



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico,
abiótico y elicitores en plántulas de maíz para consumo animal**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

EVA GUADALUPE LIZÁRRAGA PAULÍN

TUTORES PRINCIPALES:

Dr. Irineo Torres Pacheco

(Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias de la Producción y de la Salud Animal)

Dra. Susana Patricia Miranda Castro

(Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)

COMITÉ TUTORAL

Dr. Ernesto Moreno Martínez

Dra. Alma Virginia Lara Sagahón

(Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Dios

*Por el regalo de la vida.
Por permitirme alcanzar una meta más,
por la satisfacción y la dicha de compartirla con quienes amo.*

A mis padres: Alfredo y Socorro,

*Por hacer de mí una mujer responsable y perseverante,
porque mis logros son el fruto de su esfuerzo y de su ejemplo.*

A mis hermanas Lorena y Elsa,

Por su apoyo invaluable e incondicional.

A mis sobrinos: David, Ismael y Nadia,

Porque con su alegría he aprendido que todo es más fácil cuando se le sonríe a la vida.

*Puede ser un héroe lo mismo el que triunfa que el que sucumbe,
pero jamás el que abandona el combate.*

Carlos I de Habsburgo

**El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la
Facultad de estudios Superiores Cuautitlán con el apoyo económico
otorgado a través del Proyecto PAPIIT IT220411-3
“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ELICITOR DEL QUITOSÁN EN PLÁNTULAS DE
MAÍZ CONTRA ESTRÉS DE TIPO BIÓTICO Y ABIÓTICO”**

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores: Dr. Irineo Torres Pacheco y Dra. Susana Patricia Miranda Castro, por confiar nuevamente en mí, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo, por compartirme su experiencia y conocimiento para lograr día a día mi superación académica y profesional.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez y a la Dra. Alma Virginia Lara Sagahón, miembros del Comité Tutorial, por su compromiso, apoyo, consejos y enseñanzas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo recibido a través de las becas nacionales para estudiantes de doctorado (beca No. 252089/214631).

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, por haberme dado, a través de sus profesores, alumnos e instalaciones, más de 11 años de formación académica y profesional.

A la M. en C. Ma. Cristina Julia Pérez Reyes, a la M. en C. Gabriela Sánchez Hernández, a la M. en C. Josefina Moreno Lara, a la Dra. Martha Yolanda Quezada Viay, y al Sr. Gustavo Hernández, de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la FES Cuautitlán, por el apoyo en los experimentos fitopatológicos y sus aportes para el montaje del experimento en el invernadero.

Al Dr. Francisco Montiel Sosa y al Dr. Enrique Salas Téllez (FES Cuautitlán), por sus objetivas propuestas y acertadas observaciones y para la culminación del presente trabajo. A la I.A. Ana Elvia Sánchez Mendoza (FES Cuautitlán), por su apoyo técnico en el área de Biología Molecular.

Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González y al Dr. Juan Caballero Pérez, de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, por su apoyo en el área de Bioquímica y Biología Molecular respectivamente. A todos y cada uno de los compañeros del Área de Biosistemas por permitirme hacer de mi estancia una gran experiencia. A mis compañeras del Laboratorio, Laura Mejía Teniente y Ángela María Chapa Oliver, por haberse involucrado en el presente trabajo, por los conocimientos compartidos, la amistad brindada, el apoyo recibido y el excelente trabajo en equipo.

Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo, al M. en I.B.B. Simón Guzmán León, a la Q.B.P. Lorena Chávez González y al Dr. José Luis Santillán Torres, de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por el procesamiento de los microarreglos y el apoyo para su validación.

A los miembros del jurado: Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo, Dr. Rogelio Alonso Morales y Dr. Lorenzo Guevara Olvera, por el enriquecimiento del presente trabajo a través de sus acertadas observaciones, comentarios y sugerencias.

A la M. en C. María del Rosario Rodríguez Hidalgo y al Dr. César Soto Figueroa por haberme iniciado en el camino de la investigación, por impulsarme a llegar hasta donde me encuentro en este momento, por sus valiosos consejos y por su gran amistad.

A quienes se involucraron tan comprometidamente en el presente trabajo: Carla Isabel Urbina Maza, Ileana López Vázquez, David Adrián Rodea Montes (FES Cuautitlán), Héctor Prestegui Nava y Brenda Garín Arroyo (Instituto Tecnológico de Acapulco); a la I.A. Nelly Abigail Morales Pérez y a la I.A. María Fernanda de la Mora Valencia (FES Cuautitlán), gracias por su apoyo, por su amistad y por las satisfacción de contribuir con un granito de arena a su formación profesional.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la FESC-UNAM, particularmente a Aldo, José Luis y Vladimir, por el apoyo continuo, el aprendizaje diario y la amistad sincera durante todos estos años.

A mis amigos: Joaquín, Darney (†), Marco Antonio, Inés, Dulce, Maricel... a todos aquellos que no menciono por sus nombres pero sí por sus acciones, por la amistad que crece y madura a través del tiempo.

A esas personas especiales que me han brindado su cariño y apoyo y incondicional en todo momento, y que han compartido a lo largo de 4 años mis tristezas y alegrías, mis fracasos y mis triunfos, Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. OBJETIVOS.....	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
2. HIPÓTESIS.....	3
3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
4. INTRODUCCIÓN	5
4.1 EL MAÍZ: GENERALIDADES.....	5
4.2 EL MAÍZ COMO BASE DE LA ALIMENTACIÓN Y LA NUTRICIÓN ANIMAL.....	7
4.3 ESTRESSES QUE AFECTAN AL MAÍZ Y SU IMPLICACIÓN EN LA SALUD ANIMAL	10
4.3.1 Estrés biótico	11
4.3.2 Estrés abiótico	13
4.4 ALTERNATIVAS PARA LA PROTECCIÓN DEL MAÍZ Y EL COMBATE CONTRA ESTRESSES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS	15
4.5 INNOVACIÓN EN LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: MICROARREGLOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y CARACTERIZACIÓN DE LOS INSUMOS AGRÍCOLAS	23
5.1.1 Pruebas de calidad en las semillas (<i>Determinación de las variedades a utilizar</i>).....	23
5.1.1.1 Germinación estándar	24
5.1.1.2 Envejecimiento acelerado	24
5.1.1.3 Análisis estadístico.....	24
5.1.2 Obtención de quitosán	25

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

5.1.3	Caracterización de quitosán	25
5.1.3.1	Determinación del peso molecular viscosimétrico	25
5.1.3.2	Determinación del grado de desacetilación	25
5.2	DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA FENOLÓGICA Y BIOQUÍMICA AL USO DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO POSIBLES ELICITORES EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.	26
5.2.1	Preparación de los posibles elicitors en solución para el acondicionamiento de las semillas	26
5.2.1.1	Solución de quitosán al 2%	26
5.2.1.2	Solución de peróxido de hidrógeno 8 milimolar	26
5.2.2	Preparación de los posibles elicitors en solución para la aspersión de las plántulas.....	26
5.2.2.1	Solución de quitosán al 0.2%	26
5.2.2.2	Solución de peróxido de hidrógeno 8 milimolar	27
5.2.3	Aplicación de los tratamientos a las semillas y plántulas.....	27
5.2.4	Acondicionamiento de las semillas con los posibles elicitors	27
5.2.5	Evaluación de la germinación de las semillas	29
5.2.6	Evaluación de la velocidad de emergencia de las plántulas	29
5.2.7	Evaluación fenológica de las plántulas	29
5.2.8	Pruebas bioquímicas	30
5.2.8.1	Tinción con DAB para determinar la presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno	30
5.2.8.2	Obtención del extracto enzimático para la cuantificación de proteínas y catalasa	31
5.2.8.3	Cuantificación de proteínas totales en la muestra de maíz	31
5.2.8.4	Determinación de catalasa total.....	32
5.2.9	Análisis de datos	32
5.3	EFFECTO DEL QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CULTIVOS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO SOBRE LAS VARIABLES FENOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.....	33
5.3.1	Selección de las semillas a utilizar durante la siembra.....	33
5.3.2	Evaluación de la viabilidad del uso de elicitors combinados.....	33

5.3.3	<i>Preparación de los elicitors en solución</i>	34
5.3.4	<i>Preparación de las suspensiones de esporas para la inducción de estrés biótico</i>	34
5.3.5	<i>Diseño experimental</i>	35
5.3.6	<i>Aplicación de los tratamientos a las semillas y plántulas</i>	36
5.3.7	<i>Evaluación fenológica de las plántulas</i>	38
5.3.8	<i>Cuantificación de proteínas totales</i>	39
5.3.9	<i>Determinación del rendimiento del grano</i>	39
5.3.10	<i>Análisis estadístico</i>	39
5.4	DETECCIÓN DE GENES MODIFICADOS EN SU EXPRESIÓN COMO CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.	40
5.4.1	<i>Búsqueda de los proveedores de chips con el genoma completo del maíz</i>	40
5.4.2	<i>Diseño experimental para los microarreglos</i>	40
5.4.3	<i>Obtención del material vegetal para los microarreglos</i>	40
5.4.4	<i>Extracción del RNA total de las plántulas de maíz</i>	41
5.4.5	<i>Análisis de los resultados de los microarreglos</i>	42
6.	RESULTADOS	43
6.1	SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y CARACTERIZACIÓN DE LOS INSUMOS AGRÍCOLAS	43
6.1.1	<i>Pruebas de calidad en las semillas (Determinación de las variedades a utilizar)</i>	43
6.1.1.1	<i>Germinación estándar</i>	43
6.1.1.2	<i>Envejecimiento acelerado</i>	44
6.1.2	<i>Caracterización del quitosán obtenido</i>	46
6.2	DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA FENOLÓGICA Y BIOQUÍMICA AL USO DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO POSIBLES ELICITORES EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.	46
6.2.1	<i>Evaluación de la germinación de las semillas</i>	46
6.2.2	<i>Evaluación de la velocidad de emergencia de las plántulas</i>	47

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

6.2.3	<i>Evaluación fenológica de las plántulas</i>	48
6.2.4	<i>Pruebas bioquímicas</i>	51
6.2.4.1	Tinción con DAB para determinar la presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno.....	51
6.2.4.2	Cuantificación de proteínas totales.....	53
6.2.4.3	Determinación de catalasa total	53
6.3	EFFECTO DEL QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CULTIVOS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO SOBRE LAS VARIABLES FENOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.....	54
6.3.1	<i>Evaluación de la viabilidad del uso de elicitors combinados</i>	54
6.3.2	<i>Evaluación del porcentaje de germinación total</i>	58
6.3.3	<i>Evaluación de la velocidad de emergencia de la plántula</i>	59
6.3.4	<i>Evaluación fenológica de las plántulas</i>	60
6.3.5	<i>Efecto del quitosán y peróxido de hidrógeno sobre plagas en maíz</i>	75
6.3.6	<i>Cuantificación de proteínas totales</i>	76
6.3.7	<i>Determinación del rendimiento del grano</i>	77
6.4	DETECCIÓN DE GENES MODIFICADOS EN SU EXPRESIÓN COMO CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.	80
6.4.1	<i>Análisis de los resultados de los microarreglos</i>	80
7.	DISCUSIÓN	102
8.	CONCLUSIONES	120
9.	PRODUCTOS GENERADOS DURANTE EL TIEMPO DE REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO	121
9.1	ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS ARBITRADAS INTERNACIONALES	121
9.2	CAPÍTULOS PUBLICADOS EN LIBROS INTERNACIONALES.....	121
9.3	RESÚMENES PUBLICADOS EN MEMORIAS DE CONGRESOS INTERNACIONALES.....	122
9.4	RESUMENES PUBLICADOS EN EVENTOS NACIONALES	123
9.5	TESIS DE LICENCIATURA (CO-ASESORÍA).....	123
9.6	PARTICIPACIÓN COMO REVISORA-EDITORIA EN REVISTAS INTERNACIONALES.....	123

10. REFERENCIAS.....	124
11. ANEXOS.....	138
11.1 CARACTERIZACIÓN DE QUITOSÁN	138
11.1.1 <i>Determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica</i>	138
11.1.2 <i>Determinación del peso molecular viscosimétrico</i>	140
11.2 EXPERIMENTOS EN EL INVERNADERO	142
11.3 ANÁLISIS DE MICORARREGLOS.....	145
11.3.1 <i>Integridad del RNA de las plántulas de maíz</i>	145
11.3.2 <i>Cuantificación de microarreglos</i>	145
11.4 ANOTACIONES DE LOS GENES SOBREENPRESADOS Y SILENCIADOS POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS	148
11.4.1 <i>Genes sobreexpresados por efecto del tratamiento con QN</i>	148
11.4.2 <i>Genes sobreexpresados por efecto del tratamiento con H₂O₂</i>	148
11.4.3 <i>Genes sobreexpresados por efecto del tratamiento combinado</i>	148
11.4.4 <i>Genes silenciados por efecto del tratamiento con QN</i>	148
11.4.5 <i>Genes silenciados por efecto del tratamiento con H₂O₂</i>	148
11.4.6 <i>Genes silenciados por efecto del tratamiento combinado</i>	148
11.5 ARTÍCULO: “MAIZE SEED COATINGS AND SEEDLING SPRAYINGS WITH CHITOSAN AND HYDROGEN PEROXIDE: THEIR INFLUENCE ON SOME PHENOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BEHAVIORS”	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variedades de maíz proporcionadas por el INIFAP para la investigación.	23
Tabla 2. Características de la segunda fase experimental.	27
Tabla 3. Tratamientos derivados de la aspersión de las plántulas de maíz.	29
Tabla 4. Criterio para la evaluación de la velocidad de emergencia de las plántulas.	29
Tabla 5: Experimento para la evaluación de elicitors combinados.	34
Tabla 6. Características de la tercera fase experimental.	35
Tabla 7. Efectos principales de la tercera estrategia experimental.	35
Tabla 8. Diseño de tratamientos de la tercera fase experimental.	36
Tabla 9. Diseño experimental para los microarreglos.	40
Tabla 10. Porcentajes de germinación estándar de las semillas de maíz de las diferentes variedades proporcionadas ...	43
Tabla 11. Porcentajes de germinación estándar de las distintas variedades proporcionadas después de haber sido sometidas a envejecimiento acelerado.	44
Tabla 12. Efecto del acondicionamiento de las semillas con QN y H ₂ O ₂ sobre las variables fenológicas, 19 días después de haber sido sembradas en el invernadero.	49
Tabla 13. Efecto del acondicionamiento de las semillas y aspersión de las plántulas con QN y H ₂ O ₂ sobre las variables fenológicas 30 días después de haber sido sembradas en el invernadero.	49
Tabla 14. Efecto del acondicionamiento de las semillas QN y H ₂ O ₂ sobre algunas variables fenológicas 36 días después de haber sido trasplantadas a la parcela.	50
Tabla 15. Análisis cualitativo de la presencia de H ₂ O ₂ en hojas de maíz provenientes de semillas acondicionadas con QN y H ₂ O ₂ mediante la técnica de DAB.	52
Tabla 16. Efecto del recubrimiento de las semillas de maíz y de la aspersión de las plántulas con QN y H ₂ O ₂ sobre el contenido de proteínas (µg), 30 días después de la siembra en el invernadero.	53
Tabla 17. Efecto del acondicionamiento de las semillas y aspersión de las plántulas con QN y H ₂ O ₂ sobre la actividad de catalasa (µmoles de H ₂ O ₂ destruido/mg proteína*min) 30 días después de la siembra en el invernadero.	54
Tabla 18. Germinación de las semillas de maíz en agar PDA (27 horas después de la siembra) y longitud de sus raíces y plúmulas (8 días después de la siembra).	55

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

Tabla 19. Características de las semillas germinadas en agar PDA, previo tratamiento con los acondicionamientos correspondientes.....	57
Tabla 20. Medias de los porcentajes de germinación de las semillas sometidas a los diferentes tratamientos.....	58
Tabla 21. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la plaga de gusano cogollero en las plantas de maíz	76
Tabla 22. Efecto del estrés, del acondicionamiento de las semillas y de la aspersion de las plántulas con QN, H ₂ O ₂ y la combinación de ambos sobre el porcentaje de Nitrógeno contenido (cuantificación indirecta de proteínas) en las plantas en su fase reproductiva.....	77
Tabla 23. Cuantificación de inflorescencias femeninas en las plantas de maíz previo a la cosecha.....	78
Tabla 24. Cantidad de genes de maíz sobreexpresados y silenciados bajo los acondicionamientos con QN, H ₂ O ₂ y la combinación de ambos.....	80
Tabla 25. Cantidad de genes de maíz que se sobreexpresan y silencian en común bajo distintos tratamientos.....	81
Tabla 26. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del tratamiento con QN.	83
Tabla 27. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del tratamiento con H ₂ O ₂	84
Tabla 28. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del tratamiento combinado.	85
Tabla 29. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del QN/tratamiento combinado y H ₂ O ₂ /tratamiento combinado.....	86
Tabla 30: Determinación de las viscosidades de las soluciones de quitosán a diferentes concentraciones.....	140
Tabla 31. Fragmento de los resultados obtenidos de la cuantificación de una imagen de microarreglos, correspondiente al maíz con acondicionamiento combinado de QN/H ₂ O ₂	146
Tabla 32. Fragmento de algunos de los genes sobreexpresados encontrados mediante la cuantificación de microarreglos en función de su valor de Z-score, correspondiente al maíz con acondicionamiento combinado de QN/H ₂ O ₂	147

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentajes de germinación estándar de las distintas variedades de maíz proporcionadas después de haber sido sometidas a envejecimiento acelerado ($p=0.0033$).	45
Gráfica 2. Medias de los porcentajes de germinación en función de la variedad y del acondicionamiento de las semillas.	47
Gráfica 3. Medias de los valores de emergencia de las plántulas provenientes de semillas acondicionadas.	48
Gráfica 4. Medias de la velocidad de emergencia de las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos ($p<0.0001$). ..	60
Gráfica 5. Cinética comparativa de los controles de las diferentes variedades de maíz utilizado.	61
Gráfica 6. Cinética comparativa de las semillas sometidas a estrés por <i>A. flavus</i> , acondicionamiento y aspersiones combinadas para las diferentes variedades de maíz utilizado.	62
Gráfica 7. Cinética comparativa de las semillas sometidas a estrés por <i>A. flavus</i> +sequía, acondicionamiento y aspersiones combinados para las diferentes variedades de maíz utilizado.	62
Gráfica 8. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p<0.05$).	63
Gráfica 9. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por <i>A. flavus</i> y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p>0.05$).	67
Gráfica 10. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de los diferentes elicitors ($p<0.05$).	68
Gráfica 11. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p<0.05$).	68
Gráfica 12. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p<0.05$).	69
Gráfica 13. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por <i>A. flavus</i> y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p>0.05$).	69
Gráfica 14. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de las diferentes soluciones ($p<0.05$).	70
Gráfica 15. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p<0.05$).	70
Gráfica 16. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p<0.05$).	71

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

Gráfica 17. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por <i>A. flavus</i> y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p>0.05$).	71
Gráfica 18. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de los diferentes elicitors ($p<0.05$).	72
Gráfica 19. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p<0.05$).	72
Gráfica 20. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p<0.05$).	73
Gráfica 21. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por <i>A. flavus</i> y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p>0.05$).	73
Gráfica 22. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de las diferentes soluciones ($p<0.05$).	74
Gráfica 23. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p<0.05$).	74
Gráfica 24. Rendimiento de los granos de maíz provenientes de las mazorcas obtenidas después del acondicionamiento de las semillas y la aspersión de las plántulas con QN, H_2O_2 y la combinación de ambos bajo condiciones de estrés por <i>A. flavus</i> , <i>F. moniliforme</i> o sequía.	79
Gráfica 25. Determinación del grado de desacetilación del quitosán sintetizado en el laboratorio, mediante el método de titulación potenciométrica.	138
Gráfica 26. Determinación de la viscosidad intrínseca del quitosán sintetizado en el laboratorio.	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Observaciones de la presencia de H ₂ O ₂ de los cortes hechos a las hojas de maíz de distintas variedades sometidas a los distintos acondicionamientos.	51
Figura 2. Crecimiento fenológico cualitativo y desarrollo microbiano en semillas de maíz sometidas a los diferentes recubrimientos después de 8 días de haber sido colocadas en agar PDA.	56
Figura 3. Representación mediante diagramas de Venn de los genes sobreexpresados o silenciados comunes o distintos de acuerdo a los diferentes tratamientos aplicados.	81
Figura 4. Siembra de las semillas.....	142
Figura 5. Inoculación de las semillas.....	142
Figura 6. Criterio para la determinación de la velocidad de emergencia de las plántulas.....	142
Figura 7. Plántulas control emergidas 23 días después de la siembra.	142
Figura 8. Simulación de cámara húmeda para la imposición de estreses bióticos en plántulas.	142
Figura 9. Aspersión con los elicitores.....	143
Figura 10. Clorosis causada por daño fúngico	143
Figura 11. Comparación de las longitudes de plántulas.....	143
Figura 12. Formación de las mazorcas, con granos aún en estado lechoso.....	143
Figura 13. Mazorca madura, lista para ser cosechada.	143
Figura 14. Formación de mazorcas siamesas (presentes en plantas con estrés inducido).	144
Figura 15. Mazorcas con bajo rendimiento de grano (evidente por su escaso grosor)	144
Figura 16. Recolección de la mazorca madura con rendimiento alto de grano.	144
Figura 17. Plaga de Spodoptera frugiperda en el cultivo de maíz.....	144
Figura 18. RNA de las plántulas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos	145

RESUMEN

El maíz es un cultivo de importancia mundial porque cubre los requerimientos nutricionales de quien lo consume a un bajo costo, aumentando la producción de leche y carne de buena calidad en el ganado, por lo que su inocuidad debe ser garantizada. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de dos insumos agrícolas (quitosán y peróxido de hidrógeno) en cultivos de maíz bajo condiciones de estrés. Para el desarrollo experimental se midieron variables de respuesta fenológicas, bioquímicas, microbiológicas y de expresión molecular. Dicho proceso incluyó la selección del material vegetal en condiciones de envejecimiento acelerado, usando semillas de maíz tanto de variedad normal como de alta calidad proteica (QPM). Se buscó determinar una posible actividad elicitora utilizando quitosán y peróxido de hidrógeno como insumos agrícolas, considerando la forma y oportunidad de aplicación. Posteriormente, se trabajó en condiciones de estrés biótico con *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, y de estrés abiótico con sequía. Finalmente se realizó un montaje para detectar genes asociados al efecto de los insumos mencionados. Los resultados muestran un efecto significativo en lo concerniente a la germinación por efecto del tipo de maíz sin estrés. Se observó que el peróxido favoreció la germinación y emergencia de las plántulas hasta en un 10%, mientras que el quitosán propició un desarrollo fenológico más vigoroso en un 6.5%. Ambos insumos promovieron un incremento de hasta un 200% en la cantidad de proteína producida. Con la aplicación de los dos insumos en condiciones de estrés, se registró en la planta una producción significativa de peróxido endógeno comparada con el control, y la aspersión continua de las plántulas de maíz con los dos insumos favoreció en un 12% su desarrollo fenológico durante la etapa vegetativa. El efecto de los elicitors sobre el estrés fue incierto, aunque la aplicación de quitosán disminuyó la plaga de larvas de *Spodoptera frugiperda* hasta en un 98%. Los genes que manifestaron su sobreexpresión como producto del tratamiento con peróxido y quitosán indican que estos insumos se comportan como inductores de mecanismos de defensa, ya que el peróxido se activa como respuesta al estrés mientras que el quitosán se induce por receptores específicos, involucrando la activación de enzimas como la peroxidasa y la quitinasa respectivamente, e involucrándose en rutas metabólicas específicas de protección, regulación y defensa de la planta. Los resultados sugieren que, bajo las condiciones aplicadas en este experimento, el quitosán y el peróxido son elicitors que actúan propiciando mecanismos de defensa en la planta, pudiendo ser aplicados para la protección de cultivos de importancia agroalimentaria para consumo humano y animal.

Palabras clave: Elicitor, Estrés biótico, estrés abiótico, quitosán, peróxido de hidrógeno, peroxidasa, quitinasa.

ABSTRACT

Maize is a crop of global importance because it covers the nutritional requirements of the consumers at a low cost, increasing the production of high quality meat and milk in cattle, so that, the safety of this food must be guaranteed. The objective of this study was to determine the effect of two agricultural inputs (chitosan and hydrogen peroxide) in maize under stress conditions. For the experimental development, phenological, biochemical, microbiological and molecular expression response variables were measured. This process included the selection of plant material under accelerated aging conditions, using a normal maize variety and high quality protein (QPM) variety. It was sought to determine a possible elicitor activity using chitosan and hydrogen peroxide as agricultural inputs, considering the manner and time of application. Subsequently, the experiment was conducted under biotic stress conditions with *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*, and under abiotic stress conditions with drought. Finally, a mounting was performed in order to detect genes associated with the effect of the mentioned inputs. Results show a significant effect on germination due to the effect of the maize variety without stress. It was observed that hydrogen peroxide favored germination and seedling emergence even in a 10%, while chitosan promoted a more vigorous phenological development in a 6.5%. Both, chitosan and hydrogen peroxide promoted an increase to 200% in the amount of protein produced. With the application of both inputs under stress conditions, the plant registered a significant increase on the production of endogenous hydrogen peroxide, and by spraying continuously the maize seedlings with the two inputs, their phenological development increased in a 12% during the vegetative stage. Elicitors effect over stress was unclear, although the application of chitosan decreased the number of pests of *Spodoptera frugiperda* even in a 98%. Genes that were over-expressed as the product of hydrogen peroxide and chitosan treatments, indicate that these inputs behave as defense mechanisms inducers, because hydrogen peroxide activates as a stress response while chitosan gets induced by specific receptors, involving the activation of some enzymes such as peroxidase and chitinase respectively, and involving specific metabolic pathways of plant protection, regulation and defense. The results of this study suggest that, under the conditions that were applied in this experiment, chitosan and hydrogen peroxide are elicitors which act propitiating defense mechanisms in plants, which could be applied for the protection of crops of agribusiness importance focused to human and animal consumption.

Keywords: Elicitor, biotic stress, abiotic stress, chitosan, hydrogen peroxide, peroxidase, chitinase.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar a nivel fenológico, bioquímico y molecular, el efecto del quitosán y peróxido de hidrógeno, y su influencia sobre la respuesta normal y contra estrés de tipo biótico y abiótico en cultivos de maíz para consumo animal.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar el material vegetal y caracterizar los insumos agrícolas a utilizar.
- Determinar la respuesta fenológica y bioquímica al uso de quitosán y peróxido de hidrógeno como posibles elicitors en plántulas de maíz.
- Determinar el efecto del quitosán y peróxido de hidrógeno en cultivos de maíz bajo condiciones de estrés biótico y abiótico sobre las variables fenológicas y bioquímicas.
- Detectar genes modificados en su expresión como consecuencia de la aplicación de quitosán y peróxido de hidrógeno en plántulas de maíz.

2. HIPÓTESIS

El quitosán y el peróxido de hidrógeno pueden comportarse como elicitors en cultivos de maíz, induciendo la sobreexpresión de genes de interés bioquímico para aplicaciones funcionales. Ambos elicitors pueden optimizar las características fenológicas y bioquímicas del maíz, convirtiéndose en un cereal más resistente. El quitosán y el peróxido de hidrógeno pueden disminuir, en los cultivos de maíz, el daño producido por estreses bióticos y abióticos, mejorando sus características alométricas y bioquímicas incluso bajo tales condiciones.

3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los problemas ambientales resultan de los avances tecnológicos, el crecimiento de la población y la economía de consumo, generando el uso inadecuado de los recursos naturales. Por ello, cada vez es más complicado mantener una producción pecuaria y agrícola que permita cubrir las necesidades de los consumidores. Recientemente, la ciencia se ha enfocado al estudio de estrategias biotecnológicas para estos fines, dentro de las cuales se encuentra el presente trabajo, en el que se propone una alternativa biotecnológica enfocada a la protección de cultivos de maíz en sus diferentes estadios a través de la adición de quitosán y peróxido de hidrógeno, sustancias que, debido a su inocuidad medioambiental y alimentaria, se integran a las nuevas tecnologías de sustentabilidad. Mediante el acondicionamiento de semillas y plántulas de maíz con soluciones de quitosán y peróxido de hidrógeno, se logra la producción de cultivos con un desarrollo fenológico más acelerado, además de crear resistencia a diferentes condiciones atmosféricas adversas y a algunos agentes patógenos de los cuales este cultivo es blanco, descartando así el uso de plaguicidas, pesticidas, disolventes, iones metálicos tóxicos, derivados del petróleo, y otros compuestos dañinos tanto para la planta como para quien la consume dentro de la cadena alimenticia, constituyendo una alternativa tan promisoriosa como la biorremediación. Mediante estas tecnologías de biotecnología ambiental, se pretenden elevar la producción tanto de los cultivos como del ganado, pues el maíz es el alimento esencial de muchas especies animales que a su vez sirven de alimento al ser humano. Por otra parte, considerando que mediante el procesamiento de desechos marinos se obtiene el biopolímero que se empleó en la presente investigación (el quitosán), se potencializa la participación de la biotecnología ambiental, pues con ella se logran nuevas metodologías para el tratamiento de desperdicios, la conversión de subproductos naturales en energía y nuevos materiales, y la limpieza de sitios contaminados, resolviendo así grandes problemáticas ambientales mundiales.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 EL MAÍZ: GENERALIDADES

El maíz es el cultivo más importante de México y el mundo, ya que además de suministrar nutrientes esenciales al consumidor, es una materia prima básica en la industria de transformación (FAO, 1993; SAGARPA, 2007). De acuerdo a lo reportado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), México ocupa el 7° lugar a nivel mundial en la producción de maíz, después de Estados Unidos de América, China, Brasil, Argentina, Ucrania e India. En 2011, fueron cosechadas 6,069,090 Ha de maíz en nuestro país, lo que se traduce en una producción anual de 17,635,400 toneladas de cereal, generando 387,515 toneladas de semilla destinada para la siembra del siguiente año (FAOSTAT, 2013).

Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un sistema radicular fibroso. Su reproducción es por polinización cruzada. Las panojas (generalmente una por tallo) son las estructuras donde se desarrolla el grano en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1,000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1,000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo (FAO, 1993; Grolleaud, 1997). El desarrollo de la planta de maíz se divide en dos fases fisiológicas. La primera es la *fase vegetativa*, en donde se desarrollan y diferencian los tejidos hasta que aparecen las estructuras florales y consta de dos ciclos: en el primero se forman las primeras hojas, el desarrollo es ascendente, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción; en el segundo ciclo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción, finalizando con la emisión de los estigmas. La segunda fase es la *fase reproductiva*, que se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el

incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor, además, el peso de los granos aumenta con rapidez. La planta desarrolla características y diferencias morfológicas en las fases vegetativa y de reproducción, y como consecuencia, está involucrada en el terreno de la evolución, de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han adaptado a zonas ecológicas concretas, desarrollando características particulares, como por ejemplo la sensibilidad con respecto a la duración del día y a la temperatura, que limitan su adaptabilidad a zonas con diferente latitud y altitud. Los principales factores de rendimiento son el número y el peso de los granos, determinados por factores genéticos cuantitativos (FAO, 1993).

Las estructuras que constituyen el grano del maíz (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren propiedades físicas y químicas (color, textura, tamaño, etc.) que son importantes en la selección del grano como alimento (Kato-Yamakake *et al.*, 2009). La estructura del maíz opaco-2 mejorado (conocido como “*de alta calidad proteica*”, QPM) se diferencia del común en lo tocante al endospermo: su matriz proteica es más delgada y presenta menos y más pequeños cuerpos proteicos debido a una limitación de la síntesis de zeína. Al endospermo corresponde cerca del 83% del peso del grano, el germen equivale al 11% y el pericarpio al 5%. El resto está constituido por la piloriza, estructura cónica que junto con el pedicelo une el grano a la espiga. Debido a la importancia que tiene el maíz QPM en México (por ser un maíz producido en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, en coordinación con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, INIFAP), se han hecho investigaciones sobre su productividad, y aprovechamiento, el cual es de 90% en comparación con el 39% de los maíces comunes. Por ello es que el maíz QPM se utiliza en la alimentación de aves y cerdos, ya que con una menor cantidad de alimento se puede incrementar el peso que se logra con el grano de calidad normal (Espinosa *et al.*, 2005; Mendoza-Elos *et al.*, 2006). De igual forma, se han hecho investigaciones relacionadas con el mejoramiento genético del

maíz QPM, la producción de tecnología de semillas, forrajes, plagas de granos almacenados, manejo agronómico, transferencia de tecnología, análisis de calidad y su efecto en la dieta de humanos y animales (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2003; Shewry, 2007).

4.2 EL MAÍZ COMO BASE DE LA ALIMENTACIÓN Y LA NUTRICIÓN ANIMAL

El maíz representa el 60% de la producción total de granos y es un cereal que brinda al consumidor hasta el 59% de la energía necesaria para cubrir sus requerimientos nutricionales, siendo el alimento básico de humanos y animales (Espinosa, 2005). Para la alimentación animal no solo se utiliza el grano de maíz; también la plántula es empleada como forraje para animales productores en las industrias lácteas y cárnicas, mientras que las hojas secas y las flores se utilizan como forraje de buena calidad para alimentar ruminantes en países en desarrollo (FAO, 1993).

En el caso de la alimentación del ganado (especialmente vacas y animales de tiro), se busca cubrir los requerimientos de los animales al menor costo posible. Por ello, los forrajes bien manejados son un alimento completo que permite una buena producción de leche y carne. Uno de los aspectos que buscan cubrir las buenas prácticas agropecuarias es que la cantidad y calidad de la proteína que se aporte en la dieta sea la adecuada para el animal, por lo que es prioritario reconocer y usar de modo apropiado forrajes como las leguminosas u otras especies ricas en proteína. Pese a que anteriormente se empleaban especies específicas de pastos para forraje, en la actualidad se ha promovido el uso de maíz, soya u otras leguminosas de grano, palmiste o semilla de algodón. Cada uno de estos insumos debe ser reconocido por su valor nutricional para saber el aporte de nutrientes totales a la dieta. Por lo general se entregan como materia seca, por lo que tienen un alto potencial de reemplazar forrajeras de uso convencional (Moreno-Osorio y Molina-Restrepo, 2007).

Desde las últimas décadas, el maíz se ha convertido en el cultivo más popular para ensilar porque satisface los requisitos exigidos. Inicialmente, se utilizaba el rastrojo de maíz, no obstante, tiene un valor nutritivo muy bajo. La Especialidad de Ganadería del Colegio de Postgraduados ha investigado el ensilaje de rastrojo de maíz con excretas de rumiantes o cerdos. La mezcla que mejor ha funcionado es 40 % de rastrojo de maíz, 50% de estiércol o cerdaza fresca, 9 % de agua y 1 % de melaza diluida. Su valor nutritivo oscila entre 12 % de proteína y 2.5 milicalorías por kilogramo de materia seca. Este producto puede ofrecerse a niveles del 50%de su ración total (Cobos Peralta, s/a). El maíz en forma de forraje a partir de la planta se ha empleado en las últimas décadas, y se basa en el aprovechamiento directo de verdes y pasturas, recursos que se caracterizan por poseer elevados porcentajes de proteína altamente degradable en rumen, especialmente en otoño-invierno, y bajas concentraciones de hidratos de carbono solubles. Estos desbalances nutricionales generan un ambiente ruminal con elevadas concentraciones de amonio. El uso de granos húmedos podría utilizarse como corrector de estos problemas, aumentando la utilización del Nitrógeno amoniacal a nivel ruminal y mejorando la producción de la leche y las ganancias de peso vivo en animales de carne (Santini, 2005).

Para la creación de los silos, la planta se debe cortar después de la formación de la espiga, cuando la semilla se encuentra en estado masoso-lechoso, que se caracteriza cuando mediante la presión con la uña, el grano libera una sustancia blanquecina que mezclada con el mismo grano forma una masa; en este momento es cuando el maíz presenta su máxima concentración de carbohidratos solubles (Cobos-Peralta, s/a). La calidad del silaje de maíz está relacionada con la concentración, digestibilidad y tasa de digestión de la pared celular y con su contenido de grano en el momento de ensilar. Sin embargo, no siempre el mejor híbrido para grano es el más apto para ensilar. La calidad y el consumo del silaje de maíz pueden mejorarse a través de un aumento en la digestibilidad y tasa de digestión de la pared celular. La utilización del grano de maíz cosechado húmedo y

conservado bajo la forma de silaje en reemplazo de los granos secos, ofrece ventajas para los sistemas de producción, tanto lecheros como de carne, permitiendo disminuir las pérdidas de campo, cosecha y almacenamiento y evitando los gastos de flete y secado. Adicionalmente la cosecha anticipada deja un rastrojo de mayor calidad y al desocupar tempranamente los lotes, permite una mejor planificación en la secuencia de cultivos. Si bien no existen grandes diferencias en el valor nutritivo de granos de maíz húmedos y secos, la mayor degradabilidad ruminal de la fracción almidonosa del grano húmedo podría constituir una ventaja nutricional para los sistemas de producción pastoril, donde los animales consumen forrajes con alto contenido de proteína (Santini, 2005).

Dentro de las características menos favorables del ensilaje de maíz está su bajo contenido de proteínas, lo que implica que como dieta única tenga limitantes al consumo y producción de animales en engorde. Los complementos para superar esta deficiencia pueden ser pasturas de elevada calidad o suplementos proteicos comerciales. Los mejores resultados de la utilización de ensilaje se obtienen con leguminosas de alta calidad (con rápida velocidad de digestión y alto contenido proteico). No obstante, se ha encontrado que el aumento del nivel de suplementación con ensilaje de maíz, y a su vez la disminución en la asignación de pasturas, determina una mayor ganancia en peso de los animales, debido a una mayor concentración de energía en la dieta (Vaz-Martins *et al.*, 2006).

El uso de maíz QPM en sustitución de las variedades normales es otra alternativa para mejorar la calidad de las dietas. Los maíces QPM combinados con frijol en una proporción 70:30 en peso han demostrado ser benéficos en la alimentación de los animales (Bressani y Elías, 1969). En cerdos, se ha encontrado que tanto su ganancia de peso como la calidad proteica de su carne son mayores cuando son alimentados con las mezclas QPM/frijol que cuando son alimentados con las mezclas de maíz de variedad normal/frijol. Esto puede

deberse a la alta concentración de lisina y triptófano presente en los maíces de variedad QPM (Contreras *et al.*, 1980; 1981).

Una gran amenaza para los ensilajes la constituyen las condiciones ambientales y los patógenos. Por ello, es recomendable definir el estado fenológico y la humedad del cultivo al momento del corte y picado, los henos se deben conservar secos, con una humedad menor al 15%, deben estar libres de hongos, con tallos finos y flexibles para lograr una mayor digestibilidad, y deben contar con una buena cantidad de hojas lo cual asegura un mayor contenido de proteínas (Gallardo, 2011).

4.3 ESTRESSES QUE AFECTAN AL MAÍZ Y SU IMPLICACIÓN EN LA SALUD ANIMAL

Dado que los alimentos destinados a la nutrición animal constituyen un importante canal de introducción de peligros en la cadena alimentaria humana, debe evaluarse su inocuidad antes de suministrarlos a los animales. Las evaluaciones de la inocuidad contemplan la seguridad de los animales, de los consumidores directos del pienso, de los seres humanos y de los consumidores indirectos de los residuos que pudieran permanecer en los alimentos de origen animal. En algunos casos, se evalúa también el riesgo para las personas que trabajan mezclando los piensos, por lo que es importante establecer directrices lo suficientemente genéricas como para abarcar los requisitos de todos los ingredientes (FAO, 2007).

Existen varios factores que afectan al maíz, siendo uno de los más importantes el estrés, el cual implica la presencia de uno o varios factores externos que ejercen una influencia negativa sobre el crecimiento vegetal, afectando sus estadios, desde la germinación hasta la floración, mermando la productividad y la calidad de los cultivos afectados. En general, los estreses pueden dividirse en dos grupos: El estrés biótico y estrés abiótico.

4.3.1 ESTRÉS BIÓTICO

El estrés biótico son todas aquellas condiciones biológicas o microbiológicas que involucran la presencia de seres vivos (principalmente insectos, bacterias u hongos) y que afectan al cultivo en cuestión. En México, los cultivos de maíz se encuentran afectados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, ya que crecen sobre la planta produciendo su deterioro y generando metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para las plantas, pero sobre todo para los animales que los consumen.

Aspergillus flavus es un hongo filamentoso, saprobio y común del suelo que contribuye a los procesos de descomposición de la materia orgánica especialmente en sitios de alta humedad. Se encuentra en las semillas o en los productos de las plantas después de la cosecha y durante su almacenamiento, por lo tanto, se encuentra también en la harina de granos y cereales, productos procesados, y en el silaje (Widstrom, 1996). *A. flavus* es patógeno de plantas que se comporta como hongo oportunista en los animales generando intoxicaciones debido a la producción de micotoxinas, entre las que destacan las aflatoxinas B1, B2, B2a, G1, G2 y M1, que son metabolitos secundarios con efectos carcinogénicos, hepatotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores a altas concentraciones (Keeler and Anthony, 1983; Bolet y Socarrás, 2005). Las aflatoxinas son muy estables y persistentes, por lo que son difíciles de eliminar. Debido a que están contenidas en muchos cultivos que son consumidos por los animales, las aflatoxinas se han convertido en un grave problema tanto de animales como de humanos. Los animales más susceptibles a enfermarse por aflatoxinas son los caballos, conejos, pavos, pollos, cerdos, vacas y cabras (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011a). Además, las aflatoxinas pueden transmitirse de los animales a los humanos mediante la alimentación (por los huevos, la carne y los productos lácteos), con el consecuente riesgo para la salud humana, particularmente en

países en vías de desarrollo, en donde no se cuentan con legislaciones ni tecnología suficiente para lograr el combate de este estrés (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2013).

Fusarium moniliforme es un hongo considerado como uno de los mayores patógenos para plantas y cereales, causando la podredumbre de la planta y la mazorca del maíz. *F. moniliforme* produce un amplio grupo de micotoxinas de entre las cuales destacan las fumonisinas A1, A2, B1, B2, B3, B4, FB1, FB2 y FB3; que son altamente contaminantes para el maíz (Placinta *et al.*, 1999; D'Mello *et al.*, 1999). Las fumonisinas (particularmente la B1 y B2), provocan problemas neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, edemas pulmonares y lesiones cardíacas (Gimeno, 2001). Existen evidencias de daño bioquímico, celular y morfológico en los animales que consumen alimento contaminado con fumonisinas. Dentro de las alteraciones que se observan en equinos, cerdos, rumiantes y pollos, se encuentran daño hepático, gastrointestinal, cerebral, pulmonar e incluso mortalidad, así como un defecto inmunosupresor al inhibir la replicación de células leucocitarias e inhibir la actividad fagocítica de los macrófagos (Placinta *et al.*, 1999; D'Mello *et al.*, 1999). Concentraciones bajas de contaminación con FB1, pero suministradas en periodos de tiempo prolongado, dan lugar a necrosis de hígado y a degeneraciones progresivas que interfieren con la síntesis proteica, la ganancia de peso vivo y el índice de desarrollo de los animales afectados (Mallman y Dilkin, 2007).

En nuestro país, quienes resultan más susceptibles a sufrir daños por efecto de las micotoxinas son los cerdos (especialmente los domésticos), ya que en su dieta se utilizan básicamente granos como el maíz y el sorgo. Cuando el nivel de micotoxinas en la ración es muy elevado, el animal rechaza el alimento ya que el aspecto y sabor de éste resulta desagradable, por lo que las intoxicaciones agudas son poco comunes (Osweiler, 1992). En lo que a la salud y a la productividad animal se refiere, el problema más serio está en las intoxicaciones que ocurren en forma gradual, donde los cerdos ingieren cantidades

subletales de la toxina por un periodo de tiempo prolongado. Estas intoxicaciones afectan en forma considerable la salud de los animales, manifestándose en una disminución en su ritmo de crecimiento y su eficiencia productiva. Por el contrario, en el campo, se establece como regla probable que el animal ha ingerido a lo largo de cierto tiempo cantidades de micotoxina que han llegado al nivel de causar problema, pero además resulta común la presencia de cuadros clínicos que involucran padecimientos infecciosos aunados al daño causado por micotoxinas, debido a que algunas de ellas son inmunosupresoras, facilitando la manifestación de enfermedades que pueden haber estado en forma subclínica en la población o bien que son de reciente introducción, pero en otras circunstancias no hubieran tenido la misma facilidad para afectar a los animales (Lizárraga-Paulín et al., 2011a).

4.3.2 ESTRÉS ABIÓTICO

Las condiciones climáticas o medioambientales que afectan a los cultivos son conocidas como estrés abiótico. En ellas se incluyen el estrés hídrico y la acidez del suelo, asociadas consecuentemente a la presencia de patógenos. La sequía constituye uno de los principales problemas para los cultivos, ya que está directamente asociada con otros problemas como la temperatura o la salinidad (a menudo causada por el riego), las cuales generan pérdidas en el rendimiento del cultivo.

El maíz es uno de los cultivos más nobles en cuanto a respuesta a la sequía se refiere, ya que sus raíces se adaptan fácilmente a la escasez de agua mediante un ajuste osmótico, obteniendo humedad y nutrientes de las partes más profundas del suelo. Además, tiene la capacidad de producir "osmoprotectores", que son azúcares, aminoácidos y derivados ácidos que sirven como escudo para las proteínas y membranas involucradas en efectos nocivos de la deshidratación mediante la formación de una capa protectora en su

superficie o mediante la eliminación de los radicales hidroxilo que afectan a las proteínas (Moffat, 2002).

Pese a la alta resistencia a la sequía que posee el maíz, en algunos estados de la República Mexicana las precipitaciones pluviales son nulas durante periodos anuales. Es por esa razón que recientemente se han producido nuevas variedades de cereales resistentes a la sequía mediante la producción de variedades mejoradas, híbridas y transgénicas. Sin embargo, para que la sequía no sea un impedimento para la producción alimentaria, es preferible utilizar el cultivo de maíz como alimento forrajero antes de permitir que se seque completamente en el campo. El maíz estresado por sequía se puede usar en pastoreo, como forraje fresco picado, o conservado mediante henificado, henolado o ensilado. Aunque el pastoreo de las plantas de maíz con estrés hídrico puede ser una alternativa, la recolección mecánica maximiza la cantidad de forraje obtenido. Para evitar su calentamiento, la administración del forraje de maíz fresco debe hacerse inmediatamente después del segado. Sin embargo, este método no suele utilizarse debido a la elevada cantidad de trabajo requerida. Si la sequía ocurre en una fase temprana de crecimiento la conservación del forraje en forma de heno o henolado podría ser posible. La henificación generalmente no es recomendada debido al alto contenido en humedad de las plantas de maíz (75 – 90%) y a la dificultad de secarlas. Preservar el forraje como henolado (50-60% de humedad) también presenta dificultades debido a que las cañas del maíz pueden perforar el plástico de la bola y permitir la infiltración de aire. La aireación de la masa forrajera provoca calentamiento (e incluso combustión espontánea), crecimiento de hongos y producción de micotoxinas. Debido a estos problemas, el aprovechamiento de cultivos de maíz con estrés hídrico en forma de ensilados es la técnica más recomendada (Hesterman and Carter, 1990; Díaz-Royón y García, 2013).

4.4 ALTERNATIVAS PARA LA PROTECCIÓN DEL MAÍZ Y EL COMBATE CONTRA ESTRESSES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS

Los estreses bióticos y abióticos representan una gran amenaza para los cultivos agrícolas, por lo que se han estudiado nuevos métodos que permiten incrementar su producción mejorando su calidad. Con la finalidad de aumentar los índices de germinación de las semillas y la fenología de las plantas (su crecimiento y desarrollo), se ha probado la aplicación de algunas sustancias químicas y bioquímicas en diferentes cultivos, tal es el caso del ácido salicílico (Khodari, 2004), el ácido abscísico (Sarath *et al.*, 2007), y más recientemente el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estas sustancias también son conocidas como elicitors (inductores de mecanismos de defensa).

La resistencia a enfermedades producida por patógenos (hongos, bacterias y virus), depende de que la planta sea capaz de reconocer al patógeno al inicio del proceso de infección (Camarena-Gutiérrez, 2006). Este daño “inmuniza” a la planta contra infecciones posteriores por patógenos homólogos, aún cuando la planta no lleve genes determinantes de la resistencia específica del cultivar. A esta respuesta se le denomina Resistencia Sistémica Adquirida (SAR por sus siglas en inglés); sin embargo, también se ha descubierto que tales resistencias pueden ser inducidas mediante la adición de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR) e incluso otros agentes bioquímicos como los elicitors, los cuales generan una resistencia sistémica inducida (ISR) debido a la activación de cascadas de señalización para la defensa de las plantas (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007). Los mecanismos inducidos en el sitio de la infección y asociados con respuestas hipersensibles incluyen la síntesis de enzimas hidrolíticas que atacan a hongos y bacterias, síntesis de compuestos antimicrobianos llamados fitoalexinas y alteraciones en la síntesis de proteínas estructurales de la pared celular. Muchas de estas respuestas se deben a la activación de la transcripción de genes específicos,

relacionados con la defensa de las plantas. La liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) es un proceso característico de la respuesta hipersensible causada por patógenos o elicitores. La generación de ROS ocurre en dos fases: una inicial, que sucede minutos después de la adición del patógeno o elicitador, y una secundaria que comienza de una a tres horas después de que la fase inicial ha terminado, involucrando la activación de enzimas preexistentes que en condiciones normales no son expresadas (Apel and Hirt, 2004; Camarena-Gutiérrez, 2006; Benezzer *et al.*, 2008).

Los elicitores son moléculas que estimulan la activación de mecanismos de defensa en plantas, llevando a cabo un procedimiento a nivel celular en donde las células de la planta perciben y transducen señales biológicas para activar las respuestas de defensa (Hahn, 1996). Estos inductores se han clasificado en función de su origen y estructura molecular, resultando en elicitores bióticos, abióticos, hormonas, proteínas, glicoproteínas, y oligosacáridos. Existen proteínas de unión a elicitores específicos que actúan como receptores fisiológicos en las cascadas de transducción de señal, variando su especificidad dependiendo del sistema en estudio, lo que nos permite conocer las bases moleculares que originan los intercambios de señales entre las plantas hospederas y los patógenos microbianos, activando como consecuencia tales mecanismos de defensa (Hahn, 1996; Radman, 2003; Angelova, 2006). Un grupo importante de elicitores lo constituyen los oligosacáridos, que además de tener actividad prebiótica, alteran la permeabilidad de la membrana celular y promueven la producción de metabolitos secundarios que la planta aprovecha para combatir el daño. Los elicitores no solamente permiten que los mecanismos de defensa se activen durante el crecimiento de la planta, sino que también se mantienen después de la cosecha durante su almacenamiento, evitando mermas en la cantidad final de producción. Aún cuando los cultivos se desarrollen bajo condiciones óptimas, los tejidos que forman el explanto siempre sufren de estrés (deseccación, daños mecánicos, daños en la desinfección, cambios en los potenciales hídrico, salino y

osmótico, cambios de pH, etc.), provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos. Estas sustancias provocan una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas, reacciones de estrés en las células vecinas a las dañadas, e incluso una muerte prematura de células específicas de una zona determinada o del lugar de la infección, lo cual es un mecanismo de defensa semejante a la apoptosis (Benhamou, 1996).

Existen elicitores que ya se han probado y han dado resultados exitosos, tal es el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que induce en las plantas la expresión de la misma respuesta de resistencia y el mismo conjunto de genes que cuando son inducidas por un patógeno. A pesar de que estos mecanismos no han sido profundamente estudiados, se cree que el peróxido de hidrógeno es un mediador del diálogo entre diferentes vías metabólicas y es una molécula señal que contribuye al fenómeno de tolerancia cruzada, en la cual las plantas expuestas a un estrés ofrecen protección hacia otro factor (Camarena y de la Torre, 2007). Sin embargo, hay elicitores de reciente aplicación, tal es el caso del quitosán (QN).

Pese a que el H_2O_2 ha sido utilizado durante años para desinfectar las semillas antes de la siembra (Piernas and Guiraud, 1997; Weissinger and Beuchat, 2000; Miché and Balandreau, 2001), recientemente se ha encontrado que su aplicación exógena incrementa los índices de germinación de las semillas, los porcentajes de emergencia de los coleóptilos, la elongación de coleóptilos y raíces, y el peso fresco de las plántulas (Korystov and Narimanov, 1997; Amjad *et al.*, 2004; Çavusoglu and Kabar, 2010). El H_2O_2 se ha asociado a importantes funciones en el metabolismo vegetal, a la homeostasis de las plantas y a la generación de ROS. Se ha reportado que sumergir la semilla en soluciones de H_2O_2 previo a la siembra, induce un incremento significativo en los niveles de actividad

enzimática, incluyendo catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD), enzimas juegan un importante papel en la sobreexpresión natural de respuestas ante estrés y en la activación de señales a nivel bioquímico (Gondim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

El quitosán (QN) es un biopolímero, un polisacárido de cadena larga mayormente obtenido a partir de materiales de desecho de origen marino (Guan *et al.*, 2009) que tiene propiedades antivirales, antibacteriales y antifúngicas (El-Hadrami *et al.*, 2010, Miranda-Castro and Lizárraga-Paulín, 2012). Puede aplicarse a la planta en la semilla (como material de recubrimiento en cereales, frutas y vegetales), en el suelo, o mediante vía foliar (Photchanacha *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2009; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011b; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011c), proporcionando a los frutos mayor firmeza, promoviendo la disminución de su carga microbiológica normal e incrementando su vida de anaquel (Devlieghere *et al.*, 2004). Cuando el QN es aplicado a las semillas de las plantas, su índice de germinación aumenta hasta en un 25%, la media del tiempo de germinación se reduce hasta en 3 días, se incrementa la longitud de los coleóptilos y de las raíces en más del 10%, aumenta el vigor de la planta el crecimiento vegetal significativamente, el tiempo de floración se reduce en más de un 5% y el peso fresco se incrementa significativamente (Bhaskara-Reddy *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 1999; Ruan and Xue, 2002; Shao *et al.*, 2005; Asghari-Zakaria *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2009; Kananont *et al.*, 2010; Ziani *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2012).

El QN también tiene efectos a nivel enzimático ya que al aplicarse en la semilla, se altera la permeabilidad de su membrana plasmática, incrementado las concentraciones de azúcar y prolina, y aumentando las actividades enzimáticas de peroxidasa (POD), catalasa (CAT), fenilalaninamonoliase (PAL) y tirosinaamonoliase (TAL). No obstante, tales mecanismos aún no han sido elucidados, aunque se cree que tal efecto es producto de la activación de

las Especies Reactivas de Oxígeno auxiliares en la defensa de las plantas. Algunos incrementos en los niveles de actividad de POD y CAT como consecuencia del tratamiento con QN han sido reportados cultivos como tomate, guayaba y ajeno dulce (Ortega-Ortíz *et al.*, 2007; Uthairatanakij *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012). La inhibición de la actividad de CAT (Zeng *et al.*, 2010) es importante en el desarrollo de la planta, en sus mecanismos de defensa, en el envejecimiento y en la senescencia (Yang and Poovaiah, 2002). A pesar de que existen múltiples reportes de la aplicación de QN en la producción alimentaria, no existen reportes del efecto de la aplicación de QN en el valor nutricional de los cultivos. La mayor parte de las investigaciones enfocadas al estudio de los efectos del QN y H₂O₂ se ha centrado en su aplicación a nivel de semilla y de plántulas, ya que en estos tempranos estadios se inician la mayoría de los mecanismos enzimáticos y bioquímicos, teniendo efectos continuos conforme la planta sigue su desarrollo.

En el año 2011 se publicó un artículo en donde se reportan algunos hallazgos relacionados con el uso de QN en maíz contra *A. flavus* y *F. moniliforme*. El objetivo de dicha investigación fue determinar el efecto protector de quitosán en plántulas de maíz sometidas a los hongos anteriormente mencionados. Para lograrlo, después de algunas pruebas de calidad, tres grupos de semillas fueron sometidos de manera independiente al ataque por *A. flavus* y *F. moniliforme*. El primer grupo fue considerado como un control positivo, otro fue recubierto con una solución de QN y el tercero fue dañado mecánicamente previo a la aplicación del biopolímero. En la quinta semana de crecimiento, las estructuras foliares fueron sembradas en agar PDA para determinar la presencia de hongos estresantes. Se encontró que las hojas provenientes de semillas tratadas con QN no manifestaron desarrollo fúngico, lo cual sugiere que el QN actúa como un activador de mecanismos de defensa en plántulas de maíz, previniendo las infecciones de los hongos patógenos y convirtiendo al recubrimiento de QN en un método viable para almacenar el maíz incluso bajo condiciones adversas. Se necesita de más investigación

enfocada a determinar si no solo los hongos *A. flavus* y *F. moniliforme* pueden prevenirse mediante estas metodologías, sino también las respectivas micotoxinas que producen (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011b).

Aún no se han elucidado totalmente a nivel molecular los mecanismos en los que están involucrados el QN y el H₂O₂ en las plantas, por lo que resulta importante su estudio para entender las estrategias genéticas de defensa involucradas en los cultivos.

4.5 INNOVACIÓN EN LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: MICROARREGLOS

Las investigaciones a nivel molecular han evolucionado a pasos agigantados en los últimos años. Inicialmente se hacían trabajos basados en el estudio de uno o varios genes de un organismo; ahora se hacen trabajos que involucran el análisis de los genomas en su totalidad. Gracias a los avances tecnológicos, la secuenciación de genomas es algo cada vez más frecuente, y desde que en 1995 se publicó el primer genoma completo de un ser vivo (*Haemophilus influenzae*), hasta la fecha, se han descrito alrededor de 32,921 genomas, de los cuales 7,407 corresponden a genomas completos (GOLD, 2013).

Los microarreglos de DNA constituyen una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas, siendo una de las aplicaciones más importantes para la información obtenida de la secuenciación sistemática de los genomas completos, y está asociada a la investigación bioinformática. Los microarreglos son un conjunto ordenado de sondas en una pequeña superficie (10,000 muestras por cm²), siendo cada punto una alícuota de DNA en particular. Esta tecnología permite el análisis simultáneo de un gran número de genes, proporciona datos cuantitativos y reproducibles, además de que reduce los tiempos, costos y riesgos asociados al descubrimiento y desarrollo de nuevos productos (Ramírez *et al.*, 2003). Particularmente los microarreglos se han empleado para el descubrimiento de las funciones de algunos genes (Eisen *et al.*, 1998), el diagnóstico de

enfermedades (Saiki *et al.*, 2008), análisis de rutas metabólicas (Werner *et al.*, 2008) e identificación de blancos para fármacos (Corn *et al.*, 2007). El análisis de los resultados que generan los microarreglos es útil para la identificación de rutas significativas, constituidas por grupos de genes activos involucrados en diversos procesos biológicos basados en perfiles de expresión genética (Shin and Kim, 2009). Además, permiten la caracterización temporal y espacial de la expresión génica, permiten obtener la información de genes ortólogos, el mapeo de polimorfismos, la determinación de especies y la identificación de cepas (Ramírez *et al.*, 2003).

De manera muy general, los microarreglos se emplean de la siguiente manera: Primeramente, se extrae el RNA de una muestra problema. Éste, se multiplica para tener varias copias y es marcado con fluorescencia para después hibridarse con el DNA existente (sondas) en el microarreglo. Después de la hibridación, las sondas que se hibridan con los RNAs emiten fluorescencia, la cual es detectada por computadora. Las sondas fluorescentes corresponden a los genes que se expresan en la muestra problema. Los experimentos que utilizan microarreglos de cDNA implican la presencia de dos muestras: una muestra control y una muestra problema. Primeramente, mediante el uso de robots, el microarreglo se junta con sondas de DNA correspondientes a los genes de interés (o el genoma del organismo entero). Después, se aísla el RNAm tanto de la muestra control como de la experimental. Usando la transcriptasa reversa, el RNAm se convierte en cDNA. El cDNA de ambas muestras se marca, utilizando marcadores fluorescentes de distintos colores (usualmente verde y rojo). El cDNA marcado se considera la diana, que se hibrida a través de interacciones de pares de bases con la sonda. Una vez que los objetivos están expuestos al microarreglo durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la hibridación (generalmente 12-16 horas), el microarreglo se lava. Solamente determinadas sondas en el microarreglo serán ahora fluorescentes, dado que los objetivos fluorescentes se han hibridado a ellas. Sólo las sondas que contienen los genes que se han transcrito en

la muestra serán fluorescentes. Aquellos genes que se expresan en la muestra del control generarán fluorescencia de color verde, mientras que los expresados en la muestra problema serán fluorescentes de color rojo. Los genes expresados en ambas muestras fluorescerán con la mezcla de colores (amarillo). La cantidad expresada de cada gen se puede medir por la intensidad de la fluorescencia, para la cual se emplean programas computacionales específicos, con los que se mide la intensidad y el color de cada punto del microarreglo. Existe una gran diversidad de software empleado para este fin, con los que se producen datos específicos sobre cuáles son los genes exactos que se expresan en las muestras, así como la cantidad de cada uno de estos genes expresados (Ramírez, 2013).

En México, a pesar de que existen empresas transnacionales que se dedican al diseño y análisis de microarreglos, destaca una unidad de servicio 100% mexicana y correspondiente a la UNAM: La Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular, a cargo del Dr. Jorge Ramírez Salcedo, que fue creada con el propósito de brindar asesoría y servicio en este campo a la comunidad científica y tecnológica de nuestro país, y que fue parte medular para la generación de los resultados de microarreglos correspondientes a este proyecto.

El análisis de los genomas completos de distintas especies, específicamente del maíz, constituye un gran reto, ya que no existe suficiente información reportada al respecto, además de que las grandes empresas privadas de investigación y producción de maíz han resguardado para sí una gran cantidad de la información generada. Es por esto que la investigación a nivel molecular de maíz es un aspecto prometedor en nuestro país.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La experimentación llevada a cabo en el presente trabajo se dividió en 4 estrategias metodológicas. La primera estrategia consistió en la selección del material vegetal y la caracterización de los insumos agrícolas; la segunda estrategia correspondió a la evaluación del efecto del quitosán y peróxido de hidrógeno sobre las semillas y plántulas de maíz; en la tercera, se involucró la presencia de estreses bióticos y abióticos en el sistema; y en la cuarta, se detectaron, en plántulas de maíz, algunos genes modificados en su expresión como consecuencia de la aplicación de quitosán y peróxido de hidrógeno mediante estudios de microarreglos de DNA, complementando así las fases anteriores.

5.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y CARACTERIZACIÓN DE LOS INSUMOS AGRÍCOLAS

5.1.1 PRUEBAS DE CALIDAD EN LAS SEMILLAS (DETERMINACIÓN DE LAS VARIEDADES A UTILIZAR)

Siete variedades distintas de maíz fueron proporcionadas por el Programa de Mejoramiento de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con sede en el Campo Experimental del Bajío, México (*Tabla 1*) de las cuales se seleccionaron dos: Una variedad normal y otra de alta calidad proteica (QPM).

MUESTRA	VARIEDAD	CÓDIGO
1	QPM	H.-442-C
2	QPM	H.-374-C
3	QPM	H.EC.-q(374)-7642 QPM
4	QPM	TIB-9856X860-B97R
5	Normal	2795-123#
6	QPM	CTP-3 889X892
7	Normal	279523

Tabla 1. Variedades de maíz proporcionadas por el INIFAP para la investigación.

Para poder llevar a cabo dicha selección, fue necesario realizar pruebas de calidad a las semillas para evaluar la resistencia de las mismas contra las condiciones en las cuales serían sembradas en la segunda fase. Tales pruebas se describen a continuación.

5.1.1.1 Germinación Estándar

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Moreno-Martínez en 1996. Los tacos se formaron usando 50 semillas de maíz, incubándolos a 25°C durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo el conteo de las semillas germinadas (G), de las plántulas normales (PN), plántulas anormales (PA), semillas muertas (SM) y semillas duras (SD), que sirvieron para determinar las medias de los porcentajes de germinación de las semillas y evaluar cualitativamente el vigor de las plántulas emergidas. La prueba se realizó por duplicado para cada una de las siete variedades anteriormente enlistadas.

5.1.1.2 Envejecimiento Acelerado

Para determinar cuáles variedades de semillas se utilizarían en función de su capacidad para resistir el deterioro, se formaron tacos con 400 semillas de cada variedad, los cuales fueron colocados en una cámara húmeda durante 7 días a 40°C para acelerar su envejecimiento (Moreno, 1996). Transcurrido este tiempo, a las semillas envejecidas se les sometió a una nueva prueba de germinación estándar, realizando dos repeticiones por variedad; cada repetición constó de 50 semillas distribuidas en 5 hileras de 10 semillas cada una. Esta nueva prueba se llevó a cabo en estufa, durante 4 días a 25°C.

5.1.1.3 Análisis Estadístico

Para determinar la existencia de significancia en los resultados obtenidos en las pruebas de calidad en las semillas, se llevó a cabo un análisis de varianzas ANOVA para experimentos con un factor y diseño completamente aleatorio empleando Microsoft Office Excel 2007®.

5.1.2 OBTENCIÓN DE QUITOSÁN

El QN empleado se sintetizó en el Laboratorio de Biotecnología de la FES Cuautitlán UNAM. Para la obtención del biopolímero, se partió de quitina obtenida de exoesqueletos de camarón previamente despigmentados, desproteinizados y desmineralizados. Posteriormente la quitina se sometió a una reacción de desacetilación en medio alcalino a altas temperaturas para obtener Quitosán con alto grado de pureza (Miranda, 2000).

5.1.3 CARACTERIZACIÓN DE QUITOSÁN

5.1.3.1 Determinación del Peso Molecular Viscosimétrico

El peso molecular se determinó por el método de viscosimetría capilar empleando un viscosímetro de Ostwald, equipado con un baño termostático controlado, manteniendo una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. El quitosán obtenido se disolvió en un buffer de acetatos (pH=4.6), obteniendo una concentración inicial de 0.20 g/dL. A partir de esta concentración se hicieron diluciones hasta obtener cuatro concentraciones distintas (0.20, 0.15, 0.10 y 0.05 g/dL). A estas soluciones se les determinó su viscosidad relativa, su viscosidad específica y su viscosidad específica reducida en función de la concentración. El peso molecular se determinó a partir de la ecuación matemática de Mark-Houwink, empleando los valores de las constantes $K=0.076$ y $a=0.76$ (Rinaudo, 1993; Kasaai, 2007) (*Anexo 9.1.2*).

5.1.3.2 Determinación del Grado de Desacetilación

El grado de desacetilación se calculó mediante una titulación potenciométrica ácido-base empleando NaOH 0.1M como valorante y HCl 0.2M como disolvente de la muestra de quitosán (Santiago de Alvarenga, 2011) (*Anexo 9.1.1*).

5.2 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA FENOLÓGICA Y BIOQUÍMICA AL USO DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO POSIBLES ELICITORES EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.

5.2.1 PREPARACIÓN DE LOS POSIBLES ELICITORES EN SOLUCIÓN PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE LAS SEMILLAS

5.2.1.1 Solución de Quitosán al 2%.

De acuerdo a experimentos anteriores (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011b; 2011c), se preparó una solución de QN al 2%, disolviendo 2g del biopolímero en 100 mL de ácido acético al 1% (Meyer Chemical SA de CV, Tláhuac, DF, México), manteniéndose en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. El pH de la solución fue ajustado a 5.1 con una solución de hidróxido de sodio al 12% p/v (J. T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México) para asegurar la penetración en la semilla. Finalmente la solución fue filtrada y esterilizada para eliminar posibles contaminantes biológicos.

5.2.1.2 Solución de Peróxido de Hidrógeno 8 milimolar

Se preparó una solución 8 mM de H₂O₂, diluyendo 2.037 mL del reactivo (al 30%) en 250 mL de agua destilada (Fermont, Productos Químicos de Monterrey, SA de CV, Monterrey, NL, México, con un peso molecular de 34.01 g/mol, alcanzando un pH de 7.8.

5.2.2 PREPARACIÓN DE LOS POSIBLES ELICITORES EN SOLUCIÓN PARA LA ASPERSIÓN DE LAS PLÁNTULAS

5.2.2.1 Solución de Quitosán al 0.2%.

Se preparó una solución de QN al 0.2%, disolviendo 2g del biopolímero en 1000 mL de ácido acético al 1% (Meyer Chemical SA de CV, Tláhuac, DF, México), manteniéndose en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. El pH de la solución fue ajustado a 5.1 para asegurar la adecuada absorción de la semilla.

5.2.2.2 Solución de Peróxido de Hidrógeno 8 milimolar

Se utilizó la misma solución que para el recubrimiento.

5.2.3 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS A LAS SEMILLAS Y PLÁNTULAS

Se formaron catorce grupos de semillas (cada uno de diez semillas, sembrando una semilla por maceta): Siete grupos de variedad Normal y 7 grupos de variedad QPM. El primer grupo de cada variedad fue considerado como control; en el segundo grupo de cada variedad, las semillas fueron acondicionadas con QN al 2%; en el tercer grupo de cada variedad, las plántulas emergidas de las semillas germinadas fueron asperjadas con QN al 0.2%; el cuarto grupo de cada variedad fue sometido a tratamiento combinado (acondicionamiento de la semilla y aspersion de las plántulas con QN al 2% y 0.2% respectivamente); en el quinto grupo de cada variedad, las semillas fueron acondicionadas con H₂O₂ 8mM; en el sexto grupo de cada variedad, las semillas fueron asperjadas con H₂O₂ 8mM; y finalmente el séptimo grupo de cada variedad fue sometido a tratamiento combinado (acondicionamiento de la semilla y aspersion de las plántulas con H₂O₂). El experimento se llevó a cabo por triplicado (*Tabla 2*).

Unidades Experimentales	42
Repeticiones por Experimento	3
Semillas por Unidad Experimental	10
Número de Experimentos	14

Tabla 2. Características de la segunda fase experimental.

5.2.4 ACONDICIONAMIENTO DE LAS SEMILLAS CON LOS POSIBLES ELICITORES

Para acondicionar las semillas con QN, éstas fueron sumergidas en la solución de QN al 2% durante 12 h; después fueron secadas en horno a 29°C durante 24 h para contrarrestar los efectos de la excesiva humedad presente en las semillas, generada por el tratamiento

biopolimérico (debido a las propiedades hidrofílicas del QN). Las semillas acondicionadas con H₂O₂ fueron sumergidas en la solución de H₂O₂ 8mM durante 12h sin posterior secado.

El sustrato en el que las semillas fueron sembradas, fue preparado empleando Mezcla Sunshine #3[®] (Sun Gro Horticulture Inc., Canada CM, Ltd.), enriquecida con perlita Hortiperl[®] (Termolita S.A. de C.V., México), en una proporción 10:1. Las semillas fueron sembradas a una profundidad de 3 cm, y las macetas fueron regadas con agua corriente. El experimento se condujo en el cuarto de germinación de la Facultad de Ingeniería en la Universidad Autónoma de Querétaro, el cual fue sanitizado previamente para llevar a cabo la plantación bajo condiciones protegidas, lo más cercano a la esterilidad (ISTA, 1993; Albajes *et al.*, 1999; Sonneveld and Voogt, 2009), y así evitar interferencias en los resultados de la experimentación. La temperatura promedio registrada dentro del cuarto de germinación fue de 31±3°C, con una humedad promedio del 80%.

Después de la siembra, al emerger las plántulas, éstas fueron asperjadas a diferentes oportunidades de aplicación con las soluciones de QN y H₂O₂ descritas anteriormente. La aplicación se llevó a cabo empleando un aspersor de líquidos mecánico, rociando las plántulas con atomizaciones finas, mojando todo el dosel hasta escurrir, evitando estresar a la plántula con un manejo poco cuidadoso de la misma. Para evaluar cuál sería la oportunidad de aplicación ideal del insumo utilizado, manifestada en su fenología, se llevaron a cabo dos cinéticas observando el efecto de la aplicación con respecto al tiempo: Una cinética paso a paso y otra acumulada (*Tabla 3*). La cinética paso a paso consistió en la aspersión de QN y H₂O₂ a diferentes tiempos, midiendo la respuesta fenológica de la planta una hora después de cada aplicación. La cinética acumulada consistió en la aspersión de QN y H₂O₂ de manera acumulada durante varias horas para finalmente medir las respuestas fenológicas al término del conjunto de aspersiones.

OPORTUNIDAD	CINÉTICA PASO A PASO (h)	CINÉTICA ACUMULADA (h)
1	0	0
2	3.5	3.5
3	7.0	10.5
4	14.0	24.5
5	24.0	48.5

Tabla 3. Tratamientos derivados de la aspersión de las plántulas de maíz.

5.2.5 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Todas las semillas fueron sembradas al mismo tiempo. La germinación fue evaluada hasta que éstas hubieran alcanzado las etapas finales del proceso germinativo, manifestada por la emergencia del coleóptilo (Monasterio *et al.*, 2007).

5.2.6 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE EMERGENCIA DE LAS PLÁNTULAS

La velocidad de emergencia de las plántulas fue evaluada 9 días después de la siembra. Diferentes valores numéricos fueron asignados a cada fase de emergencia (Tabla 4).

FASE DE EMERGENCIA	ESTADIO DE LA PLÁNTULA
0	Semilla no germinada
1	Coleóptilo (Clavo)
2	Plúmula
3	Plántula de 1 hoja
4	Plántula de 2 hojas

Tabla 4. Criterio para la evaluación de la velocidad de emergencia de las plántulas.

5.2.7 EVALUACIÓN FENOLÓGICA DE LAS PLÁNTULAS

El crecimiento de la plántula en su estado vegetativo fue evaluado en dos etapas: 19 días después de la siembra (en donde las semillas habían sido acondicionadas solamente, sin aspersión de las plántulas con QN y/o H₂O₂), y 30 días después de la siembra (después de haber sido acondicionadas y asperjadas con los posibles elicitors). Las mediciones

registradas fueron la longitud de los tallos, la longitud de las hojas, la longitud total de la plántula (empleando un flexómetro) y el diámetro de los tallos (empleando un vernier digital).

La longitud total de las plántulas y el grosor de los tallos también fueron evaluados en algunas plántulas provenientes de semillas recubiertas con elicitores, las cuales fueron sacadas de las macetas 34 días después de la siembra para después ser trasplantadas directamente a tierra, regándose diariamente para dar seguimiento a su desarrollo bajo condiciones medioambientales no controladas y evaluar la posible existencia de un efecto prolongado derivado del recubrimiento de la semilla con los elicitores en cuestión. Las variables de respuesta anteriormente mencionadas, fueron medidas 36 días después de haber sido transplantadas a la pequeña parcela.

5.2.8 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

5.2.8.1 Tinción con DAB para determinar la presencia o ausencia de Peróxido de Hidrógeno

Esta prueba se llevó a cabo únicamente con aquellas plántulas provenientes de semillas acondicionadas. La solución de DAB fue preparada mezclando 25mg de 3,3'-diaminobencidina y 25 mL de MOPS 10 mM, ajustando el pH a 3.8. El material vegetal (hojas de maíz) fue cortado en pequeñas porciones y sumergido en la solución de DAB durante 8h, para posteriormente ser desteñido con varios lavados de metanol absoluto (el cual fue asignado como disolvente ideal después de una serie de ensayos), calentando en baño maría para agilizar la decoloración. Una vez desteñido, el material vegetal fue almacenado en glicerol al 50% para su conservación, y la presencia de H₂O₂ se determinó de acuerdo a lo descrito por Thordal-Christensen y su equipo de trabajo en 1997. El experimento se hizo por triplicado. Se registraron las observaciones correspondientes.

5.2.8.2 Obtención del extracto enzimático para la cuantificación de proteínas y catalasa

Se tomaron muestras de hojas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos, las cuales fueron molidas de forma independiente en nitrógeno líquido, empleando un mortero preenfriado a 4°C, para así obtener un polvo fino, el cual fue transferido a tubos Falcon. Las muestras obtenidas fueron limpiadas añadiendo 5 volúmenes de acetona por cada volumen de tejido pulverizado. El sistema se agitó por inversión y se almacenó durante 24h a 4°C. Transcurrido este tiempo, el sistema fue transferido a tubos Eppendorf, los cuales se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min para asegurar la precipitación tisular. El sobrenadante (que contenía la clorofila y otros compuestos orgánicos extraídos por la acetona), fue desechado. Después, la pastilla resultante (tejido vegetal), fue resuspendida en buffer de fosfatos 0.05M a pH 7, y fue centrifugado a 13,000 rpm durante 15 min para asegurar la extracción proteica. El sobrenadante (extracto enzimático), fue recuperado (Castro-Rivera *et al.*, 2006; Ortega-Ortíz *et al.*, 2007).

5.2.8.3 Cuantificación de proteínas totales en la muestra de maíz

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el método de Bradford, ajustándolo a una técnica de micro-placa. Cada mezcla de reacción fue preparada usando 200 µL de reactivo de Bradford 1:5 (Bradford, 1976), y 10 µL del extracto enzimático, los cuales fueron colocados directamente en los pozos de la micro-placa. El blanco correspondiente fue preparado con 200 µL de reactivo de Bradford 1:5 y 10 µL del mismo buffer de fosfatos que había sido usado para la extracción enzimática. Tanto las muestras como el blanco, fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 min, y los valores de las absorbancias fueron leídos en un espectrofotómetro (Spectronic 20D+ Digital, Sargent-Welch) a una longitud de onda de 620 nm. La curva de calibración correspondiente fue preparada con soluciones stock de albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich, Saint Louis,

Missouri, USA) de concentraciones conocidas. La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo por triplicado.

5.2.8.4 Determinación de catalasa total

La actividad de catalasa fue determinada de acuerdo a lo descrito por Ortega-Ortíz *et al.* en 2007 con las siguientes modificaciones: La mezcla de reacción correspondiente fue preparada empleando 6 mL del extracto enzimático y 1 mL de peróxido de hidrógeno 0.022 M. El blanco utilizado fue la solución de buffer de fosfatos preparada para la extracción enzimática. La absorbancia de las muestras fue medida inmediatamente (para prevenir la oxidación del peróxido de hidrógeno) empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Spectronic 20D+ Digital, Sargent-Welch) a una longitud de onda de 240 nm. La curva de calibración correspondiente fue preparada a partir de soluciones de H₂O₂ grado reactivo (Fermont, Productos Químicos de Monterrey, SA de CV, Monterrey, NL, Mexico) a diferentes concentraciones conocidas. La determinación se llevó a cabo por triplicado.

5.2.9 ANÁLISIS DE DATOS

Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas mediante ANOVA para experimentos con un factor y diseño completamente aleatorio, con un análisis *post hoc* mediante pruebas de Tukey, empleando el programa computacional JMP™ Release 5.0.1.2 (SAS Institute Inc, USA). Los valores de las medias con diferencia estadística significativa de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

5.3 EFECTO DEL QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CULTIVOS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO SOBRE LAS VARIABLES FENOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

5.3.1 SELECCIÓN DE LAS SEMILLAS A UTILIZAR DURANTE LA SIEMBRA

Las semillas de maíz empleadas fueron de las mismas variedades que las usadas en la anterior estrategia experimental (Normal y QPM). Para evitar interferencias en lo que respecta a la infección fúngica, las semillas de maíz fueron seleccionadas cuidadosamente en función de su morfología; es decir, solo fueron escogidas las enteras y sin daño físico aparente.

5.3.2 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL USO DE ELICITORES COMBINADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en la segunda estrategia experimental, y que se presentarán en el apartado correspondiente, se encontró que el uso tanto del QN como del H₂O₂ promueven mejores características en las plántulas de maíz tratadas. De ahí que surgió la propuesta de aplicar a las semillas y a las plántulas, además de los tratamientos arriba mencionados, un nuevo tratamiento, consistente el uso combinado de estos posibles elicitores. Para conocer la efectividad del uso de elicitores combinados (QN/H₂O₂), se llevó a cabo un ensayo *in vitro*. Se formaron 4 grupos de semillas de variedad normal y 4 grupos de semillas de variedad QPM, cada uno de los cuales constó de 3 semillas. El primer grupo fue considerado como el control (sin acondicionamiento); el segundo grupo fue acondicionado con solución de QN; el tercero fue acondicionado con solución de H₂O₂, y el cuarto fue acondicionado con la solución combinada (QN/H₂O₂) (Tabla 5). Todos los grupos fueron colocados en cajas petri estériles con Agar Dextrosa Papa (PDA) (MCD Lab, Tlalnepantla Estado de México, México) y se incubaron durante 8 días a una temperatura de entre 25 y 28°C. Transcurrido este tiempo, se registró la

longitud de raíces y plúmulas, la cantidad de hojas emergidas y se realizó una evaluación cualitativa de los hongos crecidos en el medio de cultivo.

VARIEDAD	GRUPO	ACONDICIONAMIENTO
Normal	Control	Sin acondicionamiento
	Tratamiento 1	QN
	Tratamiento 2	H ₂ O ₂
	Tratamiento 3	Combinado
QPM	Control	Sin acondicionamiento
	Tratamiento 1	QN
	Tratamiento 2	H ₂ O ₂
	Tratamiento 3	Combinado

Tabla 5: Experimento para la evaluación de elicitores combinados.

5.3.3 PREPARACIÓN DE LOS ELICITORES EN SOLUCIÓN

Las soluciones de QN al 2% y al 0.2%, así como la solución de H₂O₂ 8mM que se emplearon para esta segunda fase de la experimentación, fueron las mismas que se utilizaron en la estrategia experimental anterior (secciones 2.1 y 2.2). La solución de elicitores combinados se preparó disolviendo 2g QN en 100 mL de solución de H₂O₂ 8 mM, manteniéndose a temperatura ambiente, con agitación constante y aislándose de la luz durante 10 min. El pH de la solución fue ajustado a 5.0 para asegurar la adecuada absorción del biopolímero en la semilla. La solución resultante fue empleada para el acondicionamiento de las semillas. Para la aspersion de las plántulas, se disolvieron 2g de QN en 1L de H₂O₂ 8 mM, obteniendo una solución final de QN/ H₂O₂ al 0.2%.

5.3.4 PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE ESPORAS PARA LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS BIÓTICO

Se prepararon suspensiones de esporas de los hongos *A. flavus* (cepa UNIGRASASP28, especie productora de aflatoxinas, obtenida de mazorcas de maíz de la zona del Bajío, México) y *F. moniliforme* (cepa UNIGRASFUS44, especie productora de fumonisinas, obtenida de mazorcas provenientes de Michoacán, México), de acuerdo al procedimiento

descrito por Stubbs *et al.* en 1986. La concentración de esporas empleada para asegurar la infección de los cultivos con los patógenos correspondientes fue de 30,000 conidios/mL de acuerdo a lo reportado por Gilchrist-Saavedra *et al.* (2005).

5.3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

La *Tabla 6* muestra el diseño global de la tercera estrategia experimental para determinar la respuesta de inducción de estrés en plántulas de maíz, mientras que la *Tabla 7* muestra los efectos principales del experimento.

Unidades Experimentales	356
Repeticiones por Experimento	10
Semillas por Unidad Experimental	2
Número de Experimentos	19

Tabla 6. Características de la tercera fase experimental.

FACTOR	NIVEL	FACTOR	NIVEL
Variedad	Normal QPM	QN	Sin QN Acondicionamiento Aspersión Acondicionamiento + Aspersión
Estrés	Sin estrés Sequía <i>Aspergillus flavus</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Aspergillus flavus</i> + Sequía	H ₂ O ₂	Sin QN Acondicionamiento Aspersión Acondicionamiento + Aspersión

Tabla 7. Efectos principales de la tercera estrategia experimental.

El diseño de tratamientos se realizó mediante un Diseño Factorial Incompleto (Turrent y Laird, 1975), que permitió analizar de manera resumida el experimento completo en función de los resultados significativos obtenidos en la anterior estrategia experimental. Se formaron 19 grupos de semillas (cada uno de veinte semillas, sembrando dos semillas por maceta), siendo 16 grupos de variedad Normal y 3 grupos de variedad QPM (*Tabla 8*).

VARIEDAD NORMAL:

Tx	ESTRES	H ₂ O ₂	QN
1	Sequía	Recubrimiento	Recubrimiento
2	Sequía	Recubrimiento	Recubrimiento y Aspersión
3	Sequía	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento
4	Sequía	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
5	<i>A. flavus</i>	Recubrimiento	Recubrimiento
6	<i>A. flavus</i>	Recubrimiento	Recubrimiento y Aspersión
7	<i>A. flavus</i>	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento
8	<i>A. flavus</i>	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
9	Sin estrés	Recubrimiento	Recubrimiento
10	Sequía	Recubrimiento	Sin QN
11	Sequía	Sin H ₂ O ₂	Recubrimiento
12	<i>F. moniliforme</i>	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
13	<i>A. flavus</i>	Recubrimiento y Aspersión	Aspersión
14	<i>A. flavus</i>	Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
15	<i>A. flavus</i> + Sequía	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
16	Sin estrés	Sin H ₂ O ₂	Sin QN

VARIEDAD QPM:

Tx	ESTRES	H ₂ O ₂	QN
17	<i>A. flavus</i>	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
18	<i>A. flavus</i> + Sequía	Recubrimiento y Aspersión	Recubrimiento y Aspersión
19	Sin estrés	Sin H ₂ O ₂	Sin QN

5.3.6 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS A LAS SEMILLAS Y PLÁNTULAS

El acondicionamiento con QN se efectuó sumergiendo las semillas en la solución de QN al 2% durante 12h. Después fueron secadas en un horno a 29°C durante 24h. Las semillas acondicionadas con H₂O₂ fueron sumergidas en la solución 8mM durante 12h sin posterior secado. Las semillas acondicionadas con la solución combinada (QN/H₂O₂) fueron sumergidas en la solución 2%/8mM durante 12h sin secado posterior. Posteriormente, las semillas de los tratamientos sometidos a estrés biótico por *A. flavus* y *F. moniliforme*, fueron inoculadas aplicando 1mL de suspensión de conidios previamente preparada (sección 3.4) a cada una de las semillas a infectar (primera infección).

Después de los acondicionamientos y/o infecciones correspondientes, las semillas fueron sembradas a una profundidad de 3 cm en bolsas para invernadero de 50 x 50 cm, las cuales contenían el sustrato preparado con Mezcla Sunshine #3[®] (Sun Gro Horticulture Inc., Canada CM, Ltd.), enriquecida con perlita Hortiperl[®] (Termolita S.A. de C.V., México), en una proporción 10:1. Se sembraron dos semillas por bolsa y el riego se realizó con agua corriente. Este estudio se condujo en el invernadero de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, el cual fue sanitizado previamente para llevar a cabo la plantación bajo condiciones protegidas, lo más cercano a la esterilidad (ISTA, 1993; Albajes *et al.*, 1999; Sonneveld and Voogt, 2009), y así evitar interferencias en los resultados de la experimentación. El acomodo de las macetas (bolsas) dentro del invernadero se realizó de manera aleatoria para evitar sesgos por factores externos como la iluminación o la aireación. Las semillas sin inóculo fueron colocadas en un área aislada para evitar que las esporas de las unidades inoculadas pudieran contaminarlas. En este estadio las respuestas medidas fueron el porcentaje de germinación (Monasterio *et al.*, 2007) y la velocidad de emergencia de la plántula (de acuerdo al criterio descrito en la *Tabla 4*).

Ya emergidas las plántulas en su totalidad, éstas fueron asperjadas quincenalmente durante su etapa vegetativa con las soluciones de QN, H₂O₂ y QN/H₂O₂ según el tratamiento correspondiente, asegurando el completo humedecimiento de la plántula. De igual manera, las infecciones fúngicas posteriores fueron realizadas mediante aspersión de la suspensión con periodicidad quincenal durante la etapa vegetativa. El volumen de inóculo asperjado fue variable, el necesario para cubrir toda la planta hasta escurrir. Para asegurar el establecimiento del hongo, las plantas, después de ser inoculadas, fueron cubiertas con plástico durante 48h simulando una cámara húmeda. Cinco semanas

después de la siembra, una plántula de cada maceta fue extraída para realizar pruebas destructivas (cuantificación de proteínas y análisis microbiológico).

Durante la etapa vegetativa, los cultivos de maíz (controles y sin sequía) fueron regados diariamente con agua corriente (1L/día). A partir del día 24, el riego se hizo con Solución Universal Steiner al 25%, alternando los riegos con agua corriente para evitar la intoxicación de las plántulas. Después de tres semanas, el riego se hizo empleando “jugo de suelo agrícola” para abastecer al cultivo de todos los nutrientes necesarios. Durante la etapa reproductiva, los riegos se realizaron aplicando 1L de agua cada tercer día, y después de la floración, aplicando 2L por semana. Los cultivos sometidos a estrés por sequía fueron regados quincenalmente durante la etapa vegetativa y mensualmente durante la etapa reproductiva.

5.3.7 EVALUACIÓN FENOLÓGICA DE LAS PLÁNTULAS

La evaluación fenológica se realizó mediante la medición de la altura de tallos, hojas, la altura total y el diámetro de los tallos. Durante las tres primeras semanas, las mediciones se realizaron semanalmente. La primera medición se efectuó a los 14 días después de la siembra (dds), para asegurar la máxima germinación de las semillas, donde se evaluó el efecto del acondicionamiento de las semillas. La segunda medición se efectuó 21 dds, evaluándose el efecto de dos infecciones continuas por los patógenos correspondientes y elicitación mediante acondicionamiento de la semilla y aspersión de la plántula, construyéndose una cinética de crecimiento con respecto al tiempo para observar el comportamiento del material vegetal. Después de la tercer semana de crecimiento, las mediciones se realizaron quincenalmente hasta que la planta alcanzó su etapa reproductiva. Del quinto al sexto mes después de la siembra se comenzó la cosecha. Las inflorescencias fueron recolectadas, almacenadas en bolsas de papel de estraza y secadas

en estufa a 45°C, simulando la temperatura de los rayos de sol, que es el método por el que el cereal es secado en los campos. Dos semanas después, las inflorescencias se clasificaron en función de la cantidad de llenado de grano. Finalmente las mazorcas fueron desgranadas y se registró el rendimiento de la planta (peso del grano obtenido en función del tratamiento).

5.3.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales se realizó 5 semanas después de la siembra mediante el método de microkjeldahl (Aurand *et al.*, 1987; A.O.A.C 960.52, 1990) para conocer la calidad nutricional del maíz bajo los distintos tratamientos.

5.3.9 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL GRANO

Las mazorcas recolectadas fueron clasificadas en cuatro grupos: Sin grano, poco grano, medianamente llenas y completamente llenas. Después, las mazorcas fueron desgranadas, y se determinó el peso de los granos obtenidos.

5.3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante ANOVA para experimentos con un factor y diseño completamente aleatorio, con un análisis Post Hoc mediante pruebas de Tukey empleando el programa computacional JMP™ Release 5.0.1.2 (SAS Institute Inc, USA). Los valores de las medias con diferencia estadística de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

5.4 DETECCIÓN DE GENES MODIFICADOS EN SU EXPRESIÓN COMO CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.

5.4.1 BÚSQUEDA DE LOS PROVEEDORES DE CHIPS CON EL GENOMA COMPLETO DEL MAÍZ

Se realizó una ardua búsqueda de chips con el genoma completo del maíz en los Institutos en los que se ha trabajado con tal material alrededor de todo el mundo; no obstante, debido a la complejidad que implica el diseño de los mismos, no encontramos quien pudiera manufacturarlos. Finalmente adquirimos seis chips en el Instituto de Fisiología Celular (IFC, UNAM, México), sobrantes de un trabajo llevado a cabo en el CIMMYT (México) y diseñados por el Dr. David Galbraith (Arizona), que contenían 60,000 sondas de DNA (genoma completo de maíz).

5.4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LOS MICROARREGLOS

En función de la cantidad de chips adquiridos, se llevó a cabo un nuevo diseño experimental (*Tabla 9*) consistente en los tres tratamientos primordiales para evaluar el efecto del QN y el H₂O₂ (solos o en combinación, sin estrés) sobre los genes del maíz, empleando dos chips para cada uno (el tratamiento y su respectivo control). Por la limitante de la cantidad de chips existentes, fue imposible involucrar los estreses bióticos y abióticos a los que se enfrentó el cultivo en la anterior estrategia experimental.

EXPERIMENTO	ELICITOR	ESTRÉS
1	Control/QN	Sin estrés
2	Control/ QN-H ₂ O ₂	Sin estrés
3	Control/ H ₂ O ₂	Sin estrés

Tabla 9. Diseño experimental para los microarreglos.

5.4.3 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LOS MICROARREGLOS

Debido a que los granos de maíz obtenidos mediante el experimento *in vivo* se vieron afectados por condiciones climáticas que no pudieron ser controladas, se llevó a cabo la siembra de semillas bajo condiciones de total esterilidad y control, para con ellas obtener el material necesario para la realización de los microarreglos. Para lograrlo, se seleccionaron seis grupos de diez semillas de variedad normal. Tres grupos se consideraron como controles, mientras que los otros tres fueron acondicionados con las soluciones de elicitores (QN 2%, H₂O₂ 8mM y la combinación de ambos, respectivamente). La aplicación de los tratamientos se hizo sumergiendo las semillas en las soluciones correspondientes (sección 2.1 y 3.3) durante 12h, para después ser escurridas totalmente y colocarse en tacos de papel anchor previamente esterilizado (Moreno, 1996), donde se llevó a cabo su germinación *in vitro*. Se optó por este método de crecimiento en vez de cultivo en tierra para evitar contaminaciones por esporas y bacterias presentes en el suelo que pudieran desarrollarse a la temperatura de germinación. Los tacos de papel anchor fueron colocados en una germinadora durante 15 días, tiempo suficiente para obtener plántulas de 4 hojas bien desarrolladas. La humedad se mantuvo constante (60%) así como la temperatura (26±1°C) y la iluminación (artificial, las 24h del día). Transcurrido este tiempo, los tacos fueron sacados de la germinadora, las plántulas fueron separadas del papel anchor y lavadas en NaOCl al 2% para asegurar el nulo crecimiento de microorganismos en las mismas. Para eliminar los restos de NaOCl, las plántulas fueron lavadas con agua estéril y secadas con papel absorbente estéril, para finalmente ser envueltas en papel aluminio y almacenadas en nitrógeno líquido.

5.4.4 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DE LAS PLÁNTULAS DE MAIZ

Las plántulas fueron molidas con nitrógeno líquido empleando un mortero con pistilo preenfriado a 4°C, para así obtener un polvo fino, cuya superficie de contacto permitiera una mejor extracción de RNA. Dicha extracción se llevó a cabo empleando el Kit SV Total

RNA Isolation System (Promega, No. Cat. Z3105), de acuerdo al protocolo que el mismo kit sugiere, obteniendo un volumen final de 100 μ L de RNA en solución por cada muestra vegetal. La comprobación de la eficiencia de la extracción se llevó a cabo cuantificando el RNA presente en el extracto empleando un Espectrofotómetro NanoDrop, ND1000. La calidad de la extracción se probó mediante un gel de agarosa al 1.0% p/v en el cual se corrieron las muestras correspondientes (*Anexo 9.3.1*). Los RNAs fueron llevados al IFC para procesar los microarreglos correspondientes.

5.4.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS MICROARREGLOS

Los resultados generados por el IFC consistieron en una amplia lista de los genes sobreexpresados y silenciados en los chips del maíz por efecto de los distintos tratamientos. El análisis que se realizó de los mismos, consistió en la organización de los datos numéricos obtenidos en función del valor de su desviación estándar, tomando únicamente aquellos datos con valores de “Z-score” mayores a 2 (*Anexo 9.3.2*). Los genes fueron acomodados en una hoja de cálculo en función de su valor absoluto de “Z-score” en orden descendente, considerando que a mayor valor, mayor sobreexpresión o silenciamiento del gen. Debido a la gran cantidad de resultados obtenidos, se creó un criterio para el análisis de los resultados. Este consistió en agrupar los genes (tanto sobreexpresados como silenciados) de acuerdo a los tratamientos que fueron comunes para la sobreexpresión o silenciamiento de los genes. De esta forma, ya compactada la información, se hizo uso de las distintas bases de datos públicas para poder obtener información sobre los genes, tal como su secuencia, sus características generales, la ruta metabólica a la que corresponden etc.

6. RESULTADOS

6.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y CARACTERIZACIÓN DE LOS INSUMOS AGRÍCOLAS

6.1.1 PRUEBAS DE CALIDAD EN LAS SEMILLAS (DETERMINACIÓN DE LAS VARIEDADES A UTILIZAR)

6.1.1.1 GERMINACIÓN ESTÁNDAR

Cuatro días después de la germinación de los maíces en estudio, pudo apreciarse que en todos los casos se presentó un sistema radicular bien desarrollado y una evidente vigorosidad en las plúmulas, lo cual fue indicativo de que las semillas proporcionadas poseían alta calidad para ser sembradas. Cuantitativamente, la *Tabla 10* muestra los resultados de las pruebas de germinación estándar.

Muestra	Total de Semillas	Submuestra	PN	G	PA	SM	SD	%	\bar{x} %
H-442-C	100	1	50	50	0	0	0	100	100
		2	50	50	0	0	0	100	
H-334-C	100	1	50	50	0	0	0	100	100
		2	50	50	0	0	0	100	
HC-7642-QPM (374)	100	1	50	50	0	0	0	100	100
		2	50	50	0	0	0	100	
FIB9856X860-B97R	100	1	48	48	0	2	0	96	93
		2	45	45	0	5	0	90	
3795-133#	100	1	50	50	0	0	0	100	100
		2	50	50	0	0	0	100	
CTP-3 889X892	100	1	50	50	0	0	0	100	100
		2	50	50	0	0	0	100	
279523	100	1	50	50	0	0	0	100	100
		2	50	50	0	0	0	100	

Tabla 10. Porcentajes de germinación estándar de las semillas de maíz de las diferentes variedades proporcionadas; en donde PN=Plántulas Normales, G=Semillas Germinadas, PA=Plántulas Anormales, SM=Semillas Muertas, SD=Semillas Duras, %=Porcentaje de las semillas germinadas para cada grupo, y \bar{x} =Media de los porcentajes de germinación para cada variedad. ($p=0.0000$).

Todas las medias de los porcentajes de germinación fueron del 100%, excepto para la muestra 4 (93%); no obstante, no existe diferencia significativa con respecto al resto de las medias de los porcentajes de germinación registrados para las variedades de maíz proporcionadas ($p=0.0000$); por lo tanto, según esta prueba, cualquiera de las muestras a utilizar sería conveniente para obtener resultados satisfactorios en cuanto a la germinación y desarrollo del cultivo se refiere.

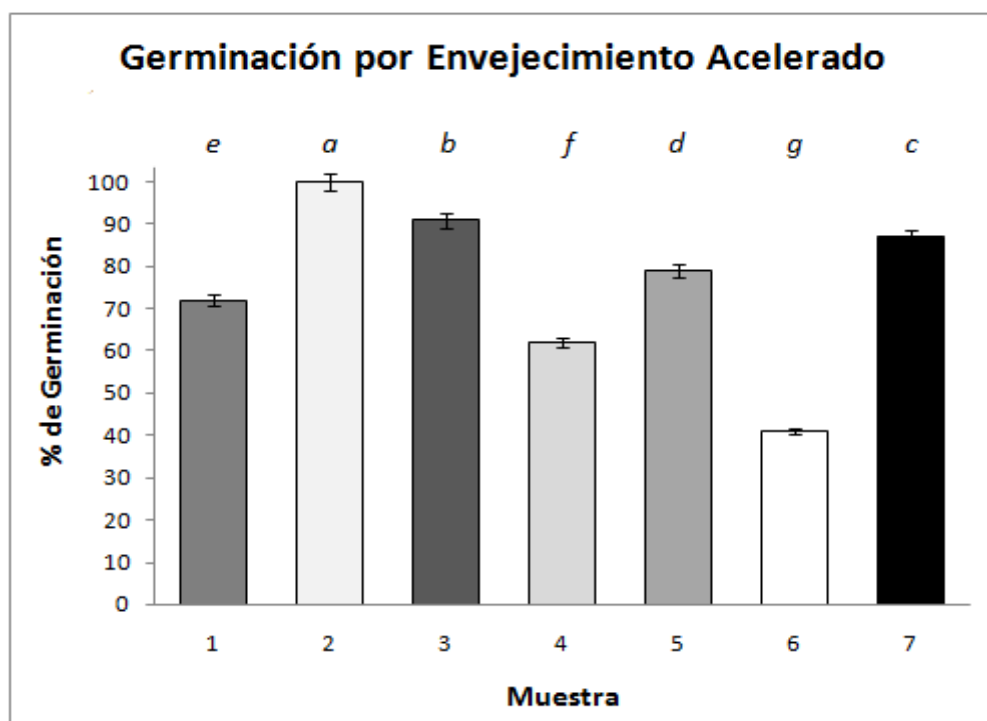
6.1.1.2 ENVEJECIMIENTO ACELERADO

Debido a que era necesario seleccionar únicamente una muestra de variedad normal y una muestra de variedad QPM, se llevó a cabo la prueba de envejecimiento acelerado, la cual resultaría decisiva para lograr dicha selección. La *Tabla 11* muestra los resultados de las pruebas de germinación que se llevaron a cabo después de haber sometido a las semillas a condiciones de alta humedad y alta temperatura.

Muestra	Variedad	Total de Semillas	Sub-muestra	PN	PA	SM	SD	% PN	\bar{x} (%)	Observaciones
1	H-442-C	100	1	34	1	0	15	68	72	Semilla abundantemente contaminada con hongo esporulado de colores negro y verde.
			2	38	0	0	12	76		
2	H-334-C	100	1	50	0	0	0	100	100	Semilla libre de contaminación por patógenos. Germinación abundante y alto vigor.
			2	50	0	0	0	100		
3	HC-7642-QPM (374)	100	1	44	0	0	6	88	91	Semillas poco contaminadas, escasas coloración negra en algunas de las semillas.
			2	47	0	0	3	94		
4	FIB9856X860-B97R	100	1	38	2	0	10	76	62	Presencia de abundantes esporas de color verde y negro. Aparente presencia de <i>Aspergillus</i> .
			2	24	1	0	25	48		
5	3795-133#	100	1	41	0	0	9	82	79	Plúmulas largas y vigorosas con escasa contaminación visible.
			2	38	0	0	12	76		
6	CTP-3 889X892	100	1	18	1	0	31	36	41	Escasa germinación, plúmulas muy pequeñas, presencia mayoritaria de raíces primarias únicamente.
			2	23	1	0	26	46		
7	279523	100	1	45	0	0	5	90	87	Semillas muy vigorosas y con escasa contaminación.
			2	42	0	0	8	84		

Tabla 11. Porcentajes de germinación estándar de las distintas variedades proporcionadas después de haber sido sometidas a envejecimiento acelerado; en donde PN=Plántulas Normales, G=Semillas Germinadas, PA=Plántulas Anormales, SM=Semillas Muertas, SD=Semillas Duras, %=Porcentaje de las semillas germinadas para cada sub-muestra, y \bar{x} =Media de los porcentajes de germinación para cada variedad.

En la última columna se registraron las observaciones hechas a cada una de las muestras; en ella puede verse que la mayoría de las variedades presentaron contaminación por microorganismos (de escasa a abundante), lo cual indica la susceptibilidad de las distintas variedades hacia los patógenos desarrollados bajo tales condiciones. Enfatizando los resultados correspondientes a las semillas germinadas bajo condiciones de envejecimiento acelerado, la *Gráfica 1* muestra las medias de los porcentajes de germinación para cada una de las variedades estudiadas, en donde se observa que existe diferencia significativa entre los porcentajes de germinación de plántulas normales de las diferentes variedades proporcionadas ($p=0.0033$), siendo estadísticamente mayores las correspondientes a las muestras 2, 3 y 7 [H-334-C, HC-7642-QPM (374) y 279523] y menor la correspondiente a la muestra 6 (CTP-3 889X892).



Gráfica 1. Porcentajes de germinación estándar de las distintas variedades de maíz proporcionadas después de haber sido sometidas a envejecimiento acelerado ($p=0.0033$).

La muestra 3 corresponde la variedad de maíz QPM. Por lo tanto, la muestra HC-7642-QPM (374) y la muestra H-334-C fueron las seleccionadas para conducir este experimento. En adelante, se hará referencia a la muestra H-334-C como “maíz de variedad normal”, y a la HC-7642-QPM (374) como “maíz de variedad QPM”.

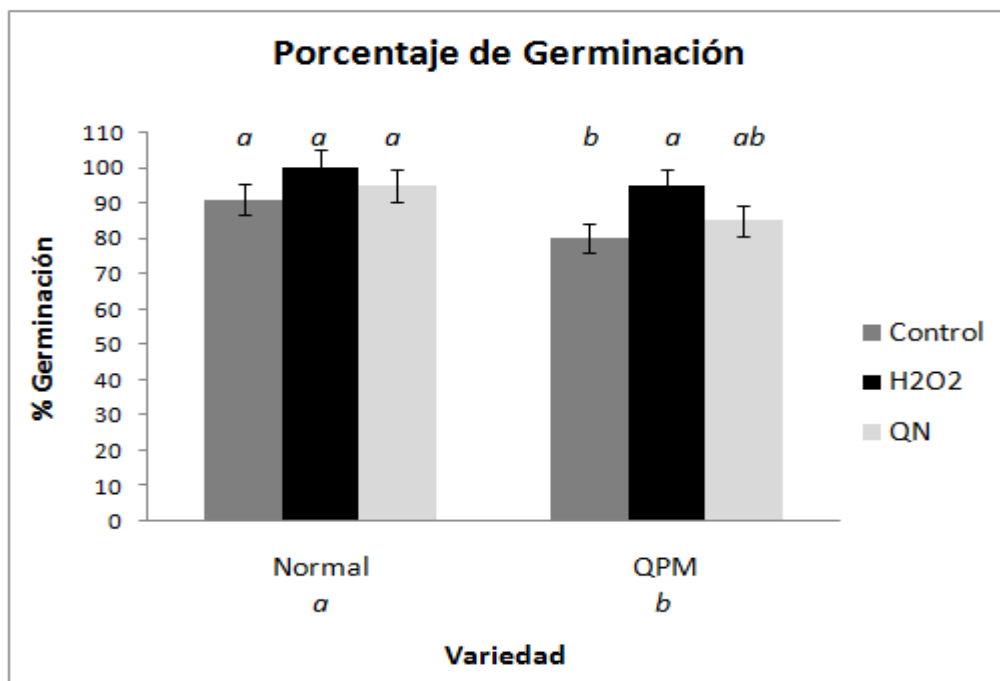
6.1.2 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSÁN OBTENIDO

El quitosán obtenido en el laboratorio fue clasificado como de alta pureza debido a que fue soluble en ácidos débiles (ácido láctico y ácido acético). El grado de desacetilación obtenido fue de 92%. El peso molecular obtenido fue de 125 kDa (*Anexo 9.1*).

6.2 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA FENOLÓGICA Y BIOQUÍMICA AL USO DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO POSIBLES ELICITORES EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.

6.2.1 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

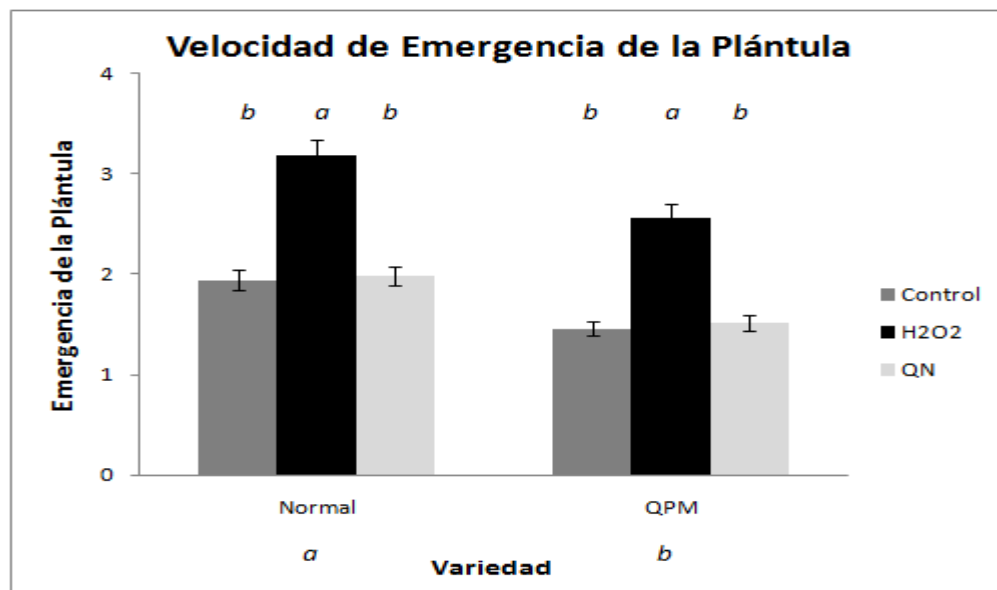
De las semillas sembradas en esta etapa del experimento, el 98.57% llegó a su fase final de germinación nueve días después de la siembra. Como se muestra en la *Gráfica 2*, se encontró que existe diferencia significativa entre los porcentajes de germinación de las diferentes variedades de maíz, es decir, las semillas de variedad normal fueron aquellas que presentaron un mayor porcentaje de germinación ($p=0.0017$). Se encontró que el acondicionamiento de las semillas con H_2O_2 resulta eficaz en las semillas de la variedad QPM, promoviendo una mayor germinación al compararse con el control ($p=0.0028$). No se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de germinación registrados para los distintos acondicionamientos en la variedad normal.



Gráfica 2. Medias de los porcentajes de germinación en función de la variedad y del acondicionamiento de las semillas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad. Las letras diferentes por debajo de las barras indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre variedades independientemente del tratamiento.

6.2.2 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE EMERGENCIA DE LAS PLÁNTULAS

La *Gráfica 3* muestra que las plántulas de ambas variedades de maíz que fueron acondicionadas con H_2O_2 , emergieron más rápidamente que aquellas acondicionadas con QN e incluso emergieron más rápidamente que el control ($p<0.0001$). El comportamiento del control y de las semillas acondicionadas con QN fue muy similar. De acuerdo a las variedades, las plántulas de variedad normal emergieron significativamente más rápido que las correspondientes a la variedad QPM. Este comportamiento pudo deberse a que el H_2O_2 estimula la germinación de las semillas y el crecimiento de los coleóptilos debido al estrés oxidativo causado por ROS a nivel celular (Korystov and Narimanov, 1997).



Gráfica 3. Medias de los valores de emergencia de las plántulas provenientes de semillas acondicionadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad. Las letras diferentes por debajo de las barras indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre variedades independientemente del tratamiento.

6.2.3 EVALUACIÓN FENOLÓGICA DE LAS PLÁNTULAS

Diecinueve días después de la siembra, previo a la aspersión con QN o H_2O_2 , las plántulas provenientes de las semillas acondicionadas fueron medidas. No existió diferencia significativa entre las variables evaluadas con respecto al tratamiento en la variedad normal (Tabla 12). En el caso de las semillas de variedad QPM, el acondicionamiento con H_2O_2 promovió un incremento significativo en la longitud de los tallos comparado con el tratamiento de QN e incluso con el control. De igual manera, la longitud total de las plántulas provenientes de semillas acondicionadas con H_2O_2 fue mayor que la registrada para el control correspondiente. Para el caso de las plántulas provenientes de semillas de variedad QPM, la longitud de sus hojas y el grosor de sus tallos no presentaron diferencias significativas en función del tratamiento.

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

Variedad	Tratamiento (recubrimiento)	Longitud de Plántula (cm)	Longitud de Hojas (cm)	Longitud de Tallos (cm)	Grosor de Tallos (mm)
Normal	Control	38.19 ± 2.35 a	28.46 ± 2.31 a	9.73 ± 0.22 a	5.25 ± 0.14 a
	QN	42.66 ± 2.88 a	32.99 ± 2.83 a	9.67 ± 0.27 a	5.54 ± 0.17 a
	H ₂ O ₂	40.00 ± 2.86 a	29.83 ± 2.81 a	10.17 ± 0.27 a	5.76 ± 0.17 a
QPM	Control	36.97 ± 0.57 b	27.26 ± 0.48 a	9.71 ± 0.19 b	5.96 ± 0.14 a
	QN	37.40 ± 0.61 ab	27.84 ± 0.59 a	9.56 ± 0.23 b	5.91 ± 0.17 a
	H ₂ O ₂	39.25 ± 0.89 a	28.75 ± 0.60 a	10.49 ± 0.23 a	5.81 ± 0.18 a

Tabla 12. Efecto del acondicionamiento de las semillas con QN y H₂O₂ sobre las variables fenológicas, 19 días después de haber sido sembradas en el invernadero. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

Variedad	Tratamiento (recubrimiento/aspersión)	Longitud de Plántulas (cm)	Longitud de Hojas (cm)	Longitud de Tallos (cm)	Grosor de Tallos (mm)
Normal	Control	65.68 ± 1.90 a	49.57 ± 1.36 a	16.11 ± 2.84 a	6.45 ± 1.21 a
	CH/sin	65.96 ± 1.76 a	49.64 ± 1.36 a	16.32 ± 1.85 a	6.68 ± 1.21 a
	sin /CH	69.53 ± 1.73 a	52.89 ± 1.34 a	16.64 ± 2.47 a	6.71 ± 1.19 a
	CH/CH	67.16 ± 1.73 a	51.08 ± 1.34 a	16.07 ± 3.43 a	6.69 ± 1.19 a
	H ₂ O ₂ / sin	67.36 ± 1.73 a	51.08 ± 1.34 a	16.27 ± 2.18 a	9.71 ± 1.19 a
	sin / H ₂ O ₂	67.45 ± 1.73 a	51.05 ± 1.34 a	16.40 ± 2.00 a	7.11 ± 1.19 a
	H ₂ O ₂ / H ₂ O ₂	71.63 ± 1.73 a	54.47 ± 1.34 a	17.16 ± 2.76 a	7.27 ± 1.19 a
QPM	Control	67.53 ± 1.60 a	50.76 ± 1.34 a	16.76 ± 0.43 a	7.52 ± 0.26 a
	CH/ sin	67.47 ± 1.60 a	49.86 ± 1.34 a	17.61 ± 0.43 a	7.34 ± 0.26 a
	sin /CH	69.78 ± 1.60 a	52.59 ± 1.34 a	17.19 ± 0.43 a	7.48 ± 0.26 a
	CH/CH	68.40 ± 1.63 a	51.56 ± 1.37 a	16.84 ± 0.43 a	7.57 ± 0.26 a
	H ₂ O ₂ / sin	69.51 ± 1.69 a	52.34 ± 1.42 a	17.17 ± 0.45 a	7.64 ± 0.27 a
	sin / H ₂ O ₂	67.83 ± 1.60 a	50.85 ± 1.34 a	16.98 ± 0.43 a	7.55 ± 0.26 a
	H ₂ O ₂ / H ₂ O ₂	68.75 ± 1.60 a	50.99 ± 1.34 a	17.76 ± 0.43 a	7.17 ± 0.26 a

Tabla 13. Efecto del acondicionamiento de las semillas y aspersión de las plántulas con QN y H₂O₂ sobre las variables fenológicas 30 días después de haber sido sembradas en el invernadero. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

Las mediciones fenológicas realizadas el día 30 después de la siembra fueron necesarias para determinar si el acondicionamiento de las semillas y el recubrimiento de las plántulas mediante aspersión con QN y H₂O₂ tienen la capacidad de promover cambios en sus características físicas, y particularmente en sus dimensiones. La cinética paso a paso, se

realizó registrando los resultados medidos a cada oportunidad de aplicación, mientras que la cinética acumulada se llevó a cabo midiendo las plántulas 48.5 horas después de haber sido asperjadas las soluciones de acuerdo a lo descrito en la *Tabla 3*. Los resultados obtenidos por la cinética paso a paso fueron descartados, debido a que se encontró que la aspersión del QN y del H₂O₂ no tiene efecto inmediato sobre la fenología de la plántula. Los resultados obtenidos para la cinética acumulada se resumen en la *Tabla 13*, en donde puede observarse que ninguna de las dos variedades de maíz utilizadas en el experimento presentó diferencia significativa entre las dimensiones registradas para todas las variables de respuesta medidas por efecto de la aspersión.

Las mediciones fenológicas realizadas a las plántulas de maíz después de 36 días de haber sido trasplantadas (70 días después de su acondicionamiento con QN o H₂O₂), no arrojaron resultados estadísticamente significativos (*Tabla 14*), lo cual indica que el acondicionamiento de las semillas por sí solo, no es suficiente para lograr mejoras fenológicas en los cultivos de maíz en su etapa de plántula adulta, por lo que resulta necesario complementar este tratamiento con algún otro para potencializar el efecto del acondicionamiento de la semilla.

Variedad	Tratamiento (acondicionamiento)	Longitud de Plántula (cm)	Grosor de Tallos (mm)
Normal	Control	84.58 ± 7.72 a	7.06 ± 0.04 a
	QN	100.84 ± 6.96 a	7.42 ± 0.04 a
	H ₂ O ₂	91.56 ± 7.19 a	7.26 ± 0.04 a
QPM	Control	97.74 ± 7.44 a	6.83 ± 0.04 a
	QN	75.65 ± 7.19 a	6.65 ± 0.04 a
	H ₂ O ₂	94.83 ± 7.44 a	6.96 ± 0.04 a

Tabla 14. Efecto del acondicionamiento de las semillas QN y H₂O₂ sobre algunas variables fenológicas 36 días después de haber sido trasplantadas a la parcela. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

6.2.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

6.2.4.1 TINCIÓN CON DAB PARA DETERMINAR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

En esta prueba cualitativa, la presencia de H_2O_2 se manifestó mediante una coloración café de las hojas de las plántulas con alto contenido de H_2O_2 . Se observó mayor presencia de H_2O_2 en las hojas de las plántulas provenientes de semillas de variedad QPM, mientras que las de variedad normal, presentaron menor intensidad de coloración (*Figura 1*).

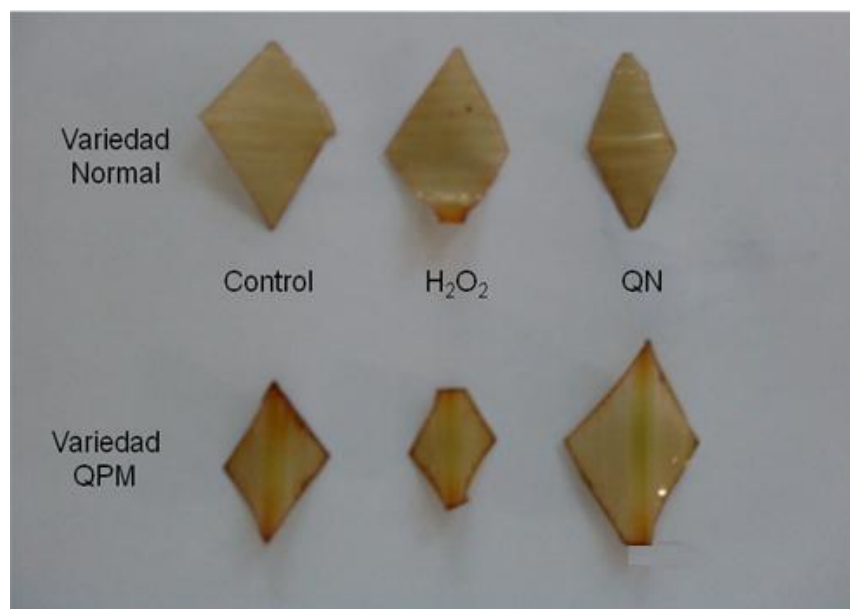


Figura 1: Observaciones de la presencia de H_2O_2 de los cortes hechos a las hojas de maíz de distintas variedades sometidas a los distintos acondicionamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la prueba de DAB fue positiva a H_2O_2 endógeno en todos los grupos analizados. Como se describe en la *Tabla 15*, la variedad con mayor cantidad de H_2O_2 presente fue la QPM, ya que la coloración café resultante fue significativa en los sitios de corte, formando en promedio un perímetro colorido más ancho (2.5mm) que la correspondiente muestra de variedad normal (1.0mm). La variedad

normal mostró una mayor coloración bajo el tratamiento con H₂O₂, seguido por el tratamiento con QN, y finalmente el control correspondiente. En cuanto a la variedad QPM, las plántulas provenientes de las semillas del grupo control fueron las que desarrollaron mayor cantidad de H₂O₂, seguidas por aquellas tratadas con H₂O₂, y finalmente aquellas tratadas con QN.







NORMAL	OBSERVACIÓN ESTEREOSCÓPICA		QPM	OBSERVACIÓN ESTEREOSCÓPICA	
Control	Presencia de H ₂ O ₂ en las nervaduras de la hoja y en la parte media de ésta.		Control	Presencia de H ₂ O ₂ en toda la hoja con una intensidad de coloración alta, principalmente en las nervaduras y en el sitio de corte.	
H ₂ O ₂	Presencia de H ₂ O ₂ en toda la hoja, principalmente en las nervaduras y en el área de corte, con una alta intensidad de color.		H ₂ O ₂	Presencia de H ₂ O ₂ en las nervaduras secundarias, pero principalmente en el área de corte. El corte hecho a la altura de la nervadura central muestra colores tenues.	
QN	Escasa presencia de H ₂ O ₂ en toda la hoja, coloración atenuada en los bordes a pesar de la escisión.		QN	Manifestaciones semejantes de la presencia de H ₂ O ₂ en las nervaduras secundarias, nervadura central y sitios de escisión.	

Tabla 15. Análisis cualitativo de la presencia de H₂O₂ en hojas de maíz provenientes de semillas acondicionadas con QN y H₂O₂ mediante la técnica de DAB. Las áreas oscuras en las fotografías de las hojas indican la presencia de H₂O₂ exógeno.

6.2.4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Los resultados de esta evaluación, realizada empleando muestras del tejido vegetal colectado 30 días después de la siembra, mostraron que el mayor contenido de proteína se presentó en las hojas de las plántulas que fueron tratadas mediante aspersión tanto con QN como con H₂O₂ independientemente de la variedad de maíz utilizada (Tabla 16). Las aspersiones con QN y H₂O₂ favorecieron un incremento significativo en la cantidad de proteínas en las plántulas de maíz, en algunos casos hasta en un 200%, convirtiéndolo en un alimento altamente nutritivo para el consumo animal a manera de forraje para ambas variedades.

Variedad	Tratamiento (recubrimiento/aspersión)	Contenido de Proteína (µg)
Normal	Control	21.317 ± 3.538 c
	QN/sin	16.104 ± 3.538 c
	sin/QN	51.470 ± 3.538 a
	QN/QN	40.440 ± 3.538 a
	H ₂ O ₂ / sin	24.610 ± 3.538 bc
	sin / H ₂ O ₂	42.281 ± 3.538 a
	H ₂ O ₂ / H ₂ O ₂	37.484 ± 3.538 ab
QPM	Control	14.761 ± 4.595 b
	QN/ sin	34.213 ± 4.595 ab
	sin /QN	41.483 ± 4.595 a
	QN/QN	31.469 ± 4.595 ab
	H ₂ O ₂ / sin	15.831 ± 4.595 b
	sin / H ₂ O ₂	42.535 ± 4.595 a
	H ₂ O ₂ / H ₂ O ₂	39.334 ± 4.595 a

Tabla 16. Efecto del recubrimiento de las semillas de maíz y de la aspersión de las plántulas con QN y H₂O₂ sobre el contenido de proteínas (µg), 30 días después de la siembra en el invernadero. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa (p=0.05, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

6.2.4.3 DETERMINACIÓN DE CATALASA TOTAL

De acuerdo a los resultados obtenidos, no existe diferencia significativa en la actividad específica de CAT en ningún tratamiento y en ninguna variedad, lo cual es indicativo de

que esta enzima no incrementa su actividad aún cuando las semillas sean acondicionadas con QN o H₂O₂ (Tabla 17).

Variedad	Tratamiento (acondicionamiento/aspersión)	Actividad de Catalasa (μ moles de H ₂ O ₂ destruido/mg proteína*min)
Normal	Control	1720.640 \pm 447.96 a
	QN/sin	2819.153 \pm 447.96 a
	sin / QN	2834.457 \pm 447.96 a
	QN / QN	3203.963 \pm 447.96 a
	H ₂ O ₂ / sin	1879.146 \pm 447.96 a
	sin / H ₂ O ₂	2804.873 \pm 447.96 a
	H ₂ O ₂ / H ₂ O ₂	3280.392 \pm 447.96 a
QPM	Control	3985.62 \pm 47741 a
	QN / sin	3109.18 \pm 47741 a
	sin / QN	3266.59 \pm 47741 a
	QN / QN	3728.48 \pm 47741 a
	H ₂ O ₂ / sin	3774.02 \pm 47741 a
	sin / H ₂ O ₂	128795.27 \pm 47741 a
	H ₂ O ₂ / H ₂ O ₂	2906.41 \pm 47741 a

Tabla 17. Efecto del acondicionamiento de las semillas y aspersión de las plántulas con QN y H₂O₂ sobre la actividad de catalasa (μ moles de H₂O₂ destruido/mg proteína*min) 30 días después de la siembra en el invernadero. Los valores son expresados como la media \pm error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

6.3 EFECTO DEL QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CULTIVOS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO SOBRE LAS VARIABLES FENOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

6.3.1 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL USO DE ELICITORES COMBINADOS

La germinación de las semillas comenzó 27h después de haber sido colocadas en el agar PDA. No todos los tratamientos germinaron a la misma velocidad. La *Tabla 19* muestra la evolución de la germinación de las semillas sometidas a los diferentes acondicionamientos, así como la medición de las longitudes de las raíces y de las plúmulas ocho días después de haber sido sembradas en PDA.

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

Variedad	Grupo	Recubrimiento	# de Semillas germinadas (27h)	Longitud de Raíces 8d (cm)	Longitud de Plúmulas 8d (cm)
Normal	Control	Sin	0	0.76 ± 0.32 b	0.40 ± 0.28 ab
	Trat. 1	QN	1	0.63 ± 0.32 b	0.30 ± 0.28 b
	Trat. 2	H ₂ O ₂	2	2.45 ± 0.32 a	1.02 ± 0.28 ab
	Trat. 3	Combinado	1	2.22 ± 0.32 a	1.50 ± 0.28 a
QPM	Control	Control	0	0.90 ± 0.37 b	0.90 ± 0.37 b
	Trat. 1	QN	1	2.47 ± 0.37 a	2.47 ± 0.37 a
	Trat. 2	H ₂ O ₂	5	2.23 ± 0.37 ab	2.23 ± 0.37 ab
	Trat. 3	Combinado	2	1.82 ± 0.37 ab	1.82 ± 0.37 ab

Tabla 18. Germinación de las semillas de maíz en agar PDA (27 horas después de la siembra) y longitud de sus raíces y plúmulas (8 días después de la siembra). Los valores de las dos últimas columnas son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

En la tabla, puede observarse que, en general, las semillas de variedad QPM germinaron más rápidamente que las correspondientes a la variedad Normal hasta en un 200%, siendo para ambas variedades el Tratamiento 2 (acondicionamiento con H₂O₂) el que promueve una germinación más acelerada. En lo que respecta a la longitud de las raíces registrada 8 días después de la siembra en agar, puede observarse que, para la variedad Normal, las raíces de los Tratamientos 2 y 3 (acondicionamiento con H₂O₂ y Combinado respectivamente), son significativamente mayores que aquellas recubiertas con QN; además, estas últimas registraron tamaños de raíz iguales al control. Para la variedad QPM, las raíces más grandes resultaron ser aquellas provenientes de las semillas acondicionadas con el Tratamiento 1 (QN), mientras que las más chicas fueron aquellas correspondientes al control. Tanto el tratamiento con H₂O₂ como el de la combinación de recubrimientos (Tratamientos 2 y 3 respectivamente), presentaron medias iguales, pero no son estadísticamente significativas con respecto al control ni a aquellas recubiertas con QN.

En lo que respecta a la longitud de las raíces registrada 8 días después de la siembra en agar, puede observarse que, para la variedad Normal, las plúmulas de mayor tamaño fueron aquellas sometidas a recubrimiento combinado (Tratamiento 3), mientras que las

más pequeñas fueron aquellas tratadas con QN (Tratamiento 1). Para el caso de la variedad QPM, las plúmulas más pequeñas fueron aquellas correspondientes al control, mientras que las más grandes son aquellas correspondientes al tratamiento con QN (Tratamiento 1). Las plúmulas provenientes de semillas tratadas tanto con H₂O₂ como con recubrimiento combinado, presentaron la misma longitud, sin diferencia estadística con el resto de los tratamientos. Estos resultados sugieren que el acondicionamiento de las semillas con el tratamiento combinado (en adelante referido como QN/H₂O₂), es una alternativa para poder obtener mejores respuestas en las variables que se midan, por lo tanto, este tratamiento también fue aplicado a las semillas en el presente experimento.

La *Figura 2* presenta el proceso germinativo de las semillas, así como la apreciación cualitativa de las especies fúngicas alrededor de las mismas. Por otra parte, la *Tabla 19* muestra la descripción de la micobiota (de acuerdo a su morfología colonial) encontrada en este experimento.

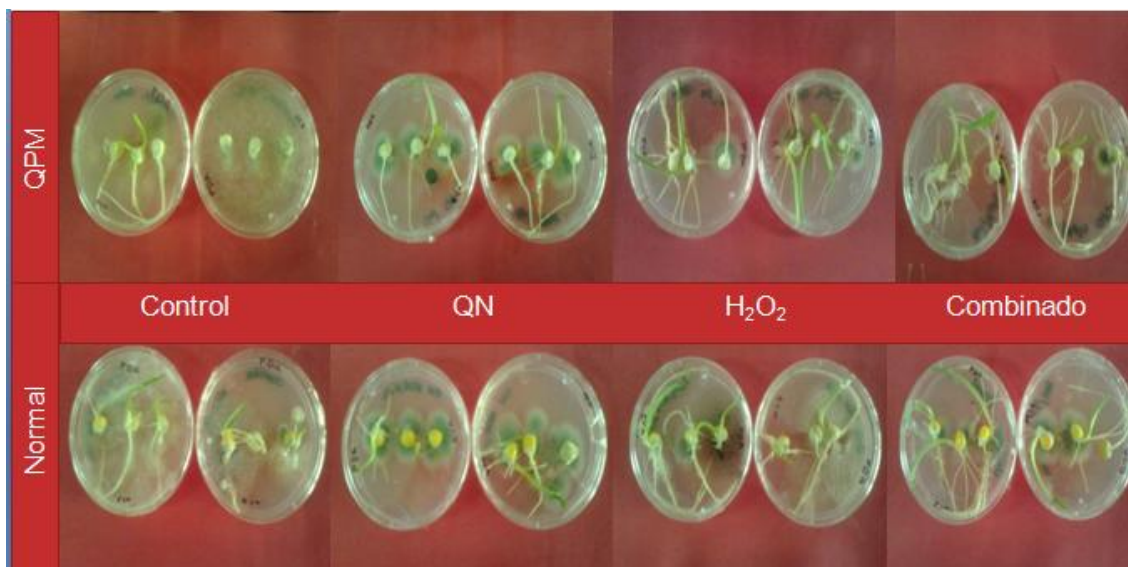


Figura 2. Crecimiento fenológico cualitativo y desarrollo microbiano en semillas de maíz sometidas a los diferentes recubrimientos después de 8 días de haber sido colocadas en agar PDA.

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitores en plántulas de maíz para consumo animal

Recubrimiento	Variación	Características
Control	QPM	Crecimiento de <i>F. moniliforme</i> y <i>A. niger</i> combinados en ambas cajas. Propagación de las esporas de ambos hongos en toda el área del agar.
	Normal	Crecimiento de <i>F. moniliforme</i> y <i>Penicillium</i> spp en las áreas cercanas a las semillas y raíces,
QN	QPM	Crecimiento de <i>A. niger</i> alrededor de las semillas sembradas formando un halo; crecimiento de <i>Penicillium</i> en zonas cercanas a las raíces.
	Normal	Crecimiento de <i>A. flavus</i> alrededor de las semillas sembradas formando un halo, el cual se extiende ligeramente también alrededor de las raíces.
H₂O₂	QPM	Contaminación bacteriana en una de las cajas. Escaso crecimiento fúngico (<i>A. flavus</i>) formando un halo a penas visible alrededor de las semillas.
	Normal	Escaso crecimiento de <i>A. niger</i> y <i>A. flavus</i> , cuyas esporas se encuentran esparcidas formando un delgado halo alrededor de las semillas y alrededor del área ocupada por las raíces y plúmulas.
Combinado	QPM	Contaminación por <i>A. flavus</i> únicamente sobre el grano, pero nula contaminación fúngica sobre el agar, el cual mantiene su aspecto traslúcido.
	Normal	Crecimiento de <i>Penicillium</i> formando un halo alrededor de las semillas.

Tabla 19. Características de las semillas germinadas en agar PDA, previo tratamiento con los acondicionamientos correspondientes.

De acuerdo a los resultados, puede observarse que el tratamiento combinado (QN/H₂O₂) es una buena opción para obtener plántulas sanas y con características microbiológicas aceptables, ya que el crecimiento fúngico en las semillas sometidas a este tratamiento fue mínimo comparado con el control, e incluso fue menor que el registrado para los tratamientos con QN y H₂O₂ de manera independiente. Sumando estos resultados a los presentados en la *Tabla 18*, se concluye que el acondicionamiento combinado de las semillas promueve un mayor crecimiento de la plántula, desarrollando menor carga fúngica. Por esta razón es que para la esta fase experimental, se decidió emplear los tres

tratamientos para las semillas (QN, H₂O₂ y QN/H₂O₂). Cabe mencionar que, a pesar de que existe una gran variedad de trabajos en los que se ha involucrado el uso del QN y el uso del H₂O₂ en semillas de diversos cultivos agrícolas con fines antimicrobianos, promotores de crecimiento y elicitors, no existen reportes del empleo combinado de ambas sustancias, de ahí la especial importancia de los resultados obtenidos esta parte de la experimentación.

6.3.2 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN TOTAL.

Tratamiento	Estrés	Acondicionamiento	Variación	% de Germinación
a	Sequía	Combinado	Normal	91.25 ± 0.569 b
b	<i>A. flavus</i>	Combinado	Normal	92.5 ± 0.569 b
c	No	Combinado	Normal	65 ± 0.569 f
d	Sequía	H ₂ O ₂	Normal	100 ± 0.569 a
e	Sequía	QN	Normal	80 ± 0.569 d
f	<i>F. moniliforme</i>	Combinado	Normal	85 ± 0.569 c
g	<i>A. flavus</i>	H ₂ O ₂	Normal	100 ± 0.569 a
h	<i>A. flavus</i>	QN	Normal	90 ± 0.569 b
i	<i>A. flavus</i> + sequía	Combinado	Normal	85 ± 0.569 c
j	No	No	Normal	75 ± 0.569 e
k	<i>A. flavus</i>	Combinado	QPM	100 ± 0.569 a
l	<i>A. flavus</i> + sequía	Combinado	QPM	100 ± 0.569 a
m	No	No	QPM	100 ± 0.569 a

Tabla 20. Medias de los porcentajes de germinación de las semillas sometidas a los diferentes tratamientos. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos.

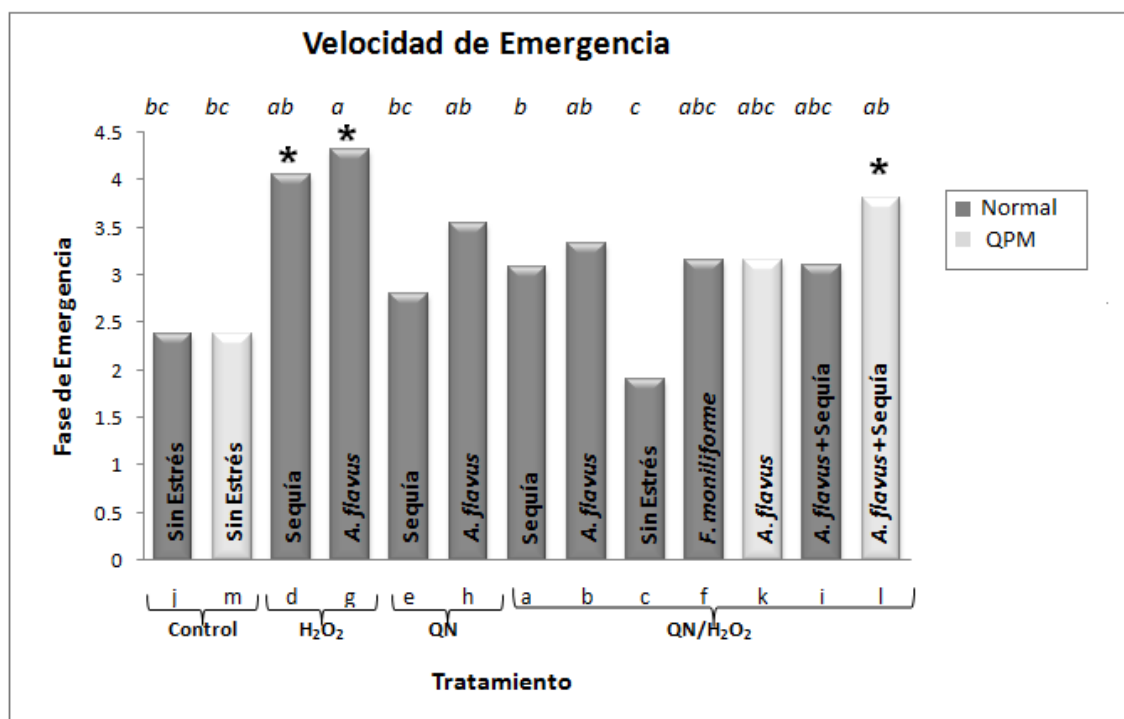
De las semillas plantadas en esta etapa del experimento, independientemente del acondicionamiento previo o de la inducción de estrés biótico o abiótico, el 90.44% de ellas llegaron a su fase final de germinación 10 días después de la siembra; no obstante, el porcentaje máximo de germinación se alcanzó el día 14 después de la siembra,

registrando un total de 94.66% de semillas germinadas, un porcentaje alto que confirma la calidad de las semillas empleadas en el presente experimento. Esto es justificable, ya que la semilla empleada en este proyecto de tesis corresponde a una variedad mejorada, es decir, producida por plantas escogidas, cruzadas entre diferentes variedades de la misma especie con la finalidad de ser más productivas. Analizando las medias de los porcentajes de germinación en función de los tratamientos (*Tabla 20*), puede observarse que existe diferencia significativa entre los tratamientos involucrados, siendo menor la germinación de las semillas de variedad normal sin estrés y con acondicionamiento combinado ($p=0.0012$) comparada con el resto de los tratamientos. También puede observarse que las semillas de variedad QPM tienen mayor capacidad germinativa que las de variedad normal, y que la presencia de estrés en las semillas de maíz bajo condiciones de invernadero favorece su germinación *in vivo*.

6.3.3 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE EMERGENCIA DE LA PLÁNTULA

Como puede observarse en la *Gráfica 4*, existen diferencias significativas entre las velocidades de emergencia de las plántulas de maíz en función del tratamiento, siendo los controles (plántulas provenientes de semillas sin estrés) los que emergen de manera más lenta. Todas las plántulas provenientes de semillas sometidas tanto a estrés biótico como estrés abiótico registraron una emergencia más rápida ($p<0.0001$), mostrando un desarrollo más acelerado las plántulas sometidas a estrés por *A. flavus* y sequía para la variedad normal, y la combinación de *A. flavus* + sequía para la variedad QPM. Los controles de ambas variedades emergieron a la misma velocidad. No existió diferencia significativa entre las velocidades de emergencia de las plántulas provenientes de semillas infectadas con *A. flavus* para las dos variedades. Bajo la influencia de estrés por la combinación de *A. flavus* + sequía, las semillas acondicionadas con QN/H₂O₂ de variedad

QPM presentaron una emergencia más acelerada en un 33% que las correspondientes a la variedad Normal. Algunas imágenes se presentan en el Anexo 9.2.

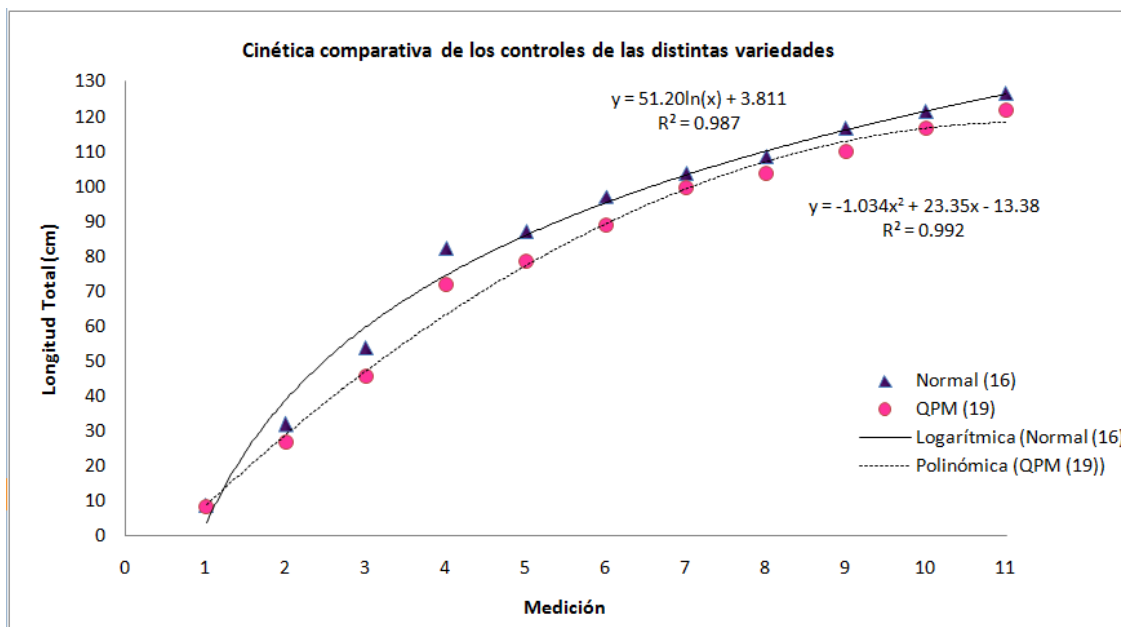


Gráfica 4. Medias de la velocidad de emergencia de las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos ($p < 0.0001$). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p = 0.05$, Tukey) entre los distintos tratamientos. Las barras con asterisco (*) indican diferencia significativa con respecto al control de acuerdo a la prueba de Dunnett's.

6.3.4 EVALUACIÓN FENOLÓGICA DE LAS PLÁNTULAS

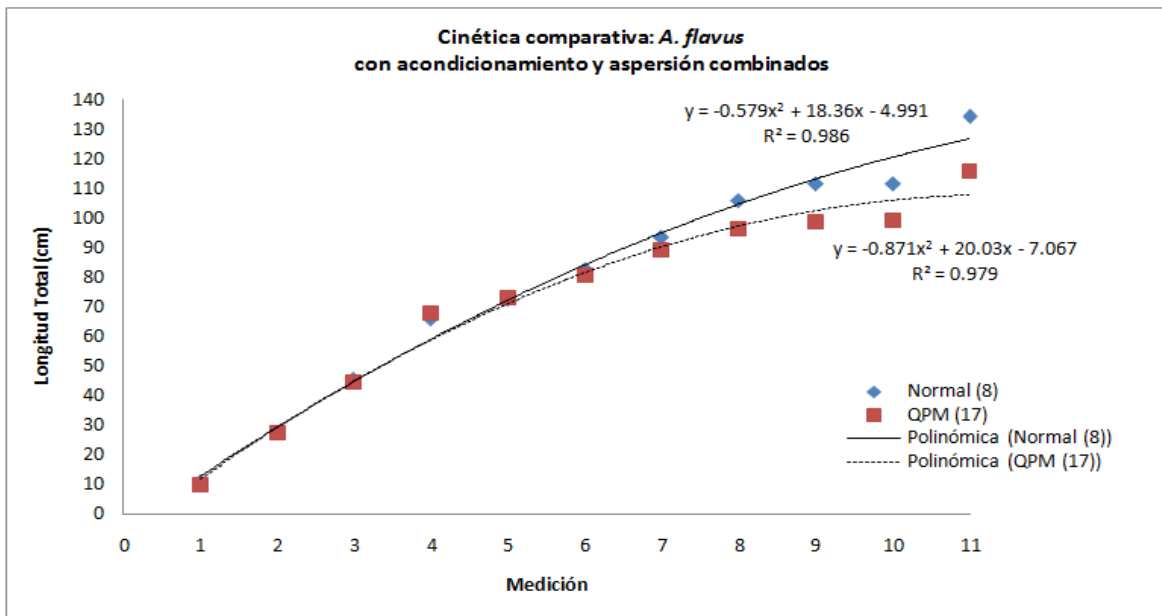
Las cinéticas obtenidas a partir de las mediciones continuas de las longitudes de las plántulas de maíz nos indican, en función de la ecuación a la que más se ajustan, que existen diferencias significativas entre ellas, además de que algunas resultan estadísticamente distintas al compararse con los controles correspondientes.

Las Gráficas 5, 6 y 7 muestran las comparaciones entre las dos variedades, tanto de los controles correspondientes como de aquellas plantas sometidas a estrés por *A. flavus* y *A. flavus* + sequía con acondicionamiento y aspersión con la combinación de soluciones. La Gráfica 5 muestra que los controles de ambas variedades son diferentes, ya que uno se desarrolla de forma logarítmica y el otro polinómica. Las Gráficas 6 y 7 muestran que ambas variedades se desarrollan con una tendencia polinómica sin diferencia estadística aparente. La Gráfica 8 muestra las cinéticas de altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y recubrimiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones. Como puede observarse, existe diferencia significativa de los diferentes tratamientos con respecto al control ($p < 0.05$); sin embargo no existe diferencia entre tratamientos. Esta diferencia se corrobora mediante el análisis de las tendencias, ya que mientras los distintos tratamientos tienen una tendencia polinómica, la tendencia del resulta logarítmica.

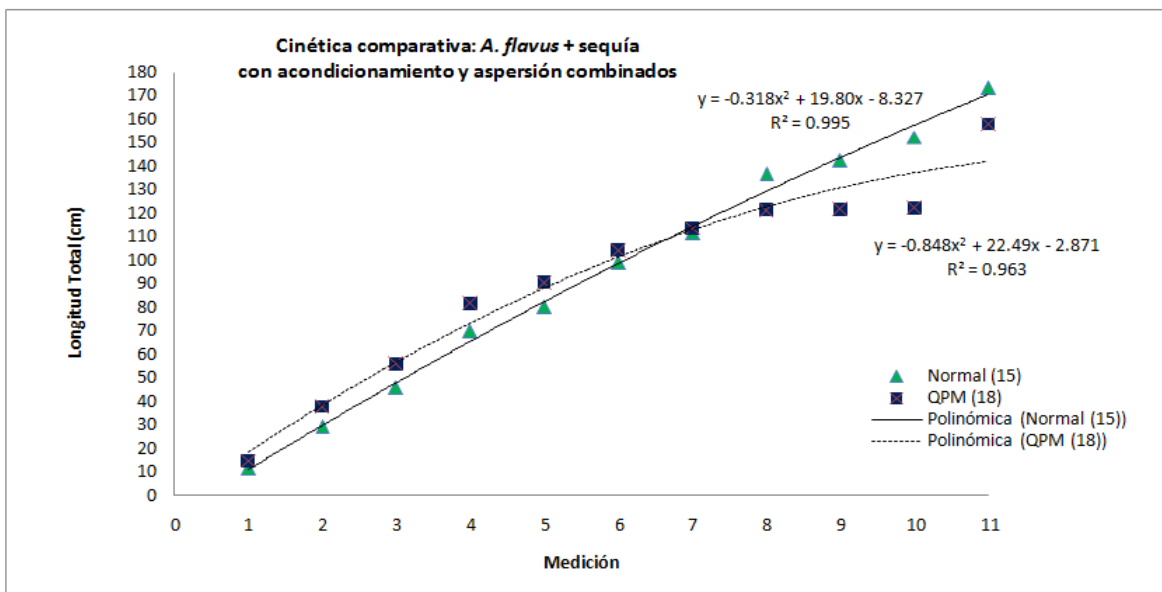


Gráfica 5. Cinética comparativa de los controles de las diferentes variedades de maíz utilizado.

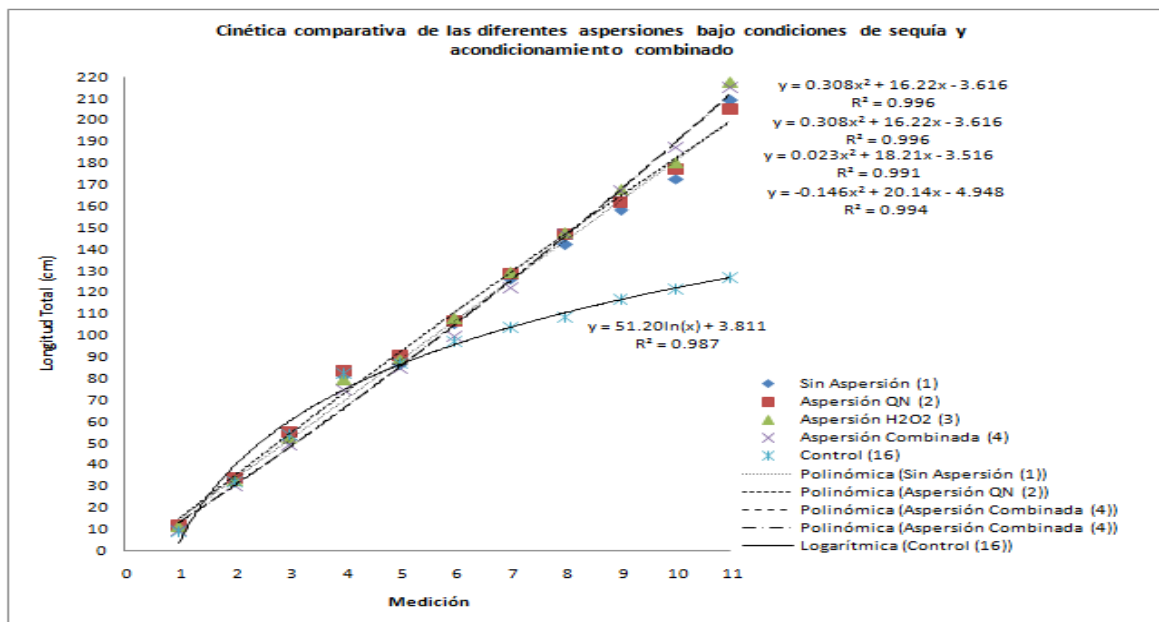
Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal



Gráfica 6. Cinética comparativa de las semillas sometidas a estrés por *A. flavus*, acondicionamiento y aspersiones combinadas para las diferentes variedades de maíz utilizado.



Gráfica 7. Cinética comparativa de las semillas sometidas a estrés por *A. flavus*+sequía, acondicionamiento y aspersiones combinados para las diferentes variedades de maíz utilizado.



Gráfica 8. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p < 0.05$).

La Gráfica 9 muestra las cinéticas de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones. En este caso, no existe diferencia significativa entre los tratamientos comparados. La Gráfica 10 muestra las cinéticas de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula con los diferentes acondicionamientos; ahí se observa que aquellas plántulas sometidas a los diferentes tratamientos presentan una mayor longitud comparadas con el control ($p < 0.05$). Comparando las cinéticas de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado, aspersión combinada y sometidas a los diferentes estreses, puede observarse, como se muestra en la Gráfica 11 ($p < 0.05$), que aquellas plantas bajo condiciones de sequía presentan una

mayor longitud total, seguidas por aquellas sometidas al ataque por *A. flavus* + sequía; mientras que las plantas con menor tamaño son aquellas sometidas a estrés por *F. moniliforme*, el cual parece impedir el óptimo desarrollo vegetativo de las plantas.

Por lo tanto, en función de los resultados presentados anteriormente se observa que bajo condiciones de sequía y con acondicionamiento combinado, aquellas plantas asperjadas, independientemente de la solución usada, tienen mayor longitud que el control correspondiente. Por otra parte, no existe diferencia significativa en cuanto a longitud total se refiere en aquellas plántulas con acondicionamiento combinado, diferentes aspersiones y bajo estrés con *A. flavus*. Es importante destacar que el estrés por sequía propicia a las plantas un mayor tamaño, mientras que el estrés por *F. moniliforme* se ve reflejado en plantas de tamaño pequeño.

En lo que respecta a la longitud de tallos, la *Gráfica 12* muestra las cinéticas de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones. Puede observarse que la aspersión con las diferentes soluciones propicia una mayor altura de tallos con respecto al control ($p < 0.05$). La *Gráfica 13* muestra las cinéticas de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones; en ellas se observa que no existe diferencia con respecto al control ($p < 0.05$). La *Gráfica 14* muestra las cinéticas de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula previo acondicionamiento de las semillas, donde se observa que los tallos provenientes de plántulas tratadas con QN son los de mayor altura, mientras que los más pequeños son aquellos correspondientes al control ($p < 0.05$). La *Gráfica 15* muestra la cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento

combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses; ahí se observa que aquellas plantas sometidas a sequía (tanto sola como en combinación con *A. flavus*, son las que presentan mayor longitud de tallo, mientras que las estresadas con *F. moniliforme* son las de tallo más pequeño ($p < 0.05$).

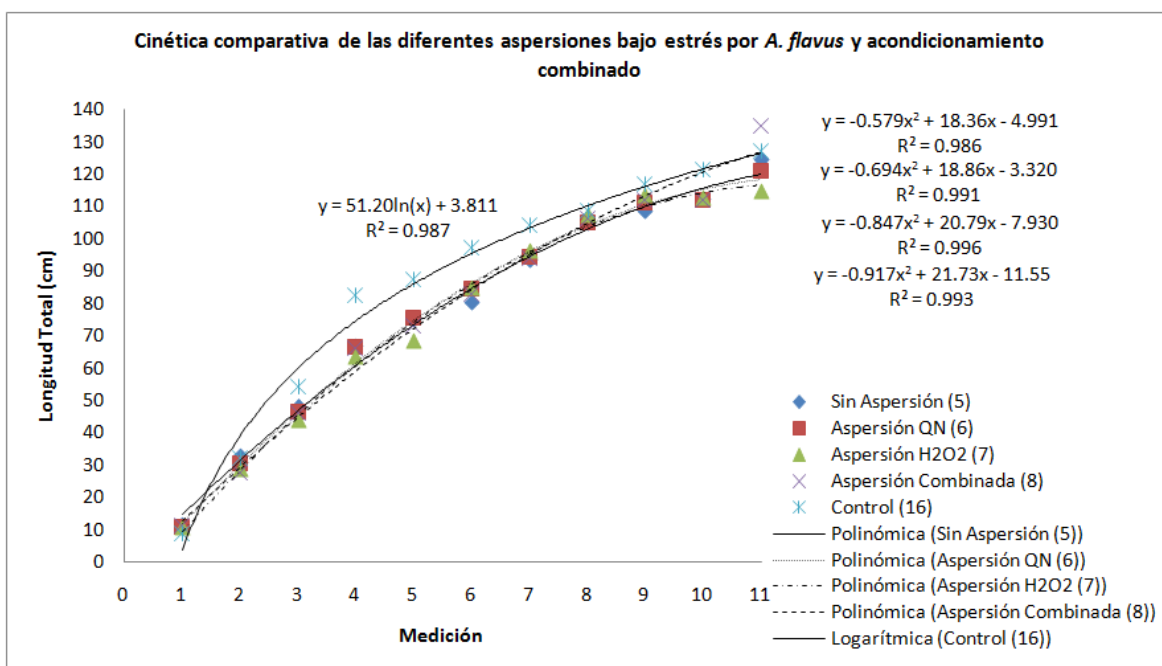
Resumiendo estos resultados, se tiene que bajo condiciones de sequía y con acondicionamiento combinado, aquellas plantas asperjadas, independientemente de la solución usada, tienen mayor longitud de tallos que el control correspondiente, lo cual se ve reflejado en la longitud total. Por otra parte, en aquellas plántulas con acondicionamiento combinado, diferentes aspersiones y bajo estrés con *A. flavus*, no existe diferencia significativa en cuanto a longitud de tallos se refiere. En lo que respecta al estrés por sequía (como factor aislado o en combinación con *A. flavus*), éste propicia a las plantas un mayor tamaño de tallo. Las semillas acondicionadas con QN desarrollan plántulas con tallos de mayores dimensiones que el resto bajo estrés por sequía y sin aspersión alguna.

La siguiente variable medida fue la longitud de hojas. La *Gráfica 16* muestra las cinéticas de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones; en ella se observan las mismas cinéticas para todos los tratamientos y se aprecia diferencia del efecto de las aspersiones ($p < 0.05$) con respecto al control. La *Gráfica 17* muestra las cinéticas de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones. Aquí se observa que bajo estas condiciones, las aspersiones producen una menor longitud de hoja con respecto al control; no obstante, esas diferencias no son significativas ($p > 0.05$). La *Gráfica 18* muestra la cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las

soluciones a la plántula bajo los diferentes acondicionamientos, en donde se observa que éstos propician mayor altura de plantas que el control correspondiente ($p < 0.05$). La *Gráfica 19* muestra las cinéticas de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada sometidas a los diferentes estreses, e indica que el estrés por sequía propicia una mayor longitud de hojas que el resto de los estreses impuestos ($p < 0.05$). Por lo tanto, se tiene que no existen diferencias con respecto a las longitudes de estas bajo el efecto de las soluciones de QN, H_2O_2 o la combinación de éstos; no obstante el estrés por sequía propicia a las plantas un mayor tamaño de hoja, mientras que *A. flavus* y *F. moniliforme* se manifiestan con un tamaño pequeño de hoja.

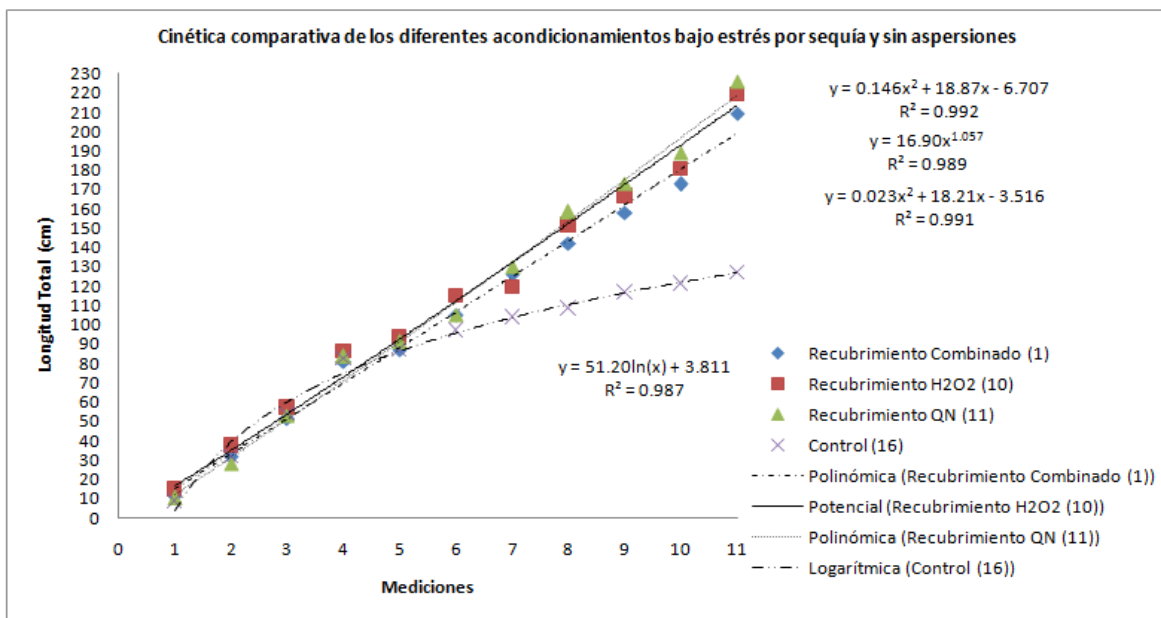
El diámetro de tallos presentó efectos significativos bajo los diferentes tratamientos. La *Gráfica 20* muestra las cinéticas de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones; ahí puede verse que las aspersiones favorecen el incremento en el grosor de tallos al ser comparados con el control ($p < 0.05$). La *Gráfica 21* muestra las cinéticas de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones, en donde no se observan diferencias entre los tratamientos aplicados ($p > 0.05$); mientras que la *Gráfica 22* (cinéticas de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía, sin aspersión de las soluciones a la plántula y con los diferentes acondicionamientos) indica que los recubrimientos favorecen un mayor diámetro de tallos al ser comparados con el control ($p < 0.05$). Finalmente, la *Gráfica 23* muestra las cinéticas de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses; en ella, se observa que el estrés por sequía favorece un mayor diámetro de tallo, mientras que el menor diámetro es

presentado por aquellas plantas estresadas por *A. flavus*, siendo un caso extraordinario, pues en el resto de las estructuras es el estrés por *F. moniliforme* quien confiere a la planta menores dimensiones. Por lo tanto se tiene que, bajo condiciones de sequía y con recubrimiento combinado, aquellas plantas asperjadas, independientemente de la solución usada, tienen mayor grosor de tallos que el control correspondiente. Por otro lado no existe diferencia significativa en cuanto al diámetro de tallos se refiere, en aquellas plántulas con acondicionamiento combinado, diferentes aspersiones y bajo estrés con *A. flavus*.

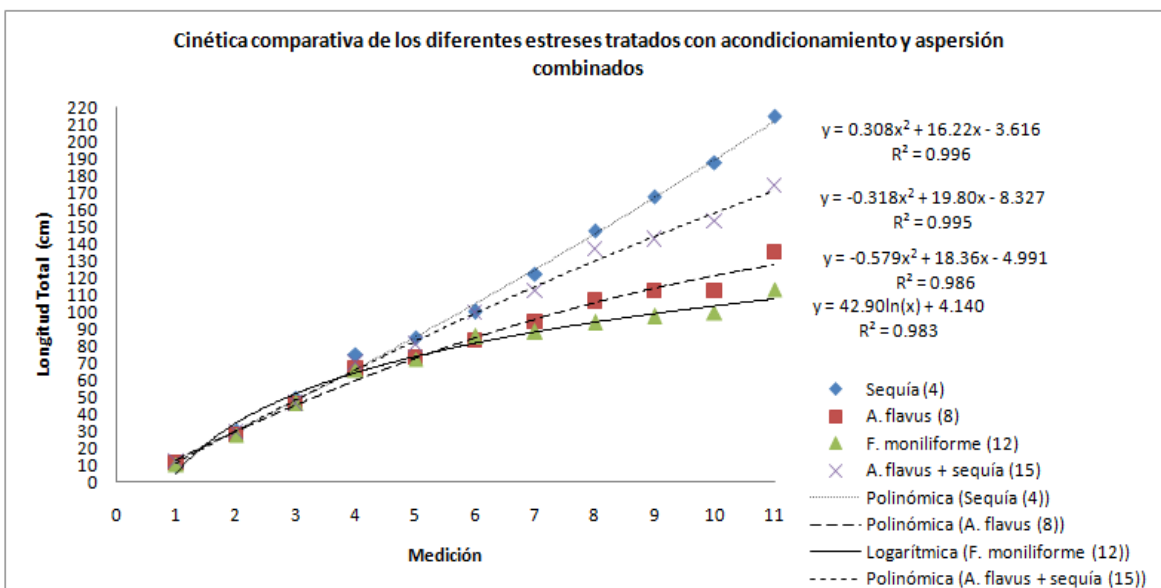


Gráfica 9. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p > 0.05$).

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

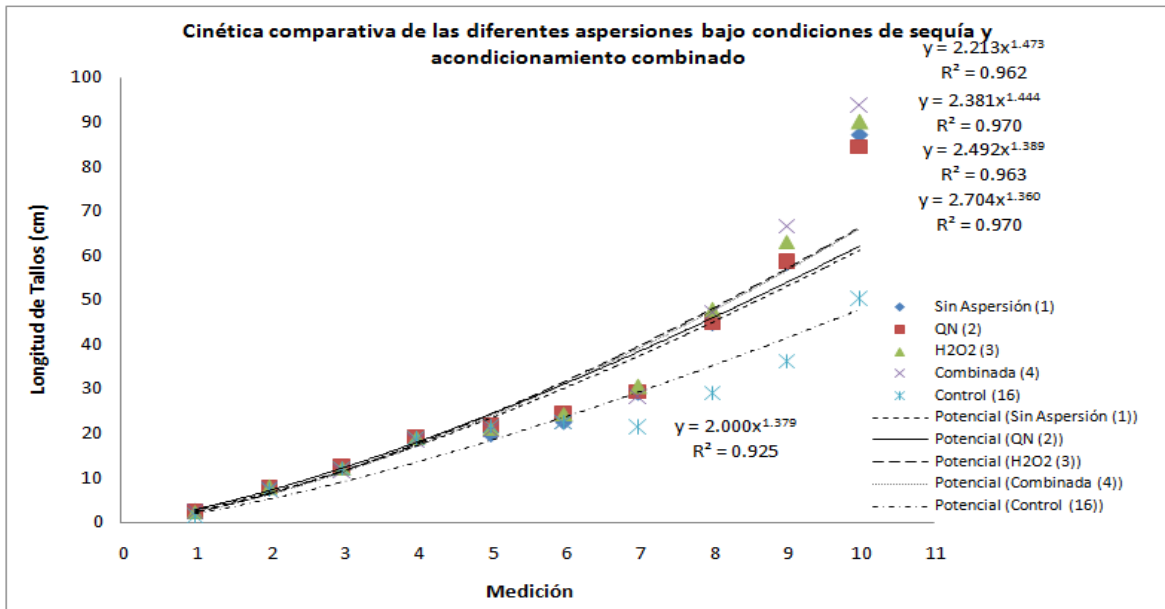


Gráfica 10. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de los diferentes elicitors ($p < 0.05$).

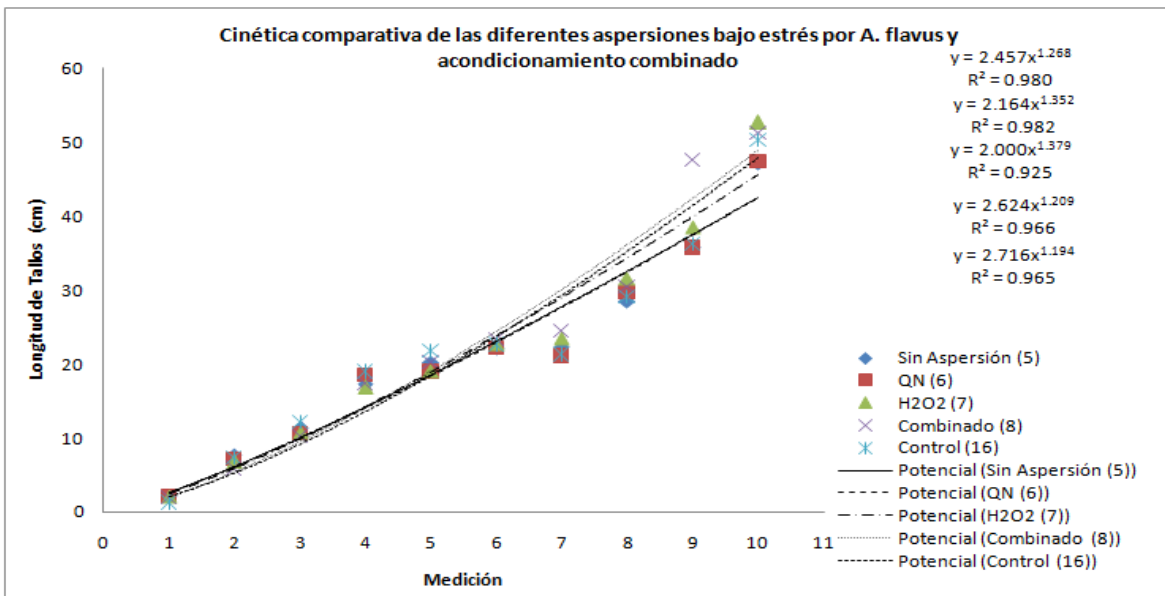


Gráfica 11. Cinética de la altura total de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p < 0.05$).

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

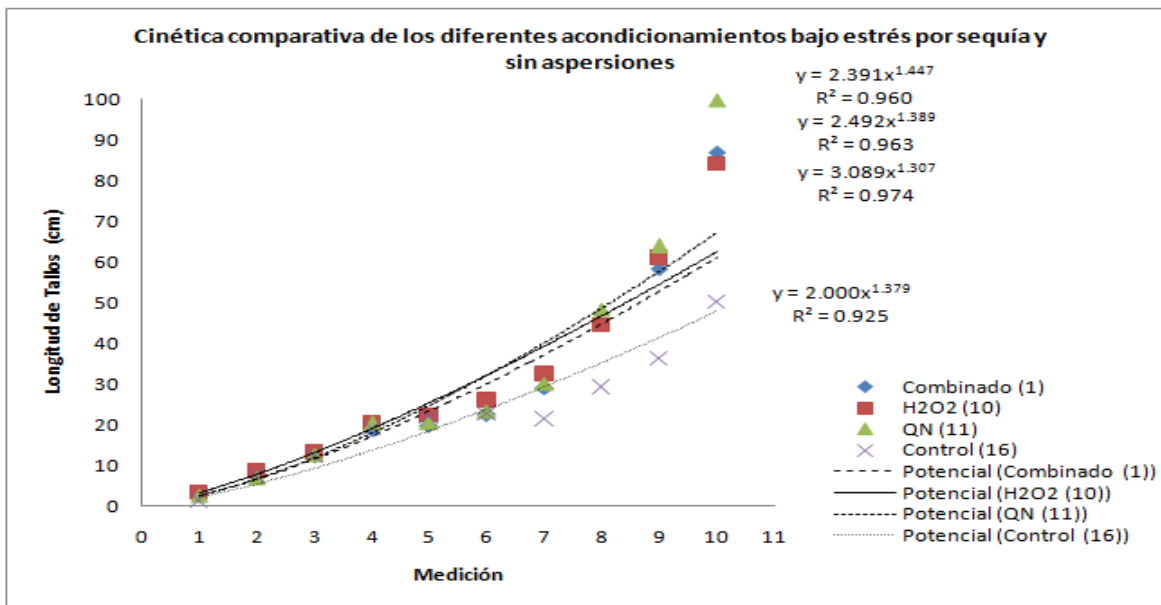


Gráfica 12. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p < 0.05$).

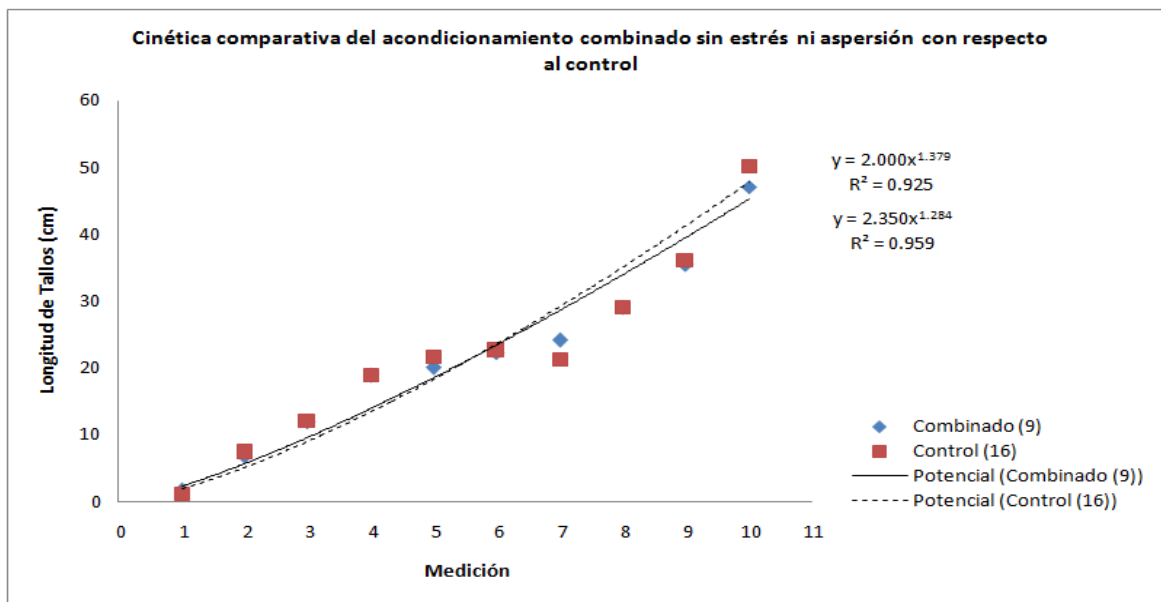


Gráfica 13. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p > 0.05$).

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

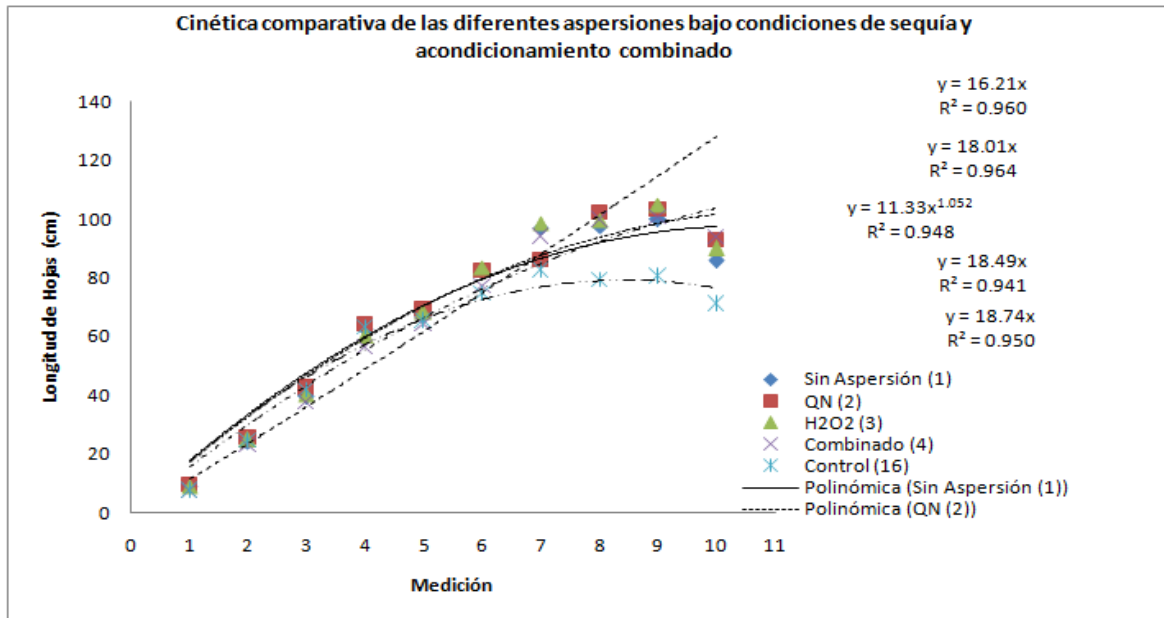


Gráfica 14. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersiones de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de las diferentes soluciones ($p < 0.05$).

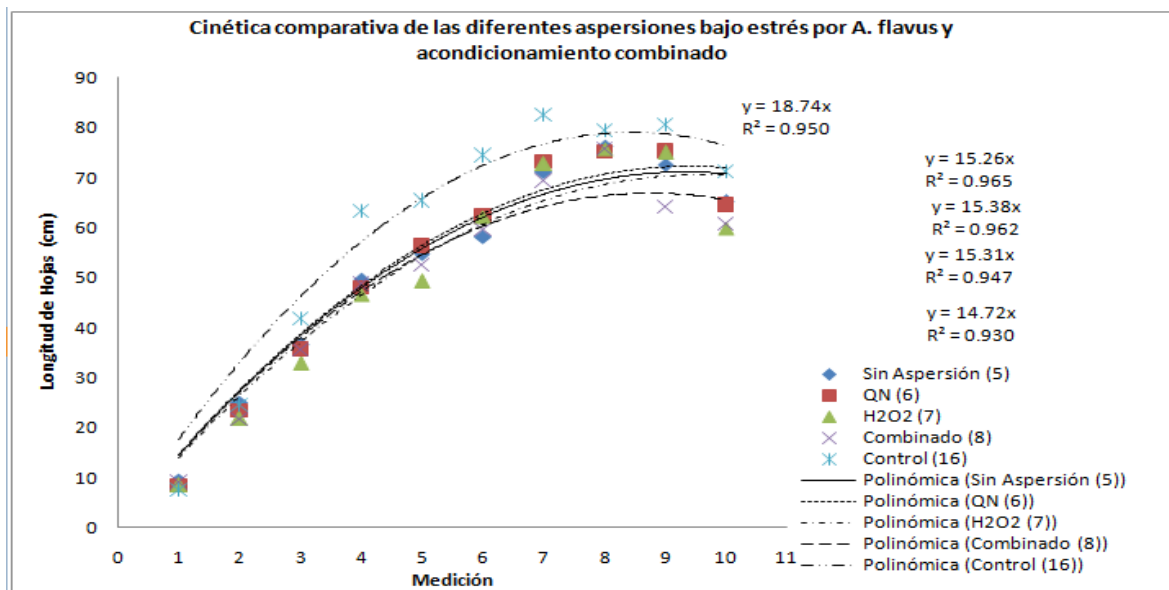


Gráfica 15. Cinética de la altura de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersiones combinadas, sometidas a los diferentes estreses ($p < 0.05$).

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

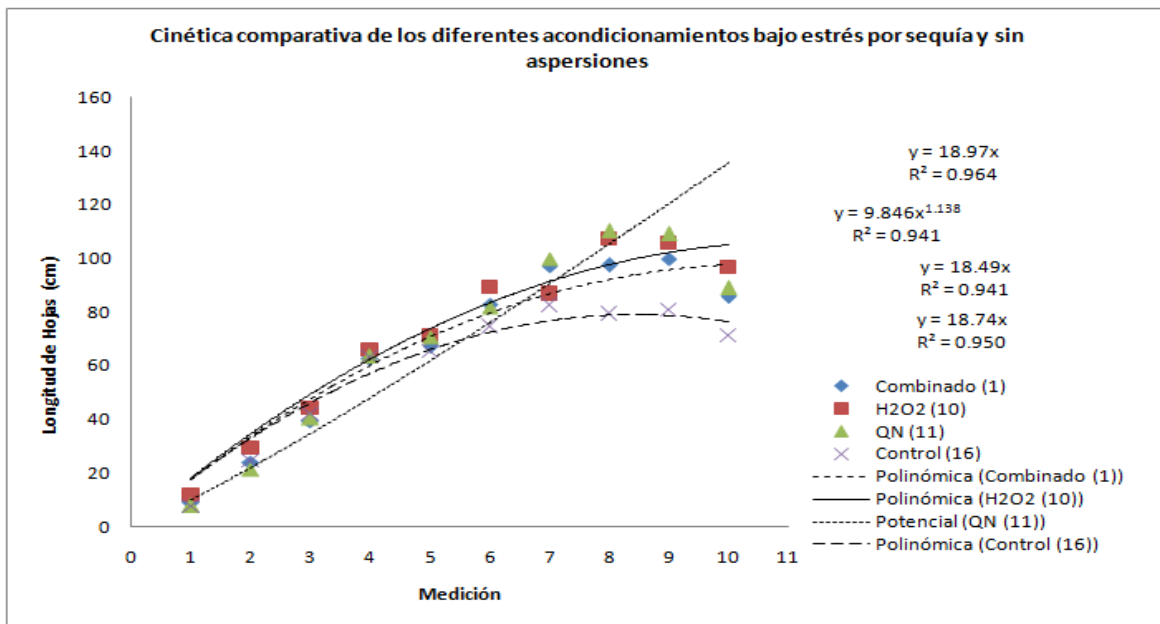


Gráfica 16. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p < 0.05$).

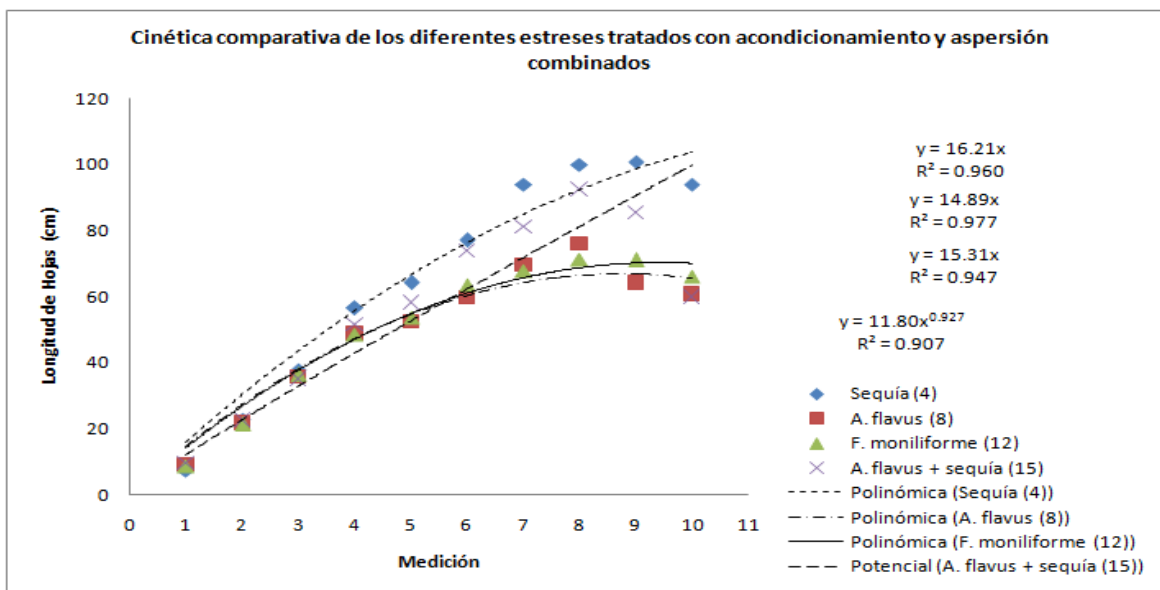


Gráfica 17. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por A. flavus y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p > 0.05$).

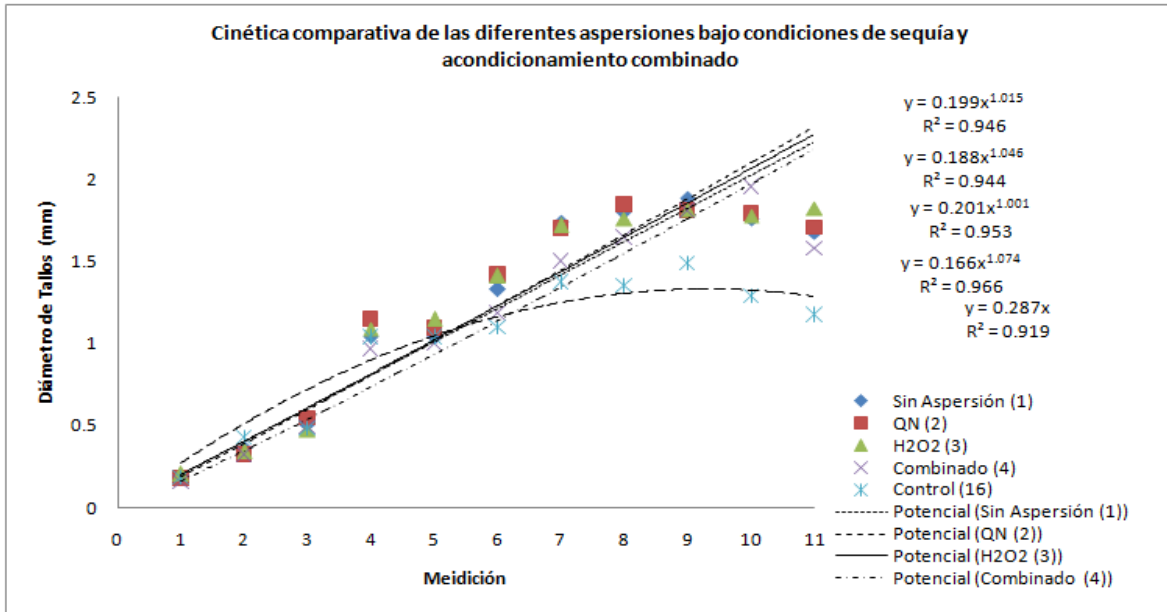
Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal



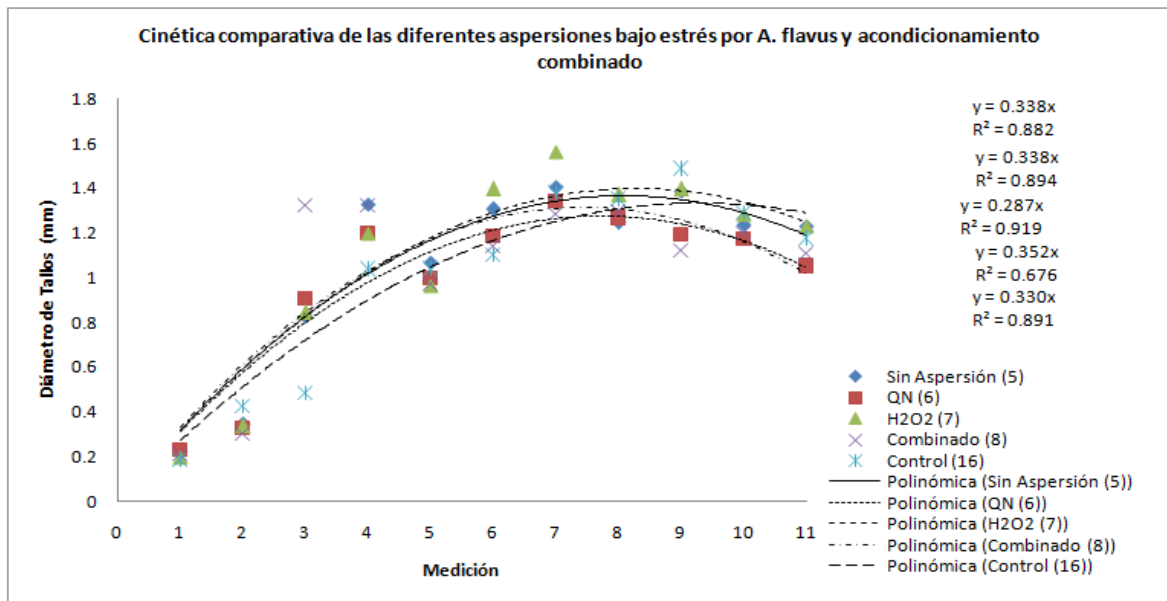
Gráfica 18. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de los diferentes elicitors ($p < 0.05$).



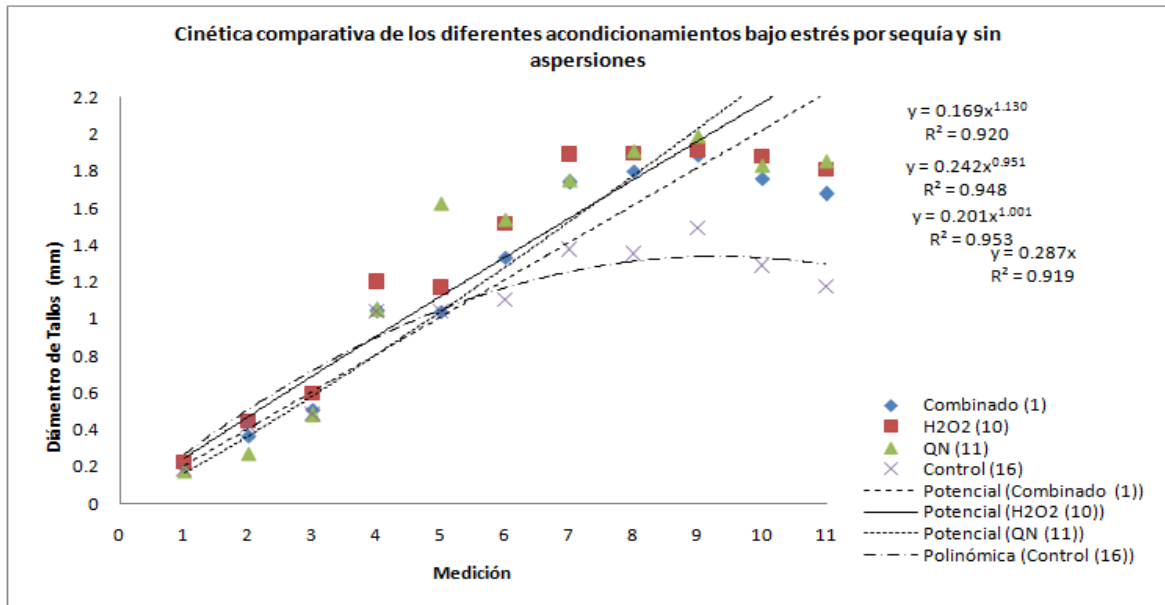
Gráfica 19. Cinética de la altura de hojas de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p < 0.05$).



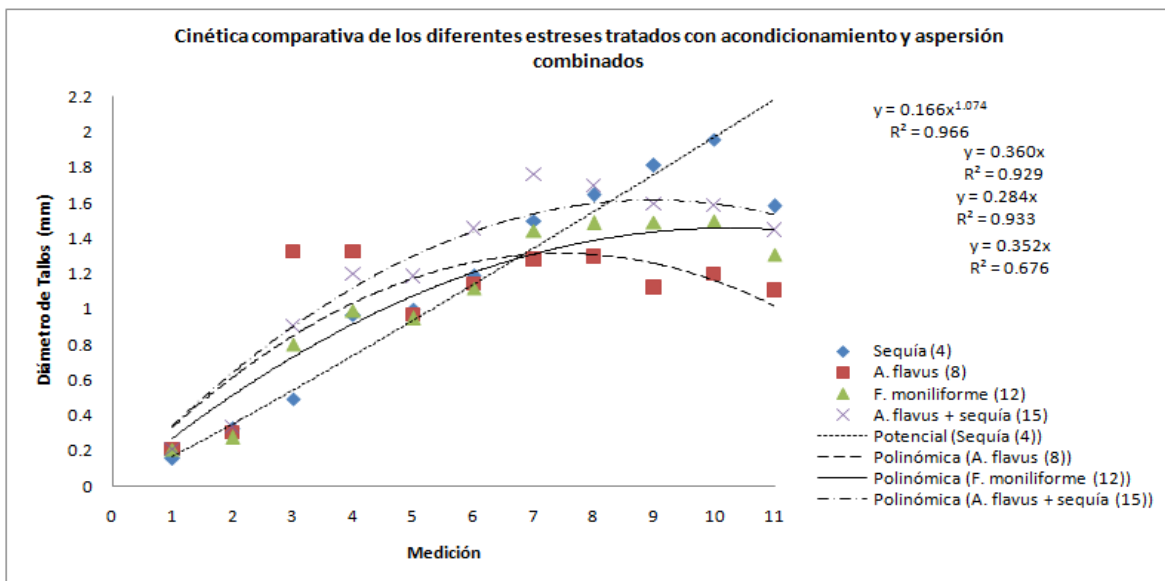
Gráfica 20. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p < 0.05$).



Gráfica 21. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por *A. flavus* y acondicionamiento combinado, sometido a aspersión con las diferentes soluciones ($p > 0.05$).



Gráfica 22. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal bajo estrés por sequía y sin aspersión de las soluciones a la plántula, con acondicionamiento de las diferentes soluciones ($p < 0.05$).



Gráfica 23. Cinética de los diámetros de tallos de las plántulas de maíz de variedad Normal con acondicionamiento combinado y aspersión combinada, sometidas a los diferentes estreses ($p < 0.05$).

6.3.5 EFECTO DEL QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE PLAGAS EN MAÍZ

Durante la décima semana de crecimiento de la planta, se registraron algunas irregularidades no previstas, pues a pesar de que el experimento fue montado en invernadero bajo condiciones mayormente controladas, en las plantas correspondientes a los grupos 1, 2, 3, 4, 10, 11, 15 y 18 (es decir, aquellos que fueron sometidos a condiciones de sequía), se observó la aparición de pequeños gusanos de color verde, de aproximadamente 0.5 cm diámetro los cuales se camuflaban fácilmente con el color de las hojas del maíz, situándose principalmente en el interior de la última hoja que había salido (hojas nuevas). Tal descripción corresponde a la del gusano cogollero, que es la larva de la palomilla nocturna *Spodoptera frugiperda*, considerada como la plaga más importante del maíz en México (Bayer Cropscience México, 2013).

En promedio se encontraron 5.3 gusanos por planta para aquellos tratamientos que involucraron la presencia de QN, sólo o en combinación, siendo significativamente menores que el resto de los tratamientos. En la onceava semana de crecimiento, se aplicó a las plantas la tercera aspersion de los tratamientos correspondientes a nivel foliar. Al llevar a cabo las observaciones pertinentes en la semana siguiente (semana doce), se registró un decremento significativo ($p=0.0088$) en la cantidad de gusanos, existiendo en promedio, para el caso de la aspersion con QN, 1.4 gusanos por planta (*Tabla 21*), los cuales prácticamente desaparecieron después de llevar a cabo la cuarta aspersion de los elicitors. Esto es indicativo de que la aplicacion foliar de QN, solo o en combinacion, actúa como plaguicida sobre esta la plaga del gusano cogollero. Después de la semana catorce, los gusanos se convirtieron en palomillas de *Spodoptera frugiperda*, los cuales no representaron una amenaza significativa para el cultivo debido a la escasa cantidad de insectos desarrollados. Algunas hojas de las plantas sometidas a sequía presentaron daños mecánicos por acción del ataque del insecto.

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

Grupo	Variedad	Estrés	Tratamiento (acondicionamiento/aspersión)	# de Gusanos Cogolleros			
				Semana 10	Semana 12		
1	Normal	Sequía	Combinado/sin	5.666 ± 1.47 a	1.000 ± 0.54 a*		
2			Combinado/QN	6.666 ± 1.47 a	0.666 ± 0.54 a*		
3			Combinado / H ₂ O ₂	6.666 ± 1.47 a	1.666 ± 0.54 a*		
4			Combinado / Combinado	3.666 ± 1.47 a	2.000 ± 0.54 a		
10			H ₂ O ₂ / sin	13.000 ± 1.47 b	11.66 ± 0.54 b		
11			QN/sin	5.000 ± 1.47 a	1.333 ± 0.54 a*		
15			A.flavus+Sequía	Combinado / Combinado	4.000 ± 1.47 a	2.333 ± 0.54 a	
18			QPM	A.flavus+Sequía	Combinado / Combinado	6.000 ± 1.47 a	0.666 ± 0.54 a*

Tabla 21. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la plaga de gusano cogollero en las plantas de maíz. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos por cada semana. Los asteriscos sobre la columna derecha indican diferencia significativa del número de gusanos presentes en la semana 12 con respecto a la semana 10.

6.3.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales fue la única prueba bioquímica llevada a cabo en esta fase experimental, por ser la única que arrojó resultados estadísticamente significativos en el experimento conducido sin estrés. De acuerdo al análisis, se encontró que no existe diferencia significativa en cuanto al porcentaje de nitrógeno total presente en los maíces sometidos a los diferentes estreses y tratamientos, lo cual se ve reflejado en una nula diferencia significativa entre la cantidad de proteínas presentes en la planta en función del tratamiento y el estrés aplicado (Tabla 22). Con respecto a la relación acondicionamiento/aspersión-proteína, independientemente del estrés aplicado ($p=0.1720$), los resultados aquí difieren con los encontrados en el experimento conducido sin estrés, ya que en aquel experimento se reportó que la presencia de QN ó H₂O₂ incrementaba la cantidad de proteína en la plántula.

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitores en plántulas de maíz para consumo animal

Variedad	Estrés	Tratamiento (acondicionamiento/aspersión)	Contenido de Proteína f(%N)
Normal	Sequía	Combinado/sin	2.748 ± 0.598 a
	Sequía	Combinado/QN	2.224 ± 0.598 a
	Sequía	Combinado / H ₂ O ₂	1.649 ± 0.598 a
	Sequía	Combinado / Combinado	3.054 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i>	Combinado / sin	2.964 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i>	Combinado / QN	2.519 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i>	Combinado / H ₂ O ₂	2.314 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i>	Combinado/ Combinado	2.086 ± 0.598 a
	Sin estrés	Combinado / sin	3.421 ± 0.598 a
	Sequía	H ₂ O ₂ / sin	2.538 ± 0.598 a
	Sequía	QN/sin	2.267 ± 0.598 a
	<i>F. moniliforme</i>	Combinado / Combinado	2.611 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i>	H ₂ O ₂ / Combinado	2.060 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i>	QN / Combinado	2.784 ± 0.598 a
	<i>A. flavus</i> +Sequía	Combinado / Combinado	1.645 ± 0.598 a
	Sin estrés	Sin / sin	2.215 ± 0.598 a
QPM	<i>A. flavus</i>	Combinado / Combinado	1.704 ± 0.577 a
	<i>A. flavus</i> +Sequía	Combinado / Combinado	3.121 ± 0.577 a
	Sin estrés	Sin / sin	3.713 ± 0.577 a

Tabla 22. Efecto del estrés, del acondicionamiento de las semillas y de la aspersión de las plántulas con QN, H₂O₂ y la combinación de ambos sobre el porcentaje de Nitrógeno contenido (cuantificación indirecta de proteínas) en las plantas en su fase reproductiva. Los valores son expresados como la media ± error estándar. Las letras diferentes que siguen a los valores, indican diferencia significativa ($p=0.05$, Tukey) entre tratamientos de la misma variedad.

6.3.7 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL GRANO

Previo a la cosecha de las mazorcas, se llevó a cabo el conteo de las inflorescencias femeninas presentes en cada una de las plantas y se clasificaron en función del llenado de grano como se indica en la *Tabla 23*. La cantidad de inflorescencias femeninas presentes en los grupos sometidos a los diferentes estreses y tratamientos fue muy variable. Llama la atención la cantidad de inflorescencias existentes sin grano, lo cual puede deberse a la aplicación de los diversos tratamientos, o bien, a algún desvío metabólico causado por la naturaleza del propio maíz por tratarse de una especie mejorada. Se observa que el Grupo

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

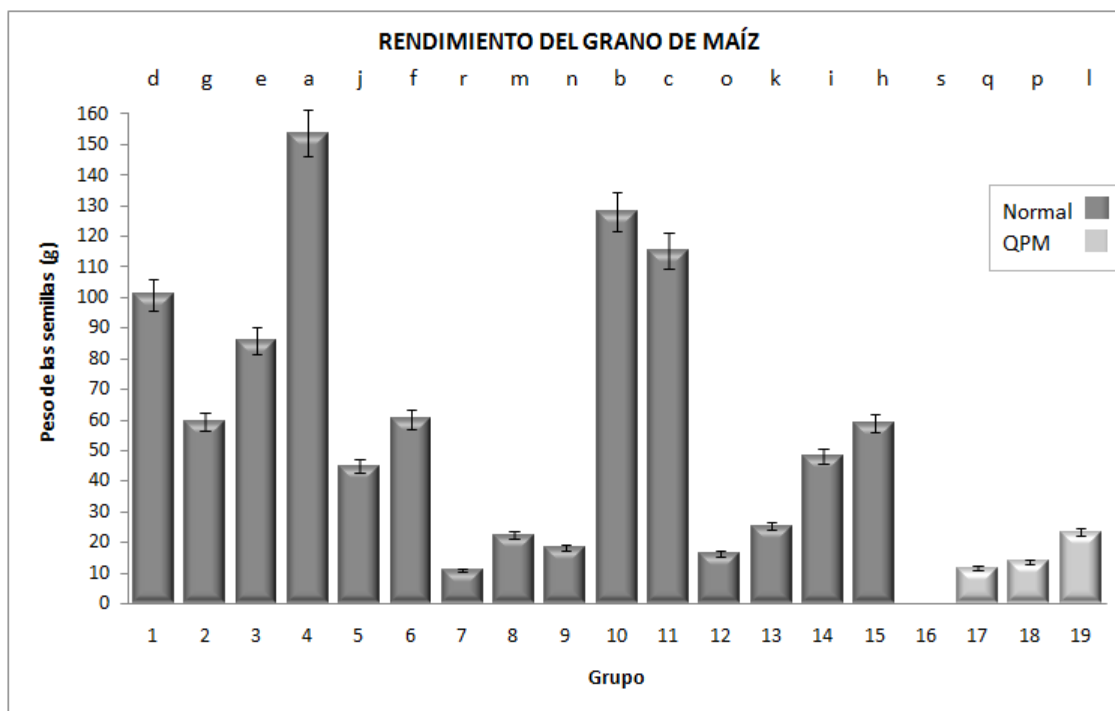
16, correspondiente al control de variedad normal, presenta siete inflorescencias, de las cuales, ninguna desarrolló granos. Es probable que la presencia de estrés en los cultivos de maíz favorezca el desarrollo de los granos para la formación de mazorcas, pues como aquí se observa, para la variedad normal, el resto de los grupos sometidos a estrés o a la presencia de recubrimientos y/o aspersiones, se genera una mayor cantidad de grano. En cuanto a las inflorescencias femeninas de la variedad QPM, solo se presentan estructuras o totalmente llenas de grano o totalmente vacías, sin diferencias aparentes entre los grupos evaluados.

Grupo	Variedad	Estrés	Tratamiento (acondicionamiento/aspersión)	# de Inflorescencias Totales	Llenado de mazorcas (%)			
					0%	0<x<50%	50<x<100%	100%
1	Normal	Sequía	Combinado/sin	11	54.5	9.1	0	36.4
2		Sequía	Combinado/QN	12	50	16.7	25	8.3
3		Sequía	Combinado / H ₂ O ₂	9	44.5	22.2	22.2	11.1
4		Sequía	Combinado / Combinado	12	50	0	25	25
5		A. flavus	Combinado / sin	18	66.6	16.7	0	16.7
6		A. flavus	Combinado / QN	15	73.4	13.3	0	13.3
7		A. flavus	Combinado / H ₂ O ₂	14	85.8	7.1	7.1	0
8		A. flavus	Combinado/ Combinado	15	73.3	13.4	6.6	6.7
9		Sin estrés	Combinado / sin	8	62.5	12.5	122.5	12.5
10		Sequía	H ₂ O ₂ / sin	8	0	37.5	12.5	50
11		Sequía	QN/sin	10	40	20	0	40
12		F. moniliforme	Combinado / Combinado	12	83.4	8.3	8.3	0
13		A. flavus	H ₂ O ₂ / Combinado	10	70	20	0	10
14		A. flavus	QN / Combinado	22	77.3	13.7	4.5	4.5
15		A.flavus+Sequía	Combinado / Combinado	11	36.4	27.3	27.3	9
16		Sin estrés	Sin / sin	7	100	0	0	0
17	QPM	A. flavus	Combinado / Combinado	10	90	0	0	10
18		A.flavus+Sequía	Combinado / Combinado	12	91.7	0	0	8.3
19		Sin estrés	Sin / sin	3	66.7	0	0	33.3

Tabla 23. Cuantificación de inflorescencias femeninas en las plantas de maíz previo a la cosecha. Las últimas 4 columnas muestran el porcentaje de llenado de mazorcas en función del número de inflorescencias totales por grupo (considerado como el 100%); en donde 0% se refiere a inflorescencias sin grano, 0<x<50% se refiere a inflorescencias con poco grano, 50<x<100% se refiere a inflorescencias con abundante grano, y 100% se refiere a inflorescencias totalmente llenas de grano.

El rendimiento se determinó de acuerdo a la cuantificación en peso de los granos de maíz obtenidos para cada uno de los grupos. Estos resultados se resumen en la *Gráfica 24*, en

donde se observa también que el grupo 16 no produjo granos, lo cual llama la atención pues al ser un control negativo se esperaría que las inflorescencias femeninas produjeran semillas abundantes.



Gráfica 24. Rendimiento de los granos de maíz provenientes de las mazorcas obtenidas después del acondicionamiento de las semillas y la aspersión de las plántulas con QN, H₂O₂ y la combinación de ambos bajo condiciones de estrés por *A. flavus*, *F. moniliforme* o sequía. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey) entre los distintos grupos.

Los grupos 4, 10 y 11 fueron los que produjeron una mayor cantidad de grano. Estos tres tratamientos corresponden a la variedad normal y se encuentran bajo condiciones de sequía; no obstante, tienen distintos acondicionamientos y aspersiones, lo cual indica que el H₂O₂ y el QN no tienen influencia sobre la producción de semilla bajo condiciones de estrés. Los grupos 17, 18 y 19, así como el 7 y el 12, fueron los que generaron menos

granos. Los tres primeros corresponden a variedad QPM, mientras que el 7 se trata de una variedad normal. Los resultados obtenidos para los tratamientos 17, 18 y 19 sugieren que los semillas de variedad QPM generan escasos granos pese a la cantidad de inflorescencias que desarrollan, mientras que el 7 y el 12 no presentan características en común. Todos los pesos registrados son estadísticamente distintos al compararse con el resto de los grupos cuantificados.

6.4 DETECCIÓN DE GENES MODIFICADOS EN SU EXPRESIÓN COMO CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE QUITOSÁN Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.

6.4.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS MICROARREGLOS

La *Tabla 24* muestra la cantidad de genes sobreexpresados y silenciados bajo los diferentes acondicionamientos a los cuales fue sometido la semilla. Los porcentajes presentados en la tabla están calculados en base al total de genes contenidos en los chips (60,000 genes). De acuerdo a los resultados obtenidos, se tiene que es mayor la cantidad de genes que se sobreexpresan que los que se silencian. Las medias de la cantidad de genes modificados en su expresión con respecto al tratamiento no son significativas.

SOBREEXPRESADOS			SILENCIADOS		
ACONDICIONAMIENTO	TOTAL DE GENES	% DE GENES	ACONDICIONAMIENTO	TOTAL DE GENES	% DE GENES
QN	1584	2.64 %	QN	1168	1.95 %
H ₂ O ₂	1576	2.63 %	H ₂ O ₂	1177	1.96 %
Combinado	1537	2.56 %	Combinado	1151	1.92 %

Tabla 24. Cantidad de genes de maíz sobreexpresados y silenciados bajo los acondicionamientos con QN, H₂O₂ y la combinación de ambos.

Debido a que la media de genes sobreexpresados para los tres acondicionamientos (tratamientos) es de 1566 genes, y la media de genes silenciados para los tres tratamientos es de 1165 genes, existe la posibilidad de que un mismo gen se sobreexpresase o silencie bajo cualquiera de los acondicionamientos, o bien, que su respuesta sea compartida por al menos dos tratamientos. Por esta razón, es que se hizo un nuevo análisis de los genes el cual se presenta en la *Tabla 25*, en donde se muestran los genes sobreexpresados y silenciados en común bajo los distintos tratamientos. La *Figura 3* muestra, mediante diagramas de Venn, una vista general de la influencia del acondicionamiento de las semillas con QN, H₂O₂ y la combinación de ambos sobre las plántulas de maíz, representando los genes sobreexpresados o silenciados, comunes o distintos de acuerdo a los diferentes tratamientos aplicados.

SOBREEXPRESADOS		SILENCIADOS	
ACONDICIONAMIENTO	# de GENES INVOLUCRADOS	ACONDICIONAMIENTO	# de GENES INVOLUCRADOS
QN / H ₂ O ₂	194	QN / H ₂ O ₂	100
QN / Combinado	91	QN / Combinado	74
H ₂ O ₂ / Combinado	348	H ₂ O ₂ / Combinado	169
QN / H ₂ O ₂ / Combinado	71	QN / H ₂ O ₂ / Combinado	63

Tabla 25. Cantidad de genes de maíz que se sobreexpresan y silencian en común bajo distintos tratamientos.

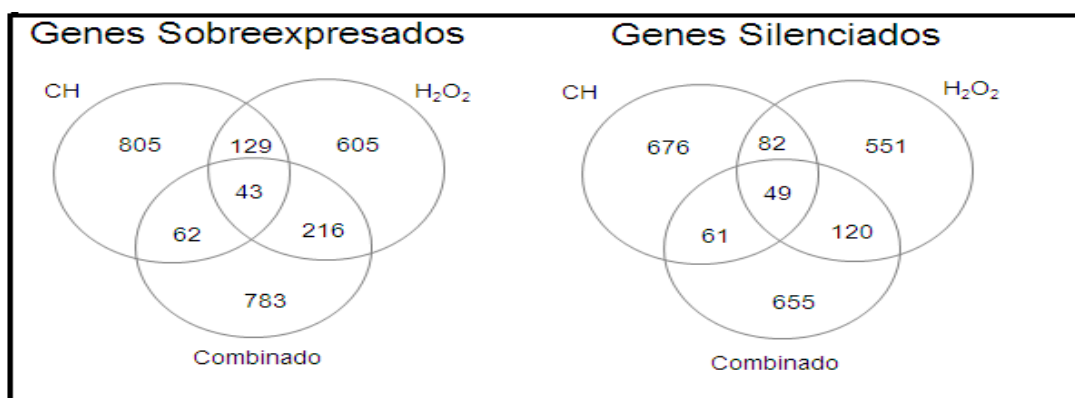


Figura 3. Representación mediante diagramas de Venn de los genes sobreexpresados o silenciados comunes o distintos de acuerdo a los diferentes tratamientos aplicados.

Algunas características y la identidad de los genes que fueron sobreexpresados y silenciados como consecuencia de los distintos tratamientos se presentan en el *Anexo 9.4*. De esa lista, se decidió analizar únicamente a los genes sobreexpresados. Para resumir la información, se discriminaron aquellos genes cuya anotación no se reporta de manera concreta. De los genes restantes, se seleccionaron aquellos de los que ya han sido descritas algunas de sus características, de modo que pudieran darnos mayor información sobre los mecanismos de defensa en los que están involucrados, ya sea por la relación con las condiciones bióticas y abióticas de trabajo, o por la presencia enzimática despertada como consecuencia de los tratamientos aplicados. Por esta razón, se decidió averiguar la identidad de dichos genes y lo que sabe de ellos en las bases de datos públicas (NCBI, Kegg, MaizeGDB, PlantGDB), y así establecer la importancia de éstos en el presente experimento. Para ello, se buscó para cada uno de los genes de interés la caracterización de los productos génicos usando términos ontológicos.

En las *Tablas 26, 27, 28 y 29*, se resumen las características de los 21 genes seleccionados, su anotación correspondiente, su homología con otros organismos en los que también se han encontrado y la posible ruta metabólica de la cual forman parte.

La *Tabla 26* muestra una lista de nueve genes de importancia que son sobreexpresados en las plántulas de maíz como consecuencia del acondicionamiento previo de la semilla con QN. El gen AZM4_92566 se ha descrito como una proteína relacionada con la enfermedad; no obstante, no se tiene la anotación puntual de qué proteína específica es. La mayoría de las proteínas y enzimas relacionadas con la enfermedad participan de manera activa en las rutas de interacción planta-patógeno, las cuales pueden presentar varios tipos de asociaciones que dependen del contenido genético de cada organismo. Bajo condiciones naturales, las plantas interactúan con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas

GENES DE INTERÉS, SOBREENPRESADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON QN				
GEN	IDENTIFICACIÓN DEL MICROARREGLO	ANOTACIÓN (DESCRIPCIÓN)	ENCONTRADO TAMBIÉN EN	RUTA METABÓLICA EN LA QUE SE INVOLUCRA
AZM4_92566	TM00002537	Proteína relacionada con enfermedad	<i>Oryza sativa</i>	-Interacción planta-patógeno*
CD945891	TM00008088	Regulador de órganos florales	<i>Oryza sativa</i>	-Sin ontología
AZM4_105025	TM00046591	Proteína hidrofóbica inductora de sequía	<i>Oryza sativa</i>	-Componente celular*
TC236161	TM00041718	Regulador de órganos florales	<i>Oryza sativa</i>	-Sin ontología
TC233058	TM00040346	Proteína de imbibición de semillas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-Metabolismo celular
NP003439	TM00033879	Peroxidasa R15	Propio de <i>Zea mays</i>	-Reacciones de óxido-reducción en el metabolismo celular -Metabolismo de fenilalanina -Biosíntesis de fenilpropanoides
AW147037	TM00035565	Isosima 3 de catalasa (EC 1.11.1.6)	Propio de <i>Zea mays</i>	-Catabolismo de Peróxido de Hidrógeno
CF027523	TM00039799	Proteína de membrana peroxisomal	<i>Oryza sativa</i>	-Peroxisoma
AZM4_138810	TM00048177	Quitinasa (EC 3.2.1.14)	<i>Conus tulipa</i>	-Metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares -Biosíntesis de metabolitos secundarios

Tabla 26. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del tratamiento con QN. Las rutas metabólicas marcadas con (*) indican la probable ontología.

GENES DE INTERÉS, SOBREENPRESADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON H ₂ O ₂				
GEN	IDENTIFICACIÓN DEL MICROARREGLO	ANOTACIÓN (DESCRIPCIÓN)	ENCONTRADO TAMBIÉN EN	RUTA METABÓLICA EN LA QUE SE INVOLUCRA
NP003442	TM00013010	Peroxidasa R11	Propio de <i>Zea mays</i>	-Reacciones de óxido-reducción en el metabolismo celular -Metabolismo de fenilalanina -Biosíntesis de fenilpropanoides
CD944346	TM00008040	Proteína de resistencia a la enfermedad RPM1 homóloga	<i>Sorghum bicolor</i>	-Respuesta de defensa fisiológica -Interacción planta-patógeno
AW065936	TM00001152	Factor de transcripción de estrés térmico A3	<i>Lycopersicon peruvianum</i>	-Componente del núcleo celular (encontrado en citoplasma)
NP447091	TM00045342	Proteína semejante a resistencia a la oxidación	Propio de <i>Zea mays</i>	-Respuesta de defensa fisiológica
TC232735	TM00022862	Peroxidasa	<i>Nicotiana tabacum</i>	-Respuesta al estrés oxidativo

Tabla 27. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del tratamiento con H₂O₂.

GENES DE INTERÉS, SOBREENEXPRESADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO				
GEN	IDENTIFICACIÓN DEL MICROARREGLO	ANOTACIÓN (DESCRIPCIÓN)	ENCONTRADO TAMBIÉN EN	RUTA METABÓLICA EN LA QUE SE INVOLUCRA
AZM4_12342	TM00047270	Citocromo P-450 putativo inducible de elicitores	<i>Oryza sativa</i>	-Metabolismo de fenilpropanoides
CF024267	TM00039776	Peroxina PEX 14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-Peroxisoma
BG321159	TM00036480	Fenilalanina amonioliasa	Propio de <i>Zea mays</i>	-Ruta del ácido Shikímico
TC199346	TM00019543	Peroxidasa (EC 1.11.1.7)	Propio de <i>Zea mays</i>	-Metabolismo de fenilalanina -Biosíntesis de fenilpropanoides -Porfirina y metabolismo de la clorofila
BM500583	TM00005416	Beta 1,3-glucanasa putativa inducible de elicitores	<i>Oryza sativa</i>	-Metabolismo de carbohidratos
TC245959	TM00007434	Proteína semejante a peroxidasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-Respuesta al estrés oxidativo
AZM4_60495	TM00050565	Precursor de peroxidasa	<i>Medicago truncatula</i>	-Respuesta al estrés oxidativo

Tabla 28. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del tratamiento combinado.

GENES DE INTERÉS, SOBREEXPRESADOS EN COMÚN TANTO CON EL TRATAMIENTO DE QN COMO CON EL TRATAMIENTO COMBINADO				
GEN	IDENTIFICACIÓN DEL MICROARREGLO	ANOTACIÓN (DESCRIPCIÓN)	ENCONTRADO TAMBIÉN EN	RUTA METABÓLICA EN LA QUE SE INVOLUCRA
AZM4_138810	TM00048177	Quitinasa (EC 3.2.1.14)	<i>Conus tulipa</i>	-Metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares -Biosíntesis de metabolitos secundarios
GENES DE INTERÉS, SOBREEXPRESADOS EN COMÚN TANTO CON EL TRATAMIENTO DE H ₂ O ₂ COMO CON EL TRATAMIENTO COMBINADO				
GEN	IDENTIFICACIÓN DEL MICROARREGLO	ANOTACIÓN (DESCRIPCIÓN)	ENCONTRADO TAMBIÉN EN	RUTA METABÓLICA EN LA QUE SE INVOLUCRA
TC232735	TM00022862	Peroxidasa	<i>Nicotiana tabacum</i>	-Respuesta al estrés oxidativo

Tabla 29. Características de los principales genes de interés que se sobreexpresan como consecuencia de la aplicación del QN/tratamiento combinado y H₂O₂/tratamiento combinado.

debido a la manifestación de varios mecanismos de defensa. Se sabe que los genes que determinan la resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning, 1980). Esta determinación está íntimamente relacionada con las proteínas estructurales de la planta, las cuales son auxiliares en las inducciones de defensa y relacionadas con la presencia o ausencia de enfermedad (Midoh and Iwata, 1996).

El gen CD945891, sobreexpresado también en la plántula como producto del tratamiento de la semilla con QN, funge como regulador de órganos florales en la planta; no obstante, no se ha reportado su ontología correspondiente, por lo que hasta la fecha se desconoce a qué ruta metabólica podría pertenecer. Cabe mencionar que se ha encontrado que este gen también se sobreexpresa bajo condiciones de riego de recuperación, donde tampoco se ha reportado su ontología (Hayano-Kanashiro et al., 2009). Dicho gen es análogo al TC236161, sobreexpresado también como producto del tratamiento con QN, y cuya ontología tampoco ha sido elucidada. En los primeros estudios que se han realizado con respecto al proceso de floración, se ha empleado a *Arabidopsis thaliana* como modelo, mostrando que la floración es uno de los ejemplos más notables de los cambios que suceden durante el desarrollo programado en las plantas superiores, ya que antes de la diferenciación de los órganos florales, la planta requiere ciertos ajustes, algunos de los cuales se disparan por señales ambientales y otros se asocian con cambios estructurales y fisiológicos de la planta. La sincronización entre procesos convergentes como tiempo de floración y señales ambientales como el fotoperíodo y, entre el reloj circadiano y el desarrollo de los primordios florales, se genera un proceso complejo en la flor. Los cuatro verticilos (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) se forman sucesivamente gracias a la actividad de los meristemas, proceso que involucra el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de los órganos florales a partir de los meristemas reproductivos, como resultado de la expresión e interacción de muchas rutas genéticas y bioquímicas

relacionadas con la percepción y transducción de señales. Además, está involucrado en el proceso un grupo de genes que codifican factores de transcripción, encargados del control de la expresión de otros genes cuyos productos tienen funciones únicas en los órganos florales (Tofiño *et al.*, sa). El conocimiento de las bases moleculares y fisiológicas del proceso es fundamental para optimizar la inducción en especies con floración recalcitrante, asociada principalmente con la complejidad de la interacción entre los factores genéticos y ambientales, es por ello que se debe ampliar el estudio de este aspecto para poder elucidar de manera concreta las rutas metabólicas involucradas en este proceso.

El gen AZM4_105025, una proteína hidrofóbica inductora de sequía, se sobreexpresa también como consecuencia del tratamiento con QN. Al igual que la proteína relacionada con la enfermedad, esta proteína no está puntualmente definida. Existen algunos reportes en donde se ha “predicho” la existencia de este tipo de genes de naturaleza hidrofóbica en maíz, es decir, se han encontrado secuencias específicas para un gen determinado pero en las bases de datos públicas no existen pruebas fehacientes a nivel de proteínas y transcripción. Ontológicamente han sido definidas como componentes celulares, y se ha encontrado, por homología con otras proteínas, que son proteínas integrales de membrana que perforan al menos un fosfolípido de la bicapa de la membrana celular, o que incluso pueden estar incrustadas en la bicapa sin exponerse fuera de esta (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/B0FYH7>). Reportes específicos mencionan que las funciones de este tipo de proteínas no solo están relacionadas con la cantidad de mRNA presente, sino también con sus niveles traduccionales y postraduccionales, y se han encontrado numerosas discrepancias entre la cantidad de transcritos y sus proteínas respectivas en plantas estresadas por sequía.

El gen TC233058 es una proteína de imbibición de semillas que participa en el metabolismo celular y que es de gran importancia para la germinación y emergencia de las plántulas (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9FVM2>). Se sabe que el primer paso para que se inicie la germinación es que la semilla entre en contacto con el agua la cual es fundamental para que la semilla se rehidrate y exista un medio acuoso donde los procesos enzimáticos puedan llevarse a cabo. Los factores que deben tomarse en cuenta al analizar el proceso de absorción (imbibición) de agua por parte de la semilla son la relación semilla-agua y la relación semilla-sustrato. La cantidad de agua que absorbe y la velocidad con que lo hace están determinadas por procesos físicos de difusión y por las propiedades de los coloides. El agua tiene que atravesar una membrana permeable, la cual presenta una alta concentración de sustancias en uno de los lados. Las moléculas del solvente penetran a la sustancia que se está hinchando o imbibiendo, ocupando los espacios capilares e intermicelares del coloide. En las semillas, el principal componente que se imbibido de agua son las proteínas así como los mucílagos y la celulosa. La hidratación de una semilla se produce en tres fases. En la fase I se lleva a cabo la absorción inicial del agua (imbibición) y es consecuencia de las membranas celulares y de las fuerzas ejercidas por los contenidos; ocurre tanto si la semilla está viable como si no lo está, si está latente o no. Es independiente de la actividad metabólica de la semilla, aunque ésta se inicia rápidamente con la entrada del agua. La fase II corresponde a un periodo de rezago. Las semillas muertas y las latentes mantienen este nivel de hidratación. Para las semillas latentes y no latentes es un periodo de metabolismo activo que prepara la germinación y para las muertas es un periodo de inercia. La fase III está asociada con la germinación y sólo la presentan las células viables, no latentes. Durante esta fase hay actividad metabólica, incluyendo el inicio de la movilización de las reservas almacenadas. La superficie de la semilla que está en contacto con el suelo también afecta la capacidad de absorción de ésta. Mientras mayor es el contacto, más cantidad de agua

puede ser absorbida. Por lo tanto, el tamaño y la estructura de la cubierta de la semilla son factores determinantes, al igual que la microtopografía del suelo. Desde la perspectiva de una semilla, la estructura del suelo es sumamente heterogénea. Así, no todas las posiciones de una semilla hacen buen contacto con las partículas del suelo, ni tienen acceso a suficiente humedad para germinar. Conforme se incrementa el contacto de la semilla con el suelo, aumenta la velocidad con que ésta se hidrata y por tanto la germinación se lleva a cabo más rápidamente. La imbibición de las semillas se determina también en función de su morfología. En algunas especies, la entrada principal de agua es por el micrópilo (zona donde la testa es más delgada), más que por toda la superficie de la testa. En semillas de testa dura e impermeable, mientras no se perfore la testa, el agua no puede penetrar y por lo tanto las semillas permanecen latentes. En algunas de las leguminosas es necesario remover una protuberancia que funciona como una especie de tapón, llamada estrofiolo. Se ha visto que numerosos haces vasculares desembocan en este punto, por lo que una vez roto o removido el estrofiolo, es un canal de entrada importante de agua (Moreno-Casasola, 2003). La activación de esta proteína de imbibición de las semillas mediante el acondicionamiento con QN justificaría el hecho de que las semillas presentaran un mayor índice de germinación que las semillas control, ya que el biopolímero, por sus características higroscópicas, le confiere a la semilla una mayor captación de agua; de ahí la importancia del estudio de dicha proteína como promotor de germinación y desarrollo de plántulas.

El gen NP003439 (Peroxidasa R15) también se sobreexpresa como producto del tratamiento con QN. La peroxidasa R15 se ha encontrado únicamente en la especie *Zea mays*, por lo que se hace referencia a ella como ZmPrx15. Esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y oxidar diversos sustratos. Esta función bioquímica le confiere un papel importante en muchos procesos biológicos diferentes como

mecanismo de defensa, respuesta inmune y patogenicidad (PeroxiBase, 2013: http://peroxibase.toulouse.inra.fr/browse/process/view_perox.php?id=183; UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9ZTT1>). Esta peroxidasa se encuentra en todos los tejidos de la planta de maíz, y pertenece a las peroxidases de Clase III (E.C. 1.11.1.7), que son glicoproteínas que contienen el grupo prostético hemo, un complejo formado entre un ión de hierro y una molécula de protoporfirina IX. Participa en un amplio rango de procesos fisiológicos debido a su alto número de isoformas y a la regulación tan heterogénea de su expresión. Además, esta enzima multifuncional participa en la biosíntesis de la pared celular por la polimerización del alcohol cinámico a lignina y el entrecruzamiento de proteínas estructurales (Hiraga *et al.*, 2001) y en el mecanismo de defensa por daño físico o tejidos infectados (Biles and Martin, 1993) entre otros procesos. Enzimas como la ZmPrx15 se encuentran altamente conservadas tanto entre genes parálogos como ortólogos. Nuevas estrategias como la denominada Prx-profiling han sido utilizadas para mapear nuevos marcadores homólogos a Prxs en el genoma del maíz. Gracias al empleo de estas nuevas estrategias, se han conseguido mapear un gran número de genes de Prx en los genomas de distintos cereales, como por ejemplo, la cebada, mapeando hasta un 95% de los clusters reales del cereal (González-Fernández *et al.*, 2012). La ZmPrx15, como las demás peroxidases de Clase III, es capaz de regular los niveles de H₂O₂ mediante dos ciclos alternativos. En el ciclo peroxidativo, estas enzimas catalizan la reducción de H₂O₂ acoplada a la oxidación de varios sustratos, tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina o auxina. En el ciclo hidroxílico alternativo generan ROS, principalmente radicales hidroxilo (OH•) o hidroperóxidos (HOO•), que tienen actividad propia o actúan como parte de una vía de transducción de señal. Numerosos estudios han demostrado la participación de las Prxs en la defensa frente a infección patógenos en diversas especies vegetales y por ello han sido clasificadas dentro de la familia PR-9 de proteínas implicadas en patogénesis (Simonetti, 2009);

además participan en procesos como el metabolismo de fenilalanina y la biosíntesis de fenilpropanoides, de ahí la importancia de la sobreexpresión de las mismas en el cultivo del maíz. De manera análoga, se encontró que el tratamiento de las semillas con H₂O₂ (Tabla 27), promueve la sobreexpresión en las plántulas del gen NP003442 (Peroxidasa R11), que al igual que la ZmPrx15, se ha encontrado únicamente la especie *Zea mays*, por lo que se hace referencia a ella como ZmPrx11 (PeroxiBase, 2013: http://peroxibase.toulouse.inra.fr/browse/process/view_perox.php?id=184; UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9ZTS4>). Su función es exactamente la misma que para la ZmPrx15, y lo que cambia en ella es su secuencia de nucleótidos y aminoácidos.

La isosima 3 de catalasa (EC 1.11.1.6) describe al gen AW147037, que se sobreexpresa también como consecuencia del tratamiento previo con QN. Esta isosima es específica de *Zea mays*, y no existe evidencia de su manifestación en ninguna otra especie. Su existencia ha sido evidenciada a nivel de transcrito. Se ubica en las mitocondrias de las células de hojas mesófilas, en el pericarpio, en las raíces de las plántulas y en los coleóptilos. Su función es la de proteger las células de la planta de los efectos tóxicos del H₂O₂. Sus niveles son más altos en los periodos de luz y más bajos en los periodos de oscuridad, por lo tanto, es importante en las reacciones químicas y las vías resultantes de la descomposición de H₂O₂ (catabolismo del H₂O₂) (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/P18123>).

Bajo el tratamiento con QN también se sobreexpresa el gen CF027523, siendo una proteína de membrana peroxisomal (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9FW35>). Este, al igual que el gen CF024267, una peroxina PEX 14 (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/B6TK69>),

sobreexpresada en la plántula como producto del tratamiento de la semilla con QN y H₂O₂ en combinación (*Tabla 28*), participan de manera importante en la ruta metabólica de los peroxisomas, la cual forma parte de los procesos celulares de transporte y catabolismo. Los peroxisomas son organelos citoplasmáticos esenciales muy comunes en forma de vesículas que contienen oxidasas y catalasas que juegan un papel importante en la señalización de óxido reducción y de homeostasis de lípidos. Los peroxisomas contribuyen a muchos procesos metabólicos cruciales, tales como la oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de lípidos de éter y la detoxificación de radicales libres. La biogénesis de los peroxisomas comienza con las peroxinas tempranas PEX3, PEX16 y PEX19, y proceden mediante diferentes pasos. La importación de proteínas de membrana a los peroxisomas necesita de la PEX19, que funciona como chaperona, para el reconocimiento, focalización e inserción mediante acoplamiento a PEX3 (Salceda-Sacanelles, 2008; Keeg, 2013). Las proteínas de la matriz son transportadas a través de cuatro etapas: son identificadas por un receptor citoplásmico que las guía a un sitio de anclaje en la membrana peroxisomal, después de su traslocación, el complejo se separa y el receptor regresa al citoplasma (Platta and Erdman, 2007). El complejo de anclaje de la maquinaria de importación en la membrana peroxisomal consiste de tres peroxinas: PEX13, PEX14 (sobreexpresada en el presente trabajo como producto del tratamiento con QN) y PEX17; que se piensa forman un poro transitorio en la membrana en el que PEX14 es el sitio de entrada del receptor al complejo. El mecanismo de translocación se desconoce, una vez que la proteína se libera en la matriz, PEX5 es translocado al citoplasma. Las proteínas de matriz en el citosol son reconocidas por señales de focalización peroxisomal (PTS por sus siglas en inglés) y transportadas al complejo de acoplamiento en la membrana peroxisomal. Las deficiencias de los peroxisomas conducen a enfermedades peroxisomales hereditarias graves, ocasionando incluso la muerte celular del organismo vegetal (Salceda-Sacanelles, 2008; Keeg, 2013: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?K13343).

El gen más representativo sobreexpresado como consecuencia del tratamiento con QN, solo o en combinación con H₂O₂ (Tablas 26 y 29), fue el AZM4_138810 (TM00048177), que es el responsable de la activación de quitinasas (quitinasa EC 3.2.1.14) (Metalife, 2013, http://www.metalife.com/PIR%20PSD/JC7335_42400), que también son producidas por algunos hongos e insectos de manera natural. En este caso, el gen sobreexpresado bajo esta condición es encontrado también en *Conus tulipa*, una especie de caracol marino cuya rádula consiste de dientes quitinosos variables en número, tamaño y forma (ubicados en la parte anterior de la faringe), y que sirven para la masticación de la comida; además, su forma de arpón es útil para inyectar a través de ellos potentes venenos que paralizan los sistemas nervioso y muscular de sus presas (López-Vera *et al.*, 2012).

De acuerdo a las bases de datos públicas, se sabe que la quitinasa EC 3.2.1.14 participa de manera importante en dos rutas metabólicas que se encuentran íntimamente relacionadas entre sí: la Biosíntesis de Metabolitos Secundarios y el Metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares (Keeg, 2013: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=1.0&query=EC+3.2.1.14&map=map00520&scale=1.0&auto_image=&show_description=show&multi_query=; http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=0.35&query=3.2.1.14&map=map01110&scale=0.35&auto_image=&show_description=hide&multi_query=&show_module_list=). La biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre como parte de la respuesta química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, induciendo la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003), mientras que el metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares pertenece propiamente al metabolismo de carbohidratos, que al involucrar varios azúcares en su ruta de conversión, se transforma en energía que requiere el organismo para desarrollar sus funciones. De igual manera, las quitinasas son capaces de erradicar plagas de cultivos, tanto hongos como insectos.

La *Tabla 27* muestra cuatro de los genes seleccionados que se sobreexpresan en las plántulas como consecuencia del tratamiento de las semillas con H₂O₂. Además de la Peroxidasa R11, de la cual se habló anteriormente, destaca también la sobreexpresión del gen CD944346, una proteína de resistencia a la enfermedad RPM1 homóloga, la cual es semejante a la encontrada en sorgo. Esta proteína está involucrada en las respuestas de defensa, es decir, participa en las reacciones que se desencadenan en respuesta a la presencia de un cuerpo extraño o la ocurrencia de una lesión, y que se traducen en la restricción de daños en el organismo atacado o la prevención o recuperación de la infección causada por el ataque (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9XEQ9>). La proteína de resistencia a la enfermedad RPM1 homóloga que más se ha estudiado ha sido la de *Arabidopsis thaliana*, y ha constituido la base para el estudio de esta proteína en otras especies. El entendimiento de la especificidad de resistencia a enfermedades en plantas se centra en la estructura y función de la Resistencia específica a patógenos (R) y sus productos génicos. Las proteínas R confieren resistencia a cepas de patógenos expresando una molécula que activa específicamente su acción. La clase más amplia de proteínas R contiene un sitio de unión a nucleótidos (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR), y se denomina NB-LRR (Dangl and Jones, 2001). La activación de NB-LRR puede incluir un gran cambio conformacional que conduce a la activación inducida por proximidad. Esto, a su vez, conduce a una serie de eventos celulares que forman colectivamente la respuesta de defensa que es capaz de detener el crecimiento de patógenos. La proteína RPM1 es una proteína NB-LRR que confiere el reconocimiento de las cepas bacterianas que expresan cualquiera de los dos genes efectores de tipo III divergentes, AvrRpm1 o avrB (Grant *et al.*, 1995). Estas dos proteínas efectoras de tipo III tienen la función de virulencia en los hospederos que carecen de RPM1. Se ha determinado que el reconocimiento de AvrRpm1 o AvrB por RPM1 puede ser la consecuencia de su acción en especies como *Arabidopsis thaliana*,

frijoles y guisantes (Dangl *et al.*, 1992; Hubert *et al.*, 2003). En el caso del maíz, el acondicionamiento de las semillas con H₂O₂ tiene como consecuencia la activación de la proteína de resistencia a la enfermedad RPM1, lo cual resulta prometedor para inducir en la plántula mecanismos de defensa contra ataque de patógenos, particularmente de bacterias que tienen por blanco a estos cultivos.

El tratamiento con H₂O₂ también favorece la sobreexpresión del gen AW065936, un factor de transcripción de estrés térmico A3 (HSFA3) que se ha evidenciado a nivel de transcrito. Esta proteína es un componente del núcleo celular cuya función molecular es la unión a DNA de secuencia específica (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/D1M7W9>). Los factores de transcripción de estrés térmico (HSFs por sus siglas en inglés), son los componentes terminales de una cadena de transducción de señales que median la activación de genes responsables del calentamiento y de un gran número de agentes químicos promotores de estrés. La expresión genética inducida por estrés permite una rápida acumulación de proteínas de estrés térmico (HSPs) que, al ser chaperones moleculares, juegan un rol fundamental no solo en la protección contra el daño por estrés, sino también en el plegamiento, la distribución intracelular y la degradación de proteínas (Agashe and Hartl, 2000; Jolly and Morimoto, 2000; Richter and Buchner 2001; Mishra *et al.*, 2013). Los genes inducibles promotores de estrés térmico en eucariotas comparten elementos de reconocimiento de Hsf (HSEs) con la secuencia de consenso palindrómica (AGAA_n)(nTTCT) (Pelham, 1982; Pelham and Bienz 1982; Nover, 1987). Al igual que otros factores de transcripción, los HSFs tienen una estructura nodular con un dominio de enlace DNA N-terminal caracterizado por una secuencia hélice-giro-hélice, un dominio de oligomerización adyacente con un patrón de repetición bipartita de siete residuos de aminoácidos (regiones HR-A/B), otras secuencias esenciales para importación y exportación nuclear (NLS, NES) y dominios de activación ácida C-terminales (Wu, 1995; Morimoto, 1998;

Heerklotz *et al.*, 2001; Nover *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2013). En plantas, existen dos clases distintas de HSFs, las cuales difieren de su estructura en sus dominios de oligomerización así como en sus dominios de activación C-terminales (CTAD). Los de clase A se caracterizan por la inserción de residuos de 21 aminoácidos en el dominio de oligomerización y en el CTAD ácido; mientras que los de clase B no se insertan y el CTAD es neutral o de carga positiva. Para su función activadora, en plantas de tomate se han identificado dos pequeños motivos peptídicos con un residuo central de triptófano, conocidos como HSFA1 y HSFA2, que se expresan como consecuencia del estrés térmico provocando cambios dinámicos a nivel celular y promoviendo la localización intracelular entre otras funciones. No obstante, en el año 2000 se caracterizó en tomate la HSFA3, la cual también se sobreexpresó en las plántulas de maíz del presente trabajo como consecuencia del tratamiento previo de las semillas con H₂O₂. Esta es una proteína expresada constitutivamente y que ha demostrado tener un alto potencial activador cuando se emplea con construcciones reporteras HSF dependientes en protoplastos de tabaco y levaduras, incluyéndose como un miembro más de HSFs en cultivos comestibles (Bharti *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2013).

La sobreexpresión del gen NP447091 también se logra mediante el tratamiento con H₂O₂. Este gen es una proteína semejante de resistencia a la oxidación, y que se ha identificado como propia del maíz. Esta proteína se involucra en la respuesta de defensa de la planta y su función molecular es la unión a ADP's, interactuando selectivamente y de forma no covalente con ADP, y adenosin 5'-difosfato (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8S458>). Su mecanismo de acción aún no ha sido completamente elucidado.

El gen más representativo sobreexpresado como consecuencia del tratamiento con H₂O₂, solo o en combinación con QN (*Tablas 26 y 29*), fue el TC232735 (TM00022862), el cual es el responsable de la activación de peroxidasas, que son enzimas muy extendidas en toda la escala filogenética, pertenecientes a la categoría de las oxidoreductasas, y producidas tanto por vegetales como por animales y microorganismos de manera natural. En este caso, el gen sobreexpresado bajo esta condición es encontrado también en *Nicotiana tabacum*, conocida también como tabaco de Virginia, petén o hierba santa, siendo la única especie, dentro de 50 existentes, que no ha sido hallada en estado silvestre (Solórzano *et al.*, 2004). Las peroxidasas de plantas se caracterizan porque constan de un gran número de isoenzimas en una sola especie. En plantas de *Nicotiana tabacum*, se han detectado 12 isoenzimas de peroxidasas, todas ellas presentes en la raíz, 8 presentes en la médula del tallo y 5 presentes en la hoja, las cuales se activan en respuesta al daño mecánico a excepción de 2 isoenzimas de la hoja que se activan por infección, con lo que se sabe que las peroxidasas se activan con distintos estímulos, por lo cual se consideran importantes en el crecimiento y defensa de la planta, y por lo que se sugiere que la amplificación y modificación estructural de los genes peroxidasa (POD) pudo haber sucedido repentinamente en el genoma de la planta durante su evolución (Lagrimini *et al.*, 1992; Hiraga *et al.*, 2001).

La *Tabla 28* muestra algunos de los genes sobreexpresados como producto del tratamiento combinado (QN/H₂O₂). El gen BG321159 fue expresado bajo este tratamiento, y corresponde a una fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual participa en la ruta del ácido shikímico, que a su vez se involucra en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Utiliza como sustratos la eritrosa-4-fosfato (de la vía de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenolpirúvico (proveniente de la glucólisis). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, de la que se deriva la mayoría de los fenoles. La

fenilalanina, un aminoácido esencial parte del metabolismo primario de las plantas y animales, entra al metabolismo secundario cuando la PAL cataliza la eliminación de un amonio convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico. La PAL está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides, siendo metabolitos de gran importancia que incluso se han estudiado para aplicaciones médicas y de autoprotección de la planta, por lo que es de especial interés que el tratamiento combinado aplicado en el presente trabajo, participe en la activación de esta enzima (Wink, 1999; Willians and Grayer, 2004; Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Este gen se relaciona con el AZM4_12342, un citocromo P-450 putativo inducible de elicitors expresado también como consecuencia del tratamiento combinado (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q69P71>). A pesar de que no existen reportes de éste para maíz, se ha encontrado que el citocromo P-450 putativo inducible de elicitors está relacionado con el metabolismo de fenilpropanoides, los cuales le confieren a la planta diversas funciones fisiológicas acordes con perturbaciones ambientales, por lo que la mayor parte de los metabolitos secundarios son sintetizados a través de esta vía. Las reacciones básicas del metabolismo de fenilpropanoides involucran tres enzimas: PAL, cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y la 4-cumarato coenzima A ligasa (4CL) (Hahlbrock and Scheel, 1989). C4H constituye la familia CYP73 del gran grupo de monooxigenasas del citocromo P45 (Teutsch et al., 1993). Las monooxigenasas de las plantas del citocromo P450 (P450s), son proteínas hemo-unidas a la membrana, y son

miembros de la súper familia que cataliza una gran variedad de reacciones en el metabolismo secundario de la planta. La regulación de la síntesis de fenilpropanoides es de especial interés para su estudio por ser un modelo para el entendimiento del control de flujo bioquímico y porque permite la identificación de blancos de manipulación biotecnológica en la acumulación de productos fenólicos. El citocromo P450 al ser auxiliar en el desencadenamiento de rutas bioquímicas de señalización es capaz de inducir elicitors endógenos (Turgut-Kara, and Ari, 2011), siendo así importante para la activación de metabolitos secundarios indispensables para la defensa de las plantas, de ahí la importancia de la activación de este gen por efecto de la aplicación del recubrimiento combinado.

El gen BM500583, sobreexpresado en la plántula como consecuencia del tratamiento previo de la semilla con la combinación de QN/H₂O₂, corresponde a una Beta-1,3 glucanasa putativa inducible de elicitors. Su función molecular es una hidrolasa y participa en el proceso metabólico de carbohidratos (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZL97>). Este gen, integrante de la familia de las β -1,3 glucanasas (EC 3.2.1.39), ha sido investigado ampliamente debido a su extensa participación en la respuesta de defensa en vegetales, y se ha demostrado que se expresa coordinadamente junto con la quitinasa como consecuencia de la infección por patógenos, heridas, tratamiento con etileno y estrés químico. La co-inducción de quitinasas y β -1,3 glucanasas ha sido descrita en plantas de importancia alimentaria como los guisantes, frijoles, tabaco, tomates, maíz, soya, papa y trigo, entre otros.

El gen TC245959 es una proteína semejante a peroxidasa y se sobreexpresa como consecuencia del tratamiento de la semilla con H₂O₂. Esta proteína funciona como una oxidoreductasa perteneciente a la familia de las peroxidasas y se involucra en el proceso biológico de respuesta al estrés oxidativo (UniProt Database, 2013:

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q56YT4>). Esta es la misma función que posee el gen AZM4_60495, un precursor de peroxidasa sobreexpresado también en maíz (UniProt Database, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q40372>). Ambos se involucran en todos aquellos procesos que resultan en un cambio en el estado o la actividad de una célula o de la plántula en sí misma (en términos de movimiento, la secreción, la producción de enzimas, la expresión génica, etc.) como resultado de estrés oxidativo como resultado de la exposición a niveles altos de las especies reactivas de oxígeno, tales como los aniones superóxido, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los radicales hidroxilo, y cuya importancia ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo. De igual forma, el tratamiento combinado favorece la sobreexpresión de una peroxidasa (EC 1.11.1.7) propia de la especie *Zea mays* (gen TC199346), de la cual no se especifica su naturaleza exacta en la anotación correspondiente. Sin embargo, como todas las peroxidases, esta participa en rutas metabólicas diversas como el metabolismo de la fenilalanina, la biosíntesis de fenilpropanoides, la porfirina y el metabolismo de la clorofila, todos ellos de gran relevancia para el desarrollo de la plántula (Kegg, 2013: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=1.0&query=EC+1.11.1.7&map=map00360&scale=1.0&auto_image=&show_description=hide&multi_query=; http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=1.0&query=EC+1.11.1.7&map=zma00940&scale=1.0&auto_image=&show_description=hide&multi_query=).

Todos los genes anteriormente descritos son de gran importancia para la defensa de las plantas, debido a que mediante su sobreexpresión, la planta pueda responder ante los ataques bióticos o abióticos que la amenazan, así como también activar mecanismos de defensa contra estrés para prevenir su afectación por los mismos, favoreciendo a la planta, y evitando pérdidas en rendimiento debidas al ataque de patógenos o condiciones medioambientales.

7. DISCUSIÓN

La germinación es una etapa clave en la producción agrícola, ya que si no se tiene un alto índice de germinación, el rendimiento disminuye desde ese momento. En el presente experimento, a pesar de que los datos técnicos del maíz utilizado indicaban que su capacidad germinativa era del 100% para ambas variedades, experimentalmente y bajo condiciones de invernadero, sin estrés ni tratamientos aplicados, las semillas presentaron una germinación promedio de 85%. La fase final de emergencia de las semillas se alcanzó el día 10 después de la siembra. El acondicionamiento de las semillas con H_2O_2 elevó su índice de germinación por arriba del 95%. Este resultado concuerda con lo reportado por Hameed *et al.* (2004) y Msanga y Maghembe (1989), quienes al aplicar H_2O_2 a las semillas como un proceso de desinfección, encontraron que de forma paralela se promovía su germinación. Este efecto puede ser atribuido al hecho de que la eliminación de H_2O_2 resulta en la producción de oxígeno necesario para diversos procesos metabólicos, mientras que la generación de moléculas de agua permite una adecuada imbibición de las semillas para acelerar el proceso germinativo, reflejándose también en una mayor velocidad de emergencia de las plántulas sometidas a este tratamiento.

Los porcentajes de germinación de las semillas de variedad normal fueron mayores que aquellos registrados para las semillas de variedad QPM, esto se explica debido a la alta concentración de aminoácidos presentes en las semillas QPM que disminuyen los espacios intracelulares, impidiendo así el hinchamiento homogéneo de la semilla y la completa hidratación de las proteínas que contiene, entorpeciendo el proceso de imbibición y con ello, retrasando el proceso de germinación.

Al someter a las semillas a los estreses bióticos y abióticos trabajados con los acondicionamientos respectivos, la germinación total se obtuvo en el día 14 después de la siembra, es decir, 4 días después que para las semillas con estrés. Estas diferencias

podieron deberse a diferentes factores tales como las condiciones impuestas (estrés biótico, abiótico y presencia de QN y H₂O₂), la temperatura del ambiente y las condiciones climáticas, ya que los periodos de siembra fueron distintos y el clima de la región varió entre los dos experimentos.

En las semillas sin estrés, el acondicionamiento con QN no promovió el incremento en los porcentajes de germinación. Este resultado contradice a lo reportado por Guan y colaboradores en 2009, quienes reportaron un incremento significativo en la germinación del maíz. Esta diferencia puede deberse a la temperatura del entorno y a las concentraciones de QN empleadas, ya que mientras que en este experimento se empleó una solución de QN al 2% p/v, Guan y colaboradores emplearon soluciones de entre 0.25% p/v y 0.75% p/v; además, las características del QN empleado en su investigación no fueron reportadas. Otros investigadores han encontrado incrementos significativos en la capacidad germinativa de cereales como trigo (Bhaskara-Reddy *et al.*, 1999) y cacahuates (Zhou *et al.*, 2002) empleando concentraciones de QN de 2 a 8 mg/mL, o incluso al 1.5% p/v (Ruan and Xue, 2002). Sin embargo, para el presente experimento, las semillas se acondicionaron con QN al 2% p/v debido a que a esta concentración, el QN no solo favorece las características fenológicas del maíz, sino que también protege al cultivo contra algunos estreses bióticos y abióticos inherentes al cultivo (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011b; 2011c). Por esta razón, es probable que las variaciones encontradas en la germinación de las semillas bajo la influencia del QN sean debidas a la concentración del biopolímero, a las características específicas de cada tipo de cultivo, el peso molecular o el grado de desacetilación del QN, las cuales dependen del método de extracción y de la materia prima utilizada.

En lo que respecta a las semillas sometidas a hongos o sequía, aquellas de variedad QPM fueron las que presentaron mayores porcentajes de germinación. Este comportamiento

puede deberse a distintos factores, siendo precisamente la presencia de los estreses quien encabeza la lista, pues la semilla, con el afán de defenderse de las amenazas de su entorno, comienza a llevar a cabo la activación enzimática de manera acelerada para generar defensas y con ello evitar el daño por factores externos. Debido a la alta cantidad de proteína presente en el maíz QPM, los resultados sugieren que la planta comienza su activación de forma prematura a manera de competencia contra los estreses, propiciando así una mayor velocidad de germinación.

Son muchos los experimentos que se han llevado a cabo en donde se involucra el uso de sustancias promotoras de la germinación aún bajo condiciones de estrés en una gran diversidad de cultivos. Por ejemplo, en alcachofa, se ha encontrado que mediante el recubrimiento con QN, se promueve una mayor capacidad germinativa de las semillas de soja a diversas temperaturas (Ziani *et al.*, 2010). El mismo efecto se ha encontrado en algunas flores como las orquídeas, en donde se ha reportado un aumento en porcentaje de germinación de las semillas incluso bajo estrés hídrico (Kananont *et al.*, 2010). Existe un reporte de Guan y colaboradores en 2009 en donde se encontró que la germinación de las semillas se ve favorecida con el recubrimiento biopolimérico incluso bajo estrés por bajas temperaturas. Estudios realizados en China, han demostrado que existe un aumento significativo en la capacidad germinativa de las semillas de arroz recubiertas con QN al 1.5% aún bajo condiciones de salinidad (Ruan and Xue, 2002). Igualmente, se sabe que la germinación de las semillas bajo tratamiento con H₂O₂ al 6 u 8% se ve favorecida (Msanga, 1989), no obstante, no existen estudios reportados en donde se involucre la presencia de estreses bióticos o abióticos sumados al peróxido y su influencia sobre la germinación de las semillas.

En el presente trabajo, los estreses promovieron una mayor velocidad de emergencia en la plántula, superando al control incluso en una unidad. Es importante destacar que, si por

efecto del estrés la plántula al momento de emerger manifiesta anomalías, es posible que su desarrollo se vea truncado durante el proceso vegetativo impidiendo así su desarrollo hasta planta adulta. Caso contrario, si al emerger la plántula se detecta alguna anomalía, se le puede dar cierto tratamiento a la misma, o bien, la plántula recién emergida puede ser desechada y en su lugar puede ser sembrada una nueva semilla que sea capaz de aprovechar el espacio y los nutrientes de la tierra y emerger sana para dar el fruto esperado.

Una gran porción de las plantas de maíz que son cultivadas en el campo son destinadas para su uso como forraje o rastrojo, siendo la base de la alimentación animal, motivo por el cual los investigadores han enfocado sus estudios para lograr la producción de mayores cantidades de este cereal. De acuerdo con las variables fenológicas evaluadas en las plántulas sometidas a los diferentes acondicionamientos sin la interferencia de estreses, se encontró que las QPM acondicionadas con H_2O_2 presentaron un mayor crecimiento fenológico que el resto de los tratamientos, siendo los tallos las estructuras que tuvieron un desarrollo más acelerado hasta en un 8.5%. Esto es consecuencia de la continua absorción de agua de las plántulas QPM a través de las raíces, necesaria para generar los procesos enzimáticos que permitan la manifestación y activación total de los aminoácidos presentes. Mediante los tratamientos aplicados, se esperaba encontrar una respuesta significativa al adicionar las soluciones de QN y H_2O_2 de manera foliar, ya que se ha reportado que estos tratamientos afectan la capacidad fotosintética de algunos cultivos, incrementan la conductancia estomatal y la tasa de transpiración, promoviendo como consecuencia el desarrollo de las plántulas y particularmente, la longitud de las hojas (Khan *et al.*, 2002); no obstante, este comportamiento no se presentó. Los resultados sugieren que deben incrementarse las concentraciones de las soluciones asperjadas para promover una mayor conductancia dentro de la planta, y con ello incrementar la fenología de todas las estructuras.

Llevar a cabo el estudio de la fenología de las plantas cuando se tienen involucrados una gran variedad de factores resulta una tarea complicada. Tal fue el caso de las plantas provenientes de semillas sometidas a estrés, manejadas en el presente experimento. Algunos trabajos reportan el comportamiento de los tratamientos con QN y H₂O₂ sobre las semillas de siembra o aplicados a la plántula en su estadio vegetativo bajo la influencia de algún estrés en particular; no obstante la combinación de estreses genera en la planta una competencia entre los mismos haciendo prácticamente imposible atribuir de manera específica a alguno de ellos su comportamiento. En el caso de la soja y la alcachofa, se ha encontrado que el recubrimiento de la semilla con QN previo a la siembra no solo promueve una mejor germinación, sino que también genera resultados positivos en cuanto al desarrollo fenológico de las plantas aún bajo condiciones de estrés hídrico (Ziani *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2012). Estos resultados son congruentes con los reportados en el presente trabajo, en donde se encontraron mejores características en las plantas provenientes de semillas acondicionadas con QN, ya que las longitudes de sus hojas fueron mayores. No obstante, existen pocos estudios en los que se ha aplicado QN a plantas de maíz bajo estrés.

De acuerdo al los resultados obtenidos con respecto a las longitudes totales de las plántulas en general, el efecto del QN y del H₂O₂ sobre ellas fue incierto, pues no se observaron efectos significativos. Esto puede deberse a que la presencia de estrés en la misma provoca un desvío energético de la planta de modo que le impide asimilar las soluciones aplicadas, o bien, existe una competencia entre el tratamiento aplicado y el estrés (principalmente por patógenos) impidiendo así que el QN o el H₂O₂ actúen como promotores de desarrollo en el vegetal. Benavides y Mendoza en 2001 reportaron que en lechuga se encontró un aumento significativo en las variables de respuesta evaluadas para las plántulas regadas con QN con respecto a aquellas regadas con agua; sin embargo no hubo diferencia significativa con aquellas a las que se les aplicó ácido acético (el cual es el

disolvente del QN empleado en el presente trabajo); por lo tanto es posible que bajo ciertas condiciones, el quitosán no sea totalmente efectivo para promover su desarrollo significativamente.

Existen investigaciones enfocadas al uso de QN para favorecer el desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés abiótico, tal es el caso del estudio realizado por Guan y colaboradores en 2009 en donde se encontró un incremento en la longitud de plántula bajo condiciones de bajas temperaturas; no obstante existen pocos estudios en los que se involucre el estudio de variables fenológicas en plantas bajo condiciones de estrés biótico y el uso de QN o H₂O₂.

En lo que respecta al H₂O₂, se sabe que cuando las semillas se remojan previo a la siembra en la mencionada solución a concentraciones de 6 u 8%, las plantas presentan mayores dimensiones que aquellas que no fueron sometidas a dicho tratamiento; además, las plantas tratadas incrementan su vigor (Msanga, 1989; Hameed, 2004); no obstante, como ya se ha mencionado, no existen estudios en donde se involucre la presencia de estresantes bióticos o abióticos sumados al uso de peróxido en las semillas.

A pesar de que cuando se realizó el experimento en el invernadero la mayoría de los factores externos fueron controlados (humedad, aireación, temperatura, ausencia de patógenos ambientales, etc.), con el paso de los días se volvió más complicado llevar a cabo dicho control, principalmente por las corrientes de aire generadas dentro del invernadero por la posición de las ventanas y algunos problemas técnicos con las instalaciones. Conforme los meses fueron pasando, a pesar de que se intentó tener un control de temperaturas, la posición del sol fue variando, elevando el calor dentro del invernadero y haciendo casi imposible su control. El mismo caso ocurrió con el tiempo de lluvias, ya que la humedad se quedaba concentrada en áreas específicas al exterior del invernadero, en donde árboles cercanos fomentaban la retención de vapor de agua que

afectaba de manera importante la humedad y temperatura al interior del invernadero. Algunas imperfecciones en la construcción del techo del invernadero propiciaron también el ingreso de insectos y algunas aves, los cuales, a pesar de ser expulsados del sitio tan pronto como se detectaba su presencia, ejercían cierto estrés sobre las plantas, siendo factores no controlables que pudieron haber interferido en los resultados obtenidos.

El estrés que pudo controlarse hasta en un 98% fue la invasión de las plántulas por las larvas de *Spodoptera frugiperda*, desarrolladas como consecuencia del estrés por sequía y erradicadas mediante aspersión de los doseles y las hojas con los tratamientos que contenían QN, solo o combinado con H₂O₂. Este comportamiento está asociado a la sobreexpresión de las quitinasas a nivel molecular (gen AZM4_138810) por efecto de los tratamientos de la semilla y la plántula con QN. Es sabido que las semillas de los cereales cuentan con cantidades sustanciales de quitinasas (0.01%). A estas concentraciones, estas quitinasas tienen la capacidad de defenderse de los ataques fúngicos; no obstante, no es suficiente para defenderse de los ataques por insectos. Las quitinasas de las plantas pueden tener como blanco la membrana del intestino medio del insecto en vez de la quitina de su exoesqueleto, con un contenido máximo de quitina del 12%. Un ataque enzimático en la membrana del intestino medio podría resultar en una abrasión severa y fatal desintegrando el revestimiento intestinal y provocando la muerte inmediata del insecto (Brown *et al.*, 1998), siendo entonces el mecanismo por el cual el QN aplicado a las plantas actuó para erradicar la plaga del gusano cogollero. La habilidad de la planta para producir tal alimento de disuasión le da una ventaja evolutiva sobre las plantas que carecen de un mecanismo de este tipo, teniendo la capacidad de promover el desarrollo de plantas superiores al actuar como un potente elicitor.

En cuanto a la protección del cultivo de maíz mediante la producción de ROS se refiere, se encontró que el acondicionamiento de las semillas tanto con H₂O₂ como con QN,

promovió la generación de H_2O_2 endógeno en las hojas, particularmente en los sitios sometidos a estrés siendo mayor la producción en las plántulas provenientes de semillas acondicionadas con H_2O_2 . Estos resultados indican que la actividad de POD aumenta al aplicar H_2O_2 y QN exógeno a las semillas, lo cual permite que la planta sea capaz de resistir los ataques de patógenos, además de que le permite iniciar mecanismos de defensa contra diferentes estreses mediante procesos de oxidación y reducción (Bradley *et al.*, 1992; Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

Hasta la fecha no existen reportes del efecto de los elicitores en cultivos de cereales para incrementar su contenido proteico. En el presente experimento se encontró que, mediante la aspersion de QN y H_2O_2 , se logró aumentar la cantidad de proteínas presentes en la plántula incluso hasta en un 200% sin estrés inducido; no obstante, algunas pruebas de digestibilidad y de asimilación proteica deben ser implementadas en estos cultivos enriquecidos para tener un panorama más completo y justificado sobre los beneficios de este alimento enriquecido para consumo animal. En este contexto, los tratamientos con QN o H_2O_2 son prometedores, ya que dentro de las características menos favorables del maíz para el consumo animal está su bajo contenido de proteínas, lo que lo convierte en una dieta limitada (Vaz-Martins *et al.*, 2006). De esta manera, al tratar al maíz con las soluciones anteriormente mencionadas, la suplementación de este cereal con leguminosas puede ser innecesaria, e incluso representaría costos más bajos logrando una mayor ganancia en peso de los animales.

Con respecto a la relación acondicionamiento/aspersion-proteína, independientemente del estrés aplicado, los resultados difieren con los encontrados en el experimento conducido sin estrés, ya que no se registró un incremento significativo en la cantidad de proteína por efecto del QN o H_2O_2 . Existe la posibilidad de que la planta adulta en su etapa reproductiva no responda de la misma manera que la plántula en etapa vegetativa debido

a algún desvío metabólico que sufra en esta transición fisiológica, ya que incluso puede existir una explosión energética que se concentre en las espigas para promover la formación de las inflorescencias. Por otra parte, existe la posibilidad de que la presencia de estreses bióticos y abióticos en la planta interfiera en los procesos bioquímicos de la misma, provocando que la aplicación de QN, H₂O₂ o la combinación de ambos no eleven la cantidad proteica en las plantas afectadas, ya que tanto los estreses como las soluciones aplicadas a modo de acondicionamiento o como aspersión promueven la activación de distintas rutas metabólicas de defensa el momento en que la planta los reconoce, identificándolas como algún agente externo, el cual deberán aceptar o rechazar mediante la activación de cascadas de señalización, acción que requiere de inversión energética por múltiples vías.

Se esperaría que la actividad de CAT se incrementara con la aplicación de QN o H₂O₂, tal como lo reportan Ortega-Ortíz *et al.* (2007), Guan *et al.* (2009), Lei *et al.* (2011), y Hong *et al.* (2012), quienes han encontrado, en frutos y plantas tratadas, un aumento significativo en la cantidad de peroxidasa, siendo hasta 3 veces la producida por el control, mientras que la producción de catalasa se incrementa hasta en un 33%. No obstante, en éste experimento no se encontraron diferencias significativas al evaluar la actividad específica de catalasa en las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos, pese a que, por efecto de la aplicación de QN a la semilla, se sobreexpresa el gen AW147037, una Isosima 3 de catalasa que participa en la regulación de los efectos tóxicos de ROS. No obstante, su expresión no se manifestó en las pruebas bioquímicas. Por este motivo, otros tratamientos deben ser propuestos para promover las defensas del maíz en las que se involucre la actividad enzimática de CAT, o bien, pueden llevarse a cabo pruebas más sensibles para su determinación.

La productividad de los cultivos agrícolas, particularmente de los cereales se ve mermada por los estreses, siendo la sequía y la salinidad los que encabezan la lista. En los resultados obtenidos para el experimento en el que se involucraron los distintos estreses, llama la atención que el grupo 4, sometido a sequía pero con acondicionamiento y aspersión combinados, sea el que tenga un mayor rendimiento, pues el tratamiento aplicado a las plantas confiere un mejor desarrollo reproductivo de la misma aún bajo esta condición adversa. Por lo tanto, si se busca una mayor productividad, este tratamiento puede ser aplicado bajo condiciones de sequía. Más estudios deben conducirse con la finalidad de evaluar si la respuesta al tratamiento es la misma al aplicarse a otras variedades de maíz, e incluso a otros cereales susceptibles a la sequía. Los grupos 10 y 11 también se sometieron a sequía, sin embargo el rendimiento de los granos también es alto. En ambos casos, no se realizó aspersión alguna en la plántula durante su etapa vegetativa, no obstante, se acondicionó la semilla con QN y H₂O₂ respectivamente. Este resultado sugiere que el acondicionamiento previo a la semilla con estas soluciones promueve que la semilla adquiera cierta humedad (específicamente por la naturaleza higroscópica de ambas sustancias), la cual ejerce un efecto de liberación hídrica prolongada, reteniendo la humedad lo más posible para llevar a cabo sus procesos metabólicos en tiempo y forma. A partir de esta premisa, se pueden llevar a cabo más investigaciones en donde los factores externos sean totalmente controlados, la sequía sea una constante, y las variables sean la aplicación de QN, H₂O₂ y la combinación de ambos como acondicionamiento a las semillas, incluso a diferentes concentraciones para evaluar la viabilidad del este tratamiento como una alternativa para el combate a la sequía.

El acondicionamiento de las semillas con los diferentes tratamientos, permitió la sobreexpresión de genes que, sumados a los efectos positivos sobre la fenología de las plantas, sus procesos germinativos y sus características bioquímicas, justifican el por qué se han considerado como elicitors, ya que además, participan en rutas metabólicas

específicas que están directamente relacionadas con la defensa ante factores ambientales y patógenos, predominando el metabolismo de fenilalanina, la biosíntesis de fenilpropanoides, las interacciones planta-patógeno, las reacciones de óxido reducción, y el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y aminoazúcares. El QN y el H₂O₂ pueden ser considerados como elicitores exógenos, porque inducen respuestas de protección en las plantas mediante su aplicación externa.

Las plantas poseen mecanismos por los que reconocen a quien las ataca. Se cree que poseen receptores de reconocimiento de patrones transmembranales (PRR) capaces de interactuar con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs/MAMPs), que pueden ser efectores secretados por el patógeno o liberados de la pared celular del huésped tras un ataque en el sitio de la infección. Se ha reportado que los polisacáridos de la pared celular de la planta (tales como glucanos y QN) actúan como PAMPs/MAMPs en muchos sistemas. El QN tiene la ventaja de ser reconocido por los PRRs de la planta y desencadenar, como consecuencia, un panel de respuestas de defensa (El-Hadrami, *et al.*, 2010). El QN se comporta como un PAMPs/MAMPs o un elicitor general, induciendo la resistencia al hospedero y aumentando la inmunidad sistémica. Las respuestas de defensa promovidas mediante la aplicación de QN incluyen el aumento de H⁺ y el flujo de Ca²⁺ en el citosol, la activación de MAP quinasas, la explosión oxidativa, las respuestas de hipersensibilidad, la síntesis de ácido abscísico, jasmonatos, fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (Amborabé et al., 2008).

Los glucanos y el QN producen la sobreexpresión de glucanasas y quitinasas. En el presente trabajo, el acondicionamiento de las semillas con QN permitió no solo la expresión de quitinasa, sino también de una β-1,3-glucanasa putativa inducible de elicitores (BM500583). Existen muchos reportes sobre la inducción de la expresión de la β-1,3-glucanasa durante la infección por patógenos, donde se ha sugerido que la β-1,3-

glucanasa se expresa constitutivamente a bajos niveles, y se secreta dentro de la pared celular y los espacios intercelulares donde se encuentra el invasor, principalmente de carácter fúngico (Zemanek *et al.*, 2002). Por ejemplo, plantas de trigo infectadas con *Fusarium graminearum* han mostrado una acumulación más rápida de β -1,3-glucanasa y otras proteínas de resistencia PR, más que en las plantas susceptibles (Li *et al.*, 2001). También se ha encontrado que la inoculación de plantas de soja con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *glyciniae* o con un elicitor fúngico de *Phytophthora* spp., aumenta la expresión una isoforma III de β -1,3-glucanasa (Cheong *et al.*, 2000). Estudios similares se han reportado en tomate (Roulin and Buchala, 1995), garbanzos (Vogelsang and Barz, 1993), y papas (Beerhues and Kombrink, 1994). También existen estudios sobre la inducción de la actividad de la β -1,3-glucanasa en respuesta a heridas y otros estímulos de estrés. Como respuesta al estrés por heridas, la actividad de glucanasa ha sido inducida en las raíces y tallos de garbanzo (Cabello *et al.*, 1994), así como en las hojas de cebada (Ignatius *et. al*, 1994) y sorgo (Krishnaveni *et al.*, 1999). Por esta razón es que el estudio de estas glucanasas ha sido de gran importancia, debido a que participan de manera activa en la reparación de daños de la planta a nivel bioquímico, promoviendo las respuestas de defensa e induciendo la elicitación de los cultivos. La activación de este gen justifica la sanidad de las plántulas tratadas con H₂O₂ y sometidas a los ataques fúngicos de *A. flavus* y *F. moniliforme* a nivel invernadero, ya que, mientras que durante la primer semana de crecimiento, después de haber sido infectadas desarrollaron estructuras cloróticas y presentaron amarillamiento generalizado, características que desaparecieron después de la segunda semana de crecimiento, tiempo en el que, según el estudio de microarreglos, se manifiesta la sobreexpresión de la β -1,3-glucanasa.

El H₂O₂ aplicado de manera exógena promovió principalmente la sobreexpresión de peroxidasas, que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del H₂O₂ (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). Las

peroxidasas también han sido involucradas en los procesos de lignificación de la pared celular, que es un proceso propio del final del periodo de crecimiento celular de las plantas superiores por el cual la lignina sustituye a la mayor parte del agua de la membrana celular y produce el endurecimiento de la misma y su aumento de volumen dándole un aspecto leñoso, con una consistencia semejante a la de la madera y con una especial resistencia, siendo una barrera física contra microorganismos patógenos. También se involucran en la regulación de la elongación de las células a través de la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de diversos polímeros de la pared celular (Bradley *et al.*, 1992). Sin embargo, hasta la fecha, no existe una descripción puntual de la acción *in vivo* de la peroxidasa debido a la gran cantidad de sustratos potenciales y la existencia de múltiples isoenzimas. La peroxidasa aniónica del tabaco es una de las isoenzimas mejor caracterizadas, y se ha encontrado que tiene la capacidad de oxidar un gran número de compuestos secundarios en las plantas a nivel *in vitro* incluyendo alcoholes cinamílicos, ácidos fenólicos y ácido acético-3-indol (Lagrimini, 1991). Hace un par de décadas, se obtuvo un cDNA que codificaba para peroxidasa, y se encontró que esta enzima solo se expresaba en niveles muy altos en los tejidos lignificantes (xilema y elementos traqueales) y en el tejido epidérmico. También se demostró que existían cuatro copias diferentes del gen de peroxidasa aniónica en *N. tabacum*. Por esta razón, una biblioteca de DNA genómico de tabaco fue construida en el fago- λ EMBL3, cuyos dos únicos genes de peroxidasa fueron secuenciados. Una de estas clonas (λ POD1), fue designada como un gen putativo cuando se encontró que las secuencias de exones diferían de la secuencia de cDNA en un 1%, y algunos cambios en las secuencias codificantes indicaron un gen disfuncional. La otra clona (λ POD1), fue designada como gen aniónico de peroxidasa funcional en tabaco debido al 100% de homología presentada con respecto al cDNA (Diaz-De-León *et al.*, 1993). Estos estudios constituyeron la base para el estudio funcional de las peroxidasas en

plantas, así como la determinación de sus funciones estructurales que hasta la fecha siguen vigentes. En el caso del presente trabajo, es probable que el gen peroxidasa sobreexpresado sea el mismo que para *N. tabacum* por la homología que ambos tienen en la estructura celular de las paredes, particularmente de los tallos, siendo estructuras fibrosas con alto contenido de lignina. Además, las peroxidases se involucran en la ruta metabólica de los fenilpropanoides, en la cual, uno de los productos generados es el ácido salicílico, que también es considerado como un importante elicitor, ya que tiene la capacidad de mediar la resistencia sistémica adquirida en la planta, que le permite defenderse contra hongos patógenos e insectos que la atacan.

El método de la resistencia inducida a enfermedades por el elicitor en las plantas se caracteriza por tener grandes ventajas tales como la seguridad ecológica (ya que el método se basa en la inducción del potencial inmune nativo de la planta huésped y no en la supresión de fitopatógenos), un efecto protector sistémico y prolongado, la participación de múltiples sistemas de defensa en la resistencia inducida (permitiendo que la adaptación de los patógenos a las plantas protegidas sea casi imposible) y la inducción de la resistencia no específica de hongos, bacterias, virus, nematodos, etc. (Ozeretskoykaya and Vasyukova, 2002). Las plantas tratadas con elicitores desarrollan una resistencia inespecífica. La inmunocorrección fenotípica causada por elicitores resulta en la modificación del funcionamiento del genoma conectado con los niveles de expresión de los genes protectores, más que en cambios en el genoma mismo (Ozeretskoykaya and Vasyukova, 2002) tal como se observó en el presente trabajo, ya que como se muestra en los resultados de los microarreglos, ni el QN ni el H₂O₂ provoca cambios en el genoma del maíz; sin embargo son los responsables directos de influir en la sobreexpresión y silenciamiento de algunos genes de importancia bioquímica que modifican el metabolismo de las plantas.

Los cultivos de maíz transgénico son cultivos a los que se les incorpora en su genoma un gen específico de algún otro organismo para mejorar sus características. Algunos de los genes sobreexpresados por efecto de los elicitores aplicados en el presente trabajo, son de la misma naturaleza de los que se agregan para convertirlos en transgénicos. Por ejemplo, las proteínas hidrofóbicas inductoras de sequía (sobreexpresada en este trabajo como consecuencia del acondicionamiento con QN), han sido utilizadas para evaluar la respuesta de las plantas a estrés hídrico en especies como arroz, sorgo, cacahuate, amaranto y maíz mediante la inducción de la deshidratación en la planta para estudiar su repercusión proteica, y han sido empleadas como marcadores moleculares para la creación de plantas transgénicas tolerantes a sequía (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007; Kottapalli *et al.*, 2009; Peng, 2009, Benesova *et al.*, 2012).

Las quitinasas de organismos como hongos o insectos también han sido incorporadas a los cultivos de maíz para convertirlos en transgénicos (Ping-Mei *et al.*, 2011). Hace un quinquenio en la Universidad del Estado de Kansas, se caracterizaron las quitinasas de diversas especies y el DNA que éstas codifican fue clonado. Los genes de quitinasa resultantes fueron insertados en plantas, convirtiéndolas en plantas transgénicas usando una tecnología similar a la que se usa para crear plantas marcadas con el gen de la endotoxina delta de *Bacillus thuringiensis*. Se encontró, por ejemplo, que las plantas transgénicas de tabaco que contenían genes de quitinasas del “gusano cornudo” del tabaco, expresaban una quitinasa inmunológicamente idéntica a la de dicho gusano. Otro insecto, el gusano cogollero del tabaco, fue alimentado con plantas de tabaco quitinasas-negativas o quitinasas-positivas, encontrándose que las larvas sobrevivientes que fueron alimentadas con hojas quitinasas-positivas pesaron solo 1/6 del peso de las larvas alimentadas con plantas quitinasas- negativas (Ding *et al.*, 1997; Kramer and Muthukrishnan, 1997). Por otra parte, las quitinasas pueden incrementar el efecto de la endotoxina delta de *Bacillus thuringiensis* (constituida por cristales proteicos y

caracterizada por poseer propiedades insecticidas), ya que se ha encontrado que las quitinasas, además de debilitar la barrera de la membrana del intestino medio del insecto, favorecen un incremento en la toxicidad de *B. thuringiensis*, potencializando el efecto insecticida de la bacteria. Además, la quitinasa de los insectos expresada por la planta de tabaco transgénica multiplica el efecto de las dosis subletales de la toxina de *B. thuringiensis* (Shapiro *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1996).

Con esto, el QN es considerado como un insumo agrícola que actúa como un elicitor contra plagas de insectos que puede tener la capacidad de sustituir a los biopesticidas, e incluso podría incorporarse a los cultivos de plantas transgénicas para mejorar sus condiciones. De igual manera, considerando que no solo los insectos constituyen un factor de estrés biótico importante, sino que también los hongos lo son, las quitinasas podrían actuar como fungicidas sistémicos, atravesando el tejido vegetal y se traslocándose vía sistema vascular hacia puntos distantes de la planta de manera localizada, puesto que con el tratamiento exógeno de quitosán, los hongos podrían ser combatidos desde antes de que infecten a la planta en su totalidad como ocurre en algunas plantas susceptibles a los mismos. Existe la posibilidad de que los genes correspondientes a proteínas relacionadas con la defensa a ataques fúngicos no sean sobreexpresados en la etapa vegetativa de la planta, pues como se observó en los resultados de los microarreglos, ninguno de los genes que ahí se sobreexpresan corresponden a esta condición; no obstante, se esperaría que si se analiza el genoma, su silenciamiento y su sobreexpresión en las diferentes etapas fenológicas del cultivo, podrían encontrarse algunos genes transcritos en su etapa reproductiva y que solo hayan sido traducidos en la etapa vegetativa, sugiriendo así que la expresión genética varía en los diferentes estadios de la planta, siendo esta una perspectiva de estudio para investigaciones subsecuentes.

Por otra parte, se sabe que el H_2O_2 actúa como una señal local para la muerte celular por reacción hipersensible, manifestada con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección, y que actúa también como una señal difusible para la inducción de genes de defensa en las células adyacentes (Álvarez *et al.*, 1998). Por ejemplo, se ha encontrado que plantas de papa transgénicas que sobreexpresan un gen fúngico de glucosa-oxidasa, provocan que las proteínas constitutivas de dicha especie presenten un incremento en los niveles subletales de H_2O_2 , y como consecuencia, presentan una mayor resistencia a las enfermedades (Wu *et al.*, 1995, 1997). Del mismo modo, las plantas de tabaco transgénico han sido diseñadas para poseer bajos niveles de defensas antioxidantes (enzimas) que muestran altos niveles (constitutivos e inducibles) de H_2O_2 y proteínas PR, junto con aumento de la sensibilidad de la planta y una resistencia general al desafío por patógenos (Chamnongpol *et al.*, 1998; Mittler *et al.*, 1999). De acuerdo a los resultados encontrados en el presente trabajo, la adición en bajas concentraciones de H_2O_2 exógeno a algunos cultivos comestibles, podría hacer las veces de un organismo transgénico, pues no sería necesario introducir otros genes para incrementar la producción endógena de H_2O_2 y PR's, sino que con la aplicación exógena, podría promoverse la resistencia asociada al estrés oxidativo.

Con esto, el H_2O_2 puede ser considerado como un insumo agrícola que actúe como un elicitor contra plagas de insectos y contra el ataque fúngico, que al igual que el QN, podría incorporarse a los cultivos de plantas transgénicas para potencializar su actividad protectora. Con respecto al H_2O_2 exógeno, aún existen muchas investigaciones por realizar, ya que son escasos los reportes existentes en donde éste se emplee para potencializar la activación de ROS, ya que podría pensarse que una aplicación exógena no sería necesaria si la propia planta tiene la capacidad de producirlo; no obstante en el caso de plantas sometidas a constantes ataques de patógenos, la aplicación de este elicitor podría resultar efectiva, ya que las plantas, como consecuencia de ataques continuos,

tiene la limitación de que agota la cantidad y concentración del H_2O_2 endógeno que produce, tornándose en un blanco perfecto para distintos patógenos, provocando una consecuente debilitación celular en el sitio de la infección, que si no es tratada a tiempo, puede desencadenar una apoptosis, y con ello, la muerte de la planta en su totalidad, siendo esta una de las mayores amenazas en la producción agrícola, pues por efecto de las plagas y los ataques por patógenos, se generan pérdidas importantes en cultivos comestibles, disminuyendo también las ganancias de producción, y con ello, una desestabilización agrícola y socioeconómica.

Los resultados descritos en el presente trabajo, tanto en los aspectos fenológicos, bioquímicos y moleculares, sugieren que el QN y el H_2O_2 , bajo las condiciones en las cuales fueron aplicados, son elicitors compatibles, ya que actúan de manera efectiva sobre los cultivos de maíz sin causar interferencias entre sí. Como se observó, cada uno de ellos participa en rutas metabólicas diferentes, por lo que su complementariedad puede ser promisoría al enfrentarlos contra distintos estreses bióticos y abióticos de interés agrícola.

La compatibilidad y complementariedad de estos dos elicitors y su efecto sobre las características fenológicas, microbiológicas y moleculares en el cultivo pueden deberse a su distinto modo de acción y activación, ya que mientras que el QN se induce y activa por receptores específicos, el H_2O_2 se produce e induce como una respuesta al estrés, de modo que ambos participan en distintos procesos bioquímicos activando rutas metabólicas en común, y por ende, favoreciendo la activación de enzimas que juegan un papel clave en la defensa de la planta y en el desarrollo de la misma incluso bajo condiciones adversas.

8. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones manejadas en el presente trabajo, los resultados encontrados indican que el QN y el H₂O₂ son insumos agrícolas que actúan como elicitores o inductores del metabolismo en las plantas de maíz, favoreciendo sus características fenológicas aún bajo condiciones de estrés, promoviendo la activación de peróxido de hidrógeno exógeno como mecanismo de defensa ante las condiciones externas, incrementando la cantidad de proteína presente en el cultivo, y generando metabolitos secundarios específicos que además de consistir en moléculas de soporte a la planta, permiten la activación de rutas metabólicas que le confieren protección ante el estrés oxidativo y la generación de enzimas para su resistencia, destacando las reacciones de óxido-reducción en el metabolismo celular y la respuesta al estrés oxidativo, el catabolismo del peróxido de hidrógeno, el metabolismo de la fenilalanina, la biosíntesis de fenilpropanoides, la respuesta de defensa fisiológica, el metabolismo de carbohidratos, el metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares y la biosíntesis de metabolitos secundarios en general.

El efecto de la aplicación de QN y H₂O₂ en los cultivos de maíz a nivel molecular, es paralelo al efecto generado por la aplicación de transgenes, motivo por el cual, se sugiere que el acondicionamiento de este cultivo con los insumos agrícolas trabajados constituye una alternativa al maíz transgénico, ya que mediante estos tratamientos se logra la sobreexpresión de genes de defensa ante condiciones adversas sin poner en riesgo la seguridad alimentaria debido a la inocuidad de los elicitores usados a las concentraciones manejadas.

9. PRODUCTOS GENERADOS DURANTE EL TIEMPO DE REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO

9.1 ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS ARBITRADAS INTERNACIONALES

- Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S. P. 2011. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *African Journal of Biotechnology*, 10(34):6439-6446. DOI: 10.5897/AJB10.1448
- Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S. P. 2011. Protección contra estrés biótico inducida por quitosán en plántulas de maíz (*Zea mays*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (Antes Agrociencia)*, 2(6):813-827. ISSN: 2007-0934.
- Lizárraga-Paulín, E.G., Miranda-Castro, S.P., Moreno-Martínez, E., Lara-Sagahón, A.V., Torres-Pacheco, I. 2013. Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: Their influence on some phenological and biochemical behaviors. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 14(2):87-96. DOI: 10.1631/jzus.B1200270. Disponible también en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365007> (Anexo 11.5).

9.2 CAPÍTULOS PUBLICADOS EN LIBROS INTERNACIONALES

- Lizárraga-Paulín, E.G., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P. 2011. Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem. In: *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*, Ramón Gerardo Guevara-González (Ed.), ISBN: 978-953-307-395-8, InTech.
- Miranda-Castro, S.P., Lizárraga-Paulín, E.G. 2012. Is Chitosan a new panacea?: areas of application. In: *The Complex World of Polysaccharides*, Desiree Nedra Karunaratn (Ed.), ISBN: 978-953-51-0819-1, InTech.
- Lizárraga-Paulín, E.G., Miranda-Castro, S.P., Moreno-Martínez, E., Torres-Pacheco, I., Lara-Sagahón, A.V. 2013. Novel Methods for Preventing and Controlling Aflatoxins in Food: A Worldwide Daily Challenge. In: *Aflatoxins- Recent Advances*

and Future Prospects”. Mehdi Razzaghi-Abyaneh (Ed.), ISBN: 980-953-307-566-7, InTech.

9.3 RESÚMENES PUBLICADOS EN MEMORIAS DE CONGRESOS INTERNACIONALES

- Lizárraga Paulín Eva Guadalupe, Moreno Martínez Ernesto, Torres Pacheco Irineo, Miranda Castro Susana Patricia. “Determinación del efecto elicitor del quitosán en plántulas de maíz contra estrés de tipo biótico y abiótico”. 2° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Zapopan, Jalisco, México. 23 al 26 de Septiembre de 2009.
- Lizárraga E.G, Miranda S.P, Torres I. “Protective Effect of Chitosan in Maize Seedlings under Biotic and Abiotic Stress”. 4th International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Boca del Río, Veracruz, México. ISBN: 978-607-00-3785-6. 29 de Noviembre a 1° de Diciembre de 2010.
- Eva Guadalupe Lizárraga Paulín, Irineo Torres Pacheco, Alma Virginia Lara Sagahón, Ernesto Moreno Martínez, Susana Patricia Miranda Castro. “Efecto fenológico de la aplicación de Quitosán y Peróxido de Hidrógeno en semillas y plántulas de maíz bajo condiciones de invernadero”. 3° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Zapopan, Jalisco, México. ISBN: 978-607-719-001.1. 28 de Septiembre al 1° de octubre de 2011.
- De la Mora Valencia María, Morales Pérez Nelly, Lizárraga Paulín Eva, Miranda Castro Susana. “Effect of Hydrogen Peroxide and Chitosan in Corn Seeds Exposed to Pathogenic Fungi”. 5th International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Nuevo Vallarta, Nayarit, México. ISBN: 978-607-95455-2-9. 24 a 26 de Octubre de 2012.
- Eva Guadalupe Lizárraga Paulín, Irineo Torres Pacheco, Alma Virginia Lara Sagahón, Ernesto Moreno Martínez, Susana Patricia Miranda Castro. “Mejoramiento de cultivos de maíz mediante la aplicación de Quitosán y Peróxido de Hidrógeno como elicitors exógenos”. 4° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Zapopan, Jalisco, México. ISBN: 978-607-719-003-5. 25 al 27 de Septiembre de 2013.

9.4 RESUMENES PUBLICADOS EN EVENTOS NACIONALES

- Lizárraga Paulín Eva Guadalupe, “Estudio a nivel molecular de la respuesta contra estrés de tipo biótico y abiótico en plántulas de maíz para consumo animal”. VI Congreso de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. Agosto de 2010.
- Lizárraga Paulín Eva Guadalupe, Miranda Castro Susana Patricia, Torres Pacheco Irineo. “Protective Effect of Chitosan in Maize Seedlings under Biotic and Abiotic Stress”. Simposium Interno de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán 2011. 17 y 18 de Mayo de 2011.
- Lizárraga Paulín Eva Guadalupe, “Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitores en plántulas de maíz para consumo animal”. VII Congreso de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM. Ciudad Universitaria, D.F., México. Julio de 2012.

9.5 TESIS DE LICENCIATURA (CO-ASESORÍA)

- María Fernanda de la Mora Valencia y Nelly Abigail Morales Pérez. “Efecto del peróxido de hidrógeno y quitosán en semillas de maíz expuestas a hongos patógenos”. Asesora: Dra. Susana Patricia Miranda Castro. Coasesora: M en C Eva Guadalupe Lizárraga Paulín. Ingeniería en Alimentos. 2013.
- Jennifer Nicasio Hernández. “Evaluación del Recubrimiento de Quitosán aplicado en semillas de maíz”. Asesoras: Dra. Susana Patricia Miranda Castro, M en C Eva Guadalupe Lizárraga Paulín. Ingeniería en Alimentos. 2013.

9.6 PARTICIPACIÓN COMO REVISORA-EDITORIA EN REVISTAS INTERNACIONALES

- Frontiers in Food Microbiology. Editor Asociado Invitado. Desde junio de 2013.

10. REFERENCIAS

1. A.O.A.C., 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. AOAC, Arlington, Virginia, USA, pp. 960-52.
2. Agashe, V.R., Hartl, F.U. 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Development Biology*, 11(1):15–25.
3. Albajes, R., Gullino, M., Lodovica, J.C., Elad, Y., 1999. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Kluwer Academic Publishers. New York, USA.
4. Alvarez, M.E., Penell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C., 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92(6),773–784.
5. Amborabé, B.E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P., Roblin, G., 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 59(9):2317–2324.
6. Amjad, H., Shafqat, F., Nayyer, I., Rubina, A., 2004. Influence of exogenous application of hydrogen peroxide on root and seedling growth on wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 6(2):366-369.
7. Angelova, Z., Georgiev, S., Ross, W., 2006. Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnology*, 20:72-83.
8. Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1):373-399.
9. Asghari-Zakaria, R., Maleki-Zanjani, B., Sedghi, E., 2009. Effect of *in vitro* chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. *Plant, Soil and Environment*, 55(6):252-256.
10. Aurand, W.L., 1987. Food composition and analysis of food. Von Nostrand Reinhold, New York, USA, pp.135-138.
11. Ávalos-García, A., Pérez-Urria, C.A. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
12. Bayer Cropscience México, 2013. Pests: Gusano cogollero (Actualizado el 1° de Julio de 2013). Bayer Cropscience México, Consultado en julio de 2013. (http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/gcogolleropests_bcs)
13. Beerhues, L., Kombrink, E. 1994. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and β -1,3-glucanase in potato. *Plant Molecular Biology*, 24(2):353–367.

14. Benavides-Mendoza, A., Romero-García, J., Ledesma-Pérez, A.S., Raygoza-Castro, J.M., 2001. La aplicación foliar de quitosano en ácido acético aumenta la biomasa de la lechuga. *BIOTAM Nueva Serie*, 12(3):1-6.
15. Benesova, M., Hola, D., Fischer, L., Jedelsky, P.L., Hnilicka, F., Wilhelmova, N., Rothova, O., Kocova, M., Prochazkova, D., Honnerova, J., Fridrichova, L., Hnilickova, H. 2012. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: Early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PLoS ONE*, 7(6):e38017, doi:10.1371/journal.pone.0038017
16. Benezzer, B.M., Castro, M.E., García, P.E., 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1):56-61.
17. Benhamou, N., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with endophytic bacteria strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204:153-168.
18. Bharti, K., Schmidt, E., Lyck, R., Heerklotz, D., Bublak, D., Scharf, K.D. 2000. Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*, *The Plant Journal*, 22(4):355-65.
19. Bhaskara-Reddy, M.V., Arul, J., Angers, P., Couture, L., 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3):1208-1216.
20. Biles, C.L., Martin, R.D. 1993. Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31(4):499–506.
21. Bogeat-Triboulot, M.B., Brosche, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vincour, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman J.F., Polle, A., Kangasjärvi, J., Dreyer, E. 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, 143(2):876–892.
22. Bolet-Astoviza, M., Socarrás-Suárez, M.M., 2005. Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 24(1):54-59.
23. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254.
24. Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*, 70(1): 21–30.

25. Bressani, R., Elias, L., 1969. Studies on the use of opaque-2 corn in vegetable protein rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(1):659-662.
26. Brown, J., 1998. Possible New Biopesticides?. *Agrichemical and Environmental News*, 6(1):1-3.
27. Browning, J.A. 1980. Genetic protective mechanism of plantpathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. In Harris, M.K. (Ed.) *Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants*. Texas Agricultural Sta.College Station, 52-75.
28. Cabello, F., Jorin, J.V., Tena, M. 1994. Chitinase and beta-1,3-glucanase activities in chickpea (*Cicer arietinum*)-induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. *Physiologia Plantarum*, 92(4):654-660.
29. Camarena-Gutiérrez, C., 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2):157-162.
30. Camarena-Gutiérrez, C., de la Torre-Almaráz, R., 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 12(2):25-30.
31. Castro-Rivera, J.A., Baquero-Duarte, L.E., Narváez-Cuenca, C.E., 2006. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase from pitaya amarilla fruits (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*, 35(1):91-101.
32. Çavusoglu, K., Kabar, K., 2010. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. *EurAsian Journal of Biosciences*, 4(1):70-79.
33. Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inze, D., Van Camp, W., 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1):5818-5823.
34. Cheong, Y.H., Kim, C.Y., Chun, H.J., Moon, B.C., Park, H.C., Kim, J.K., Lee, S-H., Han, C-D., Lee, S.Y., Cho, M.J. 2000. Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science*, 154(1):71-81.
35. Cobos-Peralta, M.A. s/a. Técnicas de ensilaje y construcción de silos forrajeros. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Subsecretaría de Desarrollo Rural. Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural*. México, D.F., pp 1-8.
36. Contreras, G., Elías, L.G., Bressani, R., 1980. Limitations of corn (*Zea mays*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) diets as protein and calorie sources. *Plant Foods for Human Nutrition*, 30(2):145-153.

37. Contreras, G., Elias, L.G., Bressani, R., 1981. Efecto de la suplementación con vitaminas y minerales sobre la utilización de la proteína de mezclas de maíz y frijol. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 31(4):808-826.
38. Corn, P.G., El Deiry, W.S., 2007. Microarray analysis of p53-dependent gene expression in response to hypoxia and DNA damage. *Cancer Biology & Therapy*, 6(12):1858-66.
39. Cuevas-Rodríguez, E.O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Cárdenas-Valenzuela, O.G., Reyes-Moreno, C., 2003. Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process. *LEBENSMITTEL-Wissenschaft und-Technologie*, 37(1):59–67.
40. D’Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implication for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80(3-4):183-205.
41. Dangl, J.L., Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411(6839):826-833.
42. Dangl, J.L., Ritter, C., Gibbon, M.J., Mur, L.A.J., Wood, J.R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J.O., Vivianb, A. 1992. Functional homologs of the Arabidopsis RFM1 resistance gene in bean and pea disease. *The Plant Cell*, 4(1):1359-1369.
43. Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 21(6):703-714.
44. Diaz-De-Leon, F., Klotz, K.L., Lagrimini, L.M., 1993. Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant Physiology*, 101(3):1117-1118.
45. Díaz-Royón, F., García, A., 2013. Utilización de maíz dañado por sequía como forraje. (Publicado el 01 de Abril de 2013). Engormix. Consultado en Abril de 2013. (<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/nutricion/foros/utilizacion-maiz-danado-sequia-t26341/141-p0.htm>).
46. Ding, X., Gopalakrishnan, B., Johnson, L.B., White F.F., Wang, X., Morgan T.D., Kramer, M. K.J., Muthukrishnan S., 1997. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Research*, 7(2):77-84.
47. Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Clustering analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25):14863-14868.
48. El-Hadrami, A., Adam, L.R., El Hadrami, I., Daayf, F., 2010. Chitosan in plant Protection. *Marine Drugs*, 8(4):968-987.
49. Espinosa, C.A., Gómez, M.N., Sierra, M.M., Betanzos, M.E., Caballero, H.F., Coutiño, E.B., Palafox, C.A., Rodríguez, M.F., García, B.A., Cano R.O., 2005. Los maíces de calidad proteínica y la producción de semillas en México. *Revista Ciencia y*

- Desarrollo en
internet. (<http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/ArticulosCompleto/pdf/Maiz.pdf>)
50. FAO, 1993. El Maíz en la Nutrición Humana. *Departamento de Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Roma, Italia, Cap. 1.
 51. FAO, 2007. El impacto de los piensos en la inocuidad de los alimentos. Informe de la Reunión Conjunta FAO/OMS de Expertos. Roma, Italia, (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1507s/a1507s00.pdf>)
 52. FAOSTAT, 2013. Maize Crop Production (Actualizado el 16 de Enero de 2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Consultado en Abril de 2013. (www.faostat.fao.org)
 53. Gallardo, M., 2011. Los forrajes conservados son clave en un contexto climático complejo (Publicado el 12 de enero de 2011) INTA Informa. Consultado en Abril de 2013. (<http://intainforma.inta.gov.ar/?tag=forrajes-conservados>)
 54. Gilchrist-Saavedra, L., Fuentes-Dávila, G., Martínez-Cano, C., López-Atilano, R.M., Duveiller, E., Singh, R.P., Henry, M., García, A.I., 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada, 2° ed. CIMMYT, México, D.F., pp.28-29.
 55. Gimeno, A., Martins, M.L., 2001. XVII Seminario G-TEMCAL. *Organizado por G-TEMCAL/DANONE*, Lisboa, Portugal, (www.mycotoxin.com)
 56. GOLD database. Genomes Online Database. EUA. Consultado en noviembre de 2013. <http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>
 57. Gondim, F.A., Gomes-Filho, E., Lacerda, C.F., Prisco, J.T., Azevedo-Neto, A.D., Marques, E.C., 2010. Pretreatment with H₂O₂ in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(2):103-112.
 58. González-Fernández, A.M., Marcel, T.C., Stam, P., van der Linden, C. G., Niks, R.E. 2012. Mapeo de peroxidases (Prxs) en accesiones de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante la técnica NBS-profiling. Consejo Superior de Investigaciones Científicas - España, http://www.bibliodar.mpp.eu.gob.ve/?q=doc_categoria/Peroxidasas
 59. Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., Dangl, J.L. 1995. Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269(5225):843-846.
 60. Grolleaud, M., 1997. Pérdidas post-cosecha: Un concepto mal definido o mal utilizado. En: *Estudio sintético y didáctico sobre el fenómeno de las pérdidas que se producen a lo largo del sistema post-cosecha*. FAO (Ed.), Roma, Italia, Cap. 1-3.
 61. Guan, Y.J., Hu, J., Wang, X.J., Shao, C.X., 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under

- low temperature stress. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 10(6):427-433.
62. Hahlbrock, K., Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 40(1):347-369.
63. Hahn, M., 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 34:87-412.
64. Hameed, A., Farooq, S., Iqbal, N., Arshad, R., 2004. Influence of exogenous application of hydrogen peroxide on root and seedling growth on wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(2):366-369.
65. Hayano-Kanashiro, C., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Simpson, J. 2009. Analysis of gene expression and physiological responses in three mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS ONE*, 4(10):e7531, doi: 10.1371/journal.pone.0007531. Complemento publicado en : http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&ved=0CEsQFjAE&url=http%3A%2F%2Fwww.plosone.org%2Farticle%2FfetchSingleRepresentation.action%3Furi%3Dinfo%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007531.s004&ei=Y3ECUp6SH-GqyAHQ_4GYCQ&usg=AFQjCNFFNOYh_SFLJ8R5-HvFCXp_Bfw1HQ&sig2=Z2Giv4tkiRYzpO2RS6m53A&bvm=bv.50310824,d.aWc
66. Heerklotz, D., Döring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S., Nover, L. 2001. The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5):1759-1768.
67. Hesterman, O.B., Carter P.R., 1990. Utilizing Drought-Damaged Corn. *Michigan State University. Cooperative Extension Service*. Michigan, USA.
68. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5):462-468.
69. Hong, K., Xie, J., Zhang, L., Sun, D., Gong, D., 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 144(1):172-178.
70. Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., Dangl, J.L. 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *The EMBO Journal*, 22(21):5679-5689.
71. Ignatius, S.M.J., Chopra, R.K., Muthukrishnan, S. 1994. Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and β -1,3-glucanases in near-isogenic lines of barley. *Physiologia Plantarum*, 90(3):584-592.
72. ISTA, 1993. International rules for seed testing. Rules 1993. *Seed Science and Technology*, 21(1):1-288.

73. Jolly, C., Morimoto, R.I. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(19):1564–1572.
74. Kananont, N., Pichyangkura, R., Chanprame, S., Chadchawan, S., Limpanavech, P., 2010. Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two *Dendrobium orchids* (Asparagales: Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*. 124(2):239-247.
75. Kasaai, M.R., 2007. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3):477-488.
76. Kato-Yamakake, T.A., Mapes-Sánchez, C., Mera-Ovando, L.M., Serratos-Hernández, J.A., Bye-Boettler, R.A., 2009. El origen y diversificación del maíz en México. UNAM, México, DF.
77. KEGG database. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Japan. Consultado en agosto de 2013. www.genome.jp/kegg
78. Keeler, F.R., Anthony, T.T., 1983. Plant and fungal toxins. *Handbook of Natural Toxins*, 1(1):299-323.
79. Khan, W., Prithiviraj, B., Smith, D.L., 2002. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica*, 40(4):621-624.
80. Khodari, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(1):5-8.
81. Korystov, Y.N., Narimanov, A.A., 1997. Low doses of ionizing radiation and hydrogen peroxide stimulate plant growth. *Biología*, 52(1):121-124.
82. Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Shibato, J., Burow, G., Tissue, D., Burke, J., Puppala, N., Burow, M., Payton, P. 2009. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell and Environment*, 32(4):380–407.
83. Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. 1997. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(11):887-900.
84. Krishnaveni, S., Muthukrishnan, S., Liang, G.H., Wilde, G., Manickam, A. 1999. Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Science*, 144(1):9–16.
85. Lagrimini, M.L., Bradford, S., Rothstein, S., 1992. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 2(1):7–18.

86. Lei, C., Ma, D., Pu, G., Qiu, X., Du, Z., Wang, H., Li, G., Ye, H., Liu, B., 2011. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, 33(1):176-182.
87. Li, J.T., Qiu, Z.B., Zhang, X.W., Wang, L.S., 2011. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiologie Plantarum*, 33(3):835-842.
88. Li, W.L., Faris, J.D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P.D., Gill, B.S. 2001. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3):353-362.
89. Lizárraga-Paulín, E.G, Miranda-Castro S.P, Moreno-Martínez E, Torres-Pacheco I, Lara Sagahón A.V., 2013. Novel Methods for Preventing and Controlling Aflatoxins in Food: A Worldwide Daily Challenge. En: *Aflatoxins- Recent Advances and Future Prospects*. Razzaghi-Abyaneh, M. (Ed.), Rijeka, InTech.
90. Lizárraga-Paulín, E.G., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011a. Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem. En: *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*, Guevara-González, R.G. (Ed.), Rijeka, InTech.
91. Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011b. Protección contra estrés biótico inducida por quitosán en plántulas de maíz (*Zea mays*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(6):813-827.
92. Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011c. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *African Journal of Biotechnology*, 10(34):6439-6446.
93. López-Vera, E., Aguilar-Ramírez, M.B., Heimer de la Cotera, E.P., 2012. Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. Consultado en julio de 2013. (http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=17)
94. MaizeGDB database. Maize Genetics and Genomics Database. USA. Consultado en agosto de 2013. www.maizegdb.org
95. Mallman, C.A., Dilkin, P., 2007. Fumonisin. En: *Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos*. Sociedade Vicente Pallotti (Ed.), Santa María, Brasil, pp. 105-427.
96. Mendoza-Elos, E., Andrio-Enríquez, J.M., Juárez-Goiz, C., Mosqueda-Villagómez, L., Latournerie-Moreno, L., Castañón-Nájera, G., López-Benítez, A., Moreno-Martínez, E., 2006. Contenido de lisina y triptofano en genotipos de maíz de alta calidad proteica y normal. *Universidad y Ciencia*, 22(2):153-161.
97. Metalife. Metalife bioexplorer. Reino Unido. Consultado en agosto de 2013. www.metalife.com

98. Miché, L., Balandreau, J., 2001. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7):3046-3052.
99. Midoh, N., Iwata, M. 1996. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in Rice. *Plant and Cell Physiology*, 37(1):9-18.
100. Miranda, S.P., 2000. Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán. Título de la Patente: 293022, 2011. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México. Número de Expediente: 005444. Número de Folio: 1175930-5.
101. Miranda-Castro, S.P., Lizárraga-Paulín, E.G., 2012. Is Chitosan a new panacea?: areas of application. En: *The Complex World of Polysaccharides*, Nedra-Karunaratn, D. (Ed.), Rijeka, InTech.
102. Mishra, S.K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L., Scharf, K.D. 2013. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development*, In press, doi:10.1101/gad.228802
103. Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., van Camp, W., Willekens, H., Ellis, B.E., 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24):14165–14170.
104. Moffat, A.S., 2002. Finding new ways to protect drought-stricken plants. *Science*, 296(5571):1226-1229.
105. Monasterio, P., Velásquez, L., Alejos, G., Lugo, L., Maturat, W., Tablante, J., Rodríguez, L., Araujo, D. 2007. Desarrollo del cultivo de maíz en función de la propuesta fenológica. *INIA Divulga*. 10(1):59-63.
106. Moreno-Casasola, Patricia. 2003. Vida y obra de granos y semillas. Capítulo IV. *Fondo de Cultura Económica*, D.F., México.
107. Moreno-Martínez, E. 1996. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas, 3° Edición; UNAM, D.F., México.
108. Moreno-Osorio, F., Molina-Restrepo, D., 2007. Buenas prácticas agropecuarias (BPA) en la producción de ganado de doble propósito bajo confinamiento con caña panelera como parte de la dieta. Manual Técnico. *Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Colombia, Medellín, pp. 45-80.
109. Morimoto, R.I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* 12(24):3788–3796.

110. Msanga, H.P., Maghembe, J.A., 1989. Physical scarification and hydrogen peroxide treatment improves germination of *Vangueria infausta* seed. *Forest Ecology and Management*, 28(3-4):301-308.
111. NCBI database. National Center for Biotechnology Information. USA. Consultado en agosto de 2013. www.ncbi.nlm.nih.gov
112. Nover, L. 1987. Expression of heat shock genes in homologous and heterologous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(3):130-144.
113. Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.D. 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 6(3):177-189.
114. Ohta, K., Taniguchi, A., Konishi, N., Hosoki, T., 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience*, 34(2):233-234.
115. Orozco-Cárdenas, M.L, Narváez-Vásquez, J., Ryan, C.A., 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13(1):179-191.
116. Ortega-Ortíz, H., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villarreal, R., Ramírez-Rodríguez, H., de alba Romenus, K., 2007. Enzymatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 51(3): 141-144.
117. Osweiler, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., Witte, S.T., Carson, T.L., Rice, L.G., Nelson, H.A., 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(1):53-59.
118. Ozeretskovskaya, O.L., Vasyukova, N.I., 2002. The use of elicitors for protection of cultured plants demands caution. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(3):277-279.
119. Pelham, H.R.B. 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp70* heat-shock gene. *Cell*, 30(2):517-528.
120. Pelham, H.R.B., Bienz, M. 1982. A synthetic heat-shock promoter element confers heat inducibility on the Herpes simplex virus thymidine kinase gene. *The EMBO Journal*, 1(11): 1473-1477.
121. Peng, Z.Y., Wang, M.C., Li, F., Lu, H.J., Li, C.L., Xia, G. 2009. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(12):2676-2686.
122. PeroxiBase database. The Peroxidases Database. Francia. Consultado en agosto de 2013. <http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>

123. Photchanacha, S., Singkaew, J., Thamthong, J., 2006. Effects of chitosan seed treatment on *Colletotrichum* sp. and seedling growth of chili cv. 'Jinda'. *Acta Horticulturae*, 712(1):585-590.
124. Piernas, V., Guiraud, J.P., 1997. Disinfection of rice seeds prior to sprouting. *J. Food Science*, 62(3):611-615.
125. Ping-Mei, Y., Yu-Kui, R., Xiao-Yan, Y., Zheng, C., Qing, W., Jian-Zhong, D., Yi, S. 2011. Comparison of nutrition composition of transgenic maize (chitinase gene) with its non-transgenic counterpart. *Ciencia e investigación agraria*, 38(1), 149-153.
126. Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78(1-2):21-37.
127. PlantGDB database. Resources for Plant Comparative Genomics. USA. Consultado en agosto de 2013. www.plantgdb.org
128. Platta, H.W., Erdman, R. 2007. Peroxisomal dynamics. *Trends in Cell Biology*, 17(3):474- 484.
129. Quackenbush, J., 2001. Computational genetics: Computational analysis of microarray data. *Nature Reviews Genetics. Computational genetics*, 2(1):418-427.
130. Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T., 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2003(37):91-102.
131. Ramírez J., Comunicación personal, 21 de febrero de 2013.
132. Ramírez, J., Chávez, L., Santillán, J.L., Guzmán, S., 2003. Microarreglos de DNA. En: *Mensaje Bioquímico*. Flores-Herrera, O., Riveros-Rosas, H., Sosa-Peinado, A., Vázquez-Contreras, E., (Eds.), UNAM, México, DF, Vol XXVII.
133. Richter, K., Buchner, J. 2001. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *Journal of Cellular Physiology*, 188(3):281–290.
134. Rinaudo, M., Milas, M., Le Dung, P., 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(5):281-285.
135. Roulin, S., Buchala, A.J. 1995. The induction of 1,3-beta-glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46(6):471–489.
136. Ruan, S.L., Xue, Q.Z., 2002. Effects of chitosan coating on seed germination and salt tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 28(6):803-808.
137. SAGARPA, 2007. Situación Actual y Perspectivas del maíz en México 1996-2012. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*, México D.F, pp. 130.

138. Saiki, T., Kawai, T., Morita, K., Ohta, M., Saita, T., Rokutan, K., Ban, N., 2008. Identification of marker genes for differential diagnosis of chronic fatigue syndrome. *Molecular Medicine*, 14(9-10):599-607.
139. Salceda-Sacanelles, R. 2008. Peroxisomas: Organelos polifacéticos. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(3):85-92.
140. Santiago de Alvarenga, E., 2011. Characterization and Properties of Chitosan. En: *Biotechnology of Biopolymers*, Elnashar, M., (Ed.), Rijeka, Intech.
141. Santini, F., 2005. Uso del maíz en sus varios tipos en la alimentación de vacunos para carne en pastoreo y feedlot. *INTA Balcarce, Argentina*. (www.inta.gov.ar)
142. Sarath, G., Hou, G., Baird, L.M., Mitchell, R.B., 2007. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4-grasses. *Planta*, 226(3):697-708.
143. Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3):355-363.
144. Shao, C.X., Hu, J., Song, W.J., Hu, W.M., 2005. Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. *Journal of Zhejiang University. Agricultural Life Sciences*, 31(6):705-708.
145. Shapiro, M., Preisler, H.K., Robertson, J.L. 1987. Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by chitinase. *Journal of Economic Entomology*, 80(6):1113-1116.
146. Shewry, P., 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*. 46(3):239-250.
147. Shin, M., Kim, J., 2009. Microarray Data Mining for Biological Pathway Analysis. En: *Data Mining and Knowledge Discovery in Real Life Applications*. Ponce, J., Karahoca, A., (Eds.), Rijeka, InTech.
148. Simonetti, E. 2009. Expresión de peroxidasas en trigo hexaploide resistente a *Heterodera avenae*. Tesis. Universidad Politécnica de Madrid.
149. Solórzano, E., Chacón, O., Fernández, A., 2004. Expresión diferencial del peroxidasas, glucanasas y fenilalanina amonio liasas en la interacción tabaco-*Phytophthora parasitica* variedad *nicotianae*. *Revista de Protección Vegetal*, 19(2). 86-96.
150. Sonneveld, C., Voogt, W., 2009. *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*. Springer, New York, USA.
151. Stubbs, R.W., Prescott, J.M., Saari, E.E., Dubin, H.J., 1986. Manual de metodologías sobre las enfermedades de los cereales. CIMMYT. Mexico, D.F., pp. 46.

152. Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F., Werck-Reichhart, D. 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate-4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9):4102–4107.
153. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11(6):1187–1194.
154. Tofiño, A., Romero, H.M., Cabal, D. Sin año. Aspectos moleculares de la inducción y el desarrollo floral. *Corpoica, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Aspectosmolecularesdela%20induccionyeldesarrollo%20floral.pdf>
155. Turgut-Kara, N.; Ari, S. 2011. Analysis of elicitor inducible cytochrome P450 induction in *Astragalus chrysochlorus* cells. *Plant Omics Journal*, 4(5):264-269.
156. Turrent, F.A., Laird, R.J., 1975. La matriz experimental Plan Puebla, para ensayos sobre prácticas de producción de cultivos. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
157. UniProt database. Universal Protein Resource. USA. www.uniprot.org/ Consultado en agosto de 2013.
158. Uthairatanakij, A., Teixeira, J.A., Obsuwan, K., 2007. Chitosan for Improving Orchid Production and Quality. *Science*, 1(1):1-5.
159. Vaz-Martins, D., Olivera, L., Cozzolino, D., 2006. Ensilaje de maíz como componente de la dieta en la fase de terminación de novillos. *Revista INIA, Producción animal*, 7(2006):1-8.
160. Vogelsang, R., Barz, W. 1993. Purification, characterization, and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chick pea (*Cicer arietinum* L.). *Planta*, 189(1):60–69.
161. Wang, X., Ding, X., Gopalakrishnan, B., Morgan, T.D., Johnson, L., White, F., Muthukrishnan S., Kramer, K.J. 1996. Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(10):1055-1064.
162. Weissinger, W.R., Beuchat, L.R. 2000. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate Salmonella on alfalfa seeds. *Journal of Food Protection*, 63(11):1475-1482.
163. Werner, T., 2008. Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(1):50-4.

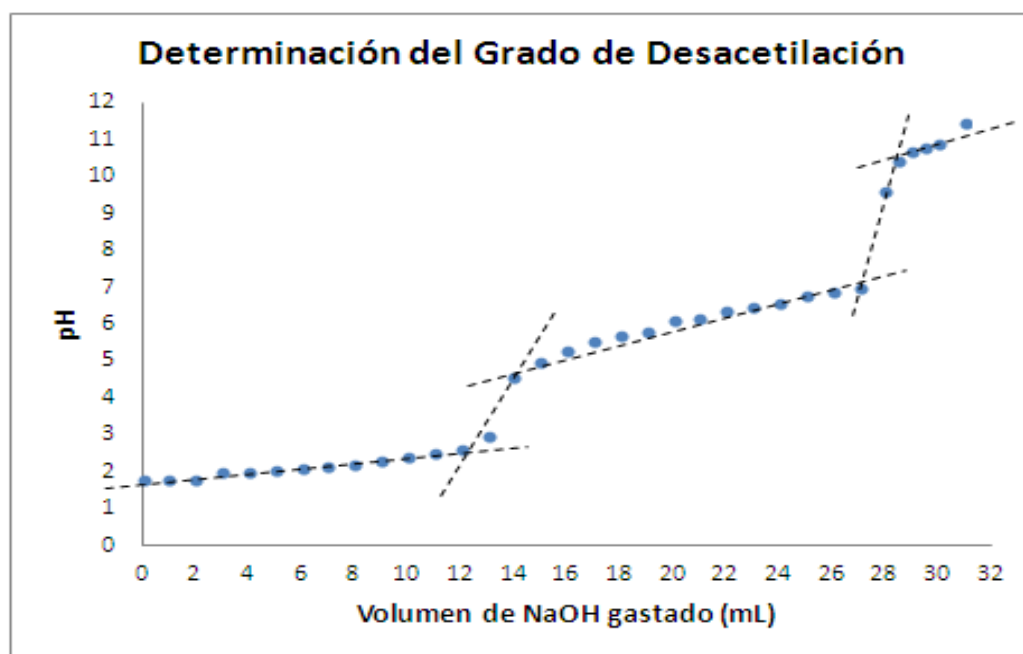
164. Widstrom, N.W., 1996. The aflatoxin problem with corn grain. *Advances in Agronomy*, 56(1):219-280.
165. Willians, C.A., Grayer, R.J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*, 21(1):539-573.
166. Wink, M. 1999. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. *CRC Press*. Boca Raton, USA.
167. Wu, C. 1995. Heat stress transcription factors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1):441-469.
168. Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Shah, D.P., 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7(9):1357-1368.
169. Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I., Shah, D.P., 1997. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology*, 115(2) 427-435.
170. Yang, T., Poovaiah, B.W., 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6):4097-4102.
171. Zemanek, A.B., Ko, T.S., Thimmapuram, J., Hammerschlag, F.A., Korban, S.S. 2002. Changes in β -1,3-glucanase mRNA levels in peach in response to treatment with pathogen culture filtrates, wounding, and other elicitors. *Journal of Plant Physiology*, 159(1):877-889.
172. Zeng, D., Luo, X., Tu, R., 2012. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012(1):1-5.
173. Zeng, K., Deng, Y., Ming, J., Deng, L., 2010. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Scientia Horticulturae*, 126(2):223-228.
174. Zhou, Y.G., Yang, Y.D., Qi, Y.G., Zhang, Z.M., Wang, X.J., Hu, X.J., 2002. Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. *Journal of Peanut Science*, 31(1):22-25.
175. Ziani, K., Ursúa, B., Maté, J.I., 2010. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, 29(8):853-859.

11. ANEXOS

11.1 CARACTERIZACIÓN DE QUITOSÁN

11.1.1 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN POR TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA

El QN a utilizar fue secado en estufa a 105°C. Ya libre de humedad, se pesaron 0.3 g y se disolvieron en 45 mL de HCl 0.2M (J. T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México). Para la titulación, se empleó un potenciómetro previamente calibrado (pH Controller, Horizon Ecology Co, Mod. 599720) para asegurar la confiabilidad de la lectura. El reactivo titulante fue una solución de NaOH 0.1M (J. T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México), el cual fue agregado a la solución de QN en volúmenes de 1mL en 1mL hasta que la muestra adquiriera un pH de 11.0 (Gráfica 25).



Gráfica 25. Determinación del grado de desacetilación del quitosán sintetizado en el laboratorio, mediante el método de titulación potenciométrica.

Se localizaron los puntos de equivalencia por el método gráfico realizando los siguientes cálculos:

$$V_p = (V_{e2} - V_{e1}) / 2000$$

Donde:

V_p = Volumen promedio gastado (L)

V_{e1} = Volumen de equivalencia 1 (mL)

V_{e2} = Volumen de equivalencia 2 (mL)

2000 = Constante para conversión a L

$$V_p = (28.4 - 27) / 2000$$
$$V_p = 0.0007$$

Este valor se sustituye en la siguiente fórmula para obtener la concentración de QN en equivalentes:

$$M_{eq} = (m / [NaOH] * V_p)$$

Donde:

M_{eq} = Concentración (m/v) del QN (eq)

m = masa del QN (g)

[NaOH] = Concentración de NaOH (M)

V_p = Volumen promedio gastado (L)

$$M_{eq} = (0.3 / 0.1 * 0.0007)$$
$$M_{eq} = (0.3 / 0.1 * 0.00007)$$
$$M_{eq} = 4285.714$$

Para así obtener el Grado de Acetilación mediante la siguiente fórmula:

$$\%GA = [203 / (M_{eq} + 42)] * 100$$
$$\%GA = [203 / (4285.714 + 42)] * 100$$
$$\%GA = 4.6906$$

Y finalmente obtener el Grado de desacetilación correspondiente, teniendo que

$$\%GD = 100 - \%GA$$
$$\%GD = 100 - 4.6906$$
$$\%GD = 95.309$$

Por lo que el Grado de Desacetilación del QN empleado en el experimento:

$$GD = 95.31\%$$

11.1.2 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO

El quitosán obtenido se disolvió en buffer de acetatos (pH=4.6), obteniendo una concentración inicial de 0.20 g/dL, a partir de la cual se hicieron diluciones hasta obtener cuatro concentraciones distintas (0.20, 0.15, 0.10 y 0.05 g/dL). A estas soluciones se les determinó su viscosidad relativa, su viscosidad específica y su viscosidad específica reducida en función de la concentración (Tabla 30).

Concentración (g/dL)	Tiempo (seg)				Promedio	Viscosidades		
	1	2	3	4		μ_{rel}	μ_{esp}	μ_{red}
buffer	77.6	79.6	79.6	79.6	79.1			
0.2	135	134.2	133.8	133.8	134.2	1.6965866	0.6965866	3.482933
0.16	113.4	113.6	112	112.8	112.95	1.42793932	0.42793932	2.67462073
0.12	148	107.1	107.6	110	108.233333	1.36831016	0.36831016	3.0692513
0.08	93.2	93	93	92.8	93	1.17572693	0.17572693	2.1965866
0.04	85	84.8	85	85	84.95	1.07395702	0.07395702	1.84892541
0.02	82.6	82.4	81.8	82	82.2	1.0391909	0.0391909	1.95954488
0.01	83.8	83	83.2	83.6	83.4	1.05436157	0.05436157	5.43615676
0.0046	80.8	80.4	80.4	80.6	80.55	1.01833123	0.01833123	3.98504919
0.0025	83.6	83.2	83	83.6	83.35	1.05372946	0.05372946	21.4917826
0.00125	79	79.8	79.4	79.6	79.45	1.00442478	0.00442478	3.53982301

Tabla 30: Determinación de las viscosidades de las soluciones de quitosán a diferentes concentraciones.

Donde:

- Viscosidad Relativa (η_{rel}):

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 = t / t_0$$

donde: $\eta = t =$ solución a diferentes concentraciones
 $\eta = t_0 =$ Buffer

- Viscosidad Específica (η_{esp}):

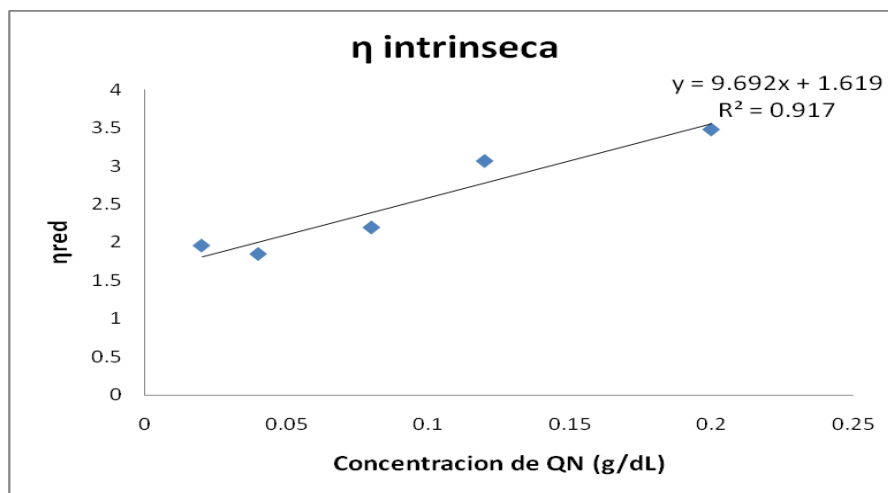
$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1$$

- Viscosidad Específica Reducida (η_{red}):

$$\eta_{red} = \eta_{esp} / []$$

- Viscosidad Intrínseca (μ intrínseca):

Se calculó mediante la gráfica de la concentración (g/dL) contra la η_{red} de todos y cada uno de los puntos (Gráfica 26). A dicha gráfica, se le calcula su regresión lineal. De acuerdo a la ecuación de la recta ($y=mx+b$), el valor de b corresponde a la viscosidad intrínseca de la muestra.



Gráfica 26. Determinación de la viscosidad intrínseca del quitosán sintetizado en el laboratorio.

Por lo tanto, si $b=1.6197$, entonces, μ intrínseca = **1.6197**

El peso molecular se determinó a partir de la ecuación matemática de Mark-Houwink:

$$[\eta]=KM^a$$

Donde:

η =viscosidad intrínseca

a =constante=0.76

K =constante=0.076

M =Peso molecular

Por lo tanto, despejando M , se tiene que:

$$M = 10^{\frac{(\log[\eta]) - (\log K)}{a}}$$

$$M = 55.9996758$$

Por lo que el Peso Molecular del QN empleado para el presente proyecto fue de:

$$PM = 55.99 \text{ KDa}$$

11.2 EXPERIMENTOS EN EL INVERNADERO



Figura 4. Siembra de las semillas



Figura 5. Inoculación de las semillas



Figura 6. Criterio para la determinación de la velocidad de emergencia de las plántulas. a) Coleóptilo, b) Plúmula, c) Plántula de 1 hoja, d) Plántula de 2 hojas.



Figura 7. (Izquierda) Plántulas control emergidas 23 días después de la siembra.



Figura 8. (Derecha) Simulación de cámara húmeda para la imposición de estreses bióticos en plántulas.

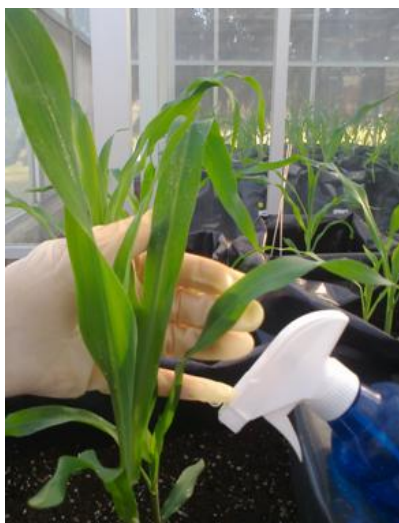


Figura 9. Aspersión con los elicitores.



Figura 10. Clorosis causada por daño fúngico



Figura 11. (Izquierda) Comparación de las longitudes de plántulas. A la izquierda, plántula estresada por sequía. A la derecha, plántula estresada por *A. flavus*, 175 días después de la siembra.



Figura 12. (Central) Formación de las mazorcas, con granos aún en estado lechoso.



Figura 13. (Derecha) Mazorca madura, lista para ser cosechada.



Figura 14. (Izquierda) Formación de mazorcas siamesas (presentes en plantas con estrés inducido).

Figura 15. (Central) Mazorcas con bajo rendimiento de grano (evidente por su escaso grosor)

Figura 16. (Derecha) Recolección de la mazorca madura con rendimiento alto de grano.

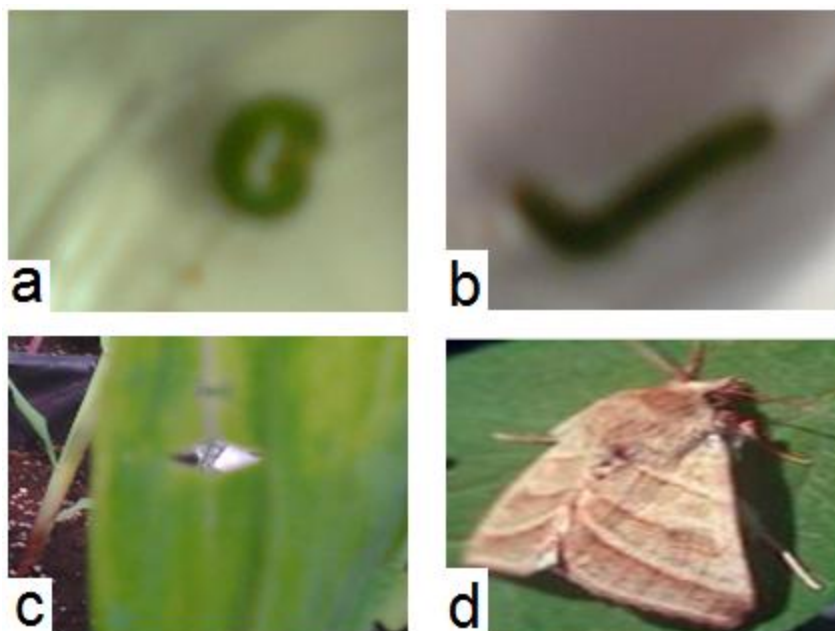


Figura 17. Plaga de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz. a) Enroscamiento del gusano para lograr su camuflaje, b) Posición del gusano en periodos nocturnos, c) Daño causado a la hoja por el gusano cogollero, d) Evolución del gusano a palomilla.

11.3 ANÁLISIS DE MICORARREGLOS

11.3.1 INTEGRIDAD DEL RNA DE LAS PLÁNTULAS DE MAÍZ

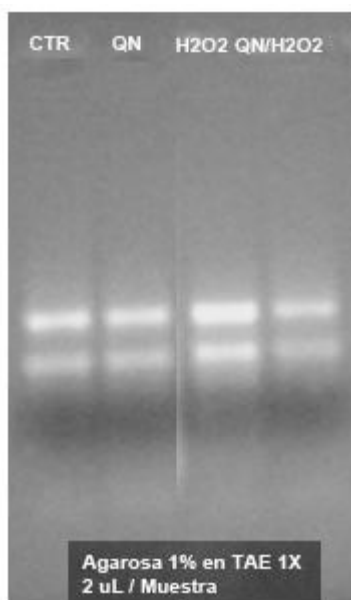


Figura 18. RNA de las plántulas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos

11.3.2 CUANTIFICACIÓN DE MICROARREGLOS

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se requirió del análisis de las imágenes, lo cual se logró mediante programas de cómputo específicos para dichos fines, en los que existen una serie de pasos básicos para la interpretación de estas imágenes. En primer lugar se consideró la aplicación de un filtro para depurar la imagen de pequeñas imperfecciones o señales no deseadas que pudieran encontrarse entre las muestras. Posteriormente se generó una retícula en la que se definen las áreas que se van a cuantificar. Definida la retícula, se determinó una zona de exclusión y el área para calcular la señal de fondo de la imagen. Definidos estos parámetros, el programa calculó la densidad de los píxeles en

Estudio de la respuesta de defensa inducida por estrés de tipo biótico, abiótico y elicitors en plántulas de maíz para consumo animal

cada área definida, dando como resultado una tabla con las coordenadas, los valores de densidad, fondo y señal para cada una de las muestras en el microarreglo (*Tabla 31*). En la presente investigación, se empleó el programa GenArise Microarray Analyzer®, el cual es una herramienta útil para discriminar individuos en el experimento, mediante la eliminación de las señales de fondo y la normalización de los datos por bloques (Ramírez et al., 2003; Ramírez 2013).

Num	meta_row	meta_col	Row	Column	ID	Tigr_ID	Name	Raw intens	Raw intens	Backgroun	Backgroun	Net intensi	Net intensi
1	1	1	1	1	1	MZ000407	TM000407.NP592869	844.9375	135.025	173.321	85.4321	671.6165	578.8086
2	1	1	1	1	2	MZ000407	TM000407.TC245883	795.3375	118.7625	168.9506	82.59259	626.3869	548.4947
3	1	1	1	1	3	MZ000407	TM000407.NP668669	1016.813	123.475	156.3704	85.45679	860.4421	452.3098
4	1	1	1	1	4	MZ000407	TM000407.NP668875	844.95	165.9	159.9136	85.7037	685.0364	615.8972
5	1	1	1	1	5	MZ000407	TM000407.TC241997	625.625	106.0375	156.2716	83.85185	469.3534	420.1479
6	1	1	1	1	6	MZ000407	TM000407.NP671733	780.55	126.1	159.4074	83.91358	621.1426	571.5178
7	1	1	1	1	7	MZ000407	TM000407.AZM4_813	702.65	111.2375	154.4444	85.38272	548.2056	468.1141
8	1	1	1	1	8	MZ000408	TM000408.TC229118	821.35	124.725	154.4321	86.44444	666.9179	531.4585
9	1	1	1	1	9	MZ000130	TM000130.NP003871	1024.3	136.0125	152.4321	85.59259	871.8679	478.8121
10	1	1	1	1	10	MZ000130	TM000130.NP004194	941.975	126.4125	155.3704	86.60494	786.6046	481.4993
11	1	1	1	1	11	MZ000130	TM000130.NP004695	1106.513	1552.888	158.0864	84.32099	948.4261	1254.028
12	1	1	1	1	12	MZ000130	TM000130.NP174416	662.3875	202.425	150.8025	84.60494	511.585	828.9568
13	1	1	1	1	13	MZ000130	TM000130.AZM4_695	905.05	142.3875	156.6914	84.83951	748.3586	553.9172
14	1	1	1	1	14	MZ000130	TM000130.NP432526	839.7875	118.6125	155.1358	84.35803	684.6517	503.1642
15	1	1	1	1	15	MZ000130	TM000130.NP538812	932.0375	197.5	153.0494	85.18519	778.9881	555.7063
16	1	1	1	1	16	MZ000130	TM000130.NP539422	1166.15	358.6125	152.8025	85.19753	1013.348	541.2749
17	1	1	1	1	17	MZ000004	TM000004.AI622173	1010.613	120.5875	150.4074	83.87654	860.2051	440.588
18	1	1	1	1	18	MZ000004	TM000004.TC229757	940.725	160.2	153.358	84.45679	787.367	534.4811
19	1	1	1	1	19	MZ000005	TM000005.AI629905	739.45	123.8125	155.7778	84.92593	583.6722	581.1735

Tabla 31. Fragmento de los resultados obtenidos de la cuantificación de una imagen de microarreglos, correspondiente al maíz con acondicionamiento combinado de QN/H₂O₂.

Ya reducida la cantidad de datos, el programa estadístico llevó a cabo ajustes estadísticos (Quakenbush 2001), a partir de los cuales se obtuvo la desviación estándar de los datos (Z-score), el cual constituye un criterio para la determinación de diferencias entre los distintos genes. De acuerdo al programa se tiene que:

Si: Z-score < 1 → no hay diferencias entre la condición control y experimental

Si: 1 < Z-score < 1.5 → existen diferencias por azar entre las condiciones

Si: Z-score > 1.5 → 90% de probabilidad de diferencias entre condiciones

Si: $1.5 < Z\text{-score} < 2.0 \rightarrow$ 90% de probabilidad de diferencias entre condiciones

Si: $Z\text{-score} \geq 2 \rightarrow$ 90-100% de probabilidad de diferencias entre condiciones

Para el presente trabajo, los genes seleccionados para su estudio fueron aquellos que cumplieron con la condición de $Z\text{-score} \geq 2$, asegurando de este modo la confiabilidad de los resultados encontrados (*Tabla 32*). Este tamiz se llevó a cabo tanto para los genes sobreexpresados como para los genes silenciados para las tres condiciones experimentales (QN, H_2O_2 y QN/ H_2O_2)

Cy3	Cy5	Id	Symdesc	Zscore
211	326	TM00007268	CD438927	2.15201
222	325	TM00047441	AZM4_12507	2.26443
217	352	TM00048116	AZM4_13781	2.34463
210	379	TM00048199	AZM4_13935	2.29865
220	374	TM00007526	TC231415	2.08385
207	400	TM00052191	AZM4_95540	2.71716
220	379	TM00050606	AZM4_60935	2.35976
228	369	TM00046603	AZM4_10525	2.33955
231	367	TM00048302	AZM4_14508	2.48243
240	359	TM00037662	TC238631	2.21206
222	394	TM00003064	AZM4_13391	2.55524
230	384	TM00007994	CD942666	2.3117
235	376	TM00031631	TC230168	2.37684
232	387	TM00046591	AZM4_10502	2.17596
231	389	TM00051009	AZM4_69742	2.17157
236	381	TM00008695	CD960252	2.03652

Tabla 32. Fragmento de algunos de los genes sobreexpresados encontrados mediante la cuantificación de microarreglos en función de su valor de Z-score, correspondiente al maíz con acondicionamiento combinado de QN/ H_2O_2 .

Finalmente, esta información fue complementada con las bases de datos en donde se obtuvo el nombre del gen de interés, su función, la vía metabólica a la que pertenece, su ubicación celular, entre otra información disponible.

11.4 ANOTACIONES DE LOS GENES SOBREENPRESADOS Y SILENCIADOS POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS

11.4.1 GENES SOBREENPRESADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON QN

https://dl.dropboxusercontent.com/u/47054980/UP_QN_annot.xls

11.4.2 GENES SOBREENPRESADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON H₂O₂

https://dl.dropboxusercontent.com/u/47054980/UP_H2O2_annot.xls

11.4.3 GENES SOBREENPRESADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO

https://dl.dropboxusercontent.com/u/47054980/UP_COMB_annot.xls

11.4.4 GENES SILENCIADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON QN

https://dl.dropboxusercontent.com/u/47054980/DW_QN_annot.xls

11.4.5 GENES SILENCIADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON H₂O₂

https://dl.dropboxusercontent.com/u/47054980/DW_H2O2_annot.xls

11.4.6 GENES SILENCIADOS POR EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO

https://dl.dropboxusercontent.com/u/47054980/DW_COMB_annot.xls

11.5 ARTÍCULO

Lizárraga-Paulín et al. / J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol) 2013 14(2):87-96

87

Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)
ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783 (Online)
www.zju.edu.cn/jzus; www.springerlink.com
E-mail: jzus@zju.edu.cn



Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors

Eva-Guadalupe LIZÁRRAGA-PAULÍN¹, Susana-Patricia MIRANDA-CASTRO^{†‡1},
Ernesto MORENO-MARTÍNEZ², Alma-Virginia LARA-SAGAHÓN¹, Irineo TORRES-PACHECO³

¹Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1,
Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México 54740, México)

²Unidad de Investigación en Granos y Semillas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Centro de Asimilación Tecnológica,
Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México 54740, México)

³CA Ingeniería de Biosistemas, División de Investigación y Posgrado, Facultad de Ingeniería,
Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro 76010, México)

[†]E-mail: spmcunam55@gmail.com

Received Oct. 5, 2012; Revision accepted Dec. 18, 2012; Crosschecked Jan. 2, 2013

Abstract: Objective: To evaluate the effect of chitosan (CH) and hydrogen peroxide (H₂O₂) seed coatings and seedling sprayings on two different maize varieties by measuring their phenology, the H₂O₂ presence, the catalase (CAT) activity, and the protein quantity. Methods: Seven groups of ten seeds for each maize variety were treated with CH (2% (20 g/L) and 0.2% (2 g/L)) or H₂O₂ (8 mmol/L) by coating, sprinkling, or both. Germination and seedling growth were measured. One month after germination, the presence of H₂O₂ in seedlings in the coated seed treatments was evaluated. Protein content and CAT activity were determined under all treatments. Results: H₂O₂ seed coating enhanced the germination rate and increased seedling and stem length in the quality protein maize (QPM) variety. Seedlings had a higher emergence velocity under this treatment in both varieties. CH and H₂O₂ sprayings did not have an effect on seedling phenology. Exogenous application of H₂O₂ promoted an increase of endogenous H₂O₂. CH and H₂O₂ seedling sprinkling increased the protein content in both maize varieties, while there was no significant effect on the CAT activity of treated seeds and seedlings. Conclusions: CH and H₂O₂ enhance some phenological and biochemical features of maize depending on their method of application.

Key words: *Zea mays*, Chitosan, Hydrogen peroxide, Phenology, Catalase, Protein

doi:10.1631/jzus.B1200270

Document code: A

CLC number: Q94; Q539

1 Introduction

Worldwide cereal crops are currently threatened by adverse environmental conditions and pathogen attacks which impede optimum seed germination, diminishing significantly seedling growth and productivity. Specifically, these conditions can be

observed in the production of maize (*Zea mays*), one of the most important crops in the world. Both maize production and nutritional quality have been seriously affected. According to the Food and Agriculture Organization, during 2010, 844405181 tons of maize were produced globally, a mere 3.01% increase over 2009 production levels (FAOSTAT, 2010). With these threats to human and animal food security in mind, researchers have been looking for new methods to enhance maize production and improve its quality.

[‡] Corresponding author

© Zhejiang University and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

In order to increase seed germination and plant phenology, the application of some chemical and biochemical substances has been tested in different crops, focusing on the use of salicylic acid (Khodari, 2004), abscisic acid (Sarath *et al.*, 2007), and more recently, hydrogen peroxide (H_2O_2). Although H_2O_2 has been used for years to disinfect seeds prior planting (Piernas and Guiraud, 1997; Weissinger and Beuchat, 2000; Miché and Balandreau, 2001), it has recently been found that the exogenous application of vital cellular component to seeds and plants has positive effects over them. H_2O_2 treatment increases seed germination rates (Korystov and Narimanov, 1997; Amjad *et al.*, 2004; Çavusoglu and Kabar, 2010), coleoptile emergence percentages, radicle and coleoptile elongation, and fresh weights of the seedlings (Çavusoglu and Kabar, 2010). H_2O_2 is coupled with important functions in metabolism, homeostasis of plants and reactive oxygen species (ROSs) generation too. It has been reported that soaking seeds in H_2O_2 induces a pronounced increase in enzymes activity levels, including catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and superoxide dismutase (SOD) (Gondim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). These enzymes play an important role on naturally over-expressing stress responses and signal activation at biochemical level.

Some authors have reported negative aspects in the use of H_2O_2 . For example, exogenous H_2O_2 poisons seedlings and reduces seed germination due to excessive activation of ROSs (Edwards and Sutherland, 1979; James and Genz, 1981; Pernezny *et al.*, 2002).

Chitosan (CH) is another chemical that has recently been used in plant protection. This biopolymer is a large cationic polysaccharide mainly obtained from waste materials from seafood processing (Guan *et al.*, 2009), with antiviral, antibacterial, and antifungal properties (El-Hadrami *et al.*, 2010). When CH is applied to plant seeds, their germination index is enhanced, the mean germination time is reduced, shoot height, root length, and seedling vigor are increased (Bhaskara Reddy *et al.*, 1999; Ruan and Xue, 2002; Shao *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2009; Kananont *et al.*, 2010; Ziani *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2012), vegetative growth is increased, time to flowering is reduced (Ohta *et al.*, 1999), and fresh weight is increased (Asghari-Zakaria *et al.*, 2009). CH has been

applied not only to seeds but also to seedlings. CH foliar application on strawberry crops increases plant height and number of leaves, augments leaf fresh and dry weights, and enhances the number and weight of seedlings (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). It has been reported that CH has effects not only at the phenological level but also at the enzymatic level. This is evidenced by peroxidase (POD) and CAT activity level increases in the protein extract of some edible cultivars like tomato, guava, and sweet wormwood that were treated with CH (Ortega-Ortiz *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012). The inhibition of CAT activity (Zeng *et al.*, 2010) is important in plant development, defense, aging, and senescence too (Yang and Poovaiah, 2002). Although, there are multiple reports of CH application in food production, there are not reports for the effect of CH application on crop nutritional value.

Research into the effects of CH and H_2O_2 has targeted application at seed and seedling levels, because in these early stages most of the biochemical and enzymatic mechanisms are initiated, having continuing effects on growth as the plant continues to develop.

The aim of this investigation was to evaluate the effects of CH and H_2O_2 seed coatings, and CH and H_2O_2 sprinklings on seedlings of two different varieties of maize by measuring their phenology, H_2O_2 presence, enzymatic activity, and protein quantity under both chemical treatments. To carry out this investigation, we evaluated *in vivo*, during short periods of time and under greenhouse conditions, the effect of coating corn seedlings with CH and H_2O_2 on their germination and growth (thickness of stems, total length of the leaves and stems) of seedlings. After one month of growing, the presence of H_2O_2 was evaluated in treated plants in order to determine if the use of H_2O_2 and CH enhance H_2O_2 production. Then, CAT activity was determined in seedling leaves from treated plants. Finally, plant proteins were quantified in order to know if the application of CH and H_2O_2 increased protein content.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Two maize seed varieties were used in this

experiment: a normal variety (N-279, with a moisture content of 11.5% and a germination rate of 100%), and a high quality protein maize variety (QPM-374, with a moisture content of 11.7% and a germination rate of 100%) obtained from the Maize Breeding Program of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) based in the Campo Experimental del Bajío, México. CH for maize treatment was obtained from chitin shrimp exoskeletons, with a molecular weight of 125 kDa and a deacetylation degree of 92%, and it was produced and characterized in our laboratories without further purification (Miranda, 2000). H₂O₂ (30%) of reagent grade was obtained from Fermont, Productos Químicos de Monterrey, SA de CV, Monterrey, NL, Mexico, with a molecular weight of 34.01 g/mol.

2.2 Preparation of coating and sprinkling solutions

A 2% (20 g/L) CH solution was prepared, dissolving 10 g of the biopolymer in 500 ml of water acidified with acetic acid (Meyer Chemical SA de CV, Tlahuac, DF, Mexico), and kept under constant agitation for 24 h before its pH was adjusted to 5.0 with a 12% (120 g/L) sodium hydroxide solution (JT Baker, Xalostoc, Edo., de Mexico, Mexico). An 8 mmol/L H₂O₂ solution was prepared, diluting 4.074 ml of commercial reagent in 500 ml of distilled water, reaching a pH of 7.8. For seedling sprinkling, a 0.2% (2 g/L) CH solution was prepared, dissolving 1 g of the biopolymer in 500 ml of acidified water, under the same conditions as the CH seed coating preparation. The same H₂O₂ seed coating preparation was used for seedling sprinkling.

2.3 Seed and seedling treatments

Fourteen groups were formed (each one of ten seeds, sowing one seed per pot): seven groups of the normal variety and seven groups of QPM maize. The first group was considered to be a control (with no treatment); in the second group, seeds were coated with CH; in the third group seedlings were sprinkled with CH; the fourth group was submitted to a combined treatment (seed coating and seedlings sprinkled with CH); in the fifth group seeds were coated with H₂O₂; in the sixth group seedlings were sprinkled with H₂O₂; and the seventh group was submitted to a combined treatment (seeds coating

and seedling sprinkling with H₂O₂).

CH treated seeds were soaked in the 2% CH solution for 12 h and then they were dried in an oven at 29 °C for 24 h to counteract the effects of excessive moisture on the seeds by treatment with the biopolymer solution. H₂O₂-treated seeds were soaked in the 8 mmol/L solution for 12 h and were not dried. Maize seedlings were sprinkled with the CH and H₂O₂ solutions, finely the entire seedling canopy.

The study was conducted in the greenhouse of the Grains and Seeds Research Unit in Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, UNAM, which was previously sanitized in order to carry out the planting under protected conditions (ISTA, 1993; Albajes *et al.*, 1999; Sonneveld and Voogt, 2009) to avoid interference in the experimentation results. The substrate on which seeds were seeded was prepared using Sunshine mixture #3[®] (Sun Gro Horticulture Inc., Canada CM, Ltd.) enriched with perlite Hortiperl[®] (Termolita SA de CV, México) in a proportion of 10:1. Seeds were sown at a depth of 3 cm, and pots were irrigated with municipal tap water.

2.4 Evaluation of maize seedling germination

All seeds were sown at the same time. Germination was evaluated until seeds reached the final stages of germination (Monasterio *et al.*, 2007).

2.5 Evaluation of maize seedling growth

First, seedling emergence velocity was evaluated nine days after sowing. Different numbers were given to each emergency phase: 0 for non germinated seeds, 1 for coleoptiles, 2 for plumules, 3 for seedlings with one leaf seedlings, and 4 for seedlings with two leaves. Then, seedling growth was assessed in two stages: 19 d after planting (where the seeds were only coated but not sprinkled with CH and/or H₂O₂), and on the 13th day (because at this stage seeds were coated and seedlings were sprinkled 5 d before). Stem length, sheet length, overall seedling length, and stem diameter were measured.

2.6 Diaminobenzidine (DAB) staining for determining the presence of H₂O₂

This test was carried out only with seedlings grown from coated seeds. The DAB solution was prepared by homogeneously mixing 25 mg of

3,3'-diaminobenzidine and 25 ml of 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 10 mmol/L, and adjusting it to pH=3.8. The plant material (maize leaves) was cut into short pieces and immersed in DAB solution for 8 h and then, faded in several washes of methanol in a heated water bath. Once faded, the plant material was stored in 50% glycerol for preservation, and the presence of H₂O₂ was determined according to Thordal-Christensen *et al.* (1997).

2.7 Quantification of total proteins

Maize leaf samples were ground in liquid nitrogen with a mortar pre-cooled to 4 °C, obtaining a fine tissue dust, which was transferred to Falcon tubes in order to clean the sample with acetone powders, adding 5 volumes of acetone per volume of tissue. The system was stirred by inversion and stored for 24 h at 4 °C. After this time, the system was transferred to Eppendorf tubes and was centrifuged at 4000 r/min for 15 min to ensure tissue precipitation. The supernatant (which contained chlorophyll and other organic compounds) was discarded. Then, the tissue pellet was resuspended in 0.05 mol/L phosphate buffer at pH 7, and was centrifuged at 13000 r/min for 15 min to ensure the protein extraction; the supernatant (enzyme extract) was recovered (Castro-Rivera *et al.*, 2006; Ortega-Ortíz *et al.*, 2007). Protein quantification was made by the Bradford method, adjusting it to micro-plate technique. Each reaction mixture was prepared using 200 µl of 1:5 Bradford (1976) reagent and 10 µl of the enzyme extract, carrying them directly into the micro-plate wells. The blank was prepared with 200 µl of Bradford reagent 1:5 and 10 µl of phosphate buffer used for extraction. Samples and blank were incubated during for 5 min at room temperature and the corresponding absorbance values were read on a spectrometer (Spectronic 20D⁺ Digital, Sargent-Welch) at a wavelength of 620 nm. The calibration curve was prepared from solutions of bovine serum albumin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) of known concentrations. Determination was made by triplicate.

2.8 Determination of total CAT

The activity of CAT was assayed as described by Ortega-Ortíz *et al.* (2007) with the following modifications: the reaction mixture was prepared using

6 ml of the enzyme extract and 1 ml of 0.022 mol/L H₂O₂. The phosphate buffer solution was used as a blank. Sample absorbance values were read immediately (to prevent oxidation of H₂O₂) in an UV-Vis spectrophotometer (Spectronic 20D⁺ Digital, Sargent-Welch) at a wavelength of 240 nm. The calibration curve was prepared from reagent grade H₂O₂ solutions (Fermont, Productos Químicos de Monterrey, SA de CV, Monterrey, NL, Mexico) of known concentrations. Determination was made by triplicate.

2.9 Data analyses

Differences between treatments were analyzed by analysis of variance (ANOVA) for experiments with one factor and a completely randomized design, with a post hoc analysis by Tukey test using the computer program JMPTM Release 5.0.1.2 (SAS Institute Inc., USA). Mean values with statistical difference of $p < 0.05$ were considered to be significant.

3 Results

3.1 Effect of coatings on seed germination

A percentage of 98.57% of planted seeds reached their final phase of germination nine days after sowing. As shown in Fig. 1, it was found that there was a significant difference between germination percentages by maize variety, namely, normal

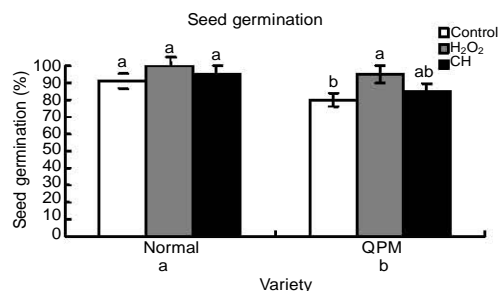


Fig. 1 Germination percentage means by variety and seed coating

Different letter(s) above the bars indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among treatments within the same variety. Different letter(s) below the bars indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among varieties regardless of treatment

variety seeds had higher germination rates ($p=0.0017$). It was found that H_2O_2 was an effective seed coating in QPM variety seeds, promoting a higher germination percentage than the control ($p=0.0028$). There were no significant differences in germination percentages among coatings in the normal variety.

3.2 Effect of coatings on seedling emergence velocity

Seeds from both varieties under H_2O_2 coating emerged quicker than either those coated with CH or the control group ($p<0.0001$). The behavior of the control and the CH-coated seedlings was the same. According to varieties, normal seedlings emerged significantly quicker than the QPM ones ($p=0.6576$) (Fig. 2).

3.3 Phenological seedling evolution under CH and H_2O_2 treatments

Nineteen days after planting but before sprinkling, seedlings from coated seeds were measured. There were no significant differences in

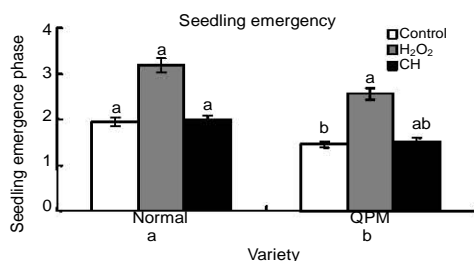


Fig. 2 Emergence means of seedlings from coated seeds

Different letter(s) above the bars indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among treatments within the same variety. Different letter(s) below the bars indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among varieties regardless of treatment

the response variable measurements irrespective of treatment for the normal variety (Table 1). In the QPM variety, H_2O_2 coating promoted increased stem length when compared with CH coating and the control. Similarly, the length of seedlings from H_2O_2 coating was greater than the corresponding control. QPM leaf length and stems thickness did not present significant differences by treatment.

Phenological measurements performed on Day 30 were necessary to determine whether the seedling applications of CH and H_2O_2 coatings and sprinkling promoted a change in physical characteristics. As shown in Table 2, neither normal variety nor the QPM one present significant differences between dimensions in any of the growth responses measured.

3.4 Presence of H_2O_2

In this qualitative test, the presence of H_2O_2 was manifested by a red-brown coloration in leaves. H_2O_2 was positive in all groups. As described in Table 3, the variety with the highest presence of H_2O_2 was QPM because the brownish color resulting from DAB coloration was evident in the cleavage site forming a wider colorful perimeter than the corresponding normal sample. The normal variety showed more coloration under H_2O_2 treatment, followed by CH and finally the control. QPM showed more presence of H_2O_2 in the control, followed by H_2O_2 and then those treated with CH.

3.5 Seedling protein content

This assessment, performed on tissue samples taken from seedlings 30 d after planting, showed that the highest protein content was present in the leaves of plants sprinkled with CH or H_2O_2 independent of the variety used (Table 4).

Table 1 Effect of seed coating with CH and H_2O_2 on the phenological variables, 19 d after planting in the greenhouse

Variety	Coating treatment	Seedling length (cm)	Leaf length (cm)	Stem length (cm)	Stem thickness (mm)
Normal	Control	38.19±2.35 a	28.46±2.31 a	9.73±0.22 a	5.25±0.14 a
	CH	42.66±2.88 a	32.99±2.83 a	9.67±0.27 a	5.54±0.17 a
	H_2O_2	40.00±2.86 a	29.83±2.81 a	10.17±0.27 a	5.76±0.17 a
QPM	Control	36.97±0.57 b	27.26±0.48 a	9.71±0.19 b	5.96±0.14 a
	CH	37.40±0.61 ab	27.84±0.59 a	9.56±0.23 b	5.91±0.17 a
	H_2O_2	39.25±0.89 a	28.75±0.60 a	10.49±0.23 a	5.81±0.18 a







Values are expressed as mean±standard error (SE). Different letter(s) following the values indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among treatments within the same variety

Table 2 Effect of seed coating and seedling sprinklings on the phenological variables, 30 d after planting in the greenhouse

Variety	Coating/sprinkling treatment	Seedling length (cm)	Leaf length (cm)	Stem length (cm)	Stem thickness (mm)
Normal	Control	65.68±1.90 a	49.57±1.36 a	16.11±2.84 a	6.45±1.21 a
	CH/none	65.96±1.76 a	49.64±1.36 a	16.32±1.85 a	6.68±1.21 a
	None/CH	69.53±1.73 a	52.89±1.34 a	16.64±2.47 a	6.71±1.19 a
	CH/CH	67.16±1.73 a	51.08±1.34 a	16.07±3.43 a	6.69±1.19 a
	H ₂ O ₂ /none	67.36±1.73 a	51.08±1.34 a	16.27±2.18 a	9.71±1.19 a
	None/H ₂ O ₂	67.45±1.73 a	51.05±1.34 a	16.40±2.00 a	7.11±1.19 a
	H ₂ O ₂ /H ₂ O ₂	71.63±1.73 a	54.47±1.34 a	17.16±2.76 a	7.27±1.19 a
QPM	Control	67.53±1.60 a	50.76±1.34 a	16.76±0.43 a	7.52±0.26 a
	CH/none	67.47±1.60 a	49.86±1.34 a	17.61±0.43 a	7.34±0.26 a
	None/CH	69.78±1.60 a	52.59±1.34 a	17.19±0.43 a	7.48±0.26 a
	CH/CH	68.40±1.63 a	51.56±1.37 a	16.84±0.43 a	7.57±0.26 a
	H ₂ O ₂ /none	69.51±1.69 a	52.34±1.42 a	17.17±0.45 a	7.64±0.27 a
	None/H ₂ O ₂	67.83±1.60 a	50.85±1.34 a	16.98±0.43 a	7.55±0.26 a
	H ₂ O ₂ /H ₂ O ₂	68.75±1.60 a	50.99±1.34 a	17.76±0.43 a	7.17±0.26 a

Values are expressed as mean±standard error (SE). Different letter(s) following the values indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among treatments within the same variety

Table 3 Qualitative analyses of H₂O₂ presence in maize leaves from CH and H₂O₂ treated seedlings by DAB technique

Normal group		Stereoscopic observation	OPM group		Stereoscopic observation
Control	Presence of H ₂ O ₂ in the ribs and in the middle of the sheet		Control	Presence of H ₂ O ₂ in the entire sheet with great intensity mainly in ribs and cleavage	
H ₂ O ₂	Presence of H ₂ O ₂ in the whole leaf, mainly in ribs and cleavage site, with an intense color		H ₂ O ₂	Presence of H ₂ O ₂ in secondary veins, but mainly in cleavage sites. The midrib acquired subdued colors	
CH	Slight presence of H ₂ O ₂ in the main rib; little coloration in the edges, despite the cleavage		CH	Same manifestations of presence of H ₂ O ₂ in secondary veins, midrib and cleavage sites	

Dark areas in the leaf images indicate the presence of endogenous H₂O₂

3.6 Specific activity of CAT

There was no statistically significant difference in terms of CAT specific activity in any treatment or in any variety, indicating that this enzyme does not enhance its activity when either CH or H₂O₂ is applied to maize seeds as coatings (Table 5).

4 Discussion

Germination is a key step when sowing seeds, because if we do not have a good germination, productivity will decrease since the beginning. In this

experiment, although maize seed technical data indicated that the germination rate was 100% for both varieties, experimentally and under greenhouse conditions, we found that the germination rate was 85% in all cases, indicating good quality seeds in general. In the case of QPM maize seeds, the application of H₂O₂ coating promoted an increased germination when compared with the control; nevertheless, the normal variety did not show improvement on germination rates under any seed coating regime. These results match the pioneer reports of Hameed *et al.* (2004) and Msanga and Maghembe (1989), which showed that exogenous application of H₂O₂ to seeds enhanced germination. Normal

Table 4 Effect of seed coating and seedling sprinkling with CH and H₂O₂ on the protein content 30 d after planting in the greenhouse

Variety	Coating/sprinkling treatment	Protein content (µg)
Normal	Control	21.317±3.538 c
	CH/none	16.104±3.538 c
	None/CH	51.470±3.538 a
	CH/CH	40.440±3.538 a
	H ₂ O ₂ /none	24.610±3.538 bc
	None/H ₂ O ₂	42.281±3.538 a
	H ₂ O ₂ /H ₂ O ₂	37.484±3.538 ab
QPM	Control	14.761±4.595 b
	CH/none	34.213±4.595 ab
	None/CH	41.483±4.595 a
	CH/CH	31.469±4.595 ab
	H ₂ O ₂ /none	15.831±4.595 b
	None/H ₂ O ₂	42.535±4.595 a
	H ₂ O ₂ /H ₂ O ₂	39.334±4.595 a

Values are expressed as mean±standard error. Different letter(s) following the values indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among treatments within the same variety

Table 5 Effect of seed coating and seedling sprinkling with CH and H₂O₂ on the CAT activity 30 d after planting in the greenhouse

Variety	Coating/sprinkling treatment	CAT activity (µmol of destroyed H ₂ O ₂ /min·mg protein)
Normal	Control	1720.640±447.96 a
	CH/none	2819.153±447.96 a
	None/CH	2834.457±447.96 a
	CH/CH	3203.963±447.96 a
	H ₂ O ₂ /none	1879.146±447.96 a
	None/H ₂ O ₂	2804.873±447.96 a
	H ₂ O ₂ /H ₂ O ₂	3280.392±447.96 a
QPM	Control	3985.62±47741 a
	CH/none	3109.18±47741 a
	None/CH	3266.59±47741 a
	CH/CH	3728.48±47741 a
	H ₂ O ₂ /none	3774.02±47741 a
	None/H ₂ O ₂	128795.27±47741 a
	H ₂ O ₂ /H ₂ O ₂	2906.41±47741 a

Values are expressed as mean±standard error. Different letter(s) following the values indicate significant difference ($p=0.05$, Tukey) among treatments within the same variety

variety germination rates were higher than those for the QPM variety. CH coating did not promote higher seedling germination rates. This result contradicts some findings, because it has been reported that

maize seed priming with CH enhances germination index; nevertheless, this finding was made under low temperatures (about 15 °C) using CH concentration from 0.25% (2.5 g/L) to 0.75% (7.5 g/L), and in previous studies the characteristics of CH have not been reported (Guan *et al.*, 2009). It also contradicts what has been found in other cultivars, because germination ability is improved in wheat when priming seeds with CH at a concentration of 2–8 mg/ml (Bhaskara Reddy *et al.*, 1999), peanuts (Zhou *et al.*, 2002) and rice seeds coated with 1.5% (15 g/L) CH solution (Ruan and Xue, 2002). We chose to use a 2% (20 g/L) CH solution for coating seeds because at this concentration, CH not only enhances maize phenological characteristics, but also protects the crop against biotic and abiotic stresses (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011a; 2011b). Variations on the response of CH on seed germination can be due to the biopolymer concentrations used, the specific seed and crop features, the conditions under which the cultivar is produced (specially temperature) and even the characteristics of CH, such as, the molecular weight or the deacetylation degree, which can vary drastically depending on the biopolymer extraction method or even the prime matter from which it is obtained.

Seedlings from H₂O₂-coated seeds emerged quicker than the control and the CH-coated ones (between which there were no significant differences in emergence). It could be because H₂O₂ stimulates seed germination and sprouts growth due to the oxidative stress caused by ROS at cellular level (Korystov and Narimanov, 1997).

A large portion of the maize plants grown in the field is destined to become forage (stubble), and is the basis of animal alimentation; that's why researchers are looking for producing a larger amount of the cereal. According to the phenological variables evaluated in this experiment, we found that 19 d after planting, QPM seedlings from H₂O₂-treated seeds showed greater physical growth than the others. Principally, this was demonstrated by stem length, because stems from H₂O₂-treated seeds were higher than the other treatments and the other variety. Thirty days after planting, no significant differences were found between treatments, even when seeds were not only coated, but their seedlings were also sprinkled with the corresponding treatments. This indicates that CH and H₂O₂ sprinklings do not favor phenological

characteristics; only seed coating alters some physical characteristics on the plant. We expected to find a response when applying by a foliar way the CH or H₂O₂ solutions, because it has been reported that this treatment affects the photosynthetic rate of some crops, increases the stomatal conductance and transpiration rate, and promotes plant development, specially leaves length (Khan *et al.*, 2002). Maybe sprinkling solution concentrations need to be increased in order to promote a higher conductance inside the plant.

ROSs are involved in many important plant processes, principally in those involved in defending plants against stress. H₂O₂ can be produced either directly or as a result of superoxide dismutation. It can diffuse into cells activating some enzymes, especially CAT and POD (Apel and Hirt, 2004). Evaluating the presence of H₂O₂ in plants, (qualitatively POD), it was found that when applying H₂O₂ by seed coating, endogenous H₂O₂ was produced in the leaves, particularly in stressed sites (cleavages sites). The application of CH by seed coating promoted the endogenous manifestation of H₂O₂, too. Nevertheless, it was qualitatively lesser than the coloration acquired by H₂O₂. The respective controls showed almost no coloration. This indicates that the POD activity increases when applying exogenous H₂O₂ to the seeds, making the plant able to resist pathogens attacks and allowing it to initiate defense mechanisms against stresses (Bradley *et al.*, 1992; Camarena-Gutiérrez and de la Torre-Almaráz, 2007), and generating major concentrations of ROSs.

CH and H₂O₂ sprinkling favored the production of proteins in maize seedlings, turning this treated cereal into a high quality food for animal consumption. Both varieties showed an increase in protein content according the treatments, because independently of being coated or not, those seedlings which were sprinkled with any of the substances, promoted more protein generation. In the case of QPM seedlings, sprinkling treatments with H₂O₂ and CH are encouraging, because they have the potential to turn this crop into an even higher quality "QPM", with not only excellent lysine and triptophane levels, but also a high protein content. There are still no reports of the effect of sprinklings on cereals for enhancing their protein quantity. Digestibility and well-use tests must be performed in order to give a better understanding

of the benefits of this enriched cereal for animals.

According to some reports, it was expected that CAT activity would increase with the application of H₂O₂ and CH as reported by Ortega-Ortíz *et al.* (2007), Guan *et al.* (2009), Lei *et al.* (2011), and Hong *et al.* (2012). However, no significant differences were found when evaluating the specific activity of CAT in all treated plants. CH and H₂O₂ applications do not enzymatically favor plant development, so other treatments need to be purposed to improve maize defense, aging, and senescence.

Application of CH and H₂O₂ to maize plants, enhance some characteristics at seed and seedling levels, generate good quality individuals in the germination stage, during growth, in terms of their peroxide production and their nutritional quantity. Despite these advances, more research is needed to produce cultivars with improved characteristics that allow for the use of growth-improving treatments harmless to both the plant and the consumer.

Acknowledgements

To CONACyT for the scholarship 252089/214631.

To PAPIIT program No. IT220411-3 "Estudio fitopatológico, bioquímico y molecular de la respuesta contra estreses bióticos y abióticos en plántulas de maíz", for financial support.

References

- Abdel-Mawgoud, A.M.R., Tantawy, A.S., El-Nemr, M.A., Sassine, Y.N., 2010. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. *Eur. J. Sci. Res.*, **39**(1):161-168.
- Albajes, R., Gullino, M., Lodovica, J.C., Elad, Y., 1999. Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Kluwer Academic Publishers. New York, USA.
- Amjad, H., Shafqat, F., Nayyer, I., Rubina, A., 2004. Influence of exogenous application of hydrogen peroxide on root and seedling growth on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, **6**(2):366-369.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**(1):373-399. [doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701]
- Ashgari-Zakaria, R., Maleki-Zanjani, B., Sedghi, E., 2009. Effect of in vitro chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. *Plant, Soil*

- Environ.*, **55**(6):252-256.
- Bhaskara Reddy, M.V., Arul, J., Angers, P., Couture, L., 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem.*, **47**(3):1208-1216. [doi:10.1021/jf981225k]
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**(1-2):248-254. [doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3]
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., 1992. Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein—a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**(1):21-30. [doi:10.1016/0092-8674(92)90530-P]
- Camarena-Gutiérrez, C., de la Torre-Almaráz, R., 2007. Systemic acquired resistance in plants: current status. *Chapingo J. For. Environ. Sci. Serie*, **12**(2):25-30 (in Spanish).
- Castro-Rivera, J.A., Baquero-Duarte, L.E., Narváez-Cuenca, C.E., 2006. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase from pitaya amarilla fruits (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*, **35**(1):91-101.
- Çavusoglu, K., Kabar, K., 2010. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. *Eur. Asian J. Biosci.*, **4**:70-79. [doi:10.5053/ejobios.2010.4.0.9]
- Edwards, D.G.W., Sutherland, J.R., 1979. Hydrogen peroxide treatment of abies seeds. Canadian Forest Service. *Bi-monthly Res. Notes.*, **35**(1):3-4.
- El-Hadrami, A., Adam, L.R., El Hadrami, I., Daayf, F., 2010. Chitosan in plant Protection. *Mar. Drugs*, **8**(4):968-987. [doi:10.3390/md8040968]
- FAOSTAT, 2010. Maize Crop Production (Updated 7 August 2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Reviewed on September 2012.
- Gondim, F.A., Gomes-Filho, E., Lacerda, C.F., Prisco, J.T., Azevedo-Neto, A.D., Marques, E.C., 2010. Pretreatment with H₂O₂ in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. *Br. J. Plant Physiol.*, **22**(2):103-112.
- Guan, Y.J., Hu, J., Wang, X.J., Shao, C.X., 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B (Biomed. & Biotechnol.)*, **10**(6):427-433. [doi:10.1631/jzus.B0820373]
- Hameed, A., Farooq, S., Iqbal, N., Arshad, R., 2004. Influence of exogenous application of hydrogen peroxide on root and seedling growth on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Agric. Biol.*, **6**(2):366-369.
- Hong, K., Xie, J., Zhang, L., Sun, D., Gong, D., 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Sci. Hort.*, **144**(1):172-178. [doi:10.1016/j.scienta.2012.07.002]
- ISTA, 1993. International rules for seed testing. Rules 1993. *Seed Sci. Technol.*, **21**(1):1-288.
- James, R.L., Genz, D., 1981. Ponderosa Pine Seed Treatments: Effects on Seed Germination and Disease Incidence. USDA Forest Service. Northern Region Report, Missoula, MT, **81**(16):13-14.
- Kananont, N., Pichyangkura, R., Chanprame, S., Chadchawan, S., Limpanavech, P., 2010. Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two *Dendrobium orchids* (Asparagales: Orchidaceae). *Sci. Hort.*, **124**(2):239-247. [doi:10.1016/j.scienta.2009.11.019]
- Khan, W., Prithiviraj, B., Smith, D.L., 2002. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica*, **40**(4):621-624. [doi:10.1023/A:1024320606812]
- Khodari, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *Int. J. Agric. Biol.*, **6**(1):5-8.
- Korystov, Y.N., Narimanov, A.A., 1997. Low doses of ionizing radiation and hydrogen peroxide stimulate plant growth. *Biologia*, **52**(1):121-124.
- Lei, C., Ma, D., Pu, G., Qiu, X., Du, Z., Wang, H., Li, G., Ye, H., Liu, B., 2011. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Ind. Crops Prod.*, **33**(1):176-182. [doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.001]
- Li, J.T., Qiu, Z.B., Zhang, X.W., Wang, L.S., 2011. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiol. Plant.*, **33**(3):835-842. [doi:10.1007/s11738-010-0608-5]
- Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011a. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**(34): 6439-6446.
- Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011b. Protection against biotic stress induced by chitosan in maize seedlings (*Zea mays*). *Mex. J. Agric. Sci.*, **2**(6):813-827 (in Spanish).
- Miché, L., Balandreau, J., 2001. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(7):3046-3052. [doi:10.1128/AEM.67.7.3046-3052.2001]
- Miranda, S.P., 2000. Process for the Extraction of Chitin from Crustaceans and Their Conversion to Chitosan. Mexican Institute of Industrial Property (in Spanish).
- Monasterio, P., Velásquez, L., Alejos, G., Lugo, L., Maturret, W., Tablante, J., Rodríguez, L., Araujo, D., 2007. Corn crop development based on the phenological proposal. *INIA Divulga*, **10**:59-63 (in Spanish).
- Msanga, H.P., Maghembe, J.A., 1989. Physical scarification and hydrogen peroxide treatment improves germination of *Vangueria infausta* seed. *Forest Ecol. Management.*, **28**(3-4):301-308. [doi:10.1016/0378-1127(89)90009-1]
- Ohta, K., Taniguchi, A., Konishi, N., Hosoki, T., 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience*, **34**(2):233-234.
- Ortega-Ortíz, H., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villarreal, R., Ramírez-Rodríguez, H., de alba Romenus, K., 2007. Enzymatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors. *J. Mex. Chem. Soc.*, **51**(3):

- 141-144.
- Pernezny, K.R., Nagata, R., Raid, R.N., Collins, J., Carroll, A., 2002. Investigation of seed treatments for management of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Dis.*, **86**(2):151-155. [doi:10.1094/PDIS.2002.86.2.151]
- Piernas, V., Guiraud, J.P., 1997. Disinfection of rice seeds prior to sprouting. *J. Food Sci.*, **62**(3):611-615. [doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb04443.x]
- Ruan, S.L., Xue, Q.Z., 2002. Effects of chitosan coating on seed germination and salt tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron. Sin.*, **28**(6): 803-808 (in Chinese).
- Sarath, G., Hou, G., Baird, L.M., Mitchell, R.B., 2007. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4-grasses. *Planta*, **226**(3):697-708. [doi:10.1007/s00425-007-0517-z]
- Shao, C.X., Hu, J., Song, W.J., Hu, W.M., 2005. Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. *J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci.*, **31**(6):705-708 (in Chinese).
- Sonneveld, C., Voogt, W., 2009. *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*. Springer, USA, p.431. [doi:10.1007/978-90-481-2532-6]
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.*, **11**(6):1187-1194. [doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x]
- Weissinger, W.R., Beuchat, L.R., 2000. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate *Salmonella* on alfalfa seeds. *J. Food Prot.*, **63**(11):1475-1482.
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *PNAS*, **99**(6):4097-4102. [doi:10.1073/pnas.052564899]
- Zeng, D., Luo, X., Tu, R., 2012. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, **2012**(1):1-5. [doi:10.1155/2012/104565]
- Zeng, K., Deng, Y., Ming, J., Deng, L., 2010. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Sci. Hort.*, **126**(2):223-228. [doi:10.1016/j.scienta.2010.07.017]
- Zhou, Y.G., Yang, Y.D., Qi, Y.G., Zhang, Z.M., Wang, X.J., Hu, X.J., 2002. Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. *J. Peanut Sci.*, **31**(1):22-25 (in Chinese).
- Ziani, K., Ursúa, B., Maté, J.I., 2010. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Prot.*, **29**(8):853-859. [doi:10.1016/j.cropro.2010.03.002]