



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LOS GENES *glx-1*, *per1* Y *zeamatina* EN TRES  
COLORES DE DOS RAZAS DE MAÍZ**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO**

**PRESENTA:**

**PATRICIA VÁSQUEZ LUIS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**

**CO-DIRECTORA:**

**DRA. ALMA DOLORES PÉREZ SANTIAGO**

**ASESORES:**

**DR. IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO  
DRA. MARÍA DEL SOCORRO PINA CANSECO  
DRA. DIANA MATIAS PÉREZ**



Instituto Tecnológico de Oaxaca  
División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Doctorado en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez; Oax, **26/octubre/2023**  
OFICIO No.DEPI/1030/2023  
ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

**C. PATRICIA VÁSQUEZ LUIS**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN**  
**CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO**  
**PRESENTE.**

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es:

**EVALUACIÓN DE LOS GENES *glx-1*, *per1* Y *zeamatina* EN TRES COLORES DE DOS RAZAS DE MAÍZ**

La división a mi cargo le concede la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
*"Tecnología Propia e Independencia Económica"*



  
 INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA  
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
 E INVESTIGACIÓN

**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

c.c.p. Expediente  
MASM/FDHP/\*cvbv





Oaxaca de Juárez; Oax, **26/OCTUBRE/2023**  
OFICIO No.DEPI/01012/2023  
ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

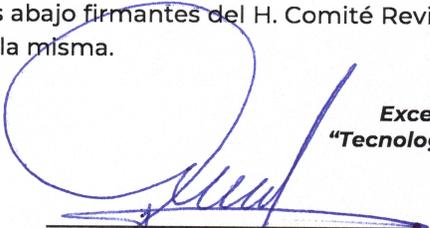
**C. PATRICIA VÁSQUEZ LUIS**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN**  
**CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO**  
**PRESENTE.**

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es:

**EVALUACIÓN DE LOS GENES *glx-1*, *per1* y *zeamatina* EN TRES COLORES DE DOS RAZAS DE MAÍZ**

Los abajo firmantes del H. Comité Revisor le concedemos la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
*"Tecnología Propia e Independencia Económica"*

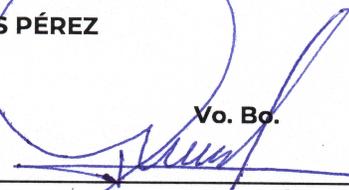
  
\_\_\_\_\_  
**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**  
DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. ALMA DOLORES PÉREZ SANTIAGO**  
CO-DIRECTORA

  
\_\_\_\_\_  
**DR. IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO**  
ASESOR

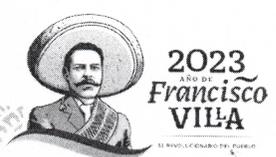
  
\_\_\_\_\_  
**DRA. MARIA DEL SOCORRO PINA CANSECO**  
ASESORA

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. DIANA MATÍAS PÉREZ**  
ASESORA

**Vo. Bo.**  
  
\_\_\_\_\_  
**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Expediente  
MASM/FDHP/cvbw



**LICENCIA DE USO OTORGADA POR** Patricia Vásquez Luis de nacionalidad **Mexicana** mayor de edad, con domicilio ubicado en Calle Álamos 4, San Jesús Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada "Evaluación de los genes *glx-1 per1* y *zeamatina* en tres colores de dos razas de maíz" en adelante "**LA OBRA**" quien para todos los fines del presente documento se denominará "**EL AUTOR Y/O EL TITULAR**", a favor del Instituto Tecnológico de Oaxaca del Tecnológico Nacional de México, la cual se registrá por las cláusulas siguientes:

**PRIMERA - OBJETO:** "**EL AUTOR Y/O TITULAR**", mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico de Oaxaca del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuita e indefinida respecto de "**LA OBRA**", para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través del repositorio institucional y del repositorio nacional, éste último consultable en la página: (<https://repositorionacionalcti.mx>).

**SEGUNDA - TERRITORIO:** La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geográfica o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

**TERCERA - ALCANCE:** La presente licencia contempla la autorización para formato uso de "**LA OBRA**" en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguientes medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido o por conocerse.

**CUARTA - EXCLUSIVIDAD:** La presente licencia de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico de Oaxaca; por lo tanto, "**EL AUTOR Y/O TITULAR**" conserva los derechos patrimoniales y morales de "**LA OBRA**", objeto del presente documento.

**QUINTA - CRÉDITOS:** El Instituto Tecnológico de Oaxaca y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el "**AUTOR Y/O TITULAR**" es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre "**LA OBRA**"; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

**SEXTA - AUTORÍA:** "**EL AUTOR Y/O TITULAR**" manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de "**LA OBRA**" y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable.

Dado en la Ciudad de Oaxaca, Oaxaca, a los 24 días del mes de octubre de 2023.

"EL AUTOR Y/O TITULAR"



Patricia Vásquez Luis

"EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA"



Fernando Toledo Toledo



Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de:

Alimentos del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Oaxaca y El Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO. Fue dirigido por el Dr. Marco Antonio Sánchez Medina y la Dra. Alma Dolores Pérez Santiago.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Dios por todas las bendiciones recibidas durante este periodo.

A mi esposo por su apoyo incondicional y a mis hijos por la alegría que le dan a mi vida.

Al Dr. Marco Antonio Sánchez Medina por darme la oportunidad de trabajar con él y por todo el apoyo recibido.

A la Dra. Alma Dolores Pérez Santiago, Diana Matías Pérez y Dr. Iván Antonio García Montalvo por el conocimiento compartido durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. María del Socorro Pina Canseco, gracias por todas las facilidades recibidas en cada etapa de este trabajo y compartir su conocimiento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Alimentos y de la Facultad de Medicina por su apoyo y amistad.

Al CONAHCyT por la beca otorgada de Doctorado.

## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**AF:** Aflatoxina

**AFB1:** Aflatoxina B1

**AFB2:** Aflatoxina B2

**AFG1:** Aflatoxina G1

**AFG2:** Aflatoxina G2

**Abl:** Arrocillo blanco

**Aam:** Arrocillo amarillo

**Aaz:** Arrocillo azul

**Bbl:** Bolita blanco

**Bam:** bolita Amarillo

**Baz:** Bolita azul

**CDS:** Región codificante

**CONABIO:** Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

**F1:** Cruza maíz Bbl-*Z. diploperennis*

**GLXI:** Proteína Glioxalasa I

**glx-I:** gen glioxalasa 1

**H2O2:** Peróxido de hidrógeno

**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**MAc1:** Actina de maíz 1

**MG:** Metilglioxal

**N-P-K:** Nitrógeno, Fosforo y Potasio

**PER1:** Proteína 1-Cys peroxirredoxina

**per1:** Gen 1-Cys peroxirredoxina antioxidante

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PolA:** Sitio de poliadenilación

**PR:** Proteína relacionada con la patogénesis

**RAP:** Proteína relacionadas a la resistencia

**RC1:** Retrocruza 1

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retrotranscriptasa Inversa

**SIPR:** Selección Intrapoblacional de Plántulas Resistentes.

**TSS:** Inicio de la transcripción

**USDA:** Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

**Zd:** *Zea diploperennis*

**zlp:** gen zeamatina

## RESUMEN

Los hongos productores de micotoxinas son responsables de la pudrición del maíz en campo y almacenamiento, estas incluyen algunas especies del género *Aspergillus* de importancia económica a nivel mundial. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* en tres muestras de maíz nativo: raza bolita y raza arrocillo ante la infección por *Aspergillus parasiticus*. Las muestras infectadas con el hongo presentaron cambios morfológicos: cómo oscurecimiento y marchites en los meristemos apicales de coleótilos y radícula, a diferencia de las muestras sin infección. La calidad e integridad del ARN extraído fue aceptable. El análisis de la expresión *glx-1*, *per1* y *zeamatina* mediante RT-PCR semicuantitativa reveló que el gen *glx-1* tuvo mayor expresión en comparación con el gen de referencia, en las muestras de maíz raza bolita y en el F1 (bolita blanco-*Zea diploperennis*) comparado con las muestras de la raza arrocillo. De manera general el gen *per1* presentó una baja expresión génica, siendo el F1 y Bbl las muestras que sobresalieron. En *zeamatina* se observaron mayores niveles de expresión en la raza bolita a diferencia de arrocillo, mientras que en el F1 los niveles de expresión también fueron bajos. En ambas razas de maíz se detectaron transcritos de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* bajo las condiciones experimentales establecidas en esta investigación, estos resultados sugieren la participación de estos genes en algunas muestras, como respuesta a la infección de *A. parasiticus* en la primera etapa de desarrollo de las muestras de maíz analizadas.

## ABSTRACT

Mycotoxin-producing fungi responsible for rotting of maize in the field and in storage include some species of the *Aspergillus* genus of economic importance worldwide. The objective of the present investigation was to evaluate the expression of the *glx-1*, *per1* and *zeamatin* genes in three samples of native corn, bolita race and arrocillo race, in response to infection by *Aspergillus parasiticus*. Samples infected with the fungus presented morphological changes: such as darkening and wilting in the apical meristems of coleoptiles and radicle, unlike samples without infection. The quality and integrity of the extracted RNA was acceptable. The analysis of *glx-1*, *per1* and *zeamatin* expression by semiquantitative RT-PCR revealed that the *glx-1* gene was expressed with greater intensity in the bolita race maize samples and in the F1 (white bolita-*Zea diploperennis*) compared to the samples of the arrocillo breed. In general, the *per1* gene presented low gene induction, with F1 and Bbl being the samples with the highest expression. In *zeamatin*, higher expression levels were observed in the bolita breed, unlike the rice breed, while in the F1 the expression levels were also low. In both races of corn, transcripts of the *glx-1*, *per1* and *zeamatin* genes were detected under the experimental conditions established in this research. These results suggest the participation of these genes in some samples, as a response to the *A. parasiticus* infection in the first stage of development of the corn samples analyzed.

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1 El maíz en México.....	3
2.2 Maíces oaxaqueños .....	4
2.2.1 Maíz raza Bolita .....	5
2.2.2 Maíz raza Arrocillo.....	5
2.3 <i>Aspergillus</i> y aflatoxinas .....	6
2.4 Genes de resistencia .....	8
2.4.1 Gen <i>glx-1</i> .....	10
2.4.2 Gen <i>per1</i> .....	11
2.4.3 Gen <i>zeamatina</i> ( <i>zlp</i> ).....	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	15
V. HIPÓTESIS .....	16
VI. OBJETIVOS.....	17
6.1 Objetivo general .....	17
6.1.2 Objetivos específicos.....	17
VII. METODOLOGÍA .....	18
7.1 Análisis de resistencia y susceptibilidad de maíces nativo .....	19
7.1.1 Muestras de maíz nativo .....	19
7.1.2 <i>Aspergillus parasiticus</i> e inoculación de coleóptilos de maíz .....	20
7.2 Evaluación de la expresión de los genes <i>glx-1</i> , <i>per1</i> y <i>zeamatina</i> en maíces nativos y en el F1 ..	21
7.2.1 Extracción y cuantificación de ARN .....	21
7.2.2 Diseño de oligonucleótidos de <i>zeamatina</i> ( <i>zlp</i> ) .....	21
7.2.3 Expresión de genes mediante RT-PCR.....	22
7.3 Obtención de la primera generación filial maíz-teocintle (F1) .....	22
7.3.1 Evaluar la expresión de los genes <i>glx-1</i> , <i>per1</i> y <i>zeamatina</i> en el F1 .....	23
7.4 Análisis estadístico .....	23
VIII. RESULTADOS .....	25
8.1 Obtención y caracterización de las muestras de maíz de la raza bolita y raza arrocillo. ....	25

8.2. Diseño de oligonucleótidos para el gen <i>zeamatina</i> ( <i>zlp</i> ).....	26
8.3 Obtención de la primera generación filial maíz-teocintle (F1) .....	27
8.4 Evaluación de la expresión de los genes <i>per1</i> , <i>glx-1</i> y <i>zeamatina</i> en maíces nativos y en el F1 ..	29
8.4.1 Inoculación de coleótilos de maíz raza bolita y raza arrocillo con <i>Aspergillus parasiticus</i> .	29
8.4.2 Extracción y cuantificación del ARN total de las muestras evaluadas .....	30
6.4.3 Expresión del Gen <i>glx-1</i> .....	31
8.4.4 Expresión del Gen <i>per1</i> .....	33
8.4.5 Expresión del Gen <i>zeamatina</i> ( <i>zlp</i> ).....	34
8.5 Análisis de la expresión de los genes <i>glx-1</i> y <i>per1</i> en muestra de bolita blanco, F1 (maíz-teocintle) y <i>Zea diploperennis</i> .....	35
IX. DISCUSIÓN.....	39
X. CONCLUSIONES .....	44
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Razas de maíz en México y sus progenitores (Bedoya, 2010).....	4
Figura 2. Muestras de maíz raza bolita color azul y blanco .....	5
Figura 3. Muestras de maíz de la raza arrocillo en colores naranja, blanco, amarillo y azul. ....	6
Figura 4. Características del género <i>Aspergillus</i> .....	7
Figura 5. ARNm del gen <i>glx-1</i> , la región codificante se remarcó en amarillo. La secuencia de aminoácidos se ubica debajo de la región codificante.....	11
Figura 6. ARNm del gen <i>per1</i> , la región codificante se remarcó en amarillo. La secuencia de 229 aminoácidos se ubica debajo de la región codificante.....	12
Figura 7. ARNm de <i>zeamatina</i> del cultivar B73, la región codificante se remarcó en amarillo. La secuencia de aminoácidos se ubica debajo de la región codificante. ....	13
Figura 8. Metodología para el análisis de la expresión de los genes <i>glx-1</i> , <i>per1</i> y <i>zeamatina</i> en muestras de maíz raza bolita y raza arrocillo .....	18
Figura 9. Metodología para el análisis de la expresión de los genes <i>glx-1</i> , <i>per1</i> y <i>zeamatina</i> en el F1 (maíz-teocintle).....	19
Figura 10. Método de polinización del teocintle al maíz. ....	23
Figura 11. Mazorcas y granos maíz nativo: 1a) Bbl, 1b) Aam, 1c) Baz y 2a) Abl, 2b) Aam y 2c) Aaz.....	25
Figura 12. Alineamiento de secuencia de bases en maíz y teocintle. Las secuencias idénticas con el primer forward (A) y reverse (B) están marcados con cuadros negros. Las secuencias utilizadas son <i>Zea mays</i> (EU965687.1), <i>Zea mays</i> (NM_001111886.2), <i>Zea mays</i> (AY105654.1 PCO151032). ....	26
Figura 13. Predicción del gen <i>zeamatina</i> en el ADN genómico de <i>Zea mays</i> cultivar B73.....	27
Figura 14. Siembra para formar un F1 Maíz-Teocintle. a) cultivo maíz y teocintle, b) sincronización de floración maíz-teocintle, c) granos F1 de bolita blanco, d) granos F1 de bolita amarillo, e) granos F1 de bolita azul. ....	28
Figura 15. Plantas y mazorcas F1. ....	29
Figura 16. Coleóptilos de maíz sin infección de <i>A. parasiticus</i> con 7 días de germinación, a) muestras de bolita y b) muestras de arrocillo. ....	30
Figura 17. Coleóptilos de muestras de maíz con infección de <i>A. parasiticus</i> con 7 días de germinación, a) bolita y b) arrocillo. ....	30
Figura 18. Gel de agarosa al 1% del ARN total de las muestras de maíz nativo y el F1 (maíz-teocintle). a) ARN de muestras control, b) ARN de muestras infectadas con <i>Aspergillus parasiticus</i> . ....	30
Figura 19. Expresión del gen <i>glx-1</i> en muestras de maíz raza bolita, raza arrocillo y el F1. Los datos graficados son el promedio de 48 repeticione.....	32
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR amplificados del gen <i>glx-1</i> de coleóptilos de maíz nativo y el F1 control e infectados.....	32

Figura 21. Expresión del gen <i>per1</i> en muestras de maíz raza bolita, raza arrocillo y el F1. Los datos graficados son el promedio de 48 repeticiones. ....	33
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR amplificados del gen <i>per1</i> de coleóptilos de maíz nativo y el F1 control e infectados. En el carril 1 el gen de referencia .....	34
Figura 23. Expresión del gen <i>zeamatina</i> en muestras de maíz raza bolita, raza arrocillo y el F1. Los datos graficados son el promedio de 48 repeticiones. ....	35
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR amplificados del gen <i>zeamatina</i> de coleóptilos de maíz nativo y el F1 control e infectados. En el carril 1 el gen de referencia .....	35
Figura 25. Coleóptilos de muestras de maíz bolita: a) controles sanos, b) muestras infectadas con <i>A. parasiticus</i> de 7 días de germinación. ....	36
Figura 26. Niveles de expresión de los genes <i>glx-1</i> y <i>per1</i> en Bolita, F1 y <i>Zea diploperennis</i> con y sin infección de <i>A. parasiticus</i> . ....	37
Figura 27. Gel de agarosa al 1.5 % de los productos obtenidos del gen <i>glx-1</i> en Bolita, F1 y <i>Zea diploperennis</i> . Carril 1 y 6: marcador de peso molecular, carril 2 y 7: gen de referencia. .	38
Figura 28. Gel de agarosa al 1.5 % de los productos obtenidos del gen <i>per1</i> en Bolita, F1 y <i>Zea diploperennis</i> . Carril 1 y 6: marcador de peso molecular, carril 2 y 7 gen de referencia.....	38

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz moderno.....	3
Cuadro 2. Proteínas asociadas a la resistencia (RAPs) (Brown <i>et al.</i> 2010).....	10
Cuadro 3. Muestras de maíz nativo, control (sin infección) e infectadas con <i>A. parasiticus</i> ....	20
Cuadro 4. Secuencia de oligos para la identificación del gen <i>zeamatina</i> mediante RT-PCR y alineamiento del fragmento codificante del gen.....	26
Cuadro 5. Cuantificación del ARN en coleóptilos de maíz y F1. ....	31

## I. INTRODUCCIÓN

En México se han reportado 64 razas de maíz, de las cuales el 59 % son consideradas como maíces nativos (CONABIO, 2022), Oaxaca es uno de los estados con mayor diversidad, albergando alrededor de 35 razas, dentro de ellas la raza bolita y arrocillo (Aragón *et al.* 2006). El maíz de raza bolita predomina en la región de los Valles Centrales, se caracteriza por tener un ciclo de producción corto y buena cobertura de la mazorca, sus granos han tenido una gran variedad de usos, principalmente para la elaboración tortillas (Ramírez *et al.* 2022) y téjate, bebida tradicional en la región de los Valles Centrales (Soleri *et al.* 2023). Otra raza de importancia en el estado es la raza arrocillo, caracterizada por presentar mazorcas delgadas y cónicas con un gran número de hileras de granos por mazorca y una diversidad de colores que van de blanco hasta azul. En Oaxaca, esta raza está distribuida en las zonas altas de la Sierra Sur (CONABIO, 2020; Aragón *et al.* 2006).

Al igual que otros cultivos de interés económico, el maíz es vulnerable a daños causados por diversos patógenos que disminuyen el rendimiento y calidad del grano. Entre los hongos fitopatógenos más frecuentes se encuentran algunas especies del género *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, ambas especies productoras de aflatoxinas, micotoxinas altamente tóxicas para el ser humano y animal (Jallow *et al.* 2021; Benkerroum, 2020). La exposición prolongada de productos contaminados con esta micotoxina se ha relacionado con diversos padecimientos, como hepatotoxicidad de hígado, retraso en el crecimiento, efecto inmunosupresor, cáncer, problemas digestivos entre otras perturbaciones metabólicas (Liu *et al.* 2022; Kumar *et al.* 2017); siendo las aflatoxinas más importantes la AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (Alameri *et al.* 2023; Shabeer *et al.* 2022).

Se han realizado estudios con la finalidad de identificar germoplasmas que presenten resistencia a la infección de estos hongos y su contaminación por aflatoxinas (Álvarez-Días *et al.* 2022; Shabeer *et al.* 2022; Sarma *et al.* 2017) representando una solución viable y económica para contrarrestar esta problemática (Sheoran *et al.* 2022; Mwamahonje *et al.* 2021). Con ayuda de

nuevos estudios moleculares se han identificado múltiples genes y sus proteínas en líneas puras e híbridos comerciales con resistencia (*Brown et al.* 2010). En este sentido, las líneas nativas de maíces mexicanos representan un área de oportunidad para su estudio.

Actualmente, son pocas las investigaciones que se han realizado con la finalidad de identificar genes y/o proteínas en maíces nativos de México (Varapizuela-Sánchez, 2020; Sandoval-Flores, 2016; Sánchez-Medina, 2016) y los teocintles (Hernández-Morales, 2022), que respondan ante la infección causada por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Entre los genes de importancia catalogados como genes de resistencia por la actividad de sus proteínas se encuentra la Glioxalasa I (GLX1) que participa en la desintoxicación del metilglioxal (MG), inductor de la producción de las aflatoxinas (Chen *et al.* 2004), la proteína 1-Cys peroxirredoxina (PER1), que cataliza la conversión de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) en agua, reduciendo el daño celular (Chen *et al.* 2007) y la Zeamatina proteína antifúngica que permeabiliza la membrana plasmática en el ápice de las hifas de diversos hongos (Batalia *et al.* 1996, Roberts & Selitrennikoff, 1990).

Por lo anterior, es de suma importancia conocer la respuesta de estos genes de resistencia y sus proteínas en razas de maíces nativos debido a la importancia cultural y económica que estos tienen en México. El objetivo de la siguiente investigación, fue evaluar la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* en coleóptilos de maíz raza bolita y raza arrocillo ante la infección causada por *A. parasiticus*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 El maíz en México

México es considerado el centro de origen, domesticación y diversificación del maíz, además, alberga a sus parientes silvestres, los teocintles. Las evidencias biotecnológicas recientes señalan al teocintle anual *Zea mays ssp. parviglumis*, como el ancestro directo del maíz moderno *Zea mays* L. ssp. *mays* y a la cuenca del Río Balsas como la región donde han concurrido el teocintle y el maíz (Matsuoka *et al.* 2002) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz moderno

Familia:	Poaceae
Subfamilia:	Panicoideae
Tribu:	Maydeae
Género:	<i>Zea</i>
Sección:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>mays</i>
Subsp:	<i>mays</i> (L.)

En cuanto a la diversidad biológica, de las 220 razas reportadas en América Latina, 64 razas fueron identificadas en México, de estas, 59 son consideradas nativas (Figura 1) (CONABIO, 2022; Sánchez *et al.* 2000). Esta gran diversidad ha estado en resguardo de las comunidades rurales quienes las seleccionan a través de su conocimiento, preferencias y prácticas adaptadas de acuerdo a sus necesidades, manteniendo así la diversidad de este importante cultivo (Escalante y Trigo, 2018), tan solo en la gastronomía mexicana se ha reportado alrededor de 600 formas de preparar platillos y bebidas a base del maíz (Oseguera y Ortega, 2016).

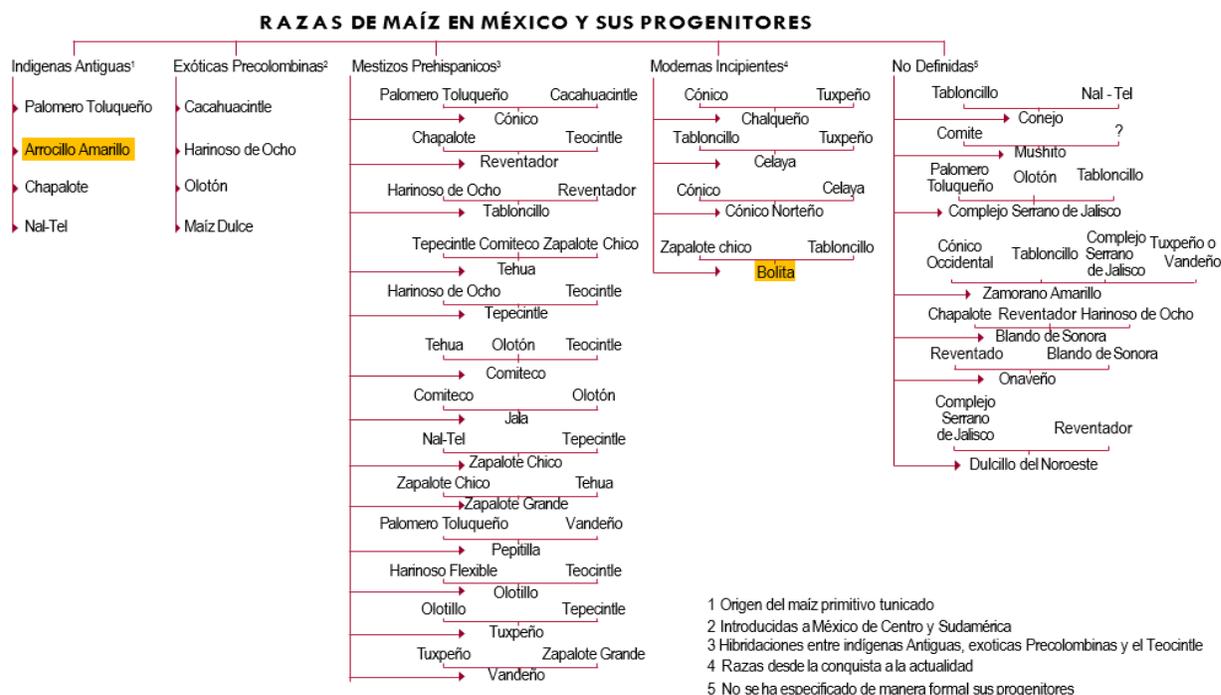


Figura 1. Razas de maíz en México y sus progenitores (Bedoya, 2010).

## 2.2 Maíces oaxaqueños

Oaxaca es considerado uno de los más importantes reservorios genéticos del maíz en México y en el mundo. El estado concentra 35 razas representando el 54% de las reportadas en todo el país. Dentro de las accesiones se encuentra el Ancho, Arrocillo, Bolita, Celaya, Chalqueño, Chiquito, Comiteco, Conejo, Cónico, Cónico Norteño, Elotes Cónicos, Elotes Occidentales, Mixeño, Mixteco, Mushito, Nal-Tel, Nal-Tel de Altura, Negro de Tierra Fría, Negro Mixteco, Olotillo, Olotón, Olotón Imbricado, Palomero Toluqueño, Pepitilla, Serrano, Serrano de Oaxaca, Serrano Mixe, Tabloncillo, Tehua, Tepecintle, Tuxpeño, Vandefío, Zamorano, Zapalote Chico y Zapalote Grande. De acuerdo a los reportes, la raza con mayor número de colecta en el estado es la raza bolita seguido de cónico y mushito; en cuanto al color del grano, los de mayor colecta son el blanco (62.93 %) y amarillo (20.13 %), los menos frecuentes son el rojo (27 colectas) y el naranja (38 colectas) (Aragón *et al.* 2006).

### 2.2.1 Maíz raza Bolita

Esta raza tiene su origen en los Valles Centrales de Oaxaca, sin embargo, se ha colectado también en la región Mixteca y zonas adyacentes de los estados de Puebla y Guerrero; crece en altitudes entre 1,500 y 2,465 msnm. Esta raza se adapta a los climas templado-árido frío, subtropical-árido templado, subtropical-semiárido templado, subtropical-subhúmedo templado, subtropical-semiárido semicálido y subtropical-subhúmedo semicálido (Ruiz *et al.* 2013), se caracteriza por tener un ciclo de producción corto y buena cobertura de la mazorca (Figura 2), sus granos han tenido una gran variedad de usos, principalmente para la elaboración de tortillas (Ramírez *et al.* 2022) y téjate, bebida tradicional en la región de origen (Soleri *et al.* 2022). Algunos sitios recomendados para realizar colectas por presentar menor introgresión de otras razas de maíz son: Santa Ana Zegache, Ocotlán; San Bartolomé Quialana, Tlacolula; Santa Marta Chichihualtepec, Ejutla; La Trinidad, Zaachila; y San Juan Teitipac, Tlacolula (Aragón *et al.* 2006).



Figura 2. Muestras de maíz raza bolita color azul y blanco

### 2.2.2 Maíz raza Arrocillo

Arrocillo es una raza indígena antigua cuyo nombre se refiere al tipo característico del grano, presenta mazorcas pequeñas, delgadas y cónicas (Figura 3); en promedio las mazorcas tienen

15 hileras de granos semi-cristalino, apiculado (puntiagudo) a semi-dentado y cortos (Aragón *et al.* 2006; Wellhausen *et al.* 1951).

Se cultiva en la regiones templadas-frías con alta nubosidad de la Sierra Norte de Puebla y Veracruz y en algunas áreas altas de la Mesa Central (partes altas de Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México, Michoacán y Oaxaca) (CONABIO, 2020). En Oaxaca, esta raza está distribuida en las zonas altas de la Sierra Sur, siendo Santa María Lachixio, Sola de Vega el lugar donde se ha identificado poblaciones de este material para su conservación in situ (Aragón *et al.* 2006)



Figura 3. Muestras de maíz de la raza arrocillo en colores naranja, blanco, amarillo y azul.

### 2.3 *Aspergillus* y aflatoxinas

La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde pueden sobrevivir y desarrollarse sobre materia en descomposición, sin embargo, pueden colonizar una gran variedad de sustratos bajo condiciones ambientales extremas; estos hongos son frecuentes en climas tropicales y subtropicales disminuyendo en los climas fríos (Paulussen *et al.* 2017).

*Aspergillus* requiere para su desarrollo una humedad relativa entre el 70 a 90 %, sin embargo, en granos también se desarrolla con un contenido de agua de 15 a 20 % y un rango de temperatura de 0 a 45 °C. Las colonias son usualmente de crecimiento rápido, poseen distintos tonos de blanco, verde, pardo, gris, amarillo, amarillo-café, café a negro o tonos del verde-grisáceo o verde-azulado (Piontelli, 2008). *Aspergillus* posee un conidióforo característico, en la estructura unicelular posee tres partes: vesícula (extremo apical), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies del género se presenta, entre la vesícula y las fiálides, otras células denominadas métulas (Figura 4). Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas y las que presentan fiálides y métulas se conocen como biseriadas (Frisvad *et al.* 2015).

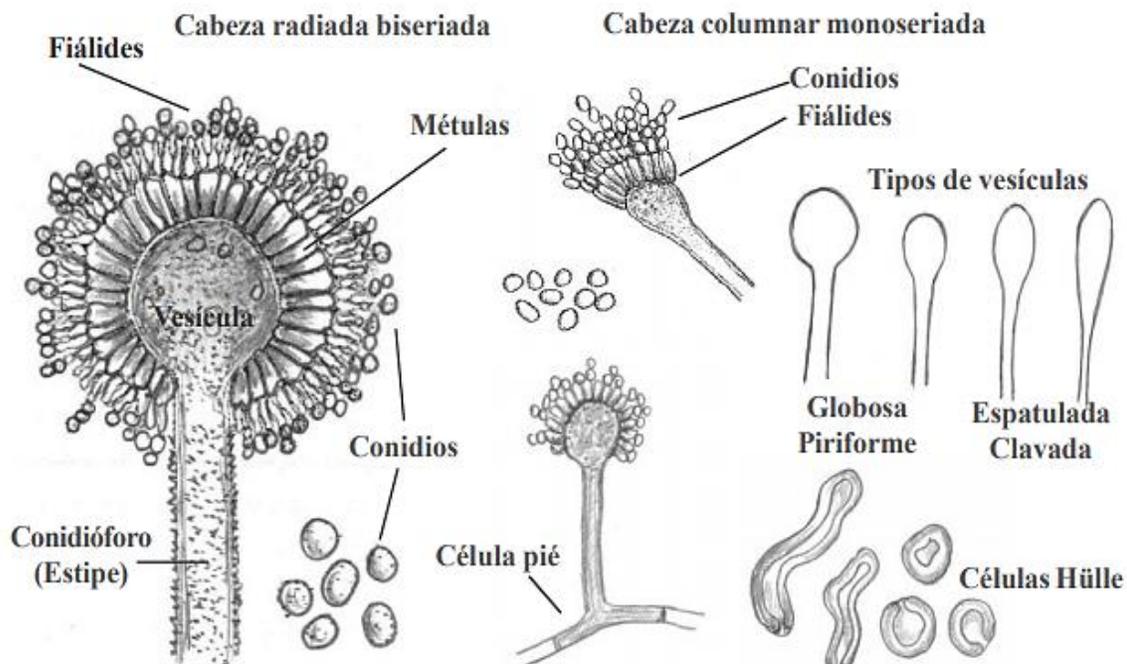


Figura 4. Características del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* se ha dividido en varias secciones, la sección Flavi comúnmente conocida como “grupo *A. flavus*” es la más reconocida por incluir especies productoras de dos importantes

micotoxinas, las aflatoxinas (AF) y las ocratoxinas (Visagie & Houbraken, 2020; Frisvad *et al.* 2019). *A. flavus* y *A. parasiticus*, miembros de esta sección son especies caracterizadas por su alta producción de aflatoxinas capaces de infectar granos de maíz inmaduro en campo durante la floración, a través de la seda en condiciones de altas temperaturas y estrés hídrico (Pechanova & Pechan, 2015) además, la infección puede ocurrir por lesiones causados en el grano por insectos (Molnár *et al.* 2023), agudizándose la infección en almacén. La infección de *Aspergillus* y contaminación de aflatoxinas también ha afectado otros cultivos agrícolas como cacahuete arroz, trigo, sorgo, cebada, avena, centeno, nueces, avellanas, pistaches, piñones, semillas de girasol, de algodón, ajonjolí y almendras, así como algunos productos procesados, entre ellos tortilla, harina de maíz y leche (Kumar *et al.* 2021; Abo Nouh *et al.* 2020).

Etimológicamente, la palabra “aflatoxina” viene de a = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno (Sarma *et al.* 2017). Las aflatoxinas son metabolitos secundarios no proteicos y de bajo peso molecular su estructura consta de un anillo dihidri-difurano o tetrahidro-difurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono. Existen alrededor de 20 diferentes tipos de aflatoxinas, las más importantes son AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (Alameri *et al.* 2023; Shabeer *et al.* 2022). De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer la B1 es la aflatoxina más potente clasificada como carcinógeno de clase 1 (IARC, 2021), entre otras alteraciones provocadas por la ingesta de productos contaminado se encuentra hepatotoxicidad de hígado, irritación dérmica, disrupciones endocrinas, efecto inmunosupresor, cáncer, edema, problemas de digestión, otras perturbaciones metabólicas y muerte (Liu *et al.* 2022; Kumar *et al.* 2017; Sarma, *et al.* 2017).

## 2.4 Genes de resistencia

Desde hace varias décadas se han reportado diversos estudios en busca de resistencia natural en líneas e híbridos de maíz, identificando múltiples genes cuyas proteínas han demostrado una importante actividad en la disminución de la infección causa por *Aspergillus* y la contaminación de aflatoxinas en maíz. En esta búsqueda, Chen *et al.* (1999) identificaron una proteína

denominada *TI* (inhibidor de la tripsina) de 14 kDa que inhibió la germinación de esporas de *A. flavus* y redujo la producción y actividad de  $\alpha$ -amilasa; de esta manera limitando la disponibilidad de azúcares simples necesarios para el crecimiento y desarrollo del hongo.

En otro estudio encabezado por Ji *et al.* (2000) encontraron ciertas isoformas de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa en respuesta a la infección *A. flavus* y *Fusarium moniliforme* en granos maduros e inmaduros de maíz amarillo, siendo la isoforma de quitinasa de 29 kDa y  $\beta$ -1,3-glucanasa de 33 kDa las que presentaron mayor inhibición del crecimiento en *A. flavus*. Analizando genotipos de maíces resistentes y susceptibles a la infección por *A. flavus*, Chen *et al.* (2002), encontraron que las muestras inicialmente contenían bajos niveles de *Aldosa reductasa* (ALD) antes de la infección en comparación con los genotipos resistentes, sin embargo, después de la inoculación fúngica, los niveles de esta proteína en líneas susceptibles fueron más altos en comparación con los genotipos resistentes. Posteriormente, Chen *et al.* (2006) identificaron una proteína en el endospermo de semillas de maíz que se expresaba cinco veces más en líneas de maíces resistentes ante la infección de *Aspergillus* y la producción de aflatoxinas en relación a las líneas susceptibles. Esta proteína fue comparada con la proteína relacionada a la patogénesis por la homología de péptidos y fue denominada como ZmPR-10, el cual mostró un efecto antifúngico al inhibir la germinación de conidios y afectar el crecimiento de las hifas de *A. flavus*.

Más tarde, Brown y colaboradores (2010) reportaron 21 proteínas de genes relacionadas a la resistencia ante la infección de *A. flavus* y *A. parasiticus* y contaminación por aflatoxinas basado en su homología de secuencias peptídicas. Estas proteínas se han clasificado en tres categorías de acuerdo a su actividad principal (cuadro 3).

Otros genes de importancia catalogados como genes de resistencia por la actividad de sus proteínas se encuentra la Glioxalasa I (GLX1) que participa en la desintoxicación del metilglioxal (MG), inductor de la producción de las aflatoxinas (Chen *et al.* 2004), la proteína 1-Cys peroxirredoxina (PER1), que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua, reduciendo el daño celular (Chen *et al.* 2007) y la Zeamatina proteína antifúngica que

permeabiliza la membrana plasmática en el ápice de las hifas de diversos hongos (Batalia *et al.* 1996, Roberts & Selitrennikoff, 1990).

Cuadro 2. Proteínas asociadas a la resistencia (RAPs) (Brown *et al.* 2010)

<b>Proteínas Antifúngicas</b>	<b>Proteínas relacionadas al estrés</b>
<b>Zeamatin</b>	Aldose Reductase (ALD)
Trypsin inhibitor 14kDa (TI)	Cold-regulated protein (ZmCORp)
Ribosome inactivating protein (RIP)	Water estrés inducible protein (WSI)
B-1,3-glucanase	Anionic peroxidase
Pathogenesis-related protein 10 (PR10)	Small heat shock protein 16.9/17.2 kDa
PR10.1	<b>Glyoxalase I (GLX I)</b>
Trypsin inhibitor 10 kDa (ZmTI)	<b>Peroxiredoxin 1 (PER1)</b>
<b>Proteínas de almacenamiento</b>	<b>Otras</b>
Globulin I	Serine/threonine protein kinase
Globulin II	Translation initiation factor 5A
Cupin domain containing protein (Zmcup)	Peroxiredoxin antioxidant (PER1)
Late embryogenesis abundant protein (LEA III)	
LEA 14	

#### 2.4.1 Gen *glx-1*

La proteína GLX-I es codificada por el gen *glx-1* (glioxalasa 1) cuyo número de acceso al GenBank es AY241545. El ARNm tiene una longitud de 1154 pb, cuya región codificante va de la base 103 al 975 como se observa en la Figura 5 y cuya proteína se integra de 290 aminoácidos con número de acceso AAP76396.1.

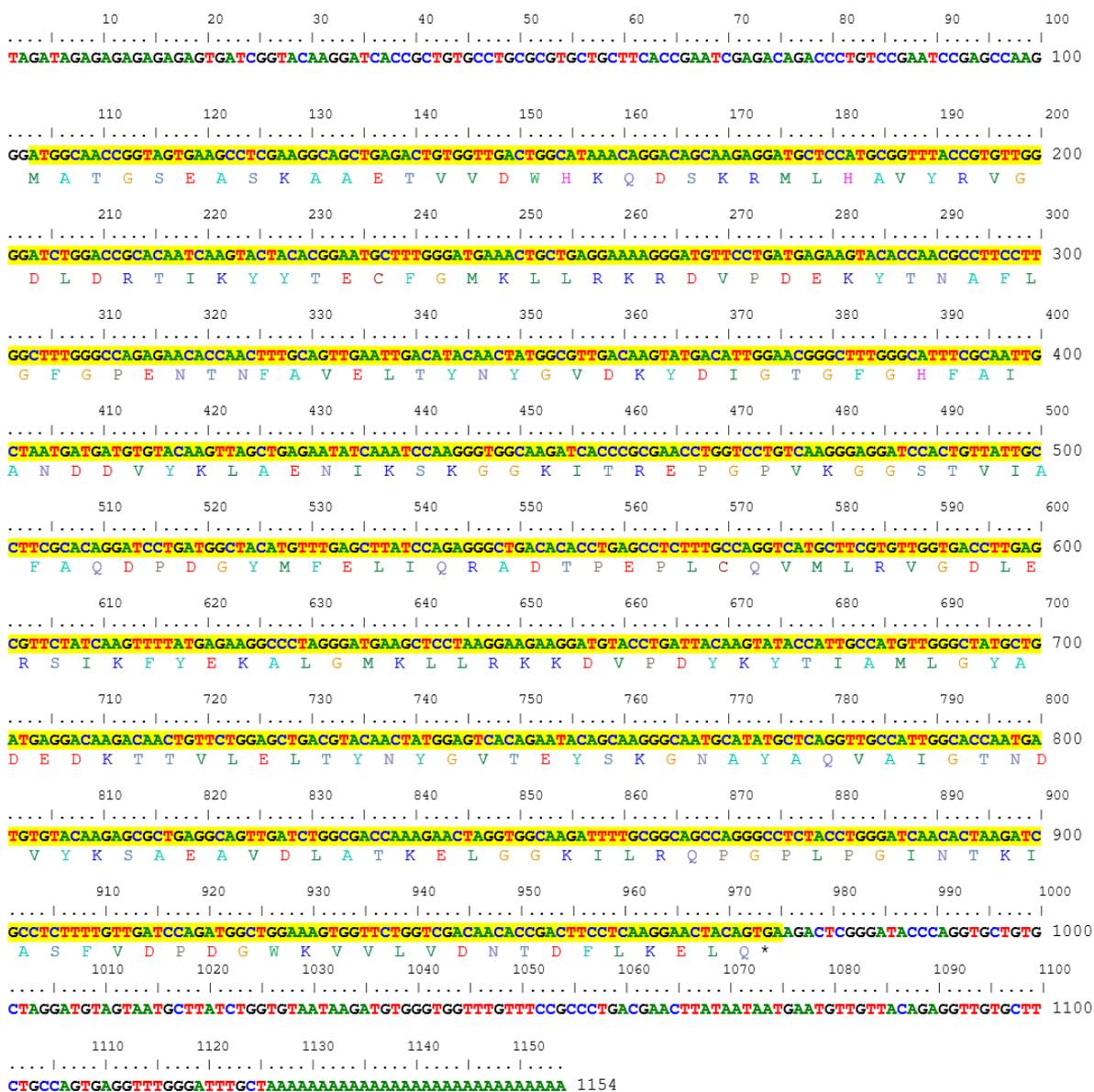


Figura 5. ARNm del gen *glx-1*, la región codificante se remarcó en amarillo. La secuencia de aminoácidos se ubica debajo de la región codificante.

## 2.4.2 Gen *per1*

El ARNm del gen *per1* (1-Cys peroxidoredoxina antioxidante), tiene un número de acceso al GenBank de NM\_001112528 y presenta una longitud total de 1171 pb cuya región codificante

va de la base 51 a la 740. El gen codifica la proteína 1-Cys peroxiredoxin (PER1) de 229 aminoácidos como se observa en la Figura 6.

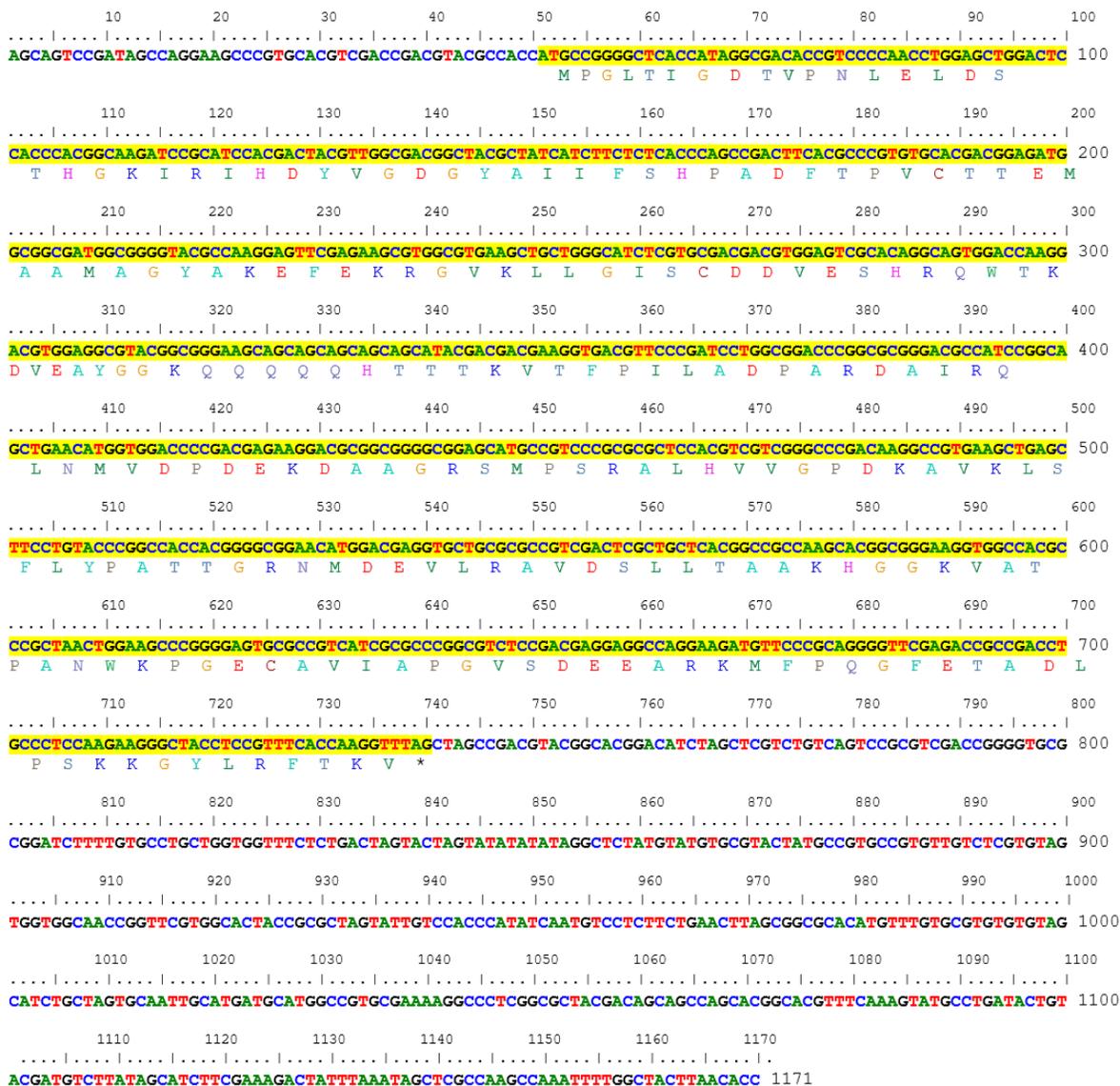


Figura 6. ARNm del gen *per1*, la región codificante se remarcó en amarillo. La secuencia de 229 aminoácidos se ubica debajo de la región codificante.

### 2.4.3 Gen *zeamatina* (*zlp*)

La secuencia de ARNm reportada para el gen *zeamatina* también conocido como *zlp* tiene una longitud de 957 pb cuyo número de acceso al GenBank es U06831.1, cuenta con una región codificante que va de la base 29 a la 712 como se observa en la figura 7. El gen codifica la proteína Zeamatina de 227 aminoácidos (NP\_001105356)

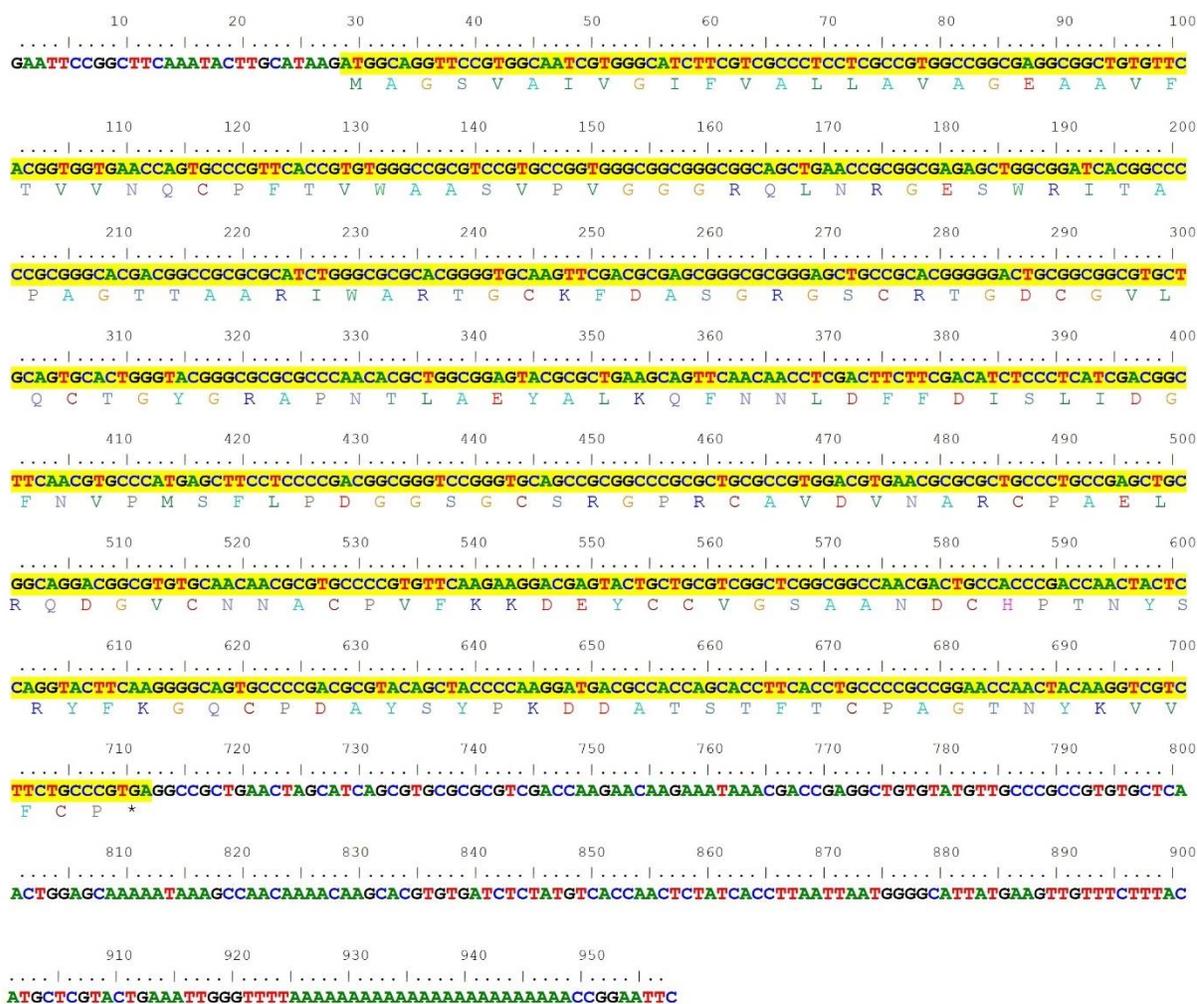


Figura 7. ARNm de *zeamatina* del cultivar B73, la región codificante se remarcó en amarillo. La secuencia de aminoácidos se ubica debajo de la región codificante.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas mayormente por *A. flavus* y *A. parasiticus* que contaminan diversos cultivos, entre ellos el maíz, provocando grandes pérdidas económicas en todo el mundo (González-Curbelo & Kabak, 2023). La ingesta de alimentos contaminados por esta micotoxina se ha relacionado a diversos padecimientos como hepatotoxicidad de hígado, irritación dérmica, disrupciones endócrinas, efecto inmunosupresor, cáncer, edema, problemas de digestión, otras perturbaciones metabólicas y muerte (Pickova *et al.* 2021; Kumar *et al.* 2017).

A la fecha, se han realizado estudios con la finalidad de identificar germoplasmas que presenten resistencia a la infección de este hongo y su contaminación por aflatoxinas (Shabeer *et al.* 2022) representando una solución viable y económica para contrarrestar esta problemática (Sheoran *et al.* 2022; Mwamahonje *et al.* 2021) como resultado, se han reportado diversos genes y sus proteínas involucradas en la defensa del huésped ante la infección de *Aspergillus* y las subsecuente producción de aflatoxinas, sin embargo, estos estudios se ha realizado principalmente en maíces de líneas puras e híbridos. En Oaxaca, Sánchez (2016) reportó la expresión de tres genes que se expresaron en coleóptilos cuyas proteínas están catalogadas como de resistencia, de igual manera, se ha reportado expresión génica en diferentes especies y subespecies de teocintles, ancestros del maíz moderno en condiciones de infección fúngica (Hernández, 2022). Considerando este antecedente, existe la posibilidad de encontrar nuevas muestras de maíz nativo que puedan inducir la expresión de otros genes de resistencia ante la infección de *Aspergillus*, planteando la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* en las muestras de maíz de la raza bolita y raza arrocillo ante la infección de *Aspergillus parasiticus*?

#### IV. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a las proyecciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la producción mundial del maíz durante el año 2023 se estima en 1,220.7 millones de toneladas, de los cuales, México aporta el 2% (USDA, 2023). En el país, la producción de este grano se compone en su mayoría por maíces nativos que representan el 75 %, el 25 % restante proviene de semillas de híbridos mejorados (Tadeo-Robledo *et al.* 2015). Las principales infecciones fúngicas que afectan a este cultivo tanto en campo como en postcosecha son algunas especies del género *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, productores de importantes micotoxinas que causan pérdidas económicas y afecta la salud humana y animal; por su alta toxicidad, las aflatoxinas son las micotoxinas más importantes, el consumo de alimentos contaminados con ellas se ha relacionado a padecimientos como el cáncer. Un estudio reciente realizado en una población infantil de Tanzania reportó una incidencia anual de cáncer de hígado inducido por el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas de 1.480 casos por cada 100.000 individuos cuya alimentación principal era de papillas a base de maíz (Kimanya *et al.* 2021).

A través de estudios moleculares, se ha reportado la expresión de diversos genes y sus proteínas en genotipos e híbridos resistentes a la infección *Aspergillus* y acumulación de aflatoxinas comparado con los susceptibles (Brown *et al.* 2010). En maíces nativos de México los estudios aún son escasos y hasta el momento no se han reportado trabajos que evalúen la expresión de los genes *glx-1*, *per 1* y *zeamatina* en muestras de la raza bolita y raza arrocillo ante la infección causada por *A. parasiticus*, así como tampoco hay trabajos que evalúen estos genes en la primera generación filial maíz - teocintle (F1), por lo que esta investigación sería el primero en esta línea. Considerando lo anterior, es importante identificar razas o muestras de maíz que presenten resistencia a la infección fúngica para proponerse como alternativa de consumo, particularmente en su zona de distribución natural con el objetivo de reducir los riesgos de ingesta de granos contaminados. Además, esta información podrá ser empleada para futuras investigaciones sobre maíz y sus parientes silvestres considerando la importancia económica, cultural y social que el maíz tiene en Oaxaca.

## V. HIPÓTESIS

En muestras de maíz nativo, al menos uno de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* podría presentar mayor expresión como posible respuesta a la infección por *Aspergillus parasiticus*.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* a nivel de ARN de las muestras de maíz raza bolita y raza arrocillo ante la infección de *Aspergillus parasiticus*.

#### 6.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el nivel de expresión de ARN por RT-PCR de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina*, en muestras de maíz: raza bolita y raza arrocillo.
- b) Obtener un híbrido por la cruce de la muestra de maíz susceptible a la infección fúngica con el teocintle *Zea diploperennis*
- c) Determinar el nivel de expresión de ARN por RT-PCR, de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* en la primera generación filiar maíz-teocintle.

## VII. METODOLOGÍA

En las Figuras 8 y 9 se muestran los diagramas de la primera etapa y segunda etapa de la metodología a seguir en la elaboración de este proyecto de investigación.

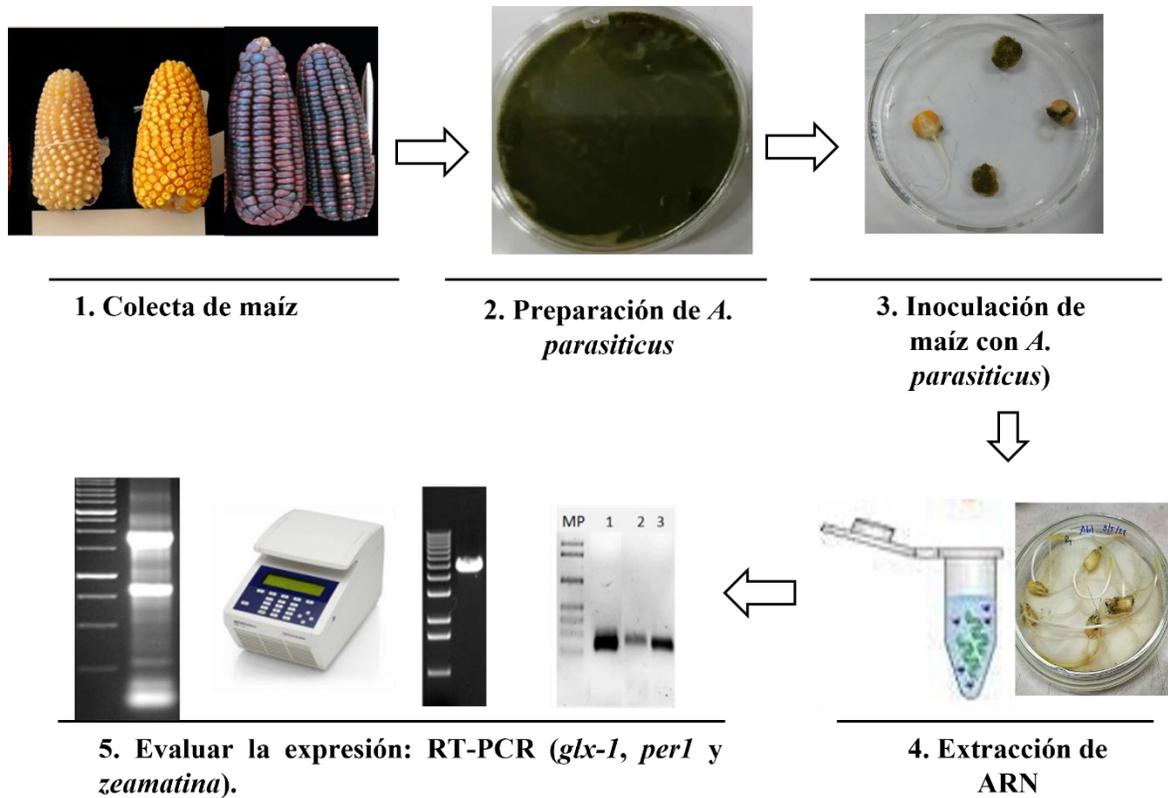


Figura 8. Metodología para el análisis de la expresión de los genes *glx-1*, *perl* y *zeamatina* en muestras de maíz raza bolita y raza arrocillo

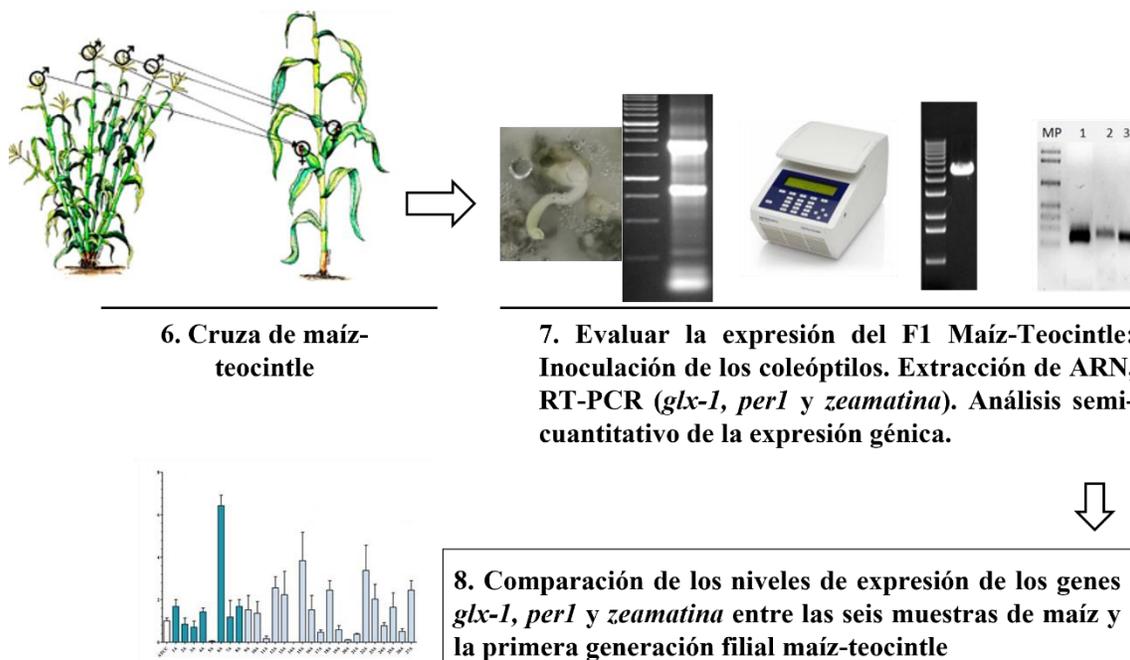


Figura 9. Metodología para el análisis de la expresión de los genes *glx-1*, *perl* y *zeamatina* en el F1 (maíz-teocintle)

## 7.1 Análisis de resistencia y susceptibilidad de maíces nativo

### 7. 1. 1 Muestras de maíz nativo

Se realizó una búsqueda bibliográfica antes de realizar la colecta de las muestras de maíz nativo en el estado de Oaxaca con el fin de identificar las zonas de mayor conservación y pureza de estas. Una vez en el laboratorio se codificaron asignando la letra B a las muestras de la raza bolita y la letra A para las muestras de la raza arrocillo, las siguientes dos letras hacen referencia al color de grano.

### 7.1.2 *Aspergillus parasiticus* e inoculación de coleóptilos de maíz

Para los ensayos se utilizó una cepa de *A. parasiticus* ATCC 16992, caracterizada por su alta producción de aflatoxinas. Se inocularon placas con medio PDA con 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión concentrada de esporas y se incubaron siete días en una incubadora INDELAB a  $28\pm 2$  °C. La recuperación de esporas se llevó a cabo en agua estéril con tritón al 0.01% y se conservaron en tubos de vidrio a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta su utilización.

Para la obtención de coleóptilos de maíz, 60 semillas de cada muestra se desinfectaron en alcohol etílico al 70% durante 10 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron 10 semillas en una caja Petri estéril con papel filtro y algodón humedecidos, siendo estos una unidad experimental. Tres placas de cada raza de maíz se utilizaron como control positivo (sin infección fúngica) inoculados con 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril y tres más se inocularon con 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas de *A. parasiticus* a una concentración de  $1\times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Las placas se etiquetaron (Cuadro 3), y se incubaron a  $28\pm 2$  °C durante 7 días (Varapizuela-Sánchez *et al.* 2022)

Cuadro 3. Muestras de maíz nativo, control (sin infección) e infectadas con *A. parasiticus*.

<b>Raza</b>	<b>Muestra</b>	<b>Control</b>	<b>Infectado</b>
	Bolita blanco	Bblc	Bbli
Bolita	Bolita amarillo	Bamc	Bami
	Bolita azul	Bazc	Bazi
Arrocillo	Arrocillo blanco	Ablc	Abli
	Arrocillo amarillo	Aamc	Aami
	Arrocillo azul	Aazc	Aazi

## **7.2 Evaluación de la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* en maíces nativos y en el F1**

### **7.2.1 Extracción y cuantificación de ARN**

La extracción del ARN total de los coleóptilos de maíz se realizó con base en la metodología comercial de TRIzol™ (Invitrogen). Se pesaron 100 mg de tejido y se maceraron con 1 ml de TRIzol en un mortero frío, posteriormente se pasó la muestra a un tubo eppendorf y se centrifugó a 11,000 rpm a 4 °C por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 200 µL de cloroformo frío, se agitó vigorosamente y se centrifugó nuevamente por 15 min bajo las mismas condiciones. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo evitando la interfase y se adicionaron 500 µL de isopropanol frío para la precipitación del ARN, se agitó y centrifugó por 10 min con las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 1 mL de alcohol etílico al 75%, centrifugando a 7500 rpm por 5 min y se llevó a baño maría por 10 min a 57 °C para evaporar los restos de alcohol. El pellet se resuspendió en 40 µL de agua ultrapura. Se realizó la cuantificación y verificación de la pureza del ARN obtenido en un equipo NanoDrop (NanoDrop 2000c, ThermoScientific™) y se verificó la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

### **7.2.2 Diseño de oligonucleótidos de *zeamatina* (*zlp*)**

Se diseñaron los juegos de oligonucleótidos para identificar y medir la expresión de *zeamatina* (*zlp*) a partir la región conservada del gen, para ello, se utilizaron las secuencias del genoma del maíz de referencia B73. El diseño se realizó en el portal: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> programa Primer3 (v. 0.4.0), adicionalmente, se realizó un alineamiento múltiple con el programa BioEdit con secuencias del ARNm de *Zea mays* cultivar B73, *Zea mays* subsp. *parviglumis* y los oligos diseñados con el fin de verificar que éstos sirvan como molde para la enzima polimerasa. Finalmente, se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento, así mismo, se hizo un gradiente de concentración óptima.

### 7.2.3 Expresión de genes mediante RT-PCR

La síntesis de la primera cadena de ADN se obtuvo usando el kit ADNc RevertAid (ThermoScientific™) en un termociclador BIO-RAD MyCycler siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando una concentración final de 25 ng de ARN como plantilla para la reacción. La síntesis de las siguientes cadenas de ADN se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega). El juego de oligonucleótidos para el gen *perl* fue diseñado por Marco Antonio Sánchez Medina: F 5' ACGGCTACGCCATCATCTTC 3' y R 5' TGCCACCACTACACGAGACAA3'. Para el gen *glx-1* se utilizaron los oligonucleótidos: F 5' GGTAGTGAAGCCTCGAAGG3' y R 5' GCATTACTACATCCTAGCACAGC3' y del gen *zlp* Forward 5' GGTAGTGAAGCCTCGAAGG 3' y Reverse 5' GCATTACTACATCCTAGCACAGC 3, ambos diseñados por José Luis Hernández utilizando el software Primer3 (v. 0.4.0). Se usó como control interno el gen de referencia actina (*MAc1*), Forward 5' GTGACAATGGCACTGGAATG 3' y Reverse 5' GACCTGACCATCAGGCATCT 3' reportado por Baker *et al.* (2009). El termociclador se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos; con desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento de 53 °C por 30 seg para los cuatro oligonucleótidos y extensión a 72 °C por 51 s para *MAc1* y *glx-1*, 47 s para *perl* respectivamente y 39 s para *zlp*. La extensión final fue de 72 °C por 5 min.

Los productos obtenidos de la PCR se corrieron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con buffer TAE 1X a 70 volts por 30 min y las imágenes se obtuvieron en un transiluminador con luz UV (Kodak Gel Logic 200 Imaging System).

### 7.3 Obtención de la primera generación filial maíz-teocintle (F1)

La cruce entre la muestra de maíz susceptible a la infección fúngica y el teocintle *Zea diploperennis*, se realizó de manera intercalada, sembrando una hilera de maíz y una hilera de teocintle. La cruce entre ambos fue controlada manualmente, donde el maíz recibió el polen del

teocintle, para esto, se tomó el polen del teocintle y se depositó en los estigmas de los elotes del maíz (Figura 10). La nutrición de las plantas se realizó con una única dosis de fertilización 17-17-17 N-P-K y un riego cada tercer día de ser necesario.

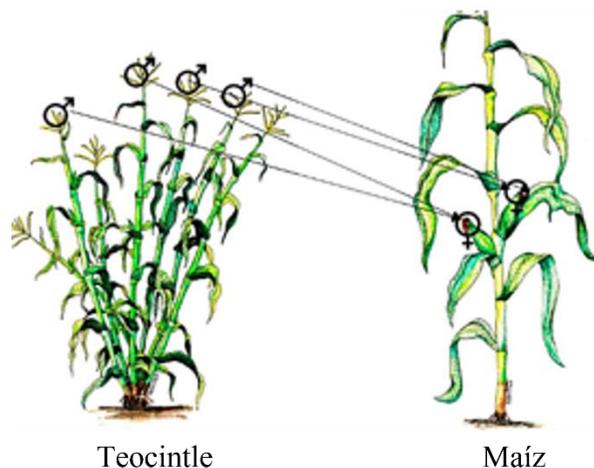


Figura 10. Método de polinización del teocintle al maíz.

### 7.3.1 Evaluar la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatin* en el F1

Para realizar la evaluación de la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatin* en la primera generación filial maíz-teocintle (bolita blanco – *Z. diploperennis*) y en el experimento adicional en donde se evaluó la expresión de los genes *glx-1* y *per1* en bolita blanco, F1 y *Zea Z. diploperennis* se siguió la metodología descrita para la obtención de coleóptilos sanos e infectados con *A. parasiticus*, extracción de ARN y análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.

### 7.4 Análisis estadístico

Las imágenes de los productos de PCR de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatin* se analizaron por densitometría con el programa ImageJ® (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012), la imagen se ajustó a escala de grises de 8 bits, el brillo y contraste se ajustaron en modo automático y se

invirtió a blanco y negro utilizando la herramienta invert LUT del programa. Los resultados obtenidos por densitometría de los niveles de expresión de los genes *glx-1g*, *perl* y *zeamatina* se compararon mediante un análisis de varianza y la prueba de medias Tukey ( $p=0.05$ ) utilizando el software Minitab (Versión 18), expresando el área de cada producto en porcentaje.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Obtención y caracterización de las muestras de maíz de la raza bolita y raza arrocillo.

Las muestras de maíz nativo fueron obtenidas por colecta directa, la raza bolita en el municipio de Villa de Zaachila, región Valles Centrales, Oaxaca y la raza arrocillo en el municipio de Santa María Lachixio, Sierra Sur, Oaxaca; en estos municipios se reportaron poblaciones de los materiales para su conservación *in situ* (Aragón *et al.* 2006). La caracterización de las mazorcas y el grano se realizó con la guía práctica para la descripción preliminar de colectas de maíz (CONABIO, 2011) y se compararon con las descripciones de Wellhausen *et al.* (1951). En la Figura 11 se presentan las muestras colectadas fueron: bolita blanco (Bbl), bolita amarillo (Bam), bolita azul (Baz), arrocillo blanco (Abl), arrocillo amarillo (Aam) y arrocillo azul (Aaz).

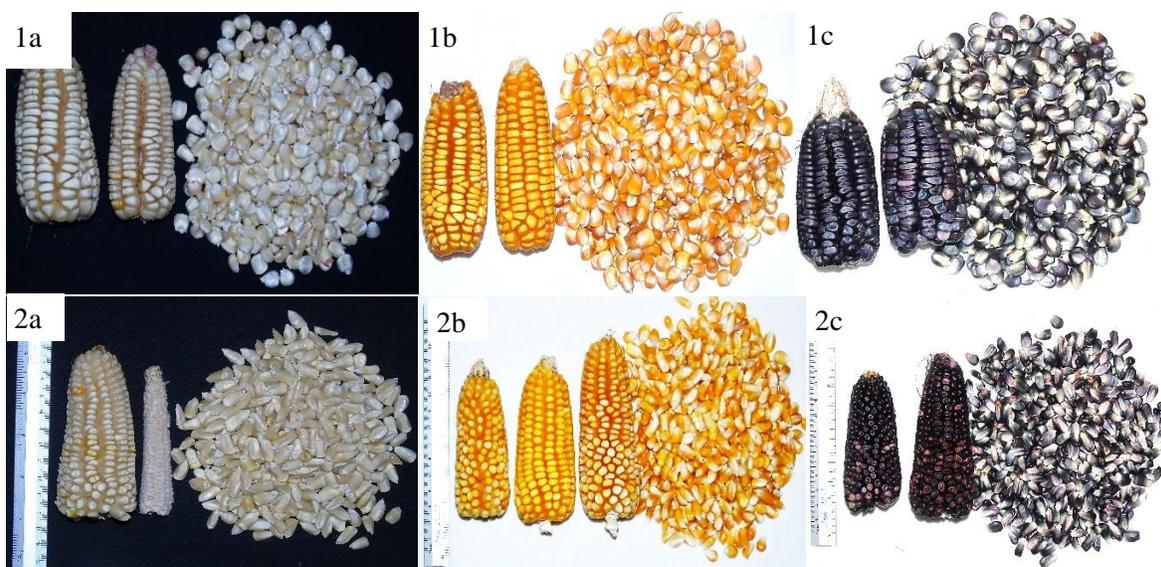


Figura 11. Mazorcas y granos maíz nativo: 1a) Bbl, 1b) Aam, 1c) Baz y 2a) Abl, 2b) Aam y 2c) Aaz.

## 8.2. Diseño de oligonucleótidos para el gen *zeamatina* (*zlp*)

Se diseñó un juego de oligonucleótidos para la evaluación de la expresión del gen *zeamatina* en maíces nativos a partir la región conservada del gen utilizando las secuencias del maíz de referencia B73. El diseño se realizó en el portal: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> y en el programa Primer3 (v. 0.4.0). En el cuadro 4 se presentan las secuencias de oligonucleótidos forward y reverse.

Cuadro 4. Secuencia de oligonucleótidos para la identificación del gen *zeamatina* mediante RT-PCR y alineamiento del fragmento codificante del gen.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto esperado
Zlp	F - GCATAAGATGGCAGGTTCCGTG R - ACCTGGAGTAGTTGGTCCGGTG	684

También se realizó un análisis *in-silico* para verificar que los oligonucleótidos sirvieran como molde de la enzima polimerasa, para ello se realizó un alineamiento múltiple con el programa BioEdit con secuencias del ARNm de *Zea mays* cultivar B73, *Zea mays* subsp. *parviglumis* y los oligonucleótidos diseñados (Figura 12), así mismo, se recurrió a la herramienta Primer-BLAST del NCBI para corroborar el diseño y la amplificación de estos.



Figura 12. Alineamiento de secuencia de bases en maíz y teocintle. Las secuencias idénticas con el primer forward (A) y reverse (B) están marcados con cuadros negros. Las secuencias utilizadas son *Zea mays* (EU965687.1), *Zea mays* (NM\_001111886.2), *Zea mays* (AY105654.1 PCO151032).

Adicionalmente se realizó otra búsqueda para identificar la estructura del gen *zeamatina* usando el programa FGENESH 2.6 que predice genes, para ello se usó la secuencia genómica del maíz B73; como resultado se encontró una longitud de 1928 pb en la cual se identificó la estructura del gen *zeamatina* con una longitud de 796 pb desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS) al sitio de poliadenilación (Po1A). El CDS es de 684 pb y codifica una proteína de 227 aminoácidos (Figura 13).

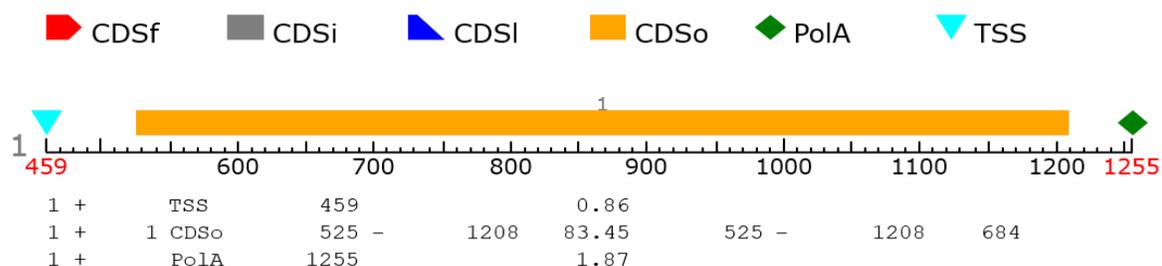


Figura 13. Predicción del gen *zeamatina* en el ADN genómico de *Zea mays* cultivar B73.

### 8.3 Obtención de la primera generación filial maíz-teocintle (F1)

Para la formación del F1, Maíz-Teocintle, se seleccionó el maíz blanco de la raza bolita y *Zea diploperennis*. La muestra de maíz se seleccionó a partir de la prueba de infección en el grano de las seis muestras de maíz, de la cual, la muestra de color blanco de la raza bolita presentó mayor infección fúngica en el grano. En el caso del teocintle, fue seleccionado por presentar baja infección ante *Aspergillus* en un estudio previo (Hernández, 2022).

El teocintle se cultivó en tres surcos el 18 de mayo de 2021, después de dos meses (18-07-2021), se sembró el maíz entre de las líneas de siembra del teocintle, una segunda siembra de realizó el 18 de agosto del mismo año. Sin embargo, la primera siembra de maíz no coincidió con la floración de los teocintles como se observa en la Figura 14a, las plantas de la segunda siembra tuvieron una floración menos desfazada con la del teocintle (Figura 14b). La polinización fue manual; las plantas de maíz recibieron el polen del teocintle. En la Figura 14c-e, se puede

observar que no se fecundaron todos los granos del maíz con el polen del teocintle, esto se observó en los tres casos.



Figura 14. Siembra para formar un F1 Maíz-Teocintle. a) cultivo maíz y teocintle, b) sincronización de floración maíz-teocintle, c) granos F1 de bolita blanco, d) granos F1 de bolita amarillo, e) granos F1 de bolita azul.

Los granos del F1 obtenido se sembraron el 23-02-2022 junto con granos de bolita blanco, con la intención de realizar una retrocruza y obtener el RC1 (Retrocruza 1). El F1 presentó su floración posterior al de bolita blanco, por lo que no se realizó la retrocruza. Sin embargo, se observaron cuatro formas de la estructura femenina no fecundada en los F1, como se observa en la Figura 15 a-d, de las cuales las mazorcas de cada una tuvieron un crecimiento y morfología particular. La mazorca a) presentó la forma más parecida a la mazorca del maíz, mientras que la mazorca b) presentó la forma más típica de una mazorca F1 con cuatro hileras, en el caso de las mazorcas c) y d) desarrollaron mazorcas típicas de F1 cuando el teocintle recibe el polen del maíz.

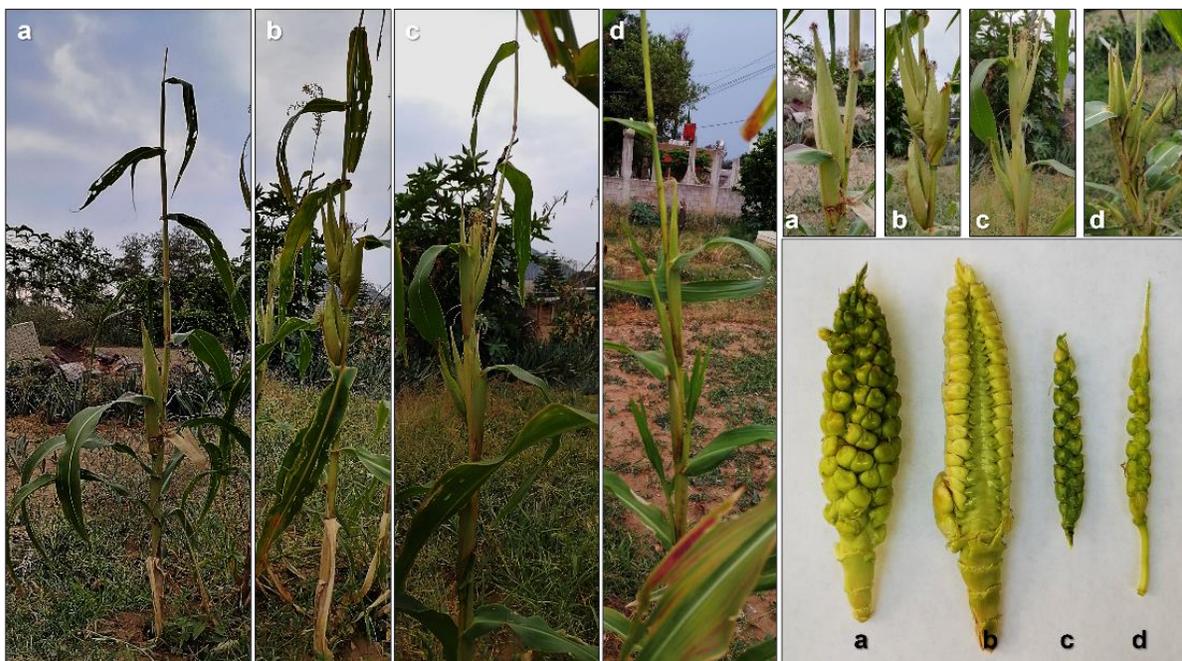


Figura 15. Plantas y mazorcas F1.

#### 8.4 Evaluación de la expresión de los genes *per1*, *glx-1* y *zeamatina* en maíces nativos y en el F1

##### 8.4.1 Inoculación de coleótilos de maíz raza bolita y raza arrocillo con *Aspergillus parasiticus*

En las muestras control o sin infección germinó el 100% de las semillas (las tres unidades experimentales). Los coleótilos y radículas mostraron un color amarillo hialino, con vigorosidad y así mismo raíces seminales abundantes (Figura 16); por su parte, las muestras infectadas con el patógeno *A. parasiticus* presentaron una menor germinación, en los tejidos de coleótilo y radícula se observó oscurecimiento causado por la infección (Figura 17), además, alrededor del 20% de las plántulas presentaron marchitamiento en los ápices.



Figura 16. Coleóptilos de maíz sin infección de *A. parasiticus* con 7 días de germinación, a) muestras de bolita y b) muestras de arrocillo.



Figura 17. Coleóptilos de muestras de maíz con infección de *A. parasiticus* con 7 días de germinación, a) bolita y b) arrocillo.

#### 8.4.2 Extracción y cuantificación del ARN total de las muestras evaluadas

El ARN total obtenido presentó las bandas características 28s y 18s bien definidas y sin trazas de material degradado (Figura 18), además de tener valores aceptables de calidad, pureza e integridad de acuerdo con los parámetros reportados en la literatura (Cuadro 5).

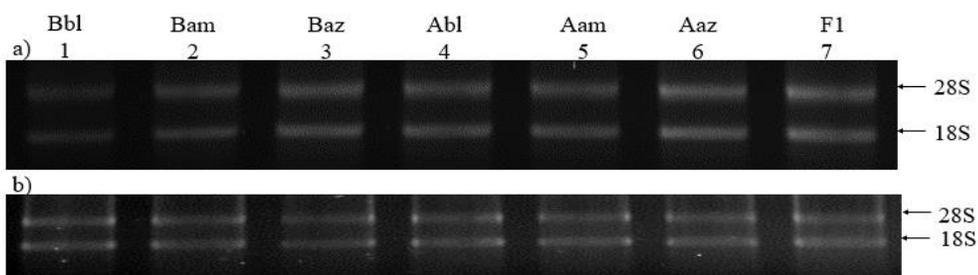


Figura 18. Gel de agarosa al 1% del ARN total de las muestras de maíz nativo y el F1 (maíz-teocintle). a) ARN de muestras control, b) ARN de muestras infectadas con *Aspergillus parasiticus*.

Cuadro 5. Cuantificación del ARN en coleóptilos de maíz y F1.

Muestras	Código	Concentración de ARN	260/280
Bolita blanco	Bblc	1139.7	2.13
	Bbli	1683.8	2.03
Bolita amarillo	Bamc	1557.6	1.99
	Bami	767.6	1.95
Bolita azul	Bazc	1277.1	1.98
	Bazi	450.0	1.95
Arrocillo blanco	Ablc	935.8	2.08
	Abli	807.6	2.01
Arrocillo amarillo	Aamc	1572.1	2.02
	Aami	655.3	1.95
Arrocillo azul	Aazc	905.3	2.04
	Aazi	754.4	2.00
F1 (Bolita blanco – <i>Z. diploperennis</i> )	F1c	1240.6	2.02
	F1i	1894.7	2.00

### 6.4.3 Expresión del Gen *glx-1*

De manera general, el gen *glx-1* presentó una alta expresión en las tres variedades de maíz raza bolita tanto control como en los infectados con *A. parasiticus* comparado con la expresión del gen en las muestras de arrocillo. La muestra Baz infectado (Bazi) se expresó 5.63 % más con respecto a *MAcI* y 3.0 % más que su control (Bazc), en el caso de Bbli, esta fue superior a su control (Bblc) con 3.67 % y -1.96 % a la muestra Bazi, en contraste, la muestra Bami fue inferior a su control (Bamc) en -3.28 % pero superior a *MAcI* en 3.98 %; en este caso, Bami fue la muestra inoculada con la expresión más baja. Estadísticamente la muestra Bazi fue superior al resto de las muestras, mientras que, las muestras Bbli, Bamc y Bazc no presentaron diferencias significativas entre ellas (Figura 19).

En la raza arrocillo, solo Aaz mostró un aumento en la expresión génica con 0.62 % mientras que Abl y Aam presentaron una respuesta negativa ante el patógeno de -2.02% y -0.26%. De las 14 muestras analizadas para este gen, Bbli y Bazi mostraron la mayor transcripción ante la infección fúngica. Comparando la expresión de *glx-1* en el F1 con su progenitor Bbl, se puede observar que, tanto en condición basal como bajo estrés por infección fúngica, el F1 presenta

una mayor expresión del gen con respecto a Bbl. Las muestras que presentaron una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la expresión de *glx-1* fueron Bazi, Ablc y F1.

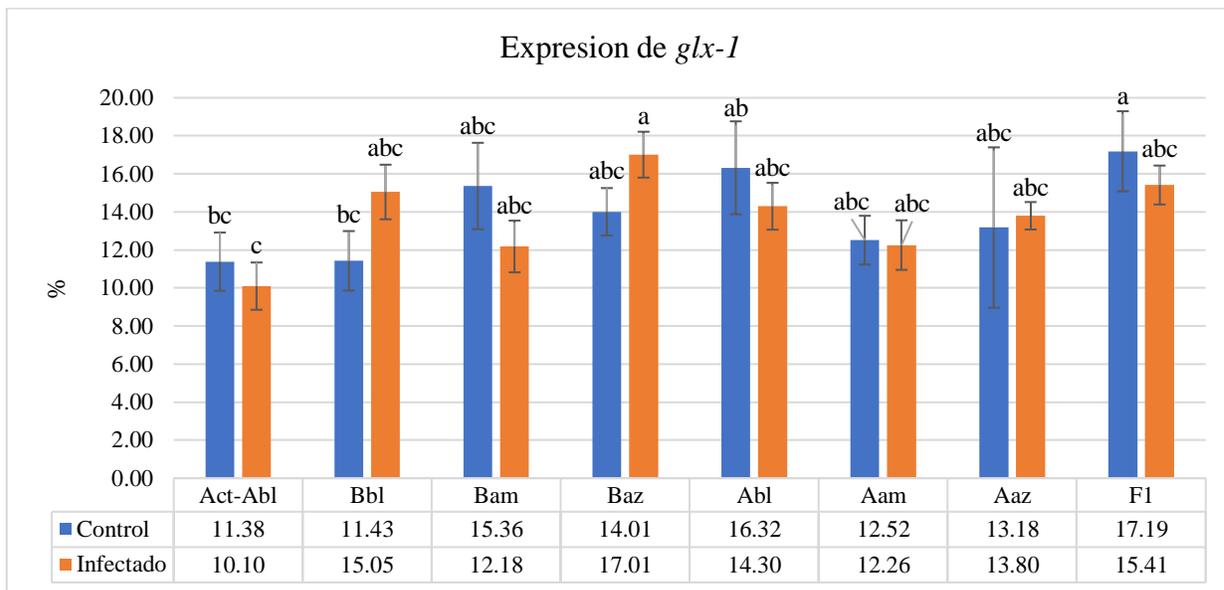


Figura 19. Expresión del gen *glx-1* en muestras de maíz raza bolita, raza arrocillo y el F1. Los datos graficados son el promedio de 48 repeticiones.

En la figura 20 se observan los productos obtenidos del gen *glx-1* de 905 pb en muestras control e infectadas de las razas bolita y arrocillo y en el F1. En el carril 1 se encuentra actina de maíz *MAC1*, el gen de referencia. Como se observa en la figura, se detectó una alta expresión del gen en todas las muestras analizadas.

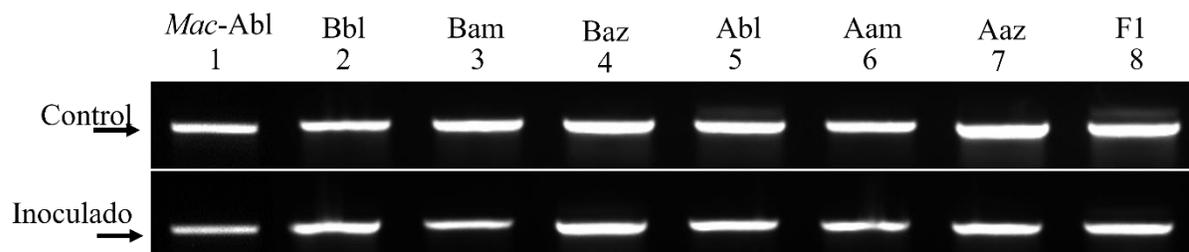


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR amplificados del gen *glx-1* de coleóptilos de maíz nativo y el F1 control e infectados.

#### 8.4.4 Expresión del Gen *perl*

Respecto a la expresión del gen *perl* se observaron niveles bajos de expresión en la mayoría de las muestras analizadas y estos fueron inferiores al gen de referencia (*MAcI*). En la raza bolita, la muestra con mayor expresión del gen *perl* fue Bbli con 18.4 % respecto a su control (Bblc) en la cual no se detectó expresión, sin embargo, Bbli fue -22.59 % inferior a *MAcI*; en Baz tampoco se observó expresión en el control (Figura 21). Bbli fue la muestra que presentó una diferencia estadísticamente significativa en este grupo.

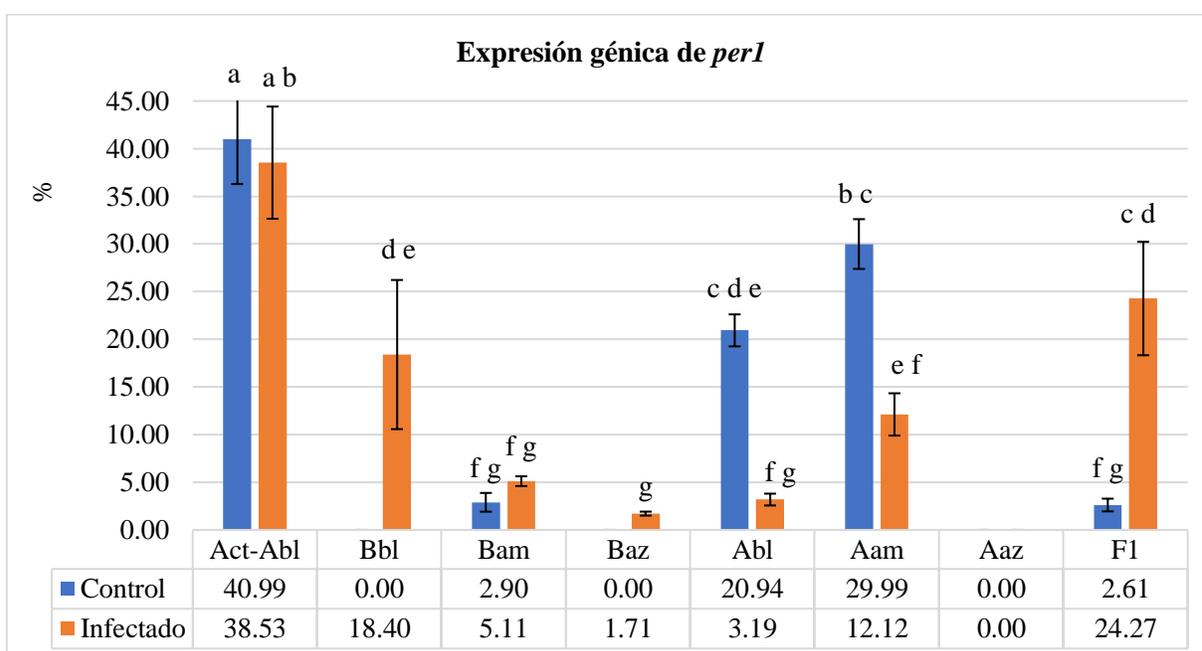


Figura 21. Expresión del gen *perl* en muestras de maíz raza bolita, raza arrocillo y el F1. Los datos graficados son el promedio de 48 repeticiones.

Por otra parte, en las muestras de arrocillo no se observó inducción en la expresión del gen en condiciones de infección fúngica, sin embargo, en estado basal Abl y Aam presentaron altos niveles de expresión comparado con sus controles de 17.75 % y 17.87 % respectivamente y en la muestra Aaz no se detectó señal del gen en ninguna condición experimental establecida en este estudio. Finalmente, el F1 presentó la mayor inducción del gen con un 21.66 % superior a la muestra sana pero inferior al gen de referencia en 16.72 %. En el caso de las muestras de

bolita, Bblc y Bazc presentaron niveles superiores a sus muestras infectadas y mostraron diferencias estadísticamente significativas con las muestras Bbl y el F1

En la figura 22 se muestra un gel de agarosa con los productos obtenidos de *per1* (770 pb) a 40 ciclos, en ella se observa una expresión menor del gen en todas las muestras analizadas comparado con el gen de referencia *MAc1*.

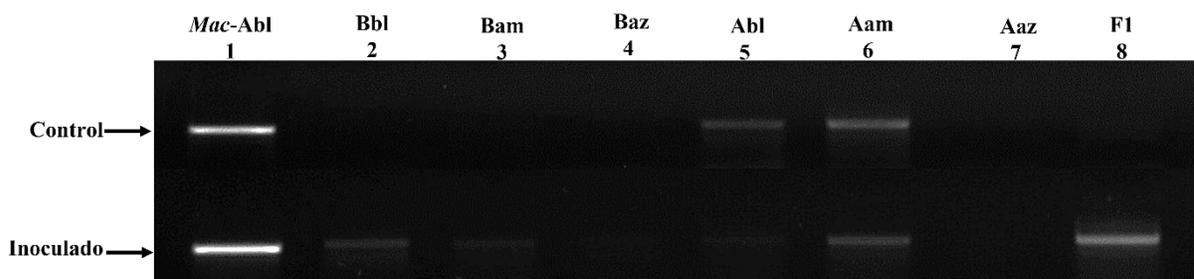


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR amplificados del gen *per1* de coleóptilos de maíz nativo y el F1 control e infectados. En el carril 1 el gen de referencia

#### 8.4.5 Expresión del Gen *zeamatina* (*zlp*)

Analizando la expresión del gen *zeamatina*, solo se observó inducción del gen en Bbli aunque fue relativamente bajo, en cambio las muestras Bam y Baz presentaron niveles elevados comparados con sus respectivos controles. En cuanto a la raza arrocillo, Ablc superaron significativamente a la muestra infectada (Abli) con un 18.42% para el gen *zeamatina* y 5.35% al gen de referencia *MAc1* respectivamente. Por otra parte, en Aam no hubo diferencia significativa en la expresión génica entre el control y el coleóptilo infectado (Figura 23). Ablc fue la única muestra que presentó diferencias estadísticamente superiores en todas las muestras analizadas.

En la figura 24 se muestra un gel de agarosa al 1.5 % con los fragmentos amplificados del gen *zeamatina* de 650 pb a una temperatura de 53 °C y 30 ciclos. Como se observa en este gel hubo expresión del gen en todas las muestras de maíz y en el F1.

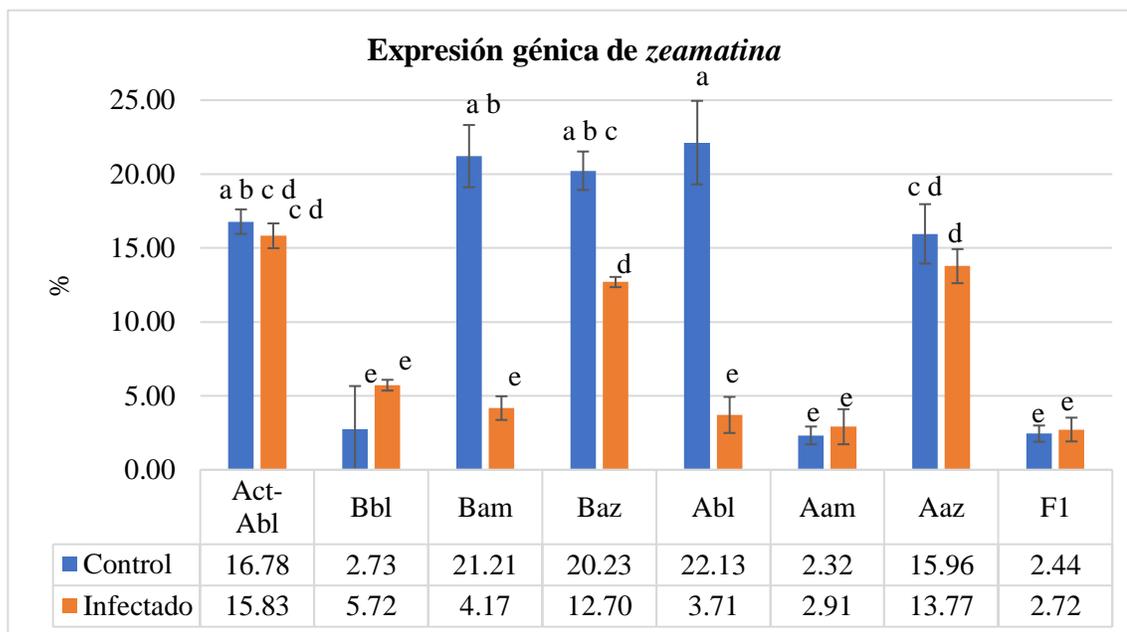


Figura 23. Expresión del gen *zeamatina* en muestras de maíz raza bolita, raza arrocillo y el F1. Los datos graficados son el promedio de 48 repeticiones.

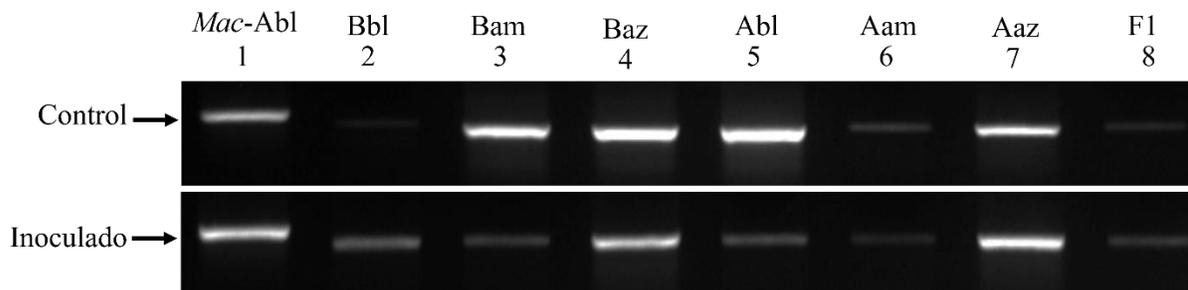


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR amplificados del gen *zeamatina* de coleóptilos de maíz nativo y el F1 control e infectados. En el carril 1 el gen de referencia

### 8.5 Análisis de la expresión de los genes *glx-1* y *per1* en muestra de bolita blanco, F1 (maíz-teocintle) y *Zea diploperennis*

Se realizó un experimento adicional con el fin de analizar la expresión de los genes *glx-1* y *per1* en el F1 y sus progenitores, Bolita blanco (Bbl) y *Zea diploperennis* (Dd). En la figura 25 se observan los coleóptilos de cada muestra tanto controles sanos (a) como infectados con A.

*parasiticus* (b) con una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Los coleóptilos de las muestras control o sanas presentaron un color amarillo hialino con vigorosidad, por su parte, las muestras infectadas con el hongo presentaron coleóptilos con oscurecimiento causado por la infección, en casos severos se observó marchitamiento en ápices.

Se realizó la extracción del ARN de todas las muestras mediante el método de TRizol, obteniéndose valores aceptables en concentración, pureza e integridad en cada extracción.

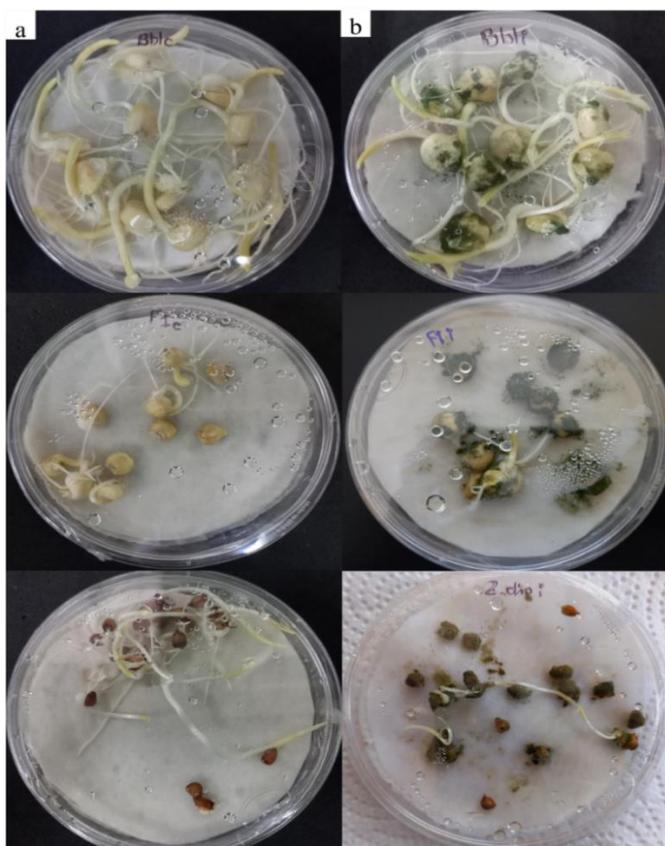


Figura 25. Coleóptilos de muestras de maíz bolita: a) controles sanos, b) muestras infectadas con *A. parasiticus* de 7 días de germinación.

Realizando el análisis de expresión de los genes *glx-1* y *per 1* en coleóptilos de Bbl, F1 y Zd los resultados mostraron que los dos genes buscados se expresaron tanto en controles sanos como en los infectados con *A. parasiticus* (Figura 26). La expresión de *glx-1* solo se indujo en el F1

en un 4.7 % comparado a su control, Zd en cambio presentó un mayor nivel de expresión en estado basal que con el hongo con una diferencia de 9 % y cuya expresión fue superior al resto de las muestras. Comparando los resultados del F1 con sus progenitores, el F1 presentó menor expresión de *glx-1* comparado a Bbl y Zd.

En este análisis se identificaron niveles elevados del gen *per1* en Bbl y F1, Bbl mostró mayor cantidad de transcritos con respecto al gen de referencia además de presentar una inducción significativa del 9.76 % superior a la muestra sana, en el caso del F1, se observó mayor expresión del gen en estado basal que con el patógeno. Finalmente, el gen *per1* tuvo el menor nivel de expresión en coleóptilos con y sin infección fúngica que disminuyó más con la infección de *A. parasiticus*. Comparando la expresión de *per1* en el F1 con sus progenitores, el F1 presentó mayor expresión del gen a diferencia de Zd.

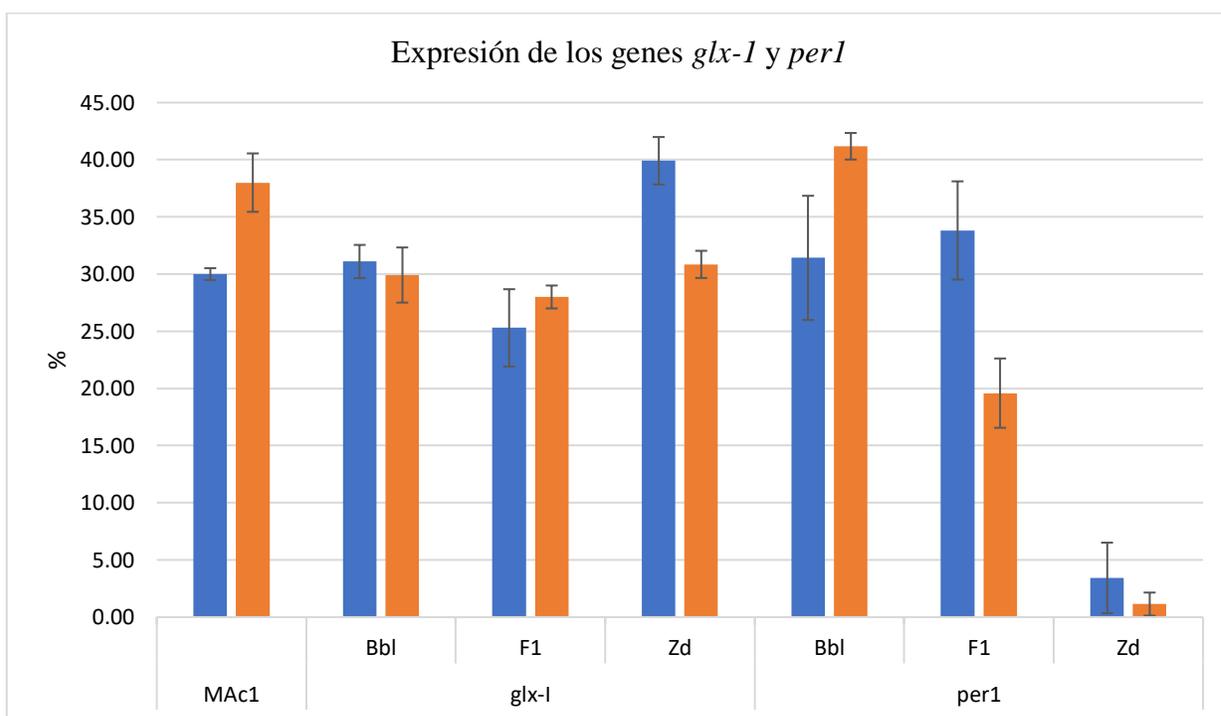


Figura 26. Niveles de expresión de los genes *glx-1* y *per1* en Bolita, F1 y *Zea diploperennis* con y sin infección de *A. parasiticus*.

En gel de agarosa la señal de *glx-1* (905 pb) fue superior al gen *MAc1* en todas las muestras analizadas tanto sanas como en presencia de *A. parasiticus* (Figura 27), en la figura 28 se presenta un gel de agarosa con los productos obtenidos del gen *per1*, en ella se observa una menor transcripción de *per1* (770 pb) en las muestras analizadas con respecto al gen de referencia ante la infección del hongo.

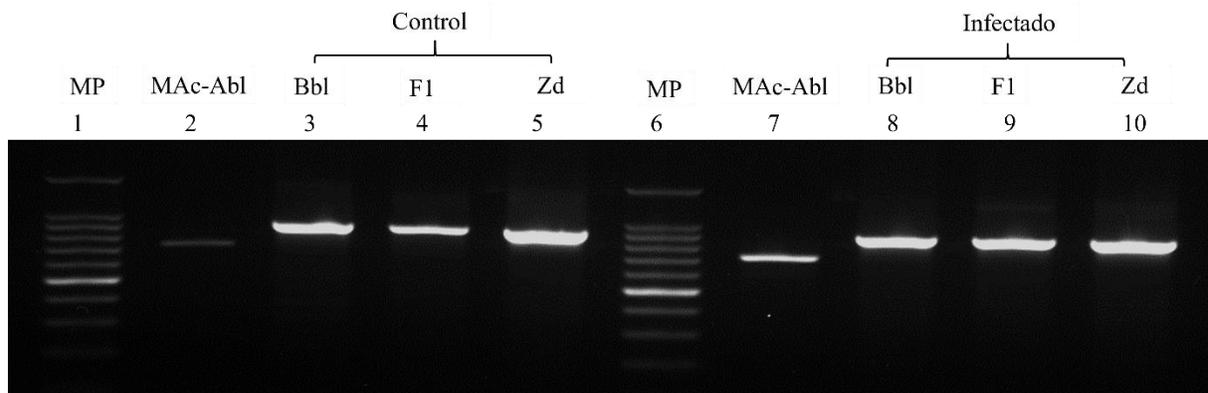


Figura 27. Gel de agarosa al 1.5 % de los productos obtenidos del gen *glx-1* en *Bolita*, *F1* y *Zea diploperennis*. Carril 1 y 6: marcador de peso molecular, carril 2 y 7: gen de referencia.

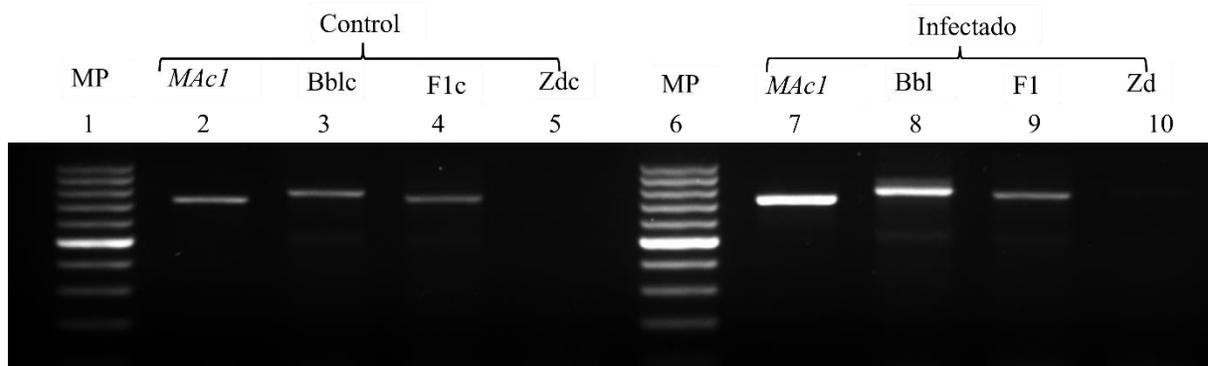


Figura 28. Gel de agarosa al 1.5 % de los productos obtenidos del gen *per1* en *Bolita*, *F1* y *Zea diploperennis*. Carril 1 y 6: marcador de peso molecular, carril 2 y 7 gen de referencia.

## IX. DISCUSIÓN

El desarrollo y uso de maíces resistentes tanto a la infección fúngica de *Aspergillus* como a la acumulación de aflatoxinas representa una alternativa de manejo de bajo costo (Ortega y Cotty 2018) particularmente para pequeños productores y de autoconsumo. El uso de la genética reversa ha permitido identificar genes que están asociados con la resistencia a la infección fúngica y acumulación de aflatoxinas conduciendo al descubrimiento de marcadores que permiten transferir resistencia natural en el cultivo de maíz (Mesterhazy *et al.* 2022; Han *et al.* 2020). Al evaluar la expresión de tres genes relacionados a la resistencia, *glx-1*, *perl* y *zeamatina* en maíces nativos de raza bolita y raza arrocillo y en la primera generación filial Bbl-*Zea diploperennis* (F1) ante la infección por *A. parasiticus*, los coleóptilos de las muestras de maíz presentaron diferencias significativas entre los controles sanos y los infectados con el hongo. Los granos de ambas razas mostraron menor germinación y crecimiento del coleóptilo, además de baja densidad radicular y en casos severos marchitamiento en los ápices del coleóptilo, en contraste, los granos sin infección presentaron mayor crecimiento del coleóptilo y densidad radicular, esta sintomatología fue similar a lo reportado en granos inoculados con *A. parasiticus* (Varapizuela *et al.* 2019) y *A. flavus* (Varapizuela *et al.* 2022) en diferentes muestras de maíz oaxaqueño.

De los tres genes analizados en este estudio, el gen *perl* presentó la menor expresión génica en las muestras de maíz y el F1 tanto sanas como inoculadas. En reportes previos se encontró que la transcripción de *perl* en semillas de cebada y *Arabidopsis* se relacionaba con la latencia y disminuía durante la germinación (Stacy *et al.* 1996, Chen *et al.* 2016, Chen *et al.* 2020) resultados semejantes fueron reportados para la actividad de la proteína PER1 que disminuyó considerablemente en semillas no latentes de cebada (Stacy *et al.* 1999); estos hallazgos podrían explicar la baja transcripción de *perl* en coleóptilos de maíz en este estudio. En genotipos de maíz, Chen *et al.* (2007) observaron en condiciones de desarrollo normal, un incremento de la expresión del gen durante la etapa de maduración y deshidratación del grano tanto en genotipo resistente (MP420) como en el susceptible (B73) sin embargo, tras la inoculación con *A. flavus* la expresión génica disminuyó en ambos genotipos, estos resultados son similares a los

obtenidos en la presente investigación, donde, de las siete muestras analizadas, tres presentaron altos niveles de expresión en muestras sin infección fúngica (Bamc, Bazc, Ablc y Aazc) con respecto al gen de referencia. Sánchez-Medina (2016) reportó en coleóptilos de cuatro muestras de maíces nativos entre ellas una muestra de la raza arrocillo inoculadas con *A. parasiticus* bajos niveles de expresión del gen *per1*, por su parte, Varapizuela *et al.* (2019), encontraron diferencias en la actividad peroxidasa en coleóptilos y raíz de variedades sanas y con infección de *A. parasiticus*, los autores concluyeron que esto puede deberse a que estas variedades proceden de diferentes regiones geográficas y que esto podría propiciar diferencias en el mecanismo de respuesta.

La actividad enzimática de la proteína sintetizada por el gen *glx-1* se ha reportado en diversas especies vegetales bajo condiciones de estrés abiótico entre ellas, *Erianthus arundinaceus*, un pariente silvestre de la caña de azúcar, en el cual se observó un incremento del gen/proteína en condiciones de estrés salino e hídrico (Manoj *et al.* 2019), mientras que en palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) se observó una inducción *glx-1* bajo estrés por altas concentraciones de NaCl (Jana y Yaish 2020), estos hallazgos denotan la importancia que tiene el gen en la tolerancia a diferentes condiciones de estrés abiótico. En maíz, el gen *glx-1* ha mostrado respuesta ante estrés biótico ante la infección por *A. flavus*, en genotipos resistentes mostraron un incremento en la expresión del gen y una alta actividad enzimática en comparación con los genotipos susceptibles (Chen *et al.* 2004, Fountain *et al.* 2010). En maíz, la actividad de la proteína en embriones de granos infectados por *A. flavus* fue significativamente mayor en seis líneas de maíz resistentes en comparación con las cinco líneas susceptibles analizadas (Chen *et al.* 2004). En maíces nativos de Oaxaca, Sánchez (2016) reportó niveles elevados de *glx-1* en coleóptilos de la raza vandeño blanco, arrocillo morado, arrocillo blanco y elotes cónicos negro inoculados con *A. parasiticus*; posteriormente, Varapizuela *et al.* (2022) analizaron nueve muestras de maíz oaxaqueño de las cuales bolita Belatove y conejo veloz presentaron un incremento en la actividad enzimática de la proteína GLX-I en coleóptilo de maíz infectado con *A. flavus* en comparación con el coleóptilo sin infección fúngica, estos datos se correlacionaron con mayores niveles de expresión de *glx-1* en estas muestras, sin embargo, otras muestras analizadas prestaron una disminución del gen/proteína tras la inoculación con el patógeno, en

este estudio varias muestras de maíz y el F1 también presentaron mayor expresión del gen en estado sano, la cual disminuyó en presencia del patógeno. En un estudio donde se analizó la transcripción de varios genes relacionados con la patogénesis y genes relacionados con estrés oxidativo en genotipos de maíz resistentes y susceptibles a *Fusarium* y *A. flavus*, los autores reportaron altos niveles de expresión génica en estado basal concluyendo que las plantas presentan un sistema basal de defensa constitutiva con el fin de mejorar la resistencia a los hongos patógenos (Lanubile *et al.* 2015).

En cuanto al gen *zeamatina*, se ha reportado la actividad de la proteína como respuesta al estrés causado por *A. flavus* y *Fusarium moniliforme* en genotipos de líneas endogámicas resistentes (GT-MAS: gk y Mp420) y de híbridos susceptibles (Pioneer 3154 y Deltapine G-4666), en ambos bioensayos se reportó inhibición en el crecimiento de hifas en los discos de cultivo, paralelamente se identificó mayor actividad antifúngica en ensayos con granos germinados a las 72 h, en contraste con los no germinados, sugiriendo una resistencia asociada a la germinación (Guo *et al.* 1997). Una investigación adicional identificó mayores concentraciones de la proteína zeamatina en el germen del grano en comparación con el endospermo (Guo *et al.* 1999). Posteriormente, Chen y colaboradores (2001) reportaron altos niveles de zeamatina y otras proteínas antifúngicas en embriones de genotipos de maíz resistentes a *A. flavus* respecto a las semillas no germinadas de genotipos susceptibles. En otro estudio en donde se analizó la expresión de los genes *ZmCOR* y *zeamatina* ante la infección por *A. flavus* en embriones de maíz nativo elotes cónicos negro (susceptible a la infección por *Aspergillus*), elotes cónicos rojo (resistente) y B73 línea endogámica susceptible formada en Estados Unidos, no se identificaron transcritos del gen *zeamatina* en ninguna de las muestras analizadas (Sandoval-Flores, 2016). Estos resultados difieren con los obtenidos en la presente investigación, en la cual se observó expresión del gen en las seis muestras de maíz y en el F1 tanto sanas como inoculadas con *A. parasiticus*, la diferencia entre los resultados en ambas investigaciones podría deberse a que se evaluaron en etapas diferentes de desarrollo de la planta.

Si bien, estudios previos reportan el aislamiento del gen y la proteína zeamatina en diversos tejidos del maíz y su aplicaciones en tratamientos contra diferentes especies fúngicas con fines

terapéuticos (Perri *et al.* 2009; Wilson *et al.* 2000; Selitrennikoff *et al.* 1992), su aplicación para el control de especies del género *Aspergillus* en cultivos de importancia económica como el maíz ha sido escasa, así como la identificación de germoplasma nativo con resistencia a la infección por *Aspergillus* y acumulación de aflatoxinas. Si bien la resistencia es un fenómeno multigénico (Singh *et al.* 2023; Liu *et al.* 2022; Chen *et al.* 2015), los resultados de esta investigación sugieren la participación del gen *zeamatina* como posible respuesta a la infección de *A. parasiticus* en la primera etapa de desarrollo del maíz.

En cuanto al análisis de los genes *glx-1* y *perl* en la primera generación filial maíz-teocintle (Bolita blanco y *Z. diploerennis*), los resultados obtenidos mostraron una inducción de *glx-1* en F1 a diferencia de sus progenitores en condiciones de infección fúngica, mientras que en el gen *perl*, el F1 disminuyó su expresión ante el patógeno, comportamiento similar al observado en *Z. diploerennis*. Ellstrand *et al.* (2007) demostraron que dos subespecies de teocintle se hibridan espontáneamente con el maíz de manera natural y que la primera generación filial puede servir para realizar retrocruzas con cualquiera de los progenitores, funcionando como puente genético para mejoramiento. En otro estudio se identificaron seis marcadores del teocintle ssp. *parviglumis* en maíz que le confirieron resistencia significativa ante la infección fúngica causada por *Cercospora zea-maydis* y *Cercospora zeina* en la hoja (Lennon *et al.* 2016). También se ha reportado que los teocintles albergan rasgos importantes que pueden ser de mucha utilidad para el mejoramiento y adaptación del maíz a las nuevas condiciones ambientales provocadas por el cambio climático (Sánchez-González *et al.* 2018). Si bien hasta el momento no se han encontrado estudios a parte del presente que evalúen la expresión de genes relacionados con la resistencia en híbridos generados entre la cruce de maíz nativo y teocintle, es interesante conocer el comportamiento de estos materiales bajo condiciones de estrés fúngico, ya que pueden representar una alternativa para aminorar el problema causado por la infección de *Aspergillus* y la acumulación de aflatoxinas.

Se ha considerado de gran relevancia conocer los mecanismos de resistencia natural en este importante cultivo que puede servir como punto de partida para estudios similares en otros cultivos de importancia agrícola (Cary *et al.* 2011; Spencer-Smith *et al.* 2019), así como

también, el uso de la biotecnología en el cultivo de maíz para resolver el grave problema de la contaminación por aflatoxinas (Bhatnagar *et al.* 2015) como la identificación de germoplasma nativo y/o generación de nuevos híbridos a partir de los maíces locales dada la importancia de este cereal.

## X. CONCLUSIONES

Se identificó la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *zeamatina* en los maíces estudiados y en el F1 tanto en controles sanos como en inoculados con el hongo, sin embargo, *per1* fue el gen que presentó el menor nivel de expresión.

De manera general, la muestra Arrocillo blanco control (Ablc) fue la muestra que presentó los niveles más elevados de los genes evaluados; en cuanto a inducción, mientras que Bolita blanco (Bbli), arrocillo azul (Aazi) y el F1 presentaron una inducción significativa de al menos dos de los genes estudiados ante la infección de *A. parasiticus*.

En el análisis del F1 con sus progenitores, las tres muestras presentaron niveles altos de *glx-1* tanto en controles como infectados siendo el F1 la única muestra que aumentó la expresión del gen en presencia del hongo. Por otra parte, *Zea diploperennis* presentó menor nivel de expresión del gen *per1* en coleóptilos sanos como infectados, mientras que Bbl mostró una inducción en los niveles de expresión del gen bajo condiciones fúngicas.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo Nouh FA, Gezaf SA & Abdel-Azeem AM. 2020. *Aspergillus* mycotoxins: Potential as biocontrol agents. *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture: Volume 2: Functional Annotation for Crop Protection*, 217-237.
- Alameri MM, Kong ASY, Aljaafari MN, Ali HA, Eid K, Sallagi MA, *et al.* 2023. Aflatoxin Contamination: An Overview on Health Issues, Detection and Management Strategies. *Toxins*, 15(4): 246. <https://doi.org/10.3390/toxins15040246>
- Álvarez-Días F, Torres-Parga B, Valdivia-Flores AG, Quezada-Tristán T, Alejos-De La Fuente JI, Sosa-Ramírez J & Rangel-Muñoz EJ. 2022. *Aspergillus flavus* and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin M1 in bovine milk in Aguascalientes, Mexico. *Toxins*, 14(5), 292. <https://doi.org/10.3390/toxins14050292>
- Aragón CF, Taba S, Hernández JM, Figueroa JD y Serrano V. 2006. Actualización de la Información sobre los Maíces Criollos de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS002 México D. F. 119 p.
- Bhatnagar-Mathur P, Sunkara S, Bhatnagar-Panwar M, Waliyar F & Sharma KK. 2015. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.009>
- Batalia MA, Monzingo AF, Ernst S, Roberts W & Robertus JD. 1996. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural Biology*, 3(1), 19-22. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-19>
- Benkerroum N. 2020. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International journal of environmental research and public health*, 17(2), 423.
- Brown RL, Chen ZY, Warburton M, Luo M, Menkir A, Fakhoury A & Bhatnagar D. 2010. Discovery and characterization of proteins associated with aflatoxin-resistance: evaluating their potential as breeding markers. *Toxins*, 2(4), 919-933.
- Cary JW, Rajasekaran K, Brown RL, Luo M, Chen ZY & Bhatnagar D. 2011. Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins*, 3(6), 678-696. <https://doi.org/10.3390/toxins3060678>
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina.
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2022. Razas de maíz de México. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas-de-maiz>. (consultado mayo, 2023).

- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2020. Raza arrocillo. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-conico/arrocillo>. (consultado abril, 2023).
- Chen ZY, Rajasekaran K, Brown RL, Sayler RJ, Bhatnagar D. 2015. Discovery and confirmation of genes/proteins associated with maize aflatoxin resistance. *World mycotoxin journal*, 8(2): 211-224. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1732>
- Chen H, Ruan J, Chu P, Fu W, Liang Z, Li Y, *et al.* 2020. AtPER1 enhances primary seed dormancy and reduces seed germination by suppressing the ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seeds. *The Plant Journal*, 101(2): 310-323. <https://doi.org/10.1111/tpj.14542>
- Chen ZY, Rajasekaran K, Brown RL, Sayler RJ & Bhatnagar D. 2015. Discovery and confirmation of genes/proteins associated with maize aflatoxin resistance. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 211-224. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1732>
- Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE. 2007. Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 97(9): 1094–1103. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1094>
- Chen ZY, Brown RL, Rajasekaran K, Damann KE & Cleveland TE. 2006. Identification of a maize kernel pathogenesis related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Phytopathology* 96:87-95.
- Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE. 2004. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology*, 94(9): 938-945. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.9.938>
- Chen ZY, Brown RL, Damann KE & Cleveland TE. 2002. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology* 92:1084-1094.
- Chen ZY, Brown RL, Russin JS, Lax AR & Cleveland TE. 1999. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* a-amylase. *Phytopathology* 89:902-907.
- Chen ZY, Brown RL, Cleveland TE, Damann KE & Russin JS. 2001. Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production. *Journal Food Prot.* 64, 1785–1792.
- El-Sayed RA, Jebur AB, Kang W & El-Demerdash FM. 2022. An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2), 91-102.
- Ellstrand NC, Garner LC, Hegde S, Guadagnuolo R & Blancas L. 2007. Spontaneous Hybridization between Maize and Teosinte. *Journal of Heredity*, 98(2), 183–187.
- Escalante LN y Trigo YCM. 2018. Campesinos maiceros en Tlaxcala: viabilidad, caracterización y respuestas ante el maíz transgénico. *Sociedad y Ambiente* 16(6): 179-206.

- Figuroa M, Rodríguez R, Guerrero B, González M, Pons J, Jiménez J, Ramírez J, Andrio E y Mendoza M. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Fitopatología*, 28, 2, 124-134.
- Frisvad J, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Nováková A, Chen AJM, Arzanlou TO, Larsen F, Sklenár W, Mahakarnchanakul RA, 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*, 93(1), 1-63.
- Frisvad JC & Larsen TO. 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7859-7877.
- Fountain JC, Chen ZY, Scully BT, Kemerait RC, Lee RD, Guo BZ. 2010. Pathogenesis-related gene expressions in different maize genotypes under drought stressed conditions. *Afr. J. Plant Sci*, 4(11): 433-440.
- González-Curbelo MÁ & Kabak B. (2023). Occurrence of Mycotoxins in Dried Fruits Worldwide, with a Focus on Aflatoxins and Ochratoxin A: A Review. *Toxins*, 15(9), 576.
- Guo BZ, Cleveland TE, Brown RL, Widstrom NW, Lynch RE & Russin JS. 1999. Distribution of antifungal proteins in maize kernel tissues using immunochemistry. *Journal of Food Protection*, 62(3), 295-301. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.3.295>
- Guo BZ, Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS, Mehta AD, Selitrennikoff CP, Widstrom NW. 1997. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology* 87:1174-1178.
- Han G, Li C, Xiang F, Zhao Q, Zhao Y, Cai R, *et al.* 2020. Genome-wide association study leads to novel genetic insights into resistance to *Aspergillus flavus* in maize kernels. *BMC plant biology*, 20: 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02404-5>
- Hernández-Morales J.L. 2022 Identificación de los genes glx-1, TI 14-kD y pr-10 relacionados a la resistencia a aflatoxinas, en *Zea diploperennis*, *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea luxurians* [Tesis de Doctorado]. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO).
- Hoque TS, Hossain MA, Mostofa MG, Burritt DJ, Fujita M & Tran LSP. (2016). Methylglyoxal: An Emerging Signaling Molecule in Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Jallow A, Xie H, Tang X, Qi Z & Li P. 2021. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(3), 2332-2381.
- Jana GA & Yaish MW. 2020. Functional characterization of the Glyoxalase-I (PdGLX1) gene family in date palm under abiotic stresses. *Plant Signaling & Behavior*, 15(11), 1811527.

- Ji C, Norton RA, Wicklow DT & Dowd PF. 2000. Isoform patterns of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in maturing corn kernels (*Zea mays* L.) associated with *Aspergillus flavus* milk stage infection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 507-511.
- Kimanya ME, Routledge MN, Mpolya E, Ezekiel, CN, Shirima CP & Gong YY. 2021. Estimating the risk of aflatoxin-induced liver cancer in Tanzania based on biomarker data. *Plos one*, 16(3), e0247281.
- Kumar A, Pathak H, Bhadauria S & Sudan J. 2021. Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3, 1-9.
- Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. 2017. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology* 7: 2170. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Lanubile A, Maschietto V, De Leonardis S, Battilani P, Paciolla C, Marocco A. 2015. Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(5): 546-557. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-14-0269-r>
- Lennon JR, Krakowsky M, Goodman M, Flint-Garcia S, Balint-Kurti P J. 2016. Identification of Alleles Conferring Resistance to Gray Leaf Spot in Maize Derived from its Wild Progenitor Species Teosinte. *Crop Science*, 56(1), 209–218.
- Liu L, Xie M & Wei D. 2022. Biological detoxification of mycotoxins: Current status and future advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3:), 1064. <https://doi.org/10.3390/ijms23031064>
- Luo M, Brown RL, Chen ZY, Menkir A, Yu J & Bhatnagar D. 2011. Transcriptional profiles uncover *Aspergillus flavus*-induced resistance in maize kernels. *Toxins*, 3(7), 766-786. <https://doi.org/10.3390/toxins3070766>
- Lv L, Guo X, Zhao A, Liu Y, Li H & Chen X. 2023. Combined analysis of metabolome and transcriptome of wheat kernels reveals constitutive defense mechanism against maize weevils. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1147145.
- Manoj VM, Anunanthini P, Swathik PC, Dharshini S, Ashwin NJ, Manickavasagam M, *et al.* 2019. Comparative analysis of glyoxalase pathway genes in *Erianthus arundinaceus* and commercial sugarcane hybrid under salinity and drought conditions. *BMC genomics*, 19: 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5349-7>
- Maschietto V, Lanubile De, Leonardis S, Marocco A & Paciolla C. 2016. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxydant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Physiology*, 200, 53-61.

- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sánchez J, Buckler E, Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:6080-6084.
- Mesterhazy A, Szieberth D, Toldine ET, Nagy Z, Szabó B, Herczig B, *et al.* 2022. Updating the Methodology of Identifying Maize Hybrids Resistant to Ear Rot Pathogens and Their Toxins—Artificial Inoculation Tests for Kernel Resistance to *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, and *Aspergillus flavus*. *Journal of Fungi*, 8(3): 293. <https://doi.org/10.3390/jof8030293>
- Mwamahonje A, Eleblu JSY, Ofori K, Deshpande S, Feyissa T & Tongoona P. 2021. Drought tolerance and application of marker-assisted selection in sorghum. *Biology*, 10(12), 1249. <https://doi.org/10.3390/biology10121249>
- Ortega-Beltran A & Cotty PJ. 2018. Frequent shifts in *Aspergillus flavus* populations associated with maize production in Sonora, Mexico. *Phytopathology*, 108(3): 412-420. <https://doi.org/10.1094/phyto-08-17-0281-r>
- Oseguera PD y Ortega P. 2016. Gente de maíz. Historia y diversidad en la cocina mexicana del maíz. In: El Maíz Nativo en México. Una Aproximación Crítica desde los Estudios Rurales. López M. I. e I. Vizcarra B. (coords.). Universidad Autónoma Metropolitana. Lerma, Estado de México. pp:113-136
- Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, *et al.* 2017. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial biotechnology*, 10(2), 296-322.
- Pechanova O & Pechan T. 2015. Maize-pathogen interactions: an ongoing combat from a proteomics perspective. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 28429-28448.
- Perri F, Della PS, Rufini F, Patamia M, Bonito M, Angiolella L & Vitali A. 2009. Antifungal-protein production in maize (*Zea mays*) suspension cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52(4), 273-281. <https://doi.org/10.1042/BA20080060>
- Pickova D, Ostry V, Toman J & Malir F. 2021. Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation. *Toxins*, 13(6), 399.
- Piontelli LE. 2014. Agentes comunes en las aspergilosis humanas: Conceptos primarios en la diferenciación de sus complejos de especies. *Bol. Micol.* 29: 63-100
- Ramírez JA, Cadena IJ, Trejo TBI, Morales FFJ, Mancera RA (5th-8th July 2022). Tlayuda value chain with gender participation and implications for the conservation of *Zea mays* L. bolita race. 26th International Congress on Project Management and Engineering. [http://dspace.aepro.com/xmlui/bitstream/handle/123456789/3274/AT06-001\\_22.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.aepro.com/xmlui/bitstream/handle/123456789/3274/AT06-001_22.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Roberts WK & Selitrennikoff CP. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Microbiology*, 136(9), 1771-1778. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-9-177>

- Ruiz CJA, Hernández C JM, Sánchez GJJ, Ortega CA, Ramírez OG, Guerrero HMJ y Aragón CF. 2013. Ecología y distribución actual y potencial de razas mexicanas de maíz. Libro Técnico Núm. 5. INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
- Sánchez-González JDJ, Ruiz-Corral JA, García GM, Ojeda GR, Larios LDL, Holland JB & García-Romero GE. 2018. Ecogeography of teosinte. *PLoS One*, 13(2), e0192676.
- Sánchez-Medina MA. 2016. Identificación de la expresión de los genes *glx-1*, *per1* y *ZmCOR* ante la presencia de *Aspergillus parasiticus* en coleóptilos de maíces criollos de Oaxaca. [Tesis de Doctorado]. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO).
- Sánchez GJJ, Goodman MM & Stuber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Economic Botanic*. 54: 43-59
- Sandoval-Flores V. 2016. Identificación de razas de maíz criollo del Valle de Oaxaca resistente y susceptible a la acumulación de Aflatoxina B1 producida por *Aspergillus flavus* y la expresión de los genes: *ZmCOR*, *Zeamatin*, *aflR* y *norB*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Repositorio Institucional- Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato.
- Sarma UP, Bhetaria PJ, Devi P & Varma A. 2017. Aflatoxins: Implications on Health. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 32(2), 124–133.
- Selitrennikoff CP, Vigers AJ & Roberts WK. 1992. Antifungal proteins from plants: a possible new source of human therapeutics. In *New Approaches for Antifungal Drugs*, 88-113. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6729-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6729-9_6)
- Shabeer S, Asad S, Jamal A, Ali A. 2022. Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins*, 14(5): 307. <https://doi.org/10.3390/toxins14050307>
- Sheoran S, Kaur Y, Kumar S, Shukla S, Rakshit S & Kumar R. 2022. Recent advances for drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): Present status and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 13, 872566. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872566>
- Singh A, Sharma S, Choudhir G & Kumar S. 2023. Fungal pathogen-induced modulation of structural and functional proteins in *Zea mays* L. In *Maize Improvement: Current Advances in Yield, Quality, and Stress Tolerance under Changing Climatic Scenarios* (pp. 303-322). Cham: *Springer International Publishing*. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-21640-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-031-21640-4_14)
- Soleri D, Cleveland DA, Aragón CF, Jimenez V & Wang MC. 2023. Traditional Foods, Globalization, Migration, and Public and Planetary Health: The Case of Tejate, a Maize and Cacao Beverage in Oaxacalifornia. *Challenges*, 14(1), 9.
- Spencer-Smith J, Paul-Williams W & Windham GL. 2019. Aflatoxin in maize: a review of the early literature from “moldy-corn toxicosis” to the genetics of aflatoxin accumulation

- resistance. *Mycotoxin research*, 35, 111-128. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-00340-w>
- Stacy RA, Nordeng TW, Culiáñez-Macià FA, Aalen RB. 1999. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *The Plant Journal*, 19(1): 1-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00488.x>
- Stacy RA, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen RB. 1996. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant molecular biology*, 31: 1205-1216. <https://doi.org/10.1007/bf00040837>
- Tadeo-Robledo M, Zamudio-González B, Espinosa-Calderón A, Turrent-Fernández A, Cárdenas-Marcelo AL, López-López C., et al. 2015. Rendimiento de maíces nativos e híbridos en diferente fecha de siembra y sus unidades calor. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(1), 33-43.
- USDA. United States Department of Agriculture. Informe 2023. <https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=0440000>. Consultado en noviembre 2023
- Varapizuela-Sánchez CF, Sánchez-Medina MA, Pina-Canseco MS, Rosas-Murrieta NH, Pérez-Santiago AD, García-Montalvo IA. 2022. Glyoxalase I (GLX-I) analysis in native maize from Oaxaca, Mexico, infected with *Aspergillus flavus* in vitro. *Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia*, 39(4). [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n4.01](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n4.01)
- Varapizuela-Sánchez CF. 2020. Análisis de la actividad de glioxalasa I (GLX-I) como respuesta a la infección por *Aspergillus flavus* in vitro en maíces nativos del estado de Oaxaca. [Tesis de Doctorado]. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO).
- Varapizuela SCF, Sánchez MMA, Pérez SAD. 2019. Análisis de la actividad enzimática de peroxidasas en maíces nativos de Oaxaca infectados por *Aspergillus parasiticus*. *Revista Ingeniantes*, 2(2): 75-79.
- Visagie CM & Houbraken J. 2020. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Studies in Mycology*, 95(1), 253-292.
- Wellhausen EJ, Roberts LM, Hernández EX, Mangelsdorf PC. 1951. Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG). México, D. F. Folleto técnico Núm. 5. 237 p.
- Wilson S, Mahiou B, Reiger R, Tentler S, Schimoler R, Orndorff S & Selitrennikoff CP. 2000. Pilot-scale purification of zeamatin, an antifungal protein from maize. *Biotechnology Progress*, 16(1), 38-43. <https://doi.org/10.1021/bp9901365>