



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA APLICADA

MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL MAIZ (*Zea Mays L*) A *Aspergillus flavus* Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA:

Ing. Agr. VERONICA GARRIDO BAZAN

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA D.BIBBINS MARTINEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. GEORGE MAHUKU

JULIO DE 2013



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala siendo las 12:00 horas del día 12 del mes de Junio del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN para examinar la tesis titulada:
MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL MAIZ (Zea Mays L) A Aspergillus flavus Y
PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS

Presentada por el alumno:

Garrido
Apellido paterno

Bazán
Apellido materno

Verónica
Nombre(s)

Con registro:

A	1	1	0	2	0	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Martha D. Bibbins Martínez

Dr. George Mahuku

Dra. Analilia Arroyo Becerra

Dr. Miguel Angel Villalobos López

Dra. Alma L. Martínez Ayala

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 20 del mes Junio del año 2013, el (la) que suscribe Verónica Garrido Bazán alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A110207, adscrito a CIBA-Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez y cede los derechos del trabajo titulado Mecanismos de resistencia del maíz (*Zea mays* L) a *Aspergillus flavus* y a la producción de aflatoxinas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección vero_gb17hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ing. Verónica Garrido Bazán



DECICATORIA

*Para lo mejor que tengo en mi vida Juana Bazán Mora y Herminio
Garrido Becerra.
A mis hermanas Norma, Yury, Kari, Erika y Edith
A mi hermano Edgar*



AGRADECIMIENTOS

Le agradezco profundamente y con mucho cariño a mi directora de tesis Dra. Martha, por el apoyo incondicional, los valiosos consejos otorgados, la paciencia y los innumerables conocimientos transmitidos.

A mi director de tesis Dr. George Mahuku, por darme la oportunidad de trabajar con el equipo de trabajo de CIMMYT, el apoyo brindado y por los valiosos consejos que me dio, porque hay mucho que aprender de usted, Gracias!

A mis asesores de tesis Dra. Analilia Arroyo, Dr. Miguel Ángel Villalobos y Dra. Alma Leticia por sus conocimientos, consejos, tiempo y apoyo que me ofrecieron. Y porque contribuyeron en mi formación.

A cada una de las personas y amigo(a)s con las que estuve trabajando en el laboratorio, a mis amigas Cristhian, Flor, Ángeles, Berenice. A Patricia por sus consejos y apoyos, Gracias!

A todo el equipo de trabajo de CIMMYT que me apoyaron, gracias.
A CONACYT por el apoyo brindado.

Y a todas las personas especiales de mi vida!



INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2 . ANTECEDENTES GENERALES.....	2
2.1 Importancia del maíz.....	2
2.2 Importancia del maíz en México	2
2.3 Enfermedades del Maíz.....	3
2.4 Respuesta de las plantas a patógenos.....	8
2.5 Tipos de resistencia de las plantas a patógenos.....	8
2.6 Mecanismo de defensa y respuesta a estrés en plantas	9
2.7 Infecciones causadas por <i>Aspergillus flavus</i>	13
2.8 Aflatoxinas.....	15
2.9. Importancia médica.....	18
3. ANTECEDENTES PARTICULARES	20
3.1 Resistencia de las plantas a <i>Aspergillus flavus</i>	20
3.2 Papel de Ascorbato peroxidasa de las plantas en la respuesta de defensa contra patógenos.....	26
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General.....	30
5.2 Objetivos Particulares	30
6. HIPÓTESIS.....	31
7. MATERIALES Y METÓDOS	32
7.1 Cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	32
7.2 Establecimiento de experimentos en campo.....	32
7.3 Inoculación de <i>Aspergillus flavus</i> en plantas de maíz.....	33
7.4 Cosecha de las mazorcas	33
7.5 Detección de aflatoxinas	34
7.6 Ensayos de qPCR.....	40
8. RESULTADOS	47
8.1 Muestreo en campo	47
8.2 Determinación de Resistencia o Susceptibilidad en doce líneas de maíz subtropicales.	48



8.3 Determinación de aflatoxinas y coeficientes de infección en líneas de maíz susceptibles y resistentes seleccionadas.....	50
8.4. Ensayos de qPCR.....	52
8.5 Correlación entre colonización por <i>A. flavus</i> y la concentración de aflatoxinas en líneas de maíz.....	53
8.6 Análisis de concentración de aflatoxinas y coeficiente de infección en líneas de maíz susceptibles	65
8.7 Comparación entre una línea de maíz altamente resistente y una línea altamente susceptible a la colonización de <i>A. flavus</i>	79
8.8 Efecto de factores ambientales en la producción de AFB1 y colonización de <i>A. flavus</i>	81
8.9 Estudios de expresión de la glioxalasa y ascorbato peroxidasa mediante RT-PCR.....	83
8.10 Estudios de expresión de glioxalasa y ascorbato peroxidasa durante el proceso de infección del maíz por <i>A. flavus</i>	85
10. CONCLUSIONES.....	88
11. BIBLIOGRAFIA.....	89
12. ANEXOS	99
ANEXO 1 . Preparación de Reactivos para ELISA	99
ANEXO 2 . Medio GYEP	99
ANEXO 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %	100
ANEXO 4. Evaluación de la concentración de AFB1 en doce líneas de maíz	100
ANEXO 5. Concentraciones de AFB1 en líneas de maíz resistentes obtenidos por la método ELISA indirecto competitivo	101
ANEXO 6. Coeficientes de infección de líneas de maíz resistentes obtenidos por qPCR.....	104
ANEXO 7. Ubicación de iniciadores.....	108



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales estados productores de maíz de grano, de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).....	3
Figura 2. Esquema general de la infección de <i>Aspergillus flavus</i> a diferentes cultivos	14
Figura 3 Agrupación de los genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas en <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	17
Figura 4. Crecimiento de <i>A. flavus</i> en PDA	33
Figura 5. Extracción de AFB1 de muestras de harina de maíz	34
Figura 6. Detección de AFB1 por método ELISA indirecto competitivo.....	35
Figura 7. Distribución de la Placa de ELISA	37
Figura 8. Detección de AFB por método VICAM.....	40
Figura 9. Colonización de <i>A.flavus</i> sobre granos de maíz.	48
Figura 10. Concentración de AFB1 en doce líneas de maíz a 21 y 49 días después de la inoculación con <i>Aspergillus flavus</i>	49
Figura 11. Concentraciones de AFB a los 49 días después de inoculación en líneas de maíz Resistentes y Susceptibles (ciclo 2010) obtenidas por el método VICAM® y método ELISA	51
Figura 12. Electroforesis de muestras de ADN en gel de agarosa 0.8%.....	52
Figura 13. Curva para la cuantificación de <i>Aspergillus flavus</i> por qPCR.....	52
Figura 14. Amplificaciones de la curva por qPCR.	53
Figura 15. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y 2011, Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MR1.	56
Figura 16. Patrón de infección en la línea de maíz MR1 en los diferentes días después de la inoculación.	57
Figura 17. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y para 2011, Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MR2.	59
Figura 18. Patrón de infección en la línea de maíz MR2 en los diferentes días después de la inoculación	60
Figura 19. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y para 2011 , Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MR3	63
Figura 20. Patrón de infección en la línea de maíz MR3 en los diferentes días después de la inoculación	64



Figura 21. . Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y para 2011 , Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MS1.....	68
Figura 22. Patrón de infección en la línea de maíz MS1 en los diferentes días después de la inoculación.....	69
Figura 23. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y para 2011 , Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MS2.....	71
Figura 24. Patrón de infección en la línea de maíz MS2 en los diferentes días después de la inoculación.....	72
Figura 25. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y para 2011, Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MS3.....	74
Figura 26. Patrón de infección en la línea de maíz MS2 en los diferentes días después de la inoculación.....	75
Figura 27. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 y para 2011, Coeficientes de infección en 2010 y 2011 en la línea de maíz resistente MS4.....	77
Figura 28. Patrón de infección en la línea de maíz MS4 en los diferentes días después de la inoculación.....	78
Figura 29. Comparación de AFB1 y coeficiente de infección entre la línea de maíz resistente MR1y la línea susceptible MS1	79
Figura 30. Comportamiento de las líneas resistentes respecto a una susceptible.....	80
Figura 31. Temperaturas y Humedades Relativas durante la infección de <i>A.flavus</i> y maíz (<i>Zea mays</i> L) en el año 2010 y 2011 en estación Agua Fría, Poza Rica Veracruz.....	82
Figura 32. Electroforesis de RNA obtenido	83
Figura 33. Optimización de GADPH.....	84
Figura 34. Optimización de APX	84
Figura 35. Optimización de GLX	84
Figura 36. Expresión de APX y GLX en MR1 y MS1 después de la infección con <i>A. flavus</i>	87
Figura 37. Niveles de expresión de APX y GLX en MR1 y MR2 en 0, 7 y 14días después de inoculación con <i>A. flavus</i>	87



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Enfermedades en mazorca de maíz (<i>Zea mays</i> L)	5
Cuadro 2. Proteínas del maíz que contribuyen a la resistencia a <i>A.flavus</i>	25
Cuadro 3. Líneas Resistentes y Susceptibles a <i>Aspergillus flavus</i>	33

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores a partir de ITS de <i>Aspergillus flavus</i>	43
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores para Ascorbato peroxidasa y Glioxalasa	45
Tabla 3. Concentración de AFB1 en doce líneas de maíz a 21 y 49ddi con <i>A.flavus</i>	49
Tabla 4. Clasificación de líneas de maíz subtropicales.....	50
Tabla 5. Concentración de Aflatoxina B en líneas de maíz, de acuerdo a los métodos ELISA y VICAM®	51
Tabla 6. Evaluación de AFB1 en 2010 y 2011 en líneas de maíz resistente. Comparaciones de medias con prueba de Tukey ($\alpha,0.05$)	54
Tabla 7. Evaluación de Coeficiente de Infección (CI) en 2010 y 2011 en líneas de maíz resistente. Comparaciones de medias con prueba de Tukey ($\alpha,0.05$).....	54
Tabla 8. Media de las concentraciones de AFB1 en líneas de maíz susceptibles	65
Tabla 9. Media de las concentraciones de AFB1 en líneas de maíz susceptibles.	66



ABREVIATURAS

ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
APX	Ascorbato Peroxidasa
GLX	Glioxalasa
AFB1	Aflatoxina B1
DDI ó ddi	Días después de inoculación
GADPH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico



RESUMEN

Aspergillus flavus es un patógeno saprofita que infecta a la mazorca del maíz, dicha infección tiene gran importancia ya que tiene la capacidad de producir aflatoxinas; sustancias extremadamente tóxicas y carcinogénicas para el humano y animales. La aflatoxina B1 (AFB1) es considerada una de las más peligrosas que se puede producir en el maíz una vez que existe la infección de *A. flavus*.

Siendo México uno de los países a nivel mundial con mayor consumo de maíz per capita, la exposición a las aflatoxinas representa un potencial problema de salud.

Una de las alternativas para el control de la contaminación por *A. flavus* y acumulación de aflatoxinas, es el uso de líneas de maíz resistentes.

La amplia diversidad genética en maíz (Buckler et al 2006) ha permitido la identificación y el mejoramiento de esta especie. Sin embargo es necesario evaluar material genético que este adaptado a las condiciones climáticas de México. Por tal motivo en la presente investigación se evaluó material genético adaptado a la zona de Poza Rica, Veracruz con el fin de encontrar material genético con resistencia a la colonización por *A. flavus* y a la producción de aflatoxinas.

Por otra parte aún se desconocen los mecanismos en el maíz que le pueden conferir resistencia al patógeno y/o a la acumulación de las aflatoxinas. En esta investigación se evaluó el perfil de expresión de la ascorbato peroxidasa (APX) y de la glioxalasa (GXL) con la finalidad de conocer la participación de dichas enzimas en la resistencia del maíz a la colonización y síntesis de aflatoxinas respectivamente.

El uso de qPCR permitió cuantificar y determinar la cantidad de ADN de *A. flavus* en muestras de maíz infectado, además la resistencia y susceptibilidad fue evaluada en dos años y se observó que existió el mismo patrón de infección y de acumulación de AFB1. Con estos resultados fueron clasificadas como genotipos resistentes las líneas de maíz MR1, MR2 y MR3 y como susceptibles a MS1, MS2, MS3 y MS4. Sin embargo es necesario realizar estudios que nos permitan visualizar cual es el tipo de resistencia que se presenta en las líneas resistentes y determinar cuáles son las diferencias con las líneas susceptibles.



SUMMARY

Aspergillus flavus causes ear rot of maize, this infection has relevance because this fungi has the ability to produce aflatoxins, highly carcinogenic secondary metabolites which can cause serious health hazards to humans and domestic animals.

Since Mexico is one of the countries worldwide with maize highest per capita consumption, exposure to aflatoxin represents a potential health problem.

Host resistance as a strategy for eliminating aflatoxin contamination of maize can be a viable approach leading to maize lines that could be safe and commercially useful.

The wide genetic diversity in maize (Buckler et al., 2006) has allowed the identification and improvement of this specie. In order to find maize lines adapted to México climatic conditions and resistant to colonization and aflatoxin production by *A. flavus* in the present research were evaluated maize lines adapted to the area of Poza Rica, Veracruz, México.

Mechanisms conferring resistance to colonization and aflatoxin accumulation by *A. flavus* in maize are still unknown although several studies have been done to explain it. In this research the expression profiles of ascorbate peroxidase (APX) and glioxalase (GLX) were evaluated as an attempt to define their participation in maize resistance to colonization and aflatoxin accumulation by *A. flavus*.

qPCR using TaqMan allowed quantify infection determined both host and pathogen DNA from the same sample. The resistance and susceptibility was evaluated in two consecutive years, showing the same pattern of infection and AFB1 accumulation.

With this results was achieved to classify as resistant genotypes the maize lines MR1, MR2, MR3 and susceptible genotype lines MS1, MS2, MS3 and MS4. More studies are needed to further explore the effects of defined host genes on colonization and contamination of maize by *A. flavus*.



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son atacadas por patógenos de distintas maneras, sin embargo han desarrollado mecanismos de defensa que le permita reducir los daños que estos le pueden causar. Los mecanismo de defensa pueden ser dirigidos a la producción de una capa protectora como es la cutícula, o el fortalecimiento de la pared celular, a nivel molecular las plantas también tienen la capacidad de responder inmediatamente al ataque por patógenos a través de diversos mecanismos, las primeras respuestas son la producción de especies reactivas de oxígeno, muerte celular por hipersensibilidad, fosforilación de proteínas, respuestas localizadas; alteración de vías de metabolitos secundarios, interrupción del ciclo celular, síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis, producción de ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico, además pueden inducir genes de respuesta sistémica.

Se sabe que *Aspergillus flavus* es un patógeno que puede infectar al maíz, específicamente a las mazorcas causando la enfermedad denominada pudrición de mazorca, dicha infección tiene una gran importancia pues no sólo afecta a la planta, sino que también puede llegar a afectar al ser humano, ya que este hongo tiene la capacidad de producir aflatoxinas; sustancias extremadamente tóxicas. La forma en que estas sustancias pueden llegar al consumo humano es por la ingesta de granos infectados o por consumir productos procesados a base de este cereal contaminado.

Diversas investigaciones han demostrado que el maíz presenta mecanismos de resistencia a patógenos y/o factores de estrés, mismos que también juegan un papel importante en la resistencia a la colonización e infección del maíz por *A. flavus* y otros organismos patógenos, así como en la inhibición de la producción de aflatoxinas.

Por lo anterior es de suma importancia evaluar genotipos de maíz para identificar aquellos que presenten resistencia a este tipo de patógeno y a la producción de aflatoxinas, con el fin de contar con líneas de maíz de consumo seguro para el humano.



2 . ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Importancia del maíz

El maíz en conjunto con el arroz y el trigo son los cereales más importantes por su consumo a nivel mundial. Actualmente el maíz se cultiva en todos los continentes, excepto en la Antártida. El rendimiento en la producción de este grano es mayor en regiones donde la precipitación el riego son adecuados. Es relativamente fácil cultivarlo, y produce granos con alto contenido en almidón, que puede ser fácilmente metabolizado en energía. (White, 2004)

El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como insumo en la elaboración de un gran número de productos industriales (Paliwal, 2001). De acuerdo a FAO (2010) el principal país productor de maíz es Estados Unidos, seguido de China, Brasil y México.

2.2 Importancia del maíz en México

En México el maíz es considerado como uno de los cultivos más importante, pues tiene relevancia alimentaría, industrial, política, y social. La producción nacional en el año 2011 de grano de maíz destinado a consumo humano y /o ganado fue de 17,635,417.30 toneladas y los estados de mayor producción fueron Sinaloa, Jalisco y Chiapas. La producción de grano destinado a siembra fue de 24,721.94 toneladas y mayores productores fueron los estados de Jalisco y Nayarit (SIAP, 2011)(Figura 1).



Figura 1. Principales estados productores de maíz de grano, de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2011

2.3 Enfermedades del Maíz

Los patógenos de plantas pueden ser divididos en aquellos que causan muerte al hospedero para posteriormente alimentarse de su contenido (denominados necrotróficos) y los que requieren la muerte del hospedero para completar su ciclo de vida (biotróficos). Los necrotróficos microbiales están frecuentemente acompañados de la producción de toxinas. Las bacterias y los hongos pueden adoptar diferentes estilos de vida. Sin embargo el sistema inmune de defensa de las plantas es altamente polimórfico y tiene la capacidad de reconocer y responder a los patógenos biotrófico (Dangl & Jones, 2001).

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades infecciosas de las plantas. De las casi 10,000 especies de hongos que han sido descritas, se sabe que más de 8,000 son patógenos de las plantas. Los hongos pueden funcionar como parásitos, obteniendo nutrientes directamente de los tejidos de un huésped vivo, como tejidos vegetales y animales muertos. Algunos hongos patógenos de plantas son parásitos obligados, requiriendo un huésped vivo para su supervivencia, pero muchos tienen la capacidad de existir como parásitos y saprofitos, dependiendo de las condiciones ambientales y la adaptación de éstos (White, 2004). Además tienen la capacidad de atacar a todas las



partes de una planta y causar una gran variedad de síntomas, desde pudriciones de las raíces, manchas foliares, marchitamiento y raquitismo. Algunos hongos causan lesiones localizadas de tamaño restringido, mientras que otros son capaces de propagarse sistémicamente dentro de la planta, causando síntomas en muchos órganos vegetales. (White, 2004) Algunos ejemplos de los hongos que pueden infectar y causar enfermedades al maíz se presentan en el cuadro 1

Cuadro 1. Enfermedades en mazorca de maíz (*Zea mays* L)

Enfermedad de mazorca	Especie que la provoca	Síntomas	
Pudrición de mazorca por <i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> .	Masas pulverulentas negras que cubren granos y olote o raquis, también pueden ser masas amarillo-verdosas o verde hiedra. Estas capas que se observan en los granos en distintos tonos son signos del patógeno (Arrieta et al, 2007)	 <p>Fuente: CIMMYT</p>
Pudriciones de mazorca por <i>Gibberella</i> y <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Gibberella zeae</i>	Coloración rojiza y rosada en los granos infectados. Para <i>F. moniliforme</i> el daño que causa es en granos individuales o en ciertas áreas de la mazorca, se desarrolla un moho algodonoso o rayas blancas en el pericarpio (CIMMYT, 2004).	 <p>Fuente: CIMMYT</p>



Enfermedad de mazorca	Especie que la provoca	Síntomas	
Pudrición carbonosa de mazorca	<i>Macrosphomina phaseolina</i>	Presentan mazorcas disecadas y granos flojos de color amarillo claro y tienen rayas oscuras debajo del pericarpio (CIMMYT, 2004).	 Fuente: CIMMYT
Pudrición de mazorca por <i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora sp.</i>	Mazorcas disecadas o momificadas, y los granos son manchados y se desprenden con facilidad a demás muestran masas negras de esporas (CIMMYT, 2004).	 Fuente: CIMMYT
Pudrición gris de mazorca	<i>Physalospora zea</i>	Aparece moho blanco-grisáceo que crece entre los granos, posteriormente las mazorcas tienen un marcado color negro (CIMMYT, 2004).	 Fuente: CIMMYT



Enfermedad de mazorca	Especie que la provoca	Síntomas	
Carbón común	<i>Ustilago maydis</i>	Agallas blancas en los granos, posteriormente estas agallas se rompen y forman masas negras (CIMMYT, 2004).	 <p data-bbox="1644 683 1845 707">Fuente: CIMMYT</p>
Pudrición de mazorcas por <i>Stenocarpella</i>	<i>Stenocarpella sp</i>	Las mazorcas presentan un áreas necróticas irregulares en las brácteas y se puede observar moho blanco y algodonoso entre los granos (CIMMYT, 2004).	 <p data-bbox="1644 1023 1845 1046">Fuente: CIMMYT</p>



2.4 Respuesta de las plantas a patógenos

La respuesta de las plantas a patógenos puede incluir la activación de defensa local o sistémica y la inducción de una muerte celular localizada en el sitio de infección llamada también respuesta de hipersensibilidad. El ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno, óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno (particularmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)), se producen una vez que se ha dado el reconocimiento del patógeno y cada una de estas moléculas son importante para promover y coordinar la respuesta de defensa (Neil et al 2002, Beer & McDowell, 2001; Wangs et al 2002), pudiendo causar cambios en la expresión de factores transcripcionales similares (Chen et al 2002).

La similitud en la respuesta a diferentes patógenos sugiere que vías similares están involucradas y que las diferencias en la respuesta de plantas susceptibles a patógenos difiere sólo en algunos detalles (Korves & Bergelson 2003)

Korves & Bergelson (2003) sugieren que cambios en el desarrollo de las plantas podría ser una respuesta activa de las plantas a la infección ó puede ser la consecuencia de la intervención del patógeno en el crecimiento de las plantas. Se sabe que algunos patógenos alteran el crecimiento mediante la inducción de cambios hormonales (Jameson, 2000)

2.5 Tipos de resistencia de las plantas a patógenos

Las razones por la cual algunos agentes considerados patógenos para las plantas no puedan infectar a una planta con éxito son las siguientes: 1) Porque las plantas atacadas por algún patógeno son incapaces de sobrellevar la estrategia de vida y los requerimientos del patógeno y por tanto son consideradas como no hospederas, 2) Que una planta tenga algunas estructuras o barreras toxicas que limiten la infección, 3) El reconocimiento del ataque del patógeno active los mecanismos de defensa y la infección permanezca localizada, 4) Que las condiciones ambientales imposibiliten que el patógeno progrese en su infección (Buchanan et al 2000)



El ataque de un patógeno es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa en la planta, cuyo fin es detectar al mismo, en las primeras etapas y aminorar o contrarrestar (resistencia o tolerante) la infección (Madriz, 2002). Se ha observado que las células comienzan a acumular metabolitos primarios que tienen un papel de defensa, la alta concentración y la rápida localización crea condiciones desfavorables para el crecimiento y reproducción del patógeno, al mismo tiempo las células responden para la detoxificación y evita que las enzimas emitidas por el patógeno continúen con su acción (Buchanan et al, 2000).

Muchas plantas son resistentes a diversos patógenos, la protección pasiva que tienen las plantas contra patógenos que no es especializada al ataque de patógenos específicos, son por ejemplo las capas de cutícula y sus compuestos anti-microbiales.

2.6 Mecanismo de defensa y respuesta a estrés en plantas

El crecimiento de las plantas puede ser afectado por una diversidad de ambientes estresantes, como la deshidratación, las bajas temperaturas, el calor, perturbaciones mecánicas, heridas e infección por patógenos. Los estreses ambientales inducen una diversidad de respuestas bioquímicas, fisiológicas y moleculares incluyendo la expresión diferencial de genes (Bowles, 1993), sin embargo las plantas responden al estrés biótico y al ataque de patógenos con la expresión de genes específicos y la síntesis de numerosas proteínas (Skriver & Mundy, 1990). Las señales sistémicas de defensa pueden ser transmitidas de célula a célula y numerosas hormonas pueden estar involucradas (Buchanan et al 2000).

La respuesta de defensa de las plantas ante patógenos se manifiesta por síntomas delimitados, debido a la incapacidad del patógeno a crecer y extenderse, este tipo de respuesta se le conoce como respuesta de hipersensibilidad (Van, 1997); las células que mueren contienen altas concentraciones de moléculas con propiedades microbianas para que después no sean atacados por organismos necrotróficos oportunistas (Buchanan et al 2000).

2.6.1 El estado oxidativo de las plantas

Existen muchas fuentes potenciales de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas, algunas reacciones involucran un metabolismo normal, tales como respiración y



fotosíntesis. Otras fuentes de ROS se producen en el estrés abiótico además se ha observado que ROS participa en procesos de muerte celular programada y en defensa contra patógenos. El aumento de la producción de ROS durante el estrés puede representar una amenaza a las células y también puede actuar como una señal para activación de respuestas a estrés y vías de defensa (Mittler, 2002).

En las células de vegetales, el ROS puede alterar y provocar el fortalecimiento de la pared celular a través de la reticulación de glicoproteínas o puede causar daños en la membrana por la peroxidación de lípidos (Montillet et al 2005). Sin embargo es evidente que ROS es una importante señal que media la activación de los genes de defensa (Levine et al 1994). Adicionalmente la función reguladora para ROS en conjunto con otras moléculas señales de las plantas, particularmente con el ácido salicílico (SA) y el óxido nítrico (NO) ocurre como una señal de defensa.

2.6.2 Mecanismos de producción de ROS en respuesta a patógenos.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía consumo de oxígeno en lo que es denominado estallido oxidativo, es uno de las primeras respuestas seguida del reconocimiento del patógeno. La señalización de ROS es controlada por la producción y la eliminación de éste. Diferentes señales de desarrollo o ambientales contribuyen con la señalización por ROS. La mayoría de las formas de estrés biótico y abiótico interrumpen el equilibrio metabólico de las células, dando como resultado un aumento en la producción de ROS (Mittler et al 2004).

La producción de ROS es probablemente una primera consecuencia del daño producido durante el curso de la infección. Sin embargo mientras hay una sobreacumulación de ROS podría aumentar la susceptibilidad de la planta (Kariola et al 2005) o causar una defensa descontrolada con amplias lesiones de muerte celular que podrían matar a la planta. La estrecha regulación de la sobre producción de ROS y la eliminación de antioxidantes han permitido que las plantas usen compuestos reactivos como una característica en los sistemas de defensa inmune de las plantas (Torres et al 2006).



Diversos estudios indican que las plantas tienen un sistema sofisticado como es la compartimentación de la producción de ROS y la modulación de respuestas de defensa contra el ataque de patógenos. El estricto control de la sobre producción y acumulación de ROS probablemente es crucial para el crecimiento de las plantas en ambientes naturales donde existen las posibilidades de ser atacada por patógenos además de sufrir estrés abiótico (Vellosillo *et al* 2010).

Varias enzimas han sido implicadas en la producción apoplastica de ROS seguidas del reconocimiento del patógeno. Las peroxididasas forman una compleja familia de proteínas que catalizan la oxido-reducción de varios sustratos usando peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En particular peroxididasas dependientes de pH en la pared celular pueden también ser una fuente de H_2O_2 en el apoplasto. La expresión de estas enzimas es inducida y seguida del reconocimiento de la bacteria o el hongo patógeno (Sasaki *et al* 2004). Existen estudios en donde se indica que la generación de H_2O_2 por las peroxididasas podría permitir que dicha generación subcelular, polarice las barreras físicas de los sitios de infección. Aunque el estallido oxidativo primario seguido del reconocimiento del patógeno ocurre en el apoplasto, el ROS producido en otros compartimentos celulares podría tener una función de defensa. Altos niveles de ROS pueden ser producidos dentro de la célula de las plantas como productos de un proceso metabólico (Brown *et al* 1998).

La producción de ROS ha sido asociada con la formación de barreras de defensas contra el mildiú en avena (Huckelhoven & Kogel, 2003). El ROS producido en la interacción de la cebada con mildiú fue observado dentro de vesículas de células, sugiriendo que la distribución de ROS y otros factores podrían contribuir a la inhibición del crecimiento del patógeno (Collins *et al* 2003).

Las especies ROS son producidas como parte de un complejo de red de señales que responden al ataque del patógeno y median múltiples respuestas, algunas veces con efectos opuestos, en diferentes contextos o en respuesta a diferentes patógenos. Aunque ROS es correlacionado con el éxito de respuesta a resistencia a enfermedades, algunos patógenos podrían producir ROS para obtener ventajas. Por ejemplo los hongos



necrotróficos parecen estimular la producción de ROS e infectar tejidos para inducir así la muerte celular, lo que facilita la subsecuente infección (Govrin & Levine, 2000).

2.6.3 La generación de ROS durante la interacción planta-patógeno

Durante la interacción hospedero- patógeno en las plantas se generan ROS, principalmente H_2O_2 que restringen el proceso infeccioso-invasivo del patógeno, ya que se disminuye el crecimiento del patógeno y lo conduce a la muerte celular. La producción de ROS durante las primeras horas de la inoculación del patógeno se conoce estado oxidativo. En las interacciones compatibles e incompatibles, un fenómeno hiperoxidante ocurre desde las primeras horas posteriores a la inoculación (Dang, 2001)

Las interacciones incompatibles se caracterizan por un fuerte y prolongado estrés oxidativo, que tiene como consecuencia la muerte celular. La muerte celular es causada por las ROS de forma directa o indirecta. La inhibición de la generación de superóxido en una planta reduce la muerte celular inducida por el patógeno de tal manera que las cantidades de ROS producidas por la reacción de incompatibilidad son suficientes para matar directamente a las células de las plantas (Bollwell et al 1995).

Para ganar un acceso a los componentes celulares y de ahí tomar sus nutrimentos, en la etapa considerada como biotrófica, los hongos requieren de la penetración directa de la pared celular, y la producción de H_2O_2 condiciona que la penetración pueda ocurrir (Mellersh et al 2002).

2.6.4 Eliminación de ROS en plantas.

Diversos sistemas de eliminación de ROS, incluyen a la ascorbato peroxidasas (APX), glutatión, superóxido dismutasa (SOD) y catalasas (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y peroxiredoxina (PrxR) manteniendo la homeostasis de ROS en diferentes compartimentos celulares de las células de plantas (Mittler et al 2004; Noctor et al 1998). Estas enzimas podrían restringir los daños dependientes de ROS ó ajustar a ROS como una señal de transducción. La regulación diferencial en parte mediado por SA, podría contribuir al incremento en ROS (Klessing et al 2000). Estudios sugieren



que sistemas de eliminación de ROS pueden tener un importante rol en el mantenimiento de ROS generado en respuesta de patógenos. Además la compartimentación de ambos sistemas de producción de ROS y activación de sistemas de eliminación de ROS podrían contribuir en un fino ajuste de los niveles de ROS y sus propiedades de señalización (Torres et al 2006).

2.7 Infecciones causadas por *Aspergillus flavus*

2.7.1 Ciclo de vida de *Aspergillus flavus*

A. flavus es una de las especies más ampliamente conocida del genero *Aspergillus*. Esta especie fue descubierta en 1802 y reportada como patógena de las plantas en 1920. Recientemente *A. flavus* es más conocida por la producción de aflatoxinas, uno de los compuestos más tóxicos de la naturaleza (Machida & Gomi, 2010)

Ha sido reportado que *Aspergillus flavus* pasa la mayor parte de su vida como saprofito en el suelo, el crecimiento del hongo en este hábitat se ve favorecido en gran medida por la presencia de restos de plantas y animales, el micelio es la estructura del hongo más predominante en el suelo, pero se pueden formar esclerocios que contribuyen a la supervivencia para un periodo largo (Figura 2). *Aspergillus flavus* no tiene una etapa sexual y por tanto su infección se produce a través de la germinación de conidios los cuales contiene las esporas asexuales, éstas esporas pueden ser llevadas por el viento o insectos hasta las plantas más cercanas. Los conidios producidos por el micelio o por los esclerocios pueden servir como inóculo primario para enfermedades causadas por *Aspergillus flavus* (Scheidegger, KA & GA Payne, 2003).

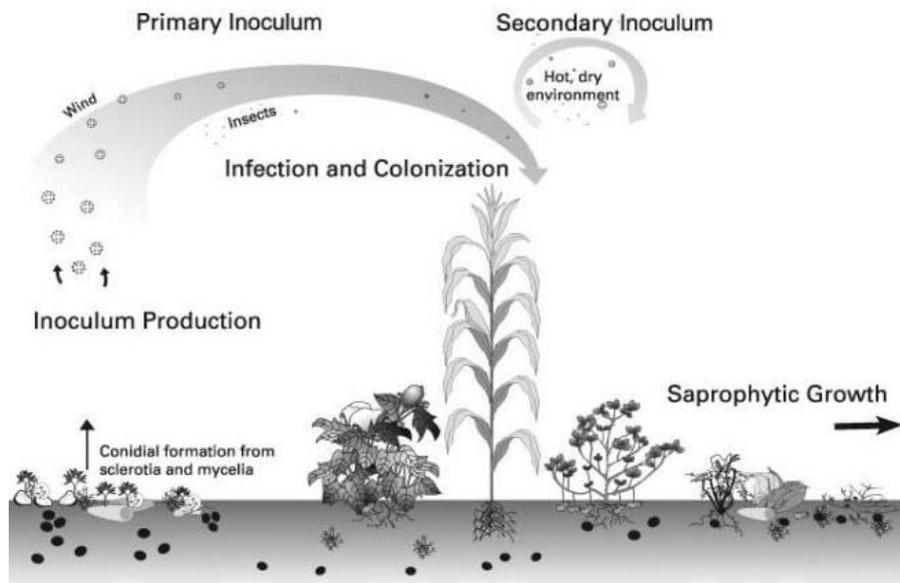


Figura 2. Esquema general de la infección de *Aspergillus flavus* a diferentes cultivos (Scheidegger, KA & GA Payne. 2003)

Algunas pudriciones de la mazorcas de maíz (*Zea mays* L) son causadas por varias especies del genero *Aspergillus*; la pudrición causada por *Aspergillus flavus* es la más importante porque participa en la producción de al menos dos micotoxinas en éste caso denominadas aflatoxinas del maíz. Algunos factores tales como las altas temperaturas y el estrés de las plantas, especialmente el estrés a humedad antes de la cosecha están asociados con un aumento de la incidencia de la infección de *Aspergillus*. El problema de las aflatoxinas y de otras micotoxinas producidas por los diversos *Aspergillus* pueden llegar a ser serios cuando la humedad contenida en los granos es más del 15-18 % y cuando el grano infectado es almacenado en un ambiente húmedo y cálido (Paliwal, 2001).

Una estrategia para el control de la contaminación de granos de consumo humano por aflatoxinas puede ser la generación de germoplasma desarrollado por programas de mejoramiento genético tradicional o por ingeniería genética de plantas, con genes de resistencia al hongo o inhibición a la síntesis de aflatoxinas, sobre todo en el maíz, el cual posee una abundante y natural diversidad genética contra ésta infección fúngica. Naturalmente el germoplasma del maíz no solo provee de fuentes de resistencia sino que también demuestra los requisitos específicos de resistencia (Brown et al 1998)



2.8 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, altamente carcinogénicos inmunosupresivos y hepatotóxicos, producidos, sobre todo, por las especies de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Yu et al 2002).

Las aflatoxinas son sustancias que están estructuralmente relacionadas. Químicamente se definen como cumarinas sustituidas, las cuales contienen anillos de bifurano y una configuración tipo lactona, comunes a todas ellas. Son muy fluorescentes, propiedad que es utilizada para su detección y análisis. La mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol, las aflatoxinas purificadas en forma cristalina, son bastante termoresistentes, sus puntos de fusión son superiores a los 250°C y también estables en el rango de pH entre 3 y 10. Actualmente se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales solo seis tienen importancia significativa como contaminantes de los alimentos: las aflatoxinas del grupo B (B1 y B2), G (G1 y G2) y M (M1 y M2). La aflatoxina B1 (AFB1), al igual que la G1 (AFG1) son un grupo de toxinas producidas por cepas de varias especies del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. tamarii*) (Soriano, 2007)

2.8.1 Biosíntesis de aflatoxinas

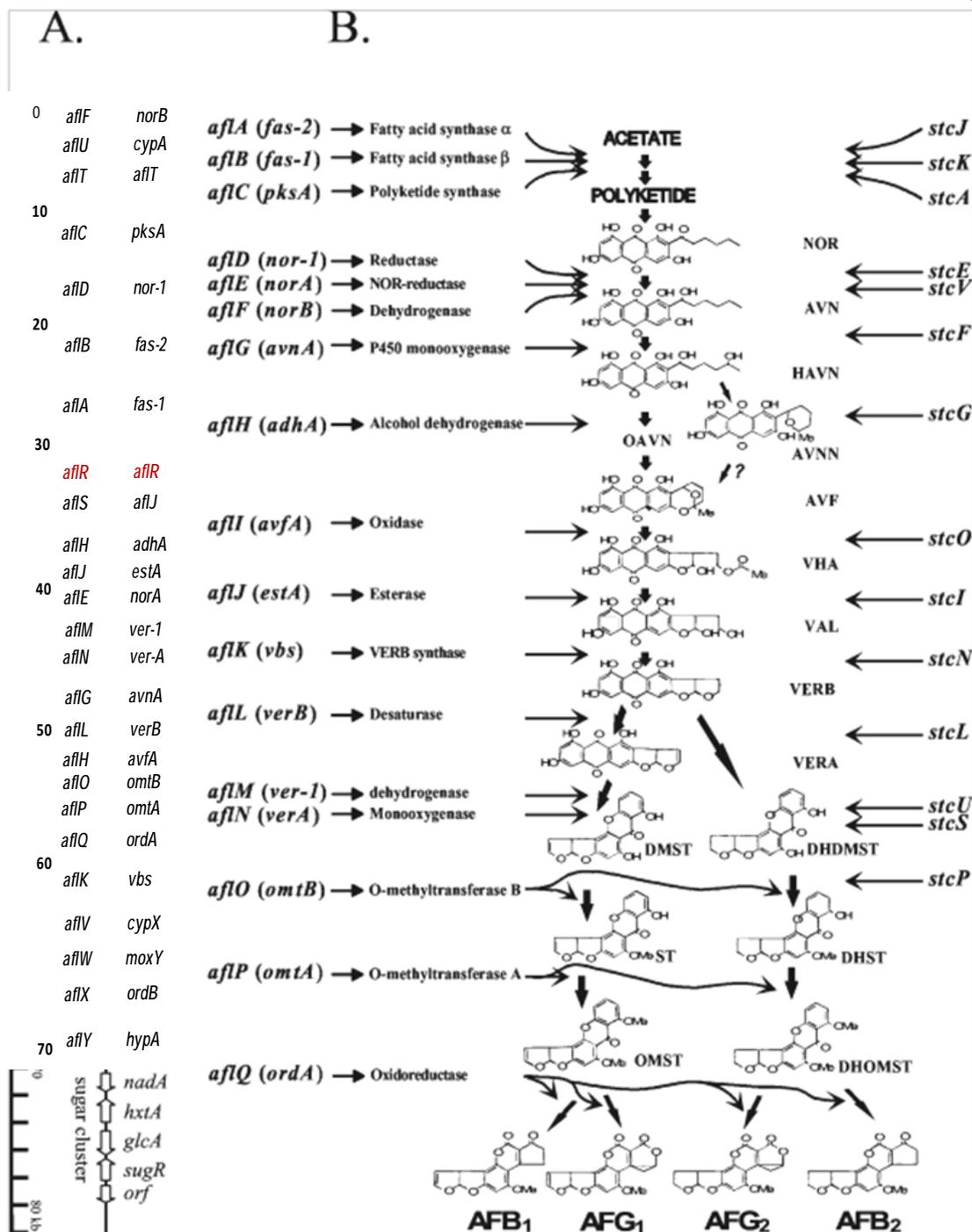
La biosíntesis de aflatoxinas es un proceso muy complejo dirigido por un grupo de genes (Yu et al 2002).

En general la agrupación de genes de biosíntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* y *A. flavus* consiste en 25 genes que alcanzan aproximadamente 70 kb. Se ha reportado que el gen *aflR*, codifica para la secuencia específica, un dedo de Zinc el cual sirve de unión de la proteína al ADN y es requerido para la activación transcripcional de la mayoría de los genes (Bhatnagar et al 2003).



Los factores ambientales y nutricionales entre ellos la temperatura, humedad, la fuente de carbono y nitrógeno, pH, sales, ciertos metales, así como el estrés, pueden afectar la expresión génica y síntesis de las aflatoxinas por *Aspergillus* (Cary *et al*, 2000).

El agrupamiento de estos genes juega un papel importante en hongos para su crecimiento y supervivencia (Yu *et al* 2002). De los 25 genes identificados en la vía de biosíntesis de aflatoxinas únicamente cuatro (*nor A*, *nor B*, *afl T* y *ord B*) son los que hasta ahora (Figura 3), no se ha determinado experimentalmente la función de su producto proteico (Bhatnagar *et al* 2006).





DHOMST dihidroesterigmatocistina; AFB₁ aflatoxina B₁; AFB₂ aflatoxina B₂; AFG₁, aflatoxina G₁; AFG₂ aflatoxina G₂ (Yu *et al* 2002)

2.9. Importancia médica

La ingesta de alimentos o productos que contengan aflatoxinas tiene como consecuencias enfermedades tales como aflatoxicosis aguda que se manifiesta como hepatitis aguda en el ser humano, mientras que la aflatoxicosis crónica conlleva a alteraciones patológicas más prolongadas, como el cáncer y la inmunosupresión. En 1974 se registró un brote de hepatitis en la India en el que murieron 100 personas después de haber consumido maíz con unos niveles extremadamente altos de contaminación por aflatoxinas. La vía principal de exposición a aflatoxinas en el ser humano es el consumo de alimentos contaminados, como los granos de cereales (Murray *et al* 2009).

Se cree que el mecanismo de carcinogéncia inducida por aflatoxinas implica la promoción de la formación de tumores o la progresión de éste proceso. Algunos datos indican la participación de la aflatoxina en la actividad de protooncogenes y también pueden causar mutaciones en el gen supresor de tumores (Murray *et al* 2009).

La Aflatoxina B₁ y G₁ poseen una insaturación en la posición 8,9 en el anillo de furano terminal, estudios demuestran que la epoxidación en esta posición es crítica en su potencial carcinogénico (Groopman and Kensler, 2005) debido a su unión con el N7- de la Guanina del ADN y la inducción de una carga positiva en el imidazol, lo cual da lugar a un derivado de anillo abierto. Este compuesto puede estar presente por más de una ronda de replicación del ADN, y se sigue que induce una mutación en el cambio de una base de guanina por timina (G → T) en la tercer base del codón 249 del gen p53 (Wanag & Gropman, 1999) en humanos.

2.9.1 Problemática de la contaminación de maíz de México por *A. flavus*

Las aflatoxinas se han encontrado a diferentes concentraciones y en cultivos como maíz, frijol, sorgo, cacahuates entre otros. Las concentraciones de aflatoxinas en maíz en



México van de 15 a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se han reportado concentraciones de 955 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en maíz en un muestreo hecho en el año 2000, y una disminución del 96% de las mismas por el proceso de nixtamalización (Guzmán & Peña, 2004).

Las aflatoxinas en México son un importante peligro en la salud por las siguientes razones: a) México es uno de los países con alto consumo per cápita de maíz en el mundo (aproximadamente 325 gramos por día): b) México produce alrededor de 20 millones de toneladas de maíz por año, c) las condiciones de almacenamiento del maíz en México no están muy bien desarrolladas y no se tiene un monitoreo regular de la contaminación por aflatoxinas (Anguiano et al 2005)

Existen reportes de pacientes mexicanos con la enfermedad de hepatitis viral y altos niveles de aflatoxina B1 en orina (Álvarez et al 2000). Estudios han reportado que hombres y mujeres que ingirieron 48.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 92.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina excretaron al cuarto día AFB1-N7-gua, aflatoxina M1 y aflatoxina B (Groopman, et al 1992)



3. ANTECEDENTES PARTICULARES

3.1 Resistencia de las plantas a *Aspergillus flavus*

3.1.1 Condiciones y crecimiento de *Aspergillus flavus*

En ambientes naturales complejos, la disponibilidad temporal y espacial de nutrientes y la competencia con otros organismos afectan en patrón de colonización del hongo *Aspergillus flavus* (Boswell et al 2007) y se han desarrollado modelos para caracterizar la colonización del micelio en un substrato natural.

De acuerdo con Abbas et al 2008, la acumulación de aflatoxinas por *A. flavus* se presenta después de la producción de biomasa en un medio sólido, con una máxima acumulación observada a los cuatro días después de la formación de conidios. También demuestran que la acumulación de aflatoxinas es paralelo al crecimiento de *A. flavus* se da cuando el régimen de temperatura es apropiado (20 a 27°C) observándose a los 10 días después de la inoculación, sus estudios indican que una cepa no toxigénica de *A. flavus* aislada de maíz presenta mayor colonización esto en comparación con una cepa no toxigénica aislada del suelo.

En semillas de algodón Rajasekaran et al 2008 han demostrado que *Aspergillus flavus* entra primero a través de los poros de las células chalazal de la semilla hasta el micrópilo y posteriormente coloniza totalmente a los cotiledones.

Brown et al 1993. Reportaron que la exposición del endospermo no incrementa la susceptibilidad o contaminación en líneas resistentes o susceptibles sugiriendo que la invasión, la susceptibilidad o contaminación no siempre están correlacionadas directamente. Además observaron que embriones viables poseen resistencia a la acumulación de aflatoxinas.

A. flavus al igual que otros hongos patógenos emplea enzimas hidrolíticas tales como pectinasas, proteasas y amilasas para su éxito en la invasión y la utilización del



tejido de la planta hospedante. Aunque se ha demostrado tener correlación entre la agresividad de *A.flavus* y la actividad de P2c (Pectinasa) y otros factores parecen estar involucrados sobre todo en la virulencia (Cleveland et al 2004).

La pectina es uno de los constituyentes de las paredes celulares de las plantas y algunas enzimas denominadas pectinasas son las degradadoras de pectinas (Cleveland & McCormick, 1987). Se ha observado que *A. flavus* produce tres tipos de pectinasas llamadas P1, P3 y P2c. La P1 y la P3 es producida en altos y bajos grados de infección, mientras que P2c se produce en altos grados de infección (Cleveland & Cotty, 1991).

Se han observado que *A flavus* produce hidrolasas durante la infección que son enzimas necesarias para el establecimiento y la producción de aflatoxinas, a demás es probable que exista la expresión de numerosos genes que no han sido identificados durante la interacción de *A flavus* con su hospedante y la producción de aflatoxinas. (Cleveland et al 2004)

La producción de amilasa en el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxinas fue observada en estudios de factores de resistencia en granos de maíz. Una proteína de 14 –kDa de maíz inhibidora de tripsina (TI) es asociada con los hospederos resistentes a *A.flavus*, esto se encontró por inhibir la producción de un α -amilasa extracelular así como reducir la actividad de la amilasa. La purificación y la sobreexpresión de TI en *E.coli* demostraron que también inhibe la capacidad de germinación de esporas de *A. flavus* así como la inhibición del crecimiento del hongo (Chen et al 1999).

Incluso se ha demostrado que *A.flavus* produce celulasas, xylasas, quitinasas, lipasas y cutinasas durante el crecimiento en un medio que contenía inductores de estas enzimas. Las lipasas también parecen tener un papel importante en el crecimiento del hongo y en la producción de toxinas. En granos infectados con *A.flavus* se encontró que la hidrólisis del almidón y los triglicéridos ocurre simultáneamente. Por otra parte, estudios indican que *Aspergillus flavus* no utiliza a las proteínas de reserva del maíz como fuente de carbono. Se observó que *A.flavus* requiere de dos días para iniciar la



adquisición de fuentes de carbono de granos de maíz. Presumiblemente este periodo sea requerido para que el hongo rompa las barreras de defensa mecánica que tiene la semilla, incluyendo el pericarpio y la capa de la cutícula (Mellon et al 2000). Un estudio similar en semilla de algodón demostró que los azúcares fueron utilizados para el crecimiento inicial y cuando éstos se agotaban los triglicéridos fueron hidrolizados también (Mellon et al 2000).

La presencia de isoformas de hidrolasas han sido demostradas y éstas pueden existir debido a la presencia de familias de genes que codifican para una clase particular de hidrolasas o quizá también por las modificaciones postraduccionales de la proteína. Existe la posibilidad de que la presencia de una única isoforma o incluso diferencias en la expresión de genes dentro una familia de genes hidrolasa puede ser responsable de las diferencias observadas en niveles de virulencia entre las cepas de hongos aisladas (Cleveland et al 2004)

3.1.2 Resistencia a la colonización por *Aspergillus flavus*

Investigaciones revelan que genotipos susceptibles de maíz son capaces de inducir proteínas antifungales en la infección fungal, lo cual sugiere que líneas susceptibles tienen la capacidad de inducir un mecanismo de defensa después de la infección fungal. Y que la acumulación de aflatoxinas ocurre después de la maduración de los granos (Guo et al 1996).

En el genotipo de maíz resistente Tex6 se demostró que las quitinasas pCh2 y pCh11 tienen actividad antifungal, estas quitinasas son miembros de la familia del gen *Chia1*. Ambas están presentes en los granos de maíz que fueron dañados e inoculados por *A.flavus*. La mayor inducción de la quitinasa pCh2 y pCh11 se encontró en la aleurona de los granos y minoritariamente en los embriones, y estuvo ausente en el endospermo. Además la actividad de la quitinasa de las semillas parece incrementarse en la maduración, después de 36 días después de la polinización (Moore et al 2003). Estudios sugieren que una peroxiredoxina actúa en la defensa contra patógenos. Los altos niveles de expresión de PER1 en genotipos de maíz resistente y los altos niveles de transcritos de *per1* durante el desarrollo de los granos en líneas resistentes, la



inducción de la expresión de *per1* después de la inoculación y la demostración de su actividad de peroxidasa indican un posible papel de la PER1 en respuesta como defensa contra la infección de *A.flavus* (Chen et al 2007).

En el cuadro 2 se muestran las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia del maíz a *Aspergillus flavus* dichas proteínas juegan un rol importante en la interrupción de la infección o la producción de aflatoxinas.

Estudios de expresión génica en granos de líneas de maíz resistentes y susceptibles a diez días después de inoculación, revelan que existen genes que se expresan mayoritariamente en líneas de maíz susceptibles, estos genes codifican para dehidrin DNH1 y LEA 14-A, mientras que las líneas resistentes presentan mayor expresión de genes que codifican para proteínas tales como defensinas antifungales (γ -tionina, una probable glicoproteína rica en hidroxiprolina DZ-HRGP) y dos genes que codifican para enzimas antioxidantes (una probable glutatión peroxidasa y una glutatión reductasa), cinco genes que codifican para mediadores de señales de transducción (probable MAP cinasa, MAP cinasa fosfatasa, una proteína cinasa inducida por sales, una proteína cinasa transmembranal con repetidos ricos en leucinas y genes inducibles por ácido abscisico), y genes para proteínas de respuesta a estrés (proteínas de choque térmico, proteínas inducidas por sequía, multi proteínas de resistencia y proteínas ricas en prolinas (Jiang et al 2011).

Por otra parte estudios proteómicos con granos maduros de genotipos de maíz que fueron infectados con *Aspergillus flavus* encontraron proteínas RAPs involucradas en la resistencia, algunas de ellas son aldosa reductasa (ALD), glioxalasa (GLX-1), proteína 10 relacionada a patogénesis (PR10), una antioxidante peroxiredoxina (PER1), proteínas reguladas por frío (Zm COR), inhibidor de tripsina, ZmTI y una proteínas de 14 kDa TI (Brown, 2010).

3.1.3 Mecanismo de resistencia del maíz a la producción de aflatoxinas

Comparando genotipos resistentes y susceptibles se identificaron proteínas involucrado en la resistencia (Chen et al 2002). Estas proteínas fueron agrupadas



basadas en la homología de sus péptidos en; 1) proteínas de almacenamiento como las globulinas y las proteínas abundantes en embriogénesis tardía, 2) proteínas de respuesta al estrés, como una aldosa reductasa, glioxalasa 1, y una proteína de choque térmico de 16.9 kDa y 3) proteínas antifungales, incluidas las proteínas relacionadas a la patogénesis PR-10 (Chen et al 2006). En el cuadro se resumen los estudios realizados en la interacción entre *A. flavus* y maíz.

Otros análisis proteómicos (Ver cuadro 2) han identificado varias proteínas en granos de maíz cuyos niveles de expresión están correlacionados con la resistencia a la contaminación por aflatoxinas (Cleveland et al 2004).

Además se sugiere que existe una correlación entre un maíz resistente a la infección por *A. flavus*, la producción de aflatoxinas y la tolerancia al estrés. Lo que pone en ventaja a genotipos resistentes sobre los susceptibles al tener la capacidad de defenderse contra patógenos bajo condiciones de estrés. (Chen et al 2002).

La resistencia a la acumulación de aflatoxinas en granos de maíz es cuantitativamente heredable y altamente influenciada por el ambiente, (Busboom & White, 2004).

Diversos estudios han reportado QTL's (Brooks et al 2005; Paul et al 2003) para la resistencia a pudrición de la mazorca por *Aspergillus* y acumulación de aflatoxinas. En todos los casos se observó una alta variación en genotipo/ambiente y baja heredabilidad. En general más de los QTL's identificados son de bajo a moderado efecto, sin embargo se encontró que por lo menos 20% de la variación fenotípica se debió a diferentes ambientes (Brooks et al 2005).

Estudios indican que las aflatoxinas producidas por *A. flavus* son transportadas de las células del hongo a la planta, lo cual sugiere que la respuesta de la planta a la presencia del hongo puede ser provocada por la capacidad de responder a este metabolito secundario, sin embargo la producción de aflatoxinas no es necesaria para la contaminación de las semillas de maíz (Ehrlich et al 2011).



Cuadro 2. Proteínas del maíz que contribuyen a la resistencia a *A.flavus*

Proteína	Modo de Acción	Referencia
RIP (Proteína que inactiva a los Ribosomas)	Inhibición de crecimiento de <i>A.flavus</i>	Guo et al, 1997.
Zeamantina	Inhibición de crecimiento de <i>A.flavus</i>	Guo et al, 1998. y Guo et al, 1997.
Quitinasa de 28 kDa	Inhibe el crecimiento de <i>A.flavus</i>	Chen, et al, 2001.
Proteína de 100 kDa	Resistencia a producción de aflatoxinas	Huang et al, 1997.
Proteína inhibidora de tripsina (TI) de 14 kDa	Inhibe la alfa-amilasa del <i>A.flavus</i> ., limitando el uso de los azúcares que tiene el maíz.	Chen et al 1998.
Glioxalasa 1	Contribuye en regular los niveles de MG -> estimula a <i>aflR</i> en la biosíntesis de aflatoxinas.	Chen et al. 2004
PR-10	Provee resistencia a colonización	Chen et al, 2010.
Homologo PR10.1	Germinación de conidios, retraso de germinación y bajo crecimiento hifal	Chen et al, 2005..
PER1	Actividad peroxidasa, de esta proteína se indujo cuando de infecto el maíz con <i>A.flavus</i>	Chen et al, 2007.
ZmCORp	Inhibe la germinación de conidios y la elongación de las hifas.	Baker et al, 2008.
ZmTI	Ruptura de conidios , disminuye el crecimiento y germinación de conidios	Baker et al, 2008
Catalasa	Colonización	Magbanua et al 2007.



Según Busboom & White (2004) la reducción de la concentración de aflatoxinas en granos está asociada a QTL. Estos QTL de resistencia fueron identificados en los cromosomas 2 y 3 en maíz que presentan resistencia (Oh516, Tex6 y Mp313E), indicando que los posibles genes o alelos para la baja concentración de aflatoxinas están en éstos cromosomas.

Robertson-Hoyt et al 2007, demostraron que existen altas correlaciones en fenotipos y genotipos a la pudrición de mazorca por *Fusarium* y pudrición por *Aspergillus* además de la acumulación de aflatoxinas y fumosinas en líneas puras de maíz .

Chen et al. (2004) observaron que los embriones de maíz de genotipos resistentes a *A.flavus* contenían altos niveles de actividad de una proteína GLX-I comparado con genotipos susceptible en donde su actividad se mantuvo en niveles bajos. Sin embargo la infección por el hongo incrementó significativamente los niveles de metilglioxal (MG), este último se ha observado que es un inductor de aflatoxinas, el modo de acción de MG es a través de la estimulación de un gen regulador de la biosíntesis de aflatoxinas como es *aflR*. Estudios sugieren que GLX-I juega un papel importante en la concentración de MG dentro del grano de maíz lo cual a su vez contribuye a la reducción de aflatoxinas.

Magbanua et al 2007 miden la actividad de una catalasa en embriones, pericarpio y tejido de raquis y observan que existe una mayor actividad de una Cat3 en líneas de maíz resistente comparado con las susceptibles.

3.2 Papel de Ascorbato peroxidasa de las plantas en la respuesta de defensa contra patógenos

La ascorbato peroxidasa (APX) es una enzima que juega un importante papel en el metabolismo del H₂O₂ en las plantas superiores. La APX utiliza al ascorbato como donador de electrones para reducir al peróxido de hidrogeno a agua con una generación de monohidroascorbato, un oxidante univalente de ascorbato (Asada, 1997).



Estudios indican que las isoenzimas de APX son componentes críticos que previenen el estrés oxidativo en organismos fotosintéticos. Otros estudios revelan que la respuesta en la expresión de APX para algunas condiciones de estrés y ataque por patógenos tiene importancia la actividad de APX en controlar la concentraciones de H_2O_2 en la señalización intracelular (Shigeoka et al 2002). Las isoenzimas de APX están distribuidas en compartimentos celulares: APX de estromas (sAPX) y la unida a la membrana de los tilacoides (mAPX) y la citosólica (cAPX)

Existe un mecanismo de defensa basado en metabolitos con propiedades antioxidantes, tales como el ascorbato, glutatión, α -tocoferol y enzimas, incluyendo a la superóxido dismutasa la cual convierte el superóxido a peróxido de hidrogeno, la catalasa y la ascorbato peroxidasa enzima que cataliza la hidrólisis de H_2O_2 vía ascorbato-glutatión en plantas (Davletova et al 2005). Estudios reportan el aislamiento y secuenciación de una ascorbato peroxidasa citosólica (Van et al 1995). En las células vegetales, la ascorbato peroxidasa es considerada un componente crucial en el metabolismo contra estrés oxidativo (Asada et al 1994).

Otros estudios indican que la respuesta específica por una interacción compatible fue la inducción de ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y de menor importancia guayacol. La actividad de las primeras enzimas claramente se relaciona con el ciclo ascorbato-glutatión, el mecanismo más general de detoxificación de las células del H_2O_2 . Se ha reportado por Zahaby que en la interacción *Erysiphe graminis* y trigo la baja regulación de expresión de ascorbato peroxidasa está asociada resistencia y que la mayor expresión se observa genotipos susceptibles, es decir existe una respuesta a la interacción compatible entre el patógeno y el hospedante.

En análisis de expresión génica en líneas de maíz contaminado con *Aspergillus flavus* se encontró que granos que fueron inoculados 21 después de polinización presentaron expresión de L-ascorbato peroxidasa, ascorbato peroxidasa y algunas otras enzimas que intervienen en mantener el estado oxidativo a los 14 días después de la infección. (Jiang et al 2011)



4. JUSTIFICACIÓN

La importancia del maíz (*Zea mays L*) en México tanto económica, cultural, política y social, ha conducido a diversos estudios sobre esta especie. Algunas investigaciones han sido enfocadas a patógenos que causan enfermedades las cuales inciden en dicha especie y además resultan ser nocivas al ser humano.

Una de las enfermedades que puede atacar al maíz y que es nociva para la salud humana, es la pudrición de mazorca la cual es ocasionada por el hongo *Aspergillus flavus*, microorganismo considerado de importancia en salud humana ya que interviene en la producción de al menos dos micotoxinas denominadas aflatoxinas (Paliwal, 2001) uno de los compuestos más tóxicos de la naturaleza (Machida & Gomi, 2010) debido a que es altamente carcinogénico, inmunosupresivo y hepatotóxico (Yu et al., 2002).

México es considerado uno de los países con alto consumo per-cápita del maíz, esto da como consecuencia que la población mexicana esté constantemente expuesta a los efectos perjudiciales de las aflatoxinas, por tal razón en México la contaminación por aflatoxinas está regulado por la Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002) la cual indica que un nivel máximo de 20 µg/kg de aflatoxinas totales en los cereales para consumo humano y animal (Diario Oficial de la federación, 2002). Sin embargo, aún a bajas concentraciones, estos compuestos no dejan de ser un riesgo potencial para la salud de humanos y animales.

La amplia diversidad genética en maíz (Buckler et al 2006) ha permitido la identificación y el mejoramiento de esta especie. El maíz no sólo provee de caracteres de resistencia a diversas enfermedades, sino que también se ha demostrado, la presencia de caracteres específicos de resistencia a infección por *Aspergillus sp* (Brown et al 1998). Por ello es necesario identificar genotipos de maíz que presenten resistencia a la colonización y a la producción de aflatoxinas mismos que servirán para el mejoramiento de la especie.

Por otra parte el estado oxidativo de las plantas juega un papel importante en la resistencia o susceptibilidad a patógenos (Torres et al 2006), se ha observado que la



modulación de este estrés es llevado a cabo por las enzimas ascorbato peroxidasa y catalasa entre otras (Shigeoka et al 2002), en estudios enfocados a expresión génica, han observado que existe una mayor expresión de genes de enzimas involucradas en el estrés oxidativo tales como ascorbato peroxidasa (Jiang et al 2011), sin embargo aún se desconoce el patrón de expresión de este gen cuando el maíz es infectado por *Aspergillus flavus*.

Hasta el momento se ha reportado que la glioxalasa interviene en la inhibición de la biosíntesis de aflatoxinas ya que tiene un papel importante en la regulación de Methylglioxal; un compuesto que induce la producción de las aflatoxinas (Che et al 2004), pero aún se desconoce la expresión de este gen en genotipos resistentes y susceptibles durante la infección de *A. flavus*.

En la presente investigación se pretende elucidar si el mecanismo de resistencia en líneas de maíz infectadas por *Aspergillus flavus* se dirige a la colonización o a la acumulación de aflatoxinas. Además se pretende conocer el patrón de expresión del gen de ascorbato peroxidasa de maíz en los primeros estadios de infección.

Las contribuciones realizadas podrán servir para posteriores investigaciones en mejoramiento sobre dicha especie.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Contribuir en la determinación de el/los mecanismos que definen la resistencia del maíz (*Zea mays* L) a la colonización y/o biosíntesis de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar la resistencia o susceptibilidad a la biosíntesis de aflatoxinas en doce líneas subtropicales de maíz (*Zea mays*) inoculadas con *Aspergillus flavus*.
- Determinar la resistencia o susceptibilidad a la colonización por *Aspergillus flavus* en 6 líneas subtropicales de maíz (*Zea mays*) en diferentes estadios de desarrollo del grano
- Determinar la resistencia o susceptibilidad a la colonización por *Aspergillus flavus* en 6 líneas de maíz (*Zea mays*) subtropicales en diferentes estadios de desarrollo del grano.
- Analizar la correlación en tiempo real entre colonización por *A. flavus* y la concentración de aflatoxinas en seis líneas maíz subtropicales (*Zea mays*) en diferentes estadios de desarrollo del grano.
- Analizar los patrones de expresión de una Ascorbato peroxidasa en diferentes estadios de desarrollo del maíz durante la infección por *A.flavus*.
- Analizar los patrones de expresión de una Glioxalasa en diferentes estadios de desarrollo del maíz (*Zea mays* L) durante la infección por *A.flavus*.



6. HIPÓTESIS

- 1.- Existe en maíz un mecanismo de resistencia a *Aspergillus flavus*, que le permite contender la colonización.

- 2.- Aunque haya colonización de *Aspergillus flavus* al maíz, este presenta mecanismos de resistencia a la biosíntesis de aflatoxinas.

- 3.- Existe una mayor expresión de APX en maíz en respuesta a *Aspergillus flavus* en líneas resistentes.

- 4.- Existe una mayor expresión GLX en líneas de maíz resistentes a la acumulación de aflatoxinas.



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepa de *Aspergillus flavus*

La cepa utilizada para las inoculaciones fue *Aspergillus flavus* PR 96B cepa # 40, colectada en Poza Rica, Veracruz; la cual se creció en placas con un medio que contenía 10g de papa-dextrosa-agar (PDA) por 1 L de H₂O, éstas placas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento durante 12 días a una temperatura de 23°C. Posteriormente se colectaron las esporas y se realizó una solución que contenía 1x10⁶ esporas por mililitro de H₂O desionizada estéril.

7.2 Establecimiento de experimentos en campo

El material vegetal que se usó fueron líneas de maíz de clima subtropical con resistencia y susceptibilidad a la colonización por *Aspergillus flavus* previamente identificadas en campo (Ver Cuadro 3).

El experimento en campo se llevó a cabo en la estación de Agua Fría del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ubicado en Poza Rica, Veracruz, México. El primer experimento abarcó el periodo del 20 de Abril al 16 de Agosto de 2010 y un segundo experimento se estableció del 16 de Marzo al 15 de Julio. Para cada línea de maíz evaluada, se establecieron tres surcos de 4.5 m con cuatro repeticiones por línea.

A continuación en el cuadro 3 se presentan las líneas evaluadas a todas se les designó una clave de identificación y a aquellas que fueron seleccionadas para posteriores se marcan con un asterisco.

Cuadro 3. Líneas Resistentes y Susceptibles a *Aspergillus flavus*

Genotipo de maíz	ID	Genotipo de maíz	ID
CML 52	MS3	DERRC2 15-3-1-#2-#1-1-## -B	MR3
(P36STE-28*36STE-38)-BBBB-###-B*8-B	MS7	DTPWC9-F115-1-2-1-2-B-B-B	MS8
CL-02510	MS4	90[SPMATC4/P500(SELY)]#-B-4-2-B-B	MR4
CML 495. CL-RCW01	MR1	P502c1F9-2-2-1-B-B-1-3-1-1-B-1-B-B-1-B-B-B-B	MS1
CML 247	MR2	DTPWC9-F67-2-2-1-B-B-B	MS2
CML-155	MS5	S.AM.TSR-76-1-1-B-1-BBBB-5-##-B*9-B-B -B	MS6

7.3 Inoculación de *Aspergillus flavus* en plantas de maíz

Se realizaron dos inoculaciones en campo, la primera al inicio de la floración femenina; colocando granos de maíz previamente infectados con *Aspergillus flavus* al pie de las plantas de maíz. La segunda inoculación se hizo a los 7 días después de la floración femenina; a través del canal de los estigmas se inyectó 1 ml de una solución de esporas de la cepa *A. flavus* 96B #40 a una concentración de 1×10^6 esporas /ml. En la figura 4 se presenta el crecimiento de la cepa en medio PDA.



Figura 4. Crecimiento de *A. flavus* en PDA

7.4 Cosecha de las mazorcas

La colecta de las mazorcas se realizó a los 0, 7, 14, 21, 28 y 49 días después de la inoculación, las colectas se realizaron en el periodo del 25 de Junio al 16 de Agosto del 2010 y para el año 2011 se realizaron a partir del 20 de Mayo hasta 15 de Julio. De acuerdo al tiempo de floración de cada línea se hicieron cuatro colectas de mazorcas

inoculadas y dos del control, se identificaron e inmediatamente se liofilizaron y fueron almacenadas a una temperatura de -80°C para los posteriores estudios.

Posteriormente se separaron los granos del resto del material vegetal, se molieron y se refrigeraron a una temperatura -20°C para sus siguientes análisis.

7.5 Detección de aflatoxinas

Los métodos utilizados fueron ELISA indirecto competitivo para AFB1 y VICAM para AFB, en los siguientes párrafos se describe la metodología correspondiente a cada método.

7.5.1 Método de ELISA indirecto competitivo

La determinación de aflatoxinas AFB1 se hizo de acuerdo al método propuesto por Ramakrishna y Mehan (1993) el cual se describe a continuación.

Extracción de AFB1 de la muestra

En la Figura 5 se muestran los pasos que se realizaron para la extracción de aflatoxina B1. De las muestras previamente molidas se pesó 1 gramo de harina de maíz y se le adicionó 5 ml de una solución de metanol 70:30, la cual contenía 5 g de KCl por litro. Se agitó a 150 rpm durante una hora, posteriormente se filtró con papel Whatman No.1, y se colectó en un frasco limpio, se tomó 1 ml y se guardó a -20°C para su posterior análisis.

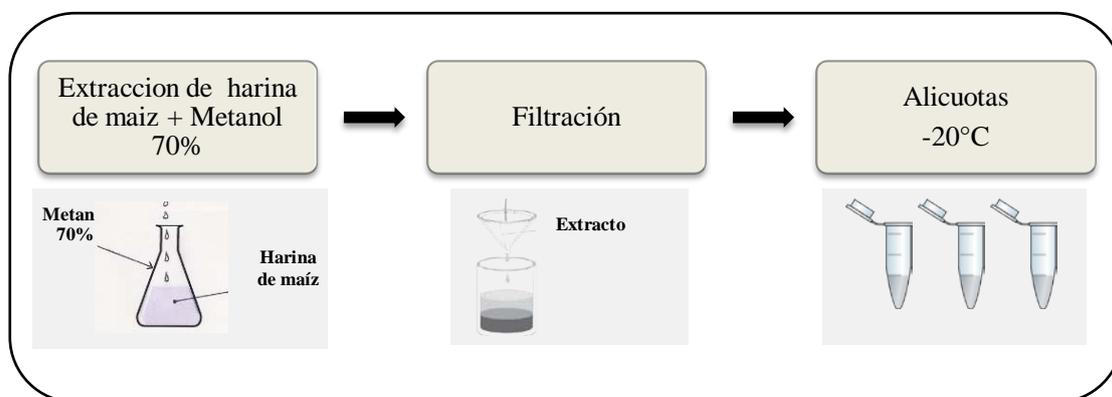


Figura 5. Extracción de AFB1 de muestras de harina de maíz

La extracción de muestras de mazorcas de maíz sano para generar la curva estándar se realizó siguiendo el mismo procedimiento.

Detección de AFB1 por el método ELISA indirecto competitivo

Para la preparación, se usaron placas ELISA de poliestireno de 96 pozos (Cultek^{MR}), los pasos de la técnica se describen en la figura 6. Previamente se prepararon los reactivos necesarios como indica el Anexo 1.

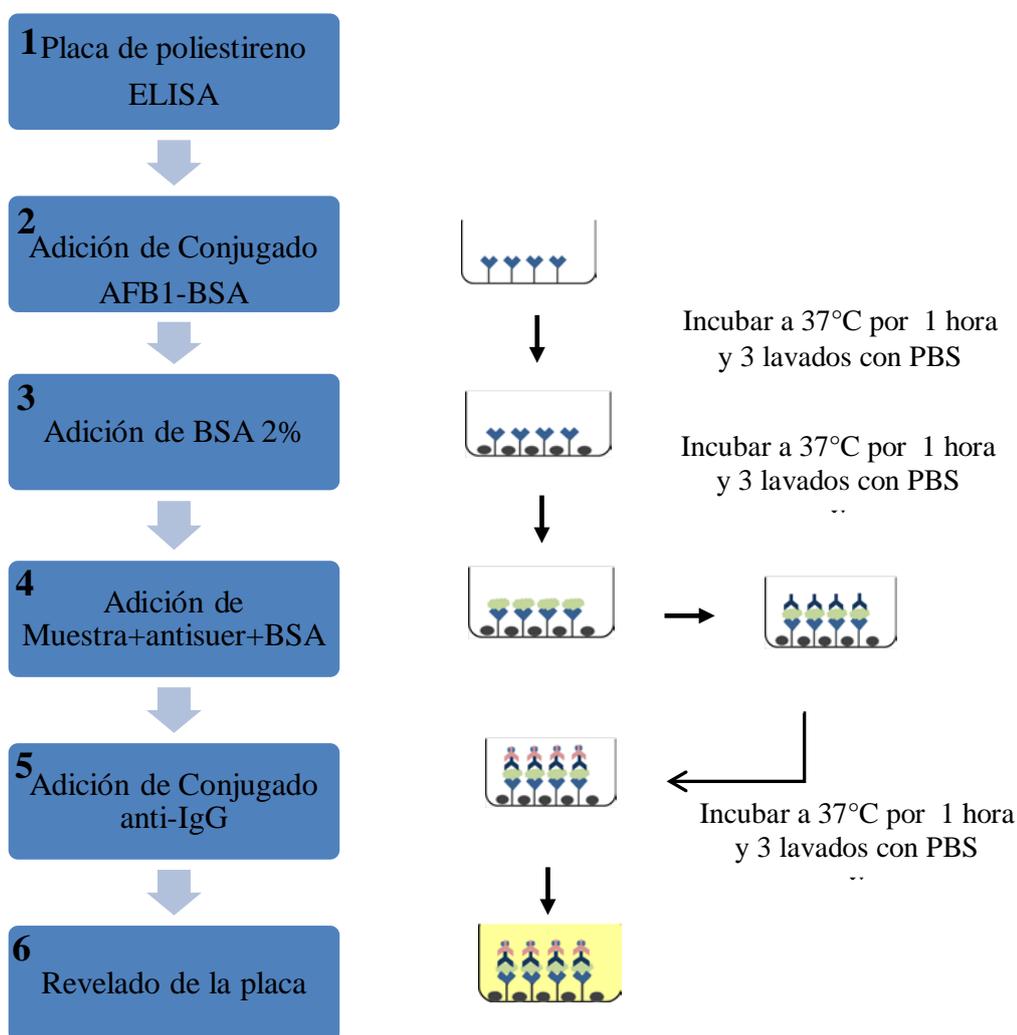


Figura 6. Detección de AFB1 por método ELISA indirecto competitivo



Adición de Conjugado (AFB1 más BSA)

Para la adición del conjugado aflatoxina B1 (AFB1) con suero de albumina de bovino (BSA) a (1µg/ µl); se mezclaron 20 ml del buffer de carbonato 1X y 2 µl del conjugado AFB1-BSA en un tubo falcon. Posteriormente se agregaron 150 µl de la mezcla en cada pozo de una placa de poliestireno para ELISA, la placa se cubrió con papel aluminio y se colocó en una cámara húmeda a una temperatura 37°C en agitación a 150 rpm por 1 hora, después la placa se lavó 3 veces con una solución de PBS-tween 1X

Adición de BSA(suero de albumina de bovino)

Se preparó BSA 0.2%: para esto se colocaron 0.5g de BSA en 250 ml de PBS-Tween 1X. De ésta solución se agregó 150 µl en cada pozo de la placa de poliestireno para ELISA y se colocó dentro de una cámara húmeda cubierta con papel aluminio, se incubo por 1 hora a 37°C y se mantuvo en agitación (150 rpm), posteriormente se lavó 3 veces con PBS-tween 1X.

Muestra más Antisuero

Previo a realizar este paso se preparó el Antisuero, estándar negativo y estándar AFB1 de la siguiente manera:

Para la preparación del Antisuero; Se mezclaron 6 ml de BSA con 1 µl de Antisuero AFB1, se cubrió el tubo con papel aluminio y se incubó por 40 minutos a 37°C en agitación.

Para la preparación del estándar negativo se tomaron 4.5 ml de BSA 0.2% y se agregó 500 µl del extracto generado con una muestra de maíz sano. Para la preparación del estándar AFB1 se tomó 1 ml del estándar negativo y se le agregó 2.5 µl del estándar AFB1 (10 mg/ml).

Posteriormente la placa de poliestireno para ELISA se dividió de la siguiente manera: en los pozos de la periferia sólo se les colocó agua y el área que se utilizó de la placa fue de las filas B a la G y las columnas de la 2 a la 11, en las filas B y C se usó para la curva estándar, para su generación se adicionaron 100µl de estándar negativo previamente preparado y posteriormente se adicionó en el pozo B2 100µl estándar positivo AFB1 (10µg/µl) se mezcló y a partir de este pozo se hicieron diluciones seriadas quedando como se muestra en la Figura 7.

Posteriormente en los pozos de la fila D2 a la G11 se colocó 90 µl de BSA 0.2%, 10 µl del extracto de la muestra problema. De la fila B2 a la H11 se le adicionó 50 µl de antisuero AFB1 previamente preparado y se colocó dentro de una cámara húmeda con agitación y se incubó por 1 h 20 minutos a 37°C, posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween 1X.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2 25 ppb	B3 12.5 ppb	B4 6.25 ppb	B5 3.125 ppb	B6 1.562 ppb	B7 0.781 ppb	B8 0.390 ppb	B9 0.195 ppb	B10 0.097 ppb	B11 0.000 ppb	B12
C1	C2 25 ppb	C3 12.5 ppb	C4 6.25 ppb	C5 3.125 ppb	C6 1.562 ppb	C7 0.781 ppb	C8 0.390 ppb	C9 0.195 ppb	C10 0.097 ppb	C11 0.000 ppb	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

-  Pozo con H₂O
-  Curva estándar
-  Muestras con concentración desconocida

Figura 7. Distribución de la Placa de ELISA

Adición de Conjugado anti-IgG de conejo- fosfatasa alcalina

La preparación del conjugado anti-IgG de conejo- fosfatasa alcalina; se tomó 12 ml de BSA 0.2 % y se le agregó 3 µl de conjugado anti-IgG de conejo- fosfatasa alcalina 3687-5ML SIGMA y se mezcló. Posteriormente se adicionaron 150 µl a cada pozo de la placa de ELISA, después se colocó dentro de una cámara húmeda, se incubó 1h a



37°C con agitación a 150 rpm, posteriormente la placa se lavó tres veces con PBS-Tween 1X.

Revelado de placa ELISA

Para el revelado de placa ELISA; a 10ml de solución de dietanolamina al 10% a pH 9.8 y se le adicionó una tableta de 5mg de la sal nitrofenil fosfato disódico hexahidratado, se mezcló hasta disolver la pastilla. Posteriormente, se agregó 150 ml de esta solución a cada pozo de la placa ELISA y (paso 6 de la Figura 6) se dejó que se llevara a cabo la reacción por 20 minutos bajo obscuridad. Transcurrido el tiempo de reacción se procedió a leer la placa a 405 nm en un lector de placa Thermo-Electron Multiskan EX®.

7.5.2 Método VICAM®

El método de extracción de aflatoxinas utilizado fue el reportado en el AOC (1999), para la detección se utilizó Afla B, el cual consiste en tres pasos; extracción de AFB de la muestra, dilución de la muestra y la separación por cromatografía. La figura 8 presenta cada uno de los pasos y posteriormente se describen cada uno de ellos.

Extracción de AFB de la muestra

Para la extracción se pesaron 2 g de muestra molida con 0.5 g de NaCl y se le adicionó 20 ml de una mezcla de metanol: agua (80:20), se agitó por 3 minutos a 300 rpm y enseguida se filtró con papel Whatman No.1 y se colectó en un frasco limpio.

Dilución del extracto

Posteriormente se colocó 1 ml del extracto filtrado dentro de un frasco limpio y se diluyó con 4 ml de agua desionizada, se mezcló y volvió a filtrar a través de un Microfibre Filtres VICAM®, y se colectó en un tubo de plástico limpio.



Cromatografía

Para la separación por cromatografía (VICAM), se insertó una jeringa en la parte superior de la columna, posteriormente se hizo pasar 2 ml del extracto diluido y filtrado a través de una columna de afinidad Afla B a razón de 1 a 2 gotas por segundo, después se hizo pasar 10 ml de agua purificada a través de la columna igualmente a razón de 1 a 2 gotas por segundo. La columna del paso anterior se eluyó pasando 1 ml de metanol grado HPLC a una razón de 1 a 2 gotas por segundo y se recolectó la muestra eluida (1 ml) en un tubo de vidrio.

El revelador se preparó diluyendo 1 ml de revelador proporcionado por VICAM con 9 ml de agua destilada. Antes de leer la muestra se tomó lectura de un blanco el cual consistió en leer una mezcla de 1 ml de revelador diluido más 1 ml de metanol HPLC, esta mezcla obtuvo una lectura de “0”.

Posteriormente a la muestra se le agregó 1.0 ml de Revelador AflaTest® previamente preparado como indica el manual de instrucción de Aflatest®. Se mezcló y se colocó el tubo en un fluorómetro VICAM Serie 4EX, calibrado. Y se tomaron lecturas para la concentración de aflatoxinas después de 60 segundos.

La calibración del equipo VICAM Serie 4EX consistió en leer las ampollas a concentraciones conocidas y se siguieron las instrucciones que indica el proveedor en el manual.

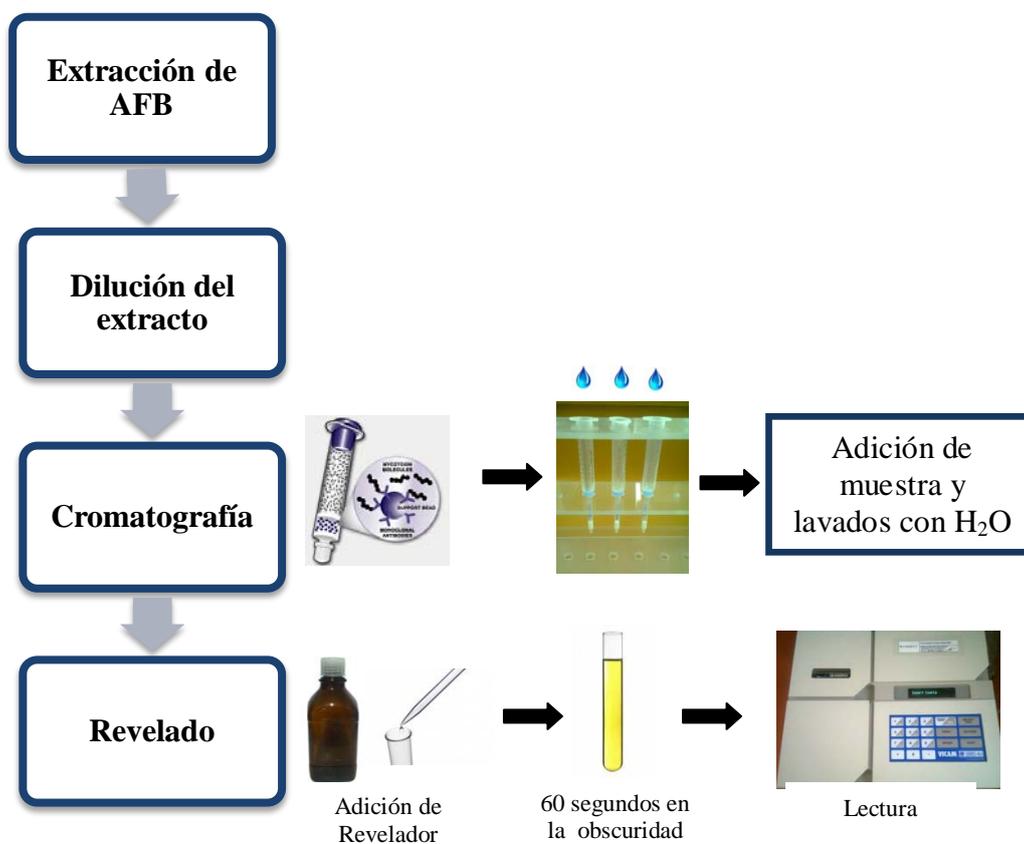


Figura 8. Detección de AFB por método VICAM

7.6 Ensayos de qPCR

7.6.1 Crecimiento de *Aspergillus flavus*

Para la preparación de la curva estándar de DNA de *A.flavus* y maíz, se creció la cepa 96B #40 de *Aspergillus flavus* en placas que contenían medio PDA marca BD (Bioxon) durante cinco días a 23 °C, posteriormente se colectó el micelio lavando la placa con 5ml de del medio liquido GYPE (Kumeda& Asao, 1996) y se transfirió la suspensión de esporas a una placa con medio liquido GYPE (Ver anexo 2), se incubó en un cuarto por dos días a 23°C. Se filtró el micelio a través de papel (Whatman no.1) con ayuda de una bomba de vacío y se lavó dos veces con agua estéril. Posteriormente el micelio se recuperó utilizando una asa estéril y fue colocado en



tubos eppendorf de 2 ml. Enseguida el tejido se liofilizó y se guardó a -80° hasta su procesamiento.

7.6.2 Extracción de ADN genómico de *Aspergillus flavus*

El protocolo de extracción de ADN genómico para *Aspergillus flavus* que se utilizó fue el reportado por Grades y Bruns (1993) con algunas modificaciones.

El tejido liofilizado de *Aspergillus flavus* se molió en un mortero ~~con pistilo~~ que contenía nitrógeno líquido y se colocó en tubos de 2ml, se le adicionó 500 μ l de Buffer de extracción bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 2%, NaCl 1.4M, Tris 100 nM a pH 8, EDTA 20 nM a pH 8 y con 0.1 % de 2-mercaptoetanol). Se agitó en vortex por 5 segundos y se incubó a 60°C por 10 minutos. Se le adicionó 400 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm y se retiró la fase superior y se colocó en tubos limpios, enseguida se le adicionó 300 μ l de cloroformo:alcohol isoamilico y se retiró la fase superior y se colocó en tubos limpios, posteriormente se le adicionó 300 μ l de isopropanol y se dejó por una hora a -20°C . Adicionalmente se le hicieron lavados con 300 μ l de etanol al 70 y 90%, finalmente se resuspendió en 100 μ l de H_2O (ELGA sistema de agua ultrapura, High Wycombe, UK). Se le determinó la concentración del ADN con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000

7.6.3 Extracción de DNA genómico de granos infectados y controles

Para la extracción de ADN genómico de *A. flavus* a partir de granos de maíz infectados y granos sanos, se adaptó la metodología reportada por Gardes y Bruns (1993). Se colocaron 100 mg de granos infectados en tubos de 2ml y para favorecer su molienda, se pusieron balines de acero inoxidable y se molieron en molino Retsch MM40 durante 1 minuto, inmediatamente después se colocaron los tubos en hielo y se les adicionó 500 μ l del buffer de extracción bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 2%, 1.4M NaCl, 100 nM Tris at pH 8, 20 nM EDTA at pH 8 y con 0.1 % de 2-mercaptoetanol). Se agitó en vortex por 10 s, se incubó a 60°C por 10 minutos. El ADN se extrajo con una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 15 minutos a



12000 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y limpios. La precipitación del ADN se hizo con isopropanol al 100% y se dejó reposar por 1 hora a -20°C . Posteriormente se hicieron lavados con etanol al 70% y 90%. La pastilla se dejó secar al aire y se resuspendió en $100\mu\text{l}$ de H_2O (ELGA sistema de agua ultrapura, High Wycombe, UK).

Posteriormente se determinó la concentración del ADN con ayuda del Nanodrop ND-1000. La integridad del ADN fue visualizada en un gel de agarosa al 0.8% utilizando un transiluminador de UV. (Ver Anexo 3)

7.6.4 Generación de la curva estándar para la cuantificación de *Aspergillus flavus*

Para la generación de la curva se hizo una extracción de ADN de la línea de maíz CML 247. Primeramente se ajustó la concentración de ADN genómico del maíz a $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ y posteriormente se hizo una dilución, hasta obtener una concentración final de ADN genómico de $1\text{ ng}/\mu\text{l}$.

La concentración de ADN genómico de *Aspergillus flavus* se ajustó a $100\text{ ng}/\mu\text{l}$. A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas de 10 a 1×10^{-3} en ADN de maíz ($1\text{ ng}/\mu\text{l}$), para lo cual se tomaron $50\mu\text{l}$ y se mezclaron con $450\mu\text{l}$ de ADN genómico de maíz $1\text{ ng}/\mu\text{l}$, para obtener una concentración final de $10\text{ ng}/\mu\text{l}$, posteriormente de esta mezcla se tomaron $50\mu\text{l}$ y se le adicionó $450\mu\text{l}$ de ADN genómico de maíz $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ y se obtuvo una concentración final de $1\text{ ng}/\mu\text{l}$, así sucesivamente. Se separaron en alícuotas y se guardaron en congelación a -20°C y -4°C .

7.6.6 Condiciones para qPCR

Acorde a Mideros *et al* 2009, los iniciadores que se están usando para la cuantificación de *Aspergillus flavus* fueron diseñados de regiones polimórficas de Espacios Internos Transcritos 1(ITS1), el producto amplificado que se obtiene es de 73 bp. (Tabla 1)



Tabla 1. Iniciadores a partir de ITS de *Aspergillus flavus*

Iniciador	Secuencia
Af2F	5'- ATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCT-3'
Af2R	5'-GCCGAAGCAACTAAGGTACGTAAA-3'
Af2TaqMan	5' FAM-CGAGCCCAACCTCCCACCG-3'TAMRA

La mezcla de reacción es de un volumen total de 25 µl: con 10 µM de cada uno de los primers Af2R y Af2F, 2.5 µM de la sonda Af2Taq Man, 3 µl ADN molde, 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Biosystems) y 7.12 µl de H₂O . Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial 50°C/2 min, 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C/ 10 min y 40 ciclos: 95 C/30s, 59 C/30s, y 72 C/30s

Las reacciones se llevaron a cabo en placas Multiplate TM Low- Profile 96 Well Unskirted PCR Plates, cada una contenía la curva estándar por duplicado con la concentraciones de 10,1,0.1,0.01 y 0.001 ng/µl de DNA genómico de *A.flavus* diluido en DNA genómico de maíz a 1ng/µl.

Los experimentos se hicieron en el equipo CFX96 Real- Time PCR Detection System- Bio-Rad, C1000 Thermal cicler. Los primers y la sonda TAQMAN TAMRA se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (IDT).

Una vez que se obtuvo las cuantificaciones del genoma de *A. flavus* por qPCR, se procedió a obtener un coeficiente de infección (IC) al dividir la cantidad de DNA genómico total sobre DNA de *A.flavus* amplificado y éste se correlacionó con la concentración de aflatoxinas.

Posteriormente todos los datos de AFB1 y CI se transformaron a [Log (x+1)] para los posteriores análisis estadísticos. Se les realizó un análisis de varianza con el paquete estadístico SAS 9.0. A demás se hizo una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey (P=0.05).



7.6.7 Extracción de ARN

La metodología para la extracción de ARN de semillas de maíz se adaptó Li y Trick (2005). Para lo cual se molieron aproximadamente 100 mg de granos infectados con *A.flavus* con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero. Inmediatamente después se colocaron en tubos de 2ml y se pusieron en hielo, posteriormente se les adicionó 500 µl del Buffer I (100 mM Tris, pH 8.0, 150 mM de LiCl, 50 mM de EDTA, 1.5 % de Dodecilsulfato sódico (SDS), 1.5 % de 2-mercaptoetanol) y se agitó en vortex y se adicionó 400µl fenol: cloroformo (1:1), nuevamente se dió vortex y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C. El sobrenadante se pasó a tubos nuevos y limpios. Se le adicionó 300 µl de TRIzol (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se le adicionó 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se dio vortex y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó en tubos nuevos y limpios. La precipitación se hizo con 300 µl de Isopropanol y 250 µl de Cloruro de Sodio 1.2M y se dejó reposar durante 2 horas a -20°C. Posteriormente se centrifuga a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se hicieron lavados con etanol al 70%. La pastillas se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de H₂O con Dietilpirocarbonato (DEPC).

Para la visualización de las bandas de ARN se realizó un gel agarosa/formaldehído al 2 % y se visualizó en un transluminador de UV. (Ver Anexo 6). Posteriormente a las muestras de ARN se les dio un tratamiento con DNAsas (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención de ADNc se utilizó la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ II y se siguieron las instrucciones del fabricante.



7.6.8 Condiciones de RT-PCR

La secuencia de los iniciadores que se utilizaron se muestra en la tabla 2. Así mismo se indica el tamaño de producto de amplificación con ADN genómico y con ADNc

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores para Ascorbato peroxidasa y Glioxalasa

Primer	Secuencia	Producto
GADPH_ZmF	5'-GCAGCACTGGAGCTGCTAAG-3'	227 DNA Genómico
GADPH_ZmR	5'-ACATCGACAGTTGGGACACG-3'	94 cDNA
APXCit _Forward	5'-CCTTCTTCAGCTCCCAAGTG-3'	192 DNA Genómico
APXCit _Reverse	5'-GGTGGGCCTCTTTGTAGTCA-3'	116 cDNA
GLX _Forward	5'-TGCCGTATCGAAGCTAATGG-3'	290 DNA Genómico
GLX _Reverse	5'-TTGCCGGACATACACATCAG-3'	202 cDNA

Las condiciones de reacción para cada iniciador fueron optimizadas, para lo cual se vario: Tm , concentración de magnesio; para APX Cit de 55°C a 60 °C, para GLX de 55°C a 60.6°C y para GADPH de 55°C a 65°C. Todas las mezclas de las reacciones fueron de un volumen total de 20µl; 4µM de cada uno de los iniciadores, 4µM de MgCl₂, 10 µl de DreamTaq PCR Master Mix 2X (Fermentas), 1 µl de ADNc y 8.2 µl de H₂O. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Px2 Thermal Cycler. Thermo Electron Corporation.

Se diseñaron iniciadores para uno de los genes, la secuencias se obtuvieron de la base de datos GenBank para Ascorbato Peroxidasa Citosólica (APXCit) (NM_001156720.1) y para glioxalasa (GLX) (NM_001154449.1) flanqueando intrones y exones (Anexo XX) , en la siguiente tabla se especifica la secuencia del iniciador y el tamaño del producto amplificado. (Tabla2). El gen constitutivo que utilizó fue el de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Las condiciones de reacción para cada iniciador fueron optimizadas, para lo cual se varió: la Tm , para APX Cit de 55°C a 60 °C, para GLX de 55°C a 60.6°C y para GADPH de 55°C a 65°C, concentración de magnesio de 2mM a 4mM y de 35 a 38 ciclos); todas las mezclas de las reacciones fueron de un volumen total de 20µl; 4µM



de cada uno de los iniciadores, 4 μ M de MgCl₂, 10 μ l de DreamTaq PCR Master Mix 2X (Fermentas), 1 μ l de cDNA y 8.2 μ l de H₂O. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Px2 Thermal Cycler. Thermo Electron Corporation. Las condiciones de PCR fueron 1 ciclo inicial de 95°C por 10 minutos y 35,38 ó 40 ciclos a 60°C por 30s, y 72°C por 30s, finalmente se le dio un tiempo de extensión final de 72°C por 5 minutos.



8. RESULTADOS

8.1 Muestreo en campo

Se evaluó la resistencia o susceptibilidad del maíz a *Aspergillus flavus* durante el desarrollo de los granos de la mazorca, para esto primeramente se documentaron fotográficamente los muestreos de 0, 7, 12, 21 y 49 días después de la inoculación con *Aspergillus flavus* para cada línea de maíz evaluada. En la figura 9 se presenta la colonización de algunos granos de maíz. Se observa que existe colonización a nivel pericarpio, endospermo y embrión. Cleveland (2004) ha reportado que *A.flavus* emplea enzimas hidrolíticas para la invasión y establecimiento en el hospedero. Dentro de las enzimas que son producidas por este patógeno se encuentra la una pectinasa (P2c) la cual se ha visto que se produce en infecciones severas (Cleveland & Cotty, 1991).

Este patógeno requiere tan sólo de dos días para iniciar la adquisición de fuentes de carbono a partir del hospedero, presumiblemente este es el periodo requerido para que el hongo pueda romper las barreras de defensa, como la cutícula de la semilla (Mellon, *et al* 2000). Por otra parte, se ha reportado que aberturas o grietas en el endospermo podrían ser la entrada primaria para la infección de *A.flavus* y subsecuentemente se dé la contaminación (Smart *et al* 1990). Brown *et al* (1993) realizó un estudio en donde incubó granos de maíz del genotipo resistente MAS y genotipos susceptibles que fueron dañados desde el pericarpio hasta el endospermo, en una suspensión de *A. flavus* y observó que la exposición del endospermo no incrementa la susceptibilidad a la contaminación en genotipos susceptibles o resistentes, sugiriendo que la susceptibilidad o la invasión de granos no siempre esta correlacionada.



Figura 9. Colonización de *A.flavus* sobre granos de maíz.

8.2 Determinación de Resistencia o Susceptibilidad en doce líneas de maíz subtropicales.

Se evaluaron las concentraciones de AFB1 en doce líneas de maíz subtropicales a los 21 y 49 días después de inoculación con *A. flavus* con el fin de clasificarlas inicialmente. A los 21 días la línea MS1 presentó una concentración de 27.59 ppb (Figura 10) y fue estadísticamente diferente ($P=0.05$) del resto de las demás líneas, clasificándose como altamente susceptible a la producción de aflatoxinas. El resto de las líneas tuvieron un comportamiento similar entre ellas, presentando valores de aflatoxinas máximos de 3.22 ppb. (Tabla 3)

Tabla 3. Concentración de AFB1 en doce líneas de maíz a 21 y 49ddi con *A.flavus*

Línea de maíz	AFB1 21ddi (ppb)	AFB1 49ddi (ppb)
MR1	1.08	3.52
MR2	0.28	2.06
MR3	0.34	2.07
MR4	0.28	10.90
MS1	27.59	208.14
MS2	3.22	189.21
MS3	0.43	167.10
MS4	0.30	188.40
MS5	2.76	153.85
MS6	0.35	51.70
MS7	1.07	113.32
MS8	0.54	103.51

A los 49 días después de la inoculación se observó que las líneas de maíz MR1, MR2, MR3 y MR4 presentaron bajas concentraciones de la toxina de 3.52, 2.06, 2.07 y 10.90 respectivamente. Las líneas MS1, MS2, MS4, MS3, MS5, MS7, MS8 y MS6 tuvieron un incremento en la concentración de AFB1, obteniéndose una concentración máxima de 208.14 ppb en la línea MS1 (Ver Anexo 1)

En base a los resultados obtenidos y en concordancia con la norma mexicana NOM-188-SSA1-2002, las líneas bajo estudio fueron clasificadas en resistentes o susceptibles a la producción de aflatoxinas.

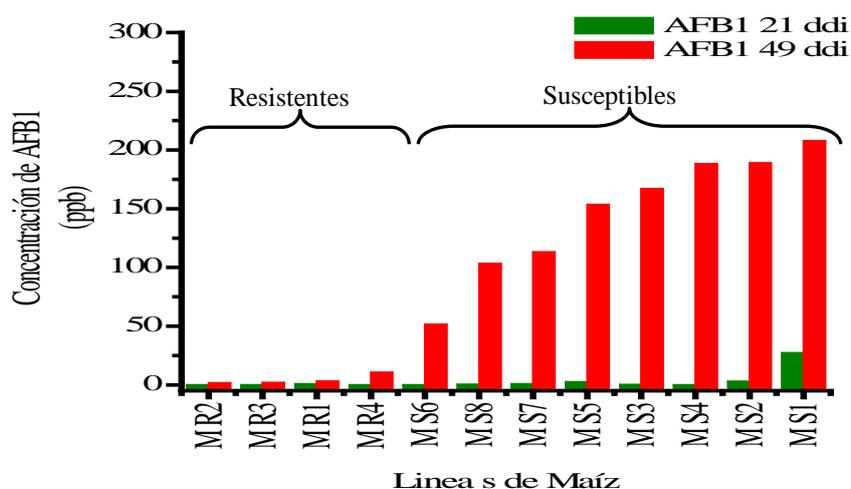


Figura 10. Concentración de AFB1 en doce líneas de maíz a 21 y 49 días después de la inoculación con *Aspergillus flavus*



En base a los resultados anteriores se eligieron únicamente seis líneas de maíz para posteriores análisis; tres clasificadas como altamente resistentes a la acumulación de AFB1 y tres como altamente susceptibles, evaluando estos genotipos en dos años, 2010 y 2011. (Tabla 4)

Tabla 4. Clasificación de líneas de maíz subtropicales

Resistentes	Susceptibles
CML 495. CL-RCW01 (MR1)	P502c1F9-2-2-1-B-B-1-3-1-1-B-1-B-B-1-B-B-B-B (MS1)
CML 247(MR2)	DTPWC9-F67-2-2-1-B-B-B (MS2)
DERRC2 15-3-1-#2-#1-1-#-# -B (MR3)	CML 52 (MS3)

Para estas líneas se obtuvieron las concentraciones de AFB1 y los coeficientes de infección en los diferentes tiempos de colecta; 0, 7,14, 21 y 49 días después de la inoculación y en los años 2010 y 2011.

8.3 Determinación de aflatoxinas y coeficientes de infección en líneas de maíz susceptibles y resistentes seleccionadas

8.3.3. Comparación de métodos VICAM Y ELISA en la determinación de aflatoxinas

Las concentraciones de aflatoxinas B de acuerdo a las dos técnicas se muestran en la Figura 11 y Tabla 5, en la que podemos observar que existe la misma tendencia, es decir, las líneas consideradas como resistentes presentan valores bajos de concentración de Aflatoxina B en un rango de 2.1- 3.5 ppb obtenidos con el método ELISA y 2.9-15 ppb por el método VICAM®, y las líneas de maíz susceptibles presentan valores altos en un rango de 167.1 -208.1ppb con la técnica ELISA, y de 220-300 ppb con la técnica VICAM®.

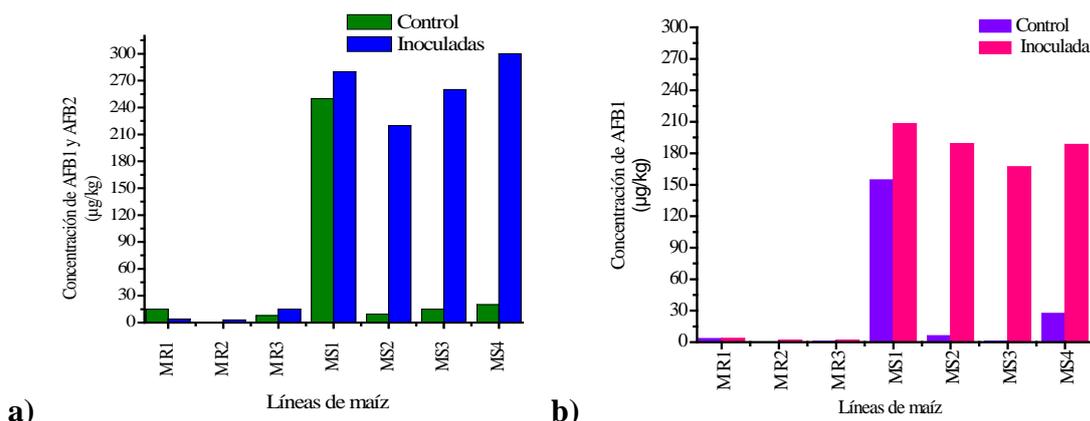


Figura 11. Concentraciones de AFB a los 49 días después de inoculación en líneas de maíz Resistentes y Susceptibles (ciclo 2010) obtenidas por el método VICAM® (a) y método ELISA (b).

Tabla 5. Concentración de Aflatoxina B en líneas de maíz, de acuerdo a los métodos ELISA y VICAM®

LINEAS DE MAIZ	VICAM Aflatoxinas B (µg/kg)	ELISA AFB1 (µg/kg)
MR1	4.0	3.5
MR2	2.9	2.1
MR3	15.0	2.1
MS1	280.0	208.1
MS2	220.0	189.2
MS3	260.0	167.1
MS4	300.0	188.4

Se realizó una prueba de T, con un alfa de 95% la cual arrojó que los métodos ELISA y VICAM para medir la concentración de AFB no difieren estadísticamente. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 98% por lo que se concluyó que existe una alta correlación entre ambos métodos. Por lo anterior, las subsecuentes evaluaciones se realizaron utilizando únicamente la técnica de ELISA por resultar un método sensible y más económico en comparación con VICAM.

8.4. Ensayos de qPCR

8.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de los granos infectados así como los controles se hizo con el método de CTAB 0.2% reportado por Gardes y Bruns (1993) en la Figura 14 se presenta la calidad del ADN obtenida.

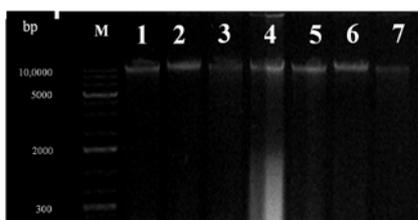


Figura 12. Electroforesis de muestras de ADN en gel de agarosa 0.8%

8.4.2 Curva en qPCR para la cuantificación del número de copias del genoma de *Aspergillus flavus* en maíz

La amplificación de la curva estándar para los ensayos de qPCR se presenta en la figura 13, Acorde a los datos generados se obtuvo una eficiencia de amplificación del 93.6% con una $R^2(1.00)$.

En el Anexo 8 se muestran las curvas y las amplificaciones obtenidas para las muestras de 0, 7 14,21 y 49 días analizadas.

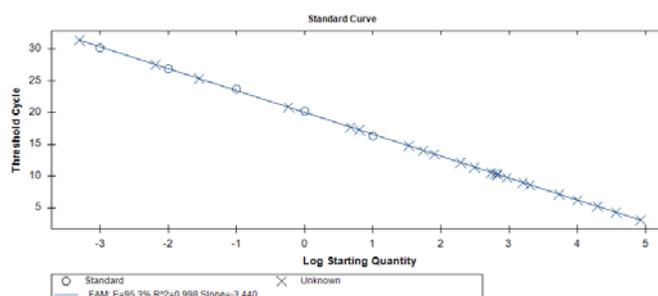


Figura 13. Curva para la cuantificación de *Aspergillus flavus* por qPCR

En la figura 14 se muestra la amplificación de los puntos de la curva de calibración. Se puede observar que a partir de los 18 ciclos de amplificación se detecta *A. flavus* a una concentración de ADN de 10 ng/ μ l en contraste con la concentración de 0.001 ng/ μ l de ADN de *A. flavus* donde se obtiene un producto de amplificación después de 32 ciclos.

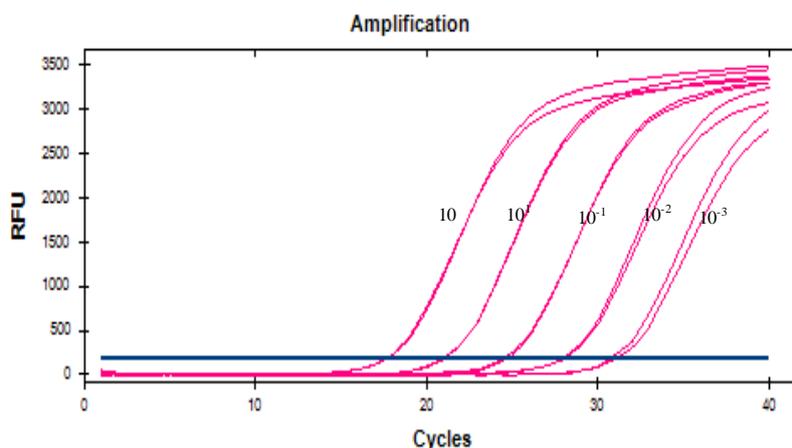


Figura 14. Amplificaciones de la curva por qPCR.

8.5 Correlación entre colonización por *A. flavus* y la concentración de aflatoxinas en líneas de maíz

De acuerdo al análisis estadístico realizado para la concentración de AFB1, existen diferencias estadísticas significativas con una $P=0.05$ entre las líneas clasificadas como Resistentes y Susceptibles, así como entre replicas experimentales (años 2010 y 2011). En el Anexo 5 y 6 se presentan en forma de tabla las concentraciones de AFB1 obtenidas a partir del método ELISA indirecto competitivo en las colectas hechas a los 0, 7, 14, 21 y 49 días después de la inoculación con *Aspergillus flavus*.

8.6 Análisis de correlación entre concentración de aflatoxinas y coeficiente de infección en líneas de maíz resistentes

En las tablas 6 y 7 se presenta la concentración de aflatoxinas y coeficientes de infección respectivamente, para las líneas de maíz clasificadas como resistentes. La comparación de medias de la concentración de aflatoxinas (Tabla 5) no mostró diferencias significativas entre las líneas consideradas como resistentes, particularmente para el año 2011 se observó un ligero aumento en la concentración de aflatoxinas en las líneas inoculadas, lo cual no se vio reflejado en el control sin inocular.



Tabla 6. Evaluación de AFB1 en 2010 y 2011 (b ,c) en líneas de maíz resistente. Comparaciones de medias con prueba de Tukey ($\alpha,0.05$)

Tratamiento	Línea de Maíz			
	MR1	MR2	MR3	
	AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
2010	Control	0.67 ^b	0.62 ^b	0.89 ^b
	Inoculada	0.96 ^b	1.58 ^b	1.54 ^b
2011	Control	0.19 ^c	0.13 ^c	0.43 ^c
	Inoculada	4.44 ^c	5.79 ^c	1.11 ^c

En relación a los coeficientes de infección (Tabla 7), no se encontraron diferencias significativas entre líneas por año y su respectiva replica manteniéndose los coeficientes de infección bajos. Lo que sugiere que en estas líneas presentan un mecanismo para contener la colonización por *A flavus*.

Tabla 7. Evaluación de Coeficiente de Infección (CI) en 2010 y 2011 (b ,c) en líneas de maíz resistente. Comparaciones de medias con prueba de Tukey ($\alpha,0.05$)

Tratamiento	Línea de Maíz			
	MR1	MR2	MR3	
	CI			
2010	No Inoculada	6.3E-05 ^a	2.9E-06 ^a	1.6E-05 ^a
	Inoculada	6.3E-05 ^a	4.9E-05 ^a	3.4E-05 ^a
2011	No Inoculada	4.8E-05 ^a	3.9E-05 ^a	5.3E-04 ^a
	Inoculada	1.2E-04 ^a	9.2E-04 ^a	1.7E-04 ^a

A continuación se presentan los resultados obtenidos para aflatoxinas y coeficiente de infección por línea.



8.5.1 Línea de maíz MR1

Para la línea MR1 se observó diferencia significativa entre los tratamientos (inoculada y no inoculada) para ambas replicas experimentales. En relación a las acumulación de aflatoxinas en las líneas inoculadas tampoco se observó diferencias significativas ($P=0.05$) en los dos años evaluados. La máxima concentración de AFB1 que se obtuvo fue de 11.6 ppb a los 49 días después de inoculación. En la figura 15 a y b se representan las concentraciones de AFB1 a los diferentes días después de la inoculación, en donde se puede notar que para el primer año la concentración se mantuvo en niveles bajos y para el segundo año hubo un ligero incremento sólo hasta los 49 días después de inoculación. Por otro lado los coeficientes de infección que se obtuvieron fueron bajos, los máximos coeficientes se detectaron a los 14 y 21 días después de la inoculación. En la Figura 16 se muestran imágenes de la secuencia de colonización de las mazorcas colectadas a los diferentes tiempos de tratamiento, observándose que al igual que las muestras control no inoculadas, las muestras de mazorcas inoculadas, no presentaron alto grado de colonización por parte de *A. flavus*. Considerándose finalmente como resistentes a la acumulación de AFB1 y a la colonización por *A.flavus*.



Línea de maíz MR1

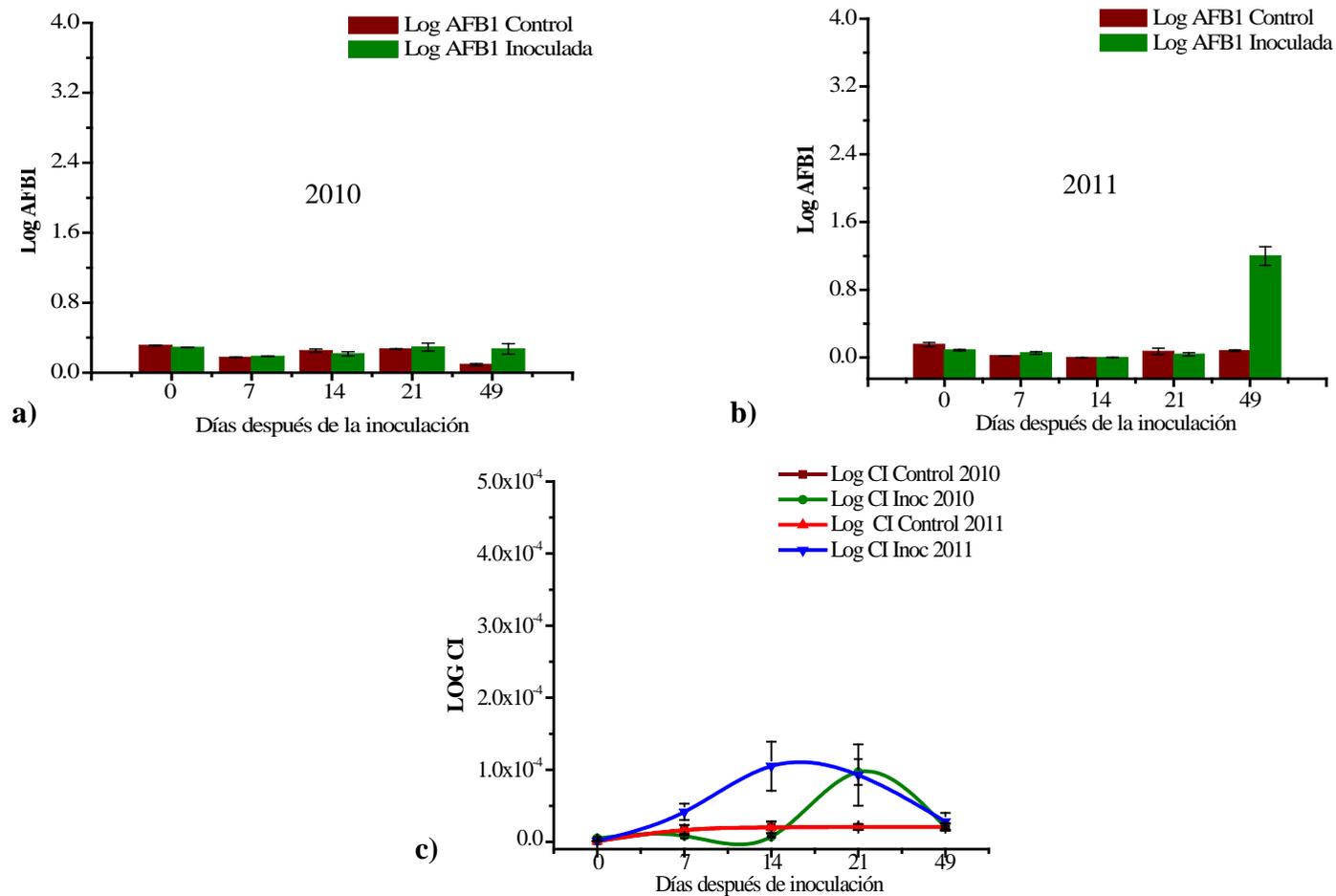


Figura 15. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MR1.

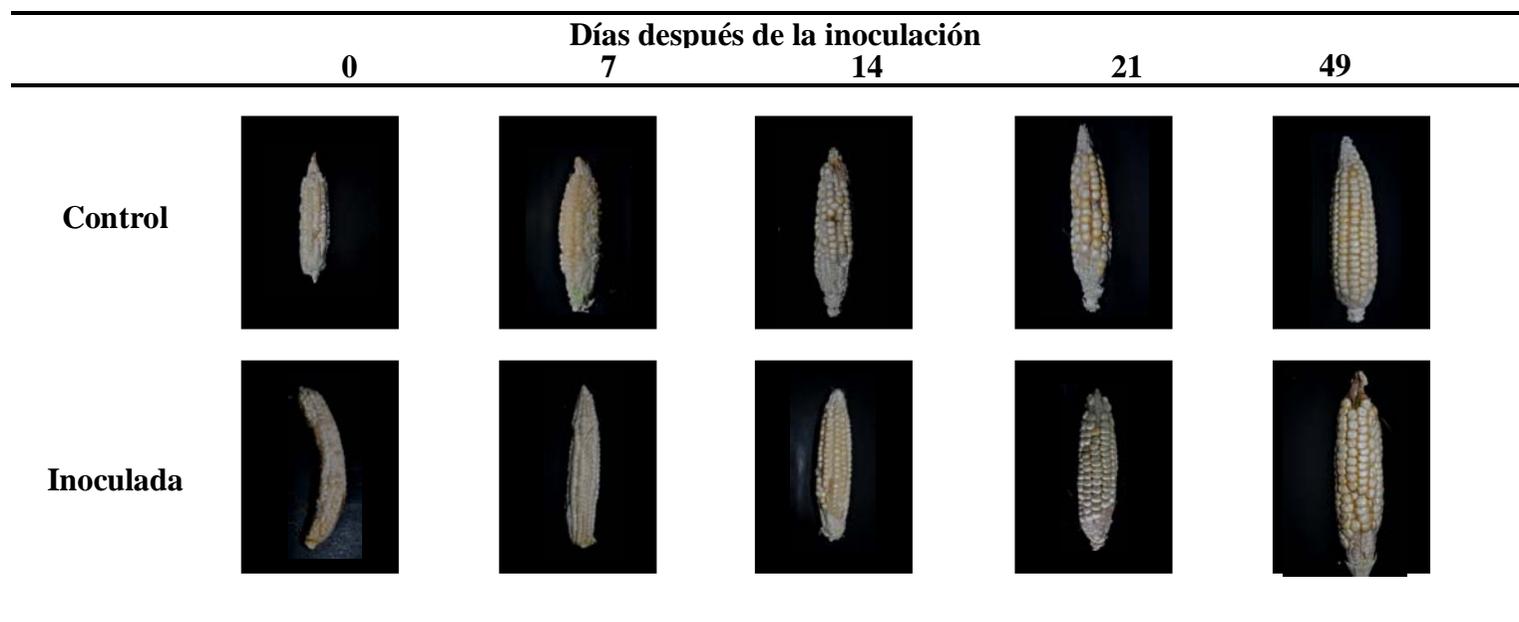


Figura 16. Patrón de infección en la línea de maíz MR1 en los diferentes días después de la inoculación.



8.5.2 Línea de maíz MR2

El genotipo MR2 presentó a los 49 ddi concentraciones de aflatoxinas de 2.08ppb y 28.073ppb para los años 2010 y 2011 respectivamente (Figura 17 a y b). En el análisis de varianza ($P=0.05$) no se encontró diferencia significativa en la concentración de aflatoxinas y coeficiente de infección (Figura 17c) entre años. Tampoco existieron diferencias en los días después de la inoculación, esto se puede observar claramente en el aspecto de la mazorca representado en la Figura 18. En donde vemos que únicamente a los 49 ddi se observa que la infección no logró establecerse en la mazorca.

Las correlaciones obtenidas entre coeficiente de infección (colonización) y concentración de aflatoxinas fueron de 1 y 0.99 para los años 2010 y 2011 respectivamente. Estos coeficientes de correlación nos indican que la infección por *A. flavus* está directamente relacionada con la concentración de aflatoxinas. En estudios anteriores realizados por Mideros 2009 en donde evaluó la línea MR2 en Mississippi, Estados Unidos obtuvieron coeficientes de infección bajos, sin embargo la concentración de AFB1 fue alta (172 ppb) en comparación a las obtenidas en esta investigación. Esta línea fue inoculada 7 días después de que emergieron los estigmas y se inyectó 3.4 ml de una suspensión de conidios de 3×10^8 con la cepa NRRL 3357. Existen reportes que indican que en la interacción de maíz y *A. flavus* existe una alta variación dependiendo del genotipo/ ambiente. Ello hace que los genotipos se comporten de diferente manera en distintos ambientes (Brooks et al. 2005; Paul et al., 2003).

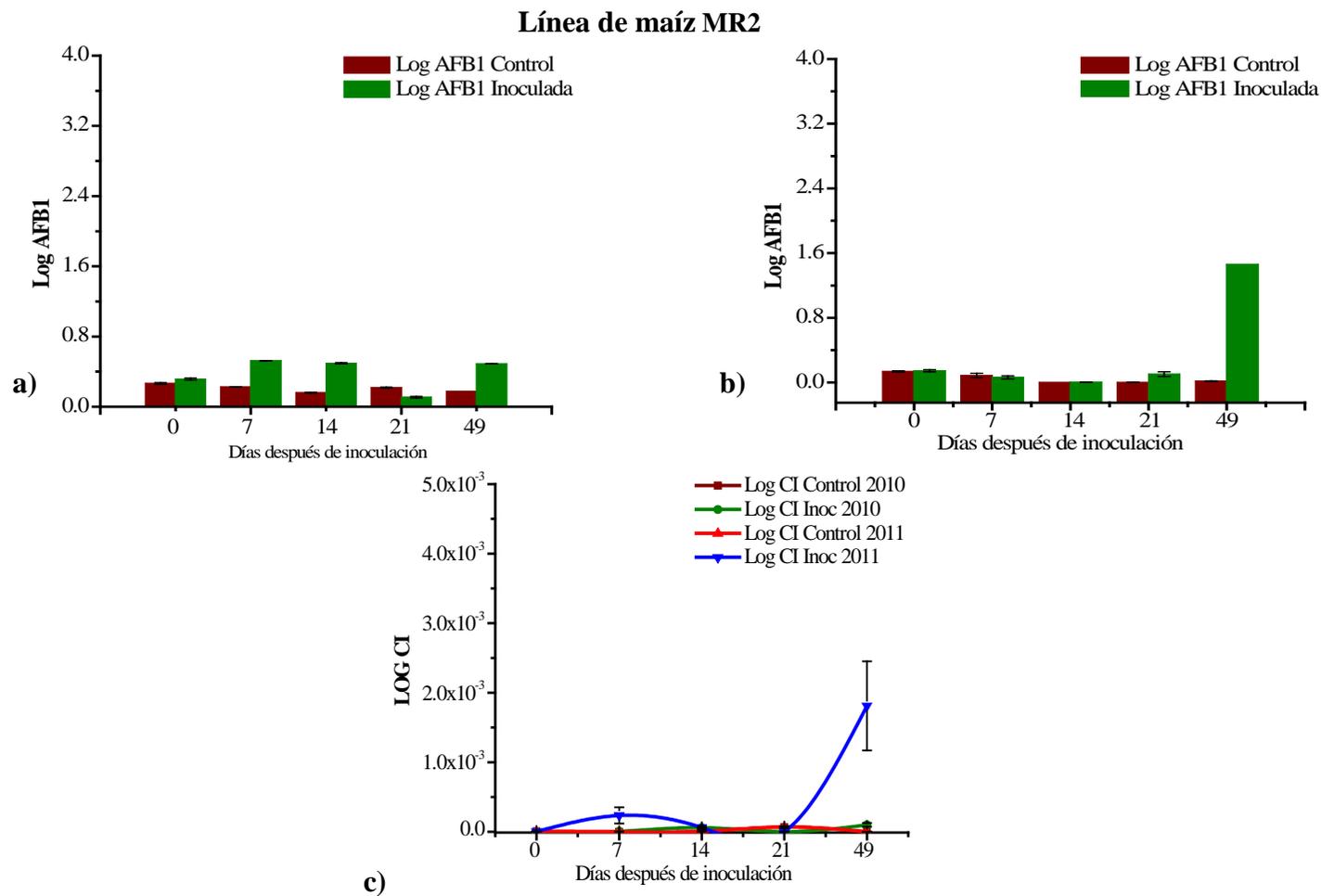


Figura 17. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y para 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MR2.

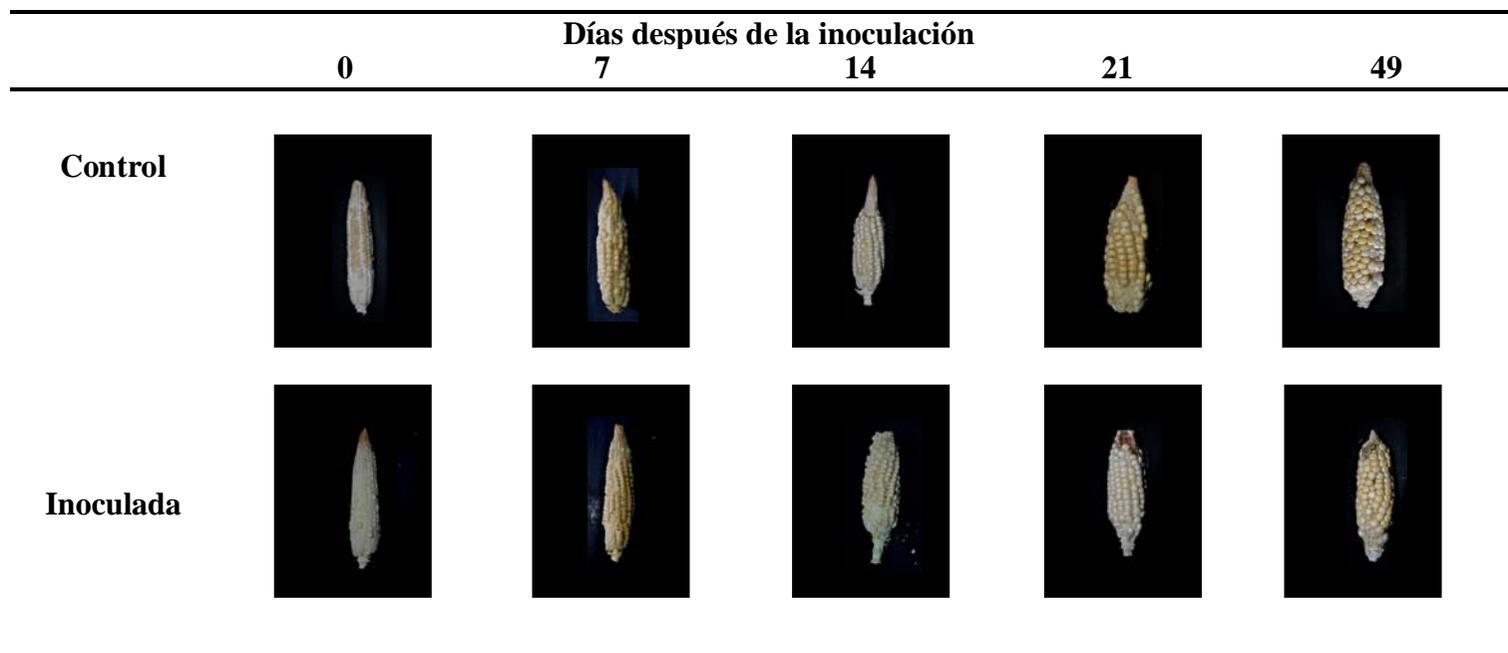


Figura 18. Patrón de infección en la línea de maíz MR2 en los diferentes días después de la inoculación

8.5.3 Línea de maíz MR3

En la línea MR3 se obtuvo una concentración máxima de aflatoxinas después de 49ddi de 2.073 y 4.21ppb para el año 2010 y 2011 respectivamente (Figura 19 a y b). En cuanto al Coeficiente de Infección hubo diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) para los dos años analizados. En la Figura 20 se muestran imágenes de la secuencia de colonización de las mazorcas colectadas a los diferentes tiempos de tratamiento. Es evidente que no existió una colonización en los granos que afectará el desarrollo de la mazorca.

Es importante destacar que el rango de acumulación de AFB1 y los coeficientes de Infección que presentan las líneas resistentes son muy bajos en comparación a los obtenidos en las líneas susceptibles, además se observó que al menos visualmente no existió una colonización que afectará el desarrollo de los granos (Figura 20)

Estos datos sugieren que las líneas de maíz resistentes, presentan un mecanismo de resistencia a la acumulación de AFB1 durante el desarrollo de la infección.

Un estudio realizado por Pitt (1993) reporta que la acumulación de aflatoxinas se da después de la acumulación de biomasa de *A. flavus* en un medio sólido. Mellon en 2002 reporta que la producción de aflatoxinas es paralelo al crecimiento y que existe un incremento durante la fase de crecimiento exponencial en un medio líquido que simula el contenido de los granos de maíz. Un estudio en campo realizado por Abbas et al 2008 en donde inocularon 200 μ l de solución con 1×10^6 conidios/ ml a 20 días después de la floración femenina reportó que generalmente la acumulación de biomasa se da después del crecimiento de *A. flavus* y encontraron que una cepa toxigenica comienza a acumular toxina dos días después de inoculación. Mideros en 2009 estudió diferentes genotipos de maíz y encontró que en todos existe una alta correlación entre la biomasa fungal y la acumulación de aflatoxinas.

En otro estudio realizado con líneas resistentes a la colonización de *A. flavus* reportaron que la actividad de una glioxalasa contribuye a regular los niveles de metilglioxal, el cual a su vez regula la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de las aflatoxinas (Chen et al, 2006). Sin embargo también se ha observado que las especies ROS en granos de maíz juega un importante papel en los niveles de AFB1 (Bush, 2008).



La resistencia de los genotipos MR1, MR2 y MR3 es resultado de la inducción de diversas respuestas bioquímica, fisiológicas y moleculares la cual incluye la expresión diferencial de genes (Bawles, 1993) y se ha visto que la expresión de algunos genes específicos y la síntesis de numerosas proteínas es el resultado de la respuesta ante algún tipo de patógeno (Skriver & Munday, 1990).

Línea de maíz MR3

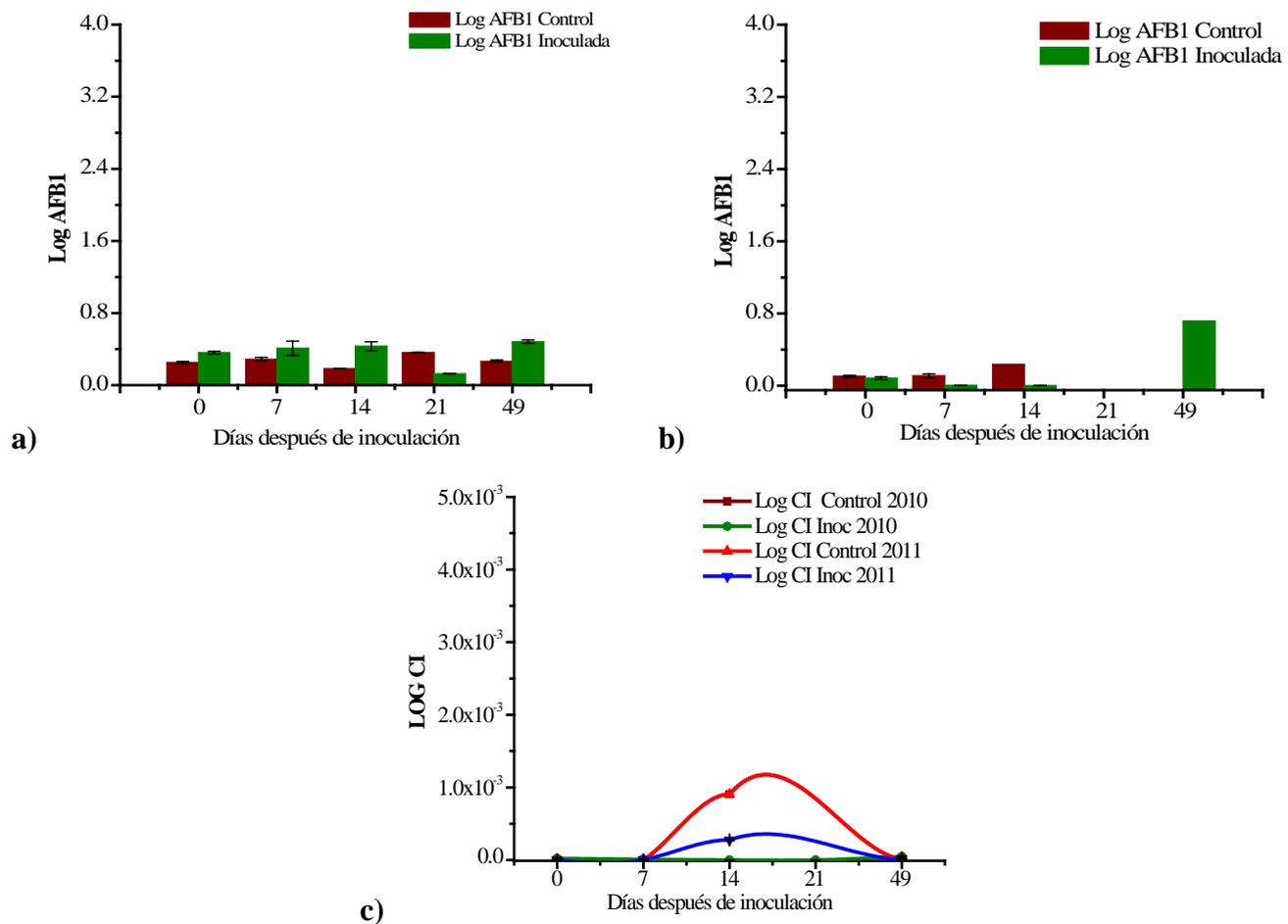


Figura 19. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y para 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MR3

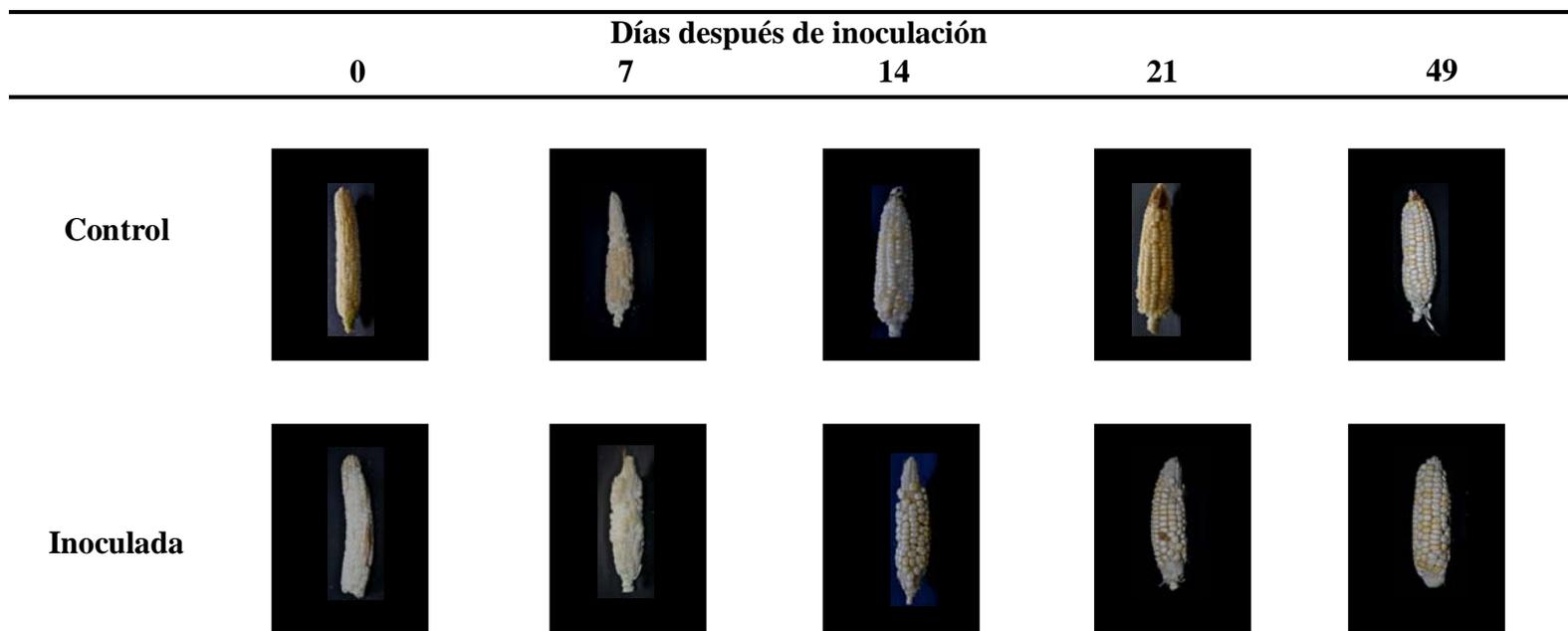


Figura 20. Patrón de infección en la línea de maíz MR3 en los diferentes días después de la inoculación



8.6 Análisis de concentración de aflatoxinas y coeficiente de infección en líneas de maíz susceptibles

El análisis estadístico para la comparación de medias con Tukey ($\alpha 0.05$) para AFB1 en las líneas de maíz consideradas como susceptibles mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) entre estas líneas. Es decir todas las líneas se comportaron como susceptibles, pues en todas obtuvieron altos contenidos de AFB1 y coeficientes de infección elevados, comparados con las líneas de maíz consideradas como resistentes. A demás las líneas MS2 Y MS3 se observó que hubo diferencias entre la muestras control y las inoculadas y para la línea MS1 no existió diferencias significativas, es decir los controles presentaron altas concentraciones de AFB1 lo mismo que la inoculada. En todas las líneas hubo diferencias significativas en la concentración de aflatoxinas con el tiempo después de la inoculación. ($P=0.05$), observándose que a los 49 días después se presentó la mayor acumulación de AFB1 (Tabla 8).

Tabla 8. Media de las concentraciones de AFB1 en líneas de maíz susceptibles

Tratamiento	Línea de Maíz				
	MS1 ^a	MS2 ^a	MS3 ^a	MS4 ^a	
	AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
2010	Control	31.05 ^b	2.03 ^b	0.82 ^b	6.70 ^b
	Inoculada	47.70 ^b	39.12 ^b	34.44 ^b	39.98 ^b
2011	Control	40.7 ^c	27.85 ^c	17.04 ^c	0.81 ^c
	Inoculada	48.80 ^c	47.77 ^c	46.26 ^c	12.01 ^c

2010 y 2011 (b ,c) Comparaciones de medias con Tukey ($\alpha,0.05$)



Tabla 9. Media de las concentraciones de AFB1 en líneas de maíz susceptibles.

Tratamiento	Línea de Maíz				
	MS1 ^a	MS2 ^a	MS3 ^a	MS4 ^a	
	Coeficiente de Infección				
2010	Control	2.1E-03 ^a	4.4E-04 ^a	4.7E-05 ^a	4.7E-05 ^a
	Inoculada	4.9E-02 ^a	1.1E-02 ^a	1.5E-03 ^a	2.2E-03 ^a
2011	Control	2.4E-05 ^a	8.2E-05 ^a	1.5E-02 ^a	1.5E-04 ^a
	Inoculada	4.7E-02 ^a	5.6E-04 ^a	1.5E-02 ^a	3.8E-03 ^a

2010 y 2011 (b ,c) Comparaciones de medias con Tukey ($\alpha,0.05$)

En el caso de los Coeficientes de Infección no existió diferencia significativa en los años 2010 y 2011, es decir la infección para las líneas susceptibles fue similar en los dos años. Sin embargo si se observaron diferencias significativas entre las muestras no inoculadas y las inoculadas.

A continuación se presentan los resultados de concentración de aflatoxinas y coeficiente de infección por línea susceptible evaluada.

8.6.1 Línea de maíz MS1

La línea de maíz MS1 estadísticamente fue la más diferente entre líneas susceptibles, presentando los coeficientes de infección más altos de 0.179 para el 2010 y 0.235 para 2011 en muestras inoculadas.

Esta línea de maíz presentó altas concentraciones de AFB1 en los años 2010 y 2011, sin embargo se puede observar en la Figura 21a y 21b que en el año 2010 a los 21 días después de la inoculación ya presentaba una alta acumulación de AFB1 (27.59 ppb) en comparación con la concentración de afb1 en el 2011 donde presentó solo 0.001 ppb es decir aún no existía acumulación y/o producción de aflatoxinas, existieron diferencias estadísticas significativas a los 49 ddi para coeficientes de infección y la concentración de AFB1 para los dos años.

Las máximas acumulaciones de aflatoxina alcanzaron valores de 208.14 y 232.29 ppb para el 2010 y 2011 respectivamente.



En el caso de los coeficientes de infección no hubo diferencias significativas en los dos años evaluados, pero si hubo diferencias estadísticamente significativas con una ($P=0.05$) en las muestras control y las inoculadas (Figura 21c). En la Figura 22 se muestra el aspecto de las mazorcas colectadas a los diferentes tiempos de tratamiento, a los 21 ddi se puede observar que las mazorcas presentaron colonización de *A. flavus* y a los 49 ddi existió la máxima colonización. Para esta línea se obtuvieron coeficientes de correlación entre biomasa fungal y concentración de AFB1 de 0.3 Y 1 en 2010 Y 2011 respectivamente, esta diferencia entre replicas se debieron a que en el año 2010 la concentración de AFB1 aumento paralelamente al crecimiento a *A. flavus* sólo hasta los 21 ddi y a los 49 ddi los coeficientes de infección fueron menores en las muestras colectadas, pero la acumulación de AFB1 eran altas. Para el 2011 existió una correlación de 1. Pues la acumulación de AFB1 aumento paralelamente al crecimiento de *A. flavus*.



Línea de Maíz MS1

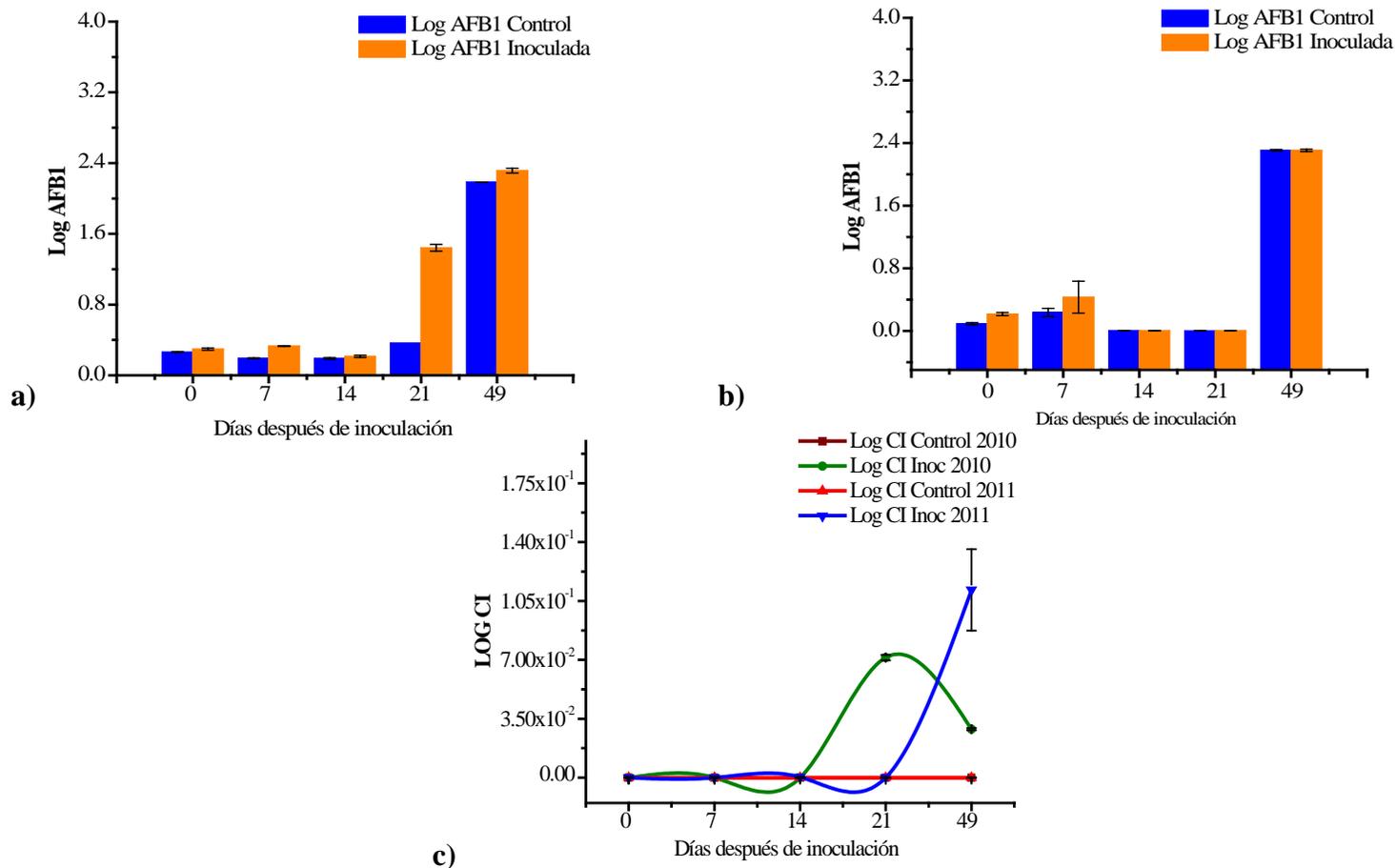


Figura 21. . Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y para 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MS1

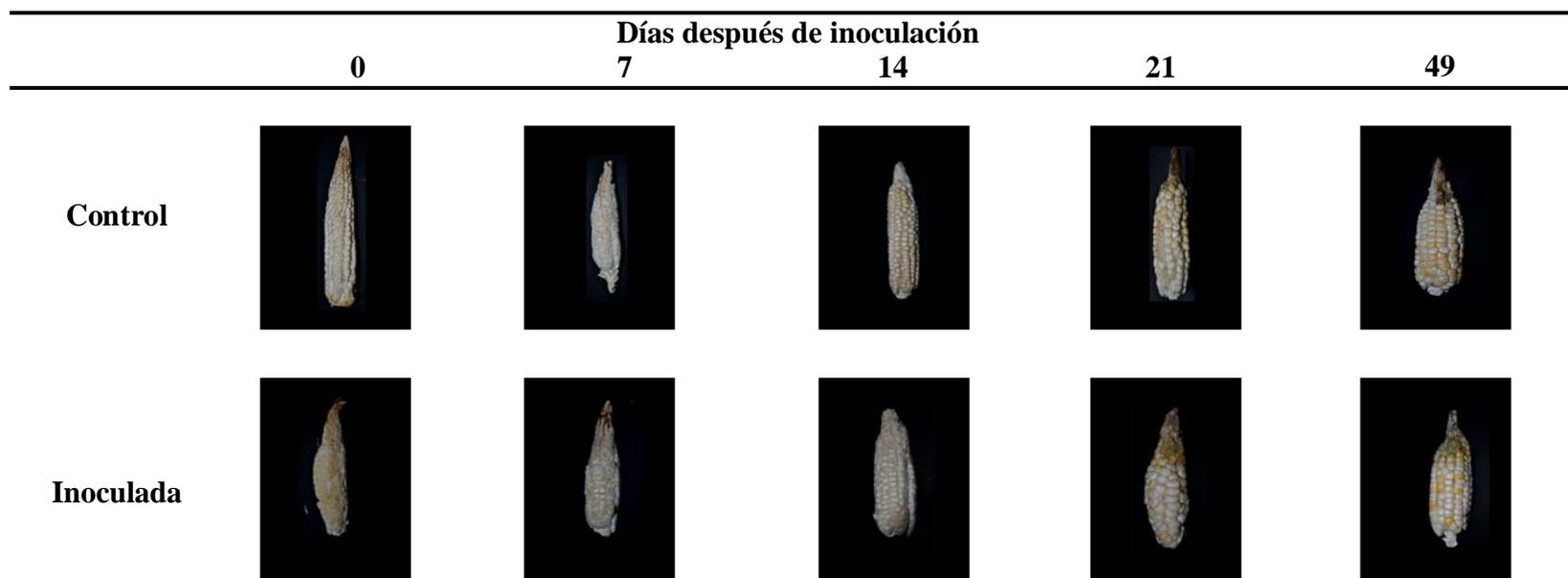


Figura 22. Patrón de infección en la línea de maíz MS1 en los diferentes días después de la inoculación



8.6.2 Línea de maíz MS2

En la figura 24 a y b se presentan las concentraciones de AFB1 para la línea de maíz MS2, estadísticamente para esta línea no hubo diferencias significativas para los años 2010 y 2011, en ambos casos la mayor acumulación se dio a los 49 ddi siendo aún mayor en el 2010. En la figura 23c se representan los coeficientes de infección, estadísticamente no existieron diferencias significativas ($P=0.05$) en los años evaluados sin embargo si se observó que en el año 2010 se presentó un promedio general más alto ($5.29E-03$) que en el 2011 ($3.73E-04$). Tampoco existieron diferencias significativas en los días después de la inoculación, pero se obtuvieron coeficientes de infección de 0.017 para 2010 y 0.0003 para 2011.

En la figura 24 se muestran imágenes de la secuencia de colonización de las mazorcas colectadas a los diferentes tiempos de tratamiento, en donde se observa que a los 14 días ya se presenta infección por *A.flavus*.

Los coeficiente de correlación obtenidos para esta línea fueron para 2010 de 0.21 y una correlación negativa en 2011 de -0.19. Esto sugiere que para esta línea de maíz no existió una correlación entre la biomasa fungal y la cantidad de toxina. Lo cual sugiere que es una línea susceptible a la acumulación de AFB1.



Línea de Maíz MS2

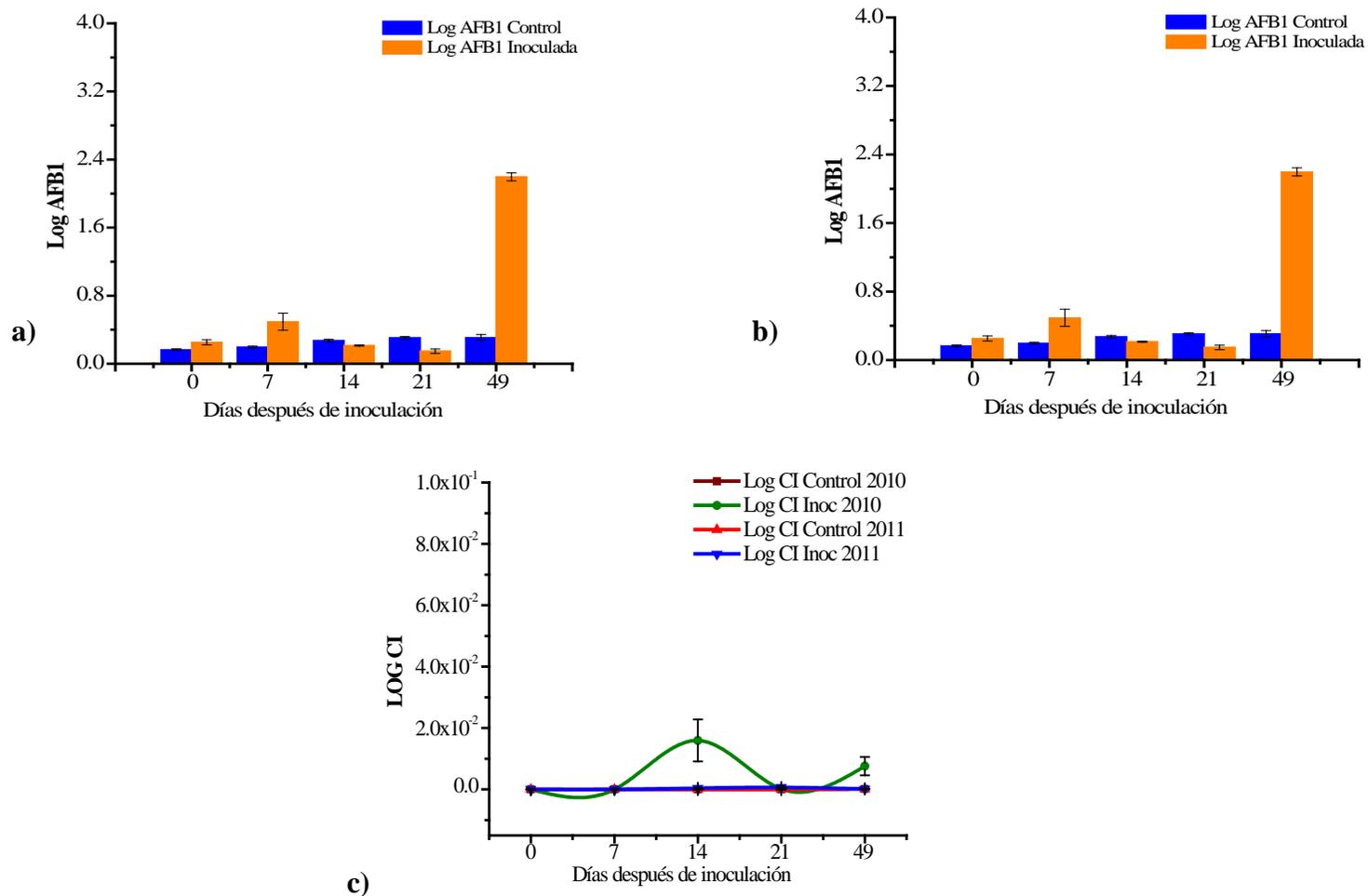


Figura 23. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y para 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MS2

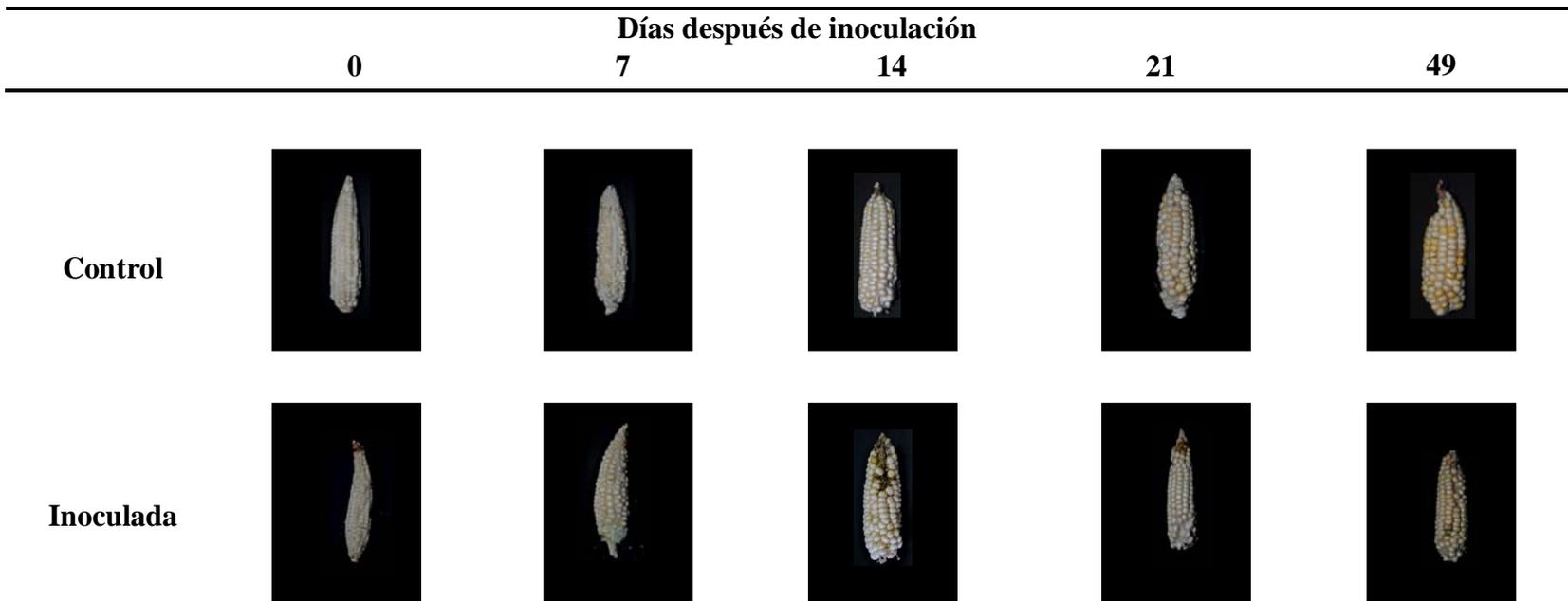


Figura 24. Patrón de infección en la línea de maíz MS2 en los diferentes días después de la inoculación



8.6.3 Línea de maíz MS3

La línea de maíz MS3 no presentó diferencias significativas para AFB1 en los dos años evaluados ($P=0.05$), sin embargo si hubo diferencias significativas para las muestras control y las inoculadas, es decir si hubo diferencias en las concentraciones de AFB1. En la Figura 25 a y b se presentan las concentraciones durante los días muestreados después de la infección. Se puede observar que la mayor concentración para los dos años evaluados se dio a los 49 ddi, incluso para el año 2011 se ve un aumento en la concentración de AFB1 que supera al de 2010 y se nota que el control de igual manera presenta altas concentraciones de AFB1. Estadísticamente la muestra a los 49 ddi fue diferente a los demás. Para los coeficientes de infección no existió diferencias significativas para el 2010 y 2011 ($P=0.05$) pero si se logra ver que este coeficiente aumentó a los 49 ddi (Figura 25 c).

En la Figura 26, se muestra el grado de colonización de *A.flavus* en los diferentes tiempos de colecta. Se puede observar que desde los 21 ddi ya hay colonización y que a los 49 días ya la colonización es más grande sobre del punto de donde fue inoculado.

Las correlaciones para esta línea indican que existe una alta relación entre la colonización y al producción de aflatoxina, pues para los dos años analizados se obtuvieron correlaciones de 1.



Línea de Maíz MS3

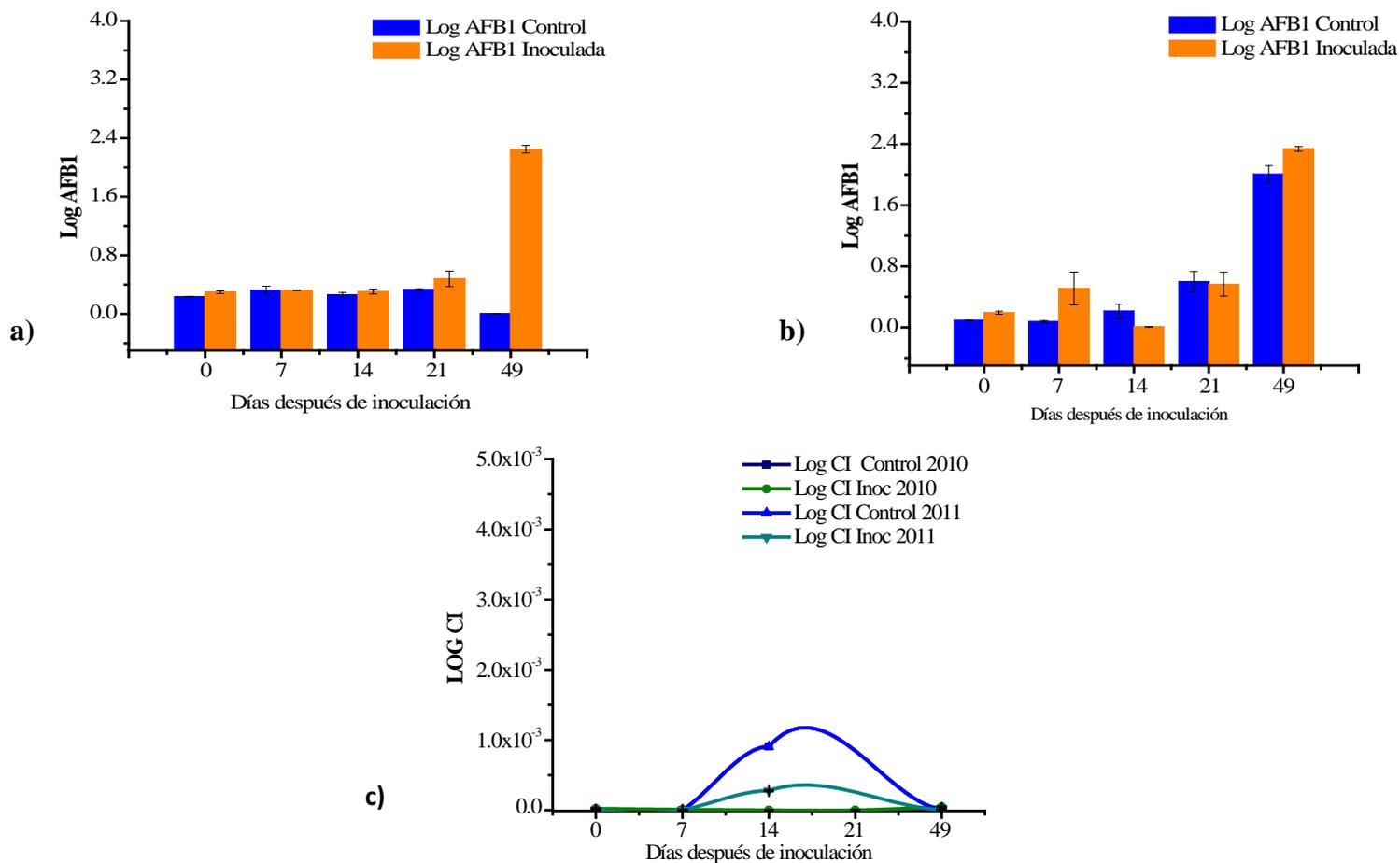


Figura 25. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y para 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MS3.

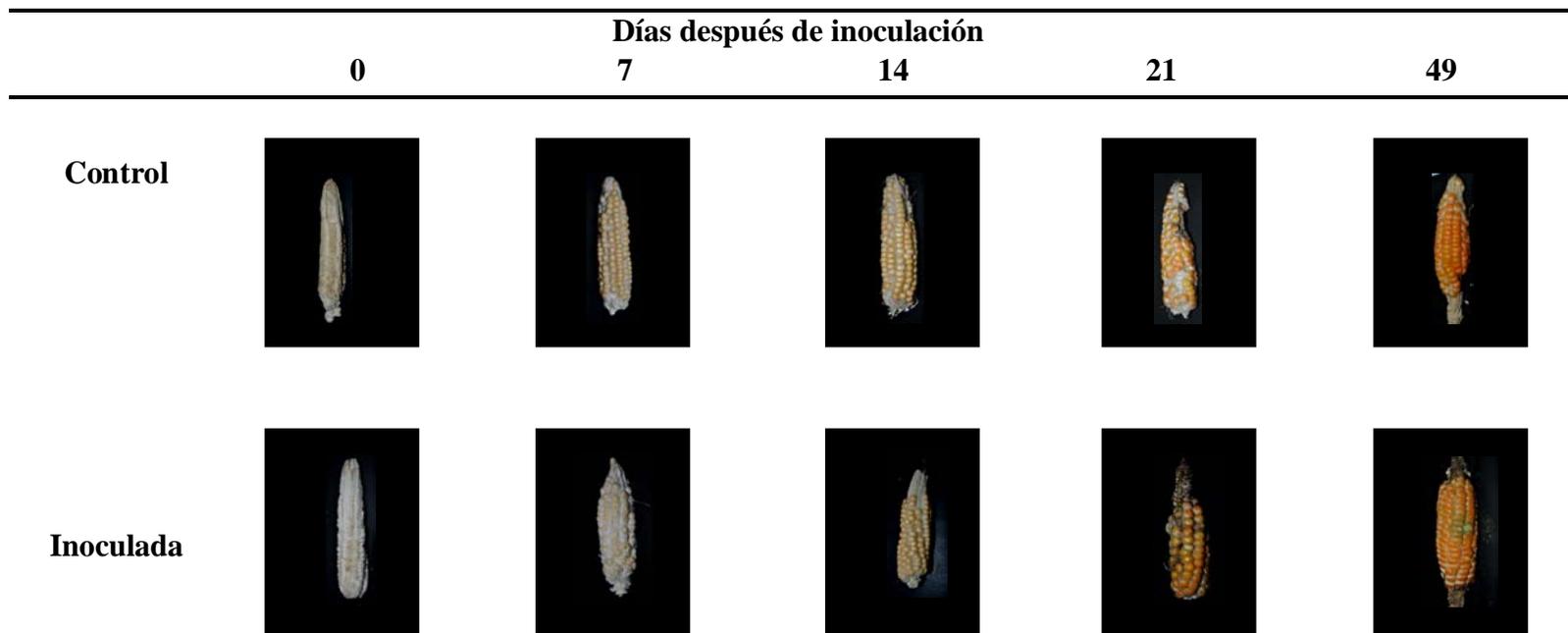


Figura 26. Patrón de infección en la línea de maíz MS2 en los diferentes días después de la inoculación



8.6.4 Línea de maíz MS4

Las concentraciones de AFB1 de la línea de maíz MS4 se muestran en la figura 27 a y b, estadísticamente si existió diferencias significativas ($P=0.05$) en los años 2010 y 2011 y se vio que para el primero hubo mayor acumulación de AFB1 a los 49 ddi de 188 ppb , incluso el control presentó acumulación de AFB1 de 27.32 ppb. Estadísticamente esta fecha de muestreo fue diferente del resto de los tiempos mostrados. Existió diferencias significativas en las muestras que fueron inoculadas y la que no fueron inoculadas. No se presenta los datos de la no inoculada para los 49 días por falta de muestras.

Para los coeficientes de infección no hubo diferencias significativas para los dos años evaluados (Figura 27c), es decir la infección de esta línea de maíz fue similar en un año que en otro (Figura 28). A los 49ddi se notaron diferencias estadísticas significativas respecto a los demás muestreos.

Los coeficientes de correlación para la biomasa fungal y la producción de AFB1 son altamente relacionados en dos años estudiados, ambos tuvieron un valor de 1.



Línea de maíz MS4

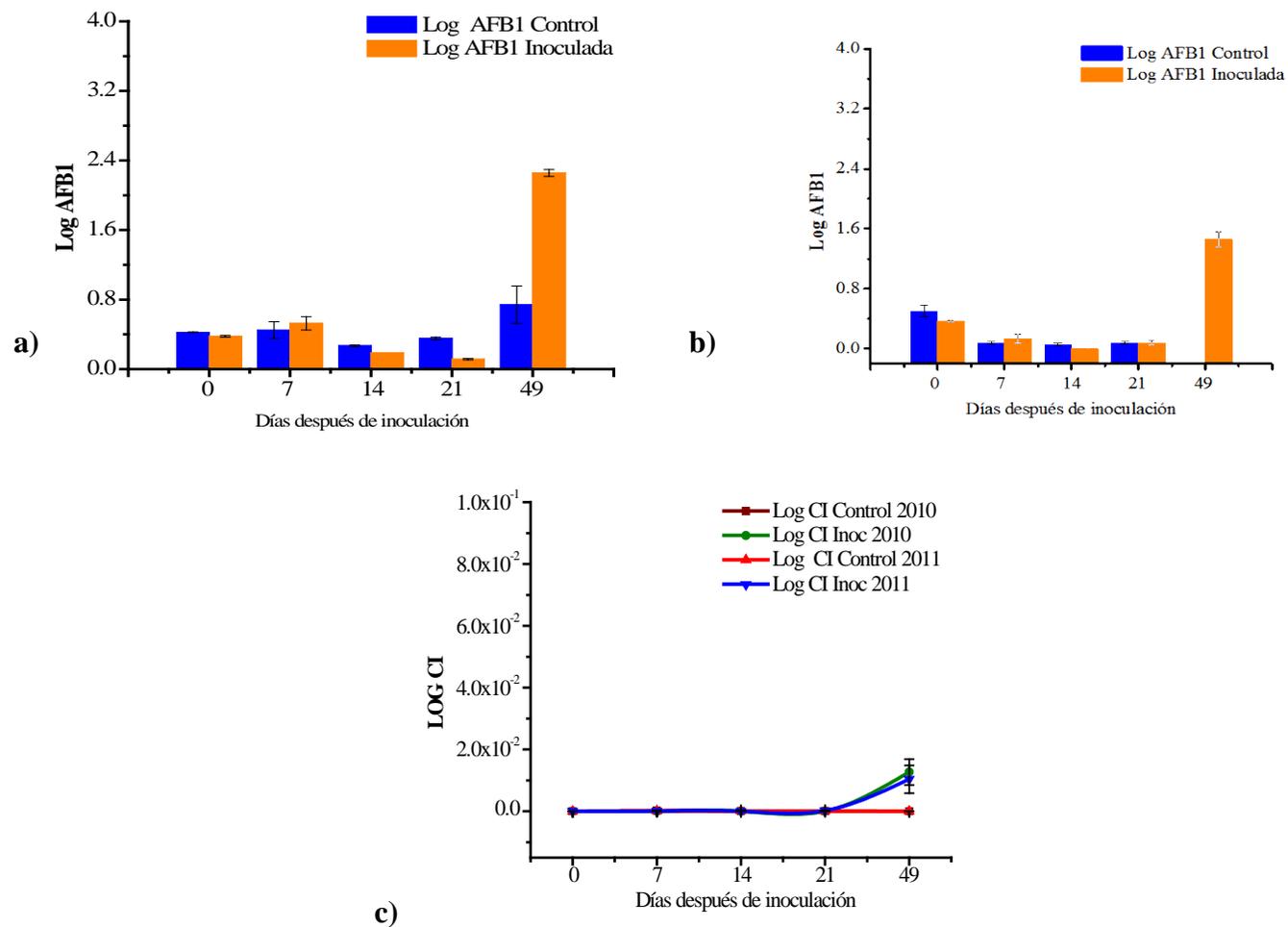


Figura 27. Concentraciones de AFB1 en el año 2010 (a) y para 2011 (b), Coeficientes de infección en 2010 y 2011 (c) en la línea de maíz resistente MS4

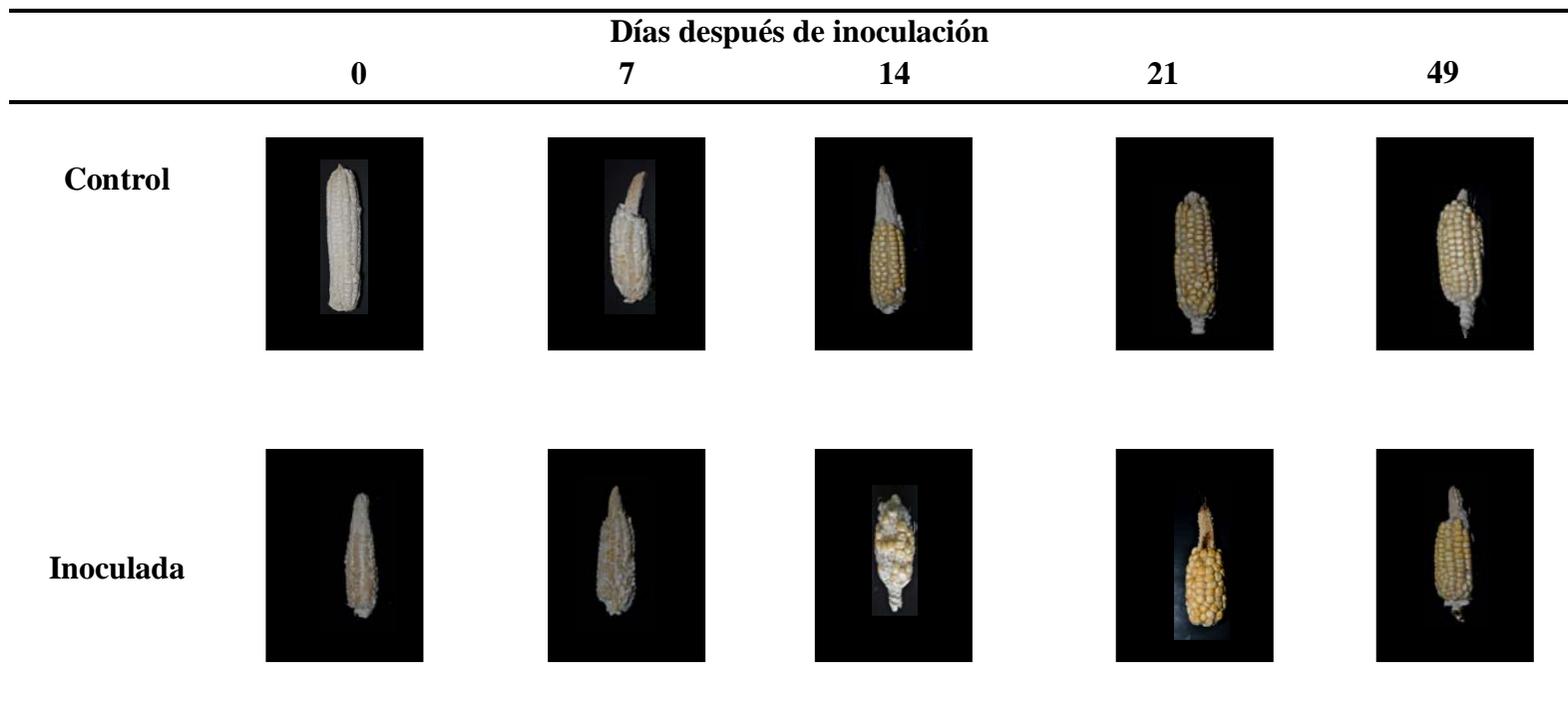


Figura 28. Patrón de infección en la línea de maíz MS4 en los diferentes días después de la inoculación

8.7 Comparación entre una línea de maíz altamente resistente y una línea altamente susceptible a la colonización de *A. flavus*

La comparación de las líneas MR1 y MS1 muestra claras diferencias en los coeficientes de infección y acumulación de aflatoxina B1, siendo el coeficiente de infección de 3×10^{-4} y 2.3×10^{-2} y acumulación de aflatoxinas máxima a los 49 ddi de 21.74 y 232 ppb para la línea MR1 y MS1 respectivamente (Figura 29). Los resultados anteriores parecieran demostrar una correlación directa de la resistencia a la colonización con la resistencia a la producción de aflatoxinas en los genotipos de maíz estudiados.

Por otra parte, la capacidad de *A. flavus* para colonizar el maíz y otros granos, puede estar relacionado con la capacidad que tiene este hongo para producir enzimas hidrolíticas entre ellas pectinasas, proteasas y amilasas, lo cual favorece la a invasión y la utilización del tejido de la planta hospedante (Cleveland et al 2004).

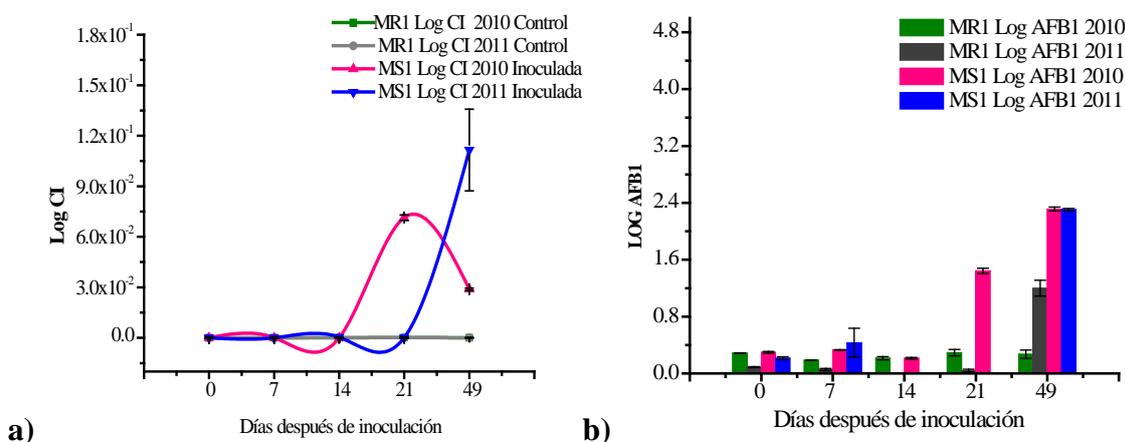


Figura 29. Comparación de AFB1 (A) y coeficiente de infección (B) entre la línea de maíz resistente MR1 y la línea susceptible MS1

8.8 Comparación tres genotipos altamente resistente y un genotipo altamente susceptible a la colonización de *A. flavus*

En la figura 30 se representa el comportamiento de la concentración de AFB1 a los 49 ddi de las líneas de maíz consideradas como resistentes (MR1, MR2, MR3) con una

línea muy susceptible (MS1) para los años analizados. Se observa que el patrón de coeficiente de infección y acumulación de aflatoxinas entre líneas y años se mantiene, aunque en el segundo año (2011) existió un ligero incremento en la producción de la toxina, pero este valor no superó las 30 ppb. Esto sugiere que existe una resistencia por parte de estos genotipos que se manifiesta en cada ciclo de cultivo.

Estudios han revelado que la resistencia de algunos genotipos ha sido asociada a los altos niveles de una proteína de 14 k-Da identificada como inhibidor de tripsina y se ha visto además que actúa como un antifúngico contra *A.flavus* pues inhibe la germinación de esporas del hongo y subsecuente crecimiento del hongo (Chen et al, 1999).

Moore et al, 2003, reportaron la determinación en granos de maíz dañados e infectados con *A. flavus*, de un par de quitinasas pCh2 y pCh11 las cuales actúan como antifúngicos. Estas enzimas fueron detectadas en la aleurona de los granos de maíz y su actividad parece incrementarse a los 36 días después de la polinización.

Otros estudios proteómicos indican la presencia de proteínas RAPs, aldooxidasa, glicoxalasa, PR, PER1 (peroxidasas), COR, inhibidor de tripsina en granos de maíz que fueron infectados con *A.flavus*. (Brown, 2010, Chen et al 2007).

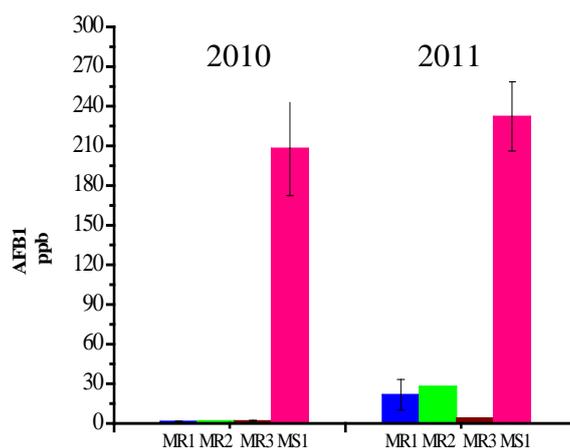


Figura 30. Comportamiento de las líneas resistentes respecto a una susceptible



8.8 Efecto de factores ambientales en la producción de AFB1 y colonización de *A. flavus*

La contaminación por aflatoxinas ha sido dividida en dos fases descrita por Cotty (2001), la primera durante el desarrollo del cultivo y la segunda después de la madurez. En ambas fases el clima tiene influencias. Algunos cultivos son resistentes a la infección a *Aspergillus flavus* y subsecuentemente a la contaminación con aflatoxinas a menos de que las condiciones ambientales favorezcan el crecimiento del hongo y con ello presenten contaminación. Estudios han descrito el rol de algunos daños por insecto que son importantes en la contaminación por aflatoxinas. Ni et al 2011 indican que granos dañados por insectos (como los gorgojos) influyen en la acumulación de aflatoxinas.

Con la finalidad de determinar el efecto de la temperatura y humedad relativa en el establecimiento y colonización del maíz por *A. flavus*, así como la acumulación de aflatoxinas, durante el presente experimento se monitoreó las temperaturas y humedad relativa en campo para los años 2010 y 2011. En la figura 31 se observa que a temperaturas superiores a los 24 °C y HR del 80% se presenta la mayor concentración de aflatoxinas. Así mismo se observa que existió una correlación entre la temperatura y la concentración de AFB1 con coeficiente de correlación entre AFB1 y temperatura cercanos a 1. Estos efectos son particularmente importantes en los genotipos susceptibles estudiados.

Se ha observado que la acumulación de aflatoxinas es paralelo al crecimiento de *A. flavus* cuando el régimen de temperatura es apropiado para la producción de aflatoxinas (20 a 27°C) (Abbas et al 2008) además acorde a Cotty & Garcia (2007) los cultivos de climas cálidos tienen mayor probabilidad de ser infectados por *Aspergillus flavus* y producir aflatoxinas. En algunas regiones la infección se produce cuando hay elevadas temperaturas y estrés por sequía. En estudios previos se ha visto que a temperaturas de 35°C y humedad relativa (HR) de 100% existe una mayor incidencia de *A. flavus* mientras que a 10°C y 30% de HR la incidencia es mínima (Gadgile & Chavan, 2010)

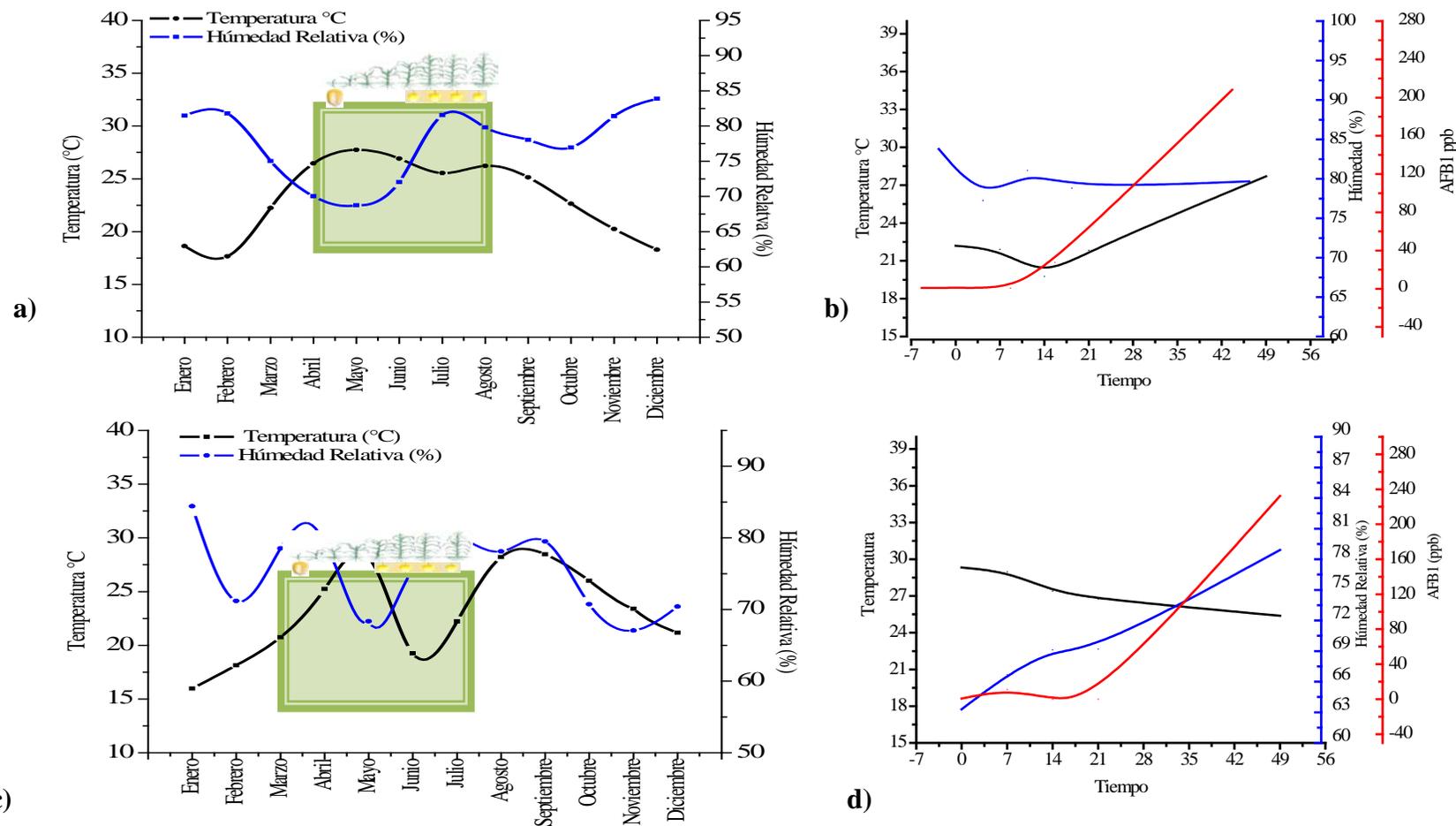


Figura 31. Temperaturas y Humedades Relativas durante la infección de *A.flavus* y maíz (*Zea mays* L) en el año 2010 (a y b) y 2011 (c y d) en estación Agua Fría, Poza Rica Veracruz.

8.9 Estudios de expresión de la ascorbato peroxidasa y glioxalasa mediante RT-PCR

Para la analizar la expresión de estas enzimas se eligieron únicamente una línea de maíz resistente (MR1) y una línea susceptible (MS1). Se monitorearon las enzimas únicamente a los 0, 7 14 ddi.

8.9.1 Extracción y tratamiento de ARN

La extracción de ARN de los granos infectado con *A. flavus* y los controles se obtuvo con el método reportado por Li y Trick (2005) con algunas modificaciones. En la Figura 32 se presenta la calidad de ARN de muestras obtenidas.

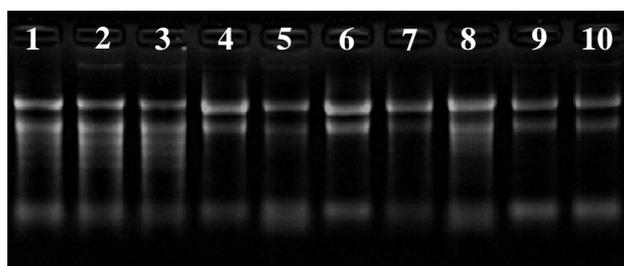


Figura 32. Electroforesis de RNA obtenido

8.9.2 Optimización de reacciones de RT-PCR

Para la optimización de las condiciones de RT-PCR para los iniciadores de Ascorbato peroxidasa, glioxalasa y el gen constitutivo GADPH. Se optimizó la temperatura de alineamiento y la concentración de $MgCl_2$ para cada uno de los iniciadores. En la Figura 33 se presenta la optimización GADPH, Ascorbato peroxidasa (APX) Figura 34 y Glioxalasa (GLX) Figura 35.

No. ciclos	Temperatura °C			
	60°C	61.8°C	64.2°C	65.5°C
35				
38				
40				

Figura 33. Optimización de GADPH.

No. Ciclos	Temperatura °C				
	53.1	54.3	57.4	59.4	61.3
35					
38					
40					

Figura 34. Optimización de APX

No. Ciclos	Temperatura °C			
	60°	61.8°	64.2°	65.5°
35				
38				
40				

Figura 35. Optimización de GLX

Se eligieron 38 ciclos y una temperatura de alineamiento de 60°C para todos los iniciadores.



A continuación se presentan los niveles de expresión de una planta control resistente y una susceptible en cuanto a la expresión de APX y GLX.

8.9.3 Estudios de expresión de glioxalasa y ascorbato peroxidasa durante el proceso de infección del maíz por *A. flavus*

En la Figura 36 se presenta el producto de PCR obtenido de una ascorbato peroxidasa citosólica monitoreada 0, 7 Y 14 ddi en una línea de maíz resistente y susceptible. En la línea MR1 a los 0 ddi se puede observar que existió una mayor expresión de APX bajo la probable inducción por *A. flavus*, pues se observó que la expresión respecto al control y al constitutivo fue de 2.8 veces más. Se han reportado diversos sistemas de eliminación de ROS que incluyen a la enzima la ascorbato peroxidasa (Mittler et al 2004; Noctor et al 1998) ésta es importante para mantener el ROS generado como respuesta a un patógeno (Torres et al 2006)

Como se puede observar en la Figura 37 que en una línea susceptibles igual existe expresión de APX a los 0 ddi, pero la expresión comparada con la línea resistentes es menor pues sólo es de 1.6 veces

A los 7 y 14 ddi se observa en la línea resistente tiene menor expresión de 0 y 0.3 respectivamente, incluso las líneas susceptibles presentan expresión de 0.1 a los 7 ddi y a los 14 ddi ya no hay expresión. La ascorbato peroxidasa que se estudio en el presente trabajo es una ascorbato peroxidasa citosólica, en plantas se ha visto que enzimas de APX que son importantes en prevenir el estado oxidativo (Shigeoka et al 2002). Y en maíz existen al menos siete APX 1.1 APX1.2, APX 2 (Citosólica), AXP3, APX4, APX5, APX6, APX7 cada una puede estar en diferentes compartimentos celulares como citosol, mitocondria, peroxisoma y cloroplastos (Yun et al 2012). Además la participación de ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasas, glutatión peroxidasa y peroxiredoxina ayudan a mantener el estado oxidativo en diferentes compartimentos celulares (Mittler et al 2004)



Otra enzima importante y que se ha visto que interviene en mantener el estado oxidativo es Cat3 (Catalasa 3) pues reporte de Magabanua et al 2007 indican que en embriones de líneas de maíz resistente presenta mayor actividad

Para la glioxalasa no se observo que existiera una mayor expresión génica en los primeros estadios de desarrollo del maíz, a los 0 ddi su expresión fue de 1.2 veces mayor que la expresión de el constitutivo. Posteriormente a los 7 no hubo expresión pero y 14 ddi su expresión disminuyo a 0.8 respectivamente. En la línea susceptible su expresión a los 0 ddi fue de 0, para 7 ddi de 1 y a los 14 ddi de 0.8. Se ha reportado que en líneas de maíz resistentes contenían mayor actividad de una glioxalasa comparada con líneas susceptibles, a demás se observo que durante la infección con *A. flavus* se produce niveles significativos de metilglioxal éste es un inductor aflatoxinas a través de la estimulación del gen regulador *aflR*. El estudio sugiere que la glioxalasa contribuye a mantener la concentración de metilglioxal en el grano de maíz el cual a su vez contribuye a la reducción de las aflatoxinas (Chen et al, 2004)

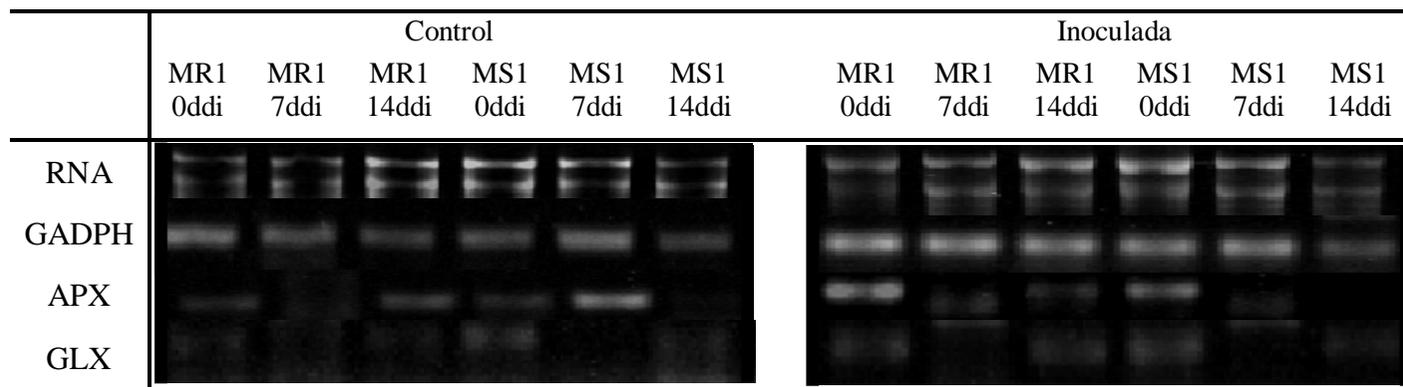


Figura 36. Expresión de APX y GLX en MR1 y MS1 después de la infección con *A. flavus*

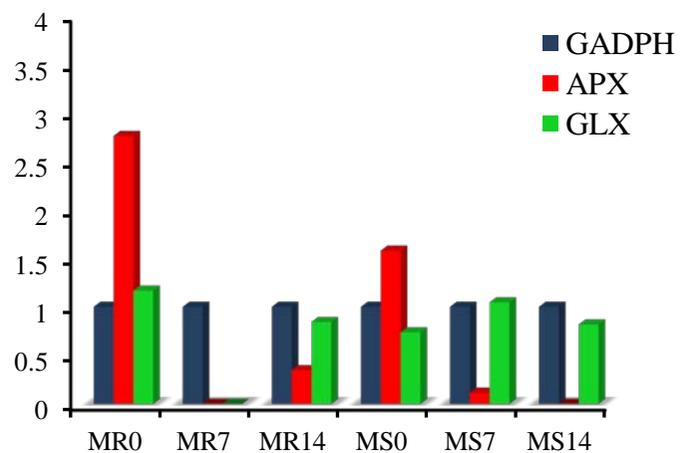


Figura 37. Niveles de expresión de APX y GLX en MR1 y MR2 en 0, 7 y 14 días después de inoculación con *A. flavus*



10. CONCLUSIONES

- Las líneas MR1, MR2 y MR3 presentan mayor resistencia a la producción de aflatoxinas y a la colonización de *A.flavus*. y no presentaron diferencias estadísticas durante los dos años evaluados (2010 y 2011)
- Las líneas MS1,MS3 Y MS4, presentan mayor susceptibilidad a la producción de aflatoxinas. .y a la colonización por *A. flavus*.
- La línea MS1 es la más susceptible a la producción de aflatoxinas y a la colonización por *A. flavus*.
- La línea MS3 sugiere ser susceptible a la producción de aflatoxinas pero no a la colonización por *A. flavus*.
- Existe una mayor expresión de APX a los Oddi en la línea de maíz MR1 inoculada con *A. flavus* y bajo condiciones de campo ,
- No hubo sobre expresión de GLX en la línea de maíz MR1 y MS1 inoculadas con *A.flavus* y evaluadas en campo.



11. BIBLIOGRAFIA

Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Bruns, H.A. 2008. Modelling the colonisation of maize by toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strain: implications for biological control. *World Mycotoxin Journal* 3: 333-340.

Alvarez B. M.T., Carvajal M.M., Ruisanchez P.N., Rojo. F. 2000. Aductos DNA-aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Revista Cubana Oncología* 16(1):35-9

Arrieta, K., Salazar, C., Ocampo, O. R., Villareal, N. 2007. Enfermedades patogénicas en los híbridos de maíz (*Zea mays*) en el medio y bajo Sinú del departamento de Córdoba. *Temas Agrarios*. 12 (1): 58-69.

AOAC Official Method 970.44. Preparation of standards for mycotoxins. Thin layer chromatographic-spectrometric methods- (1995). *Natural toxins* 49:52

Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Cleveland, T. E., Cary, J.W. 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology Biotechnology* 61 (2): 83-93.

Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Yu, J., Cleveland, T. E. 2006. Understanding the genetic of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development . *Mycopathology* . 162 : 155-166

Beers, E.P., McDowell, J.M. 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion Plant Biology* 4: 561–567

Bennetzen, J.L & Hake, S.C.(eds); Balint-Kurti, P.J. & Johal G.S. 2009. Maize disease resistance. *Handbook of maize: its biology*. Springer Science 229-250 p.



Boswell, G.P., Jacobs, H., Ritz, K., Gadd, G.M., Davidson, F. A. 2007. The development of fungal networks in complex environments. *Bulletin of Mathematical Biology*. 69: 605-634.

Bollwel, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., Zimmerlin, A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23: 517-532.

Bowles, D.J. 1993. Local and systemic signals in the wound response. *Semin. Cell Biology* 4: 103–111.

Brooks, D.T., Williams, W.P., Windham, G. L., Willcox, M.C., Abbas, H.K. 2005. Quantitative trait loci contributing resistance to aflatoxin accumulation in the maize inbred Mp313E. *Crop Science* 45 :171-175.

Brown, R.L., Chen, Z.-Y., Cleveland, T.E., Russion, J.S. 1998. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 89 (2): 113- 117.

Brown, R.L., Cleveland, T.E. Payne, G.A., Woloshuk, c.P., Campbell,K.M., White, D.G. 1993. Living maize accumulation of aflatoxin in maize kernels. *J. Food Protection* 56: 967- 971.

Brown, R.L., Chen,Z.-Y., Waburton, M., Luo, M., Menkir, A., Fakhoury, A., Bhatnagar D., 2010. Discovery and characterization of proteins associated with aflatoxina-resistance: Evaluating their potential as breeding markers, *Toxins* 2; 919.933

Brown, I, Trethowan, J, Kerry, M, Mansfield, JW, Bolwell, GP (1998) Location of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant Journal* 15: 333–343



Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jone, R.L. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 21.

Buckler, S.E., Gaut, S.B., McMullen D.M. 2006. Molecular and functional diversity of maize. *Plant Biology* 9: 172-176.

Busboom, K.N., White, D. G. 2004. Inheritance of resistance to aflatoxin production and *Aspergillus* ear rot of corn from the cross of inbreds B73 and Oh516. *Phytopathology* 10: 1107-1115

Cary, JW, Linz, JE, Bhatnagar, D. 2000. Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Technomic, Lancaster, Pa., pp 317–361

Chen, Z.Y., Brown, R.L., Lax, A.R., Cleveland, T. E., Russin, J.S. 1999. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli* *Applied Environment Microbiology*. 65: 1320-1324.

Cleveland, T.E., Yu, J., Bhatnagar, D., Chen, Y.Z., Brown, R.L., Chang, K.P., Cary, J.W., 2004. Elucidation the molecular basis of the host plant *Aspergillus flavus* interaction, a basis for devising strategies to reduce aflatoxin contamination in crops. *Journal of Toxicology* 23 ; 345-380.

Cleveland, T. E., McCormick, S. P., 1987. Identification of pectinases produced in cotton bolls infected with *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 77: 1498-1503.

Cleveland, T.E., Cotty, P.J. 1991. Invasiveness of *Aspergillus flavus* isolate in wounded cotton bolls is associated with production of a specific fungal polygalacturonase. *Phytopathology* 81: 155-158.

Collinge, DB;Gregersen,P;Thordal-Christensen, H.1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *In Mechanisms of plant growth and*



improved productivity, Modern approaches. Basra,AS. Ed.New York, Marcel Dekker.p. 391-433.

Coll A., Nadal A., Palaudelma`s M., Messenguer J., Melé E., Puigdome`nech P., Pla M. 2008. Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. *Plant Mol Biol.* 68:105–117

Collins, NC, Thordal-Christensen, H, Lipka, V, Bau, S, Kombrink, E, Qiu, JL, Huckelhoven, R, Stein, M, Freialdenhoven, A, Somerville, S.C. 2003 SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973–977

Chen, Z-Y.,Brown, R.L., Damman, K.E., Cleveland, T.E. 2002. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxina accumulation. *Phytopathology.* 94: 938 - 945.

Chen, Z-Y.,Brown, R.L., Damman, K.E., Cleveland, T.E. 2004. Identification of a maize kernel endosperm protein associated with resistance to aflatoxina contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology.* 97: 1094 - 1103.

Chen, Z-Y.,Brown, R.L., Rajasekaran, K., Damman, K.E., Cleveland, T.E. 2006. Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxina production. *Phytopathology.* 96: 87-95.

Chen, W.Q., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G.Z., Whitham, S.A. 2002. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559–574

Dangl, J.L., Jones, J.D.G. 2001.Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Review. *Nature.* 411: 826-833.



Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shenggiang, Z., Oliver, J.D., Coutu, J., Shualev, V., Shualev, K., Mittler, R. 2004. Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of Arabidopsis. *Plant Cell*. 17: 268-281.

De Wit, P. J. G. M. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science* 2: 452 - 458.

Diario Oficial de la Federación. 2002. Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para el consume humano y animal. Especificaciones sanitarias. Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSAI-2002) México, DF.

Ehrlich C.K., Wei Q., Brown R.L., Bhatnagar D. (2011). Inverse correlation of ability to produce aflatoxina and *Aspergillus* colonization of maize seed. *Food and Nutrition Science*, 2,486-489

FAOSTAT Producción. País por producto. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Gadgi, D.P., Chavan, A.M., 2010. Impact of temperature and relative humidity on development Of *aspergillus flavus* rot of mango fruit. *Recent Research in Science and Technology* 2010, 2(3): 48-9

Garcia, L.C., Hervas, A. Navas, C.J., Jiménez, D. R.M., Tena, M., 2002. Induction of antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L) and *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61; 325-337.

Groopman, J. D., and Kensler, T. W. 2005. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer. *Toxicol. Applied Pharmacology*. 206, 131-137.

Govrin, E, Levine, A 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757



Guo, B.Z.; Russin, J.S.; Cleveland, T.E.; Brown, R.L.; Widstrom, N.W. 1996 Resistance to aflatoxin contamination in corn as influenced by relative humidity and kernel germination. *Journal Food Protection*, 59, 276–281.

Guzmán, de P.D., Peña, C. J.J. 2005. Regulatory considerations of aflatoxina contamination of food in Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47 (3-4): 160-164

Huckelhoven, R, Kogel, K-H 2003. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Plant* 216: 891–902

Jameson, P. E. 2000. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions: an overview. *Plant Growth Regul* 32: 369–380

Jiang, T., Zhou, B., Luo, M., Abbas, H.K., Kemerait, R., Dewey, L.R., Scully, T.B., Guo B. 2011. Expression analysis of stress-related genes in kernels of different maize (*Zea mays* L) inbred lines with different resistance to aflatoxina contamination. *Toxins*. 3: 538-550.

Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, 2000 Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natural Academy Science USA* 97:8849–8855

Korves, M.T., Bergelson, J. 2003. A developmental response to pathogen infection in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 133: 330-347.

Kumeda, Y., Asao, T. 1996. Single strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA transcribed spacers to different species of *Aspergillus* section Flavi. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2947-2952.



Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.J. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593

Li, Z., Trick H.N. 2005. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *BioTechniques* 38:872-876

Madriz, O.K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta- patógeno. *Manejo integrado de plagas* 63: 22-32.

Machida, M., Gomi, K. 2010. *Aspergillus*; Molecular Biology and Genomics. Caster Academic Press. Norfolk, UK: 157- 163 p.

Mellersh, D. G., Foulds I.V., Higgins V.J., Heath V.C.2002. H₂O₂ play different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interaction. *Plant Journal* 29: 257-268.

Mellon, J. E., Cotty, P.J., Down, M.K. 2000. Influence of lipid with and without other cottonseed reserve materials on aflatoxin B(1) production by *Aspergillus flavus* *Journal Agricole Food Chemistry*, 50: 648-652.

Mellon, J.E., Dowd, M.K., Cotty, P.J., 2002. Time course study of substrate utilization by *Aspergillus flavus* in medium simulating corn (*Zea mays*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 648–652.

Mideros, S. X., Windham, G. L., Williams, W. P., and Nelson, R. J. 2009. *Aspergillus flavus* biomass in maize estimated by quantitative real-time polymerase chain reaction is strongly correlated with aflatoxin concentration. *Plant Dis.* 93:1163-1170.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 9: 405-410



Mittler, R, Vanderauwera, S, Gollery, M, Van, B.F. 2004 Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498

Montillet, J.L, Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F., Triantaphylides, C .2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* 138: 1516–1526

Moore, G.K., Price, S.M., Boston, S.R., Weissinger, K.A., Payne, A.G. 2003. A chitinase from Tex6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*. 94: 82-87.

Murray, R. P, Rosenthal, S.K., Pfaller, A. M. 2006 *Microbiología Médica*. ELSEVIER. 5ta Ed. Barcelona, España. 812-814

Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion Plant Biology*. 5: 388–395

Noctor, G. & Foyer, C.H. 1998 Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 49, 249–279

Paliwal, L.R., Granados G., Lafitte R.H., Violic D.A. 2001. El maíz en los trópicos mejoramiento y producción. *Producción y protección vegetal. Colección FAO No.28*. Organización De las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 61-80 p.

Paul, C., Naidoo,G., Forbes, A., Mikkilineni, V. 2003.Quantitative trait loci for low aflatoxin production in two related maize population. *Theoretical Applied Genetics* 107: 203-270.

Programa de Maíz de CIMMYT. 2004. *Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo*. 4^{ta} Edición.México, D.F.: CIMMYT.



Rajasekara, K., Cary, J.K., Cotty P.J., Cleveland T.E. Development of a GFP-Expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. *Mycopathologia*. 165: 89-97.

Ramakrishna, N., & Mehan, V.K. (1993). Direct and indirect competitive monoclonal antibody- based ELISA of aflatoxin B1 in groundnut. *Micotoxins Research* 9(1): 53-63.

Robertson, -Hoyt, L.A., Betrán,J., Payne, G.A., White, D.G., Iskaeit, T., Maragos, C.M., Molnár T.L., Holland, J.B. 2007. Relationships among resistance to *Fusarium* and *Aspergillus* ear rots and contamination by Fumonisin and Aflatoxin in maize. *Phytopatology* 9(3); 311-317

Santos, O. 1995 . Aflatoxins, an overview. Thesis, Food Science Department, University of Minnesota: 1-32

Sasaki, K., Iwai, T., Hiraga, S., Kuroda, K., Seo, S., Mitsuhara, I., Miyasaka, A., Iwano, M., Ito, H., Matsui, H., 2004. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant Cell Physiology* 45: 1442–1452

Scheidegger, K.A. & Payne, G.A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 22(2-3): 423-459.

Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. Producción de maíz, 2009. Disponible en: www.siap.gob.mx

Skriver, K., Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503–512.

Smart, M.G., Wicklow, D. T., Caldwell, R. W.(1990). Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: light microscopy of fungal spread from wounds. *Phytopathology* 80:1287-1294.



Soriano, C. J.M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Díaz de Santos. 1ra. E. España. 424 p.

Torres, M.A., Jones, D.G.J., Dangl, L.J. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology* 141: 373-378.

Van, B.F., Villarroel, R., Van, M.M., Izné, D. 1995. Ascorbate peroxidase cDNA from maize. *Plant Physiology* 107: 649-650.

Wang, J.S, Gropman, J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* 1999;424(1-2):167-81

Wang, K.L.C., Li, H, Ecker, J.R.2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: S131–S151

White, D., 2004. Plagas y enfermedades del maíz. 3^{ra}. Edición. Mundi Prensa. España: 1-10 p.

Yu, J., Bhatnagar, D., Ehrlich C. K .2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19:191-200

Yun, J. L., , Yuan, Y., Yan-Y.L., Liua, Yan,L., , Jun,J. F.,, Jun, Z., Guo Y. W. 2012. Gene families of maize glutathione–ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. *Journal Plant Physiology* 169 (2012) 183– 192



12. ANEXOS

ANEXO 1 . Preparación de Reactivos para ELISA

Preparación de buffer de Carbonato 1X: Se pesó 1.5 g de Carbonato de sodio (Na_2CO_3), 2.93 g de Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se mezcló con 1L de H_2O destilada.

Preparación de solución stock del conjugado.- Se pesó 0.6 mg de conjugado de aflatoxina AFB1-BSA de *Aspergillus flavus* A6655-5M SIGMA y se añadió 0.5 ml de agua destilada estéril y 0.5 ml de PBS, esta solución se almacenó a una temperatura de -4°C (AOAC, 1995).

Preparación de la solución PBS - Tween 10X; Se disolvieron 23.8 g de fosfato de sodio (NaHPO_4), 4 g de cloruro de potasio (KCl), 4 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 160 g de cloruro de Sodio (NaCl), 5 ml de tween-20 en 2L de agua destilada. Se tomó 1L de ésta solución y se diluyó en 9L de H_2O para obtener una solución 1X que fue usada posteriormente.

Preparación del estándar AFB1 ($10 \mu\text{g/ml}$). -Se pesó 0.2 mg de aflatoxin AFB1 de *Aspergillus flavus* (SIGMA) y se disolvió en 10 ml de metanol (grado espectrofotométrico). Se midió la absorbancia de la solución a 360 nm, en un espectrofotómetro Thermo-Electron Multiscan EX, posteriormente se ajustó la concentración a 10 mg/ml y se guardó a -4°C .

Preparación de solución de dietanolamina al 10%.- Se mezclaron 30 ml de dietanolamina grado 98.0% (SIGMA) con 270 ml de H_2O y posteriormente se ajustó a pH 8 con ácido clorhídrico.

ANEXO 2 . Medio GYEP (Kumeda & Asao, 1996)

El medio contiene lo siguiente:

Componente	Peso (g)
Glucosa (2%)	10
Extracto de levadura (0.3%)	1.5
Peptona (1%)	5



Todo se mezcló con 500 ml de H₂O desionizada y se esterilizó con autoclave por 20 minutos.

ANEXO 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %

Para la preparación del gel de agarosa al 0.8%; se pesaron 0.28 de agarosa y me mezcló en 35 ml de TAE 1X y se le adicióno 3 µl de bromuro de etidio.

En el gel de agarosa se depositaron en el primer pozo 1.5 µl de marcador de peso molecular de 1000 kb y en los siguientes 5µl de DNA más 1.5 µl de Buffer de carga y se corrió en la cámara de electroforesis por 1 hora, posteriormente se llevó al Transluminador UV y se tomó una fotografía para observar las bandas originadas.

Gel de agarosa/formaldehido

Para su preparación se disolvieron 0.6 gr de Agarosa en 30 ml de H₂O (DEPC), posteriormente se adicionó 4 ml de MOPS 10X y posteriormente adicionar 6 ml de formaldehido y 1 µl de Bromuro de Etidio.

ANEXO 4. Evaluación de la concentración de AFB1 en doce líneas de maíz

GENEALOGÍA	Concentración AFB1 21ddi (ppb)	Concentración de AFB1 49ddi (ppb)
MR2	0.28 ^a	2.06 ^a
MR3	0.34 ^a	2.07 ^a
MR1	1.08 ^a	3.50 ^a
MR4	0.28 ^a	10.9 ^{ba}
MS6	0.35 ^a	77.10 ^{abc}
MS7	1.07 ^a	78.23 ^{abc}
MS3	0.43 ^a	167.11 ^{abc}
MS5	2.76 ^a	169.43 ^{abc}
MS4	0.30 ^a	188.43 ^{ac}
MS2	3.22 ^a	189.20 ^{ac}
MS8	0.54 ^a	205.25 ^c
MS1	27.59 ^b	208.15 ^c



ANEXO 5. Concentraciones de AFB1 en líneas de maíz resistentes obtenidos por la método ELISA indirecto competitivo

Concentraciones de AFB1 en líneas de maíz resistentes (Control e Inoculadas) obtenidos por la método ELISA indirecto competitivo

Días después de inoculación	2010 Control			2011 Control			2010 Inoculada			2011 Inoculada		
	MR1	MR2	MR3	MR1	MR2	MR3	MR1	MR2	MR3	MR1	MR2	MR3
	AFB1 (ng/g)			AFB1 (ng/g)			AFB1 (ng/g)			AFB1 (ng/g)		
0	1.04 ^{ce}	0.85 ^{ce}	0.79 ^{ce}	0.45 ^{ce}	0.37 ^{de}	0.28 ^{de}	0.9 ^{ce}	1.07 ^{ce}	1.31 ^{ce}	0.23 ^{ce}	0.40 ^{de}	0.22 ^{de}
7	0.50 ^{ce}	0.68 ^{ce}	0.97 ^{ce}	0.05 ^{ce}	0.24 ^{de}	0.30 ^{de}	0.54 ^{ce}	2.34 ^{ce}	2.09 ^{ce}	0.14 ^{ce}	0.17 ^{de}	0.01 ^{de}
14	0.80 ^{ce}	0.44 ^{ce}	0.53 ^{ce}	0.001 ^{ce}	0.001 ^{de}	0.72 ^{de}	0.66 ^{ce}	2.13 ^{ce}	1.88 ^{ce}	0.004 ^{ce}	0.01 ^{de}	0.003 ^{de}
21	0.86 ^{ce}	0.65 ^{ce}	1.31 ^{ce}	0.24 ^{ce}	0.0004 ^{de}	-	1.08 ^{ce}	0.28 ^{ce}	0.34 ^{ce}	0.11 ^{ce}	0.29 ^{de}	-
49	0.16 ^{ce}	0.50 ^{ce}	0.85 ^{ce}	0.21 ^{ce}	0.04 ^{de}	-	1.56 ^{cf}	2.08 ^{cf}	2.07 ^{cf}	0.11 ^{ce}	28.07 ^{df}	4.21 ^{df}

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con Tukey ($\alpha, 0.05$)



Concentraciones de AFB1 en líneas de maíz susceptibles (Control) obtenidos por la método ELISA indirecto competitivo

Días después de inoculación	2010				2011			
	MS1	MS2	MS3	MS4	MS1	MS2	MS3	MS4
	AFB1 (ng/g)				AFB1 (ng/g)			
0	0.83 ^{ce}	0.71 ^{ce}	0.47 ^{ce}	1.65 ^{ce}	0.21 ^{de}	0.23 ^{ce}	2.81 ^{ce}	2.67 ^{de}
7	0.56 ^{ce}	1.24 ^{ce}	0.58 ^{ce}	2.39 ^{ce}	0.14 ^{de}	0.19 ^{ce}	0.01 ^{ce}	0.21 ^{de}
14	0.55 ^{ce}	0.88 ^{ce}	0.88 ^{ce}	0.86 ^{ce}	0.00 ^{de}	1.10 ^{ce}	0.002 ^{ce}	0.14 ^{de}
21	1.32 ^{ce}	1.16 ^{ce}	1.03 ^{ce}	1.27 ^{ce}	0.0003 ^{de}	5.83 ^{ce}	0.14 ^{ce}	0.20 ^{de}
49	152.00 ^{cf}	6.17 ^{cf}	1.11 ^{ce}	27.32 ^{ce}	202.4 ^{df}	131.87 ^{cf}	82.26 ^{cf}	-

Días después de inoculación (ddi)

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con prueba de Tukey ($\alpha, 0.05$)



Concentraciones de AFB1 en líneas de maíz susceptibles (Inoculadas) obtenidos por la método ELISA indirecto competitivo

Días después de inoculación	2010				2011			
	Inoculada				Inoculada			
	MS1	MS2	MS3	MS4	MS1	MS2	MS3	MS4
	AFB1 (ng/g)				AFB1 (ng/g)			
0	0.99 ^{ce}	0.99 ^{ce}	0.83 ^{ce}	1.39 ^{ce}	0.66 ^{de}	0.57 ^{ce}	0.351 ^{ce}	1.09 ^{de}
7	1.14 ^{ce}	1.10 ^{ce}	3.21 ^{ce}	9.26 ^{c2}	11.06 ^{de}	10.2 ^{ce}	0.68 ^{ce}	0.73 ^{de}
14	0.64 ^{ce}	1.09 ^{ce}	0.63 ^{ce}	0.54 ^{ce}	0.0004 ^{de}	0.01 ^{ce}	0.04 ^{ce}	0.02 ^{de}
21	27.59 ^{ce}	3.23 ^{ce}	0.43 ^{ce}	0.30 ^{ce}	0.001 ^{de}	5.92 ^{ce}	2.69 ^{ce}	0.89 ^{de}
49	208.14 ^{cf}	189.20 ^{cf}	167.10 ^{cf}	188.40 ^{cf}	232.3 ^{df}	222.08 ^{cf}	227.50 ^{cf}	57.31 ^{df}

Días después de inoculación (ddi)

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con prueba de Tukey ($\alpha, 0.05$)



ANEXO 6. Coeficientes de infección de líneas de maíz resistentes obtenidos por qPCR

Coeficientes de infección de líneas de maíz resistentes (Control) obtenidos por qPCR

Días después de inoculación	2010			2011		
	MR1	Control MR2 CI	MR3	MR1	Control MR2 CI	MR3
0	2.57E-06 ^{ce}	2.64E-06 ^{ce}	1.77E-06 ^{ce}	2.37E-06 ^{ce}	1.37E-05 ^{ce}	6.34E-06 ^{de}
7	1.42E-06 ^{ce}	5.77E-06 ^{ce}	3.99E-06 ^{ce}	9.62E-05 ^{ce}	5.31E-06 ^{ce}	5.94E-06 ^{de}
14	5.07E-07 ^{ce}	5.00E-06 ^{ce}	2.38E-06 ^{ce}	4.63E-05 ^{ce}	1.62E-05 ^{ce}	2.09E-03 ^{df}
21	1.22E-07 ^{ce}	1.27E-06 ^{ce}	2.65E-06 ^{ce}	4.78E-05 ^{ce}	1.56E-04 ^{ce}	-
49	3.09E-04 ^{ce}	0.00E+00 ^{ce}	6.86E-05 ^{ce}	4.80E-05 ^{ce}	1.99E-06 ^{ce}	1.99E-05 ^{ce}

Días después de inoculación (ddi)

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con prueba de Tukey ($\alpha, 0.05$)



Coefficientes de infección de líneas de maíz resistentes (Inoculadas) obtenidos por qPCR

Días después de inoculación	2010			2011		
	MR1	Inoculada MR2 AFB1	MR3	MR1	Inoculada MR2 AFB1	MR3
0	1.13E-05 ^{ce}	1.53E-06 ^{ce}	5.16E-05 ^{ce}	3.16E-06 ^{ce}	1.09E-05 ^{ce}	2.56E-06 ^{de}
7	1.91E-05 ^{ce}	8.72E-05 ^{ce}	2.80E-05 ^{ce}	9.62E-05 ^{ce}	5.44E-04 ^{ce}	6.62E-06 ^{de}
14	1.65E-05 ^{ce}	1.38E-04 ^{ce}	4.30E-06 ^{ce}	2.42E-04 ^{ce}	1.41E-04 ^{ce}	6.36E-04 ^{df}
21	2.23E-04 ^{ce}	3.04E-07	3.04E-06 ^{ce}	2.14E-04 ^{ce}	5.28E-06 ^{ce}	-
49	4.70E-05 ^{ce}	1.80E-05 ^{ce}	8.14E-05 ^{ce}	6.46E-05 ^{ce}	3.89E-03 ^{ce}	1.65E-05 ^{ce}

Días después de inoculación (ddi)

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con prueba de Tukey (α ,0.05)



Coeficientes de infección de líneas de maíz susceptibles (Control) obtenidos por qPCR

después de inoculación	2010				2011				
	MS1	MS2	MS3	MS4	MS1	Control MS2	CI	MS3	MS4
0	44.7E ^{-ce}	9.1E-07 ^{ce}	6.7E-07 ^{ce}	1.9E-06 ^{ce}	2.0E-06 ^{ce}	3.4E-07 ^{ce}	CI	3.0E-06 ^{ce}	77.6E-06 ^{ce}
7	1.9E-05 ^{ce}	1.8E-04 ^{ce}	5.8E-07 ^{ce}	5.4E-06 ^{ce}	7E-05 ^{ce}	3E-06 ^{ce}	CI	3E-06 ^c	2E-04 ^{ce}
14	4.5E-05 ^{ce}	1.0E-03 ^{ce}	4.6E-07 ^{ce}	2.7E-06 ^{ce}	1.2E-05 ^{ce}	8.2E-06 ^{ce}	CI	5.5E-06 ^{ce}	2.4E-04 ^{ce}
21	9.9E-05 ^{ce}	6.4E-07 ^{ce}	2.2E-08 ^{ce}	2.0E-05 ^{ce}	8.3E-06 ^{ce}	3.9E-07 ^{ce}	CI	4.2E-05 ^{ce}	1.9E-04 ^{ce}
49	1.0E-02 ^{cf}	9.7E-04 ^{ce}	1.6E-04 ^{cf}	2.0E-04 ^{ce}	2.3E-05 ^{ce}	4.0E-04 ^{ce}	CI	7.5E-02 ^{cf}	3.7E-07 ^{ce}

Días después de inoculación (ddi)

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con prueba de Tukey ($\alpha, 0.05$)



Coeficientes de infección de líneas de maíz susceptibles (Inoculadas) obtenidos por qPCR

Días después de inoculación	2010				2011			
	MS1	Inoculada MS2	MS3	MS4	MS1	Inoculada MS2	MS3	MS4
		CI				CI		
0	1.3E-06 ^{ce}	8.0E-07 ^{ce}	1.4E-06 ^{ce}	5.3E-07 ^{ce}	1.1E-06 ^{ce}	9.9E-06 ^{ce}	5.6E-06 ^{ce}	1.2E-05 ^{ce}
7	8.2E-05 ^{ce}	2.0E-05 ^{ce}	2.2E-04 ^{ce}	1.7E-06 ^{ce}	2E-05 ^{ce}	2E-06 ^{ce}	6E-05 ^{ce}	1E-04 ^{ce}
14	1.0E-05 ^{ce}	3.8E-02 ^{ce}	2.1E-06 ^{ce}	1.63E-05 ^{ce}	7.7E-04 ^{ce}	9.1E-04 ^{ce}	.5E-05 ^{ce}	6.3E-06 ^{ce}
21	1.7E-01 ^{ce}	3.0E-04 ^{ce}	1.4E-05 ^{ce}	5.8E-05 ^{ce}	2.5E-08 ^{ce}	1.5E-03 ^{ce}	2.6E-06 ^{ce}	2.9E-04 ^{ce}
49	6.8E-02 ^{cf}	1.7E-02 ^{ce}	7.0E-03 ^{cf}	1.0E-02 ^{cf}	2.3E-01 ^{cf}	3.4E-04 ^{ce}	7.5E-02 ^{cf}	1.8E-02 ^{cf}

Días después de inoculación (ddi)

Control o inoculada (a y b), 2010 y 2011 (c y d), días después de inoculación (e y f)

Comparación de medias con prueba de Tukey ($\alpha, 0.05$)



ANEXO 7. Ubicación de iniciadores

Ascorbato peroxidasa citosólica (APX)

Gen; LOC100283822 (GRMZM2G054300)

... Intrones

GTACCGGATTATAAACTATTTATATGTTAACGTTTAGATTCAAATCTGGGCCCGTCACTTGATGTATGTATGGTCAC
CACCACGATGTTCTTTTCAATGAAAAAAAAAACTGGCTACCGAAATGGCTGATCGTGATCGTGACTTTGGTGTGGC
GTTCCGGTGCAGTTTCATGCTGTTGCGGCTGCAGTATGAACGAATTGAATAAGGCAGTTTGTACTCTGTAGTGTAGTA
GTTGCAGCCACGCTTTTATTTCTTTTCATCTAATGCTCGTTCAAGACTCGCTGCAAGCATTGTTGTCTAGCTCGTCCCA
TTTCTGGAATAGATAAAAAAAACAAAATAGATAAAATGGGAACGAGCTTCTGAGTTGTGCGTGAGAAAAAAGGATC
ACGAGAGGATGAAAACCTGGACCAAAACTTCTGATTTTTAAACGTGGAGGAGAAAACGAATCTGTACTGCGCTCGG
TGTACCCATTGCTGGTCTCGTCAGATCGTTCCCATACCACGTTACGGCAAGGTGTACCATTGGCAGTAAACATC
GCAAAAAACAATACTTTTGTAGGGTGGGGGCGGCTGTTTCATTCATGGCCGGCTTGTCTGTTGCCCTTGGCGTGA
GGCGTGGCGTGGACGTGGAGTGAGTGGGGATGGATCAGGCCGTTGGCACGCTGCTCGAGAAATAGTCAGCCGGCCA
GGGACCCATCAAGGAGGAGTTCCCAACCTCCTATGCGCGTCCAAATGTGCATCCTTTCTGGCCCGCAGTATCGATGGA
TTAACGGCCACAATGCATCCTACGAGAAGCTTCCCTTTCTCCATCAATCCTCCGGACCTCCGCTCTATAAACCGCCG
GGGAGCGTGGCGGCCATTTCGACGCAAGCACCAGACCCAGCAGTATTGTGGTCTGCTCCCTCAGCCGCTGCAACCG
ATCGCATTCTACGATTGAAAGCTCTCTGCTCGCAGCCATGGCGAAGAATTACCAACCGTGAGCCGCGAGTACAG
CGAGGCCGTGAGAAAGGAGTCCCAACCTCCTATGCGGATTCTACCGGATTCTACCAGGTGCGCCCTGATCTCGCATCG
TCGCGTAAGCCTTCCCTCCCGCGCGCGCATTTCCAGATCTTTGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGCCTTTTCGGT
TGCCTGATCTGCAGCTCAGTTAATCGCGCAGGTGGCACTCCGCGGGGACGTTGACGCTGTCGTGAGGACCGGGC
GTCCTTTCGGTACTATGAAGTGCCCGCGGAACCTGGCTCAGCGGCCAACGCGGGGCTGGACATCGCGGTGCGCGT
CTCGAGCCATCAAGGAGGAGTCCCAACCTCCTATGCGGATTCTACCAGGTGCGCCCTGATCTCGCATCGAT
CTGGTTGGATGATTTCGATCTGCCGAATCGATGTGCGTTTTGACCGTGTCCCTTGTCTCTCTGCTCTTCTT
TGCAGCTTCCCGGAGTTGTGGCCGTGAGGTCACCGGTGGGCTGAGATCCCCTTCCACCCGGCAGGGAGGTGAGA
TTTTTCATCCATTTCTCACTATCTTTGGGGTTTAGCCAGGGTTAAAGTCTTGTTCGAAATCTCCGAGGGGGTGGT
TGAAGGCTGTCAGTGAGATCGTGGTGTACTCCAACCTAGCGATAACTCTCATCTGTTGTTTTTGTCACTGTTT
GGGACATATCCATGCAATCAAATCATCTGAGCATCAAATCTAGATCCAATGTTTTCATATGGAAGGGATTAATATA
AAATAGATAACCATTTCAGATGAAAAGGGTAAATGTAATAAATCGTCACTGTTGGATTTGATTGAATAACCAGAT
CACTTGATTACATGCTTACACCATCATGATTGATTGCACAGGATATGTTCCGTAGATACCTCCACAGTCAGCGATA
ACAATTTATCTGACACGTGATTTTATTTCTCAGTAACCTTTATTTCTTTGACATTTTTTTGAGGCTTGTGTCCA
CACATCTTTCTGGTCTGTGGTTTCATGTTTCGTGTGACATGGACACCAAGTTATGTTTTGATTTGATGATTATA
GATATTATCTTTGAATGGTGGGCATTATGCTGCAAAAGCAATTTAGCGGTTAATCTGATGTTCAATATTTGAGA
TGCAGTTTCTTGTGGTACTCATAATCTCCTGCTCTTGAAGACGTGATAGGAAAGTCACATCAGTAACTTTATTGC
TTGTTTCATACTTTTAGTATGGGAAAGGATGCCACTAATAACTAGGTATCAAAATATGTTGTTAGAAGCTGTCTCT
AACATTATGGTTCCTGATTGTTGTTGCAATCTGAGATTCATATAACCTTTTGAATTAATGTTGAAATGCTG
GATTTATCACGGATATGGAAAATTAATCTGTTGTTTTGTCATTTTGTATTGTTCTACATCCAACCTTTTTTTATTGCTTTG
AATGATGATATATTCAATATTTTGAATACTGTTAATTTCTGTCATCTTGTGATATATATGTTGAGTTGGTAGGT
CATGTGATGAGGTATAATATAATTGTGCCCTTATCTGTTATACATTTATATGTTGGCCAATACAATACCATATCTTAG
GTCTTTGTATCTTTATGGGAGGTCACCTCTCTTCTGGATGACACTGAACATCCAGAGTATGCTATTGGGTATGAG
TTGTATGGTTGAGTTCGAGGCTTTTCATGCCGTCTAGATGATGAGGTGCATGATGTAGATTATGCACACGTATAGTTCC
AGTTGATATGTTGTCAAATATACACACATAGACCATAAACTTCTGCATGGTGTCCAGAGCTGATAATATTTCCCTT
GATTTGTTGTTACTATGTGTTGGGTGACAATTAGTTAACTTTGGTGATAAAGTTGCTCGATTCTATCTCTCTTTTCT
TAATAACTATGAGAAACATGACTGAGAAGGTAACCTTTGACACTTGCAGTGGTGAGAAGTGAAGTGAAGTGGTCTC
GGTTTATCCCTTCCGACCCCTACTCATGTGGGAGTCTACTGCCTGGATCTTTTCTTTTATAGACATGACTGAGTGT
GATGTTATTTGTTCCATGCCTTTTTCGTCATCAGTATTTATATCTTCTTGTCTTTTTCAGGACAAGCCTCAGCCGCCA
CCTGAGGGCGCTTCTCTGATGCCACCAAGGGTAGATTTCTAATCTTACTAGATTGGCATGAATGCTGAGTTAATGG
GTTACATTGACCTTGCATCTTTTTTAAGTGTTCAAAGATGTTGTTTTGGCATCCCTGTACCCAGCTTGCCTTTGGGTA
ACAGTGGTTCCCTGTAGCCAAGGCACCCGATAGGCCGCGCAGACCAAACTCGTTTTTCATGTCACTTATTGACACG
AGGACTGGCACTTGTCTGCTTGTCTTTTTTTAACCAGTTCTGACCACCTGAGGCAAGTCTTTGGCAAGCAGATGGGT
TGAGTGATCAGGACATTGTTGCCCTCTCTGGTGGCCACACCTGGTTTTGTGCTGTCCACTCATGTTTGTCTCAGGAAT
TTAATGTGATGCCTGACTGATTTAGTTTTCTTTGAGGTTTTATTAGGGAAGGTGCCACAAAGAGCGGTCTGGTTTTG
AGGGGCCCTGGACTACGAACCCTTGGTCTTTGACAACCTCTACTCAAGTGAGTGTATGCTTGTACTATTGAAA
AGCAACTGCATTTAGTTAAGAAACTTAAAATTTGTTTACCTTTGTTATGTCATTACTGGGCAGCTGAATGCTGTGCT
AGAAATTAACAGCCATCCCATATATCCTACTATTCCCATATTTTCATAGGGAACCTTCTGAGTGGCGACAAGGAGGGCC
TTCTTCAGCTCCCAAGTGCAAAGCCCTGTGAGCAGCCACTGCTTCCGCCCTTGTGGAGAAAATATGCTGCAGTA
TGTCTTGGTCATTA**TATCCAGGGTATGGAGATTCA**AGGGAGGCAAGTACTGATTATCGTGTGCTCTGTAGGATGA
GAAGGCATTCTTGA**TGACTACAAAGAGGCCACC**CAAGCTCTCCGAACCTGGGGTGAGTAACCATTGGTTGCACA
ATGTGTGATGGTCAGTGGAAACAAATCTGATCGTTTACTCTTCTGGGGTGCAGGTATGCTGATGCTTAAATGGTCCAT
ATCCTGGAGCGGGACACAACTGCTGCTGTATGGACTCGTGCATTACAGGGTGAACCATCAGATTGTCTAGTGTCTT
CTTTGTAATAAATTTATCTGTTCTTGGTACTTGTCTATGTTGATGTTGAGTGAACCAACCTTTTCCGTTTGCCTAGATTCTAA
TTTTCTGGTGTGATCCAGCTGAAACTAGTAGATCTATGATCTTGTGGCTGCAGCATGTTCTTGTCACTTTTATCTGGT
CTCCGTTGGTTCGGTTCACAGGTTGTGTGCTTTAAAAGGCTGTGCTTAAAGTCTGCAATTCGAGTCCACCAAACTGTA
GGGTGCAAGTCGAGATTTTATAGTGATGCAAGTTGCTGGTATTGGTGCATTATCGGGGTAATACGCTTGGCTTGGCT
TCTGATTTATAAGTGATGAAATGCTGGTTTTAACGTTGATTACCTGCAAAATCCTGGTTTTAACTTGGTGCATTA
ATGGTGGTTTTGGCAAGCAGGATCTGCTGTATGCTTGTGCGCACCCGTTTCAAGCGTGAAACGTTCAACACTTC
TACTTGTCAAAAGTCGTGCCTAAAACAATCTGCTTGTACGTTTTCTCGATTTCTGCTGTAGGGTTGCAATGGCCAGA
CGTAGTTTTGCAGTGATCTGGTTTTCAATTTCTGAAATATGAATTATTGCTCTAATCCATTGTTACATAGGCTTTTTA



CCCCAAAAAACAAGACGGTATGACTATATATACGTGGAGGCTCTTCATCAGGGAAACTCTACATTATAAATCAAG
TGACATTATCTTTAAGTTGACTTTAAAAAGTTCAAACATGTATCCTACAAGTATTCCATGCTTGCATGCAAGACAGAG
ATCACTTACAAATGGTATGTTAAGACTAACATATTTAAAATCTTATCATGTGTAAGCATGAGTGATCACTTACA
TATCATATAAAATCATATCAAGACCAATTGGATCTCTACATGTGGTATTTTTAAATCTATATCATTGTGTTCTTCA
CCCGGTTCTTTTATATGCTTTCTGTCAGCGTTATGTAGATCAAACCTCTCTATGTGCGCTAATTTATCCGGTATACGTA
GGGGGCTTAGTCTATGTAATGTGAGTCAAATTTATGATCAATCCATTCCACATATAAAAGGAGCATAAAATTTGGC
TCTCCCTGTGTTACTAAGAGCAAATCCACTAGCTCTCTAAAAAAGAGCTTACTAAAATCATGTTTAGCAAGTTGCTA
AATAGCTATAGGGAGTAAAAAAGTAGCTTAGTCTAATAGTTGT

Glioxalasa

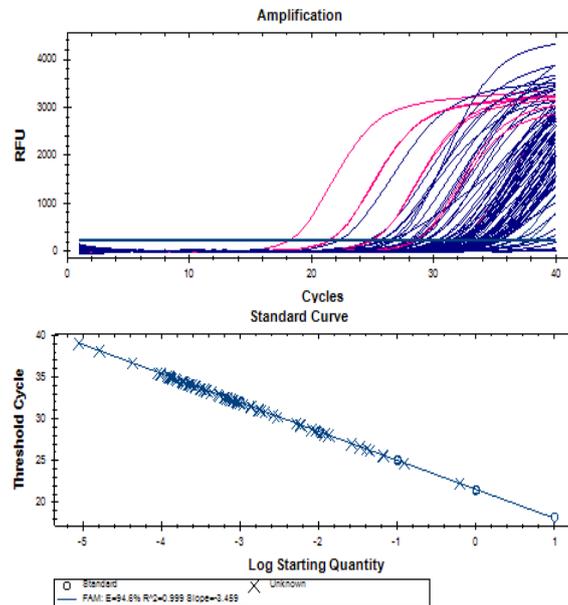
Gene: LOC100281531 (GRMZM2G464295)

... Intrones

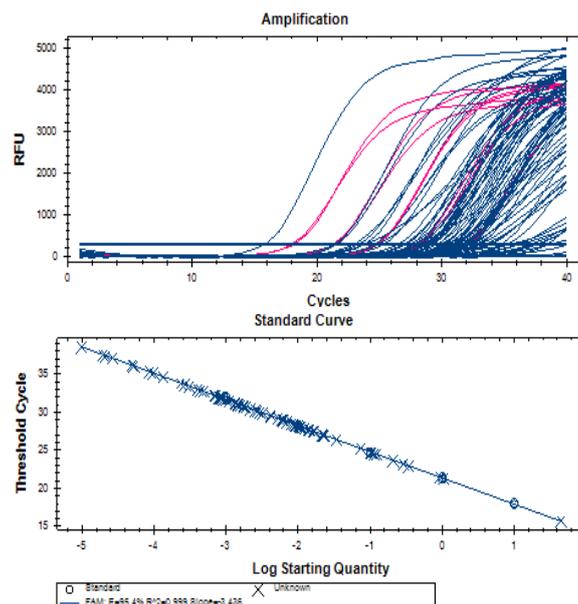
CATTCACCAATTGATAAAAAATTATGAAGTAAAT AAGGAATAACAAGTTTGTGGTCATTTATAAAAAT AAAATGACAA
TATGCACTAGGTTTGGTTGGGTTTAAAAAACCCACGGGTTACGGGTTTGGGACTATAGGAACAAACCCGTACCCAT
AAACCCGTCGGGTATAGATTTATGCCATTAACAAACCCATGGGTATGAAAATTGACCAAACCCGTACCCTAATGG
GGTAAAAACCCATCGGGTTTCGGGTACCCGTTGCCATCTCTAGGTCGGCGGAAGAAGAAGGCGGCTGCTTGGTGCT
CGCTCTGGTTTGATAAGTTGGGCTTTATTGCCAACACGGCCCAAGTAGTCGAATTTGATTGCTGGGTTTGTGTTGC
TCGCCGTCGGGCTGGATGTGAGAGTGTCTGACTGCTGCTCGCTCGTTCGTTGACGGCAGAAACAATCTCGTGCT
AGGAGGGAGGGACAGGGCGGAGGGCCGTTATGGCCAAGTATGGCCGCGCCATACCTTAAATCGGCCAGTAAA
GAGCAAAACCTAGGTATTCAGTCCAACAACAGGCACGCGCAGCACAGCCGCCGACGACGCTCCTACCTGGCCGG
CGACCGCTGCTTGTCCGTCGGCGGCGGTTGGCTCCGCTCTGGCTTGTCTGCTTCTGCTCCTCTCCTCTCCTGCTTGG
CCCATTGGGCTTGGCCGCTCGGTCTTGTCCACTGTCCGCGGTCGGCATTGGAGAAAACAATCTCGTGCT
CCGGTGCTCGTACTGGCTGCAGACTGCTTGCTAAGTTGCTTTGCTCAATTTGCTGCTTGTAGCCTTCTACAGTGC
TCCGGCTGCTTGCCTGGTTGCTTGGCTTTGGCTAGTTGGCTTGTGCTCGCGTAGTTGCGTTGGCCGCGTTGCTGCTT
GCAGTTCTGCTTGTGCTTGTGCTTGTATTTGCAAATTTAGCTGCCCTGCAGTTGCAAATTCGAATAGATTCAAGCTC
AGCAAGGTCGGCAAAAAGAAAGGCTCTAGAAAGAGGTAGTTGCTTATGTGTAACAATATTGCTATACATTTTTTT
ATTAATTTAGTCTTTTATTTAATGCTAATGTATGCTTGTCTTTGTTTGAACAATATATTGGTTAAGTTACTGATT
TGACATATAATCTACAAGGAATCTTCATCTAAGGTACTTCTTAATAATGTTTTTATACTAAATTTGTTTTACTGCAA
GATATATTTTTGTCAATGCCATACCTATTTTTAGGTCTGTCTCCGCCACTGGGAGGGAGGTGGTGGGGAATGGCGG
CGGACGCTCGGTTGGGTCGCTGCAGCTGCACCGGACGTACCCGGGCGAGCAGCGGTTCTACTCGGAGGGTCTCGAC
TTCAGTGAACCTGTCACGCTCCGCTGGGCGGCTGACTGCTGCTCGGGCCGCTCAAGCTCGGACCTATGCACACAA
CGACAGGTGCGGCTACTGCTGTTTGTATACCGGCTCTCCTCGTAGTATTATCCTTCTCGTATAACTTCGGCCTTCA
GATGGATCGGATTCGGATTTGTGTGAGGTTTATGTTGATGAAATGTGTGTGTCAGCACTTGGTTTTATTTAAG
TTCTGAAAACCTGGGTCATGGGCTGCGAGATTAGTGAAGAATCAAGTCAGTTTTCATATGACAGTCGTCAACTTTG
GCTCGAGATACCTTGCCCTTGGAACTTCTCCTGCGGCTTTTTTTTTGAAAAGCAAATGGTAGGACTATGCTCCTCATTG
AAGAGGGAAAAGAGTTATAGAAAATGATCACAGATCTCACACACACCAGGAGCACACCTCCTCGCATAAAAAAG
ACCCGACAGGTGAACTAAGAGAATATCAAACACAATAGGCGAGGCTGCTAGTGAACATCAGCACTCCTATACAGCG
AAAGACTCTTTTATTTTCCCTGCACCCACCTGCAAGGCTACAACGCGGACAGTGAGCTATTCTCGAAAATCCTTTTAA
TTACGCTTTTCCAAATGTTCCACATGAACATGATGATGATCTGCGGTTTCAAATTCCTTTTATTTTCTACTAGCAT
TGAGAGAGGTTGTCAAACCCACCCTCGCTGATGCTGTGCAAAATTTGATGGGTCTACTTGTGTCAGTAAGACCAGCC
TTTCCAGGAGAGGATCTGGTTCCAGATATCGAGAGCGAAAGGGCATTGCAAGCAGAGGTGGATTTAGGTTCTATA
GGTCTTGGCAGAGCGAGCAAGAGGTTTGGTGTGGCCATCCAGGCGGGCTAGATTGTTGGCAGTGAGCAGCTTATT
CTGAATGAGAAATCCGCAAAACAAATTCACCTCTGACTCTGCACTTCCAAATGCGTTAACCTTGTGGCTCTATA
AGTACCCGTAACCTTCTCTGTTGATATGATCTGCTGATCTGGCGGTTCAAATTCCTTTTATTTTCTACTAGCAT
CTATCAACATAGAGGAGTAGTGAGGCAGGCTAGCTTCTGCTGCATCCTGGGAGGGGGGACGCTAAACTAATCTCGT
TTTTGTGTGATAGGAGTGCCCGCAAAATGGAAAATGTCAACGAATCCTTCATTTGTGGCAATGATTTGCACTGCAGGT
TGATAGTGGGCTTTGAGCAAGCTCAGACTTCGAGTAAAAGTTATTTATGTTGATCAGCTTGGTCAGACTTACAATAG
GACATGTACCAAAGAACATAAACATACAACACAACAACTTAGTGACCCCAATAAAAGAAAATAAATCTGAAAATTTGA
TGGAAAGGAGTGTGGATCTATCGCATGAAAATATGAGATCCATGGAAAAGTAGACAAAACATACTGGACAAAATTT
GTGACCCTATAAACATAACAGCTCTGAAGTGTGGATCTGGGAGGTTGCCAGTCTTGGGAAAAAATCCCAAACATT
GCTTGAATGATACTTCACTCTCCAATACATTTATAGTCTCGTTACAATCTTGTATGTCAAAGGCAGTGCATG
AAAAAAGTACCCCTCCCAAGAGTCAAAAAGAAATTTGCTCCTCCTTGGAGCTTTTCTCAGTTTTTGTGTGGATTT
CAAATTCATCATCACATAAACATAAGCTACACAAAAACATAGGGGATCCCCCCCCCAATTGGCCAGTGCATG
AAATCATAAATTCATAACTATTATCTTATATTCTGTACATGCTTGCAGTAATCTTGCATCGCAGAGAGTCTATTCTCA
ATGCTCTCCTTCACTGTACCAGACATAAAACA **GTGCCGTATCGAAGCTAATG** CATTGGGAGCCGAGTTGGATGGG
CAATCAAGTATGAGATCCATGGAAAAGTATTGTCTCTATATTCCACGATTTCCATTATGATTTCAGGACGCAGAA
TCATTTACATGACGTTTCTCTTCTTCCAACGCAGGTTGCAGCACTGCGATGCATCGATGGGCACATGCTAGGCCTG
TACGAGCCAGCTTGAAGAAGTCTGTGCACAACGAAAGTATTGAGAAGTCCATTAACCACTCACTGAAG **ACTGATGT**
GTATGTCGGCA AAGATCTTCCGCGTAAGACAATCTACTGGGCTGGTGTGCATGAAGTGGCAGAACTCCTTTG
TTAGCAAAATCAGGAGACACGGTGGATGGTTAGCTTACCATTCTCTCCTCGTGTGCTGGTTATGATACACA
TTTTTCTCGAAGTGAATGTGCCTAGCAGGTGCTGCTGTTAAGCTGAAGCCAGGTTTTCAGTGGTCTGCTCGGTATGG
CCTTGTTCATGGCATTGTGCCAGTACATCTAATTCAGTTTTCAGTTGTAGTTTACTGACATTACATGTGTGCGTAGT
TTCAATTTGCAATTCAGTGCAGGAGTGTCTGCCCCTGATCATCCATGTAATTGAAATCTTCTGTAGCAATTTGTT
TGACAGTATAAATTTGGACCATAAAGTTGCTGTTA **AACTTGTGTGTAGCTGCACTGTTCTATTTTTTCACTTTTAGGTT**
CCGTTTGGTTTCTTGTAGTCCAGGACTAAAATTTAGTTGGAAGACTAAAAGTTTGTAGTCCCTACCCTGTTTGGTCTGGG
ACTAAAATATTTAAAAAATATTAATGAATCAT AAGAGGACCAAATACCTTTTGTAGTATTCTCCCGCCATTAGTGCAA
CTGAAATAAAGAGGGCAAAAAGTGGAAATAGTATGGTTTGTAGTCCCTTTAGTCACTCCCTTGGGGACTAGATAATA
AAACAGTTTGTCCATATTTTGTAGTCCAGTGTTCGGCTATTTAGGGACTACCAAACCTGGGCTTACTACCCGTTTGGTT
CCTTTAGTCACTAGACTAACTTTAGTACTAAGTTTGTACTAAAGTACATTGTTTGGGTTTTAGTACTAAACCG

GACTAAAGAACATTAATTGTTGTGAATAATGACTGTATTACCCTATTAATTAGTGGATGTTTGCTGCAAGAAGAAAG
TGTAGAGGACAAATAAGGTA AAAATCCTAATTTAGTCCCTTTTAGTCATTGCGAACTAAAGTTTAGTCACCTCAGTT
AGCTATCA

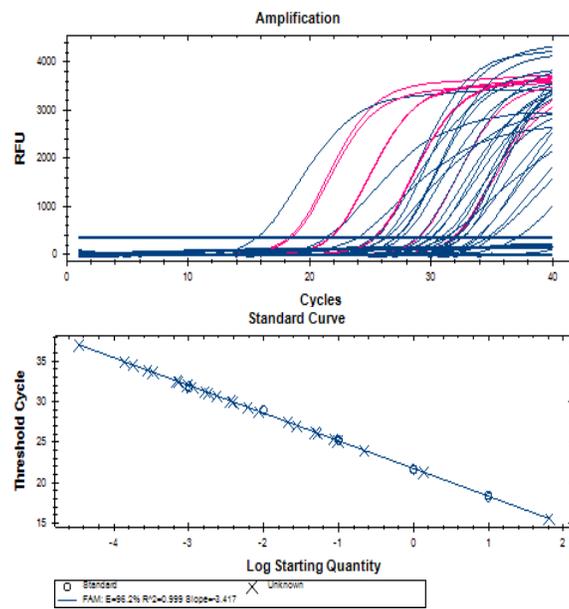
Anexo 8. Amplificaciones y detección de *Aspergillus flavus* durante el desarrollo del grano de maíz.



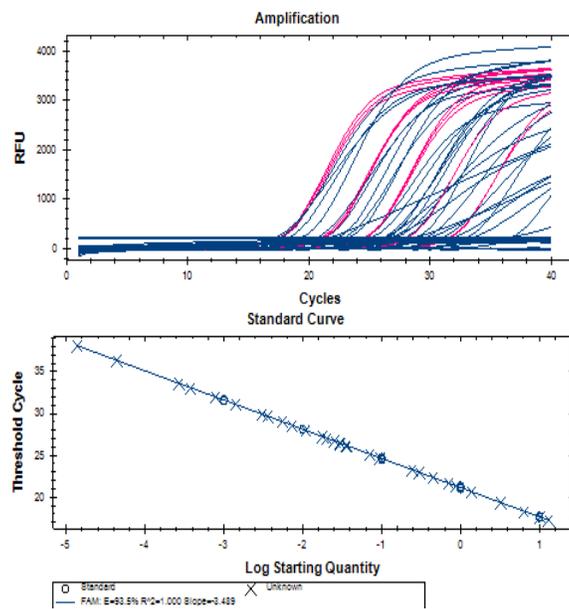
Amplificación de DNA de *Aspergillus flavus* por qPCR en muestras de grano de maíz a los 0 y 7 días después de la infección.



Gráfica 2. Amplificación de DNA de *Aspergillus flavus* por qPCR en muestras de grano de maíz a los 7 y 14 días después de la infección



Gráfica 3. Amplificación de DNA de *Aspergillus flavus* por qPCR en muestras de grano de maíz a los 21 días después de la infección



Gráfica 4. Amplificación de DNA de *Aspergillus flavus* por qPCR en muestras de grano de maíz a los 49 días después de la infección.