



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO**

**Identificación de razas de maíz criollo del Valle de Oaxaca resistente y susceptible a la acumulación de Aflatoxina B1 producida por *Aspergillus flavus* y la expresión de los genes: *ZmCOR*, *Zeamatin*, *aflR* y *norB*.**

Tesis que presenta

**Q.A. Viviana Sandoval Flores**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de  
Biotecnología de Plantas

Directora de Tesis

**Dra. Doralinda Asunción Guzmán Ortiz**

## UBICACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micotoxinas perteneciente al Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección de la Dra. Doralinda A. Guzmán Ortiz.

Irapuato, Guanajuato 2016

## **Dedicatoria**

A mis padres **Margarita y Fidelmar** por ser un ejemplo a seguir, guiarme y siempre estar conmigo enseñándome, dándome toda la confianza, comprensión y amor incondicional.

A mi familia, **mi hermano Juan Carlos, mi Abue, Martina, Didier Fernanda** mis tíos **Patty, Paco, Hugo, Lucy, y Vero** por su apoyo, amor y cariño en todo momento.

A **Gilberto** por caminar junto a mí estos dos años y brindarme siempre apoyo amor y confianza.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría.

A la **Dra. Doralinda Gúzman Ortíz** por aceptarme en su laboratorio, brindarme su asesoría, apoyo y compartir su conocimiento para la realización de este trabajo de investigación

A mis asesores de tesis **Dra Silvia Valdés** y **Dr. Axel Tiessen** por sus valiosos comentarios y aportaciones durante la realización de este proyecto de maestría

A la **Dra.Laura Valdes** por su asesoría y apoyo para la realización de esta tesis.

A **Laura Hernández** por su apoyo en el laboratorio.

A la **M. Yolanda Rodríguez Aza** por su apoyo para realizar las cuantificaciones de aflatoxina en el HPLC.

A los Maestros **Sergio Hernández Dalia Rodríguez, Melany Ortega y Estela Jiménez** por todos los consejos y apoyo durante este periodo de formación.

A todo el personal administrativo que labora en CINVESTAV especialmente **Dora Elia, Diana, Juan Pablo, Sarita y Baltazar**, por su amabilidad y disponibilidad para cualquier trámite y apoyo.

A todo el personal de CINVESTAV, por su disponibilidad para ayudar en cualquier situación y hacerme una estancia agradable con gente muy trabajadora y dedicada.

A mis compañeras de laboratorio **Karina Rocío Estefanía, Diana, Lupita, Rosa, Magda**, que hicieron que fueran muy agradables los días en el laboratorio.

A mis amigas **Raquel, Suzel, Ana Carina, Danny, Monse Andy Angie, Caro, Tere y Azenet** porque a pesar de la distancia siempre tengo su apoyo y amistad incondicional.

A todos mis amigos que conocí en Irapuato, **Coyol Sergio Estela, Melany Conrado, Orlando Rocío Thania, Rigel Erasmo Ahiko Edgar, Frank, Javi, Abraham, Aníbal Alex, Fabi Memo, Carmen, Pili**, que se convirtieron en mi familia estos años

**A**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	9
INTRODUCCIÓN .....	13
HIPÓTESIS .....	24
OBJETIVOS .....	25
MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
EXPERIMENTOS.....	42
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	72
CONCLUSIONES.....	80
PERSPECTIVAS.....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas Asociadas a la Resistencia de Patógenos y Acumulación de Aflatoxina (RAPs). _____	20
Tabla 2. Mapeo de RAPs en cromosomas de maíz _____	22
Tabla 3. Características de las 11 razas de maíz criollo del Estado de Oaxaca _	28
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para identificación de la cepa A. flavus. ____	29
Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para identificación de genes	30
Tabla 6. Cantidad de AFB <sub>1</sub> producida por A. flavus T-1 en maíz criollo. _____	48
Tabla 7. Cuantificación de Ergosterol en embriones germinados de maíz _____	53
Tabla 8 . Acumulación de AFB <sub>1</sub> en 11 razas de maíz criollo sin inóculo de A. flavus T-1 _____	54
Tabla 9. Acumulación de AFB <sub>1</sub> en 11 razas de maíz criollo inoculadas con A. flavus. _____	56
Tabla 10. Acumulación de AFB <sub>1</sub> de 11 maíces criollos y su clasificación utilizando datos de producción de aflatoxina transformados. _____	58
Tabla 11 . Aflatoxina B <sub>1</sub> en razas susceptible, resistente y en variedad de referencia. _____	59
Tabla 12. Obtención de RNA de grano seco de maíz MAHN16. _____	60
.Tabla 13. Obtención de RNA de grano seco de maíz MAHN16. _____	60
Tabla 14. Obtención de RNA de grano seco de maíz B73. _____	61
Tabla 15. Obtención de RNA de grano de maíz fresco _____	62
Tabla 16. Obtención de RNA de embrión de B73. _____	63
Tabla 17. Obtención de RNA de embriones de maíz no inoculados. _____	64
Tabla 18. Obtención de RNA de embriones de maíz inoculado con A. flavus T-1.	65
Tabla 19 . Resumen de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de AFB <sub>1</sub> _____	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grano de maíz _____	14
Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas _____	16
Figura 3. Morfología de <i>Aspergillus flavus</i> _____	47
Figura 4. Crecimiento del hongo dentro de grano de maíz _____	49
Figura 5. Unidades experimentales de maíz criollo MAHN16 inoculadas de acuerdo al método KSA. _____	51
Figura 6 . Unidades experimentales de maíz criollo MSHR25 inoculadas de acuerdo al método KSA. _____	52
Figura 7 . Gel de electroforesis de RNA de grano de maíz fresco. _____	62
Figura 8. Gel de electroforesis de RNA de embriones no inoculados. _____	64
Figura 9. Gel de electroforesis de RNA de embrión inoculado con <i>A. flavus</i> T-1 _	65
Figura 10. Amplificación de los genes con alineamiento a 50 °C durante 30 ciclos _____	66
Figura 11. Amplificación de genes <i>norB</i> , <i>aflR</i> y <i>18 S</i> _____	67
Figura 12. Expresión de genes en embriones no inoculados con <i>A. flavus</i> _____	68
Figura 13. Expresión de genes en embriones de maíz inoculados con <i>A. flavus</i> _	69
Figura 14. Expresión de genes en embriones no inoculados con <i>A. flavus</i> . _____	70
Figura 15. Expresión de genes en embriones de maíz inoculados con <i>A. flavus</i> . _____	70



## RESUMEN

El maíz es un cultivo susceptible a la infección por el hongo *Aspergillus flavus* y la posterior acumulación de Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) antes, durante y después de la cosecha. En México el consumo de maíz es de suma importancia, cerca del 60% del maíz producido e importado es utilizado para consumo humano por lo que la incidencia de AFB<sub>1</sub> en maíz representa un riesgo para la población. Se ha demostrado que existen genotipos híbridos de maíz resistente y susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>. Sin embargo no se ha logrado que la resistencia de estos híbridos se mantenga en el campo por lo que se siguen buscando híbridos, líneas, variedades o razas de maíz que mantengan la resistencia, tanto en campo como en almacén. El objetivo de este estudio fue identificar maíces resistentes y susceptibles a la acumulación de AFB<sub>1</sub> en maíces criollos de Oaxaca. El estado de Oaxaca posee maíces criollos con una alta variación genética como consecuencia de ser lugar de origen, por su situación geográfica, su alta variación climática, su topografía variada, su diferente tipo de suelo y la facilidad de entrecruzamientos del maíz.

Se inocularon 11 razas de maíz criollo de Oaxaca con *Aspergillus flavus* T-1 productor de AFB<sub>1</sub> utilizando el ensayo "Kernel Screening Assay" (KSA) y se mantuvieron en condiciones adecuadas de humedad y temperatura durante 6 días, con sus respectivos controles no inoculados. La AFB<sub>1</sub> se cuantificó por HPLC y el crecimiento fúngico fue determinado midiendo Ergosterol, un esteroide específico de hongos. Para la cuantificación de la transcripción por RT-PCR de los genes del maíz involucrados en la resistencia a la acumulación de AFB<sub>1</sub>: ZmCOR y Zeamatin, así como de dos genes de *A. flavus* implicados en la síntesis de aflatoxina: *afIR* y *norB*, se obtuvo RNA de embriones germinados de la raza de maíz resistente MSHR25 y susceptible MAHN16 y de la variedad susceptible B73.

Los resultados sobre acumulación de AFB<sub>1</sub> permitieron clasificar las razas de maíz criollo en tres grupos: los de baja, mediana y alta acumulación. La raza MAHN16 presentó la mayor acumulación de AFB<sub>1</sub> (raza susceptible) y la MSHR25

(raza resistente), la variedad B73 reportada anteriormente como susceptible, presentó alta acumulación de AFB<sub>1</sub> (susceptible).

Con respecto a los niveles de transcritos de los genes de maíz, *ZmCOR* y *Zeamatin* no se detectó expresión en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas. En cambio, en el análisis de los genes de *A. flavus* implicados en la síntesis de aflatoxina *afIR* y *norB* los resultados son diferentes. Se encontró transcripción del gen *afIR* en embrión germinado de MAHN16, MSHR25 y B73 no inoculados. Estos genes son específicos de hongos micotoxigénicos, por lo tanto, este transcrito fue expresado por los hongos presentes en la flora interna natural de los granos de maíz, que son capaces de sintetizar AFB<sub>1</sub>. Interesantemente, la mayor expresión de transcrito en el maíz inoculado se encontró en el MAHN16, catalogado como susceptible. El gen *norB* sólo se expresó en MSHR25 y B73 no inoculados y no se expresó en el maíz inoculado con *A. flavus* T-1.

La búsqueda de factores de resistencia a la acumulación de AFB<sub>1</sub> en maíces criollos representa un desafío muy complejo y es necesario desarrollar estrategias considerando la relación de los factores involucrados: la planta, el hongo micotoxigénico y las condiciones ambientales que juegan un papel determinante durante la síntesis de aflatoxinas.

## ABSTRACT

Maize is a susceptible crop to the infection of the fungus *Aspergillus flavus* and the subsequent accumulation of Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), during preharvest, postharvest and storage. Maize is the staple food for Mexicans. The incidence of AFB<sub>1</sub> represents a serious health hazard to the Mexican population since 60% of the total corn produced in Mexico is use for human consumption. It has been shown that there are hybrid genotypes resistant and susceptible to the accumulation of AFB<sub>1</sub>. In addition it has been reported genes associated with the resistance, however the identification of new genes would help to development of new hybrids resistant to the aflatoxin accumulation. Accordingly, researchers are still looking for maize hybrids, lines, varieties or races capable of maintain their resistance during field and storage. The purpose of this study was to identify maize landraces of Oaxaca Valley resistant and susceptible to the accumulation of AFB<sub>1</sub>. The state of Oaxaca is consider the center and origin of maize, its geographical position, high climatic variation, varied topography, soil type and, maize crossbreeding have contributed to the presence of landraces with high genetic variation.

Maize kernels from 11 landraces from Oaxaca Valley were inoculated with the fungus *Aspergillus flavus* T-1 producer of AFB<sub>1</sub> using the assay "Kernel Screening Assay" (KSA) under controlled conditions (humidity and temperature). After 6 days of incubation AFB<sub>1</sub> was quantified by HPLC and fungal growth measured by quantification of Ergosterol, a specific fungal sterol. Additionally quantification of transcription levels of genes involved in resistance to the accumulation of AFB<sub>1</sub>: ZmCOR and Zeamatin and two genes involved in the synthesis of aflatoxin from the fungus *A. flavus*: aflR and norB. Were analyzed by RT-PCR. We obtained RNA from germinated embryos of maize landraces MSHR25 "resistant" and MAHN16 "susceptible" and the variety B73.

The results allowed us to classify landraces according with their ability to accumulate AFB<sub>1</sub>: low, medium and high. The landraces MAHN16 had the highest accumulation of AFB<sub>1</sub> (susceptible race) and MSHR25 the lowest accumulation (resistant race), variety B73, previously reported as susceptible.

Genes expression level of Zeamatin and ZmCOR was not detected in none of the experimental conditions probed. In opposition the analysis of genes involved in the synthesis of AFB<sub>1</sub> in *A. flavus*; norB and aflR the results were different. Transcription of the gene *aflR* was found in no inoculated germinating embryo of landrace MAHN16, MSHR25 and B73, these genes are specific for mycotoxigenic fungi therefore this transcript was expressed by the fungi present in the natural microflora of corn kernels, which were capable of synthesise AFB<sub>1</sub>. Interestingly we found a higher gene expression in the inoculated kernels MAHN16 classified as susceptible. The norB gene was expressed in MSHR25 and B73 no inoculated and the same genes did not shown expression in inoculated kernels.

The identification of resistance factors to the accumulation of AFB<sub>1</sub> in landraces represents a challenge, it is necessary to develop strategies considering the relationship of the involved factors: the plant, the micotoxigenic fungus and the environmental conditions that has a decisive role during aflatoxin synthesis.

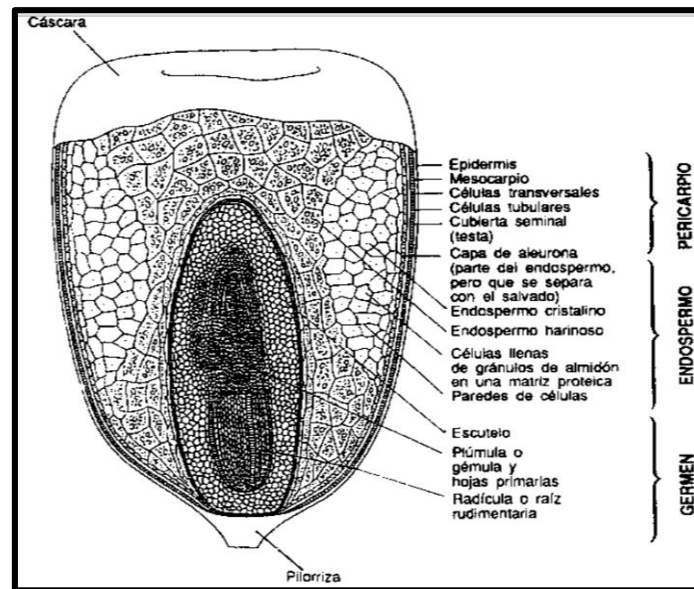
## INTRODUCCIÓN

La infección de maíz por el hongo *A. flavus* y su subsecuente acumulación de metabolitos secundarios tóxicos y altamente cancerígenos (aflatoxinas) es un problema agrícola de suma importancia. La contaminación con aflatoxina reduce significativamente el valor del grano como alimento para ganado y producto para exportación, así mismo pone en riesgo la salud humana y de animales domésticos (Z-Y Chen, Brown, Damann, & Cleveland, 2002). Esta contaminación por aflatoxina es un problema tanto de pre-cosecha como post-cosecha ya que *A. flavus* puede infectar el cultivo antes de la cosecha y permanecer a lo largo de esta y durante el almacenamiento (Robert L Brown, Cotty, Cleveland, & Widstrom, 1993). Especialmente en los cultivos que crecen en condiciones de estrés y de sequía se acentúan los problemas por los hongos y aflatoxinas.

### La planta de maíz

El maíz (*Zea mays*) es una gramínea que cuenta con una raíz ramificada, un tallo central con nudos y entrenudos, los cuales son envueltos parcialmente por las hojas que salen de los nudos; los frutos son las mazorcas que nacen de los nudos medios de la planta y están envueltas por hojas (totomoxtle), pueden tener de ocho a dieciséis hileras de granos, los cuales pueden ser de diferente color dependiendo de la raza. El grano de maíz es el cereal más grande, con un peso de 250 a 300 mg cada uno. Está constituido principalmente de tres partes: pericarpio, endospermo y germen o embrión. El pericarpio es la parte estructural más externa del grano, es una película cuyo espesor normalmente varía de 60 a 80  $\mu\text{m}$ , el cual está formado por un tejido denso y correoso, cuya composición es 77.7% fibra, 9.1% proteína, 7.3% almidón, 1% grasa y 4.4% de otras sustancias. Empezando desde la región exterior, las partes del pericarpio son la cutícula, la epidermis, el mesocarpio, las celdas cruzadas y las celdas tubulares (Bartolo Pérez, Peña, Cruz Orea, & Calderón, 1999). El endospermo es un tejido nutritivo que se encuentra a un lado o rodeando completamente al embrión, es un tejido de reserva que proporciona nutrientes al embrión y a las plantas en sus primeras fases de desarrollo (Megías, Molist, & Pombal, 2015). El germen o embrión es la

estructura a partir de la cual se desarrollará una nueva planta. Se caracteriza por un elevado contenido de grasas, proteínas y minerales.



**Figura 1. Grano de maíz (FAO, 1993)**

### **Maíz criollo del Valle de Oaxaca**

México posee la mayor diversidad genética de maíz, existen reportadas 50 razas, de las cuales 35 se encuentran distribuidas en el estado de Oaxaca (Aragón C.F., S., C., D., & A.V., 2006) Maíz “criollo” es un término que comúnmente se utiliza para denotar que es un material nativo de la comunidad, región, estado o país y que se diferencia de un material extranjero, un maíz híbrido o una variedad mejorada. Está conformado por una población heterogénea de plantas, las cuales son diferenciadas por los agricultores por su color, textura, forma del grano, forma de la mazorca, ciclo de cultivo y uso. Son materiales que han sido desarrollados por los agricultores durante muchos años, mediante una selección empírica, y lo conservan y manejan año tras año en un complejo sistema de intercambio de semillas y genes. También puede considerarse como maíz criollo (“criollo hibridado” o “criollo mejorado”) a la población de plantas resultante de un cruzamiento natural o artificial (cruzamiento realizado por agricultores, por mejoradores o por ambos) con un material mejorado, siempre y cuando la

población tenga un 75% de la constitución genética del material criollo original y solo el 25% del material mejorado (Bartolo Pérez *et al.*, 1999). Oaxaca posee una alta variación genética en el cultivo del maíz por su situación geográfica, alta variación climática, topografía variada, diferentes tipos de suelos, facilidad de entrecruzamiento de esta especie y principalmente debido al gran número de grupos étnicos que han generado diferentes variedades criollas mediante selección a través de miles de años. Actualmente, la mayoría de los agricultores siguen basando su producción en la utilización de variedades locales y continúan aplicando técnicas tradicionales de cultivo. El 90% de la superficie sembrada con maíz se realiza con variedades criollas seleccionadas por los propios productores, 7% con variedades mejoradas de polinización libre y 3% con híbridos (Aragón C.F. *et al.*, 2006). En Oaxaca existe una vasta cultura en el manejo y uso de las variedades criollas de maíz que la hacen un sitio interesante para impulsar la conservación de la riqueza genética existente y buscar estrategias para elevar la producción de los materiales locales.

El maíz criollo y/o híbrido es un sustrato muy favorable para la contaminación por hongos del género *Aspergillus* y algunos aislados de este género son capaces de sintetizar micotoxinas, por lo que el maíz resulta contaminado con estas sustancias.

## **Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos principalmente por los géneros de hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Se considera que son contaminantes naturales que causan reacciones tóxicas e incluso la muerte en animales superiores, cuando son ingeridas con los alimentos. Experimentalmente se han descrito alrededor de 300 micotoxinas de las cuales destacan: Aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>), Ocratoxinas, Tricotecenos, Zearelenona, Fumonisinias y Alcaloides Ergóticos. Estudios de incidencia llevados a cabo en distintos sustratos, muestran que ciertos cultivos son más susceptibles al ataque y colonización por determinados hongos toxigénicos. No todas las cepas de estos géneros fúngicos son capaces de producir micotoxinas, ésta es una característica

de aislado. Los factores ambientales favorables para el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas son temperatura y humedad. Durante la cosecha y el transporte los factores que favorecen la síntesis de micotoxinas son el daño mecánico del grano, temperatura, humedad, época y procedimiento de la cosecha. Durante el almacenado la temperatura, la presencia de esporas y el tipo de almacenamiento son los factores que favorecen la síntesis de AFB<sub>1</sub>.

## Aflatoxinas

Las aflatoxinas son las micotoxinas más tóxicas y altamente carcinógenas producidas por cuatro especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, y *A. tamarii*, solamente *A. flavus* y *A. parasiticus* son de importancia agronómica y estos dos organismos son los más utilizados para estudiar la biosíntesis de aflatoxina. Las aflatoxinas son difurano cumarinas derivadas de policétidos. Emiten fluorescencia bajo la luz ultravioleta de onda larga, de color azul o verde, por esta razón son clasificadas como B (Blue) y G (Green). Se producen 4 tipos de aflatoxina; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Figura 2 (GoldBlatt Leo, 1969; Kelley *et al.*, 2010).

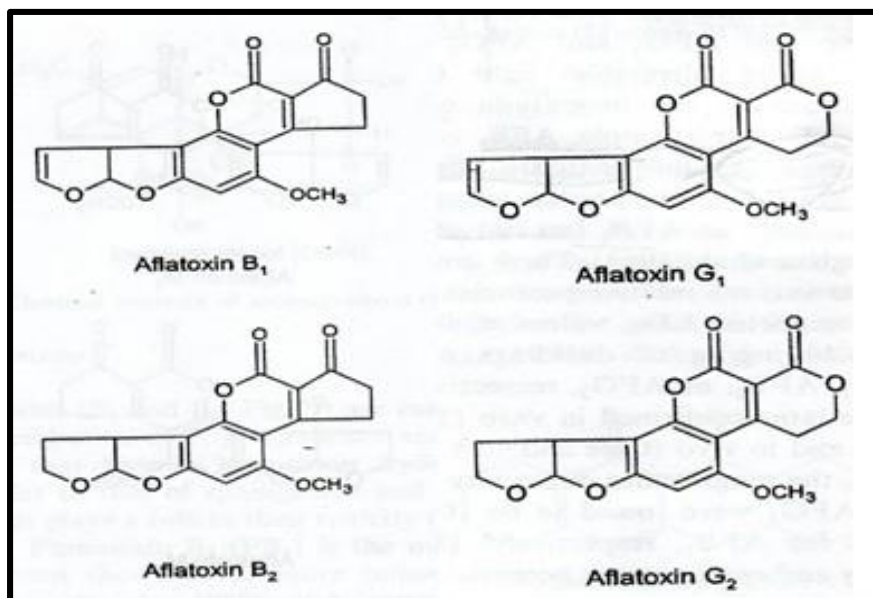


Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas



De todas las micotoxinas la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es considerada como la más peligrosa, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) la clasifica en el Grupo 1, lo que indica que es carcinogénica para humanos y animales. Más de 50 países han establecido límites máximos permitidos de aflatoxinas en alimentos y piensos, de todos ellos la Unión Europea es la que tiene regulaciones más estrictas. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), en Estados Unidos de Norteamérica ha establecido el límite máximo de 20 ppb (20ug/kg) de aflatoxinas totales para el comercio interestatal. Dada la necesidad de controlar la contaminación por AFB<sub>1</sub> en granos y alimentos procesados, por el peligro que representa para la salud humana. Es por ello que la comunidad científica ha realizado estudios con diversos enfoques para tratar de eliminar las aflatoxinas de los cultivos susceptibles, como maíz, algodón, cacahuate y nueces (Robert L Brown *et al.*, 1993).

### **Control de *Aspergillus flavus* productor de aflatoxinas**

Los métodos de control para evitar la de acumulación de AFB<sub>1</sub> en campo, se centran en la prevención de la penetración, crecimiento del hongo y subsecuente formación de toxinas en semillas, así como cosechar los granos en la etapa de madurez y el secado rápido después de cosechar. También, una vez producida la aflatoxina se puede realizar una descontaminación por métodos físicos, químicos y biológicos. Con gas amonio se reduce 99% de la contaminación, pero la FDA no permite utilizar este método para eliminar AFB<sub>1</sub>. Otra alternativa es usar gas Ozono (O<sub>3</sub>) que es un producto inocuo, potente oxidante y esterilizante, muy eficaz para aniquilar hongos y esporas. Como método de control biológico se han utilizado diversos organismos como bacterias, levaduras, hongos y algas; desde 1967 (Lillehoj, Ciegler, & Hall, 1967), encontraron que la bacteria *Flavobacterium aurantiacum* NRRLB-184 removía de manera irreversible AFB<sub>1</sub> en solución; los hongos también pueden servir como agentes biocontroladores por ejemplo las cepas atoxigénicas de *Aspergillus flavus* (Cotty & Bayman, 1993).

Otra forma de controlar la contaminación de AFB<sub>1</sub> sería la resistencia del huésped, (planta de maíz) a la infección por los hongos en el campo, lo que podría disminuir la densidad del inóculo y consecuentemente disminuir la contaminación durante el almacenamiento. Actualmente existe un ensayo en el laboratorio para identificar la resistencia y susceptibilidad a la acumulación de AFB<sub>1</sub> en granos de maíz conocido como: “*Kernel Screening Assay*” (KSA). Este ensayo es sencillo de realizar, los granos utilizados se mantienen durante siete días al 100% de humedad relativa y 31°C, condición que favorece el crecimiento de *A. flavus* y la producción de AFB<sub>1</sub> (Robert L Brown *et al.*, 1993). En resumen las ventajas del KSA son:

- i) Se requieren pocos granos de maíz
- ii) Se puede detectar e identificar diferentes mecanismos de resistencia expresados por el grano.
- iii) Se puede rechazar o confirmar las evaluaciones en campo
- iv) Las relaciones encontradas entre los resultados en laboratorio y las inoculaciones en campo son equivalentes.
- v) Se puede repetir varias veces el ensayo a través del año y fuera de la temporada de crecimiento.

Sin embargo, cabe destacar que las pruebas de campo son irremplazables para la confirmación de la resistencia, pero KSA reduce los ensayos en campo y facilita las investigaciones sobre las respuestas de los granos a la infección fúngica y a la síntesis de aflatoxina (Robert L Brown *et al.*, 1993).

La resistencia de los granos de maíz a la acumulación de AFB<sub>1</sub> es un rasgo multigénico en el que también se involucra la condición ambiental (Z. Chen, Brown, Damann, & Cleveland, 2007). Para comprender el mecanismo de resistencia de maíz contra la infección por *A. flavus* y la acumulación de AFB<sub>1</sub> se han realizado estudios que comprueban que las proteínas contribuyen a la resistencia (Z. Chen *et al.*, 2007; Z-Y Chen *et al.*, 2002).

## **Proteínas asociadas a resistencia RAPs**

(Z. Y. Chen, Brown, Damann, & Cleveland, 2010) compararon proteínas de endospermos y embrión de diferentes genotipos de maíz resistentes y susceptibles a la acumulación de aflatoxinas utilizando la electroforesis de dos dimensiones e identificaron y secuenciaron aproximadamente una docena de proteínas obtenidas del gel. Basados en su homología de péptidos, estas proteínas pueden agruparse en tres categorías:

**a) Proteínas de almacenamiento:** globulina 1, globulina 2, y proteínas de abundantes de embriogénesis tardía (LEA3, LEA14).

**b) Proteínas de respuesta a estrés:** aldosa reductasa (ALD), una peroxiredoxina antioxidante (PER1), una proteína regulada por frío, una proteína inducible a estrés por sequía, una peroxidasa aniónica, una proteína glicoxalasa I (GLX I) y varias proteínas pequeñas de choque térmico (HSP).

**c) Proteínas antifúngicas:** las cuales incluyen un inhibidor de tripsina y una proteína relacionada a patogénesis.

Los granos resistentes a la acumulación de AFB<sub>1</sub> presentaron altos niveles de proteínas antifúngicas, así como de proteínas relacionadas al estrés y proteínas de almacenamiento. Los niveles únicos o elevados de proteínas relacionadas a estrés o constitutivamente expresadas pueden poner a las líneas de maíz resistentes en una posición ventajosa sobre las líneas de maíz susceptible en la habilidad para sintetizar proteínas o defenderse contra patógenos (Z-Y Chen, Brown, Damann, & Cleveland, 2004). Se han encontrado 21 proteínas en altas concentraciones en líneas de maíz resistentes (Tabla 1) en comparación con las encontradas en líneas susceptibles (Robert L Brown *et al.*, 2010).

**Tabla 1. Proteínas Asociadas a la Resistencia de Patógenos y Acumulación de Aflatoxina (RAPs).**

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

Dentro de las diversas proteínas identificadas en líneas de maíz resistentes a la contaminación por *A. flavus* o aflatoxinas, destacan las siguientes ya que por genética inversa se ha conseguido identificar la expresión del gen correspondiente:

**ZmCORP** es una proteína del endospermo del maíz bien caracterizada, clasificada como proteína de estrés por sequía y choque térmico. Tiene una secuencia similar

a proteína regulada por frío con masa molecular de 20 kDa y características semejantes a las de una lectina. Se demostró que esta proteína inhibía la germinación de esporas de *A. flavus* en un 90% y disminuyó la longitud de las hifas en un 46 % (Baker, Brown, Chen, Cleveland, & Fakhoury, 2009).

**Zeamatin** es una proteína inducible por estrés por exceso de agua, también identificada con expresión incrementada en genotipos resistentes de maíz, tiene actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *A. flavus* in vitro (Z. Y. Chen *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 1997)

### **Genes involucrados en la resistencia a la acumulación de AFB<sub>1</sub>**

Se han identificado al menos ocho genes que codifican para la producción de Proteínas Asociadas a Resistencia (RAPs) utilizando genética inversa y han sido mapeados en regiones cromosómicas utilizando la secuencia genética del maíz variedad B73, del cual ya se tiene una línea genética. Los genes se encuentran de forma única o en mayor proporción en líneas de maíz clasificadas como resistentes a la infección de *A. flavus* o a la producción de aflatoxinas (Tabla 2).

**Tabla 2. Mapeo de RAPs en cromosomas de maíz**

<b>Gen RAP</b>	<b>Número de acceso NCBI</b>	<b>Bin</b>
<b>Zeamatin</b>	AAB21820.1	7.04
<b>TI-14 kDa</b>	X54064	2.06
<b>PR 10</b>	AY953127	1.03
<b>GLX I</b>	AY241545	10.3
<b>ZmCOR</b>	CK986091	8.04
<b>WSI</b>	BAA05537	3.07
<b>Heat Shock</b>	AW258080	1.03
<b>Heat Shock</b>	BE123268	8.01

(Robert L Brown *et al.*, 2010)

Por lo tanto, las investigaciones en la resistencia a la acumulación de aflatoxinas se han enfocado en la identificación de genes/proteínas asociadas a la resistencia (RAPs) en el grano de maíz. En estudios de genética inversa se busca la identificación de genes asociados a la resistencia del grano ante la infección de *A. flavus* y acumulación de aflatoxina. Esto puede llevar a descubrir nuevos marcadores y estos marcadores de proteína/gen pueden utilizarse para transferir resistencia en otras líneas.

En esta interrelación maíz-hongo, la resistencia de los granos es importante para controlar la contaminación por aflatoxinas de igual manera es de interés

conocer los factores involucrados en la capacidad toxigénica del hongo involucrado en la relación.

### **Biosíntesis de aflatoxina B1**

La síntesis de aflatoxina ha sido estudiada extensivamente desde su descubrimiento en 1960 y al igual que las rutas biosintéticas de otras micotoxinas, pigmentos y antibióticos, sigue la ruta de los policétidos. El primer intermediario estable es el ácido norsolorónico, después de 23 reacciones se obtiene la AFB<sub>1</sub>. Se ha descrito que en esta síntesis participan alrededor de 25 genes localizados en un clúster de 70 kb, en un cromosoma de 4.9 Mb. De todos estos genes el *afIR* es considerado como un regulador en la biosíntesis de AFB<sub>1</sub> (Georgianna & Payne, 2009; Price *et al.*, 2006). *norB* es otro de los genes implicados en la biosíntesis, se encuentra al inicio de la ruta biosintética de AFB<sub>1</sub> cerca de la síntesis del policétido y es el primer compuesto estable de la ruta (Yu *et al.*, 2004). Este gen codifica un arilo alcohol deshidrogenasa que es altamente homóloga a una enzima codificada por otro gen en el clúster de aflatoxina *norA* (Ehrlich, Yu, & Cotty, 2005).

Por todo lo descrito anteriormente es necesario seguir buscando factores implicados en la resistencia del maíz a contaminación por aflatoxinas. Una alternativa es utilizar maíces criollos que son una fuente de germoplasma no analizado, ni explotado adecuadamente. En este trabajo se propone el uso de razas de maíz criollo para buscar material resistente a la acumulación de aflatoxina y estudiar la transcripción de los genes relacionados.

## HIPÓTESIS

Los maíces criollos del valle de Oaxaca podrían presentar diferencias en la acumulación de aflatoxinas producidas por *A. flavus in vitro* lo que permitiría identificar su susceptibilidad y/o resistencia.

La susceptibilidad o resistencia del maíz a la acumulación de Aflatoxina B<sub>1</sub>, *in vitro* podría estar directamente relacionada a los niveles de transcritos de los genes de maíz (*ZmCOR* y *Zeamatin*) o del *Aspergillus flavus* (*aflR* y *norB*).



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Analizar el comportamiento *in vitro* de 11 razas de maíz del valle de Oaxaca con respecto a la acumulación de AFB<sub>1</sub> después de ser inoculadas con *A. flavus* T-

Identificar si las razas de maíz criollo del valle de Oaxaca que muestren resistencia o susceptibilidad ante la acumulación de aflatoxinas tienen diferentes niveles de expresión de los genes que codifican para algunas proteínas asociadas a resistencia.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar la capacidad toxigénica de la cepa de *Aspergillus flavus* T-1
- Determinar si existen diferencias en el nivel de acumulación de AFB<sub>1</sub> en 11 razas de maíz criollo al ser inoculadas con *Aspergillus flavus* T-1.
- Clasificar las razas de acuerdo a su perfil de acumulación de AFB<sub>1</sub>.
- Determinar si el crecimiento de *A. flavus* T-1 medido por Ergosterol, en la raza susceptible y resistente de maíz criollo y en la variedad de referencia está relacionado con la acumulación de AFB<sub>1</sub>.
- Determinar por RT-PCR si la resistencia a la acumulación de aflatoxinas en dos razas de maíz criollo del Valle de Oaxaca una susceptible y resistente está relacionada con la expresión de los genes *ZmCOR*, *Zeamatin*, *norB* y *afIR*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MATERIALES**

#### **Cepa Utilizada**

Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa *Aspergillus flavus* T-1 aislada de trigo. Este aislado presentó una alta producción de AFB<sub>1</sub>, comprobada cualitativamente mediante TLC y cuantitativamente por HPLC. Su identificación se realizó mediante técnicas de biología molecular (Stock original).

#### **Medio de cultivo**

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) Difco™ BD. El medio se preparó según las indicaciones del fabricante; 39 g/L. El medio se colocó en autoclave a 121°C y 15 lb durante 15 min y se dispuso en cajas Petri estériles (100x15mm) 20 ml/caja.

#### **Reactivos Utilizados**

##### **Desinfección**

- Benzaldehído al 50% (Antibenzil ®)
- Hipoclorito de Sodio al 1.25 % (CLOROX®)
- Etanol al 70% (J.T. Backer)

##### **Extracción de AFB<sub>1</sub>**

- Cloroformo (J.T. Backer)
- Sulfato de Amonio granular (J.T. Backer)
- Papel filtro Whatman de filtrado rápido
- Sulfato de Sodio anhidro (Karal)
- Metanol grado HPLC (J.T. Backer)

## **Extracción Ergosterol**

- Etanol absoluto (J.T. Backer)

## **Extracción de DNA**

- Buffer de extracción CTAB 4x:
  - 1 M Tris-HCl pH 8
  - 5M NaCl
  - 5M EDTA pH 8
  - Agua destilada estéril
- Mercaptoetanol (Sigma)
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (Sigma)
- Isopropanol
- 70% (v/v) Etanol
- Buffer Tris EDTA

## **Extracción de RNA de granos de maíz**

- TRIzol ® (Ambion)
- Cloroformo (J.T.Backer)
- Isopropanol (J.T.Backer)
- 0.8 M Citrato de Sodio
- 1.2 M NaCl (Karal)
- Etanol al 70%( J.T.Baker)
- 8 M Cloruro de Litio (J.T.Baker)
- 3 M Acetato de Sodio pH 5.5
- Etanol absoluto (J.T.Baker)
- DEPC (Sigma)
- Buffer TAE 1x Tris, Acetato y EDTA

Todos los reactivos y solventes grado analítico y grado HPLC fueron adquiridos en Reactivos y Equipo S.A de C.V Irapuato Guanajuato y los reactivos de biología molecular fueron adquiridos en AccesoLab S.A de C.V.

### **Granos de maíz**

Se utilizaron 11 diferentes razas de maíz criollo procedente de distintas regiones del Estado de Oaxaca donadas amablemente por el M. en C. Marco Antonio Sánchez Medina del Instituto Tecnológico de Oaxaca.

**Tabla 3. Características de las 11 razas de maíz criollo del Estado de Oaxaca**

<b>Clave</b>	<b>Lugar de origen</b>	<b>Raza</b>	<b>Color</b>
<b>MSCA1</b>	Santa Cruz Mixtepec	Vandño	Amarillo
<b>MAHB15</b>	San Antonio Huitepec	Zapalote	Blanco
<b>MAHN16</b>	San Antonio Huitepec	Elotes cónicos	Negro
<b>MAHA18</b>	San Antonio Huitepec Zaachila	Arrocillo	Amarillo
<b>MTLB19</b>	Tuxtepec Loma Bonita	Vandño	Blanco
<b>MTLN23</b>	Tlahuitoltepec	Vandño	Naranja
<b>MSHR25</b>	San Antonio Huitepec	Elotes cónicos	Rojo
<b>MPER28</b>	Soledad Peras Serrano	Serrano	Rojo
<b>MJMA30</b>	San Juan Metaltepec	Elotes cónicos	Amarillo
<b>MTLP31</b>	Tlahuitoltepec	Tuxpeño	Pinto

<b>MLTB27</b>	*Pendiente	Blanco
---------------	------------	--------

Se utilizó el maíz amarillo variedad B73 amablemente donada por el Dr. Axel Tiessen del Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular de la Unidad Irapuato como una referencia ya que ha sido reportada por (Baker *et al.*, 2009) como una variedad de maíz susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>. Todos los granos secos se guardaron en bolsas de plástico a 4°C.

### **Oligonucleótidos de las regiones ITS 1 e ITS2**

Se utilizaron los ITS 1 e ITS 2 para la identificación de género y especie del aislado de trigo, se mandaron sintetizar a la empresa Sigma-Aldrich ®, la secuencia se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para identificación de la cepa *A. flavus*.**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Tamaño de producto (pb)</b>
<b>ITS 1</b>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	290
<b>ITS 2</b>	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	290

### **Oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de resistencia y genes implicados en la síntesis de aflatoxina.**

Se utilizaron los oligonucleótidos Actina y 18 S como control positivo de la PCR, para maíz y hongo respectivamente (Baker *et al.*, 2009).

**Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para identificación de genes**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Tamaño de Banda (pb)</b>
<b>Actina</b>	F- GTGACAATGGCACTGGAATG R- GACCTGACCATCAGGCATCT	905
<b>ZmCOR</b>	F- CAATCCAACACTCGGGACGA R- TGTGTTAGTTGTTGGCGACG	656
<b>Zeamtin</b>	F- CGCTGAAGCAGTTCAACAAC R- CACAGCCTCGGTCGTTTATT	431
<b>18S</b>	F-TTCCTAGCGAGCCCAACCT R-GACGACGACCCAACACACA	366
<b>norB</b>	F- CGAATTGGCTTCGCTCCCTC R- CGAATTGGCTTCGCTCCCTC	250
<b>aflR</b>	F-CCGGGATAGCTGTACGAGTTG R- GGAAGACAGGGTGCTTTGCT	448

## MÉTODOS

### Preparación del Stock de *A. flavus*T-1

1. Sembrar 200 µl de la suspensión de esporas (Stock original) en medio PDA
2. Incubar siete días a 28°C
3. Recuperar las esporas adicionando 25 ml de agua destilada estéril con Tritón X-100 al 0.01%
4. Raspar la superficie con un asa estéril y dejar reposando diez minutos.
5. Recuperar la suspensión de esporas con pipeta Pasteur
6. Dispensar en un tubo Falcon estéril de 50 ml y se someter a choque térmico a 4°C durante 12 horas, con la finalidad de homogeneizar la germinación

### Determinación de la concentración de esporas

1. Realizar una dilución de la solución stock de *A. flavus* 1:10 (100 µl de la suspensión de esporas y 900 µl de agua destilada estéril)
2. Llevar a cabo el conteo de esporas con la cámara de Neubauer a 40 X
3. Utilizando el cuadrante A, se contaron 5 cuadros utilizando la siguiente fórmula para calcular la concentración de esporas:

$$\frac{\sum 5 \text{ cuadros } A}{5} \times (1.6 \times 10^5) = \text{esporas/ml}$$

4. La suspensión de esporas que se utilizó fue de  $1 \times 10^6$  esporas/ml

### Desinfección superficial de los granos de maíz

Se utilizó el método de (Li & Kang, 2005) que asegura una doble desinfección de la superficie de los granos de maíz ya que se utilizan dos diferentes desinfectantes. Se realizó de la siguiente manera:

1. Lavar los granos con agua destilada para eliminar cualquier contaminación física superficial
2. Remojar en una solución de etanol al 70% durante 3 minutos en un vaso de precipitados
3. Desechar la solución y enjuagar con agua destilada estéril
4. Agregar una solución de hipoclorito de sodio al 1.25 % durante 3 minutos
5. Enjuagar con agua destilada estéril
6. Dejar escurrir sobre una gasa estéril durante 10 minutos.

Una vez estériles se utilizaron para ser inoculadas con el hongo micotoxigénico.

### **Inoculación de los granos con *A. flavus* T-1**

Se siguió el método “Kernel Scening Assay” (KSA) de (Robert L Brown *et al.*, 1993) el cual consiste en colocar con pinzas 4 granos de maíz, previamente desinfestados, en cajas Petri de 15x60 mm bajo condiciones de esterilidad, cada caja es una unidad experimental. Se inocularon 10 unidades experimentales de cada raza criolla. Las unidades experimentales se colocaron en cajas de plástico limpias, previamente esterilizadas con benzaldehído al 50% y se colocaron toallas de papel (Sanitas) humedecidas con 50 ml de agua estéril y 2 cajas Petri con agua para mantener la caja con humedad.

La inoculación de los granos se realizó de manera individual con 20  $\mu$ l de la suspensión de esporas de *A. flavus* T-1 ( $1 \times 10^6$  esporas/ml) correspondiente a  $2 \times 10^4$  esporas/grano. Las unidades experimentales ya inoculadas fueron mantenidas en las cajas de plástico cerradas y se incubaron a 30°C durante 7 días.



## **Método de extracción de aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>) de granos de maíz**

La aflatoxina B1 fue extraída de cada unidad experimental como se describe a continuación:

1. Moler los 4 granos de maíz correspondientes a cada unidad experimental en un molino mezclador MM30 Retsch ® durante 15 segundos a una frecuencia de 30 1/s de, se obtuvo un polvo muy fino
2. Adicionar 10 ml de cloroformo a la muestra de maíz molida contenida en un frasco de vidrio
3. Dejar reposar 18 horas a 4°C en obscuridad
4. Adicionar 2 gramos de sulfato de amonio granular
5. Filtrar al vacío a través de papel filtro y sulfato de sodio anhidro a través de embudo Buchner
6. Recuperar el filtrado en matraz Kitasato y transferir a un frasco limpio y evaporar a sequedad en baño María (65°C)
7. Dejar enfriar y resuspender el residuo con 1 ml de metanol grado HPLC
8. Filtrar el extracto por columnas Extract Clean™ C18 de 1.5 ml (GRACE) para eliminar impurezas
9. Dispensar en viales ámbar y guardar a 4°C hasta su cuantificación por HPLC

## **Extracción de AFB<sub>1</sub> de los embriones de la raza susceptible y resistente a la acumulación de AFB<sub>1</sub>**

Se utilizó el método reportado por (Kale *et al.*, 2008) modificado, el cual consiste en los siguientes pasos:

1. Colocar 250 mg de maíz molido proveniente de cada unidad experimental en un tubo Falcon
2. Adicionar 5 ml de acetona y manteniendo en agitación constante en Roto Mix durante 10 minutos
3. Detener la agitación, dejar reposar durante 5 min a temperatura ambiente
4. Adicionar 5 ml de cloroformo, agitar 10 min y dejar reposar 10 min a temperatura ambiente pasar el tubo por el Vortex por 10 segundos.
5. Centrifugar a 2600 rpm durante 15 minutos coleccionar la fase orgánica en frasco de vidrio y desechar el residuo de maíz
6. Evaporar en baño María y dejar enfriar los frascos
7. Resuspender el residuo con 1 ml de metanol HPLC
8. Filtrar por columna Extract Clean™ C 18 de 1.5 ml (GRACE) para eliminar impurezas y recuperar en viales ámbar, guardar a 4°C hasta su cuantificación por HPLC.

### **Determinación Cualitativa de AFB<sub>1</sub>**

Se realizó cromatografía por capa fina (TLC) utilizando cromatofolios AL TLC Silica gel 60 W 20x20cm (Merk), se activó el cromatofolio en el horno a 80°C durante 40 min, se aplicaron volúmenes de 20 µl de estándar de AFB<sub>1</sub> y de las muestras con jeringa de 25µl (Hamilton), la jeringa se enjuaga con metanol y acetona entre la aplicación de cada repetición.

Las placas se corrieron ascendentemente en una cámara de vidrio con una mezcla de cloroformo-acetona 85:15. Se dejaron secar y se observaron con luz U.V. de longitud larga en cámara de luz U.V. (Chromato-Vue modelo CC-20G).

## **Determinación Cuantitativa de AFB<sub>1</sub>**

La cuantificación de la acumulación de aflatoxina en los granos se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Se inyectaron 20 µl del extracto de la muestra al equipo Agilent Technologies, serie 1200 utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical de 4.6 x 150 mm con un tamaño de partícula de 5µm con el siguiente sistema de solventes. Fase A metanol 100%; Fase B: agua: acetonitrilo: metanol (60:20:20) en una proporción de 25% A y 75% B método isocrático por 15 minutos. La longitud de onda de detección fue de 364 nm. Al inicio de cada análisis se inyectó un estándar de AFB<sub>1</sub> para conocer el tiempo de retención.

## **Determinación de crecimiento fúngico**

### **Método de Extracción de Ergosterol**

Para determinar el crecimiento fúngico se utilizó la técnica de Ergosterol utilizando la siguiente metodología modificada reportada por (Richardson & Logendra, 1997)

1. Colocar 100 mg de la unidad experimental en un tubo Eppendorf de 2 ml
2. Agregar 500 µl de etanol absoluto a 4°C
3. Mezclar y dejar reposar en hielo
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo
6. Adicionar 500 µl de etanol absoluto a 4°C
7. Mezclar y centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C
8. Juntar los sobrenadantes
9. Agregar 500 µl de etanol absoluto a 4°C A la pastilla

10. Mezclar y centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C
11. Juntar los sobrenadantes y desechar el tubo con la pastilla
12. Pasar por columna Extract Clean™ C 18 de 1.5 ml (GRACE)
13. Colectar en un vial ámbar, mantener las muestras a 4°C hasta su lectura en HPLC

La determinación de la producción total de Ergosterol se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con un equipo Agilent Technologies, serie 1200 utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical de 4.6 x 150 mm con un tamaño de partícula de 3.5 µm. La fase móvil empleada fue metanol 100% con un flujo de 0.8ml/min, la longitud de onda de detección fue de 280 nm. Al inicio de cada análisis se inyectó un estándar de Ergosterol para conocer el tiempo de retención.

## **Métodos de Biología Molecular**

### **Método de Extracción de DNA de granos de maíz**

Se utilizó el protocolo de extracción de DNA vegetal mediante el agente químico CTAB reportado por (Morillo & Miño Castro, 2011) se usó maíz de la unidad experimental molido.

1. Colocar 0.5 mg aproximadamente la punta del tubo Eppendorf de 1.5 ml
2. Adicionar 1 ml de buffer de extracción CTAB 4X calentado previamente a 65°C por 1 minuto
3. Agregar 25 µl de mercaptoetanol
4. Incubar a 65°C en block de calentamiento durante 2 horas agitando cada 30 minutos
5. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C

6. Tomar el sobrenadante aforar los tubos a 1 ml con el buffer de extracción
7. Adicionar 1ml de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y agitar
8. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 4°C
9. Capturar el sobrenadante sin llevar la interfase
10. Adicionar isopropanol en la misma cantidad que se obtuvo de sobrenadante
11. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C
12. Retirar el isopropanol y lavar con 1 ml de etanol al 70%
13. Secar la pastilla de DNA formada a temperatura ambiente durante 30 min
14. Resuspender el DNA en 50 µl de buffer TE
15. Mantener a 4°C durante toda la noche
16. Cuantificar en Nanodrop y se correr un gel de agarosa al 1.2 % para observar integridad del DNA

### **Método de Extracción de RNA de grano de maíz y embriones**

Se realizó la extracción de RNA utilizando el protocolo de TRIZOL modificado por el laboratorio de Metabólica y Fisiología celular para muestras con alto contenido de almidón, para esto se molió la muestra en molino enfriando la muestra y los recipientes de molienda con nitrógeno líquido.

1. Tomar 100 mg de tejido congelado (grano de maíz o embrión de maíz de 72 horas) con nitrógeno líquido y agregar 1000 µl de TRIZOL esperar a que se descongele la muestra en el TRIZOL con el tubo en hielo
2. Agitar en Vortex y dejar a temperatura ambiente 10 min
3. Agregar 200 µl de cloroformo

4. Mezclar por inversión hasta formar una emulsión dejar reposar 2 minutos
5. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min a 4°C
6. Recuperar 200 µl la fase superior en un tubo nuevo asegurando de no llevar contaminantes y desechar la pastilla
7. Añadir 200 µl de isopropanol y 200 µl de citrato de sodio 0.8 M- NaCl 1.2 M y dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente
8. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C y se desechar el sobrenadante sin perder la pastilla
9. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 8 rpm por 5 min.
10. Desechar el sobrenadante y dejar secar la pastilla al aire con el tubo invertido y destapado
11. Agregar 50 µl de LiCl 8 M, dejar 2 horas a 4°C
12. Centrifugar a 10000 rpm por 15 min a 4°C desechar el sobrenadante
13. Agregar 100µL de agua estéril, 10µL de acetato de sodio 3M pH 5.5 y 250µL de etanol absoluto e incubar 1 hora a -20°C
14. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a 4°C
15. Desechar el sobrenadante
16. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%
17. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min 4°C
18. Eliminar el sobrenadante y dejar secar
19. Resuspender la pastilla en 50µl agua DEPC

20. Cuantificar en Nanodrop y se verifico su integridad, corriendo un gel de electroforesis de agarosa UltraPure (Invitrogen) al 1.2% en TAE 1X.

## **Reacción RT- PCR**

### **Diseño de los oligonucleótidos para determinar expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de aflatoxina**

Los oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de los genes se diseñaron basándonos en la región conservada de los genes en el portal NCBI/ Oligonucleótido-BLAST, se utilizaron las secuencias del genoma del maíz de referencia “B73” y en el caso de *Aspergillus flavus* se seleccionaron los oligonucleótidos convenientes y se realizó el alineamiento in silico en el portal: [genomaize.org/cgi-bin/hgPcr](http://genomaize.org/cgi-bin/hgPcr)

### **Normalización de condiciones de amplificación**

Se realizó una PCR utilizando DNA extraído de maíz B73 para los oligonucleótidos ZmCOR y Zeamatin y para los oligonucleótidos implicados en la síntesis de aflatoxina *aflR* y *norB*, se utilizó DNA extraído de *Aspergillus flavus* T-1. Se probaron diferentes temperaturas y ciclos en el termociclador.

### **Preparación de la muestra de RNA para eliminar DNA**

Las muestras de RNA se trataron “Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen) para eliminar el DNA agregando en un tubo para microcentrífuga:

- 1 µg de RNA muestra
- 1 µl 10X DNasa, 1 Reaction Buffer
- 1 µl DNasa I, Amp. Grade 1 V/µl
- 10 µl de agua con DEPC.

Una vez preparada la mezcla de reacción se incubó el tubo por 15 min a temperatura ambiente transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la DNasa agregando 1  $\mu$ l of 25 mM EDTA y calentando a 65°C durante 10 minutos.

### **Síntesis de cDNA**

Se sintetizó cDNA utilizando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription kit” de Thermofisher, utilizando reacciones de 20  $\mu$ l, en un tubo se preparó la mezcla de reacción agregando:

- 2 $\mu$ l de 10X RT Buffer
- 0.8  $\mu$ L de 25X dNTP Mix(100mM)
- 2 $\mu$ l de 10x RT Random primers,
- 1 $\mu$ l de Multi Scribe reverse Transcriptase,
- 1 $\mu$ l de RNase Inhibitor
- 3.2  $\mu$ l de agua DEPC
- 10  $\mu$ l de muestra de RNA mezclar la reacción y dar spin.
- colocar el tubo con 20  $\mu$ l en termociclador para llevar a cabo la transcripción inversa, como indica el proveedor con las siguientes condiciones: 25°C, 10 min, 37°C, 120 min, 85 °C, 5 min, 4°C,  $\infty$ .

### **Reacción de cadena de polimerasa (RT-PCR)**

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial, 95°C por 5 minutos; desnaturalización: 30 ciclos 95°C por 30 segundos; alineamiento: 60°C por 30 segundos; extensión: 72°C por un minuto y extensión final: 72°C por 10 minutos. Se corrieron los geles en agarosa al 1.2% utilizando SYBR Safe DNA Gel stain (Thermo Fisher) para teñir el gel y observarlo en el fotodocumentador.



Para llevar a cabo la reacción de RT-PCR se utilizaron reacciones de 25µl con los siguientes reactivos y cantidades 2.5µl de Buffer 10X, 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5µl de dNTP's, 0.5 µl de oligo Forward, 0.5µl de oligo Reverse, 0.25 µl de Taq polymerase, 1µl de cDNA, y 19 µl de agua DEPC.

## EXPERIMENTOS

### Identificación de la cepa *A. flavus* T-1

Se realizó una observación macroscópica y microscópica del aislado después de su incubación y crecimiento durante seis días en medio PDA.

El DNA extraído de *A. flavus* T-1 obtenido con el agente químico CTAB como se describió en la sección de Métodos, se utilizó para realizar la identificación molecular del hongo aislado de trigo. Se amplificó la región ITS1- ITS 2 de los genes ribosómicos 5.8 S, utilizando los oligonucleótidos específicos mostrados en la Tabla 3, previamente reportados por (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) y el Kit Super Mix High Fidelity (Invitrogen) para la realización de la reacción de PCR. Las condiciones en el termociclador fueron: 94°C-5 min, y 35 ciclos de desnaturalización 94°C- 40 s, alineamiento 55°C- 1 min, polimerización 72° 40 s y al final 72°C 5 min.

Para la identificación del género y especie del hongo aislado de trigo. El producto de PCR se mandó secuenciar, se alineó la secuencia y se comparó con las secuencias ya existentes en la colección de nucleótidos de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa BLAST.

### Determinación de la capacidad micotoxigénica del aislado de *A. flavus* T-1 en maíz criollo de Oaxaca región la “Asunción”

Para confirmar la capacidad toxígena de la cepa *A. flavus* T-1, productora de AFB<sub>1</sub>, se realizó el siguiente experimento: Se colocaron 10 unidades experimentales de maíz criollo inoculadas con 20 µl de agua destilada estéril (Control) y 10 unidades experimentales inoculadas con 20 µl de una suspensión de esporas *A. flavus* T-1 que contenía 2x10<sup>4</sup> esporas. Las cajas conteniendo las unidades experimentales de cada tratamiento por triplicado se incubaron durante 7 días a 30°C. Se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas de los granos de maíz de cada unidad experimental y se tomaron datos de crecimiento

fúngico. La AFB<sub>1</sub> se extrajo utilizando el primer método descrito en la sección de métodos, los extractos obtenidos se guardaron en viales ámbar a 4°C y la cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), inyectando 20 µl de muestra en el cromatógrafo como se describe en la sección de métodos. Se obtuvieron los cromatogramas y se realizaron los cálculos comparando con los datos del estándar de AFB<sub>1</sub> y se realizó el análisis estadístico.

### **Clasificación de las razas de maíz criollo Oaxaqueño en base a su capacidad a la acumulación de AFB<sub>1</sub>**

Para clasificar las 11 razas de maíz criollo en cuanto a su capacidad de acumulación de AFB<sub>1</sub> (razas resistentes y razas susceptibles), se realizó el ensayo KSA. Para esto, se colocaron 10 unidades experimentales de cada una de las razas inoculadas con 20µl de agua destilada estéril (Control) y 10 unidades experimentales inoculadas con 20 µl de una suspensión de esporas 2x10<sup>4</sup> esporas de *A. flavus* T-1 y se incubaron 7 días a 30°C. Posteriormente se realizaron observaciones macroscópicas y se extrajo la AFB<sub>1</sub> con el primer método descrito en la sección de métodos. La cuantificación se realizó por HPLC utilizando las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas, comparándolos con los datos del estándar. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Con base en esta información se eligieron dos razas de maíz criollo: las que tuvieron alta acumulación de AFB<sub>1</sub> (raza susceptible) y baja acumulación de AFB<sub>1</sub> (raza resistente).

### **Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio de las 30 unidades experimentales. Los datos fueron evaluados mediante el análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre la acumulación de AFB<sub>1</sub>. La prueba de Fisher fue utilizada para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos con un valor  $p < 0.05$ . Los análisis se realizaron mediante el empleo del software XLSTAT.

## **Obtención de RNA de granos secos de maíz, de granos de maíz frescos y de embriones**

Se realizó la extracción de RNA de la raza MAHN16, MSHR25 y la variedad B73 del grano seco con el protocolo de TRIzol® modificado, descrito en la sección de Métodos. Los granos de cada unidad experimental se molieron en un mortero con nitrógeno líquido, 100mg muestra se colocaron en un tubo Eppendorf® para extraer RNA como se describe en la sección de Materiales. La cuantificación se realizó determinando la relación de absorbancia a 260/280nm en un espectrofotómetro y para determinar la integridad de RNA se analizó por electroforesis en un gel de agarosa.

Para la extracción de RNA de maíz fresco y de embriones se utilizó el grano entero y fresco se congeló, se molió en mortero con nitrógeno líquido, se tomaron 100 mg y se colocaron en tubo Eppendorf se prosiguió el protocolo de extracción de RNA descrito en la sección de métodos, se estimó la concentración en espectrofotómetro y se corrió un gel de agarosa para ver la integridad del RNA.

## **Determinación de crecimiento fúngico, acumulación de AFB<sub>1</sub> y transcripción de genes (*ZmCOR*, *Zeamatin*, *afIR* y *norB*) en embriones de MAHN16 (“raza susceptible”), MSHR25 (“raza resistente”) y maíz B73 (variedad susceptible).**

Se realizó este experimento para evaluar el crecimiento fúngico por la técnica de Ergosterol, la acumulación de AFB<sub>1</sub> y los niveles de transcrito de los genes de interés en los embriones de las razas MAHN16 (susceptible), MSHR25 (resistente) y la variedad B73 (susceptible).

Para obtener los embriones de las razas de maíz fue necesario saturar de humedad las cajas Petri. Para ello se colocó algodón humedecido con agua destilada estéril y sobre él los granos de maíz. Los granos de 10 unidades experimentales fueron inoculadas con 20 µl de agua destilada estéril (Control) y los granos de 10 unidades experimentales inoculadas con 20 µl de una suspensión de  $2 \times 10^4$  esporas de *A. flavus* T-1, se incubaron durante 72 horas a

30°C. Para mantener la humedad relativa alta las unidades experimentales, se mantuvieron en cajas de plástico saturadas con agua. Los embriones del maíz de las dos razas seleccionadas y del control se separaron del endospermo con un bisturí estéril, se dispensaron en tubos Falcon® de manera independiente y se mantuvieron congelados con nitrógeno líquido hasta su molienda con mortero y nitrógeno líquido. Los embriones molidos de MAHN16, MSHR25 y B73 fueron divididos en diferentes cantidades de la siguiente manera: 100 mg para RNA; 500 mg para extracción de AFB<sub>1</sub> y 250mg para le extracción de Ergosterol. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada unidad experimental siguiendo la metodología descrita en la sección de métodos.

#### **Extracción de Ergosterol de los embriones de las razas MAHN16 (susceptible), MSHR25 (resistente) y la variedad B73 (susceptible)**

Con los dos tubos que tenían los 250 mg de muestra se realizó la extracción de Ergosterol como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se guardaron los viales y se cuantificaron por HPLC, se obtuvieron los cromatogramas y se realizaron los cálculos comparando con los datos del estándar de Ergosterol y se realizó el análisis estadístico.

#### **Extracción de AFB<sub>1</sub> de los embriones de las razas MAHN16 (susceptible), MSHR25 (resistente) y la variedad B73 (susceptible)**

Se realizó la extracción de AFB<sub>1</sub> de los 2 tubos con 500 mg de muestra cómo se describe en la sección de materiales se guardaron los viales y se cuantificaron por HPLC, se obtuvieron los cromatogramas y se realizaron los cálculos comparando con los datos del estándar de AFB<sub>1</sub> y se realizó el análisis estadístico

#### **Extracción de RNA de los embriones de las razas MAHN16 (susceptible), MSHR25 (resistente) y la variedad B73 (susceptible)**

Se realizó la extracción de RNA juntando todas las unidades experimentales (no se realizó de forma individual como se había hecho en los

experimentos anteriores) estas eran 40 embriones del tratamiento con agua destilada estéril (no inoculado) y de los 40 embriones del tratamiento inoculado con la suspensión de *A. flavus* T-1 se molieron con mortero y nitrógeno líquido, se tomaron 100 mg se colocaron en un tubo Eppendorf y se prosiguió con la extracción como se describe en la sección de materiales. Se cuantificó en espectrofotómetro y se corrió un gel de agarosa para ver la integridad del RNA.

### **Transcripción de los genes: *ZmCOR* y *Zeamatin* de los embriones de las razas MAHN16 (susceptible), MSHR25 (resistente) y la variedad B73 (susceptible)**

Con el RNA extraído de embriones de las razas MAHN16, MSHR25, y B73 de buena concentración e íntegro se procedió realizar la retrotranscripción del RNA para obtener el cDNA y realizar la reacción de RT-PCR semicuantitativo.

Se trató 1 µg de RNA con DNAsa y se sintetizó el cDNA con el Kit como se describió anteriormente. Se utilizaron reacciones de 25 µl como se describe en la sección de métodos, los oligonucleótidos utilizados fueron Zeamatin, ZmCOR y Actina (gen constitutivo) se realizaron geles de agarosa al 1.2 % para observar la expresión de los genes de resistencia a acumulación de AFB<sub>1</sub>.

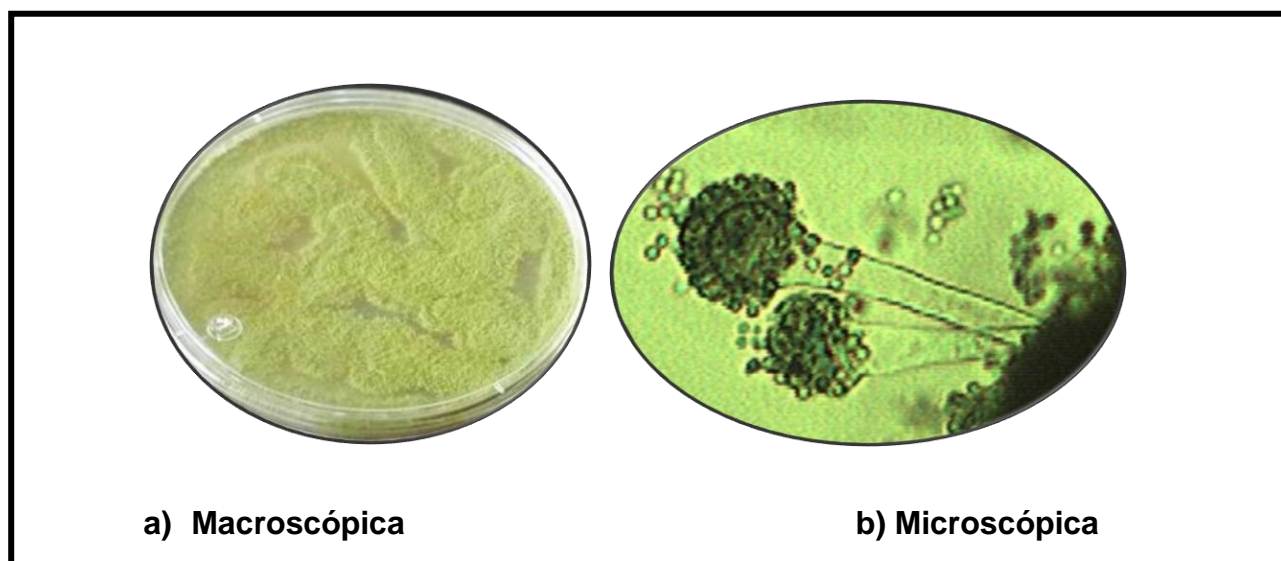
### **Determinación de la transcripción de los genes: *afIR* y *norB* de los embriones de las razas MAHN16 (susceptible), MSHR25 (resistente) y la variedad B73 (susceptible)**

Se llevó a cabo una PCR-semicuantitativa con los oligonucleótidos **afIR** y **norB** para identificar los genes involucrados en la síntesis de aflatoxina, se utilizó el gen 18 S (gen constitutivo) como control. Se realizaron geles de agarosa 1.2% para observar la expresión de los genes de resistencia a acumulación de AFB<sub>1</sub>.

## **RESULTADOS**

### **Identificación de la cepa *A. flavus* T-1**

La morfología macroscópica de este aislado correspondió a *Aspergillus flavus* es una cepa de crecimiento rápido, aspecto afelpado, esporulación color verde-amarillo oscuro. La morfología microscópica teñida con azul de bromofenol mostró cabezas conidiales típicas de *Aspergillus flavus* con una sola capa de fialides como se observa en la Figura 3.



**Figura 3. Morfología de *Aspergillus flavus***

El aislado *A. flavus* T-1 presentó 99% de similitud con las regiones del RNA ribosomal 18S de *Aspergillus flavus*. Se comprobó de manera cualitativa que el aislado *A. flavus* T-1 producía AFB<sub>1</sub> en medio PDA mediante la observación de la fluorescencia azul a través de luz UV. Sin embargo era necesario determinar la variabilidad de la capacidad micotoxigénica del aislado de forma cuantitativa.

#### **Determinación de la capacidad micotoxigénica del aislado de *A. flavus* T-1 en maíz criollo de Oaxaca región “Asunción”.**

La capacidad micotoxigénica del aislado se determinó utilizando el método “Kernel Screening Assay” (KSA) en maíz inoculado con *A. flavus* T-1 y maíz sin inocular. Los resultados obtenidos de la cuantificación por HPLC de AFB<sub>1</sub> se muestran en la Tabla 6. Cada valor corresponden a la cantidad de AFB<sub>1</sub> de cada una de las 10 repeticiones.

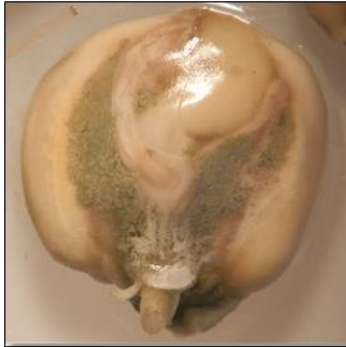
**Tabla 6. Cantidad de AFB<sub>1</sub> producida por *A. flavus* T-1 en maíz criollo.**

<b>Concentración de AFB<sub>1</sub> (µg de AFB<sub>1</sub>/g de maíz)</b>		
<b>Repetición</b>	<b>Maíz no inoculado</b>	<b>Maíz inoculado con <i>A. flavus</i> T-1</b>
<b>1</b>	4.987	6.607
<b>2</b>	5.773	6.860
<b>3</b>	5.833	6.980
<b>4</b>	7.527	8.093
<b>5</b>	8.000	16.933
<b>6</b>	9.787	19.087
<b>7</b>	13.267	20.600
<b>8</b>	13.553	24.673
<b>9</b>	18.480	32.753
<b>10</b>	18.980	34.353
<b>Media</b>	<b>10.619<sup>± 5</sup></b>	<b>17.694<sup>± 11</sup></b>

Se observa que cuando no se inoculó con *A. flavus* T-1 la concentración media de AFB<sub>1</sub> fue de 10.619 µg de AFB<sub>1</sub>/g de maíz, mientras que en el maíz inoculado con *A. flavus* T-1 alcanzó valores de 17.694 µg de AFB<sub>1</sub>/g de maíz. Así mismo, se muestran los valores con el tratamiento no inoculado, acumuló AFB<sub>1</sub> desde 4.987µg de AFB<sub>1</sub>/g de maíz hasta 18.980 µg por gramo de maíz criollo, lo



cual ilustra que la flora interna natural del maíz tiene la capacidad de producir AFB<sub>1</sub>. Además se observó que *A. flavus* T-1 creció abajo de la cutícula del maíz dando un color verde que contrastaba con el resto del tejido del maíz (Figura 4).



**Figura 4. Crecimiento del hongo dentro de grano de maíz**

El maíz criollo inoculado, acumuló AFB<sub>1</sub> desde 6.607µg de AFB<sub>1</sub>/g de maíz hasta 34.353 µg de AFB<sub>1</sub>/g por gramo de maíz. Estas son cantidades mayores a las acumuladas en el tratamiento no inoculado lo que indica que al inocular *A. flavus* T-1 se produce una mayor cantidad de AFB<sub>1</sub>. La desviación estándar entre las réplicas es de 5 unidades en el tratamiento no inoculado y 11 unidades en el tratamiento inoculado, esto demuestra que hay una gran variación entre repeticiones.

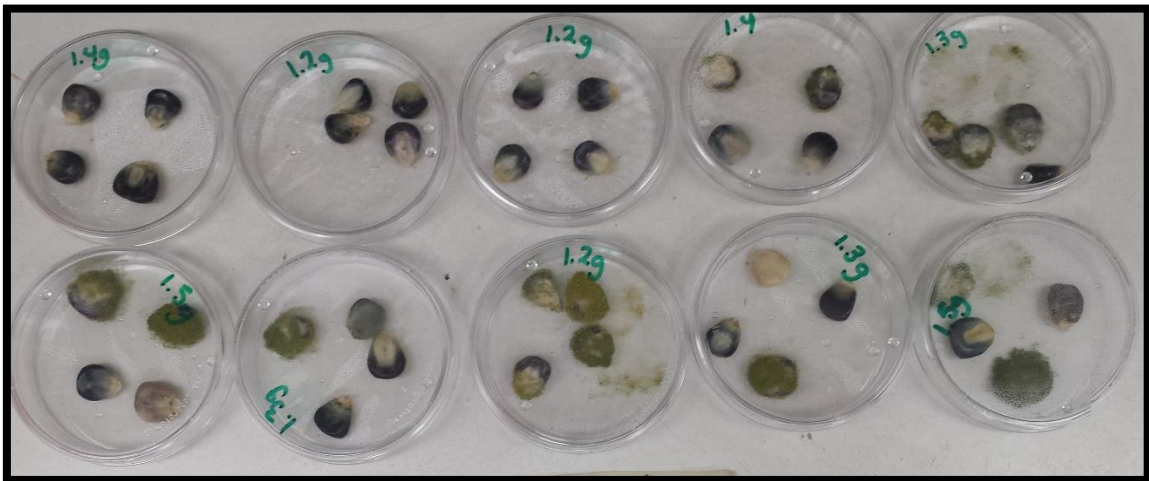
#### **Clasificación de las razas de maíz criollo en base a su capacidad a la acumulación de AFB<sub>1</sub>**

Las 11 razas de maíz criollo se clasificaron de acuerdo a su capacidad de acumular AFB<sub>1</sub> después de inocular con *A. flavus* T-1, extraer y cuantificar la AFB<sub>1</sub>, utilizando el método “Kernel Screening Assay” (KSA) (Robert L Brown *et al.*, 1993) con dos tratamientos: No Inoculado e Inoculado con *A. flavus* T-1. Se realizó a la par un experimento con la variedad B73 como una referencia ya que es una variedad híbrida que se ha reportado por (Kelley *et al.*, 2012) como susceptible ante la acumulación de AFB<sub>1</sub>.

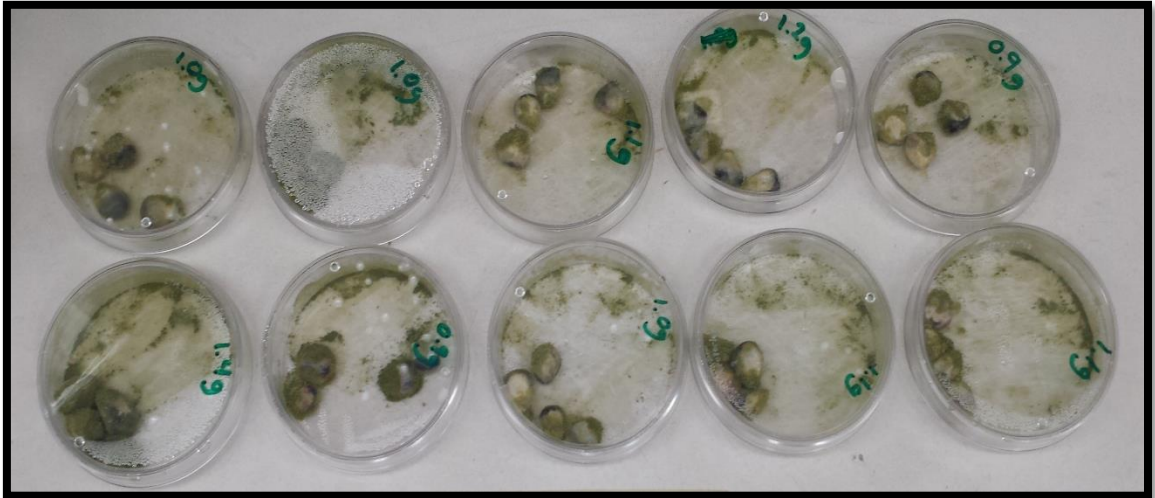
## Crecimiento Fúngico en el maíz criollo

El crecimiento fúngico en las razas de maíz fue muy diferente entre las razas y entre los tratamientos, por ejemplo la raza MAHN16, no inoculada (Figura 5 a) se presentó escaso crecimiento fúngico el cual corresponde a la flora interna natural de los granos. Como se observa en la (Figura 5 a), 12 de los 40 granos no presentaron ningún crecimiento. El crecimiento fúngico en los otros 28 granos fue mayor. En contraste el tratamiento inoculado con *A. flavus* T-1, presentó crecimiento abundante en los 40 granos inoculados. (Figura 5 b).

Resultó interesante observar que en la raza MSHR25 el maíz no inoculado con *A. flavus* T-1 no presenta crecimiento fúngico en ninguno de los 40 granos (Figura 6 a) lo cual indica que el maíz no contenía flora interna natural. De igual manera, en el maíz MSHR25 inoculado con *A. flavus* T-1 solo 12 granos presentaron escaso crecimiento (Figura 6 b).

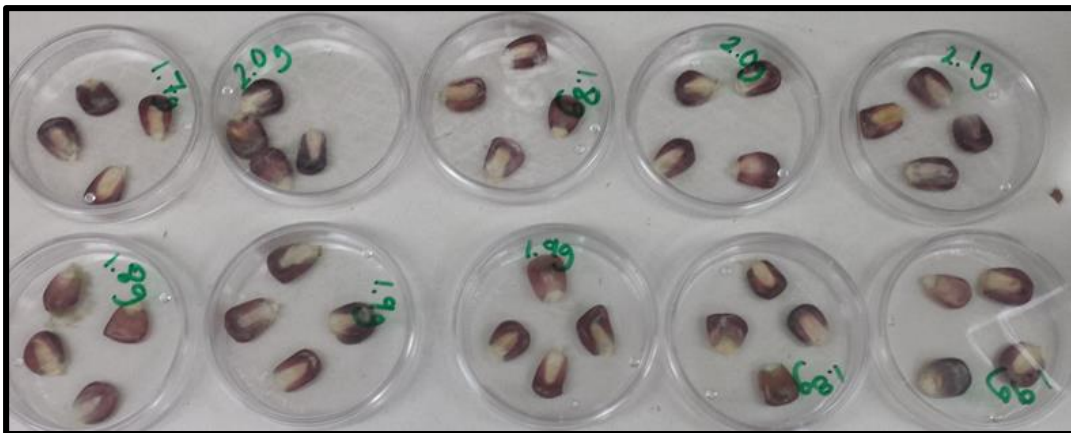


a) Maíz no inoculado con *A. flavus* T-1

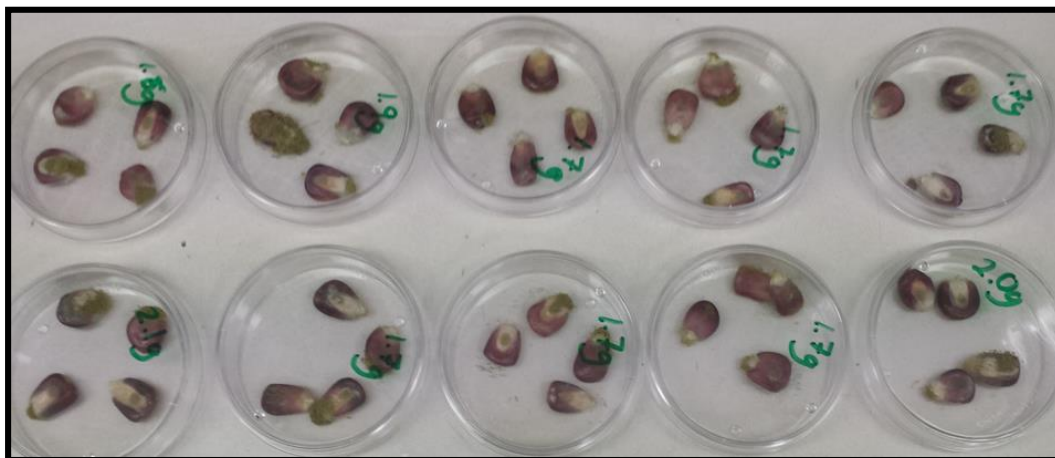


b) Maíz inoculado con *A. flavus* T-1

Figura 5. Unidades experimentales de maíz criollo MAHN16 inoculadas de acuerdo al método KSA.



a) Maíz no inoculado con *A. flavus* T-1



**b) Maíz inoculado con *A. flavus* T-1**

**Figura 6 . Unidades experimentales de maíz criollo MSHR25 inoculadas de acuerdo al método KSA.**

Vale la pena mencionar que el registro fotográfico del comportamiento de cada una de las razas no inoculadas e inoculadas con *A. flavus* T-1 se encuentra en el Apéndice 1.

**Crecimiento fúngico cuantificado por la técnica de Ergosterol en las razas MAHN16, MSHR25 y la variedad B73**

El crecimiento del hongo en estas dos razas y el híbrido se cuantificó por la técnica del Ergosterol en embriones de maíz inoculado y no inoculados con *A. flavus* T-1 en 10 unidades experimentales tomando dos muestras de cada una. Los resultados ilustran que los microgramos de Ergosterol por gramo de maíz en el tratamiento no inoculado de *A. flavus* T-1 son semejantes en los dos criollos, MAHN16 susceptible, MSHR25 resistente así como en el susceptible B73 (Tabla 7). En cambio, cuando el maíz se inoculó con *A. flavus* la mayor cantidad de Ergosterol se encontró en la raza MAHN16 (susceptible). El maíz MSHR25 y el B73 presentaron menor cantidad sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 7).

**Tabla 7. Cuantificación de Ergosterol en embriones germinados de maíz**

ERGOSTEROL ( $\mu\text{g}$ de Ergosterol /g de maíz)		
	Embrión no inoculado	Embrión inoculado con <i>A. flavus</i> T-1
<b>MAHN16</b>	23.075 <sup>AB</sup>	164.552 <sup>C</sup>
<b>MSHR25</b>	2.833 <sup>A</sup>	36.260 <sup>B</sup>
<b>B73</b>	0.000 <sup>A</sup>	17.736 <sup>AB</sup>

Los valores corresponden a la media de 20 muestras de maíz incubado 72 horas a 30°C  
Valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ )

### Acumulación de AFB<sub>1</sub> en el maíz criollo

Con respecto a la acumulación de AFB<sub>1</sub> el comportamiento de las 11 razas de maíz no inoculado con *A. flavus* T-1 resultó interesante porque se detectó acumulación de AFB<sub>1</sub>, esto indica que el maíz contenía flora natural interna capaz de producir AFB<sub>1</sub> (Tabla 8).

Los valores obtenidos entre las réplicas biológicas fueron variables y las diferencias son muy notorias, como es el caso del maíz criollo MJMA30 que acumuló 0.44  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>/g de maíz en la primera réplica, en la segunda acumuló 4.601  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>/g de maíz y aún más contrastante el acumulado en la tercera réplica 7.833  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>/g de maíz. También se observó el caso contrario, donde las diferencias no fueron tan notorias, por ejemplo en la raza de maíz criollo MPER28 los valores fueron similares en las 3 réplicas, con valores de 0.008  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>/g de maíz, 0.010  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>/g de maíz y 0.012  $\mu\text{g}$  de AFB<sub>1</sub>/g de maíz. La variedad de maíz B73, es un híbrido que se utilizó como referente ya que acumula mucha AFB<sub>1</sub>. En este experimento los niveles de AFB<sub>1</sub> en B73 fueron bajos en las 3 réplicas (0.430  $\mu\text{g}/\text{g}$  0.320  $\mu\text{g}/\text{g}$  0.016  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Este resultado indica que también B73 contenía flora natural interna productora de AFB<sub>1</sub>.

**Tabla 8. Acumulación de AFB<sub>1</sub> en 11 razas de maíz criollo sin inoculo de *A. flavus* T-1**

Razas de Maíz Criollo	Maíz no inoculado		
	1° Réplica*	2° Réplica*	3° Réplica*
	(µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)	(µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)	(µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)
1. MLTB27	0.002 ± 0.003	0.183 ± 0.183	0.009 ± 0.009
2. MPER28	0.008 ± 0.017	0.010 ± 0.011	0.012 ± 0.009
3. MSHR25	0.088 ± 0.143	1.533 ± 2.553	0.043 ± 0.044
4. MSCA1	0.550 ± 0.730	0.235 ± 0.512	0.084 ± 0.153
5. MTLN23	0.001 ± 0.001	0	0.157 ± 0.116
6. MTLB19	1.024 ±	0.315 ± 0.575	0.189 ± 0.330
7. MAHA18	2.624 ± 2.554	0.005 ± 0.008	0.342 ± 0.815
8. MAHB15	0.684 ± 0.550	3.155 ± 5.155	0.580 ± 0.633
9. MTLP31	0.044 ± 0.075	1.723 ± 2.503	1.233 ± 2.745
10. MAHN16	12.244 ± 13.670	5.372 ± 9.364	2.873 ± 2.906
11. MJMA30	0.044 ± 0.069	4.601 ± 9.691	7.833 ± 23.833
B73**	0.430 ± 0.661	0.320 ± 0.452	0.016 ± 0.021

\*Los valores corresponden a la media de 10 repeticiones de cada raza de maíz

\*\* Variedad de referencia, susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>.

Con respecto a las razas de maíz criollo inoculados con *A. flavus* T-1 se encontró que los niveles acumulados de AFB<sub>1</sub> fueron mayores que los acumulados en los maíces no inoculados. Cuatro razas criollas presentaron valores bajos en una repetición y valores más altos en las otras dos repeticiones (Tabla 9). Los otros siete criollos acumularon niveles altos de AFB<sub>1</sub> en las tres replicas pero con concentraciones variables, por ejemplo, la raza MSCA1 acumuló 0.51µg AFB<sub>1</sub>/g maíz, 7.711 µg AFB<sub>1</sub>/g de maíz y 4.661 µg AFB<sub>1</sub>/g de maíz. En cambio en la raza MTLN 23 los valores fueron: 2.081 µg AFB<sub>1</sub>/g maíz, 2.687µg AFB<sub>1</sub>/g de maíz y 5.922 µg AFB<sub>1</sub>/ g de maíz (Tabla 9).

Tabla 9. Acumulación de AFB1 en 11 razas de maíz criollo inoculadas con *A. flavus*.

Razas de Maíz Criollo	Maíz Inoculado con <i>A. flavus</i> T-1		
	1° Réplica* (µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)	2° Réplica* (µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)	3° Réplica* (µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)
1. MLTB27	2.081 ±1.750	2.687 ± 1.907	5.922 ± 6.809
2. MPER28	0	9.559 ±6.643	6.515 ±4.313
3. MSHR25	1.330 ± 1.134	0.664 ± 0.862	4.454 ± 4.455
4. MSCA1	1.077 ± 1.119	5.165 ±6.499	2.816 ± 0.653
5. MTLN23	0.120 ±0.138	3.213 ±4.134	1.204 ±2.097
6. MTLB19	0.510 ±0.809	7.711 ±9.467	4.661 ±4.696
7. MAHA18	9.302 ±5.122	14.662 ± 12.469	9.613 ±8.030
8. MAHB15	0.480 ±0.545	9.583 ±8.011	10.813 ±13.427
9. MTLP31	0.587 ±0.455	10.056 ± 13.7	6.987 ± 5.927
10. MAHN16	29.636 ±15.273	36.094 ±17.089	18.283 ±
11. MJMA30	3.031 ± 1.207	15.309 ±15.105	7.621 ± 10.337
B73**	12.635 ±16.847	1.687 ± 3.277	69.485 ±22.229

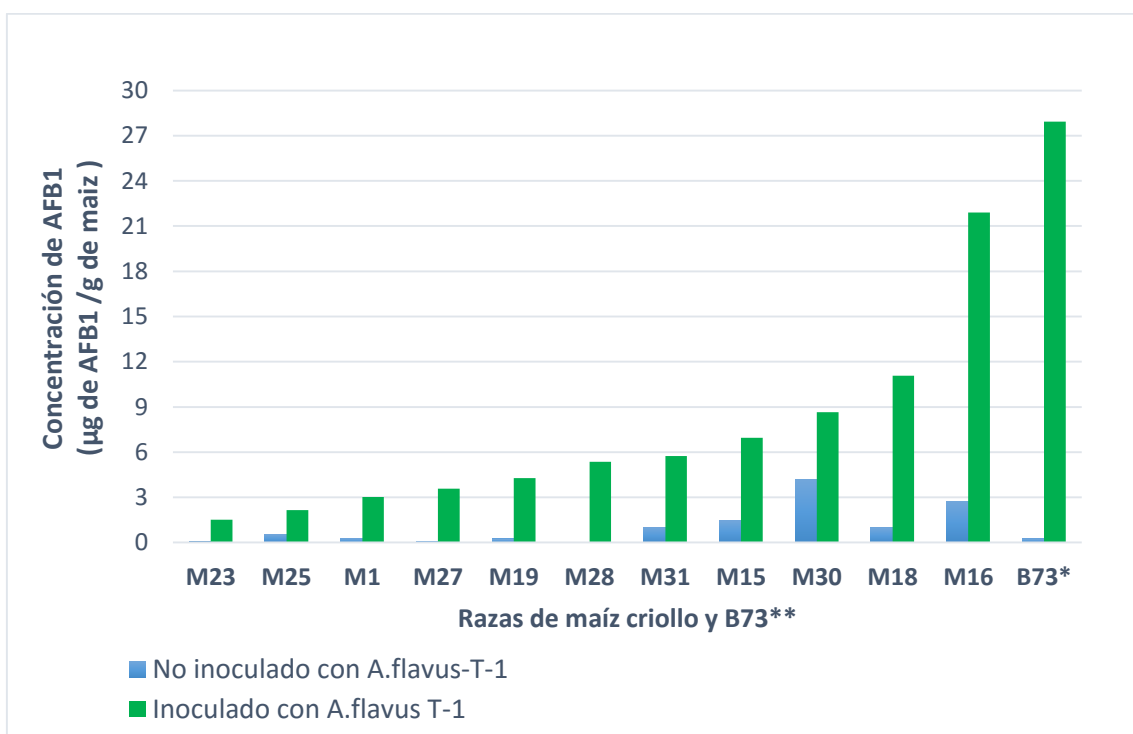
\*los valores corresponden a la media de 10 repeticiones de cada raza de maíz

\*\* Variedad de referencia, susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>



Al graficar los valores de la media sin transformar, de las 30 repeticiones de cada raza de cada uno de los tratamientos (A y B) se puede observar más claramente que existen tres patrones definidos de acumulación de AFB<sub>1</sub> en los maíces criollos (Grafica 1). Los patrones son: baja, mediana y alta acumulación. Los criollos de baja acumulación fueron MTLN23, MSHR25, MSCA1, MLTB27; los de mediana acumulación fueron MTLB19, MPER28, MTLP31, MAHB15 y los de alta acumulación MJMA30, MAHA18, MAHN16. La variedad B73 acumuló la mayor cantidad de AFB<sub>1</sub>, dato congruente con lo reportado para esta variedad.

**Gráfica 1.** Acumulación de AFB<sub>1</sub>\* en 11 razas de maíz criollo inoculado y no inoculado con *A. flavus* T-1.



\*Los valores representan la media de 30 repeticiones

\*\* Variedad de referencia B73, susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>

Al transformar los datos en log (1+x) y calcular las medias y las diferencias entre los diferentes criollos encontramos que MSHR25 era uno de los criollos que acumulaba menor cantidad de AFB<sub>1</sub> y MAHN16 acumulaba la mayor cantidad,

después de B73 maíz susceptible de referencia (Tabla 10). Por lo tanto, la variedad MSHR25 fue considerada como resistente a la acumulación de aflatoxina y la MAHN16 como la susceptible a la acumulación.

**Tabla 10. Acumulación de AFB<sub>1</sub> de 11 maíces criollos y su clasificación utilizando datos de producción de aflatoxina transformados.**

Razas de Maíz Criollo	TRATAMIENTOS	
	No Inoculado (µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)	Inoculado con <i>A. flavus</i> T-1 (µg AFB <sub>1</sub> /g maíz)
MTLN23	0.0121 <sup>A</sup>	0.235 <sup>ABC</sup>
MSHR25	0.103 <sup>AB</sup>	0.365 <sup>CD</sup>
MSCA1	0.085 <sup>AB</sup>	0.491 <sup>DE</sup>
MTLB19	0.072 <sup>AB</sup>	0.491 <sup>DE</sup>
MLTB27	0.022 <sup>A</sup>	0.532 <sup>DE</sup>
MTLP31	0.171 <sup>AB</sup>	0.558 <sup>E</sup>
MPER28	0.004 <sup>A</sup>	0.563 <sup>E</sup>
MAHB15	0.246 <sup>ABC</sup>	0.610 <sup>EF</sup>
MJMA30	0.248 <sup>ABC</sup>	0.747 <sup>FG</sup>
MAHA18	0.176 <sup>AB</sup>	0.973 <sup>H</sup>
MAHN16	0.613 <sup>EF</sup>	0.992 <sup>H</sup>
B73**	0.077 <sup>AB</sup>	0.970 <sup>GH</sup>

\*los valores son media de 30 repeticiones. Datos transformados log (1+x)

Valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes. (p<0.05)

\*\* Variedad de referencia B73, susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>

## Confirmación del comportamiento en la acumulación de AFB<sub>1</sub> de la raza susceptible MAHN16, raza resistente MSHR25 y B73 variedad susceptible

Para asegurar el comportamiento de acumulación de AFB<sub>1</sub> en las razas MAHN16, MSHR25 y la variedad B73, se realizó un experimento con 10 unidades experimentales, pero con dos repeticiones en la cuantificación de aflatoxina. Los resultados ilustran que la raza que menos AFB<sub>1</sub> acumuló fue la MSHR25 (Tabla 11) y la raza que más acumuló fue la MAHN16. Estos resultados confirman el comportamiento de la raza susceptible y la raza resistente. La variedad B73 presenta un comportamiento errático ya que en este experimento los niveles de AFB<sub>1</sub> acumulados son muy bajos a diferencia de los obtenidos en los experimentos anteriores (Tabla 11)

**Tabla 11 . Aflatoxina B<sub>1</sub> en razas susceptible, resistente y en variedad de referencia.**

Maíz no inoculado		Maíz inoculado con <i>A.flavus</i> T-1	
Maíz	AFB <sub>1</sub> (µg/g de maíz)	Maíz	AFB <sub>1</sub> (µg/g de maíz)
MAHN16	6.353 <sup>AB</sup>	MAHN16	86.215 <sup>C</sup>
MSHR25	0.017 <sup>A</sup>	MSHR25	15.372 <sup>B</sup>
B73	0.061 <sup>A</sup>	B73	0.003 <sup>A</sup>

\*Los valores son medias de 10 repeticiones por duplicado, maíz incubado 72 horas a 30°C

\*\*Los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes. (p<0.05)

## Expresión de genes asociados a la resistencia del maíz y a la capacidad toxigénica de *A. flavus*.

Los genes elegidos para evaluar su expresión en las razas susceptible, resistente y la variedad, implicados en la resistencia para la acumulación de aflatoxina B1 en maíz fueron *ZmCOR* y *Zeamatin* los cuales codifican para

proteínas antifúngicas (Zhi-Yuan Chen, Brown, Cleveland, Damann, & Russin, 2001). Así como los genes *norB* y *afIR* involucrados en la síntesis de aflatoxina de acuerdo a (Chang *et al.*, 1996). La expresión de estos genes en las razas de maíz criollo seleccionadas como susceptible y resistente podría ayudarnos explicar el comportamiento del maíz frente a los hongos toxigénicos.

### **Obtención de RNA de granos secos de maíz criollo resistente, susceptible e híbrido de referencia.**

Las concentraciones de RNA obtenidas de grano seco de maíz MAHN16 fueron muy bajas y las relaciones de absorbancia 260/280 ilustran que la pureza de RNA no era adecuada (Tabla 12), estos resultados fueron similares en las cuatro repeticiones realizadas. Los datos indican que al utilizar grano seco no se obtiene RNA de buena calidad. Datos similares se obtuvieron en la obtención de RNA de las razas MSHR25 (Tabla 13) y variedad B73 (Tabla 14).

**Tabla 12. Obtención de RNA de grano seco de maíz MAHN16.**

<b>Muestra MAHN16 grano seco</b>	<b>Concentración RNA ng/μl</b>	<b>Absorbancia 260/280</b>	<b>Absorbancia 260/230</b>
<b>1° repetición</b>	<b>54.9</b>	2.10	0.16
<b>2° repetición</b>	<b>-4.4</b>	-15.35	-0.01
<b>3° repetición</b>	<b>48.2</b>	1.76	0.09
<b>4° repetición</b>	<b>81.5</b>	2.14	2.38

**Tabla 13. Obtención de RNA de grano seco de maíz MAHN16.**

<b>Muestra MSHR25 grano seco</b>	<b>Concentración RNA ng/μl</b>	<b>Absorbancia 260/280</b>	<b>Absorbancia 260/230</b>
1° repetición	71.4	2.06	0.22
2° repetición	8.1	1.67	0.02
3° repetición	59.4	1.95	0.10
4° repetición	52.2	2.33	0.62

**Tabla 14. Obtención de RNA de grano seco de maíz B73.**

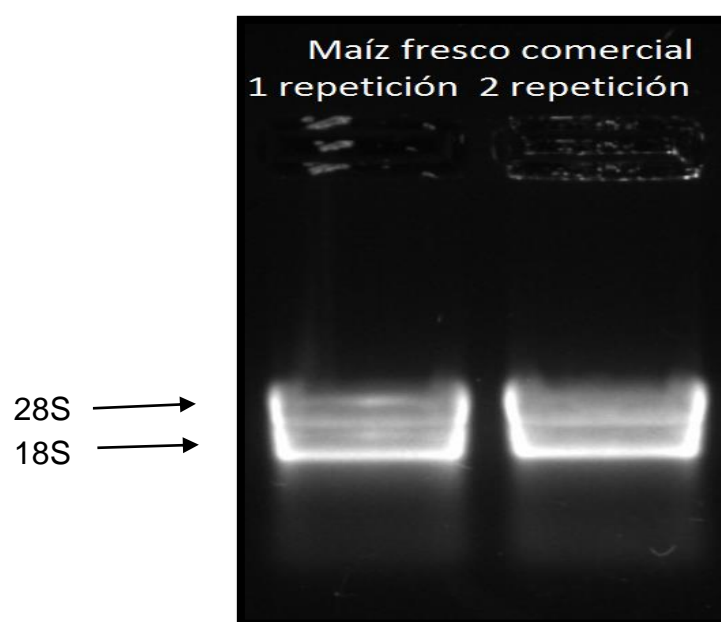
<b>Muestra B73 grano seco</b>	<b>Concentración RNA ng/μl</b>	<b>Absorbancia 260/280</b>	<b>Absorbancia 260/230</b>
1° repetición	50	1.28	0.88
2° repetición	34.8	1.78	0.60
3° repetición	72.7	2.07	2.35
4° repetición	8.0	1.51	1.20

#### **Extracción de RNA de granos de maíz frescos.**

Debido a la dificultad de obtener RNA de calidad a partir de grano de maíz seco, se optó por utilizar el protocolo utilizado anteriormente, pero con granos de maíz fresco. Se obtuvo RNA con una concentración de 3075 ng/μl y con mejor pureza ya que la relación de absorbancia proteína –ácido nucleico a 260/280 nm fue adecuada (Tabla 15). Al confirmar la integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa, se observaron 2 bandas, correspondientes a los ribosomales 18S y 28S (Figura 7).

**Tabla 15. Obtención de RNA de grano de maíz fresco**

<b>Muestra maíz fresco comercial</b>	<b>Concentración RNA ng/μl</b>	<b>A 260/280</b>	<b>A 260/230</b>
<b>1° repetición</b>	3043.3	2.08	2.38
<b>2° repetición</b>	3075.2	2.05	2.22



**Figura 7 . Gel de electroforesis de RNA de grano de maíz fresco.**

#### **Extracción de RNA de embriones.**

Para obtener el material, granos de maíz de la variedad B73 se germinaron en condiciones de alta humedad y se obtuvieron embriones del híbrido con la finalidad de obtener RNA y confirmar la eficiencia del método antes de efectuar los tratamientos A y B en las razas elegidas.

Se obtuvo RNA de los embriones del maíz B73 en alta concentración con buena calidad e integridad (Tabla 16).

**Tabla 16. Obtención de RNA de embrión de B73.**

<b>Muestra B73 Embrión</b>	<b>Concentración RNA ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>1° repetición</b>	696	1.98	2.25
<b>2° repetición</b>	592	2.05	2.29
<b>3° repetición</b>	230	1.98	2.16
<b>4° repetición</b>	979	2.04	2.44

Los resultados obtenidos en esta sección determinaron que la búsqueda de la expresión de los genes antes mencionados se realizara en RNA de embrión de maíz germinado durante 72h con los tratamientos no inoculado e inoculado con *A. flavus* T-1.

**Transcripción de genes *ZmCOR*, *Zeamatin*, *afIR* y *norB* en embriones de maíz de la raza susceptible MAHN16, resistente MSHR25 y la variedad susceptible B73.**

#### **Obtención de RNA de embrión de maíz no inoculado e inoculado**

Las razas MAHN16, MSHR25 y la variedad B73 fueron sometidas a los tratamientos<sup>8</sup> no inoculados e inoculados con *A. flavus*), respectivamente y se incubaron durante 72 h, tiempo en el cual se obtuvieron los embriones, sin radícula.

El RNA obtenido de los respectivos embriones fue de buena calidad y con concentraciones adecuadas (Tabla 17, Figura 8 y Tabla 18 Figura 9) y se confirmó la integridad por electroforesis.

Tabla 17. Obtención de RNA de embriones de maíz no inoculados.

No inoculado con <i>A. flavus</i> T-1			
Embrión de grano	Concentración (ng/ $\mu$ l)	A (260/280)	A (260/230)
MAHN16	272.8	1.94	1.67
MSHR25	269.4	1.97	1.88
B73	696.4	1.59	0.99

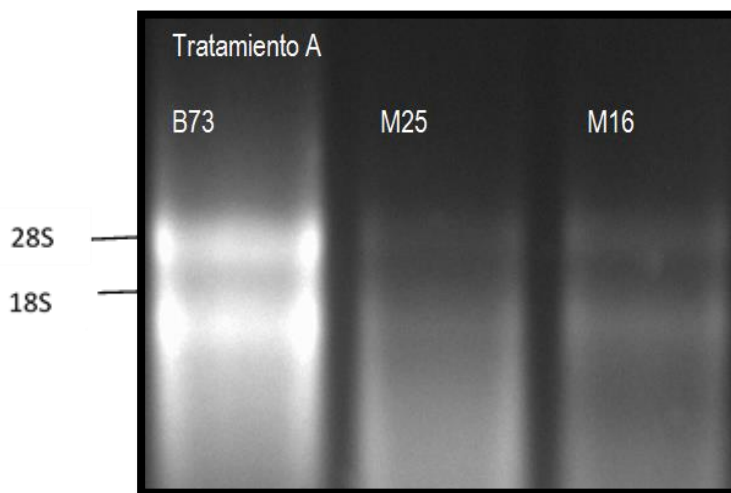


Figura 8. Gel de electroforesis de RNA de embriones no inoculados.



Tabla 18. Obtención de RNA de embriones de maíz inoculado con *A. flavus* T-1.

Inoculado con <i>A. flavus</i> T-1			
Embrión de grano	Concentración (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)
MAHN16	272.8	1.95	1.80
MSHR25	269.4	1.95	1.87
B73	696.5	1.98	2.16

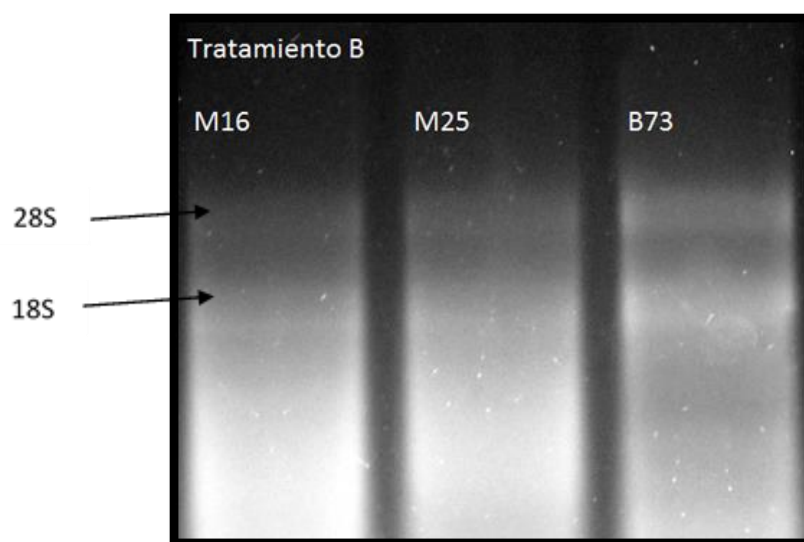
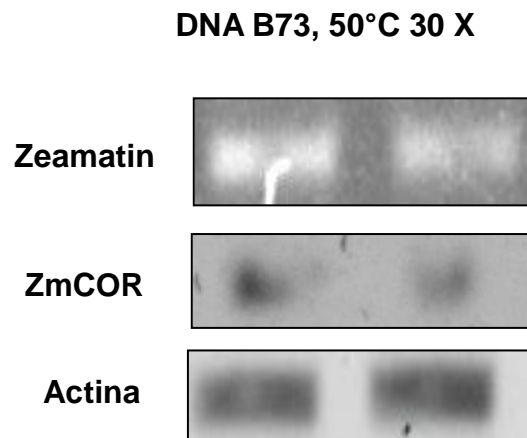


Figura 9. Gel de electroforesis de RNA de embrión inoculado con *A. flavus* T-

### **Amplificación de los genes *ZmCOR* y *Zeamatin* en maíz utilizando DNA del maíz de referencia B73.**

Para encontrar la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de los diferentes genes con el DNA se probó un gradiente de temperatura a 50, 55, 60, 66 y 68°C durante 30 ciclos, utilizando DNA de B73. El gen constitutivo actina se usó como control, el cual amplificó a todas las temperaturas mencionadas y los genes *ZmCOR* y *Zeamatin* sólo amplificaron con la temperatura de 50°C por lo que se decidió utilizar estas condiciones de amplificación para la RT-PCR (Figura 10).

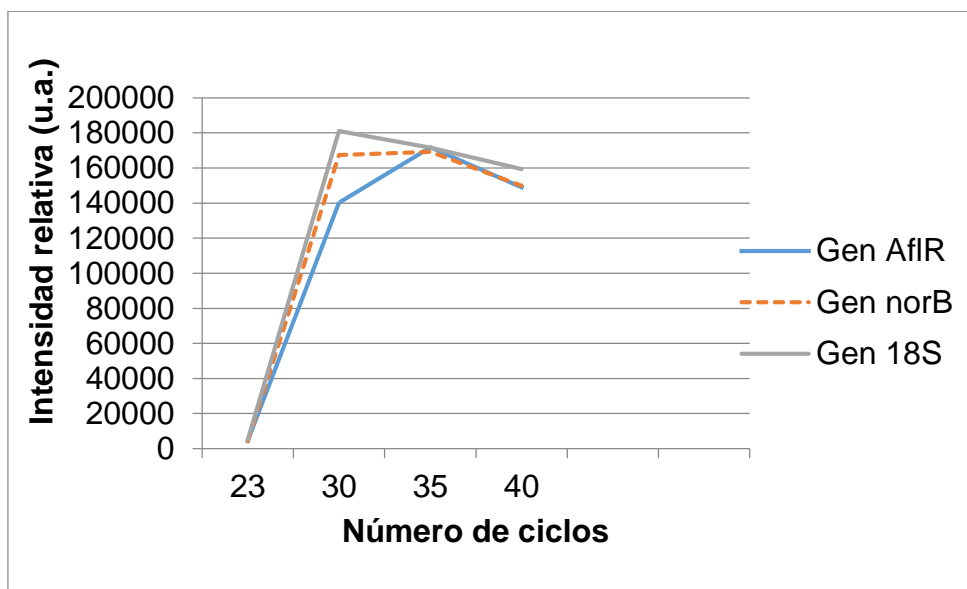


**Figura 10. Amplificación de los genes con alineamiento a 50 °C durante 30 ciclos**

### **Amplificación de los genes *aflR* y *norB* involucrados en la síntesis de aflatoxina por *A. flavus***

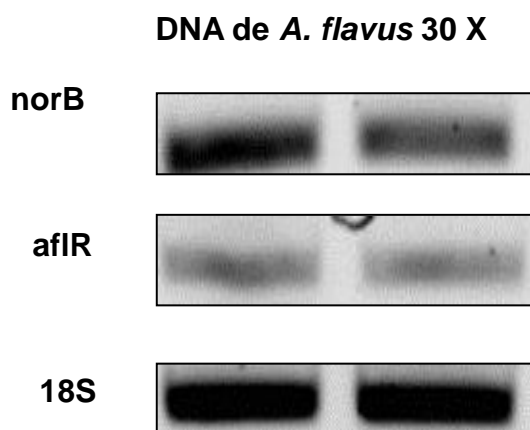
Para encontrar las condiciones de temperatura y ciclos a los que se llevarían a cabo las reacciones se probaron los oligonucleótidos de genes involucrados en la síntesis de aflatoxina: *aflR*, *norB* y el gen 18 S como gen constitutivo como control. Se realizaron PCR con 23, 30, 35 y 40 ciclos a 60 °C. Se graficaron los ciclos con la Intensidad Relativa de la banda obtenida de la PCR utilizando DNA de *A. flavus* (Grafica 2). Se eligieron 30 ciclos ya que los pares de

oligonucleótidos están en la fase exponencial y con estas condiciones se podrá ver la expresión diferencial de los genes.



**Gráfica 2. Normalización de ciclos para genes involucrados en la síntesis de aflatoxina por *A. flavus*.**

En la Figura 11 se ilustran las bandas obtenidas con DNA de *A. flavus* y las condiciones de alineamiento a 60 °C durante 30 ciclos de los genes implicados en las síntesis de aflatoxina y el control 18S.



**Figura 11. Amplificación de genes *norB*, *afIR* y 18 S**

## Expresión de genes involucrados en la resistencia a la acumulación de aflatoxina en embriones de razas de maíz criollo y variedad de referencia.

La expresión de los genes ZmCOR y Zeamatin en los embriones de maíz no inoculado e inoculado fue negativa en las dos razas y en la variedad susceptible (Figura 12 y y Figura 13), a pesar de que la integridad de los transcritos fue comprobada al amplificarse el gen constitutivo de actina en los tres tipos de maíz. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado.

### Amplificación de cDNA de embriones no inoculados

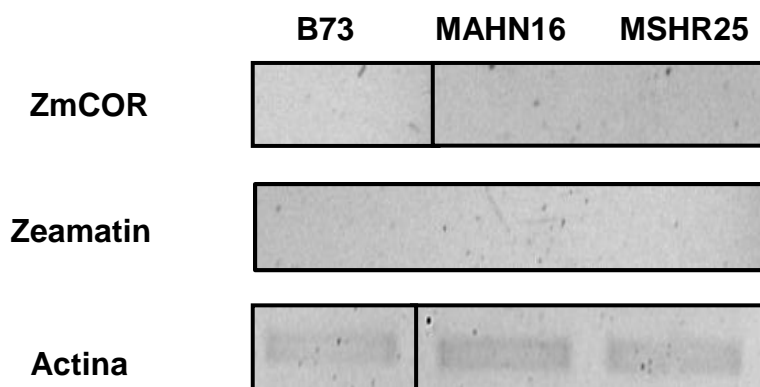
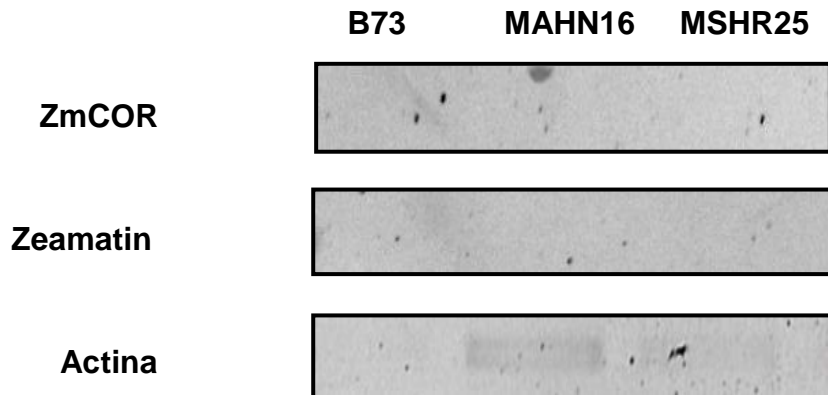


Figura 12. Expresión de genes en embriones no inoculados con *A. flavus*

**Amplificación de cDNA de embriones inoculados con *A. flavus T-1***



**Figura 13. Expresión de genes en embriones de maíz inoculados con *A. flavus T-1***

**Expresión de los genes *norB* y *afIR*, involucrados en la síntesis de aflatoxina en embriones de maíz y variedad de referencia.**

En embriones no inoculados, la expresión de los genes *afIR* fue positiva en las dos razas MAHN16, MSHR25 y en la variedad susceptible B73. La expresión del gen *norB* se detectó en los embriones de maíz MSHR25 (resistente) y en la variedad susceptible B73 (Figura 13). Cuando los embriones fueron inoculados sólo se encontró expresión del gen *afIR* en la raza MAHN16 (susceptible) y ninguna expresión del gen *norB* en los diferentes tipos de maíz (Figura 14).

Amplificación de cDNA de embriones no inoculados No inoculado

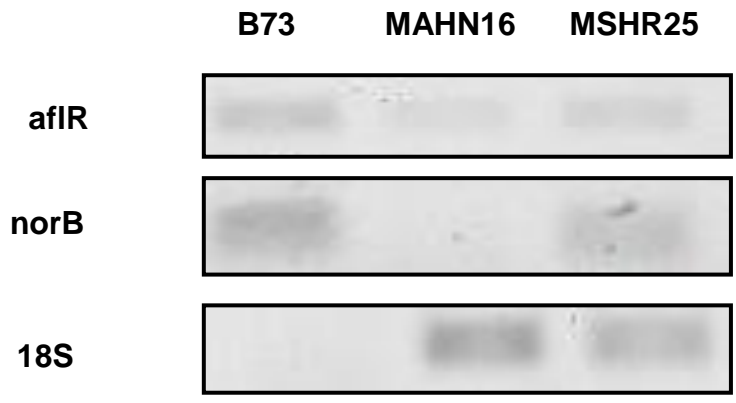


Figura 14. Expresión de genes en embriones no inoculados con *A. flavus*.T-1

Amplificación de cDNA de embriones inoculados con *A.flavus* T-1

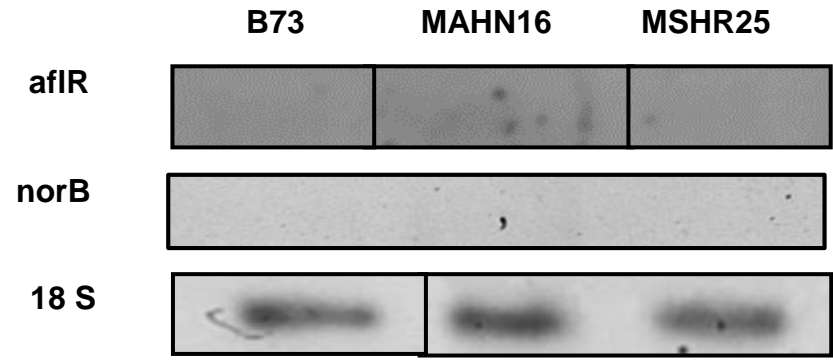


Figura 15. Expresión de genes en embriones de maíz inoculados con *A.flavus*. T-1

**Tabla 19 . Resumen de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de AFB<sub>1</sub>**

<b>No inoculado</b>	<b>B73</b>	<b>MAHN16</b>	<b>MSHR25</b>
aflR	+	+	+
norB	+	-	+
18 S	+	+	+
<b>Inoculado con <i>A. flavus</i></b>	<b>B73</b>	<b>MAHN16</b>	<b>MSHR25</b>
aflR	-	+	-
norB	-	-	-
18 S	+	+	+

En la Tabla 19 se muestra la expresión de los genes implicados en la síntesis de producción de aflatoxina y contrario a lo esperado se observa mayor expresión en el tratamiento no inoculado con el hongo, mientras que en el tratamiento inoculado con *A. flavus* T-1, sólo se pudo observar la expresión del gen *aflR* en la raza susceptible MAHN16.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Identificación molecular de la cepa *A. flavus* T-1

Al inicio de este trabajo era necesario confirmar el género y especie del hongo productor de AFB<sub>1</sub> aislado de granos de trigo amplificando las regiones ribosomales ITS (Internal Transcribed Spacer) utilizando los oligonucleótidos específicos reportadas por (White *et al.*, 1990). La especie identificada resultó ser *Aspergillus flavus* con una homología de 99% con la secuencia reportada para este hongo en la bases de datos del NCBI. Tal como se ha reportado para otros géneros, la identificación de género y especie de hongos se realiza de manera sencilla amplificando las regiones ITS y comparando los resultados con bases de datos como GeneBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Reference Sequence (Refseq), DNA DataBank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL). (Schoch *et al.*, 2012). La identidad de la cepa encontrada mediante biología molecular estuvo en concordancia con la morfología macroscópica y microscópica observada.

Posterior a la identificación de *Aspergillus flavus*, fue necesario confirmar su capacidad de producir AFB<sub>1</sub>, utilizando como sustrato maíz criollo de la Asunción, Oaxaca. El aislado de trigo T-1 se inoculó en los granos de maíz y de forma paralela se tenía un control no inoculado en las mismas unidades experimentales, las cuales se mantuvieron a 30 C° y alta humedad. Interesantemente en el maíz criollo que no fue inoculado con esta cepa de *A. flavus* T-1, se encontró acumulación de AFB<sub>1</sub> en niveles bajos. La explicación para este resultado es la contaminación interna de *Aspergillus* en los granos de maíz, el cual tenía capacidad de producir aflatoxina (Gúzman-de-Peña & Ruiz-Herrera, 1997) mencionan que en el sureste de Estados Unidos se demostró la presencia de aflatoxina en maíz en condiciones de campo en el rango de 20-150 µg/g en maíz que no tiene lesiones visibles y que fueron cultivados sin condiciones de estrés. En contraste, los niveles de contaminación con aflatoxinas pueden alcanzar concentraciones de 1000-2000 µg/kg cuando el maíz es cultivado en condiciones de estrés de sequía, altas temperaturas e infestación de insectos. En estudios



realizados en México se encontraron niveles de AFB<sub>1</sub> entre 16-42 µg/kg en maíz proveniente de Tamaulipas. Se ha descrito que *A. flavus* puede colonizar los estigmas de maíz e invadir los granos en formación durante su cultivo y que las esporas se encuentran en los granos de maíz antes del almacenamiento. Esto conduce a que los granos presenten una contaminación interna con el hongo y como consecuencia contaminación con aflatoxina. Resultados similares se encontraron en granos de sorgo de Oaxaca los cuales se desinfectaron superficialmente y se sembraron en medio de PDA. Este sorgo presentó una incidencia fúngica de 79-98%. De esta forma se confirma que los hongos pueden estar dentro del grano aun sin tener rastro de lesión. En los materiales de maíz criollo de Oaxaca no inoculados, los hongos llegaron a crecer de manera externa en los granos debido a que la temperatura y la alta humedad fueron óptimas para su crecimiento y producción de aflatoxina. Vale la pena mencionar que la flora interna nativa de algunas razas de maíz criollo del valle de Oaxaca fue determinada en el Laboratorio de Micotoxinas de CINVESTAV (Dra. Guzmán, comunicación personal) y se identificaron hongos de los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los cuales tienen la capacidad de producir diferentes micotoxinas (Bennett, Klich, & Mycotoxins, 2003; Payne & Brown, 1998).

El maíz criollo de la Asunción inoculado con la cepa de *A. flavus* T-1 presentó mayor crecimiento fúngico superficial y mayor acumulación de AFB<sub>1</sub> que el no inoculado. Sin embargo, la desviación estándar entre las 10 repeticiones fue muy alta y los comportamientos de acumulación de AFB<sub>1</sub> muy variables entre repeticiones. Estos datos no son sorprendentes ya que (Bullock J.D ., 1980) ha reportado que dentro de un mismo aislado de hongo, los efectos del medio ambiente pueden causar variaciones en las proporciones relativas de los metabolitos secundarios producidos por el hongo, por lo tanto surgen variaciones fenotípicas y diferencias genotípicas entre aislados de una o varias especies. Estas variaciones entre los aislados explican el comportamiento de producción tan variado de aflatoxina entre repeticiones. Así mismo, (Anguiano R, Rodríguez A, V.C., & D., 2002) mencionan que los hongos de la sección *flavi* presentan variabilidad aún entre individuos de la misma especie. Estos autores analizaron

dos cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, dos clonas y la parental y mostraron variabilidad frecuente en sus características morfológicas así como en la síntesis de aflatoxina entre repeticiones del mismo experimento y entre experimentos. Así mismo sugieren que la variabilidad está determinada fuertemente por las condiciones ambientales en las que se encuentra el hongo. Sin embargo, los resultados en este trabajo indican que a pesar de la alta variabilidad de síntesis de aflatoxina B<sub>1</sub> del aislado *A. flavus* T-1, siempre se produjo, lo que nos permite utilizar esta cepa en estudios de laboratorio.

Para clasificar las 11 razas de maíz criollo se realizó un ensayo de laboratorio desarrollado y utilizado para estudiar la resistencia a la acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub>, el Kernel Screening Assay “KSA” (R L Brown, Chen, Cleveland, & Russin, 1999a; Luo *et al.*, 2011). Éste utiliza equipos sencillos y económicos, los granos se mantienen con 100% de humedad relativa, 31°C y 7 días de incubación, condiciones favorables para el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina. Este ensayo es muy confiable ya que se han encontrado relaciones entre los resultados de laboratorio e inoculaciones en campo como en ejemplo se puede mencionar el híbrido GT-MAS: gk, el cual presentó resistencia a la acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub> en el campo, fue confirmada con el ensayo KSA en el laboratorio. Los autores sostienen que este ensayo confirma evaluaciones en campo. Sabemos que las pruebas en campo son irremplazables para la confirmación de la resistencia, sin embargo, KSA puede eliminar muchos ensayos preliminares en campo y facilita las investigaciones de las respuestas del grano a infección por el hongo y producción de aflatoxina.

Los resultados obtenidos al evaluar las 11 razas de maíz criollo, con el método KSA, permitieron crear tres grupos con respecto a la acumulación de aflatoxina, los de baja, mediana y alta concentración. Se detectó una gran variabilidad de los niveles de aflatoxina B<sub>1</sub> entre replicas, al igual que lo reportan (Ortega-Beltran, Guerrero-Herrera, Ortega-Corona, Vidal-Martinez, & Cotty, 2014) cuando realizaron un estudio de acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub> en 74 razas criollas de maíz del oeste y noroeste de México. Los maíces presentaron valores de AFB<sub>1</sub>

desde 0.93 hasta 152049  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , al realizar repeticiones se encontraron variaciones cuantitativas por ejemplo en la raza MLR2006-23 considerada resistente tuvo una acumulación de 5 mg/kg en el primer experimento y 19 mg/kg en el segundo experimento. A pesar de la variabilidad entre experimentos, la característica de resistencia se mantuvo constante y aún con estas variaciones pudieron seleccionarse razas susceptibles y resistentes. Realizando más réplicas pudieron clasificarse razas criollas resistentes como son: la raza Vandeño 2007-06 con acumulación menor a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y la raza blando de Sonora 2007-37 que acumuló menos de 6.5 mg/kg. En este trabajo encontramos resultados interesantes ya que las 11 razas tuvieron acumulaciones de AFB<sub>1</sub> muy diferentes como era de esperarse, sin embargo pudimos clasificar a la raza criolla de Oaxaca MSHR25 que acumuló cantidades menores de AFB<sub>1</sub> como “resistente” y la raza MAHN16 que acumuló mayores cantidades de AFB<sub>1</sub> “susceptible”. La variedad B73 evaluada en este trabajo se clasificó como susceptible ya que acumuló 36 ng de AFB<sub>1</sub>/ g, datos que concuerdan por lo reportado por (R L Brown *et al.*, 1999a), por lo que se utilizó como referencia.

Está bien documentado que son diversos los factores que pueden estar asociados a la resistencia del maíz tanto a hongos fitopatógenos, como a hongos micotoxigénicos, algunos de estos son: características de la cera del pericarpio y resistencia e integridad de la cutícula. (R L Brown *et al.*, 1995) demostraron que cuando el germen se hiere para realizar inoculaciones, la respuesta del maíz a la acumulación de aflatoxina B1 es muy diferente. En el híbrido GT-MAS: gk (clasificado previamente como resistente) cuantificaron la producción de AFB<sub>1</sub> por *A.flavus* en granos heridos y no heridos encontrando 8 ng/g y en el grano no herido y 198 ng/g en el grano herido. Estos datos demuestran que el pericarpio contribuye a la resistencia. Otro factor que influye en la resistencia del maíz a la acumulación de aflatoxinas es la presencia y expresión de genes que codifican proteínas con diferentes funciones (Zhi-Yuan Chen *et al.*, 2001). En este trabajo en granos enteros inoculados con *A. flavus* T-1 se determinaron los niveles de transcripción de algunos genes involucrados en la síntesis de Proteínas Asociadas a Resistencia (RAPs) y genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxina B1,

encontrando que los genes ZmCOR y Zeamatin no están presentes en embriones de maíz.

En el presente trabajo se inocularon con *A. flavus* T-1 las razas MAHN16 y MSHR25 y se obtuvo RNA de granos secos de maíz y de embriones. Como controles se incluyeron MAHN16 y MSHR25 no inoculados y la variedad de referencia B73. La extracción de RNA de granos secos de maíz realizada con Trizol Reagent, no fue exitosa debido a que el grano seco tiene grandes cantidades de almidón lo cual impidió tener una concentración y calidad adecuada de RNA. En cambio el RNA obtenido de maíz germinado dio concentraciones adecuadas y buena calidad. Estos resultados concuerdan con lo observado por (Luo *et al.*, 2011) quienes encontraron que la mejor manera para estudiar la expresión de genes ocurre en granos de maíz germinado. Probablemente el grano seco está en fase de dormancia, no está activo fisiológicamente, en cambio cuando los granos germinan después de absorber agua, reinician procesos metabólicos incluyendo la síntesis de ácidos nucleicos y por esta razón fue más fácil obtener RNA. El resultado obtenido con granos frescos de maíz apoya nuestra anterior deducción ya que el RNA obtenido tenía buena calidad y buena concentración. Consecuentemente los estudios de transcripción de genes implicados en resistencia, *ZmCOR* y *Zeamatin*, se realizó en el embrión germinado de granos de maíz inoculado y no inoculado con el hongo micotoxigénico expuesto por 72 h, a este tiempo se ha reportado que se puede observar la expresión de los genes responsables de generar la resistencia a la acumulación de aflatoxina (Luo *et al.*, 2011).

La resistencia de granos del maíz se ha relacionado con la presencia de proteínas asociadas a la resistencia a la infección fúngica (“RAPs”) constitutivamente producidas en el grano (Robert L Brown *et al.*, 2010). Dos proteínas muy importantes son la ZmCORP y Zeamatin las cuales presentan diferencias entre genotipos resistentes y susceptibles a la infección por *A. flavus* y a la síntesis de aflatoxina B1. La proteína ZmCORP está en el endospermo de maíz y responde al estrés por sequía y choque térmico. (Baker *et al.*, 2009)

comprobaron que esta proteína inhibe la germinación de esporas de *A. flavus* en 90% y encontraron que su expresión es 50 % más alta en la línea resistente Mp420, que en la línea susceptible B73. Zeamatin es una proteína con efecto antifúngico que inhibe la actividad de  $\alpha$ -amilasa y tripsina (Guo *et al.*, 1997; Schimoler-O'Rourke, Richardson, & Selitrennikoff, 2001). También se ha comprobado que las líneas de maíz resistentes a la acumulación de AFB<sub>1</sub> expresan altos niveles de proteínas antifúngicas, comparadas con las líneas susceptibles. Las investigaciones recientes sobre proteínas y genes se han enfocado en la identificación de Proteínas Asociadas a Resistencia (R L Brown, Chen, Cleveland, & Russin, 1999b). Nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por (Luo *et al.*, 2011) ya que no encontramos transcritos de ninguno de los dos genes ZmCOR y Zeamatin a pesar de que todos los requerimientos metodológicos fueron cubiertos y de que el gen constitutivo de actina se expresó correctamente. Estos resultados sugieren que la resistencia y susceptibilidad que presentan las razas de maíz criollo del valle de Oaxaca podría estar determinada por otros marcadores.

Por otro lado, no hay estudios que analicen como se ve afectada la expresión de algunos genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxina en los hongos micotoxigénicos que interactúan con los granos de maíz que presentan resistencia o susceptibilidad a la acumulación de aflatoxinas. Por este motivo se seleccionaron dos genes *afIR* y *norB* para probar si estos presentarían diferencias en su transcripción durante el proceso de infección por *A. flavus*. El gen *afIR* codifica una secuencia específica de unión a DNA de una proteína binuclear de un clúster de Zinc (Zn (II)<sub>2</sub> Cys<sub>6</sub> requerido para la activación transcripcional de la mayoría, si no es que de todos los genes estructurales. Este gen es el principal regulador de la vía de producción de aflatoxina y tiene una función autoreguladora. La ausencia de éste o la presencia de un gen *afIR* anormal sería un fuerte indicador de que la cepa no produce aflatoxina. (Lee, Liou, & Yuan, 2006) observaron que la ausencia putativa de *afIR* en las cepas *A. sojae* y en *A. oryzae* sería una solución práctica para seleccionar una cepa industrial completamente segura que no produciría aflatoxina. Por su parte, *norB* es un gen que se

encuentra al inicio de la ruta biosintética de aflatoxina B1 cerca de la síntesis del policétido, primer compuesto estable de la ruta (Yu *et al.*, 2004). Este gen codifica un arilo alcohol deshidrogenasa que es altamente homólogo a una enzima codificada por otro gen en el clúster de aflatoxina *norA* (Ehrlich, Chang, Yu, & Cotty, 2004). Por lo tanto la transcripción de estos genes deberá de realizarse en material con pocos días de incubación (72h).

En este trabajo se encontró transcripción del gen *afIR* en embrión germinado de MAHN16, MSHR25 y B73 no inoculado, estos genes son específicos de hongos micotoxigénicos por lo tanto este transcrito fue expresado por los hongos presentes en la flora interna natural de los granos de maíz, que son capaces de sintetizar AFB<sub>1</sub>. Interesantemente, la mayor expresión de transcrito en el maíz inoculado se encontró en el MAHN16 catalogado como susceptible. El gen *norB* sólo se expresó en MSHR25 y B73 no inoculados y no se expresó en el maíz inoculado con *A. flavus* T-1.

Estos resultados no son de extrañarse ya que (Smith, Woloshuk, Robertson, & Payne, 2007) han demostrado que la expresión de los genes de *A. flavus* en el maíz puede responder a los cambios de ambiente en los maíces en desarrollo, de tal modo que la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas puede darse por múltiples causas independientes que no necesariamente estarán relacionadas con la resistencia o susceptibilidad a la acumulación de aflatoxina del maíz criollo.

Las diferencias en el crecimiento fúngico observado en los embriones de maíz y medido por Ergosterol revelan que los maíces tienen la capacidad de frenar el crecimiento del hongo (Fig. 4, Fig. 5 y Tabla 5). Ya que la raza susceptible a la acumulación de AFB<sub>1</sub>, MAHN16 presentó el mayor crecimiento fúngico en ambas metodologías. Lo contrario sucedió en el caso de la raza clasificada como resistente donde el crecimiento fúngico medido fue menor en el MSHR25, de igual manera fue el maíz criollo que acumuló menos AFB<sub>1</sub> a los 7 días de incubación, manifestando así su resistencia a la acumulación. En este contexto la acumulación de AFB<sub>1</sub> podría estar dada por una inhibición en el crecimiento del hongo o podría

deberse a la expresión de factores que inhibieran la biosíntesis de aflatoxinas en el hongo. En este segundo caso observaríamos poca diferencia de crecimiento del hongo entre las razas. Sin embargo, nuestros datos indican que está sucediendo el primer caso ya que observamos una correlación directa entre la cantidad de AFB<sub>1</sub> y los niveles de Ergosterol cuantificados. Estos resultados indican que existen factores que causan este efecto inhibitor en el crecimiento del hongo en estas razas de maíz que pueden ser aun no conocidos.

Para revelar la red de la expresión genética durante la resistencia o susceptibilidad a la acumulación de aflatoxina, (Luo *et al.*, 2011) realizaron un perfil de expresión genética detectando 6955 genes en maíz resistente y 6565 en maíz susceptible; 214 genes inducidos en la resistente y 2149 en la susceptible cuando fueron inoculados con *A. flavus*. Estos datos ilustran la complejidad del fenómeno de resistencia y susceptibilidad en el maíz. Los autores describen que muchos de los genes identificados en su estudio están relacionados con la patogénesis. Numerosos genes constitutivos e inducidos en el grano de maíz participan en la resistencia a la infección de *A. flavus* por lo que una estrategia de defensa puede requerir el entendimiento de la red de la regulación involucrada en la respuesta de defensa en el grano (Luo *et al.*, 2011). El desafío que representa la búsqueda de factores de resistencia a la acumulación de AFB<sub>1</sub> en maíces criollos es muy grande y complejo y se deberán de desarrollar estrategias considerando la relación de dos organismos vivos, la planta, el hongo micotoxigénico y las condiciones ambientales que juegan un papel determinante durante síntesis de aflatoxinas.

## CONCLUSIONES

- Las razas de maíz criollo del valle de Oaxaca pueden ser clasificadas de acuerdo a su capacidad de acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub>.
- La acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub> en MAHN16 y MSHR25 correlacionó con el crecimiento fúngico.
- La resistencia a la acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub> en los maíces criollos puede deberse a factores que impiden el crecimiento fúngico inhibiendo de este modo la producción de aflatoxinas.
- La resistencia a la acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub> en los maíces criollo no se debe a la expresión de los genes *Zmcorp* y *Zeamatin*.



## **PERSPECTIVAS**

- Realizar el ensayo "Kernel Screening Assay" con granos de maíz enteros y frescos.
- Inocular las mazorcas en campo.
- Buscar otros genes implicados en la resistencia en grano entero.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anguiano R, G., Rodríguez A, Y., V.C., B., & D., G. de P. (2002). *Variación del comportamiento toxigénico de Aspergillus parasiticus y A. flavus. Memorias del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C. Monterrey N.L, México.*
- Aragón C.F., Taba S., Hernández C., Figueroa C.J. de D., Serrano A.V. (2006) *Actualización de la información sobre los maíces criollos de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Informe final SNIB-CONABIO proyecto N. México D.F. Retrieved from <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfCS002.pdf>*
- Baker, R. L., Brown, R. L., Chen, Z.-Y., Cleveland, T. E., & Fakhoury, a M. (2009). A maize Lectin- Like Protein with Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 72(1), 120–27.
- Bartolo Pérez, P., Peña, J. L., Cruz Orea, A., & Calderón, A. (1999). Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX. *Sociedad Mexicana de Ciencias de Superficies Y de Vacío*, 8(64), 64–68.
- Bennett, J. W., Klich, M., & Mycotoxins, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. doi:10.1128/CMR.16.3.497
- Brown, R. L., Chen, Z. Y., Cleveland, T. E., & Russin, J. S. (1999a). Advances in the Development of Host Resistance in Corn to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 89(2), 113–7. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.2.113
- Brown, R. L., Chen, Z. Y., Cleveland, T. E., & Russin, J. S. (1999b). Advances in the Development of Host Resistance in Corn to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 89(2), 113–7. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.2.113

- Brown, R. L., Chen, Z.-Y., Warburton, M., Luo, M., Menkir, A., Fakhoury, A., & Bhatnagar, D. (2010). Discovery and characterization of proteins associated with aflatoxin-resistance: evaluating their potential as breeding markers. *Toxins*, 2(4), 919–33. doi:10.3390/toxins2040919
- Brown, R. L., Cleveland, T. E., Payne, G. a., Woloshuk, K. W., Campbell, K. W., & White, D. G. (1995). Determination of resistance to aflatoxin production in maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase. *Phytopathology*, 85:983-989
- Brown, R. L., Cotty, P. J., Cleveland, T. E., & Widstrom, N. W. (1993). Living Maize Embryo Influences Accumulation of Aflatoxin in Maize Kernels. *Journal of Food Protection*, 56(November), 967–971.
- Bullock J.D . (1980). Mycotoxins as Secondary Metabolites. In Steyn Pieter S. (Ed.), *The Biosynthesis of Mycotoxins. A Study in secondary Metabolism* (Academic P, pp. 1–16). New York.
- Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Linz, J. E., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., & Bennett, J. W. (1996). Characterization of the *Aspergillus parasiticus* *niaD* and *niiA* gene cluster. *Current Genetics*, 30(1), 68–75. doi:10.1007/s002940050102
- Chen, Z., Brown, R. L., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2007). Identification of Maize Kernel Endosperm Proteins Associated with Resistance to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 97(Wsi 18), 1094–1103.
- Chen, Z. Y., Brown, R. L., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2010). PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 69–81. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00574.x

- Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Cleveland, T. E., Damann, K. E., & Russin, J. S. (2001). Comparison of Constitutive and Inducible Maize Kernel Proteins of Genotypes Resistant or Susceptible to Aflatoxin Production. *Journal of Food Protection*, *64*(11), 1785–1792.
- Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2002). Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology*, *92*(12), 1084–1094. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.10.1084
- Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2004). Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology*, *94*(13), 938–945. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.9.938
- Cotty, P. J., & Bayman, P. (1993). Competitive exclusion of a Toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an Atoxigenic Strain. *Phytopathology*, *83*, 1283–1287.
- Ehrlich, K. C., Chang, P., Yu, J., & Cotty, P. J. (2004). Aflatoxin Biosynthesis Cluster Gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(11), 6518–6524. doi:10.1128/AEM.70.11.6518
- Ehrlich, K. C., Yu, J., & Cotty, P. J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(3), 518–527. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02637.x
- FAO. (1993). *El maíz en la nutrición Humana. Colección FAO: Alimentación y Nutrición* (Vol. 25).
- Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, *46*(2), 113–125. doi:10.1016/j.fgb.2008.10.011

- Goldblatt Leo, A. (1969). The structure and chemistry of the aflatoxins. In *Aflatoxin. Scientific Background, Control and Implications* (Vol. 7, p. 474). New York: Academic Press.
- Guo, B. Z., Chen, Z. Y., Brown, R. L., Lax, a R., Cleveland, T. E., Russin, J. S., ... Widstrom, N. W. (1997). Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology*, 87(11), 1174–1178. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.11.1174
- Gúzman-de-Peña, D., & Ruiz-Herrera, J. (1997). Relationship between Aflatoxin Biosynthesis and Sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*, 205, 198–205.
- Kale, S. P., Milde, L., Trapp, M. K., Frisvad, J. C., Keller, N. P., & Woo Bok, J. (2008). Requirement of LaeA for Secondary Metabolism and Sclerotial Production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(10), 1422–1429. doi:10.1016/j.fgb.2008.06.009.Requirement
- Kelley, R. Y., Gresham, C., Harper, J., Bridges, S. M., Warburton, M. L., Hawkins, L. K., Williams, W. P. (2010). Integrated database for identifying candidate genes for *Aspergillus flavus* resistance in maize. *BMC Bioinformatics*, 11 Suppl 6(Suppl 6), S25. doi:10.1186/1471-2105-11-S6-S25
- Kelley, R. Y., Williams, W. P., Mylroie, J. E., Boykin, D. L., Harper, J. W., Windham, G. L., Shan, X. (2012). Identification of maize genes associated with host plant resistance or susceptibility to *aspergillus flavus* infection and aflatoxin accumulation. *PLoS ONE*, 7(5). doi:10.1371/journal.pone.0036892
- Lee, C. Z., Liou, G. Y., & Yuan, G. F. (2006). Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. *Microbiology*, 152(1), 161–170. doi:10.1099/mic.0.27618-0
- Li, R., & Kang, M. S. (2005). A Media-Free Method of Determining Kernel Infection Rates of Maize Field-Inoculated with *Aspergillus flavus*. *Journal of New Seeds*,

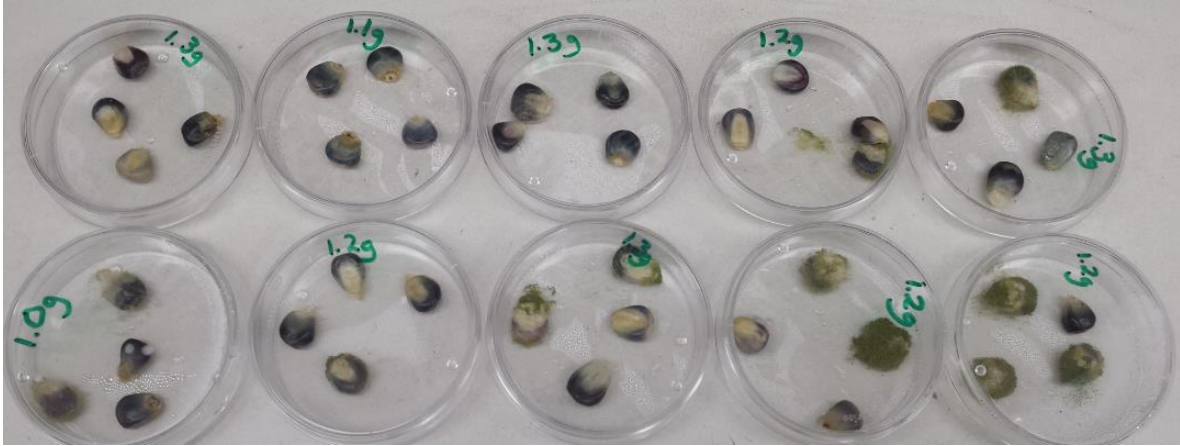
- Lillehoj, E. B., Ciegler, A., & Hall, H. H. (1967). Aflatoxin B1 uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and Resulting Toxic Effects. *Journal of Bacteriology*, 93(6), 464–471.
- Luo, M., Brown, R. L., Chen, Z.-Y., Menkir, A., Yu, J., & Bhatnagar, D. (2011). Transcriptional profiles uncover *Aspergillus flavus*-induced resistance in maize kernels. *Toxins*, 3(7), 766–86. doi:10.3390/toxins3070766
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2015). Organos vegetales. In *Atlas de Histología Vegetal y Animal* (p. 5). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Retrieved from <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>
- Morillo, E., & Miño Castro, G. (2011). *Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP. Iniap*. Quito.
- Ortega-Beltran, A., Guerrero-Herrera, M. D. J., Ortega-Corona, A., Vidal-Martinez, V. a., & Cotty, P. J. (2014). Susceptibility to Aflatoxin Contamination among Maize Landraces from Mexico. *Journal of Food Protection*, 77(9), 1554–1562. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-474
- Payne, G. A., & Brown, M. P. (1998). Genetics and Physiology. *Annu. Rev. Phytopathol*, 36, 329–62.
- Price, M. S., Yu, J., Nierman, W. C., Kim, H., Pritchard, B., Jacobus, C. A., ... Payne, G. A. (2006). The aflatoxin pathway regulator AfIR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 275–279. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00084.x
- Richardson, M. D., & Logendra, S. (1997). Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3903–3907. doi:10.1021/jf970117f

- Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., & Selitrennikoff, C. P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and alpha-amylase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2365–6. doi:10.1128/AEM.67.5.2365-2366.2001
- Schoch, C. L., Seifert, K. a., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. a., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 1–6. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Smith, C. A., Woloshuk, C. P., Robertson, D., & Payne, G. A. (2007). Silencing of the aflatoxin gene cluster in a diploid strain of *Aspergillus flavus* is suppressed by ectopic aflR expression. *Genetics*, 176(4), 2077–2086. doi:10.1534/genetics.107.073460
- White, T. J., Bruns, S., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In and T. J. W. .H. Gelfand, J.J. Sninsky (Ed.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). New York: Academic Press. doi:citeulike-article-id:671166
- Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Bennett, J. W. (2004). Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis MINIREVIEW Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1253–1262. doi:10.1128/AEM.70.3.1253

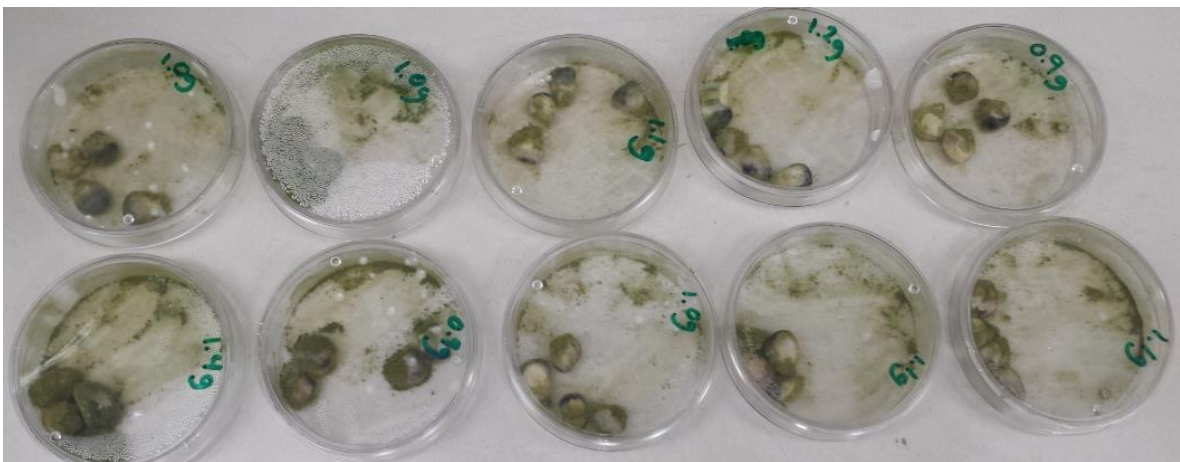
## APÉNDICE

### Registro Fotográfico de las 11 razas de maíz criollo del Valle de Oaxaca

#### MAHN16 Sin inóculo

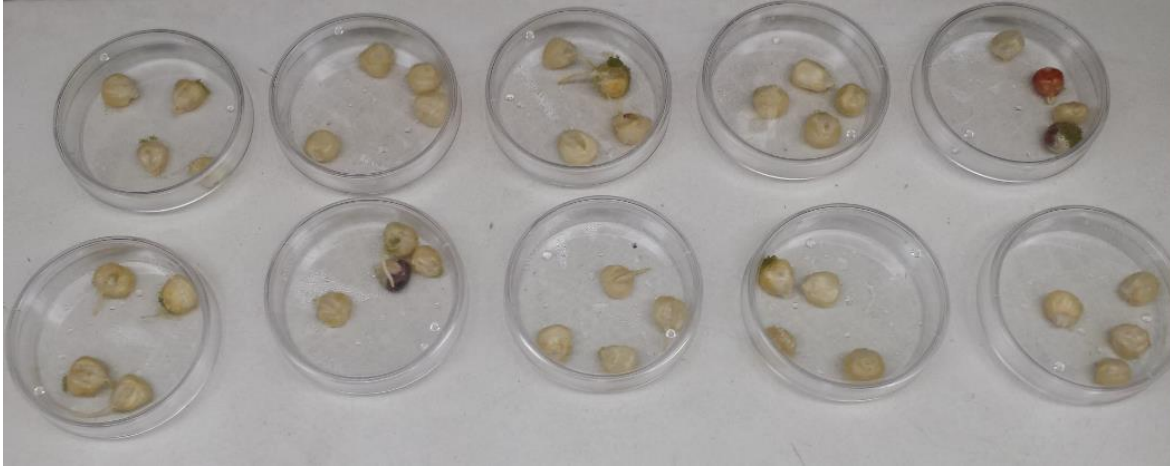


#### MAHN16 Inoculado con *A. flavus* T-1

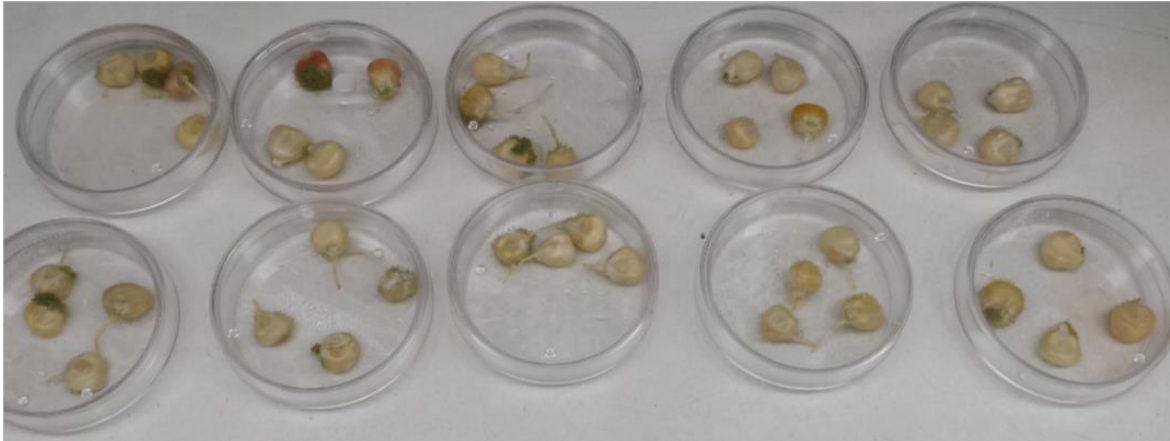




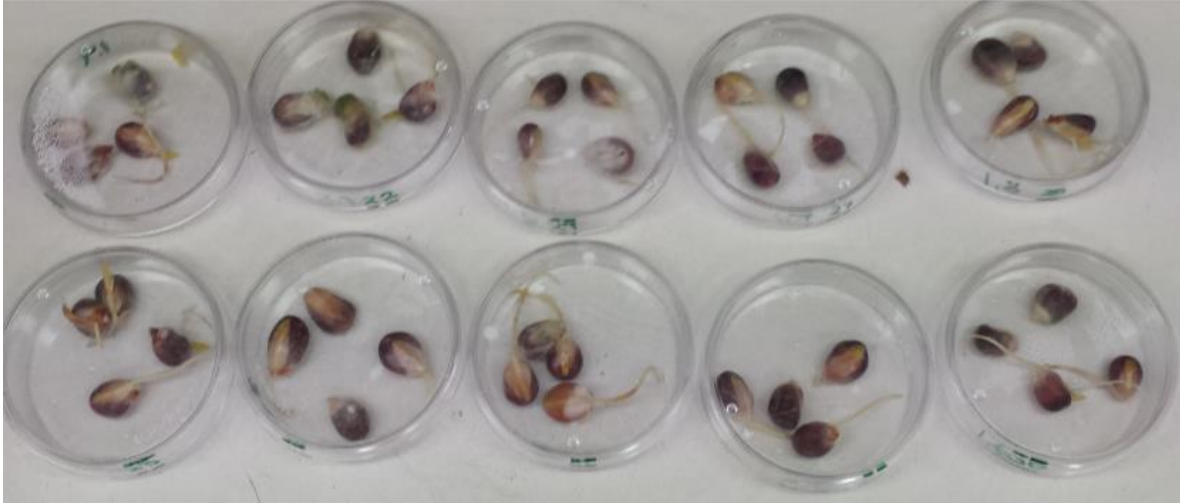
**MAHN27 Sin inóculo**



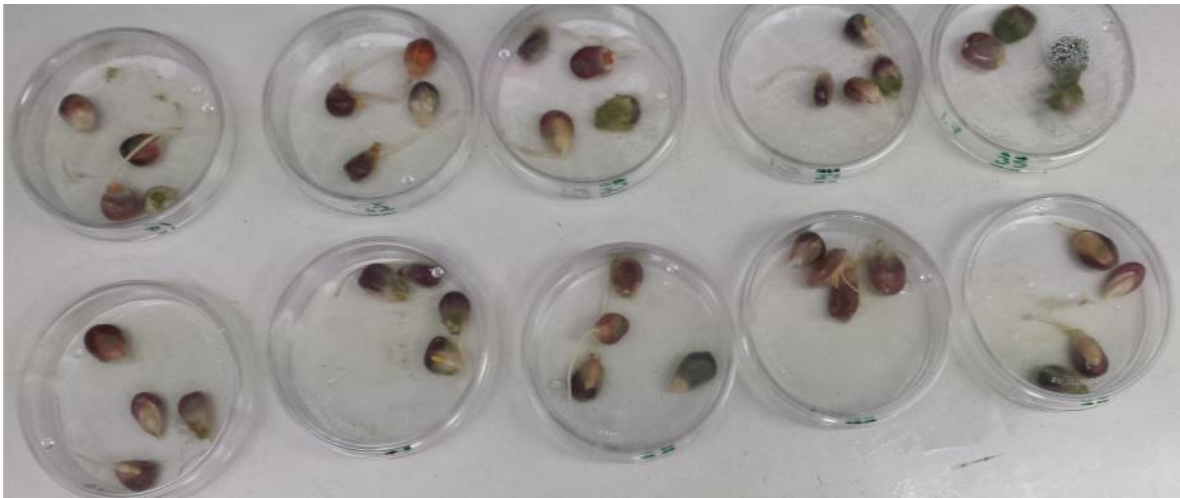
**MAHN27 Inoculado con *A. flavus* T-1**



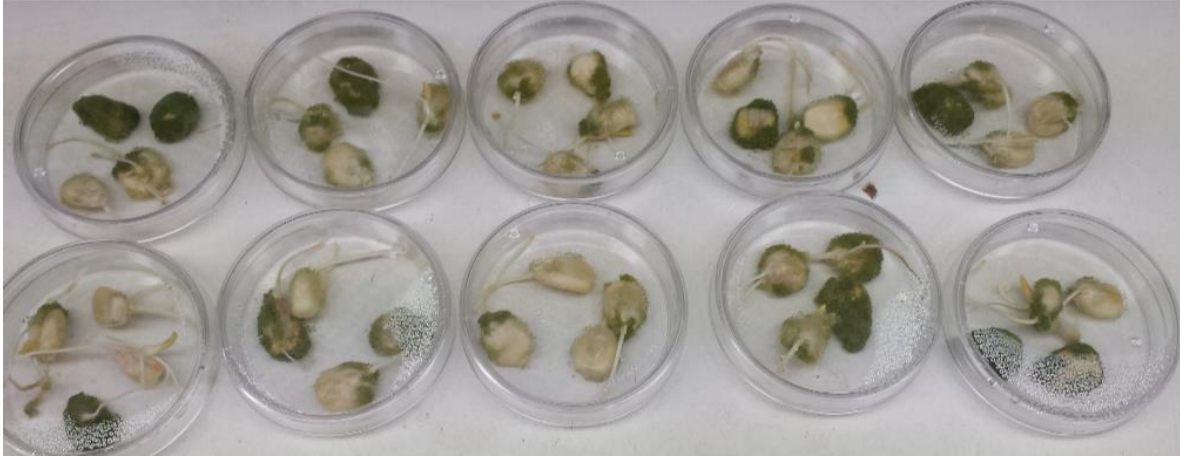
**MAHN28 Sin inóculo**



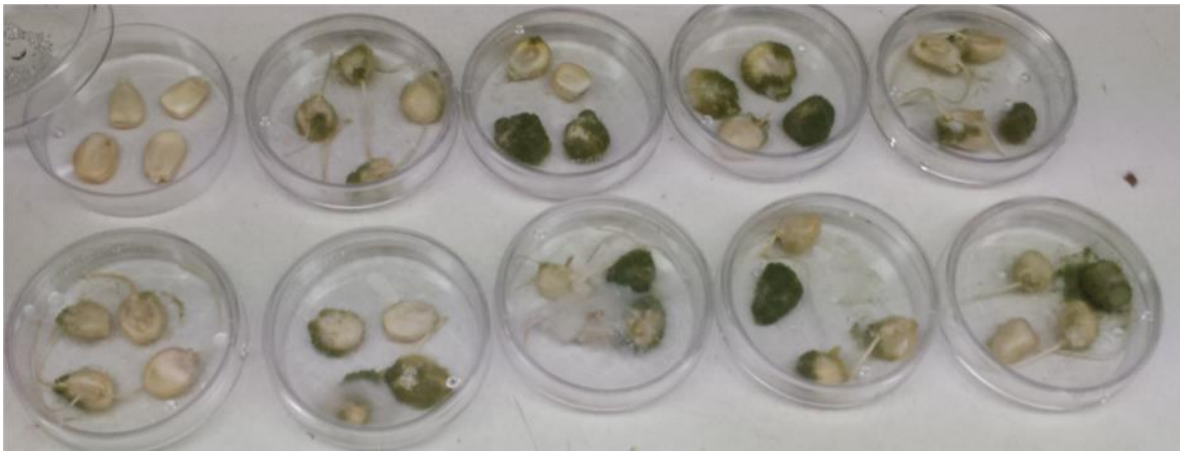
**MAHN28 Inoculado con *A. flavus* T-1**



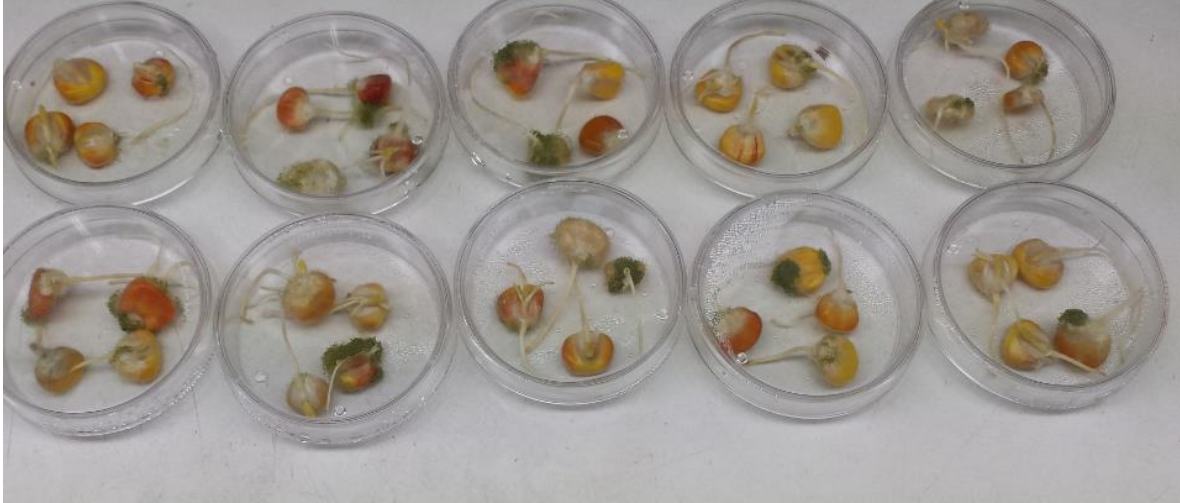
**MAHN15 Sin inóculo**



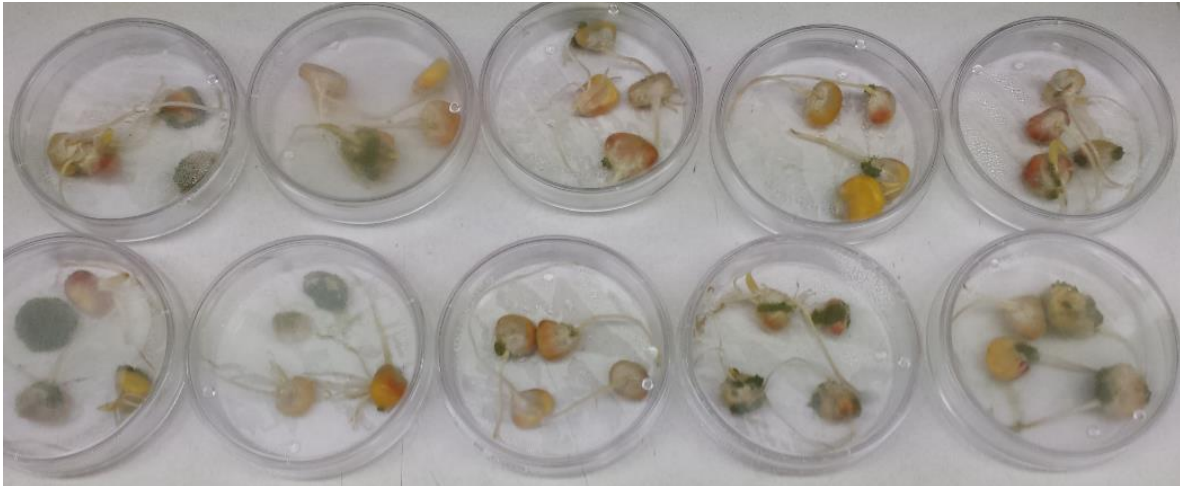
**MAHN15 Inoculado con *A. flavus* T-1**



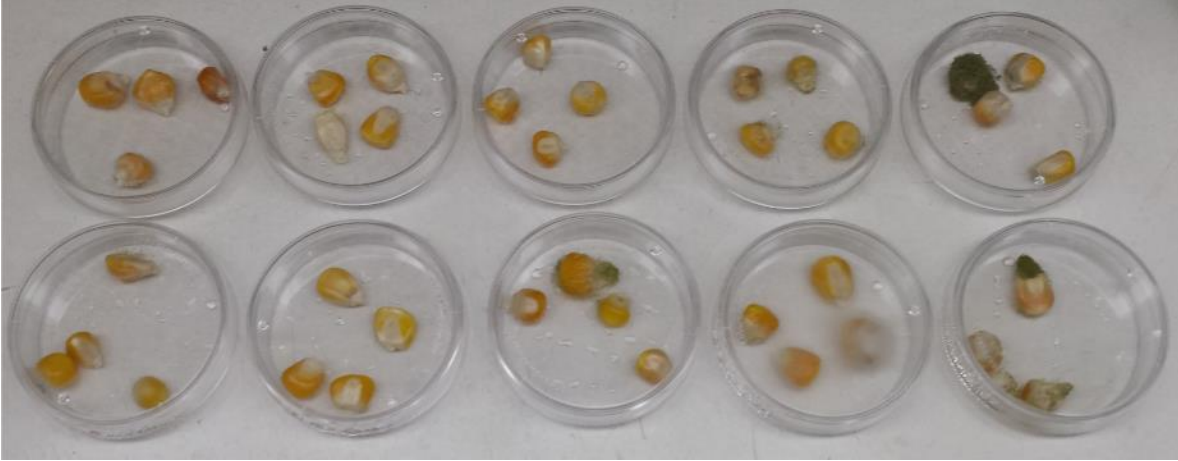
**MAHN23 Sin inóculo**



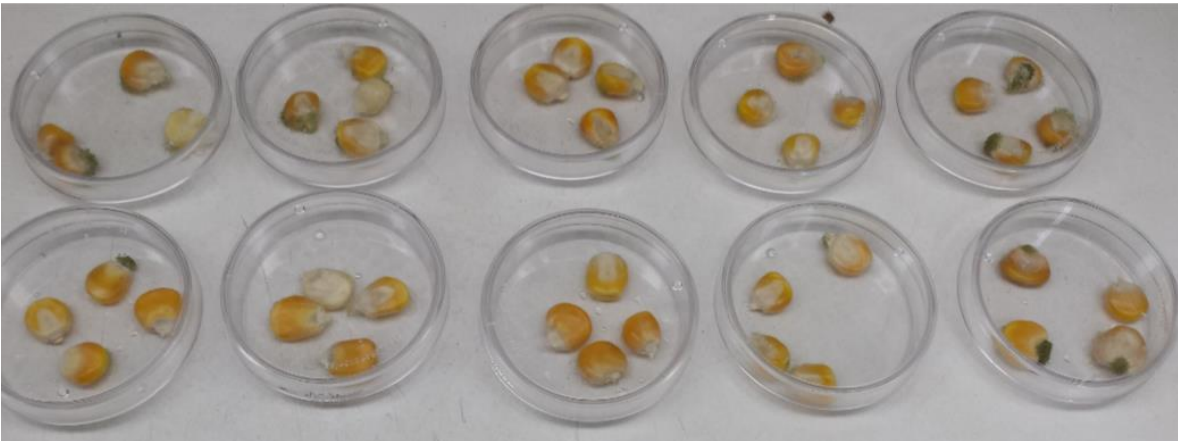
**MAHN23 Inoculado con *A. flavus* T-1**



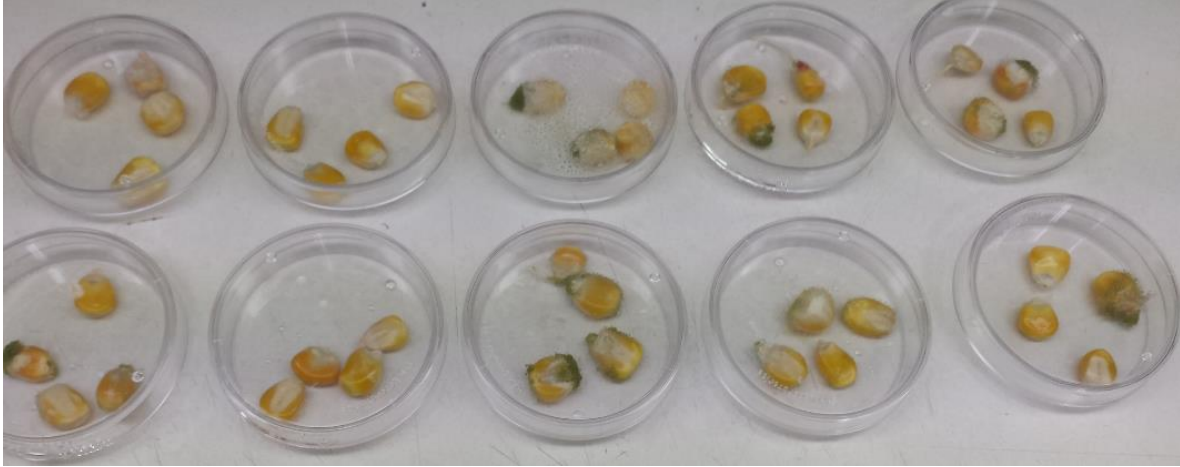
**MAHN1 Sin inóculo**



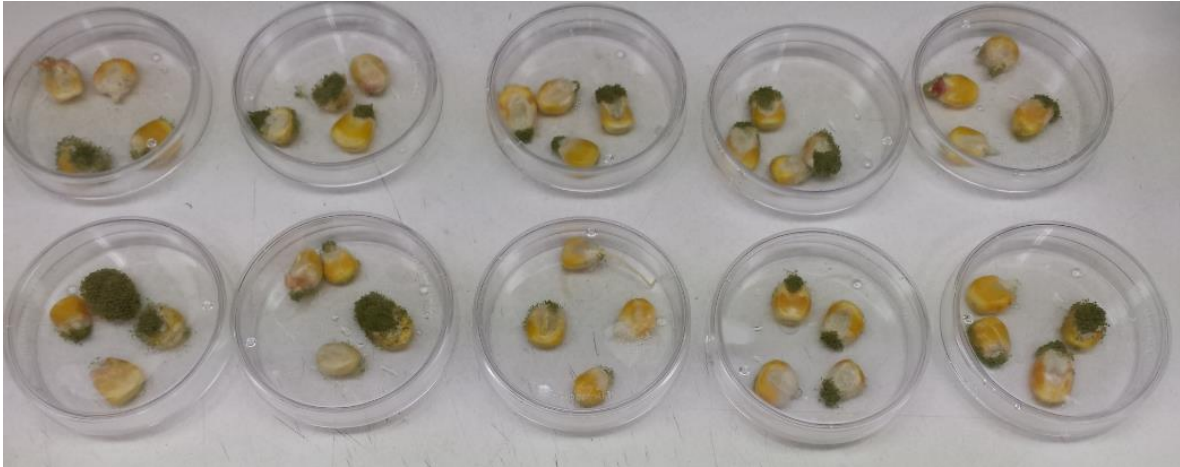
**MAHN1 Inoculado con *A. flavus* T-1**



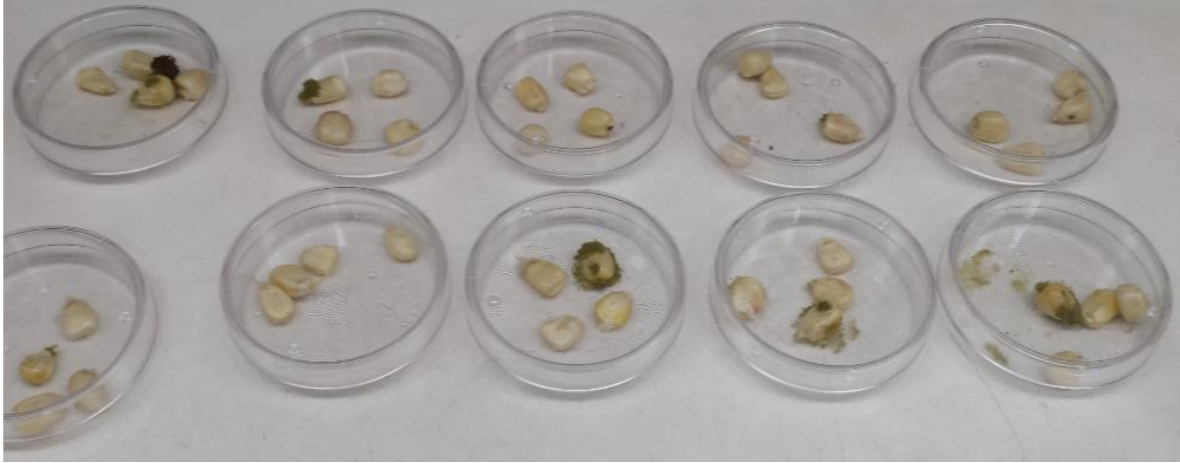
**MAHN18 Sin inóculo**



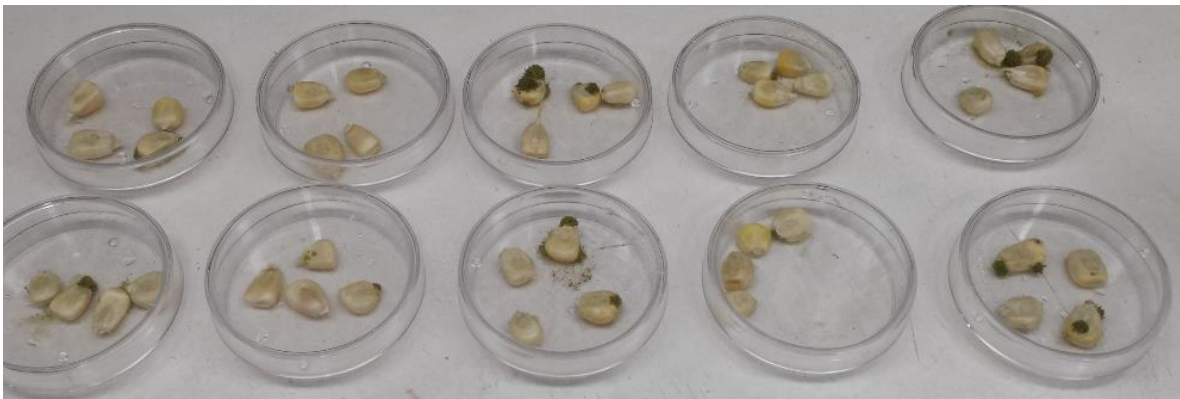
**MAHN18 Inoculado con *A. flavus* T-1**



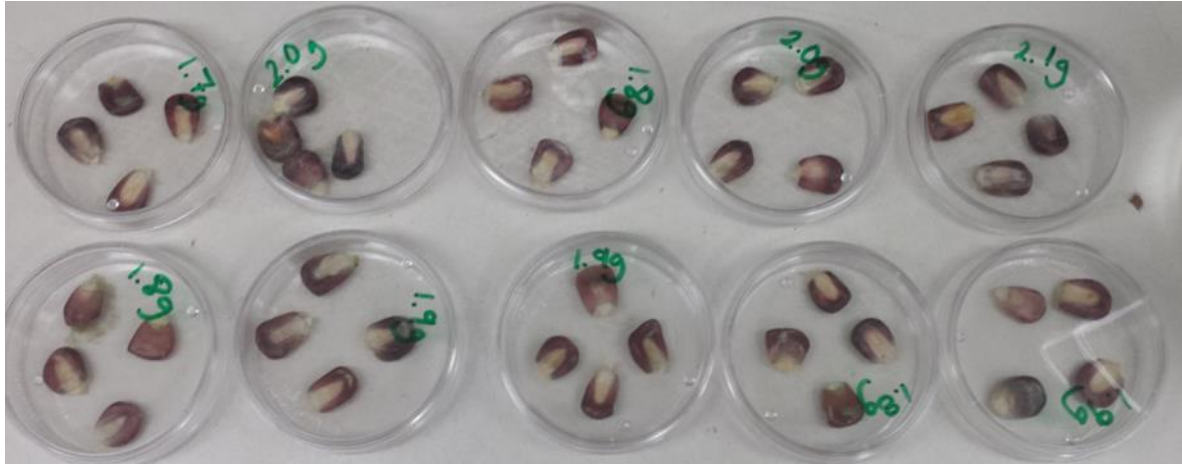
**MAHN19 Sin inóculo**



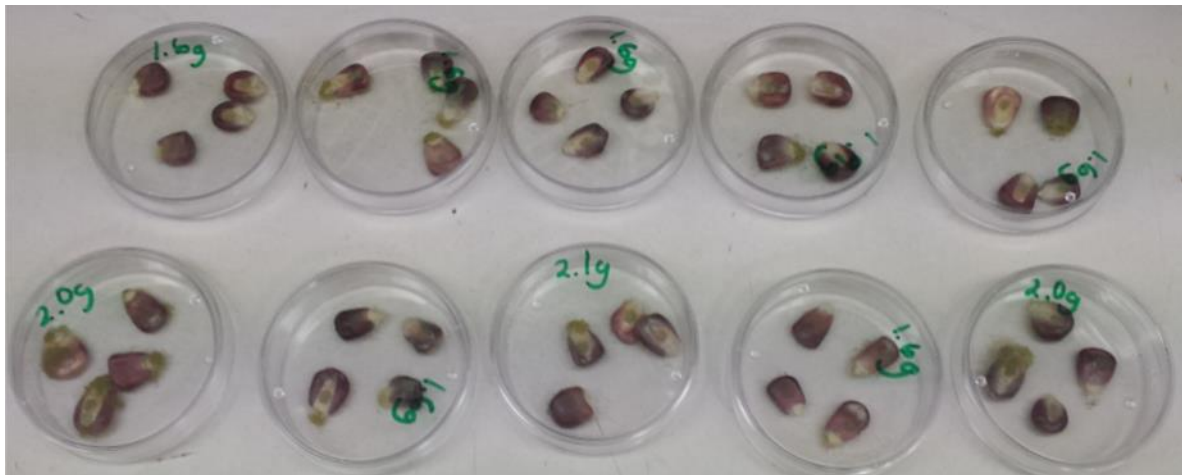
**MAHN19 Inoculado con *A. flavus* T-1**



MSHR 25 Sin inóculo

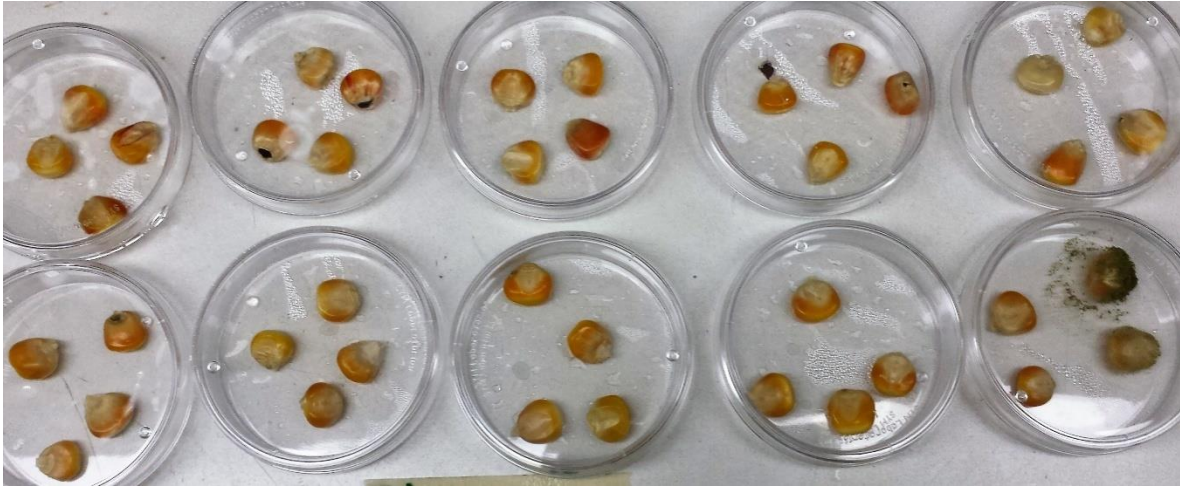


MSHR 25 Inoculado con *A. flavus* T-1

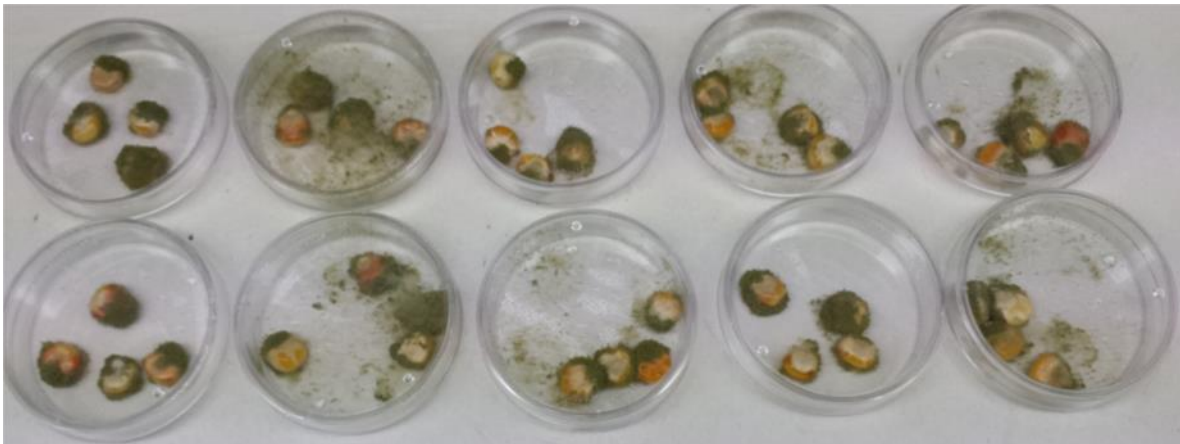




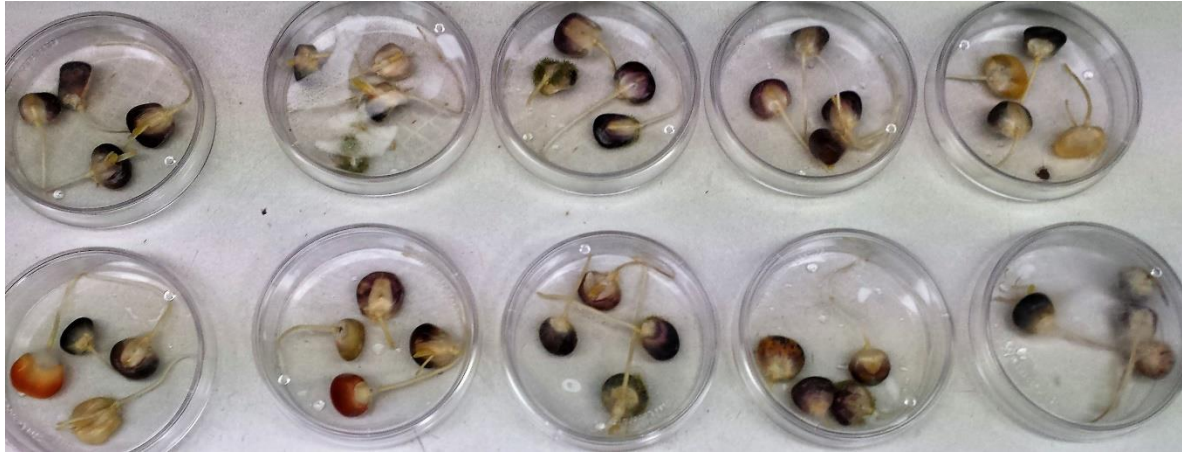
**MJMA 30 Sin inóculo**



**MJMA 30 Inoculado con *A. flavus* T-1**



**MTLP 31 Sin inóculo**



**MMTLP 31 Inoculado con *A. flavus* T-1**

