fue ponderado con el resultado de la prueba previa de germinación. El número total de materiales evaluados fue 39 (4 no fueron evaluados por muestra insuficiente). El rango de valores de EA abarcó desde 0.0% en 10 diferentes materiales aumentando progresivamente hasta 90.7% para el genotipo ZM022. El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre los materiales (ver Cuadro 3).

6.1.2 Clasificación de los materiales en vigorosos y no-vigorosos

En el Cuadro 3 aparece sombreado el grupo de los primeros 13 genotipos y el grupo de los últimos 6, los cuales se clasificaron como no-vigorosos, y vigorosos respectivamente, los valores dentro de cada grupo no difieren significativamente entre sí. Los valores restantes se clasificaron como intermedios.

6.2. Diferencias en la resistencia a la contaminación con aflatoxinas

6.2.1 Determinación de humedad y de contenido de aflatoxinas

La prueba de determinación de humedad aplicada a las muestras inoculadas con *A. flavus* confirmó que el ajuste previo de humedad fue exitoso, ya que resultó en un rango de 17.2 a 19.3%, humedad que favorece el desarrollo del hongo (ver Cuadro 4). Los niveles de aflatoxinas totales en los materiales abarcaron desde los 23 ng/g en el genotipo ZM-033 aumentando progresivamente hasta los 1053 ng/g en el genotipo ZM182, el análisis de varianza muestra diferencias significativas entre los materiales (ver cuadro 4). El rango es similar con otros trabajos reportados donde las lecturas más bajas oscilan en el orden de las unidades y las más altas en el orden de los millares (ver Cuadro 2). Los datos también se presentan en porcentaje de contaminación (%A).

Cuadro 3. Resultados de las pruebas de Germinación y de Envejecimiento Acelerado (ambos en % de semillas con germinación normal), ordenados por resultado de EA en orden creciente.

Material Clave	Germinación (%) Media	EA (%) Media ponderada
INIFAP-ZM-008	98.8	0.0a
INIFAP-ZM-016	98.5	0.0a
INIFAP-ZM-017	99.3	0.0a
INIFAP-ZM-030	98.3	0.0a
INIFAP-ZM-031	98.8	0.0a
INIFAP-ZM-033	96.0	0.0a
INIFAP-ZM-034	98.5	0.0a
INIFAP-ZM036	99.3	0.0a
INIFAP-ZM-037	99.5	0.0a
INIFAP-ZM-038	99.3	0.0a
INIFAP-ZM-005	96.3	1.6 a
INIFAP-ZM-015	98.8	2.0a
INIFAP-ZM-032	99.0	6.7 a
INIFAP-ZM-007	100.0	18.3b
INIFAP-ZM-026	95.8	24.5b
INIFAP-ZM-145	95.3	35.4c
INIFAP-ZM-027	98.8	36.7cd
INIFAP-ZM-150	90.0	44.7d
INIFAP-ZM-009	99.0	51.3e
INIFAP-ZM-010	99.0	53.8e
INIFAP-ZM-019	96.8	56.3ef
INIFAP-ZM-028	99.0	61.6f
INIFAP-ZM-011	99.3	63.5fg
INIFAP-ZM-004	99.5	63.8fg
INIFAP-ZM-012	97.5	70.3g
INIFAP-ZM-182	99.8	75.9h
INIFAP-ZM-020	97.5	77.2h
INIFAP-ZM-173	99.3	77.6h
INIFAP-ZM-021	98.3	77.9hi
INIFAP-ZM-038	99.0	79.0hi
INIFAP-ZM-013	99.5	80.4hi
INIFAP-ZM-024	97.8	81.0hi
INIFAP-ZM-042	99.5	83.9i
INIFAP-ZM-018	98.8	85.1ij
INIFAP-ZM-029	98.3	86.5ij
INIFAP-ZM-003	99.5	86.9ij
INIFAP-ZM-023	97.0	88.3ij
INIFAP-ZM-041	99.8	89.0ij
INIFAP-ZM-022	99.5	90.7j

Cuadro 4. Resultados de la determinación de aflatoxinas y de humedad en las semillas inoculadas con *A. flavus* en orden creciente de concentración.

Material Clave	Aflatoxinas (ng/g)		Contenido de humedad (%)
	Media	Aflatoxinas (%)	
INIFAP-ZM-033	23a	2.2	18.3
INIFAP-ZM-015	35a	3.3	17.5
INIFAP-ZM-042	66ab	6.3	17.8
INIFAP-ZM-150	71a-c	6.7	19.2
INIFAP-ZM-009	79a-c	7.5	17.9
INIFAP-ZM-016	81a-c	7.7	18.0
INIFAP-ZM-025	96a-d	9.1	17.8
INIFAP-ZM-017	122a-d	11.6	17.9
INIFAP-ZM-011	127a-d	12.1	18.1
INIFAP-ZM-010	129a-d	12.3	17.7
INIFAP-ZM-012	133a-e	12.6	17.7
INIFAP-ZM-019	149b-f	14.2	17.9
INIFAP-ZM-041	189b-f	17.9	18.3
INIFAP-ZM-022	253b-g	24.0	17.3
INIFAP-ZM-034	273c-h	25.9	17.7
INIFAP-ZM-037	327c-h	31.1	18.4
INIFAP-ZM-013	333c-h	31.6	17.6
INIFAP-ZM-005	333c-h	31.6	17.8
INIFAP-ZM-008	367d-h	34.9	17.9
INIFAP-ZM-002	397d-h	37.7	17.9
INIFAP-ZM-020	407d-h	38.7	17.7
INIFAP-ZM-162	467d-h	44.3	18.8
INIFAP-ZM-004	473d-h	44.9	17.9
INIFAP-ZM-036	487d-h	46.2	17.2
INIFAP-ZM-003	503e-h	47.8	17.9
INIFAP-ZM-021	520e-h	49.4	17.9
INIFAP-ZM-006	607e-h	57.6	17.7
INIFAP-ZM-023	627f-h	59.5	18.1
INIFAP-ZM-028	627f-h	59.5	18.0
INIFAP-ZM-029	660f-h	62.7	18.2
INIFAP-ZM-145	667f-h	63.3	18.7
INIFAP-ZM-014	687f-h	65.2	18.4
INIFAP-ZM-018	700g-h	66.5	18.3
INIFAP-ZM-173	713gh	67.7	19.3
INIFAP-ZM-007	720gh	68.4	17.9
INIFAP-ZM-026	740gh	70.3	18.3
INIFAP-ZM-032	747gh	70.9	18.1
INIFAP-ZM-024	820gh	77.9	18.0
INIFAP-ZM-030	827gh	78.5	18.2
INIFAP-ZM-027	860gh	81.7	17.8
INIFAP-ZM-038	927gh	88.0	18.2
INIFAP-ZM-031	1020h	96.9	17.9
INIFAP-ZM-182	1053h	100.0	18.4

6.2.2 Clasificación de los materiales en resistentes y susceptibles

En el Cuadro 4 aparecen sombreados los primeros 11 genotipos y los últimos 22, los cuales se han clasificado conforme a la metodología descrita en el apartado 5.2.6. Los resultados de contenido de humedad confirman que la etapa transcurrió en los niveles de humedad adecuados para el desarrollo del hongo.

6.3 Asociación entre el nivel de vigor y longevidad y la resistencia a la contaminación con aflatoxinas

Los 40 pares de datos ingresados en la prueba de correlación produjeron puntos ampliamente dispersos en el gráfico y un valor $R^2=0.0123$. La pendiente de la recta de aproximación es positiva (ver Figura 7).

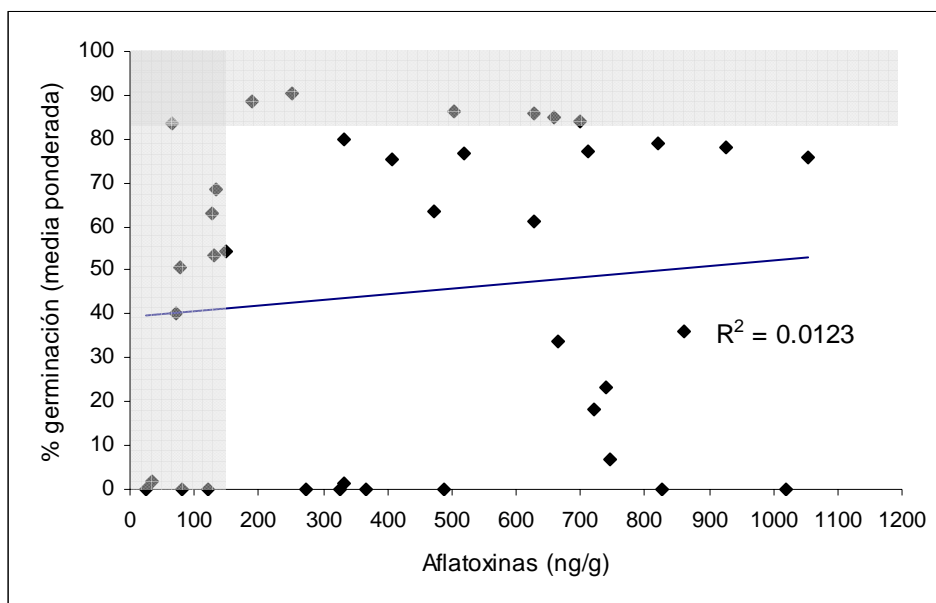


Figura 7. Nube de dispersión de la *concentración de aflatoxinas* y *% de semillas normales* de la prueba de Envejecimiento Acelerado. Cada punto es un genotipo. El gráfico incluye la recta de aproximación por regresión lineal y el coeficiente de correlación R^2 . Las regiones sombreadas vertical y horizontal representan la *zona de resistencia a contaminación con aflatoxinas* y *zona de alto vigor* respectivamente.

6.4 Detección de polimorfismos

6.4.1 Obtención de oligonucleótidos

Los productos de la búsqueda y/o diseño de oligonucleótidos fueron: 9 pares de oligonucleótidos para RGAs; 20 pares de oligonucleótidos para genes, de los cuales 10 fueron de genes de defensa biótica, 1 gen de germinación, 1 gen de longevidad, 5 genes de tolerancia a estrés por calor y 3 genes de tolerancia a estrés por frío; y 7 pares de oligonucleótidos para microsatélites; en total 36. La lista completa de los oligonucleótidos se muestra en el Anexo 2.

6.4.2 Cuantificación y calidad DNA

La prueba de electroforesis en gel de agarosa permitió visualizar el DNA concentrado y diluido de los materiales previo a su utilización en las pruebas moleculares. Las bandas formadas con el DNA genómico de cada material se observaron sin material degradado y libres de RNA, lo cual verifica que la extracción y purificación produjeron DNA de calidad. Adicionalmente, permitieron confirmar digitalmente que las diluciones hechas fueron correctas (ver Figura 8).

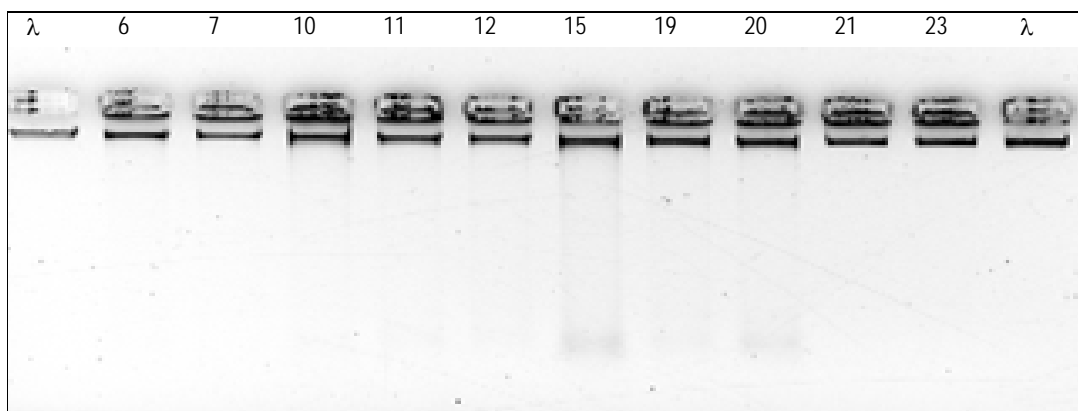


Figura 8. Ejemplo de la verificación de calidad de DNA en gel de agarosa 1% posterior a las diluciones de DNA concentrado (10 ng/μL).

6.4.3 PCR en gradiente

No todos los oligonucleótidos probados en el PCR de gradiente de temperatura generaron productos de reacción. Aquellos que no generaron productos se descartaron para las

pruebas de amplificación en los PCRs poblacionales. Las cantidades de oligonucleótidos utilizados y que amplificaron aparecen en el Cuadro 5.

6.2.3 Polimorfismos de interés

En las pruebas de PCR poblacionales no todos los amplicones generados fueron polimórficos entre los materiales (ver Cuadro 5). Sólo los amplicones polimórficos son susceptibles de análisis y tienen potencial de ser útiles, razón por la cual, en los resultados se presentan sólo los oligonucleótidos que generaron este tipo de amplicones.

Cuadro 5. Resumen general de resultados de amplificación

Tipo de oligonucleótido	Cantidad de oligonucleótidos utilizados	Cantidad de oligonucleótidos que amplificaron	Cantidad de oligonucleótidos con amplicones polimórficos
RGAs	9	3	3
Micro-satélites	7	7	3
Genes de defensa	10	4	2
Genes de tolerancia a estrés abiótico	10	8	6
Total	36	22	14

A manera de ejemplo, se muestran a continuación tres fotografías de geles de electroforesis con resultados de amplificación, cada gel representa una de las tres estrategias seguidas.

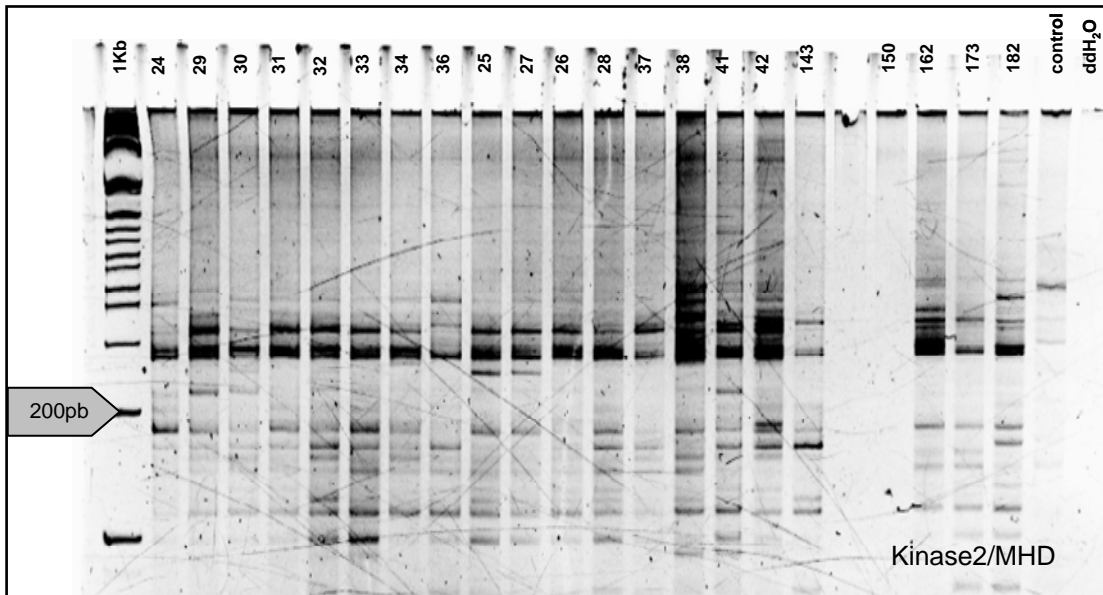


Figura 9. Imagen ejemplo de un gel de poliacrilamida con productos de amplificación con un oligonucleótido de la estrategia de RGAs. Nótese la diversidad en número de amplicones generados por material, así como el elevado polimorfismo.

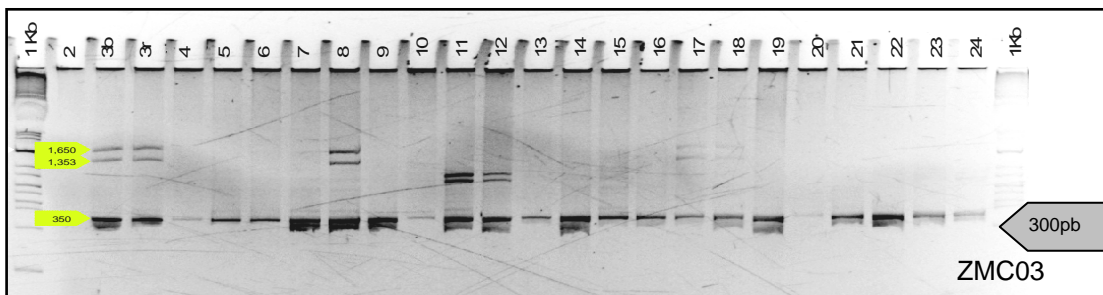


Figura 10. Imagen ejemplo de un gel de poliacrilamida con productos de amplificación con un oligonucleótido para un gen de defensa. Este tipo de oligonucleótidos produjeron menor número de bandas, algunas del tamaño esperado.

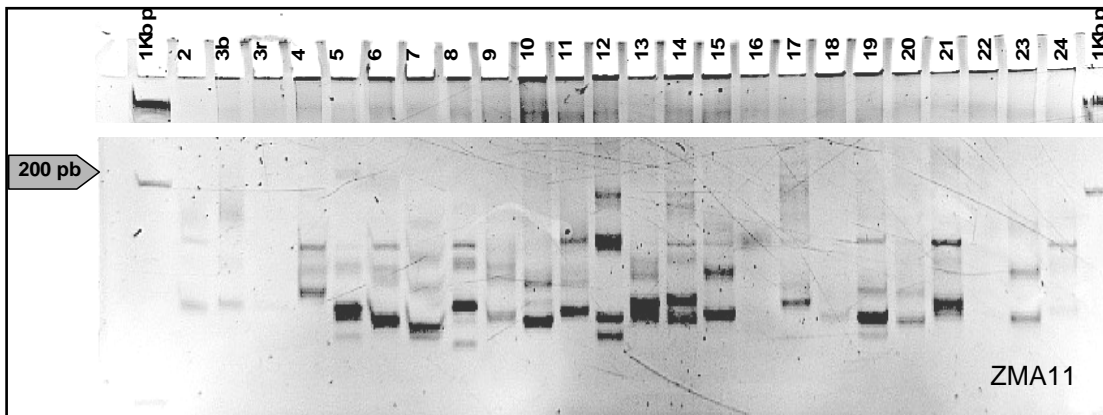


Figura 11. Imagen ejemplo de un gel de poliacrilamida con productos de amplificación con un oligonucleótido para microsatélites. Se observa el alto polimorfismo característico de este tipo de estrategia.

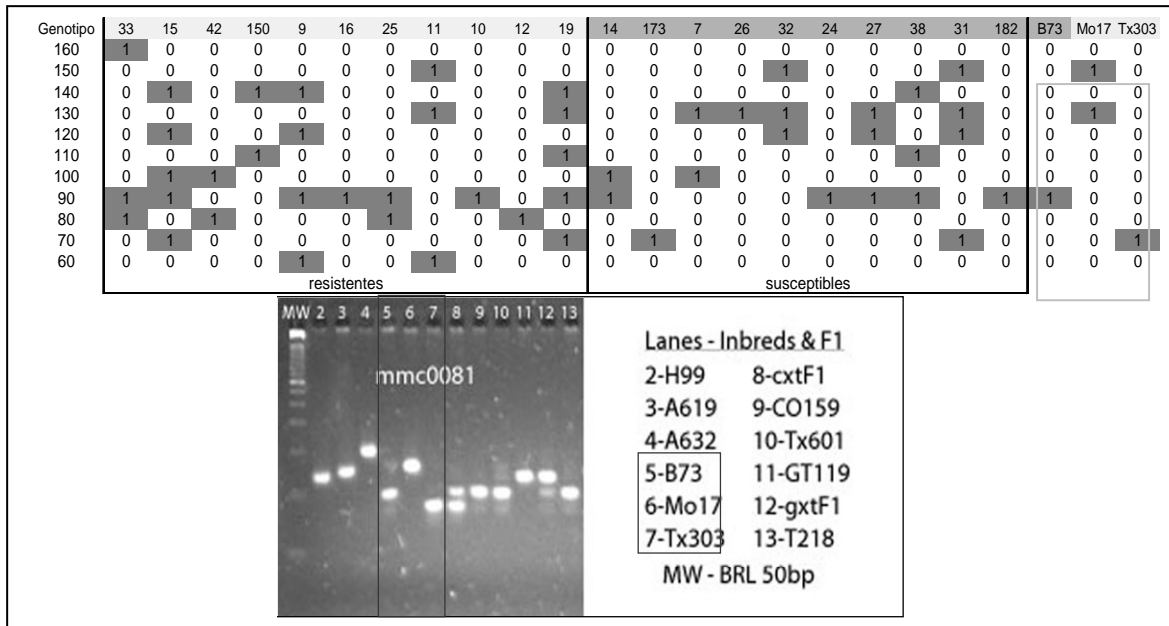


Figura 12. Imagen ejemplo de una matriz numérica creada a partir de las bandas obtenidas en un gel, en este caso, producido por el oligonucleótido ZMA16 para microsatélites. Abajo se muestra una referencia fotográfica para el mismo oligonucleótido obtenida del banco de datos *MaizeGDB*. Obsérvese la semejanza en los patrones de bandeado entre los genotipos control (B73, Mo17 y Tx303) y los reportados en la referencia. Los amplicones se identifican a la izquierda con un valor numérico en pares de bases. Los nombres de los genotipos aparecen abreviados.

6.2.4 Frecuencia de amplicones y R^2

El siguiente cuadro muestra los resultados de las pruebas de amplificación en términos de amplicones generados. Incluye el valor de la frecuencia de aparición entre materiales así como la R^2 que lo relaciona con la característica fenotípica correspondiente (aflatoxinas con RGAs, SSRs y genes R; vigor con genes de tolerancia a estrés abiótico). Se obtuvieron 16 amplicones en total dentro del rango de 40-60%. En el caso de R^2 , el mayor valor fue de 0.3610 perteneciente al amplicón 227pb del oligonucleótido ZMF01 (ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Frecuencia de aparición y R^2 de amplicones polimórficos producidos en todos los materiales. Se muestran resaltados con negritas las frecuencias entre 40-60% y los 7 valores de R^2 más elevados.

Tipo de oligo	Nombre de oligo	Amplicón (pb)	Frecuencia (%)	R^2
RGAs	Kinase2 / MHD	400	6	0.1123
		380	24	0.0003
		340	18	0.0208
		300	82	0.0343
		270	86	0.0625
		250	10	0.0172
		220	20	0.0021
		175	59	0.0338
		160	59	0.0490
		150	27	0.0168
		140	53	0.0002
		120	10	0.0584
		100	82	0.0625
		90	27	0.0000
	80	12	0.0747	
	S2 / AS1	2000	21	0.0099
		1800	13	0.0001
		1650	21	0.0137
		1000	16	0.0324
		850	16	0.0061
		750	71	0.0003
		500	50	0.0827
		400	18	0.0580
		360	34	0.1019
		315	92	0.0445
		300	5	0.0298
		285	34	0.0681
		270	3	0.0841
		250	13	0.0000
	220	5	0.1273	
	200	11	0.0505	
	170	13	0.0161	
	XLRR	1800	46	0.0126
		1650	36	0.0007
900		85	0.1144	
650		77	0.0736	
500		77	0.0040	
400		21	0.0010	
335		13	0.1590	
320		97	0.0000	
295		5	0.1111	
280		36	0.0001	
260		13	0.1111	
250		18	0.0140	
220		15	0.0352	
180		77	0.0736	
175		95	0.0000	
170		95	0.0900	
160	28	0.0136		
150	54	0.0006		
135	13	0.0005		
125	59	0.0979		
90	64	0.0009		

Cuadro 6. (continuación)

Tipo de oligo	Nombre de oligo	Amplicón (pb)	Frecuencia (%)	R ²		
Microsatélites	ZMA11	190	4	0.0003		
		180	13	0.0787		
		165	50	0.0307		
		160	25	0.0172		
		155	19	0.0605		
		150	25	0.0820		
		147	10	0.0112		
		142	21	0.0018		
		138	27	0.0004		
		135	46	0.0790		
		132	17	0.0904		
		128	15	0.0000		
		123	10	0.0668		
		120	8	0.0558		
		ZMA15	150	23	0.1273	
			135	23	0.0234	
			125	68	0.0024	
	115		9	0.0019		
	100		93	0.0191		
	90		18	0.0030		
	ZMA16	160	7	0.0607		
		150	17	0.0415		
		140	11	0.0777		
		130	22	0.1141		
		120	20	0.0245		
		110	15	0.0041		
		100	13	0.0068		
		90	50	0.0084		
		80	15	0.2137		
		70	17	0.0023		
	Genes de defensa	ZMA09	5000	59	0.2284	
			4500	56	0.0392	
			4000	41	0.0562	
			3500	15	0.0000	
			3000	21	0.0119	
			2000	10	0.0107	
			650	62	0.0027	
		ZMA10	650	5	0.0504	
			600	42	0.0327	
			580	37	0.0140	
		Genes de tolerancia a estrés abiótico	ZMC01	380	21	0.1031
				2000	15	0.0207
				840	13	0.0010
			ZMC03	1650	18	0.0358
				1353	18	0.0358
	1000			18	0.0000	
	850			18	0.0000	
390	18			0.2150		
ZMC04	1500		9	0.0440		
	900		52	0.0218		
	650		95	0.0275		
	630		77	0.0274		
	600		64	0.0194		
	280		23	0.0012		
	190		80	0.0194		
	175	27	0.0010			
ZMF01	227	38	0.3610			
ZML01	5000	26	0.3381			
	2000	28	0.2000			
	1353	38	0.0000			
	1200	6	0.0667			
	1000	68	0.2000			

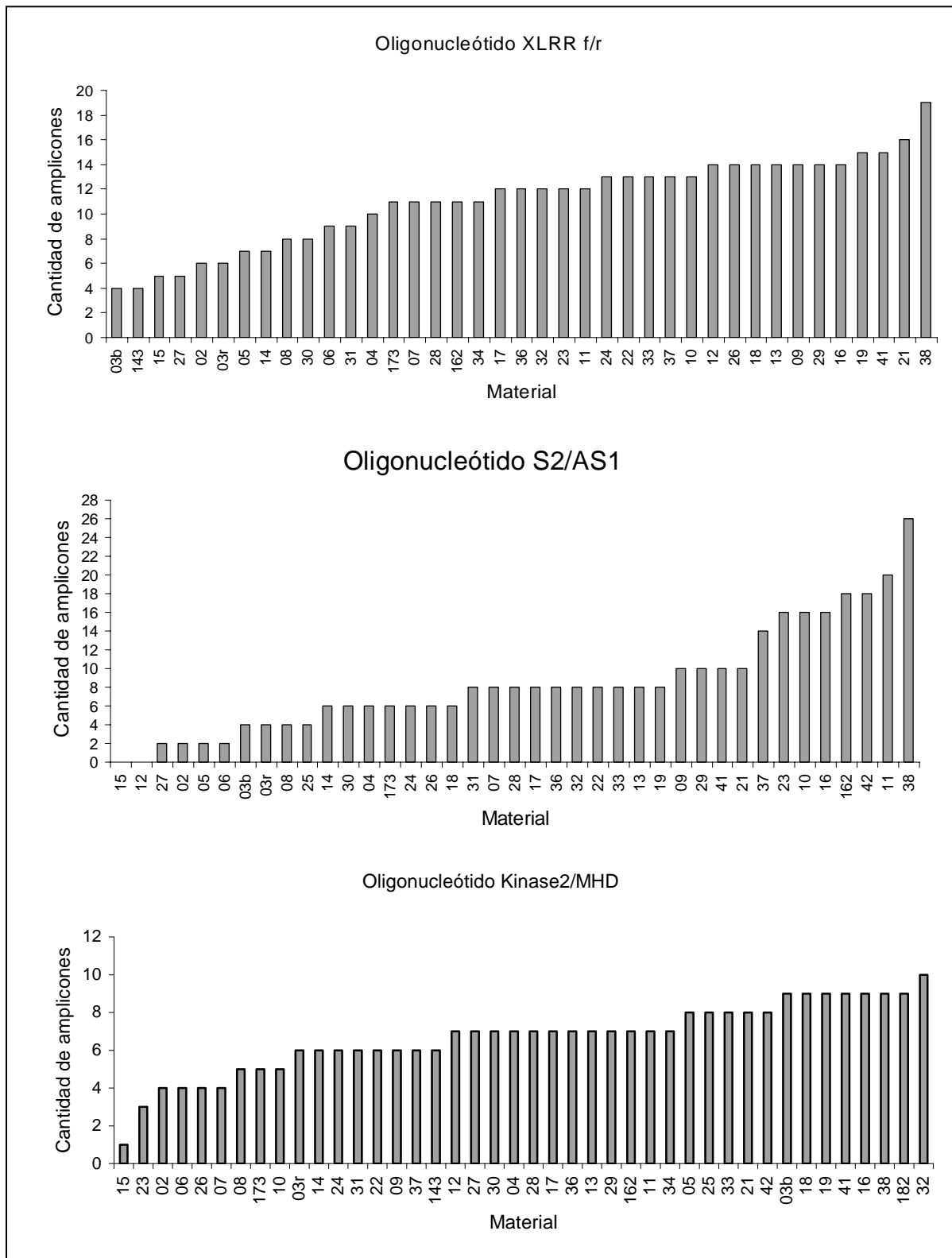


Figura 13. Cantidad de amplicones polimórficos generados en cada material con diferentes oligonucleótidos de la estrategia de RGAs. La clave de los materiales aparece abreviada.

6.2.5 RGAs

En el caso de los iniciadores para la amplificación de RGAs, no se esperan productos de búsqueda específicos. Prácticamente cualquier amplicón generado es candidato de gen R. Por esta razón, se muestra el resultado del número total de amplicones polimórficos obtenidos en cada iniciador de esta estrategia en cada uno de los materiales (ver figura 13). Algunos materiales destacaron por la cantidad superior de amplicones que produjeron, entre éstos están los genotipos ZM038, ZM021, ZMA016, ZM041 y ZM042.

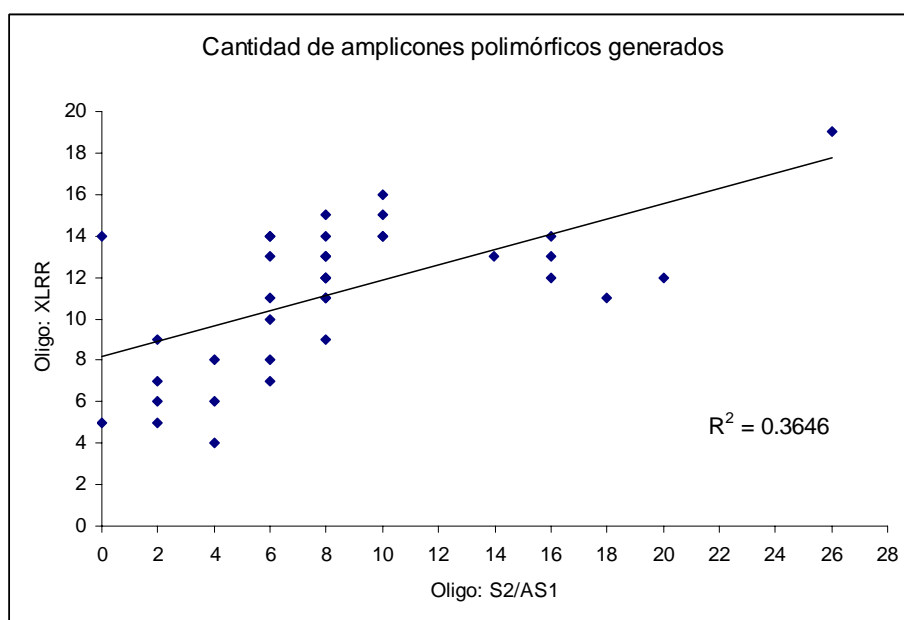


Figura 14. Nube de dispersión de la cantidad de amplicones polimórficos producidos con los oligonucleótidos XLRR y S2/AS1. Cada punto es un genotipo. El gráfico incluye la recta de aproximación por regresión lineal y el coeficiente de correlación R^2 .

6.2.6 Genes de defensa

En el caso particular de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de genes (de defensa y de tolerancia al estrés abiótico), es posible estimar el tamaño del producto de amplificación esperado, ya que estos iniciadores están diseñados en base a secuencias establecidas de cDNA. Conocer dicho tamaño facilita su búsqueda y la toma de decisiones para su aprovechamiento en trabajos posteriores (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de amplificación para genes de función y secuencia conocida.

Tipo de gen	Clave de oligo	Base de diseño	Tamaño esperado (pb)	Tamaño encontrado (pb)	Presenta polimorfismo
Genes de defensa	ZMA09	cDNA	522+	5000	sí
				4500	sí
				4000	sí
				3500	sí
				3000	sí
				2000	sí
				650	sí
				522	no
				650	sí
				600	sí
				580	sí
				390	no
				380	sí
				2000	sí
Genes de tolerancia a estrés abiótico	ZMC01	cDNA	432+	1700	no
				840	sí
				650	no
				520	no
				300	no
				200	no
				1650	sí
				1353	sí
				1000	sí
				850	sí
				389	sí
				350	no
				1650	no
				1500	sí
900	sí				
650	sí				
630	sí				
600	sí				
280	sí				
190	sí				
175	sí				
ZMF01	cDNA	227+	227	sí	
ZML01	cDNA	386+	5000	sí	
			2000	sí	
			1353	sí	
			1200	sí	
			1000	sí	

6.2.7 Microsatélites

Dentro de la estrategia de microsatélites, los oligonucleótidos ZMA11, ZMA15 y ZMA16 produjeron amplificaciones con bandas polimórficas con tamaños entre los 60 y 200 pb (ver figura 7), habiendo mucha variabilidad en patrones de bandeo. Esta información se utilizó para buscar asociación de dichos patrones con la clasificación de resistencia o susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas. Específicamente, se buscaron los casos de amplicones que estuvieran presentes en una de las clasificaciones, pero ausentes en la otra. Casos como este fueron encontrados con el oligonucleótido ZMA11, ZMA15 y ZMA16.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Diferencias en el nivel de vigor y longevidad

Las diferencias significativas encontradas entre los materiales confirman su diversidad genética y también permite aceptar la Hipótesis 1 de este trabajo. Adicionalmente, estas diferencias permitieron hacer la subsiguiente clasificación de los materiales como vigorosos y no vigorosos. Las tres clasificaciones aparecen muy repartidas entre los genotipos del grupo de maíces criollos (colectas), mientras que en grupos como los materiales provenientes de Zacatecas y Río Bravo los genotipos no-vigorosos son mayoría, el resultado esperado en estos grupos era el inverso, ya que se cree que por las condiciones climáticas de la región, estas semillas debieran tolerar más las condiciones de estrés por calor. En el caso de los materiales QPM, todos los genotipos cayeron dentro de la clasificación de *intermedios*, no apareciendo ninguno como no-vigoroso. Esto es diferente a lo que se esperaba, ya que las semillas de líneas QPM se consideran de menor viabilidad. La clasificación de los materiales sirvió también para su uso en las pruebas de correlación con los resultados de las pruebas moleculares.

7.2 Diferencias en la resistencia a la contaminación con aflatoxinas

Los resultados de en la prueba determinación de aflatoxinas demuestran un amplio rango de tolerancia de los diferentes materiales al estrés impuesto por la interacción con *A. flavus* y/o a la acumulación de aflatoxinas. Existen diferencias significativas entre las magnitudes de contaminación y existe similitud en proporción (% de contaminación) con otras pruebas reportadas (Williams, 2003), lo cual confirma la amplia diversidad genética en la muestra de germoplasma seleccionada para este trabajo. Teniendo lo antes mencionado, los resultados de la prueba de contenido de aflatoxinas permitieron su clasificación como genotipos resistentes, intermedios y susceptibles. Los 11 genotipos que se clasificaron como resistentes se encuentran dispersos en los 4 grupos de materiales, lo que quiere decir que se cuenta con fuentes de resistencia a aflatoxinas tanto entre las colectas criollas como entre las variedades mejoradas. En el caso de los maíces provenientes de Río Bravo, sólo 1

de los 5 totales se mostró resistente. No se esperaba este resultado ya que se piensa que por su región de origen debieran ser particularmente resistentes. De la misma forma, sólo 1 genotipo del grupo de variedades seleccionadas para sequía se clasificó como resistente, lo cual también contradice lo esperado, pues se cree que existe una relación directa entre la tolerancia al estrés hídrico y la tolerancia a la infección por *A. flavus*. Por último, entre las líneas QPM, 1 genotipo se clasificó como resistente. No se esperaba que algún QPM pudiera presentar este tipo de resistencia, esto podría convertirlo en un material potencialmente útil como fuente de resistencia a aflatoxinas y de alta calidad proteica simultáneamente. Adicionalmente a la prueba de determinación de aflatoxinas aquí descrita, hubo otra que se hizo de forma preliminar con sólo 10 de los 43 genotipos descritos (ver Anexo 4). Cuatro de los 5 genotipos con los valores de aflatoxinas más bajos en esta prueba coinciden con la clasificación de resistentes de la lista aquí presentada. Lo cual ayuda a demostrar la confiabilidad y repetibilidad de las pruebas realizadas.

7.3 Asociación del vigor y longevidad con la resistencia a contaminación con aflatoxinas

A diferencia de lo que se esperaba, el nivel de vigor de las semillas no mostró una relación significativa con su correspondiente concentración de aflatoxinas. Esto se puede observar en la amplia dispersión de los puntos en el gráfico (ver Figura 7), en el bajo valor de R^2 (0.0123) y en el hecho de que la pendiente de la línea de tendencia es positiva, cuando se hubiera esperado que fuera negativa, ya que se pensaba que la contaminación con aflatoxinas debía estar relacionada inversamente al nivel de vigor de las semillas. Aparentemente, la hipótesis sugerida de que las plantas de maíz provenientes de semillas vigorosas y longevas pueden desarrollar una mayor resistencia a la infección por *A. flavus* y la contaminación por aflatoxinas no puede ser explicada por medio de las pruebas aquí aplicadas. Quizás la asociación pudiera encontrarse estudiando la resistencia de los materiales a la infección en otras etapas del desarrollo de la planta. Adicionalmente, el gráfico permite ver, con ayuda de las zonas sombreadas, cuántos genotipos poseen alguno de los dos tipos de resistencia; en forma estricta, ninguno de los puntos cae en la intersección de las dos zonas, sin embargo, el genotipo INIFAP-ZM042, del grupo de maíces procedentes de Río Bravo, se encuentra muy próximo. Esto invita a pensar que

dicho material podría convertirse en una valiosa fuente de resistencia para futuras pruebas de mejoramiento. En el extremo contrario, el genotipo que presentó el máximo valor de susceptibilidad y simultáneamente uno de los mayores niveles de contaminación con aflatoxinas fue el INIFAP-ZM031, un material del grupo de maíces mejorados para sequía proveniente de Zacatecas.

7.4 Detección de polimorfismos

En cada una de las tácticas seguidas existieron amplificaciones, lo que quiere decir que fueron halladas segmentos de DNA genómico afines tanto a oligonucleótidos para RGAs, genes y microsátélites. Entre dichos oligonucleótidos, más de la mitad produjeron amplicones polimórficos, lo cual confirma en forma molecular la diversidad genética esperada en los materiales en relación a sus características de resistencia en general. Esto permite también aceptar la Hipótesis no. 4 de este trabajo.

7.4.1 Asociación del polimorfismo con el nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas

No se encontraron valores de correlación suficientemente altos para determinar asociación del polimorfismo con la resistencia a la contaminación con aflatoxinas en las semillas de maíz. Los bajos valores de R^2 obtenidos son explicables en parte a la naturaleza de los caracteres de interés. La tolerancia a la infección con *A. flavus* y la contaminación con aflatoxinas así como la tolerancia al estrés abiótico, son caracteres cuantitativos, es decir, dependen de la existencia y expresión de más de un gen, por lo cual no pueden ser explicados por la presencia o ausencia de un sólo amplicón. Esto reduce la participación de cada gen involucrado a solamente un porcentaje.

Otro factor que se piensa que puede tener influencia en la búsqueda de correlación es el hecho de que la prueba de determinación de aflatoxinas corre riesgos de falsos positivos si existen semillas con daño físico al tiempo de inocular con el hongo, como consecuencia podrían clasificarse equivocadamente como susceptibles a genotipos que tal vez sean

intermedios o resistentes. Se sugiere que se apliquen pruebas que permitan seleccionar semillas con daño físico antes de las pruebas de inoculación y determinación de aflatoxinas.

7.4.2 RGAs

De entre todas las estrategias, los pares de oligonucleótidos del grupo de RGAs, produjeron la más alta cantidad de amplicones por genotipo, lo cual se esperaba por tratarse de oligonucleótidos degenerados, y especialmente, por la naturaleza menos específica en su diseño. La mayor parte de estos amplicones resultaron ser polimórficos. No muchos caen dentro del rango de 40-60% (16 de 53) y el valor máximo de R^2 lo presenta el amplicón XLRR-335pb con 0.1590. Sin embargo, en el caso particular de RGAs, por tratarse de segmentos que codifican para dominios conservados en genes de resistencia biótica en general, prácticamente cualquier amplicón generado es candidato de gen R y por lo tanto también lo es para secuenciación. Por otro lado, se prestó atención especial al valor de *cantidad de amplicones generados* en los diferentes materiales. Se considera que a mayor cantidad de bandas, aumenta la posible utilidad del material como progenitor para posteriores pruebas de cruzamiento. Los materiales que más bandas produjeron en promedio fueron los genotipos 10, 11 y 19 (ver Figura 11). Cabe destacar que se halló cierto nivel de correlación entre las cantidades de amplicones producidas por los oligonucleótidos XLRR y S2/AS1 (ver Figura 14), lo cual permite inferir que existen genotipos que, en relación con otros, destacan por poseer una mayor cantidad de secuencias de genes R en su DNA genómico, y por lo tanto, pudieran funcionar como fuente de resistencia biótica en futuras pruebas de cruzamiento.

7.4.3 Genes de defensa

La estrategia de búsqueda de genes de respuesta defensiva produjo 2 casos de amplificación exitosa (los oligonucleótidos ZMA09 y ZMA10) de un total de 10 posibles. Desafortunadamente, estos dos oligos corresponden a dos de los genes menos específicos para la defensa del maíz contra la infección de *A. flavus* dentro del grupo de genes de defensa elegidos. La baja incidencia de éxitos en la amplificación se entiende por la alta especificidad de los oligonucleótidos en su diseño, además que se trata del primer intento

en su uso, ya que cada uno de los oligonucleótidos de esta estrategia fueron diseñados por primera vez para este trabajo. Ambos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de secuencias de genes que codifican para proteínas inactivadas de ribosomas, las cuales se han reportado como inhibidores de la traducción con actividad de RNA *N*-glicosidasa. Estas proteínas pueden funcionar como proteínas de defensa antimicrobiana o antiviral (Bass, 2004). Los oligonucleótidos ZMA09 y ZMA10 generaron amplicones no-polimórficos del tamaño esperado y algunos polimórficos más de tamaño mayor. Al no ser polimórficos, los amplicones de tamaño esperado no produjeron valores de R^2 , esto significa que no pueden correlacionarse con la resistencia a la contaminación con aflatoxinas. La base del diseño de estos oligonucleótidos es cDNA, lo que implica la posible existencia de intrones en las secuencias de DNA genómico, esto significa que el resto de los amplicones producidos, aunque no tienen el tamaño esperado, pudieran guardar relación con el tipo de gen buscado. Este hecho sumado a que además mostraron polimorfismo, los convierte también en candidatos de interés para su clonación y secuenciación.

7.4.4 Genes de tolerancia a estrés abiótico (frío y calor)

La estrategia de genes de tolerancia a estrés por frío y por calor produjo 4 casos de amplificación exitosa (ZMC01, ZMC03, ZMC04 y ZMF01) de un total de 8 posibles. Igualmente que en el caso de los genes de defensa (ver apartado 7.2.1.2) estos oligonucleótidos fueron diseñados por vez primera para este trabajo, por lo que no se esperaban productos de amplificación en todas las pruebas. En el caso del oligonucleótido ZMC03 (gen *hsp22*) se repitió la situación de una amplificación no polimórfica del tamaño esperado, acompañado de amplicones polimórficos de mayor tamaño; el oligonucleótido ZMC04 (gen *hsp70*) también produjo el amplicón del tamaño esperado, acompañado de una abundante cantidad de bandas polimórficas adicionales; el oligonucleótido ZMC01 (gen *hsp101*) produjo varias bandas mayores al tamaño esperado, algunas polimórficas; y el oligonucleótido ZMF01 (gen *CC8*) produjo una sola banda, la cual fue polimórfica y coincidió con el tamaño esperado. Este amplicón presentó el mayor de todos los valores de correlación ($R^2=0.3610$), sin embargo, no necesariamente indica una relación con el fenotipo (vigor) ya que el valor es bajo y además dicho oligonucleótido corresponde a un

gen asociado al estrés por frío. Este oligonucleótido en particular atrae un doble interés, ya que además amplifica para un gen de cistatina (proteasa con capacidad fungistática).

7.4.5 Genes asociados con vigor y longevidad

La búsqueda bioinformática de referencias y secuencias de genes asociados con el vigor y longevidad arrojó solamente dos resultados de interés para diseño de oligonucleótidos, de los cuales sólo el ZML01 (gen de familia de aseguramiento de longevidad) generó producto de amplificación. Los amplicones producidos fueron de tamaño muy superior al tamaño esperado, sin embargo presentan polimorfismo. Uno de ellos presenta uno de los valores de correlación más elevados en este trabajo ($R^2=0.3381$) cuya banda aparece sólo entre los genotipos clasificados como no-vigorous o susceptibles y está ausente en los resistentes. Esto da una idea contraria a lo que se infiere de un gen de una familia de *proteínas de aseguramiento de la longevidad*, sin embargo, y a pesar de que la información disponible es muy escasa, este oligonucleótido presentó resultados de interés suficiente para recomendar su uso y estudio en pruebas posteriores.

7.4.6 Microsatélites asociados a contaminación con aflatoxinas

Se encontraron algunos amplicones dentro de la estrategia de microsatélites que aparecieron en una de las clasificaciones de resistencia o susceptibilidad, pero no en la otra. Casos como estos fueron encontrados en el oligonucleótido ZMA11 amplicón 132pb, donde los genotipos resistentes carecen de la banda y la tercera parte de los susceptibles la presenta; con el mismo oligonucleótido, el amplicón 180pb está presente en 20% de los genotipos resistentes y ausente en los susceptibles. Con el oligonucleótido ZMA15 el amplicón 150pb está presente en el 40% de los genotipos susceptibles y ausente en los resistentes (con la excepción del genotipo ZM012 que sí presenta la banda, pero puede no tener tanta importancia por tratarse del genotipo que está en el umbral entre resistentes e intermedios). Con el oligonucleótido ZMA16 el amplicón 80pb está presente en el 40% de los genotipos resistentes y ausente en los genotipos susceptibles (ver Figura 12). Estos datos sugieren a estos amplicones y sus correspondientes oligonucleótidos como candidatos para su uso como marcadores moleculares.

A diferencia de los productos de amplificación en las estrategias de genes de defensa o de RGAs, los microsatélites no necesariamente pertenecen a genes o fragmentos de genes por lo que no se sugiere su clonación y secuenciación.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Existen diferencias significativas en el nivel de vigor y longevidad entre las semillas de los diferentes genotipos de maíz evaluados
- 2) Existen diferencias significativas en el nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas entre las semillas de los diferentes genotipos de maíz evaluados
- 3) No se encontró asociación entre el vigor y longevidad de las semillas y su resistencia a la contaminación con aflatoxinas en los genotipos de maíz evaluados
- 4) Existe polimorfismo genético en el DNA genómico de maíz con el uso de oligonucleótidos basados en secuencias asociadas a resistencia biótica
- 5) No se encontró asociación entre el polimorfismo genético encontrado y el nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas en los genotipos evaluados
- 6) No se encontró asociación entre el polimorfismo genético encontrado y el nivel de vigor y longevidad de los genotipos evaluados
- 7) Se encontraron segmentos en el DNA genómico del maíz que pueden ser de utilidad para su aprovechamiento en programas de mejoramiento asistido por marcadores moleculares

A diferencia de los productos de amplificación en las estrategias de genes de defensa o de RGAs, los microsatélites no necesariamente pertenecen a genes o fragmentos de genes por lo que no se sugiere su clonación y secuenciación.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Existen diferencias significativas en el nivel de vigor y longevidad entre las semillas de los diferentes genotipos de maíz evaluados
- 2) Existen diferencias significativas en el nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas entre las semillas de los diferentes genotipos de maíz evaluados
- 3) No se encontró asociación entre el vigor y longevidad de las semillas y su resistencia a la contaminación con aflatoxinas en los genotipos de maíz evaluados
- 4) Existe polimorfismo genético en el DNA genómico de maíz con el uso de oligonucleótidos basados en secuencias asociadas a resistencia biótica
- 5) No se encontró asociación entre el polimorfismo genético encontrado y el nivel de resistencia a la contaminación con aflatoxinas en los genotipos evaluados
- 6) No se encontró asociación entre el polimorfismo genético encontrado y el nivel de vigor y longevidad de los genotipos evaluados
- 7) Se encontraron segmentos en el DNA genómico del maíz que pueden ser de utilidad para su aprovechamiento en programas de mejoramiento asistido por marcadores moleculares

IX. REFERENCIAS

- Anguiano-Ruvalcaba GL, Verver A, Vargas-Cortina, Guzmán-De Peña D. 2005. Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud pública Méx.* 47(5)
- Association of Official Seed Analysts AOSA. 2002. *Seed Vigor Testing Handbook*, #32.
- Bai J, Pennill LA, Ning J, Lee SW, 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.
- Bass HW, Krawetz JE, OBrian GR, Zinselmeier C, Habben JE and Boston RS. 2004. Maize ribosome-inactivating proteins (RIPs) with distinct expression patterns have similar requirements for proenzyme activation. *Journal of Experimental Botany* 55(406):2219–2233.
- Bates E, Vergne P and Dumas C. 1994. Analysis of the cytosolic hsp70 gene family in *Zea mays*. *Plant Molecular Biology* 25(5): 909-916.
- Boyes DC, McDowell JM and Dangl JL. 1996. Many roads lead to resistance. *Current Biology*. 6(6): 634–637.
- Breton G, Danyluk J, Charron JBF and Sarhan F. 2003. Expression Profiling and Bioinformatic Analyses of a Novel Stress-Regulated Multispanning Transmembrane Protein Family from Cereals and Arabidopsis. *Plant Physiology* 132: 64-74.
- Brooks TD, Williams WP, Windham GL, Willcox MC, and Abbas HK. 2005. QTL contributing Resistance to Aflatoxin Accumulation in the maize inbred Mp313E. *Crop Science* 45: 171-174.
- Brown RL, Chen Z-Y, Cleveland TE, Russin JS. 1999. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus* (A mini-review). *Phytopathology* 89:113-117.
- Brown RL, Chen ZY, Menkir A and Cleveland TE. 2003. Using biotechnology to enhance host resistance to aflatoxin contamination of corn. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 557-562.
- Bruns HA. 2003. Controlling Aflatoxin and Fumonisin in Maize by Crop Management. *Journal of Toxicology. Toxin reviews*. 22(2-3): 153–173.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Salta, Argentina: Universidad Nacional de Salta; 1999. pp. 128.
- Campbell KW, Hamblin AM and White DG. 1997. Inheritance of Resistance to Aflatoxin Production in the Cross Between Corn Inbreds B73 and LB31. *Phytopathology*. 87(11): 1144-1147.
- Clerkx EJM, El-Lithy ME, Vierling E, Ruys GJ, Vries HB, Groot SPC, Vreugdenhil D and Koornneef M. 2004. Analysis of Natural Allelic Variation of Arabidopsis Seed Germination and Seed Longevity. *Plant Physiology* 135: 432–443.
- Collins NC, Webb CA, Seah S, Ellis JG, Hulbert SH and Pryor A. 1998. The Isolation of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. *Molecular Plant Microbe Interact* 11 (10), 968-978.
- Collins N, Drake J, Ayliffe M, Sun Q, Ellis J, Hulbert S And Pryor T. 1999. Molecular characterization of the maize Rpl-D rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell* 11(7): 1365-1376.
- Chang PFL, Huang CY, Chang FC, Tseng TS, Lin WC and Lin CY. 2001. Isolation and characterization of the third gene encoding a 16.0 kDa class I low-molecular-mass heat shock protein, Oshsp 16.9C, in rice. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42:85-92.
- Chen ZY, 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(12): 693-699.
- Chen XM, Line RF and Leung H. 1998. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theoretical Applied Genetics* 97:345-355.
- Dangl JL and Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.

- Díaz MGC. 1998. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Encuentros en la Biología. <http://dialnet.unirioja.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html>
- Dorner JW. 2004. Biological Control of Aflatoxin Contamination of Crops. *Journal of Toxicology. Toxin Reviews* 23 (2-3): 425–450.
- Fitch WM. 1970. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* 19:99-113.
- Guo BZ, Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS, Mehta AD, Selitrennikoff CP and Widstrom NW. 1997. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology* 87:1174-1178.
- Huynh QK, Hironakan CM, Levinell EB, Smith CE, Borgmeyer JR and Shahn DM. 1992. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *Journal of Biological Chemistry* 267(10): 6635-6640.
- Lehmensiek A, Esterhuizen AM, Van Staden D, Nelson SW and Retief AE. 2001 Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. *Theoretical Applied Genetics* 103: 797-803.
- 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. *Plant Biology* 95: 370–375.
- Lopes, MA and Larkins, BA. 1995. Genetic analysis of opaque2 modifier gene activity in maize endosperm. *Theoretical and Applied Genetics* 91 (2): 274 – 281.
- Lozovaya VV, Waranyuwat A and Widholm JM. 1998. Beta-1,3-Glucanase and Resistance to *Aspergillus flavus* Infection in maize. *Crop Science* 38:1255-1260.
- Lund AA, Blum PH, Bhattaramakki D and Elthon T. 1998. Heat-Stress Response of Maize Mitochondria. *Plant Physiology* 116: 1097-1110.
- Malehorn DE, Borgmeyer JR, Smith CE and Shah DM. 1994 Characterization and Expression of an Antifungal Zeamatin-like Protein (*Zlp*) Gene from *Zea mays*. *Plant Physiology* 106(4): 1471-481.
- Massonneau A, Condamine P, Wisniewski JP, Zivy M and Rogowsky PM. 2005 Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. *Biochimica et Biophysica Acta* 1729: 186-199.
- Meyers BC, Kozic A, Griego A, Kuang H and Michelmore RW. 2003. *The Plant Cell* 15: 809-834.
- Moreno E. 1987. Development of resistant varieties: one option for reducing mycotoxin production. Joint FAO/WHO/UNEP second International Conference on mycotoxins. Bangkok, Thailand, Documento MYC 87/83. 15 p.
- Moreno E. 1988. Comparison of Mexican Maize Races Stored Under Adverse Humidity and Temperature. Recent Advances in the conservation and utilization of Genetic Resources (CIMMYT) pp. 94-98.
- Moreno E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3ª edición. UNAM.
- Moreno E. 2004. Determinación de mecanismos hereditarios y moleculares en la pérdida de vigor, longevidad, y contaminación por aflatoxinas en maíz. Proyecto de investigación CONACYT Clave:
- Multani DS, Meeley RB, Paterson AH, Gray J, Briggs SP and Johal GS. 1998. Plant–pathogen microevolution: Molecular basis for the origin of a fungal disease in maize. *Genetics* 95: 1686–1691.
- Mullis KB, Ferre F and Gibbs RA. (1994) PCR, The Polimerase Chain Reaction. USA. Birkhäuser. 458 p.
- Munamava MR, Goggi AS and Pollak L. 2004. Seed Quality of Maize Inbred Lines with Different Composition and Genetic Backgrounds. *Crop Science* 44: 542-548.
- Nieto-Sotelo J, Martinez LM, Ponce G, Cassab GI, Alagon A, Meeley RB, Ribaut JM and Yang R. 2002. Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *The Plant Cell* 14: 1621-1633.

- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
- Rhoads DM, White SJ, Zhou Y, Muralidharana M and Elthon TE. 2005. Altered gene expression in plants with constitutive expression of a mitochondrial small heat shock protein suggests the involvement of retrograde regulation in the heat stress response. *Physiol. Plantarum* 123(4): 435-444.
- Smith SM, Pryor AJ and Hulbert SH. 2004. Allelic and Haplotypic Diversity at the Rp1 Rust Resistance Locus of Maize. *Genetics* 167(4): 1939-1947.
- 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.
- Williams WP, Windham GL and Buckley PM. 2003. Enhancing maize germplasm with resistance to aflatoxin contamination. *Journal of Toxicology*. 22(2-3): 175-193.
- Wu S, Kriz A and Widholm JM. 1994. Nucleotide Sequence of a Maize cDNA for a Class II, Acidic beta-1,3-glucanase. *Plant Physiology* 106: 1709-1710.
- Wu JL, Sinha PK, Variar M, Zheng KL, Leach JE, Courtois B and Leung H. 2004. Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice. *Theoretical Applied Genetics*. 108:1024-1032.
- Wuang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen L, Pi LY, Zhang S, Zhang Z, Fauquet C, Gaut BS, Whalen MC and Ronald PC. 1998. Xa21D Encodes a Receptor-like Molecule with a Leucine-Rich Repeat Domain that Determines Race-Specific Recognition and Is Subject to Adaptive Evolution. *The Plant Cell* 10: 765-779.
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Zx, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N And Sasaki T. 1998. Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(4): 1663-1668.
- Young TE, Ling J, Geisler-Lee CJ, Tanguay RL, Caldwell C and Gaille DR. 2001. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiology* 127: 777-791.
- Zhang F, Wan XQ and Pan GT. 2006. QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in maize. 1. Map construction with microsatellite and AFLP markers. *Journal of Applied Genetics* 47(1): 9-15.