



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

**Análisis de genes localizados en la región de inversión de
cromosoma 4 (inv4m) en los maíces de tierras altas**

Tesis que presenta

IBT. Elsa Ibarra Reyes

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

Directores de Tesis:

Dr. Ruairidh James Hay Sawers

Dr. Luis Herrera-Estrella

Irapuato, Guanajuato

Enero 2018

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Genética y Genómica del Maíz de la Unidad de Genómica Avanzada en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Luis Rafael Herrera Estrella y el Dr. Ruairidh James Hay Sawers.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado a través del apoyo número: 420378

A mis Padres, Ofelia y Guillermo, con ustedes siempre me he sentido a salvo, amada y apoyada, ustedes son la razón de que hoy pueda tener un logro más.

A mis hermanos y a mis sobrinas, por ser una fuente constante de alegría y risas y por siempre creer en mí.

A mis compañeros del Labo 9, Sofi, Caro, Karlita, Vladi, Benji, Edith y Jessy, gracias por todas las risas y momentos compartidos.

Chio, gracias por haberme tenido paciencia y haber compartido muchos conocimientos.

Índice General

AGRADECIMIENTOS.....	3
Índice de Figuras	5
Índice de Tablas.....	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. ANTECEDENTES	10
1.1 El maíz	10
1.1.1 Origen y domesticación.....	10
1.1.2 Razas de Maíz en México.: maíces de tierras altas	10
1.1.3 Adaptación a Tierras altas	12
1.1.4 Región de Inversión en el cromosoma 4	14
1.1.5 El cultivo de maíz en México	17
1.1.6 Requerimientos nutricionales del maíz: fósforo.	18
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1 Material Vegetal.....	22
4.2 Extracción de DNA.....	23
4.3 Genotipado por CAPS.....	24
4.4 Tratamiento de bajo nivel de fósforo en el suelo	24
4.5 Determinación de genes candidatos.....	25
4.6 Extracción de ARN total.....	25
4.7 Análisis de PCR en tiempo real (RT qPCR)	25
4.8 Diseño de los oligos para amplificar las regiones promotoras de los genes.....	27
4.9 Análisis de las secuencias promotoras.....	27
5. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	28
5.1 Detección de variedades de maíz que poseen la región de inv4m.....	28
5.2 Efectos fisiológicos de la baja disponibilidad de fósforo.	30
5.3 Gen GRMZM2G019177	32
5.3.1 Sistema Glioxalasa.....	33
5.3.2 Patrón de expresión para el gen GRMZM2G019177	35

5.3.3 Análisis de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G019177	39
5.4 Gen GRMZM2G125838	46
5.4.1 Calcineurina B (CBL)	47
5.4.2 Patrón de expresión para el gen GRMZM2G125838.....	49
5.4.3 Análisis de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G125838	51
6. Conclusiones.....	57
7. Perspectivas	58
8. Bibliografía	59

Índice de Figuras

Figura 1. La zona de cultivo de maíces de tierras altas coincide con la Sierra volcánica transversal	12
Figura 2. Maíz de tierras altas tiene mayor similitud con teosinte mexicana.....	13
Figura 3. Evidencia molecular de la introgresión de mexicana en maíz.	15
Figura 4. Inversión Cromosómica.	16
Figura 5. Mapa de las variedades vegetales analizadas.	22
Figura 6. Palomero toluqueño presenta la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m)..	23
Figura 7. Los maíces de tierras altas presentan la inversión en el cromosoma 4 (inv4m).28	
Figura 8. Plantas sometidas al tratamiento de bajo fósforo.....	31
Figura 9. Plantas bajo condiciones normales de nutrientes (+P) y en deficiencia de fósforo (-P).	31
Figura 10. Funcionamiento del sistema glioxalasa.....	33
Figura 11. Representación esquemática de la estructura del gen Metallo-beta-lactamasa de maíz.....	35
Figura 12. Atlas de expresión del gen metalo-beta-lactamasa en maíz.....	36
Figura 13. Análisis RT PCR del gen Metallo-beta-Lactamasa en B73, PT y Mi21 de raíz y hojas en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo.	37
Figura 14. Análisis RT PCR del gen Metallo-beta-Lactamasa en B73, PT y Mi21 de raíz en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo.	38
Figura 15. Alineamiento de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G019177 en B73, PT y Mi21.	40

Figura 16. Representación esquemática de la estructura de la proteína de unión a calcio de maíz.....	46
Figura 17. Análisis RT PCR de la proteína de unión a calcio en B73, PT y Mi21 de raíz y hojas en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo.....	50
Figura 18. Análisis RT PCR de la proteína de unión a calcio en B73, PT y Mi21 para la raíz en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo..	51
Figura 19. Alineamiento de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G125838 en B73, PT y Mi21..	52
Figura 19. Alineamiento de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G125838 en B73, PT y Mi21..	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de los oligos usados para el análisis de qRT-PCR de los genes candidatos y su referencia.....	26
Tabla 2. Lista de los oligos usados para el análisis de las regiones promotoras de los genes candidatos.	27
Tabla 3. Lista de las enzimas clasificadas experimentalmente pertenecientes a la familia metalo-beta-lactamasa	32
Tabla 4. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G019177 en B73.	43
Tabla 5. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G019177 en Mi21.....	44
Tabla 6. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G019177 en PT.	45
Tabla 7. Algunos estímulos fisiológicos que elevan el Calcio (Ca ²⁺) en las células de las plantas. Modificada de Sanders et al., 1999	47
Tabla 8. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G125838 en PT.	53
Tabla 9. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G125838 en B73.	54
Tabla 10. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G125838 en B73	55

RESUMEN

El fósforo es uno de los elementos esenciales para el adecuado crecimiento y desarrollo de la planta, desafortunadamente la concentración bio disponible de este elemento en el suelo es mínima y por lo tanto normalmente se utilizan fertilizantes químicos para compensar las necesidades nutricionales de la planta. Solo un 20% de fósforo presente en los fertilizantes es absorbido por la planta, mientras que el resto entra en contacto con los mantos acuíferos y puede generar problemas de contaminación. Además del riesgo ecológico, la materia prima de los fertilizantes es un recurso no renovable. Aproximadamente el 70% de suelo disponible para la agricultura es deficiente de fósforo; el maíz es el cultivo más importante en México y de gran demanda globalmente, generar variedades tolerantes a suelos con baja disponibilidad de fósforo es uno de los grandes retos de la agricultura.

Las razas de maíces de tierras altas del centro de México crecen en condiciones de baja disponibilidad de fósforo y muestran adaptación a este ambiente. Analizando el genoma de los maíces de tierras altas para encontrar una posible causa a la adaptación de condiciones climáticas extremas de tierras altas, incluyendo la baja disponibilidad de fósforo, se encontró una región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m) que pudo ser producto de a introgresión con su pariente silvestre, el *Zea mays ssp. mexicana*.

Con base en estos datos, se analizaron dos genes candidatos localizados en la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m); estos genes codifican para una proteína de unión a calcio y una enzima metalo-beta-lactamasa. Se analizaron los patrones de expresión de estos genes entre B73, cultivar adaptado a tierras bajas y dos variedades de tierras altas como Palomero Toluqueño y un maíz cónico identificado como Michoacan 21. Para llevar a cabo el análisis de expresión, los tres cultivares fueron crecidos bajo condiciones de invernadero. A la mitad de las plantas se les regó con una solución nutritiva que contenía todos los nutrientes y al resto con una solución nutritiva que no contenía fósforo.

Los resultados indican que las variedades de tierras altas, PT y Mi21, presentan mayor inducción de los genes candidatos bajo condiciones de estrés. Adicionalmente se

analizaron las regiones promotoras de estos genes y se encontraron diferencias en el número de sitios de unión a factores de transcripción, lo cual podría ser la causa de la diferencia entre los niveles de expresión relativos.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is one of the key elements required for plant growth and development. Its bio-availability in soil however is limited, which has resulted in an overuse of chemically derived fertilizers to comply with the plant's nutritional requirements. Approximately only 20% of the P in these fertilizers is absorbed by the plant, while the rest is infiltrated into aquifers leading to contamination. Aside from the ecological risk this represents, the starting point for these products is a non-renewable resource. Another alarming aspect is that estimates suggest that close to 70% of the tillable soil available for agriculture is phosphorus deficient. Therefore, generating varieties tolerant to phosphorus deficient soils for a crop of worldwide importance, such as Maize, is one of agriculture's main challenges.

Central Mexican Highland landraces grow in soils with low phosphorus availability and are locally adapted to this environment. After having analyzed genomic data available for individuals adapted to low phosphorus availability and harsh weather conditions, a particular region of interest was identified. This refers to a chromosomal inversion located in chromosome 4 (inv4m), which is thought to be the product of introgression from wild relative *Zea mays ssp. mexicana*.

Based on this data, two candidate genes located in the region of interest were identified. These genes code for a calcium binding protein and a metallo-beta-lactamase protein. Gene expression patterns were obtained for these candidates in B73, an American lowland inbred line and for Palomero Toluqueño and Michoacan 21, both Mexican highland landraces. Plant materials were grown under greenhouse conditions, where treatments consisted in watering individuals with nutrient solution including phosphorus and solutions lacking phosphorus. Results suggest that candidate genes are more induced in highland landraces PT and Mi21 under low phosphorus availability. In addition, the promoter regions for the candidate genes were analyzed which resulted in differences in the number of transcription factor binding sites, which may be the underlying cause for the differences in relative expression levels.

1. ANTECEDENTES

1.1 El maíz

1.1.1 Origen y domesticación

El término maíz se deriva de *mahiz*, antigua palabra taina (lenguaje arahuacano ahora extinto) de los pueblos indígenas de la América precolombina. Pruebas arqueológicas indican que el maíz es el alimento básico de las antiguas civilizaciones maya, azteca y olmeca de México, y su cultivo más venerado.

El maíz (*Zea mays ssp. Mays*) y sus parientes más cercanos, los teocintles son pastos de la familia botánica Poaceae o Gramineas al igual que el trigo, el arroz, la cebada, el centeno y la avena. El número cromosómico es $2n=20$ para el maíz y todas las especies anuales de teocintle (Sánchez González, 2011)

Evidencia arqueológica y genética indican que el maíz fue domesticado hace unos 9000 años a partir de un teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*) que crecía abundantemente en la región del Balsas, región de clima templado y baja altitud (Doebley, 1990, Matsuoka et al., 2002) y se dispersó en varias rutas originando gran diversidad de razas de maíz en México.

El maíz es el *commodity* agrícola que más se produce en el mundo. Debido a sus cualidades alimenticias para la producción de proteína animal, el consumo humano y el uso industrial se ha convertido en uno de los productos más importantes en los mercados internacionales. Su relevancia económica y social supera a la de cualquier otro cultivo. Adicionalmente, el cultivo y transformación del maíz es fuente de empleo y alimento para un número importante de personas en el mundo (FIRA, 2016)

1.1.2 Razas de Maíz en México.: maíces de tierras altas

El término raza se ha utilizado en el maíz y en las plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo que permiten diferenciarlas como grupo (CONABIO, 2012).

Las razas de maíz de México se han agrupado, con base en caracteres morfológicos, de adaptación y genéticos (isoenzimas) en 7 grupos o complejos raciales (Sanchez, J. J., Stuber & Goodman, M. M. Sanchez, 2000):

- 1) Grupo Cónico
- 2) Grupo Sierra de Chihuahua.
- 3) Grupo Ocho Hileras.
- 4) Grupo Chapalote.
- 5) Grupo Tropicales precoces.
- 6) Grupo Dentados tropicales.
- 7) Grupo Maduración tardía.

Las razas del grupo Cónico, tienen en común mazorcas de forma cónica, vainas de las hojas muy pubescente, presencia de antocianinas, hojas caídas, número reducido de ramas de la espiga, raíces superficiales y al parecer con cierto grado de resistencia al frío y a la sequía (Sánchez González, 2011) y se distribuyen predominantemente en las regiones con elevaciones de más de 2,000m y en su mayoría son endémicas a los valles altos y sierras del centro del país: el Valle de México, el valle de Toluca, la Sierra Norte de Puebla, la Meseta Purhépecha en Michoacán y la Mixteca Alta en Oaxaca; en este grupo se incluyen Palomero Toluqueño, Cónico, Arrocillo Amarillo, Chalqueño y Cacahuacintle.

El grupo de maíces de Tierras altas es cultivado en las zonas más frías de México; La temperatura media de abril a octubre, que es la temporada de crecimiento, en el año 2016 para el Valle de Toluca fue de 16°C (CONAGUA, 2016). También están sometidos a menor cantidad de lluvias durante el periodo de crecimiento, por ejemplo, Palomero Toluqueño estuvo expuesto a 704 mm de lluvia mientras que variedades de tierras bajas, como Zapalote chico recibieron 1107 mm (Ruiz Corral et al., 2008).

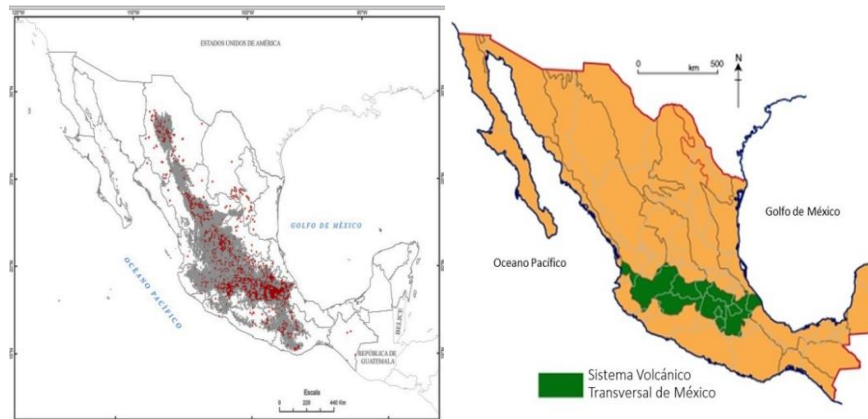


Figura 1. La zona de cultivo de maíces de tierras altas coincide con la Sierra volcánica transversal. En la imagen de la derecha se muestran con puntos rojos la distribución conocida de los maíces cónicos. Tomada de CONABIO, 2001; En la parte izquierda se muestra la región que abarca la Sierra Volcánica Transversal.

La región fisiográfica ocupada por la Sierra Volcánica Transversal se extiende desde el Océano Pacífico hasta el Golfo de México (Figura 1), es la más alta del país, así como una de las de mayor variación de relieve y de tipo de rocas. El tipo de suelo que predomina en esta región es el andosólico. Constituido principalmente de ceniza, generalmente de colores oscuros y con alta capacidad de retención de humedad. Tienen generalmente bajos rendimientos agrícolas debido a su acidez, bajo estas condiciones el aluminio y el manganeso pueden volverse muy solubles y tóxicos, además reduce la capacidad de la planta para absorber fósforo, calcio, magnesio y molibdeno. La Sierra Volcánica Transversal ocupa regiones donde crecen maíces del grupo cónico, esto significa que los maíces de tierras altas también han tenido que lidiar con la baja disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, el fósforo.

1.1.3 Adaptación a Tierras altas

En experimentos, con un ambiente de invernadero controlado, se ha comprobado que las semillas de maíces de tierras altas crecen más rápido a bajas temperaturas que las semillas de maíces que crecen en climas tropicales y baja altitud (Eagles et al., 1983). En septiembre de 1988 se reportó en el Valle de Toluca una helada de -0.8°C , causando un severo daño en las hojas de los maíces que crecen en climas templados y sub-tropicales, mientras que los maíces de tierras altas no se vieron severamente afectados (Eagles & Lothrop, 1994).

Es claro que los maíces como Palomero Toluqueño crecen mejor que los maíces de tierras bajas en climas fríos, más secos y de mayor altitud, esto implica que ha existido un

fenómeno de adaptación a las condiciones climáticas de tierras altas. Los maíces de tierras altas son de las razas más antiguas que existen, por lo tanto son los que tienen mayor similitud genética con el teosinte *parviglumis*, lo que lleva a pensar que los maíces de tierras altas podrían ser los ancestros de todas las demás variedades de maíces, pero esta idea es inconsistente ya que teosinte *parviglumis* no crece a la altitud de este grupo de maíces.

Existe un teosinte (*Zea mays ssp. mexicana*) que se distribuye a altitudes de 1500 a 2800 m en los estados de Michoacán, Estado de México, Puebla y Tlaxcala. Es de ciclo precoz a intermedio (65 – 80 días de floración), hojas verde oscuro con mucha pubescencia en las vainas (Sánchez González, 2011). Los maíces de tierras altas, como Palomero Toluqueño, Cónico y Arrocillo amarillo son morfológicamente distintos a los maíces que crecen a baja y mediana altitud, sin embargo, tienen similitud con el teosinte *mexicana* (Figura 2) en el tipo de planta, pubescencia y coloración rojiza en las vainas de las hojas (Hufford et al., 2012)(Kato, 1997).

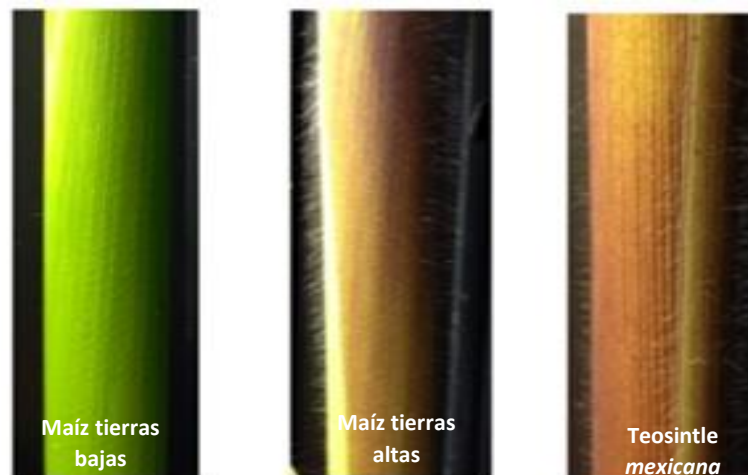


Figura 2. Maíz de tierras altas tiene mayor similitud con teosinte mexicana. Se muestra una imagen de un teosinte mexicana recolectado a 2213 m de altitud con su característica pubescencia y color rojizo, los cuales se encuentran presentes en el maíz de tierras altas, pero no en el maíz de tierras bajas que es verde y sin pubescencia.

Hibridación entre teosinte y maíz es posible, ya que tienen el mismo número de cromosomas, pero la hibridación resulta más exitosa al usar polen de teosinte en maíz, que de manera contraria (Baltazar, Sánchez-Gonzalez, De La Cruz-Larios, & Schoper, 2005). Las características similares entre teosinte *mexicana* y el maíz de tierras altas es evidencia morfológica de flujo genético entre estas dos especies. Los alelos llegan a una nueva ubicación como haplotipos vía polen o dispersión de semillas. Conforme los haplotipos se van filtrando en la nueva población, son divididos por recombinación, haciéndose pequeños

conforme pasa el tiempo. De este modo, el tamaño de los haplotipos puede proporcionar información sobre si el flujo genético ocurrió recientemente o más distante en el pasado (Bragg, Supple, Andrew, & Borevitz, 2015).

El movimiento de material genético de una línea dentro el fondo genético de otra crea nuevos genotipos recombinantes. El aumento de la variación genética a través de la introgresión puede proporcionar una capacidad adaptativa adicional (Hamilton & Miller, 2016).

Rasgos morfológicos como la coloración y la pubescencia, que se presentan originalmente en *Zea mays ssp. mexicana*, se han asociado con la adaptación a climas fríos (Lauter, Gustus, Westerbergh, & Doebley, 2004), el hecho de que estos rasgos se encuentren presentes es los maíces de tierras altas podría indicar un flujo genético con roles adaptativos a las condiciones de tierras altas.

1.1.4 Región de Inversión en el cromosoma 4

Para analizar el rol adaptativo de la introgresión de teosintle *mexicana* en el maíz es importante conocer los genes, alelos y regiones genómicas específicas que están involucrados o que no han permitido la introgresión. En el 2013, el grupo de Hufford, utilizó marcadores moleculares (SNP) y analizó 189 individuos obtenidos de 9 poblaciones de maíz y de teosintle *mexicana* que crecían en áreas geográficas similares logrando identificar 9 regiones de introgresión de *mexicana* en maíz en 7 de las poblaciones.

El cromosoma 4 muestran gran evidencia de introgresión de *mexicana* a maíz (Figura 3), este cromosoma presenta datos interesantes que podrían fundamentar la hipótesis del rol adaptativo de la introgresión, por ejemplo, una región de QTL identificada para la pigmentación rojiza y la pubescencia co localiza en este cromosoma; aquí mismo se encuentran genes asociados con la domesticación como *teosintle glume architecture* (tga1) que muestran un bajo nivel de introgresión de maíz a teosintle, lo cual indica que hay una fuerza de selección para las regiones de introgresión (Hufford et al., 2013).

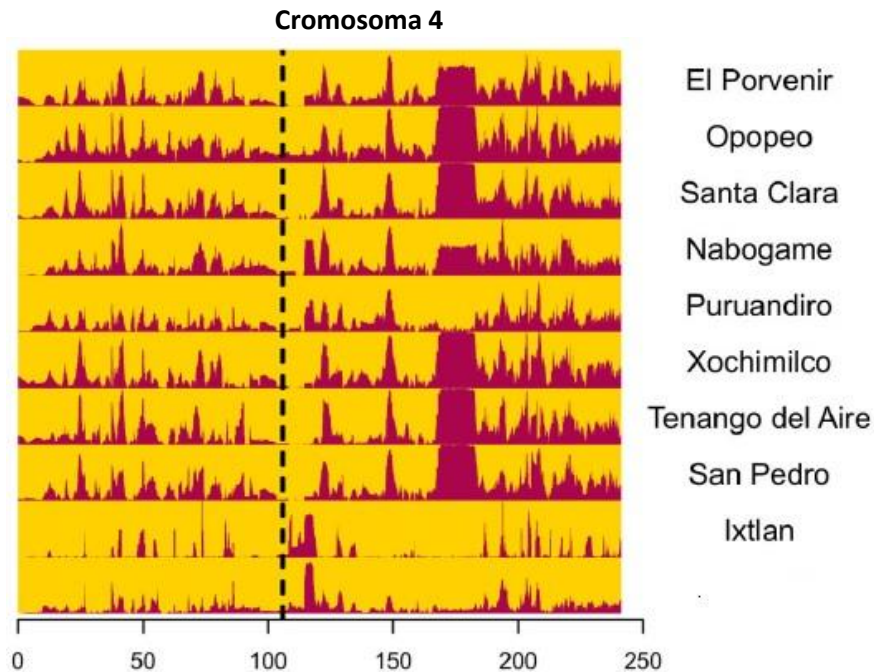


Figura 3. Evidencia molecular de la introgresión de mexicana en maíz. Imagen del cromosoma 4 de 9 poblaciones de maíz y teosintle mexicana que crecían en cercanía; en el eje de las X se muestra la posición del cromosoma en (Mb), en color amarillo se representa el genoma de maíz y en color rosa el genoma de teosintle mexicana

El flujo genético entre mexicana y maíz puede estar condicionado por la altitud; en la Figura 3 se muestra que en las poblaciones de Puruandiro localizada a 1915 msnm y la de Ixtlán que se encuentra a 1547 msnm, aunque crecen en simpatria con mexicana no presentan señales de introgresión. Métodos estadísticos que utilizaron los datos de marcadores moleculares en teosintle indican que hay una relación entre la diferencia en elevación y la diferenciación genética entre poblaciones de teosintle (Bradburd et al., 2013). La altitud es un factor importante que ha moldeado la diversidad genética entre *Zea mays ssp. parviglumis* y *Zea mays ssp. mexicana*.

Como podemos observar en la Figura 3 hay una zona muy bien delimitada que presenta la introgresión de mexicana en maíz, y que al parecer ha logrado fijarse en varias poblaciones de maíz esto es un fenómeno interesante que podría explicarse con un arreglo cromosómico especial. Se observó que en una población de maíz x teosintle *Zea nicaraguensis* y de maíz x teosintle *Zea luxurians* la frecuencia de recombinación disminuyó

en el cromosoma 4, lo cual pudo ser causado por un re arreglo cromosómico como una inversión paracéntrica (Mano & Omori, 2007).

Cuando en un cromosoma ocurren 2 cortes, a veces la región localizada entre los cortes gira 180° antes de volverse a unir con los fragmentos, dicho evento genera una mutación en el cromosoma llamada inversión (Figura 4) (Griffiths, et al., 2000). Si el segmento invertido incluye el centrómero la inversión es pericéntrica; si no está incluido la inversión es paracéntrica (Gardner et al., 2011). La recombinación se ve afectada ya que, en heterocigotos con inversión, un cromosoma tiene la secuencia normal y el otro es portador de la secuencia invertida, y durante la meiosis el entrecruzamiento dentro de la inversión produce fragmentos sin centrómero, que al final serán perdidos por qué no se podrán alinear. Estos problemas mecánicos para linearse reducen la frecuencia de recombinación.

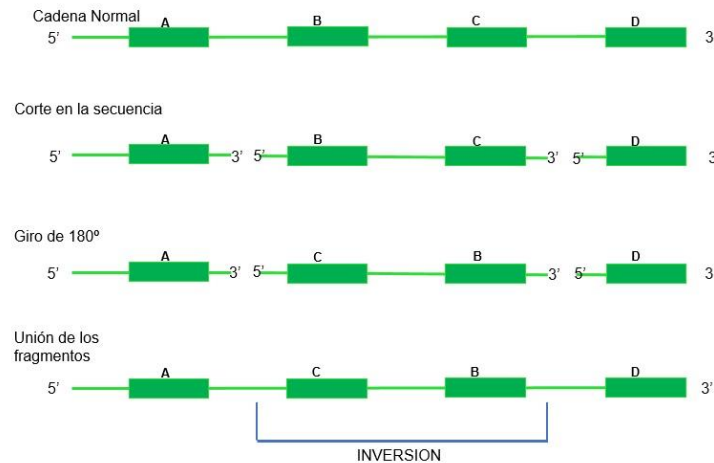


Figura 4. Inversión Cromosómica. Los genes están representados con las letras A, B, C y D, se muestra el corte generado entre los genes, posteriormente el fragmento que incluye los genes B y C gira 180° y finalmente se vuelven a unir los fragmentos, generando una secuencia invertida (A-C-B-D)

Los efectos que causa una inversión se pueden estimar en los polimorfismos que se producen en una secuencia de nucleótidos, incluyendo la generación de un desequilibrio de ligamiento (LD) (Fang et al., 2012). Usando marcadores moleculares (SNP) se analizaron 10 poblaciones de teosinte *mexicana*, y se observó que presentan un patrón de desequilibrio de ligamiento en la región del cromosoma 4, lo que se puede relacionar con una región de inversión. La inversión en el cromosoma 4 (inv4m) de teosinte *mexicana*

puede estar relacionada con la adaptación a una mayor altitud (Pyhäjärvi, Hufford, Mezmouk, & Ross-Ibarra, 2013).

La introgresión del teosinte *mexicana* al maíz domesticado, y en especial la introgresión de la región de inversión del cromosoma 4 (inv4m) pudo haberle conferido al maíz la adaptación a tierras altas.

1.1.5 El cultivo de maíz en México

El maíz es la base de la alimentación en México y, en general, de los pueblos indígenas del continente americano. De éste se aprovechan sus raíces, hojas, y mazorcas; con sus granos secos se preparan tortillas y se hacen tamales, tlacoyos, atoles, aceites, jarabes, fibras, papel, entre otras cosas. Se estima que existen 3.2 millones de productores distribuidos en las 32 entidades y el consumo per cápita en México es de 278 kilogramos de este grano (SAGARPA, 2016)

La producción de maíz en el año agrícola 2015 creció a una tasa anual de 6.1 por ciento para totalizar 24.69 millones de toneladas. Para este periodo, diez estados concentraron el 80 por ciento de la producción nacional. Sinaloa se ubica como el principal productor de maíz en el país con una participación de 21.8 por ciento, lo cual representa un volumen de 5.3 millones de toneladas. En segundo lugar, se encuentra Jalisco con 13.5 por ciento de participación y un volumen de producción de 3.3 millones de toneladas. El tercer lugar lo ocupa el Estado de México con una participación de 8.2 por ciento del total y un volumen de 2.0 millones de toneladas (FIRA, 2016)

Se producen principalmente dos variedades de maíz: blanco y amarillo. El maíz blanco se produce exclusivamente para el consumo humano, en virtud de su alto contenido nutricional. Por otra parte, el maíz amarillo se destina al procesamiento industrial y a la alimentación animal (Deere&Company, 2016).

La producción de maíz en México se distribuye en todos los meses del año; no obstante, presenta una clara estacionalidad, muy relacionada con las cosechas de los ciclos Primavera-Verano y Otoño-Invierno. De acuerdo con un informe de SAGARPA, durante el año comercial octubre 2015 – septiembre 2016, se produjeron 17.3 millones de toneladas de maíz blanco y amarillo en el ciclo Primavera – Verano y en el ciclo Otoño – Invierno 2015/16, la producción fue de 8.4 millones de toneladas.

México ocupó durante los años 2007 y 2008 el cuarto lugar en producción, llegando hasta el séptimo en el 2011, producto de la intensa sequía y heladas que se presentaron en dicho año. En el 2012 se recuperó la quinta posición en volumen de producción mundial, de acuerdo con los datos del United States Department of Agriculture (USDA).

De acuerdo con el reporte Perspectivas Agrícolas OCDE-FAO 2016-2025, se proyecta que la superficie cosechada de maíz crezca a una tasa promedio anual de 0.6 por ciento en ese periodo. Así, se ubicaría en 7.68 millones de hectáreas en 2025, es decir, 3.0 por ciento mayor al promedio de 2013-2015 (FIRA, 2016).

Para poder alcanzar estos objetivos se necesita aumentar los rendimientos por hectárea en los próximos años. Actualmente la aplicación de fertilizantes químicos es la alternativa para aumentar significativamente el rendimiento.

1.1.6 Requerimientos nutricionales del maíz: fósforo.

Los elementos nutritivos necesarios para un buen desarrollo de la planta son: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

El fósforo es un elemento esencial para todos los organismos vivos. Componente de todas las células vivas, el fósforo es indispensable porque ningún otro elemento puede reemplazar su rol tan vital en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos. Como consecuencia, la producción de cultivos para alimentación requiere un adecuado suministro de fósforo en el suelo (FAO, 2008).

El maíz acumula fósforo hasta su madurez fisiológica. El patrón de acumulación de fósforo es más rápido en los estados tempranos de crecimiento vegetativo y cuando llega a la madurez entre el 61 y el 82% del fósforo estará en el grano (Steele, McCormick, Percival, & Brown, 1981).

La única forma en que el fósforo puede ser absorbido del suelo por las plantas es como fosfato inorgánico (ortofosfato, Pi). La concentración de fosfato inorgánico en el suelo es generalmente baja (2 a 10µM) (Raghothama, 1999), lo cual es un nivel muy poco óptimo para el crecimiento de las plantas, por lo tanto, el fósforo tiene que ser agregado como fertilizante.

Se recomienda un programa de fertilización que contenga 0.3kg de fósforo en 100 kg de abono. Se tiene que aplicar un esquema de fertilización bajo en la primera época de

desarrollo de la planta hasta que la planta tenga un número de 6 a 8 hojas, a partir de esta cantidad de hojas se recomienda un abono fosforado con una cantidad de 70% de ortofosfato. Se calcula que durante todo el proceso de cultivo de maíz se necesitan 825kg/ha de abonado (Below, 2013)

La roca fosfórica es la materia prima usada para la manufactura de los fertilizantes fosfatados. El primer paso es obtener ácido fosfórico, posteriormente es calentado varias veces para remover toda el agua y producir ácido superfosfórico. El fósforo en este ácido está presente como ortofosfato y polifosfato en una concentración entre 72% y 76% disponible para las plantas (Rehm et al., 2002)

Las rocas fosfóricas son un recurso finito y no renovable. Los depósitos más grandes de este material se encuentran en África, China, Marruecos y Estados Unidos; hay muchos depósitos en los trópicos y los subtropicos pero no han sido explotados, debido a que no cumplen con los estándares para la producción de fertilizantes y son muy pequeños para sustentar la gran inversión que se requiere para su explotación y su procesamiento. Si el consumo sigue aumentando gradualmente, como en los datos de Mineral Commodity Summaries que proyectaron que aumentaría de 43.7 millones de toneladas en el 2015 a 48.2 millones de toneladas en el 2019 y al mismo tiempo las reservas de esta roca continúan agotándose, debemos estar preparados para una crisis de estos fertilizantes.

Otro problema es que, aunque se aplique una gran cantidad de fertilizante, la planta absorbe solo el 20%, ya que es rápidamente inmovilizado debido a su alta reactividad con cationes como calcio y magnesio en suelos calcáreos y aluminio y fierro en suelos ácidos. El resto del fósforo inorgánico puede ser infiltrado en las aguas subterráneas, esta sobrecarga de nutrientes provoca la eutrofización de lagos y estanques que da lugar a una explosión de algas que suprimen otras plantas y animales acuáticos generando eventualmente, zonas muertas (Ha & Tran, 2014).

El fósforo es un elemento de vital importancia para el correcto desarrollo del maíz, pero es preocupante que para una agricultura de alto rendimiento se necesite suplementar al suelo con este elemento en forma de fertilizantes químicos, es aún más preocupante que la fuente de obtención de dichos fertilizantes pueda agotarse.

Cultivos que tengan la habilidad de absorber y utilizar eficientemente el fósforo disponible en el suelo son claves para mitigar el desperdicio de fósforo e incrementar el uso eficiente de este recurso en la agricultura (Zhang et al., 2014). Los maíces de tierras altas

crecen en suelos con poca disponibilidad de fósforo, por lo cual resulta interesante e importante conocer las bases genéticas y moleculares que le permiten a maíces como Palomero Toluqueño adaptarse a estos ambientes.

2. HIPÓTESIS

Genes localizados en la región de Inv4m de maíces de tierras altas están relacionados con un mejor funcionamiento en condiciones de baja disponibilidad de fósforo.

3. OBJETIVOS

1. Identificar la región de introgresión (Inv4m) en maíces de tierras altas y tierras bajas.
2. Identificar los genes localizados en la región de introgresión (Inv4m).
3. Seleccionar genes involucrados en la respuesta a la baja disponibilidad de fósforo como candidatos, verificar su patrón de expresión diferencial y posible relación con la respuesta a baja disponibilidad de fósforo en hojas y raíces en cultivares de tierras altas y tierras bajas.
4. Hacer el análisis de las regiones promotoras de los genes candidatos para localizar posibles elementos regulatorios en cis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Las variedades vegetales seleccionadas fueron B73, 2 maíces de tierras bajas: Zapalote Chico y Na-Tel, 2 maíces de tierras altas: las Líneas Casi Isogénicas (NIL) de Palomero Toluqueño (PT) y Michoacán 21 (M21), dos muestras de teosinte *Zea mays ssp. mexicana* y dos de *Zea mays ssp. parviglumis* (Figura 5). Zapalote Chico es una raza agronómicamente muy importante del sur de México, adaptada al clima cálido y baja altitud (Sánchez González, 2011), usado en mejoramiento genético por características sobresalientes como resistencia al gusano cogollero y potencial hídrico bajo sequía (CONABIO, 2010). Nal-Tel forma parte de una raza que crece en el trópico seco y sub-húmedo de la península de Yucatán (CONABIO, 2011). Se considera que los materiales de esta raza evaden la sequía por su ciclo de maduración temprana (Wellhausen et al.1951).



Figura 5. Mapa de las variedades vegetales analizadas. Se utilizaron diferentes colores para especificar la disponibilidad de fósforo a la que están expuestos los maíces en las ubicaciones donde crecen originalmente, En color rojo son los suelos con buena disponibilidad de fósforo y en azul los suelos con baja disponibilidad.

Las semillas fueron proporcionadas por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT); Zapalote fue colectado originalmente en Oaxaca (16.32 N, -95.27W) a una altitud de 71 msnm y Nal-Tel en la península de Yucatán (20.85N, -88.52W) a una altitud de 30 msnm. Los teosintles *parviglumis* fueron colectados en comunidades de Jalisco a altitudes de 417 y 1268 msnm; las muestras de teosintle *mexicana* provienen de altitudes desde 2400 a 2600 msnm.

B73 es una línea considerada como modelo para estudios de genética clásica y molecular a nivel mundial, ya que se cuenta con la secuenciación de su genoma y sirve como referencia para diversos estudios.

Michoacán 21 y Palomero Toluqueño pertenecen a las razas de la parte alta del centro de México, las cuales se cultivan en zonas agrícolas que van desde los 2000 hasta 3000 msnm. Palomero Toluqueño presentan la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m) (Figura 6) (Gonzalez-Segovia, unpublished data), y mediante retrocruzamientos sucesivos con un parental recurrente, que es B73, a partir de una planta F1, se generan líneas casi isogénicas (NIL) portadoras de una introgresión del genotipo de interés en un fondo genético conocido.

Region	Chr	Start (Mb)	Stop (Mb)	fd region	n region
1	1	120	145	0.23	74
2	2	73	78	0.49	39
4	4	169	180	0.76	985
5	5	102	135	0.41	90
6	6	46	56	0.81	55
7	7	30	31	0.50	3
9a	9	107	125	-0.13	455
9b	9	43	44	0.47	9
10	10	39	54	0.39	47

Figura 6. Palomero toluqueño presenta la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m). En la imagen se muestra la posición física de inicio (Start) y término (Stop) de regiones de inversión previamente reportadas, la cantidad de marcadores moleculares (SNP) para cada región es el parámetro (n región) y mientras más cercano sea a 1 el parámetro (fd región) significa que esa región está presente en el genoma analizado.

4.2 Extracción de DNA

Un círculo de 0.8cm de diámetro fue colectado de la hoja de 3 individuos de cada variedad vegetal, colocado en un tubo de 2.0 ml y almacenado a -80°C. El tejido congelado fue molido en un Qiagen TissueLyser, se le adicionó Buffer de Extracción (250mM NaCl, 200 mM Tris pH7.5, 25mM EDTA, 0.5%SDS) y fue mezclado en el Thermomixer a 68° C por 10 min. Después de un ciclo de centrifugación (15000 rpm, 2min, a temperatura ambiente), 200 µl del supernadante fueron transferidos a un tubo de 1.5 ml, posteriormente se agregaron 200 µl de Isopropanol y se continuó con otro ciclo de centrifugación (15000 rpm, 5 min, a temperatura ambiente). El supernadante se descarta antes de agregar 100 µL de EtOH 70% y se repite el ciclo de centrifugación. El EtOH se retiró y se dejó secar a

temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras finales fueron eluidas en 40 µL de agua miliQ y almacenadas a -20°C.

4.3 Genotipado por CAPS

Para determinar si las variedades de maíz con las que se está trabajando poseen la región de inversión que se desea estudiar se utilizó el ensayo de CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) que utiliza fragmentos de ADN amplificados mediante una reacción de PCR, los cuales son sometidos a una digestión con endonucleasas; cambios en los fragmentos de ADN, como SNPs o INDELSs generaran fragmentos de distintos tamaños. (Konieczny et al.,1993). Un Polimorfismo de un solo Nucleótido (SNP) característico del haplotipo de *Zea mays ssp.Mexicana* localizado en la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m) está presente en el genoma de Palomero Toluqueño, la endonucleasa de restricción HinfI es capaz de reconocer este polimorfismo, con lo cual es posible identificar y diferenciar entre poblaciones de maíz que poseen la región de inv4m y las que no.

Las condiciones de amplificación fueron una incubación inicial de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 45 seg. Se utilizó KAPA Taq DNA Polymerase (Kapa Biosystems, Salt River, Cape Town, South Africa) en la reacción de PCR. Los oligos que se usaron fueron RS427 5' -CTGAGCAGGAGATGATGGCCACTC- 3' y RS428 5'-AGGAAAGGACATAAAAGAAAGGTGCA - 3', con los cuales se esperaban fragmentos de 502 pb. Las reacciones fueron analizadas en un gel de agarosa al 1.2%.

La digestión fue desarrollada usando 5 µL de cada reacción de PCR, se añadió la Endonucleasa de Restricción Hinf1 (New England Bio Labs Inc) y se dejó a 37°C toda la noche. El producto de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 4%.

4.4 Tratamiento de bajo nivel de fósforo en el suelo

Para analizar el perfil de expresión de los genes, el material vegetal fue crecido en condiciones normales de nutrientes proporcionado por el medio Hoagland (1Mm PO₄) y en bajos niveles de fósforo (0Mm PO₄). Se emplearon dos muestras biológicas por cada tratamiento y por cada cultivar. Los tratamientos y las macetas fueron aleatoriamente asignados y distribuidos en el invernadero.

Se sembraron 3 semillas de B73, de la NIL de M21 y de PT por maceta, en cada caso fueron ajustadas a una sola planta 2 semanas después de la germinación. Las plantas

fueron crecidas bajo condiciones de invernadero con radiación solar natural y la temperatura del aire regulada entre aproximadamente 19 y 32 °C. La humedad relativa osciló entre 60 y 65%.

4.5 Determinación de genes candidatos

Se conoce la localización de la región de inversión en el cromosoma 4 (Hufford et al., 2013) y fue mapeada al genoma de referencia de B73, ubicando 27 genes dentro de la región de interés. En estudios previos se analizó la expresión diferencial de 8 genes entre B73 y la NIL de Palomero Toluqueño (Aguilar Rangel, unpublished data), se seleccionaron 2 genes que mostraron expresión diferencial entre los cultivares y que estaban relacionados con tolerancia a estrés abiótico.

4.6 Extracción de ARN total

El ARN total fue aislado de tejidos congelados, usando hojas y raíces de plantas de cada cultivar de 10 días de edad que crecieron bajo condiciones normales de nutrientes (1Mm PO₄) y en bajos niveles de fósforo (0Mm PO₄). Se utilizó el sistema de purificación PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Ambion) Cat No. 12183-018, con la modificación de previa extracción con Trizol (Invitrogen) Cat. No. 15596-018, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total fue utilizado para la elaboración de los análisis de expresión de los genes candidatos en tiempo real.

4.7 Análisis de PCR en tiempo real (RT qPCR)

500 ng de ARN total de raíz y de hoja de cada cultivar y en cada tratamiento fueron empleados como templado para la síntesis de ADN de cadena complementaria (cDNA) con una mezcla de oligos reversos de los 2 genes candidatos y el gen constitutivo a 5 µM cada uno y la enzima Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los cDNAs sintetizados fueron utilizados como templado en cada qPCR para el análisis de los patrones de expresión de los genes candidatos.

El PCR cuantitativo se llevó a cabo en el equipo Step One Plus Real-Time PCR System de Applied Biosystems usando SYBR Green PCR Master Mix (KAPA Biosystems)

Cat. No. KR0389, en reacciones de 10 μ L de volumen, las cuales contenían 5 μ L de KAPA SYBR® FAST Master mix (2x), 0.2 μ L de oligo forward a 10 μ M, 0.2 μ L de oligo reverso a 10 μ M, 0.2 μ L de fluoróforo ROX como referencia pasiva, así como 3.5 μ L de cDNA diluido como templado y las cantidades apropiadas de agua destilada Ultrapure™ Distilled Water GIBCO® Cat. No. 10977. Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95° C, 40 ciclos de 15 seg a 95° C, 1 min a la T_m de cada par de oligos; al término de los 40 ciclos, se inició la curva de Melt con 15 seg a 95° C, bajó la temperatura a 60° C, de aquí subió hasta 95° C tomando lectura cada 0.3° C.

Se efectuaron 3 réplicas técnicas por duplicado con presencia de control sin templado (NTC) para la verificación de la calidad de la amplificación. Los oligos fueron diseñados con ayuda del software Primer3 Plus y T_m Calculator de ThermoFisher Scientific (Tabla 1).

El gen β -tubulina de maíz (GRMZM2G108766) fue utilizado como control constitutivo para normalizar los resultados de los otros genes. La expresión de los genes fue normalizada sustrayendo el valor C_T de β -tubulina del valor de C_T del gen de interés y el nivel de expresión relativa fue obtenida con la ecuación: $(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$, donde $\Delta\Delta C_T$ representa ΔC_T (gen de interés en la etapa evaluada) - ΔC_T (gen interés en la etapa T₀), de acuerdo con el protocolo reportado por Czechowski et al. (2004).

Tabla 1. Lista de los oligos usados para el análisis de qRT-PCR de los genes candidatos y su referencia.

Nombre del gen	Anotación	ID	Secuencia del primer (5´- 3´)
GRMZM2G108766	β Tubulina	KP113	CTACCTCACGGCATCTGCTATGT
		KP114	GTCACACACACTCGACTTCACG
GRMZM2G125838	Proteína de unión a calcio	RA 1069	CGGCAACTACTGTTGGATCGT
		RA 1070	CTGCACCTCCTCGATGTTCGTA
GRMZM2G019177	Metallo-beta lactamasa	RA 1041	ATACTCCAAAGCTGGCCAACA
		RA 1042	TCAGCCCACTTCTGTGATCT

4.8 Diseño de los oligos para amplificar las regiones promotoras de los genes

Los oligos para amplificar los promotores (Tabla 2) fueron diseñados basados en las secuencias reportadas públicamente de B73 en la base de datos <http://maizegdb.org/> (Lawrence et al., 2008) tratando de abarcar 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG). Se corroboró su especificidad en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio. Posterior a la verificación se purificó el producto de PCR en cada cultivar con el kit QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN, con número de catálogo 28104 siguiendo las especificaciones del proveedor. Se mandó secuenciar los fragmentos purificados de 2 plantas diferentes de las NIL de Michoacán 21 y de Palomero Toluqueño.

Tabla 2. Lista de los oligos usados para el análisis de las regiones promotoras de los genes candidatos.

Nombre del gen	Anotación	ID	Secuencia del primer (5'-3')	Longitud del oligo (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)	Longitud del fragmento a amplificar (pb)
GRMZM2G125838	Proteína de unión a calcio	EIR022	CGGCTGACTGAAAAGACCAA	20	58	1288
		EIR023	CTCCTGCACCTCCTCGATG	19		
GRMZM2G019177	Metallo-beta lactamasa	EIR028	GAGCTTCATGGTCACTCGTTTAG	23	58	986
		EIR027	CTCTGCTCACCGACGAAGAA	20		

4.9 Análisis de las secuencias promotoras

Las secuencias de los fragmentos de los promotores de cada gen para los dos cultivares (NIL M21 y PT) se alinearon mediante el software Clustal W (Larkin et al., 2007). Al obtener las alineaciones, se efectuó un análisis *in silico* de las regiones en busca de elementos en cis importantes para la regulación en los diferentes cultivares mediante el navegador de análisis de promotores Plant Promoter Analysis Navigator (Plant PAN) que reconoce elementos en cis presentes en la secuencia del promotor, a través de una colección de bases de datos de PLACE, TRANSFAC, AGRIS y JASPER y es cargada en formato FASTA en la dirección de internet http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php (Chang, Lee, Huang, Huang, & Pan, 2008).

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN.

5.1 Detección de variedades de maíz que poseen la región de inv4m

Utilizando el genotipado por CAPS se observó un distinto patrón de bandeo en el gel de agarosa (Figura 7) que nos permite diferenciar de manera rápida si las variedades vegetales poseen la inversión (inv4m) que se desea estudiar. El polimorfismo de un solo Nucleótido (SNP) característico del haplotipo de *Zea mays ssp. Mexicana* localizado en la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m) cambia el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción, por lo tanto para *Zea mays ssp. Mexicana* y las variedades que tengan la inversión, se generan 3 fragmentos de 295, 166 y 61 pb, y para las variedades que no tienen la inversión (inv4m) el resultado son 4 fragmentos de 251, 166, 61 y 44 pb.

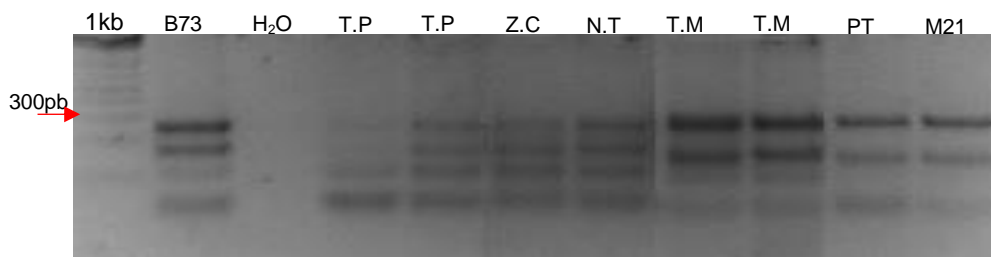


Figura 7. Los maíces de tierras altas presentan la inversión en el cromosoma 4 (inv4m). Producto de la digestión con Hinf1 en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio; B73 se usó como control positivo y H₂O como control negativo, T.P es el producto de la digestión de Teosinte *parviglumis*, Z.C de Zapalote chico, N.T de Nal-Tel, T.M de Teosinte *mexicana*, P.T de la línea NIL de Palomero Toluqueño y M21 de la NIL de Michoacan 21.

Los maíces de tierras bajas presentan el mismo genotipo que *Zea mays ssp. parviglumis* y que B73, esto se puede ver por el tamaño de los fragmentos de ADN que fueron cortados por la endonucleasa, lo cual es un claro indicio de que no poseen la región de inversión en el cromosoma 4 (inv4m). Por otra parte, las líneas de maíz de tierras altas muestran diferente genotipo a los de tierras bajas; los maíces de tierras altas poseen el mismo patrón de bandeo que el *Zea mays ssp. Mexicana*. En otros estudios moleculares ya se había hecho notar que el grupo de razas de tierras altas esta aparte de otros grupos de maíces (Warburton et al., 2008).

El flujo genético entre maíz (*Zea mays ssp. mays*) y teosintle (*Zea spp.*) ocurre en México y en América Central, además híbridos entre estas dos especies se han documentado en archivos arqueológicos (Baltazar et al., 2005). Los maíces de tierras altas

si presentan la región de inversión (inv4m) que se desea estudiar, lo cual es consistente con evidencia morfológica y molecular de la introgresión del genoma de *Zea mays ssp. Mexicana* en el maíz de tierras altas (Hufford et al., 2013)

La técnica de genotipado por CAPS es importante porque nos permite identificar si estamos trabajando con el genotipo de tierras altas o tierras bajas, pero aún más importante, nos permite identificar la presencia o ausencia de una inversión cromosómica.

Cuando un organismo es heterocigoto para la inversión, tienes el mismo contenido genético, solo que una región va a tener el orden invertido, lo cual genera que existan problemas en la recombinación, aunque una inversión represente una disminución en la frecuencia de recombinación y probablemente tenga más consecuencias, este tipo de mutaciones cromosómicas han logrado fijarse en el genoma de diversas especies, lo cual nos hace pensar que dentro de la inversión pueden existir genes benéficos, por ejemplo que ayuden en la adaptación a nuevas condiciones ambientales.

La idea de cómo funcionan las inversiones es simple, una población recibe una población inmigrante portadora de alelos que no son ventajosos para las condiciones locales, localizados en dos o más loci. Si existe descendencia, copia de los alelos localmente adaptados se encontrarán en un fondo genético desconocido y posiblemente con alelos inmigrantes que tengan efectos deletéreos. Las inversiones aparecen en un cromosoma que casualmente es portador únicamente de alelos localmente adaptados; este cromosoma no se va a recombinar con otros, consecuentemente estos genes tendrán mayor fitness que las copias localizados en los locus de cromosomas que si se recombinen. Por lo tanto, los alelos dentro de la inversión y la inversión se propagan (Kirkpatrick & Barton, 2006).

Una gran cantidad de rasgos se han asociado con las inversiones; en *Drosophila* están incluidos rasgos como resistencia al calor y a la inanición, en *Anopheles gambiae* hay dos inversiones paracéntricas que están asociadas con resistencia a insecticidas. En otro tipo de mosquito, *Chironomus ramosus*, los organismos que son heterocigotos para la inversión tienen menor tasa de infección por nemátodos (Hoffmann & Rieseberg, 2008).

En plantas, *Mimulus guttatus*, es una flor que posee un arreglo para una inversión en el ecotipo que crece anualmente y se encuentra en un hábitat caracterizado por la poca disponibilidad de agua en el verano; existe un arreglo diferente para la inversión en la

variedad perenne que crece en una región que posee una humedad adecuada en el suelo todo el año. Este es un excelente modelo genómico para probar que las inversiones cromosómicas están involucradas en la adaptación a un hábitat con condiciones particulares (Lowry & Willis, 2010).

Zea mays ssp. Mexicana posee genes que le han permitido a adaptarse a las condiciones de tierras altas, posiblemente para proteger algunos de estos genes, estos quedaron dentro de una inversión cromosómica, y junto con otras regiones del genoma fueron transferidas al maíz domesticado al momento de la hibridación. Esto permitió el surgimiento de una nueva raza de maíz conocido como maíz de tierras altas.

5.2 Efectos fisiológicos de la baja disponibilidad de fósforo.

La finalidad es analizar los genes localizados dentro de la región de inversión en el cromosoma 4 que se expresen en condiciones de carencia de fósforo, pero al tener las plantas bajo tratamiento de bajo fósforo se examinó también el efecto fisiológico.

El fósforo es un macronutriente esencial para las plantas ya que juega un rol importante en el metabolismo de lípidos y sirve como componente crítico de los ácidos nucleicos y la membrana celular; también es requerido para la fotosíntesis y procesos de respiración. Debido a su importancia es crucial el entendimiento de las respuestas de la planta a la carencia de fósforo (Ha & Tran, 2014).

Se sembraron plantas de maíz suplementadas con solución Hoagland completa (1Mm PO_4) y en deficiencia de fósforo (0Mm PO_4) como se muestra en la Figura 8. La deficiencia de fósforo tiende a inhibir el crecimiento del tallo. Las hojas se tornan oscuras, de aspecto apagado, color azul-verdoso y pueden volverse pálidas en deficiencias severas. El color rojizo, o rojo-violeta se desarrolla a veces por la síntesis de antocianinas. Las hojas pueden a menudo aparentar ser sanas, pero a menudo son pequeñas. (College of Agricultural Science, 2017)



Figura 8. Plantas sometidas al tratamiento de bajo fósforo. En la primera fila se localizan las plantas de Michoacán 21, en medio las de Palomero Toluqueño y al final las de B73. Las macetas rojas están suplementadas con el medio Hoagland completo (1Mm PO₄) y las macetas azules tienen bajos niveles de fósforo (0Mm PO₄).

La biodisponibilidad de nutrientes en el suelo es fundamental para el correcto desarrollo y productividad de la planta, así mismo las plantas tienen que desarrollar estrategias que les permitan adaptarse a diversos ambientes donde los nutrientes no estén disponibles. Entre las respuestas clásicas a la carencia de fósforo se encuentra la modificación de la arquitectura de raíz para aumentar la capacidad exploratoria (Calderón Vázquez et al., 2011). Las modificaciones incluyen una clara reducción de la raíz primaria, la formación de abundantes raíces laterales y pelos radiculares (López-Arredondo, Leyva-González, González-Morales, López-Bucio, & Herrera-Estrella, 2014)



Figura 9. Plantas bajo condiciones normales de nutrientes (+P) y en deficiencia de fósforo (-P). Fotografías de los tres cultivares tomada a los 10 días de edad resaltando diferencias en la arquitectura de raíz y en el follaje.

B73 en condiciones normales de nutrientes muestra una raíz principal más larga, menor número de raíces secundarias y de pelos radiculares, comparada con la planta de

B73 que se desarrolló en deficiencia de fósforo, también se puede resaltar el enrojecimiento del tallo característico de la carencia de este nutriente (Figura 9). El sistema radicular de PT y Michoacán 21 muestran, en condiciones de nutrientes completos, mayor número de pelos radiculares que B73 en las mismas condiciones y cuando la planta de PT está sometida a deficiencia de fósforo se ve un aumento de raíces secundarias. La parte aérea de PT y M21 disminuyeron su crecimiento cuando no se les agregó fósforo.

El consumo de fósforo disponible sucede a través de la acción de varios transportadores de fósforo y está influenciado por la capacidad de exploración de la raíz que está determinada principalmente por su arquitectura (López-Arredondo et al., 2014). Por eso resulta tan importante observar las modificaciones que se presenten sobre la arquitectura de raíz influenciadas por algún tipo de estrés, que en este caso sería la baja disponibilidad de fósforo.

5.3 Gen GRMZM2G019177

Gen localizado en el cromosoma 4, que codifica para una metalo-beta-lactamasa. Super familia de proteínas, dependientes de zinc, que poseen una amplia variedad de sustratos (Tabla 3), la mayoría de los sustratos tienen en común un enlace éster y carga negativa (Callebaut, Moshous, Mornon, & de Villartay, 2002).

Tabla 3. Lista de las enzimas clasificadas experimentalmente pertenecientes a la familia metalo-beta-lactamasa

Enzima	Sustrato
Beta-lactamasas	Lactamas
Glioxalasa II	S-D-lactoglutationes
Arilsulfatasa	Aril sulfonatos
Hidrolasa ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato	Ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato
Alquil sulfatasa (SDS)	Dodecilsulfato sódico
Fosfodiesterasa	cAMP (adenosín monofosfato cíclico)
Nucleasa (SNM1)	DNA
Factor de poliadenilación CPSF	RNA
Fosfodiesterasa (PhnP)	Fosfonatos

Las metalo-beta-lactamasas fueron descubiertas en una cepa de *Bacillus cereus* y se encuentran en otras 20 cepas (Wang, Fast, Valentine, & Benkovic, 1999). Gracias a que se encuentran disponibles datos de las secuencias de estas enzimas y a que también existe

información estructural se han podido caracterizar miembros de esta familia de super proteínas en otras especies. Por ejemplo, utilizando bases de datos públicas como BLAST se clasificó que en *Arabidopsis thaliana* existían enzimas de tipo glioxalasa II y nucleasa (SNM1) (Araind, 1998).

5.3.1 Sistema Glioxalasa

El sistema glioxalasa cataliza la conversión de metilglioxal a ácido D-láctico vía el intermediario S-D-lactoil-glutación (Figura 10). Este sistema está compuesto de 2 enzimas, glioxalasa I (EC 4.4.1.5) y glioxalasa II (EC 3.1.2.6) y una cantidad reducida de glutatión como cofactor (Thornalley, 1990). En diversos estudios han demostrado que ambas enzimas (glioxalasa I y II) están distribuidas en varios sistemas biológicos y su actividad podría ser comparable (Vander Jagt, 1993).

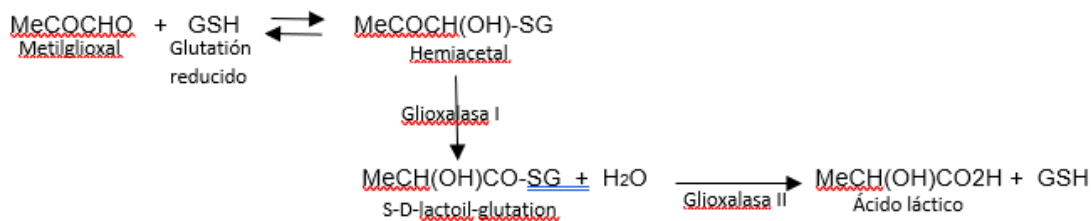


Figura 10. Funcionamiento del sistema glioxalasa. Glioxalasa I cataliza la formación de S-D-lactoil-glutación a partir del hemiacetal formado no enzimáticamente de metilglioxal y el glutatión reducido. Glioxalasa II cataliza la hidrólisis del S-D-lactoil-glutación a ácido láctico y regenera el glutatión que se consumió en la primera reacción.

La principal función del sistema glioxalasa es la detoxificación del metil glioxal. Metilglioxal es un compuesto citotóxico, sub producto del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Se encuentra en todos los organismos en bajas concentraciones (μM), es producido de manera espontánea, en condiciones fisiológicas, a partir de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y dihidroxi acetona fosfato (DHAP), los cuales funcionan como intermediarios en la glicolisis y la fotosíntesis. Enzimáticamente es un subproducto de la triosa fosfato isomerasa y del DHAP por la acción de la metilglioxal sintasa (Vander Jagt, 1993).

El sistema glioxalasa se encuentra distribuido en mamíferos, pájaros, reptiles, plantas y levaduras. En animales, ha recibido especial atención debido a que su funcionamiento podría tener acción anti tumores y anti malaria. En plantas, además de tener un rol en el crecimiento y desarrollo, este sistema ayuda en la protección contra la toxicidad del metil glioxal. Se ha observado que en sistemas donde hay rápida división celular, como el callo o las puntas de la raíz, se presenta mayor actividad de la glioxalasa I. Si el callo es expuesto a medios de crecimiento adicionados con hormonas, o expuesto a luz la actividad de la glioxalasa también aumenta, ya que las hormonas y la luz estimulan el crecimiento (Deswal, Chakaravarty, & Sopory, 1993).

Existe una concentración de metil glioxal esencial, la cual es específica de cada especie, para las funciones fisiológicas normales en las plantas. El nivel de metil glioxal en hojas y raíces, aumenta en respuesta a algún tipo de estrés abiótico. Por ejemplo, una planta en condiciones normales tiene un nivel de 40 – 75 μM de metil glioxal, pero bajo estrés por salinidad aumentó a 200 μM y en condiciones de sequía el nivel aumento a 300 μM en hojas. La acumulación de metil glioxal bajo condiciones de salinidad, sequía y estrés por frío en hojas y raíces en dos variedades de arroz sugieren que esta es una respuesta universal en plantas (Sudesh Kumar Yadav, Singla-Pareek, & Sopory, 2008).

Para proteger a las plantas del efecto tóxico del metil glioxal se necesita un sistema de desintoxicación efectivo. Cuando los genes que codifican para glioxalasa I y II fueron sobre expresados en tabaco, las plantas mostraron un mayor nivel de tolerancia a la salinidad y a los metales pesados. Esto indica que el sistema glioxalasa tiene un rol importante en la tolerancia a estrés abiótico(S. K. Yadav, 2010).

Otro ejemplo es la planta de tomate, sometido a condiciones de estrés por salinidad, se ve aumentada la expresión de glioxalasa I en raíces, hojas y tallos. Esto pudo deberse a que, para restablecer la homeostasis se aumenta la demanda celular de ATP, y como resultado se incrementa el flujo metabólico a través de la ruta glicolítica, lo cual promueve la inducción del sistema glioxalasa (Espartero, Sánchez-Aguayo, & Pardo, 1995).

Adicionalmente al mecanismo de desintoxicación de metil glioxal, el glutatión, que es regenerado en el sistema glioxalasa, juega un importante papel durante condiciones de estrés. El glutatión reducido está involucrado en reducir los niveles de especies reactivas

de oxígeno que, al aumentar sus niveles producen compuestos como el metil glioxal(Sudesh Kumar Yadav et al., 2008).

En la planta de maíz, que es el modelo de este estudio, se analizaron dos genotipos de maíz, uno resistente y otro susceptible a la infección de *Aspergillus flavus*; la infección por este hongo causa la acumulación de aflatoxinas y como consecuencia se da la producción de metil glioxal. Posterior a la infección, el nivel de metil glioxal no incrementó en el genotipo resistente y esto pudo ser ocasionado por el aumento de los niveles de glioxalasa I. El rol de glioxalasa I en respuesta a estrés biótico ha sido poco estudiado(Chen, Brown, Damann, & Cleveland, 2004).

En la Figura 11 se muestra la estructura del gen identificado como GRMZM2G019177 de maíz en B73 (<http://www.maizegdb.org/>) cuya función anotada es la de una metalo-beta-lactamasa.



Figura 11. Representación esquemática de la estructura del gen Metalo-beta-lactamasa de maíz. Los intrones son representados por líneas en gris claro y los exones en cajas de color azul; las cajas en color verde representan las regiones 5' UTR y 3'UTR respectivamente.

5.3.2 Patrón de expresión para el gen GRMZM2G019177

El atlas de expresión para este gen se muestra en la Figura 12, se indica que los niveles de expresión bajo condiciones normales de este gen en maíz se reportaron a lo largo de todo el desarrollo, pero los máximos encontrados fueron particulares a las puntas de las hojas maduras (Sekhon et al., 2009) Para verificar el patrón de expresión del gen en las condiciones nutrimentales específicas de este estudio se realizó un análisis de RT qPCR en los tres cultivares de maíz seleccionados, B73, PT y Michoacán21.

El patrón de expresión de un gen es una de las mejores características del estado funcional de una célula específica. Las células que pertenecen a diferentes tejidos, células en diferente estado de desarrollo o de proceso metabólico, bajo la influencia de un compuesto específico o células dentro de un proceso carcinogénico difieren por los

patrones de expresión genética (Muller et al., 2002). En la Figura 13 se muestra el patrón de expresión para este gen en hojas y raíces de B73, Palomero Toluqueño y Michoacan 21 suplementadas con solución Hoagland completa (1Mm PO₄) y en deficiencia de fósforo (0Mm PO₄) Los niveles de expresión relativa se refieren a la abundancia de transcrito del gen, normalizados respecto a la expresión del gen de referencia (gen constitutivo) β -tubulina cuya clave de identificación reportada en B73 es GRMZM2G108766.

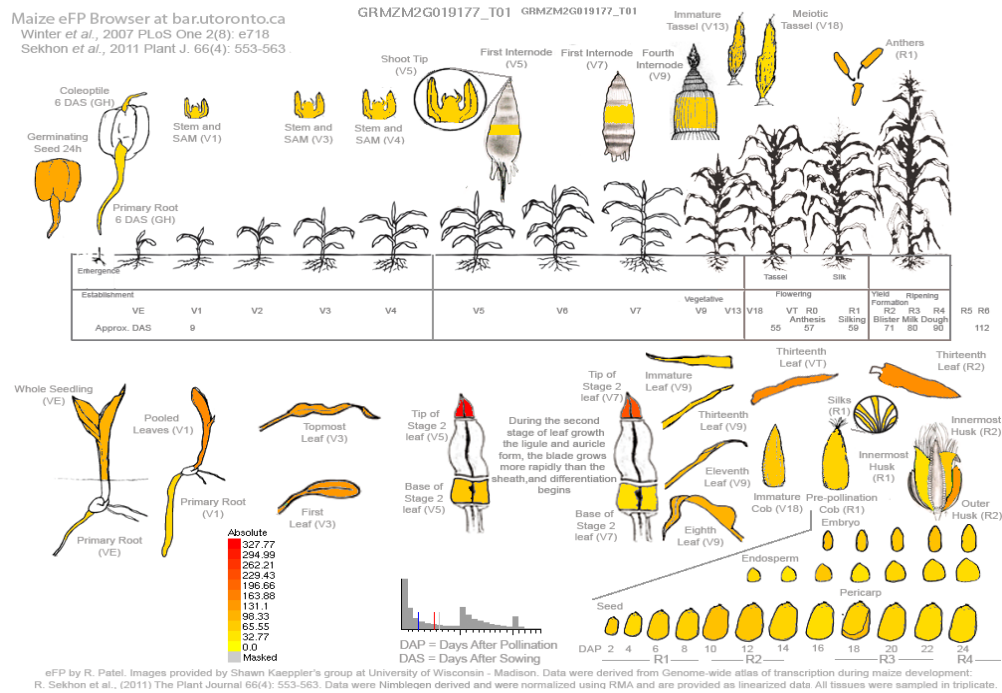


Figura 12. Atlas de expresión del gen metalo-beta-lactamasa en maíz. El nivel de expresión relativa va de amarillo a rojo, siendo rojo en los tejidos con mayor nivel de expresión.

En la Figura 13 se puede observar que los niveles de expresión del gen son superiores en hojas que, en raíces, esto concuerda con el atlas de expresión obtenido de la base de datos específica para maíz. En la hoja, cuando fue suplementada con la solución Hoagland completa, marcada como +P, y que es considerada nuestra etapa control, ya se presentan altos niveles de expresión del gen en PT y en Mi21, siendo casi el doble que los niveles de B73. Bajo condiciones de deficiencia de fósforo (-P), los niveles de expresión disminuyeron casi la mitad para B73, y siguen presentándose niveles altos para PT y para Mi21, se puede ver que en condiciones de deficiencia de fósforo los niveles de expresión de este gen en PT aumentaron. En Mi21, hubo una leve disminución en condiciones -P, pero siguen siendo niveles altos comparados con B73.

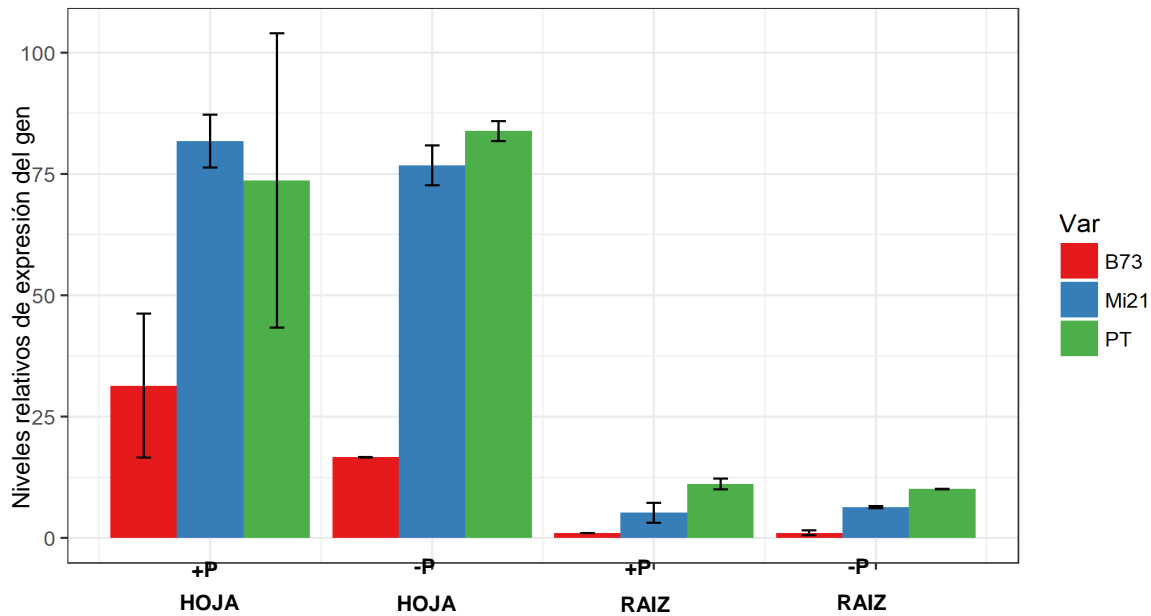


Figura 13. Análisis RT PCR del gen Metallo-beta-Lactamasa en B73, PT y Mi21 de raíz y hojas en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo. Los datos representan las medias y el error estándar de dos réplicas técnicas independientes.

De acuerdo a otros estudios, este gen en condiciones de estrés abiótico se expresa más en ciertos tejidos; al someter a las plantas a deficiencia de fósforo se genera una respuesta genética para sobrellevar estas condiciones, por lo tanto se esperaba un aumento en los niveles de expresión de este gen en los cultivares, y aunque la respuesta esperada se ve claramente en los tres cultivares en condiciones de -P resulta interesante que los niveles de expresión se encuentren siempre elevados, incluso cuando esta suplementada con todos los nutrientes.

Esto podría ser porque tanto PT como Mi21 crecen normalmente en sitios donde hay deficiencia de nutrientes y otras condiciones ambientales extremas, y como se mencionó anteriormente, para mantener la homeostasis en situaciones de estrés la planta genera cambios en el flujo metabólico, y al ser el metil glicoxal un sub producto normal de estos procesos metabólicos, en estas variedades se encuentre en niveles más elevados que en otras plantas, por lo cual niveles de expresión altos de este gen siempre sean requeridos.

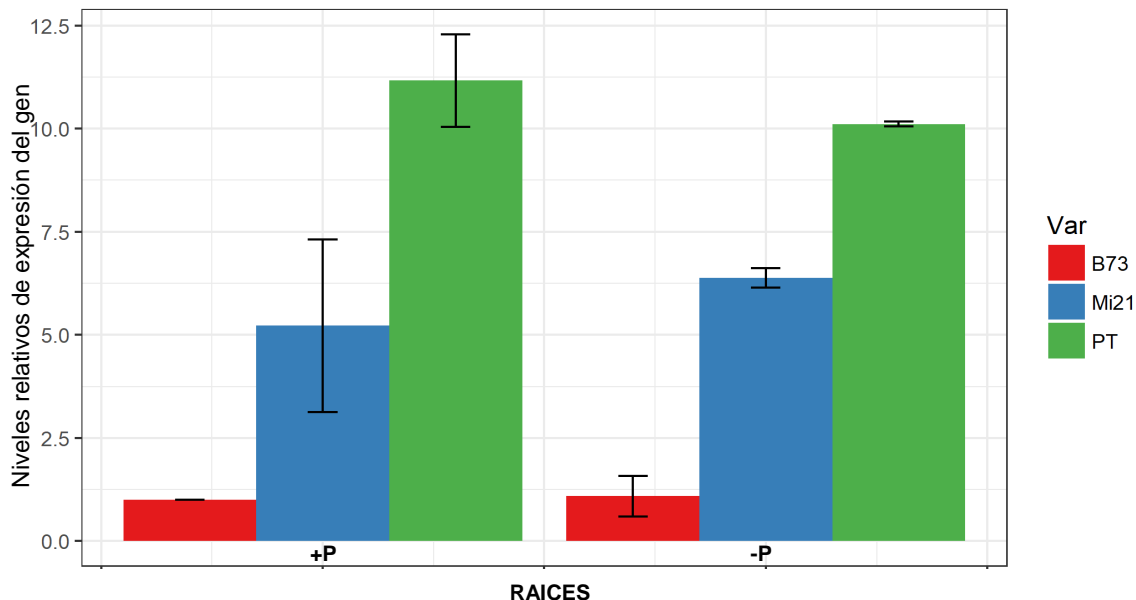


Figura 14. Análisis RT PCR del gen Metallo-beta-Lactamasa en B73, PT y Mi21 de raíz en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo. Los datos representan las medias y el error estándar de dos réplicas técnicas independientes

Aunque los niveles de expresión en raíces si se pueden apreciar en la Figura 13 son bajos comparados con los de las raíces, por lo cual se decidió hacer una representación por separado para observar más claramente el comportamiento de este gen en las raíces de los cultivares. En la Figura 14 se puede observar que cuando los tres cultivares están en condiciones de suficiencia de fósforo los niveles relativos de expresión para el gen son altos en Palomero Toluqueño (PT) y en Michoacán 21 (Mi21), e incluso PT presenta un aumento en el nivel de expresión de más del doble comparado con los niveles de Mi21. Cuando estos cultivares son sometidos a baja disponibilidad de fósforo en el suelo, los niveles de expresión para B73 se ven ligeramente aumentados; el patrón de expresión en Mi21 aumenta comparado cuando el cultivar es suplementado con todos los nutrientes, aunque PT disminuyó los niveles en -P.

En menor nivel, pero podemos observar que los niveles de expresión para el gen que codifica para una metalo-beta-lactamasa aumentan en los maíces de tierras altas, en la raíz bajo condiciones de estrés, y en este tejido se presenta un comportamiento más constante para los dos tratamientos. Al igual que en hoja, desde la condición control se ven los niveles de expresión altos en Mi21 y PT. El aumento de este gen se ha reportado que confiere tolerancia a diferentes cultivos bajo estrés hídrico, o salinidad, y en estos maíces podría estar ayudando a la planta a crecer y desarrollarse en condiciones de poco fósforo.

5.3.3 Análisis de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G019177

Al analizar los niveles relativos de expresión de un gen debemos tener en cuenta que este proceso está regulado por la unión de factores de transcripción a elementos del ADN, localizados en la región promotora (Remenyi, Scholer, & Wilmanns, 2004). La región promotora de un gen selecciona el punto de inicio de la transcripción, la especificidad y la tasa (Shahmuradov, Gammerman, Hancock, Bramley, & Solovyev, 2003). El promotor es uno de los elementos regulatorios en *cis* mejor estudiados y comprendidos. Mutaciones dentro de las regiones regulatorias en *cis* son la base de una variedad de diferencias fenotípicas en morfología, fisiología y comportamiento, que tienen significancia ecológica (Wray, 2007).

El análisis la región promotora del gen GRMZM2G019177 en M21 y PT puede proporcionar información relacionada con elementos en *cis* que nos permita elucidar el mecanismo molecular del control de expresión de este gen candidato.

Para llevar a cabo el análisis de los promotores. Se amplificó aproximadamente 1kb de la región 5' del gen adyacente a la región codificante con los oligos reportados en la Tabla 2, bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se cortaron y purificaron las bandas a partir de geles de agarosa al 1.2% y se mandó secuenciar el producto obtenido en cada genotipo. Se alinearon las secuencias obtenidas para cada cultivar, de 2 plantas independientes (2 PT y 2 Mi21) contra la secuencia reportada en la base de datos de maíz para B73 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>).

En la Figura 15 se presentan los resultados del alineamiento de las secuencias de los promotores, y se pueden observar que las secuencias de las plantas de PT presentan un número mayor de regiones diferentes a B73 y son pocas las regiones diferentes que comparten Mi21 y PT respecto de B73. El verdadero objetivo de localizar estas diferencias es determinar si estas variaciones pueden tener un efecto en la regulación de los niveles de expresión de este gen y que potencialmente los hagan responder a estímulos de baja disponibilidad de fósforo.

Se realizó un análisis *in silico* para analizar los posibles sitios de unión a factores de transcripción, esto con la ayuda de la base de datos PlantPAN 2.0 (Plant Promoter Analysis Navigator).

En plantas, los factores de transcripción regulan genes a través del reconocimiento de secuencias *cis* específicas en regiones promotoras; juegan un rol importante en fisiología celular, como reguladores de la expresión genética, en procesos de desarrollo y respuestas a estímulos ambientales (Chow et al., 2016).



Figura 15. **Alineamiento de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G019177 en B73, PT y Mi21.** En la primera fila se ubica la secuencia de B73, los dos individuos de PT están indicados como PT.1 y PT.2 y en las filas 4 y 5 se encuentran las secuencias de Mi21. En los recuadros rojos están resaltados las diferencias de las secuencias de PT y Mi21 respecto a la secuencia de B73. Adicionalmente en recuadros de colores se muestran diferencias en sitios de unión a factores de transcripción.

En las Tablas 4, 5 y 6, se muestra los probables sitios de unión a factores de transcripción, el número de veces encontrados a lo largo de la secuencia analizada y la secuencia consenso reconocida por los factores de transcripción, esta información obtenida en la plataforma PlantPan2.0 para las secuencias de los promotores de B73, Mi21 y PT.

Al analizar la información resumida en las Tablas 4, 5 y 6 podemos observar que los tres cultivares poseen sitios de unión para los mismos factores de transcripción, pero están

presentes algunas excepciones; el sitio de unión para el factor SBP no está presente en PT, pero si en los otros dos cultivares, la secuencia que puede reconocer el factor CG-1 solo está presente en B73, en la secuencia del promotor de Mi21 no se identificó sitio de unión para bHLH y finalmente en PT no se encontró sitio de unión para MADS BOX.

Algunos cambios puntuales entre las secuencias fueron analizados, por ejemplo, en la Figura 15 podemos ver localizado en un recuadro de color azul y marcado con el número 1, a la secuencia de unión para el factor MADS BOX, que no está presente en PT debido al cambio de un nucleótido en la secuencia de dicho cultivar, pero en esa precisa posición no se encuentra completa la secuencia de la segunda muestra para PT, marcada como PT.2, la cual sería importante para descartar errores de secuenciación.

El alineamiento realizado con el software Clustal Omega, muestra que hay dos regiones donde posiblemente existan inserciones, la primera región de inserción, marcada con un recuadro amarillo, está presente en los cultivares de tierras altas, PT y Mi21, mientras que la segunda inserción que se muestra en color morado es específica de PT. Aunque en los tres cultivares existen sitios de unión para el factor de transcripción GATA, el sitio de unión marcado con el número 2 solo se encuentra presente en PT, y coincide con una región de inserción. En *A. Thaliana* se identificó, un factor de transcripción llamado GATA23, que pertenece a una clase muy específica dentro de estos factores de transcripción, ya que presenta un dominio degenerado; se ha propuesto que GATA23 actúa como regulador en la iniciación de la formación de raíz lateral (Behringer & Schwechheimer, 2015)(De Rybel et al., 2010).

Es importante notar la diferencia entre los cultivares en el número de sitios de unión a factores de transcripción, ya que esto podría explicar la expresión diferencial para este gen. Igualmente es interesante analizar los factores de transcripción que pueden unirse a las secuencias identificadas, ya que esto muestra una respuesta a nivel molecular de la planta para adaptarse en respuesta al estrés.

Como se puede observar en la Tabla 4, en la secuencia de B73 el mayor número de sitios de unión encontrados fue para la familia de factores de transcripción AP2 y estos sitios disminuyen drásticamente en PT. Los factores de transcripción que pertenecen a la super familia APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF), estas proteínas reguladoras están involucradas en el control del metabolismo primario y secundario, de

programas de desarrollo y crecimiento, así como respuestas a estímulos ambientales(Mizoi, Shinozaki, & Yamaguchi-Shinozaki, 2012).

Podemos observar que en los tres cultivares se encuentran presentes posibles sitios de unión para factores de transcripción de la familia Myb/SANT. Estos factores de transcripción están involucrados en el control de procesos como desarrollo, diferenciación, metabolismo, defensa y respuesta a estrés biótico y abiótico(Ambawat, Sharma, Yadav, & Yadav, 2013). También se le ha asociado con la regulación transcripcional de genes involucrados en la adaptación a deficiencia de fósforo(Valdés-López et al., 2008) (Rubio et al., 2001).

WKRY es otro factor de transcripción involucrado en diversas respuestas tanto a estrés biótico como abiótico, así como en procesos fisiológicos y de desarrollo. Se ha reportado que un miembro de esta familia de factores de transcripción está relacionado en la regulación de la respuesta a la carencia de nutrientes, en especial de fósforo, y el desarrollo de la raíz (Devaiah, Karthikeyan, & Raghothama, 2007). Este factor de transcripción se encuentra presente en los tres cultivares.

La base de datos Plant PAN2.0 además de proporcionar información sobre los sitios de unión a factores de transcripción, considera otros elementos importantes en la regulación de la expresión genética. Por ejemplo, las islas CpG, son regiones de DNA que se encuentran metiladas y están asociadas con DNA inactivo generalmente ligado a heterocromatina, silenciamiento génico y control de patógenos(Chang et al., 2008). La presencia de elementos como las islas CpG solo fueron encontradas en la región promotora de B73; cuando fue analizado este gen bajo condiciones de bajo fósforo en hoja se notó que disminuyó su expresión, este tipo de elementos podría ser la explicación de este comportamiento.

Tabla 4. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G019177 en B73.

Factor de transcripción	# de sitios de unión encontrados	Secuencia Consenso
AP2	27	CCGCC, CGCCG, CGGCG, CGGTG, GTCGG, CCGGC, CCGAC, GCCGC, CCGAC,
AT-Hook	23	AATT, ATATA, TATAT, AATAA, AAAAA, TTTTT, ATAAT, ATTAT, ATTTT, TATTT
Homeodomain	13	TTCAT, ATTAA, TGATT, AATCA, TTAAT, ATAAT, AATAA
TBP	13	TATAT, ATATA
Dof	12	TAAAG, CTTTT, GCTTT, TAAAG
Myb/SANT	10	TATCC, GATAT, ATATC, AATCT, ATCTT, AAGAT, TTATC,
SBP	7	CGTAC
EIN3	7	ATGTA, TGTAT, TGCA
NAC;NAM	6	TTGAC, AGTAA, TTAAT, GCGTG,
TALE	6	TGACT
WRKY	5	TTGAC
bZIP	5	AATGA, ACACA, TGACC
B3	3	CGACA
C2H2	2	TCACT
CG-1	2	ACGCG
MADF	2	GTAAA, TTTAC
GATA	2	TGATC, GATCA
E2F	2	CGCGC
bHLH	1	GCGC
MADS BOX	1	CAAAA
TCR	1	TTTGA

Tabla 5. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G019177 en Mi21.

Factor de transcripción	# de sitios de unión encontrados	Secuencia Consenso
AP2	18	CCGCC, CGCCG, GCCGC, CCGAC, CAACA
At-Hook	22	AATTT, AAATT, ATATA, TATAT, ATAAA, AATAA, AAAAA, ATAAT, ATTAT, AAAAT, ATTTT, AAATA, TATTT
Homeodomain	13	TTCAT, ATTAA, TGATT, AATCA, TTAAT, ATAAT, GATTA, TAATC, AATAA
TBP	9	TTTAT, ATAAA, TTTAT, TATAT,
Dof	5	GCTTT, CTTTT, TAAAG
Myb/SANT	13	TATCC, ATATC, GATAT, ATCTT, ATCTT, AATCT, TTATC
SBP	3	CGTAC
EIN3	6	ATGTA, TGTAT, ATGCA, TGCAT,
NAC; NAM	5	TTGAC, AGTAA, TTAAT, CACGC
TALE	7	TGACG
WRKY	6	TTGAC
bZIP	6	CAGCT, TGACC, AATGA
B3	3	CAACA, CGACA
C2H2	3	AGTGT, TCACT, TAACT
MADF	2	GTAAA, TTTAC
GATA	5	TGATC, GATCA, CGATC, GATCC
E2F	2	CGCGC
MADS box	1	CAAAA
TCR	1	TTTGA

Tabla 6. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G019177 en PT.

Factor de transcripción	# de sitios de unión encontrados	Secuencia Consenso
AP2	3	CCGAC, CAACA
AT-Hook	24	AATT, ATATA, TATAT, AATAA, AAAAA, TTTTT, ATAAT, ATTAT, ATTTT, TATTT
Homeodomain	12	TTCAT, TGATT, AATCA, ATAAT, GATTA, TAATC,
TBP	16	TTTAT, ATAAA, TATAT, ATATA
Dof	5	TAAAG, CTTTT, GCTTT, TAAAG
Myb/SANT	11	TATCC, GATAT, ATATC, AATCT, TTATC
EIN3	4	TGTAT, TGCA
NAC;NAM	6	TTGAC, AGTAA, TTAAT, CACGC, CGCAA
TALE	5	TGCA
WRKY	5	TTGAC
bZIP	6	AATGA, ACACA, CAGCT, AGCTG
B3	2	CAACA, CGACA
C2H2	3	TCACT, AGTGT, TAACT
MADF	2	GTAAA, TTTAC
GATA	4	GATCA
E2F	1	CGCGC
bHLH	1	CATGC
TCR	1	TTTGA

5.4 Gen GRMZM2G125838

El segundo que se seleccionó para realizar análisis de expresión diferencial en condiciones de baja disponibilidad de fósforo en raíz y hoja de los tres cultivares fue el gen GRMZM2G125838. En la Figura 16 se muestra la estructura del gen identificado como GRMZM2G125838 de maíz en B73 (<http://www.maizegdb.org/>) cuya función anotada es la de una proteína de unión a calcio.



Figura 16. Representación esquemática de la estructura de la proteína de unión a calcio de maíz. Los intrones son representados por líneas en gris claro y los exones en cajas de color azul; las cajas en color verde representan las regiones 5' UTR y 3'UTR respectivamente

Cuando una planta entra en contacto con un estímulo, ya sea biótico o abiótico, se inicia una red de transducción de señales; esta red puede iniciar programas de desarrollo, de obtención de nutrientes y controlar metabolismo para generar una respuesta adaptada a dichos estímulos. Esta red de señales utiliza mensajeros como pH, lípidos, GMP cíclico y Calcio (Ca^{2+}). El calcio es un nutriente esencial en las plantas que se requiere para el crecimiento y desarrollo, específicamente en la raíz y en la punta de las hojas. La concentración del Ca^{2+} intracelular está delicadamente balanceada por la presencia de almacenes de Ca^{2+} como las vacuolas, el retículo endoplásmico, la mitocondria y las paredes celulares (Tuteja & Mahajan, 2007). El calcio es un mensajero ubicuo de la señalización en plantas ya que se ha demostrado que está involucrado en diversos caminos de respuesta a estrés y responde a muchos estímulos, como se muestra en la Tabla 7.

Los niveles elevados de Ca^{2+} pueden ser reconocidos por sensores o proteínas de unión, que juntas pueden activar a proteínas cinasas. Estas proteínas cinas activadas pueden fosforilar muchas proteínas reguladoras incluyendo factores de transcripción, los cuales pueden regular el nivel de expresión de proteínas reguladoras que como resultado alterarán el metabolismo, seguido de una respuesta fenotípica de tolerancia al estrés, aunque también puede desencadenar respuestas como muerte celular o inhibición de crecimiento, esto dependiendo del tipo y la cantidad de genes que sean regulados por el cambio en el nivel de calcio (Tuteja & Mahajan, 2007).

Tabla 7. Algunos estímulos fisiológicos que elevan el Calcio (Ca^{2+}) en las células de las plantas. Modificada de Sanders et al., 1999

Estimulo	Ejemplo de Respuesta
Luz roja	Fotomorfogenesis
Ácido abscísico	Cierre de estomas
Giberelinas	Secreción de α -Amilasas
Salinidad/Sequia	Síntesis de Prolina
Estrés hipoosmótico	Adaptación osmótica
Hongos	Síntesis de fitoalexina
Frío	Expresión del gen KIN1
Choque térmico	Termo tolerancia
Estrés oxidativo	Inducción del barrido de radicales libres
Factores NOD	Ondulado de los pelos radiculares

5.4.1 Calcineurina B (CBL)

El incremento del Ca^{2+} citosólico en respuesta a señales extracelulares es percibido por un grupo de sensores. Los sensores de calcio son pequeñas proteínas que se unen a Ca^{2+} y cambian su conformación en una manera dependiente de calcio. La especificidad en la cadena de transducción de señales es gracias a estos sensores que decodifican el aumento de los niveles de calcio (Tuteja & Mahajan, 2007).

En plantas se han identificado varias familias de sensores de calcio, entre ellos los más importantes son la calmodulina (CaM) y la calcineurina B (CBL) y las proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs). CaM y CBL son pequeñas proteínas que contienen múltiples dominios de unión a calcio; para transmitir la señal, interactúan con proteínas blanco y regulan su actividad. La calmodulina se expresa en todas las células eucariotas, mientras que la calcineurina B solo se ha identificado en plantas superiores, lo cual sugiere que posee una función específica en el proceso de transducción de señales en plantas (Luan, Kudla, Rodriguez-concepcion, Yalovsky, & Gruissem, 2002).

En un estudio realizado en 1999 por Kudla et al. se caracterizaron 3 miembros de la familia de proteínas CBL en *A. thaliana*, y se pudo demostrar que su patrón de expresión y el tejido donde son localizadas depende del estímulo que se recibe, por ejemplo, un miembro de esta familia identificado como AtCBL1 es altamente expresado en raíces y tallos bajo condiciones de sequía, frío y daño mecánico; podemos pensar que cada miembro de esta familia funciona en una red de señales específicas.

El descubrimiento de las proteínas CBL en *A. thaliana*, sirvió para analizar el comportamiento de estas proteínas en plantas, ya que su funcionamiento solo se conocía en mamíferos y levaduras. Se han identificado un grupo de proteínas cinasas que específicamente interactúan con los sensores CBL; el calcio se une a la proteína CBL e induce un cambio conformacional y esto promueve la interacción con su proteína blanco, una serina-treonina cinasa (CIPK) (Shi et al., 1999). La serina-treonina proteína fosfatasa 2B (EC 3.1.3.16), es una enzima que cataliza la reacción de defosforilación de una fosfoproteína y como ya se mencionó, es dependiente del calcio. Este grupo de enzimas eliminan el grupo fosfato unido a un aminoácido serina o treonina de un amplio rango de fosfoproteínas (Rusnak & Mertz, 2000).

La exposición de las plantas a estrés como frío, daño físico y salinidad promueven la expresión de los genes CBL y CIPK, sin embargo, no responden a tratamientos de sequía y de ácido abscísico, estos resultados fueron obtenidos en chícharo (*Pea sativum*). Adicionalmente por medio de microscopía confocal se pudo localizar a la proteína CBL exclusivamente en el citosol, mientras que la proteína CIPK es localizada en el citosol y en la membrana exterior. Aunque se analizaron flores, raíces y hojas, donde se pudo ver mayor nivel de genes fue en raíz y hojas (Mahajan, Sopory, & Tuteja, 2006).

En maíz, la red de señales dependientes de Ca^{2+} fue asociada con la formación de aerénquima en la raíz. La aerénquima es un tejido que contiene grandes espacios gaseosos intracelulares y se puede producir por un proceso llamado lisogenia, que es consecuencia del estrés y las cavidades gaseosas se forman por muerte celular. La formación de este tejido es observada en muchas plantas acuáticas o que crecen en ambientes muy húmedos, pero en maíz su formación es inducida por hipoxia, en condiciones de anegación, impedancia mecánica y hasta bajo condiciones aérobicas producidas por deficiencia de nutrientes (Rajhi et al., 2011).

5.4.2 Patrón de expresión para el gen GRMZM2G125838

Sekhon et al. (2009) pusieron a disposición pública un atlas de la expresión global de muchos genes de maíz cubriendo las principales etapas del desarrollo durante el ciclo de vida de la planta, sin embargo, de 80 301 genes evaluados mediante microarreglos, los patrones de expresión de este gen no fueron encontrados. Una posible explicación es que el gen esté expresado bajo condiciones ambientales específicas o en órganos o etapas del desarrollo muy específicos que no fueron cubiertas en su estudio, sin embargo, se realizó el análisis de RT PCR para verificar el patrón de expresión de este gen bajo nuestro estudio en los tres cultivares evaluados de maíz.

En la Figura 17 podemos observar los resultados del análisis por RT qPCR del gen GRMZM2G125838 en los tres cultivares a evaluar y se observó que los niveles de expresión relativa nuevamente fueron mayores en hoja que en raíz. Cuando la planta se encuentra suplementada con los nutrientes completos (+P) podemos observar que los niveles de expresión en hoja para B73 son los más altos, presenta un aumento del doble de transcrito respecto al nivel de PT y supera los niveles de Mi21 un 25%. Al presentarse la condición de estrés (-P) en la planta los niveles relativos en B73 presentan una mínima variación; en los cultivares de tierras altas se puede apreciar claramente como el nivel de este gen aumento. En Mi21 y PT los niveles relativos alcanzaron el doble, siendo aún más notorio el aumento en Mi21.

De acuerdo con la función anotada para este gen, se esperaba que los niveles relativos de expresión aumentaran en los 3 cultivares bajo condiciones de estrés, sin embargo, solo en los maíces de tierras altas se ve un aumento significativo en el transcrito; un eficiente sistema de transducción de señales puede mitigar el efecto del estrés y finalmente lograr la adaptación, por los resultados de análisis de expresión no podríamos decir que B73 no logra un respuesta que le ayude a sobrellevar la condición de deficiencia nutrimental, pero posiblemente sea más rápida y eficiente en PT y Mi21, ya que se encuentran mejor adaptados estas condiciones.

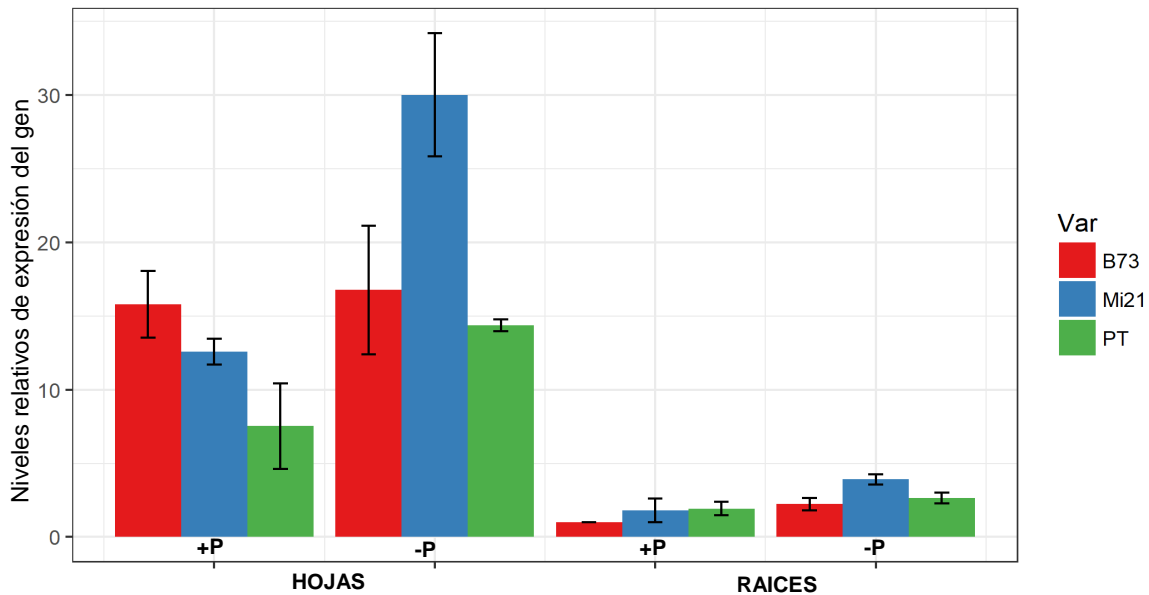


Figura 17. Análisis RT PCR de la proteína de unión a calcio en B73, PT y Mi21 de raíz y hojas en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo. Los datos representan las medias y el error estándar de dos réplicas técnicas independientes.

El análisis RT PCR realizado en la raíz de los 3 cultivares se muestra en la Figura 18 y podemos observar un comportamiento totalmente opuesto al que se presenta en la hoja bajo las mismas condiciones de nutrientes; cuando la planta se encontraba suplementada con la solución Hoagland completa (+P) los niveles relativos de expresión en Mi21 y PT son el doble que los niveles de B73, siendo los más elevados los niveles en PT. Al someter a la planta a deficiencia de nutrientes (-P) el nivel de transcrito aumenta el doble para Mi21 y para B73 y aproximadamente se presenta un 30% de incremento en PT.

Los resultados de los niveles de expresión de este gen en la zona de la raíz para los tres cultivares van de acuerdo con otros estudios publicados, es decir, se esperaba que, bajo condiciones de estrés, los niveles de transcrito aumentaran, ya que esto implica que se han activado diversas señales que modulan procesos metabólicos y confieren tolerancia al estrés.

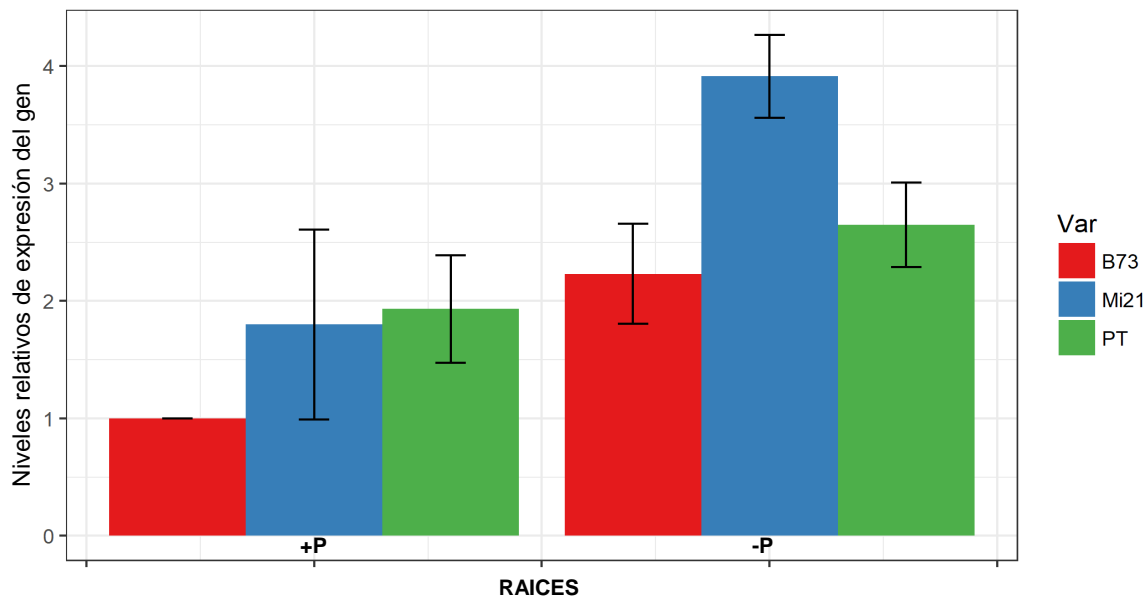


Figura 18. Análisis RT PCR de la proteína de unión a calcio en B73, PT y Mi21 para la raíz en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo. Los datos representan las medias y el error estándar de dos réplicas técnicas independientes.

5.4.3 Análisis de las secuencias promotoras del gen GRMZM2G125838

Para realizar el análisis de las secuencias de los promotoras, las regiones amplificadas y secuenciadas con los oligos enlistados en la Tabla 2 fueron alineados, se obtuvieron 4 secuencias, 2 de Mi21 y 2 de PT, siendo cada una de plantas diferentes, así como también la reportada para B73 en la base de datos para este gen (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>). En la Figura 19 se presentan los resultados finales de los alineamientos; la región promotora de este gen en PT y Mi21 resulto ser muy diferente con respecto a B73, pero entre PT y Mi21 hay muy pocas variaciones. Adicionalmente, en el análisis que se realizó con el software Clustal Omega se pudo observar que hay una amplia región del promotor de B73 que no está cubierta por las secuencias de PT ni de Mi21. Para el diseño de este experimento se generaron un par de oligos específicos para la región promotora de B73 y se presentaron algunas dificultades al intentar amplificar la región por medio de reacciones de PCR, lo cual pudo ser ocasionado por la alta variabilidad de esta región en los maíces de tierras altas. Sería conveniente diseñar un nuevo par de oligos usando como referencia el genoma de Palomero Toluqueño para poder tener una mayor cobertura de la región promotora y analizar si siguen presentándose muchas diferencias respecto a B73.

Otra diferencia localizada entre los tres cultivares, es el Homeodominio, secuencia que no se encuentra presente en las líneas de tierras altas, este sitio de unión se puede ver marcado en la Figura 19 con un cuadro de color rosa.

Tabla 8. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G125838 en PT.

Factor de transcripción	# de sitios de unión encontrados	Secuencia Consenso
bZIP	6	ACGTG, TGACGT, GACAG, CGTGT, TCACG, GACGT
AT-Hook	7	TTTAT, ATAAA, AATAA, AAAAA, AAATA, TATTT
NAC; NAM	2	CGTGT, GCGTG
TALE	3	AGTCA, TGACG, TGACC
AP2	3	CGGTG, GCCGC, CAGGT
bHLH	3	GCACG, GGTGC, CTTGC
B3	2	CAGGT
GATA	6	AGATC, GATCT,
TCP	3	GGTCC, GTGGG,
CG-1	2	ACGCG
TBP	1	ATAAA
Myb/SANT	5	ACCTA, ATATT, CGTGT, GCGTG
ARF	2	AGACA
LOB	1	CCGCA
MADF	1	GTAAA

Los sitios de unión identificados por el software Plant PAN 2.0 para la región promotora de Mi21 se muestran en la Tabla 10. Es interesante observar que Mi21 posee un sitio de unión extra para la familia de factores MYB, que están relacionados con la respuesta a estrés abiótico.

Tabla 9. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G125838 en B73.

Factor de transcripción	# de sitios de unión encontrados	Secuencia Consenso
AP2	27	CCGCC, CGCCG, CGGCG, CGGTG, GTCGG, CCGGC, CCGAC, GCCGC, CCGAC,
AT-Hook	23	AATT, ATATA, TATAT, AATAA, AAAAA, TTTTT, ATAAT, ATTAT, ATTTT, TATTT
Homeodomain	13	TTCAT, ATTA, TGATT, AATCA, TTAAT, ATAAT, AATAA
TBP	13	TATAT, ATATA
Dof	12	TAAAG, CTTTT, GCTTT, TAAAG
Myb/SANT	10	TATCC, GATAT, ATATC, AATCT, ATCTT, AAGAT, TTATC,
SBP	7	CGTAC
EIN3	7	ATGTA, TGTAT, TGCA
NAC;NAM	6	TTGAC, AGTAA, TTAAT, GCGTG,
TALE	6	TGACT
WRKY	5	TTGAC
bZIP	5	AATGA, ACACA, TGACC
B3	3	CGACA
C2H2	2	TCACT
CG-1	2	ACGCG
MADF	2	GTAAA, TTTAC
GATA	2	TGATC, GATCA
E2F	2	CGCGC
bHLH	1	GCGC
MADS BOX	1	CAAAA
TCR	1	TTTGA

Tabla 10. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen GRMZM2G125838 en B73

Factor de transcripción	# de sitios de unión encontrados	Secuencia Consenso
AP2	18	CCGCC, CGCCG, GCCGC, CCGAC, CAACA
At-Hook	22	AATTT, AAATT, ATATA, TATAT, ATAAA, AATAA, AAAAA, ATAAT, ATTAT, AAAAT, ATTTT, AAATA, TATTT
Homeodomain	13	TTCAT, ATTAA, TGATT, AATCA, TTAAT, ATAAT, GATTA, TAATC, AATAA
TBP	9	TTTAT, ATAAA, TTTAT, TATAT,
Dof	5	GCTTT, CTTTT, TAAAG
Myb/SANT	13	TATCC, ATATC, GATAT, ATCTT, ATCTT, AATCT, TTATC
SBP	3	CGTAC
EIN3	6	ATGTA, TGTAT, ATGCA, TGCAT,
NAC; NAM	5	TTGAC, AGTAA, TTAAT, CACGC
TALE	7	TGACG
WRKY	6	TTGAC
bZIP	6	CAGCT, TGACC, AATGA
B3	3	CAACA, CGACA
C2H2	3	AGTGT, TCACT, TAACT
MADF	2	GTAAG, TTTAC
GATA	5	TGATC, GATCA, CGATC, GATCC
E2F	2	CGCGC
MADS box	1	CAAAA
TCR	1	TTTGA

Los datos que tenemos para la secuencia de B73 son obtenidos de bases de datos, al ser alineados y comparados con nuestros resultados de secuenciación podemos ver que falta mucha cobertura de las secuencias de PT y Mi21, por lo tanto, no podríamos descartar la presencia de los sitios de unión a factores de transcripción que solo fueron detectados para B73.

Los genes que codifican para una proteína de unión a calcio y una metalo-beta lactamasa muestran el mismo comportamiento en las hojas, es decir, ambos genes tienen niveles relativos de expresión más elevados en este tejido que en la raíz. En la raíz de los tres cultivares, la expresión de los dos genes fue inducida cuando la planta se encontraba en deficiencia de fósforo.

En las hojas, la expresión del gen metalo-beta lactamasa disminuyó sus niveles de expresión cuando la planta se encontraba en condiciones de estrés, pero en el mismo cultivar, la expresión de la proteína de unión a calcio no se vio dramáticamente afectada bajo condiciones de estrés. La respuesta a condiciones de estrés de ambos genes fue más estable en PT, porque se pudo observar más claramente el aumento de transcrito cuando las condiciones nutricionales de la planta cambiaban.

Analizando la expresión relativa en las raíces podemos ver que nuevamente B73 se mantiene constante en la expresión del gen metalo- beta-lactamasa a pesar del cambio de condiciones nutricionales. La expresión de los dos genes, en la raíz de Mi21 mostraron los mayores niveles de transcrito bajo condiciones de poca disponibilidad de fósforo.

Las secuencias del promotor en los 3 cultivares para el gen metalo-beta-lactamasa presentó menor porcentaje de diferencias con B73 que la secuencia de la proteína de unión a calcio. En la región promotora, de los 3 cultivares, y de ambos genes se encontraron sitios de unión para las mismas familias de factores de transcripción, pero gran variabilidad entre el número de sitios lo cual indica la diferente regulación que están teniendo estos genes bajo condiciones de baja disponibilidad de fósforo.

En ambos genes se encuentra presente sitios de unión para factores de transcripción involucrados en otras plantas, en la adaptación y tolerancia a diversos tipos de estrés, y específicamente relacionados con la deficiencia de fósforo se encuentran los factores Myb y WKRY.

6. Conclusiones

El análisis de dos genes candidatos, que fueron seleccionados en base a su localización dentro de una región de inversión cromosómica presente solamente en los maíces de tierras altas, mostró que los genes codifican para proteínas que están directamente relacionadas con la respuesta a estrés abiótico. El primer gen candidato está anotado en las bases de datos como una metalo-beta-lactamasa, y el segundo es una proteína de unión a calcio.

El maíz al estar expuestas a condiciones de estrés, como deficiencia de fósforo, tienen que generar muchos cambios, principalmente modificaciones en el metabolismo, que le permitan adaptarse a las nuevas condiciones. Para iniciar estas modificaciones se necesita un mensaje específico, mensaje que un sensor como la proteína de unión a calcio es capaz de decodificar y así generar la respuesta adecuada. Al mismo tiempo, un aumento en el metabolismo genera sub productos que pueden llegar a ser tóxicos para la planta, por lo tanto, una enzima como la metalo-beta-lactamasa que es capaz de desintoxicar a la planta. Estas acciones son solo algunas de las posibles respuestas de la planta para tolerar las condiciones de deficiencia de fósforo.

Por medio del análisis RT qPCR, se pudo observar que la respuesta al estrés de los genes analizados es específica a cada tejido, ya que en todos los genes hubo mayor transcripción en las hojas; y el mayor nivel de expresión relativa se presentó específicamente para el gen GRMZM2G019177. En PT y Mi21 es donde se pudo observar mayor nivel de expresión para ambos genes en condiciones de bajo fósforo, eso puede ser por que los maíces de tierras altas crecen normalmente en condiciones de baja disponibilidad de fósforo, por lo que estos genes han estado sometidos a un proceso de selección y adaptación.

Se analizaron las regiones promotoras de los genes candidatos en los tres cultivares para buscar elementos en *cis* que nos ayuden a entender el proceso de regulación para dichos genes bajo las condiciones de baja disponibilidad de fósforo. En las regiones promotoras de los 3 cultivares, para los dos genes analizados, se encontraron los mismos sitios de unión a factores de transcripción, pero donde se puede observar una alta variabilidad es en el número de sitios específicos para cada factor de transcripción. Esta variabilidad entre los cultivares puede explicar la diferencia en los niveles de expresión de

los genes candidatos en PT y Mi21, ya que se está generando una reacción a la deficiencia de fósforo y una respuesta más eficiente que le confiere tolerancia a la baja disponibilidad de dicho nutriente.

7. Perspectivas

En la región de inversión localizada en el cromosoma 4 se encuentran 27 genes, de los cuales en este estudio solo se analizaron 2, sería muy importante estudiar el resto de los genes y sus interacciones entre ellos, para poder tener un panorama más global de cómo está funcionando la respuesta a la deficiencia de fósforo en los maíces de tierras altas.

Sería interesante realizar un estudio de QTL utilizando maíces de tierras altas, como PT y Mi21 para asociar rasgos acerca de la modificación de la arquitectura de la raíz y su relación con los genes dentro de la inversión.

Adicionalmente se debe considerar analizar una región aproximadamente de 2000pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, para poder ubicar y conocer los elementos de regulación en cis presentes en los promotores, este análisis también se podría realizar en todos los genes localizados en la inversión.

Se podría intentar la sobre expresión de genes localizados en la inversión que muestren tener un rol importante en la tolerancia a la deficiencia de fósforo, para lograr variedades tolerantes.

8. Bibliografia

- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N. R., & Yadav, R. C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *19*(3), 307–321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
- Baltazar, B. M., Sánchez-Gonzalez, J. D. J., De La Cruz-Larios, L., & Schoper, J. B. (2005). Pollination between maize and teosinte: An important determinant of gene flow in Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(3), 519–526. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1859-6>
- Behringer, C., & Schwechheimer, C. (2015). B-GATA transcription factors – insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Frontiers in Plant Science*, *6*(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00090>
- Bragg, J. G., Supple, M. A., Andrew, R. L., & Borevitz, J. O. (2015). Genomic variation across landscapes: Insights and applications. *New Phytologist*, *207*(4), 953–967. <https://doi.org/10.1111/nph.13410>
- Callebaut, I., Moshous, D., Mornon, J.-P., & de Villartay, J.-P. (2002). Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Research*, *30*(16), 3592–601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf470>
- Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y., & Pan, R.-L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics*, *9*(1), 561. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-561>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.9.938>
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., ... Beeckman, T. (2010). A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology*, *20*(19), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.007>
- Deswal, R., Chakaravarty, T. N., & Sopory, S. K. (1993). The glyoxalase system in higher plants: regulation in growth and differentiation. *Biochemical Society Transactions*, *21*(2), 527–530. <https://doi.org/10.1042/bst0210527>
- Devaiah, B. N., Karthikeyan, A. S., & Raghothama, K. G. (2007). WRKY75 Transcription Factor Is a Modulator of Phosphate Acquisition and Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *143*(4), 1789–1801. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093971>
- Eagles, H. A., Hardacre, A. K., Brooking, I. R., Cameron, A. J., Smillie, R. M., & Hetherington, S. E. (1983). Evaluation of a high altitude tropical population of maize for agronomic performance and seedling growth at low temperature. *New Zealand Journal of Agricultural Research*,

26(3), 281–287. <https://doi.org/10.1080/00288233.1983.10427031>

- Eagles, H. A., & Lothrop, J. E. (1994). Highland maize from central Mexico - Its origin, characteristics, and use in breeding programs. *Crop Science*, 34(1), 11–19. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400010002x>
- Espartero, J., Sánchez-Aguayo, I., & Pardo, J. M. (1995). Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology*, 29(6), 1223–1233. <https://doi.org/10.1007/BF00020464>
- Fang, Z., Pyhäjärvi, T., Weber, A. L., Dawe, R. K., Glaubitz, J. C., Sánchez González, J. de J., ... Ross-Ibarra, J. (2012). Megabase-scale inversion polymorphism in the wild ancestor of maize. *Genetics*, 191(3), 883–894. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.138578>
- Ha, S., & Tran, L.-S. (2014). Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(1), 16–30. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.783549>
- Hamilton, J. A., & Miller, J. M. (2016). Adaptive introgression as a resource for management and genetic conservation in a changing climate. *Conservation Biology*, 30(1), 33–41. <https://doi.org/10.1111/cobi.12574>
- Hoffmann, A. A., & Rieseberg, L. H. (2008). Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173532>
- Hufford, M. B., Lubinsky, P., Pyhäjärvi, T., Devengenzo, M. T., Ellstrand, N. C., & Ross-Ibarra, J. (2013). The Genomic Signature of Crop-Wild Introgression in Maize. *PLoS Genetics*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003477>
- Hufford, M. B., Xu, X., van Heerwaarden, J., Pyhäjärvi, T., Chia, J.-M., Cartwright, R. A., ... Ross-Ibarra, J. (2012). Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nature Genetics*, 44(7), 808–811. <https://doi.org/10.1038/ng.2309>
- Kirkpatrick, M., & Barton, N. (2006). Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*, 173(1), 419–434. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.047985>
- Lauter, N., Gustus, C., Westerbergh, A., & Doebley, J. (2004). The inheritance and evolution of leaf pigmentation and pubescence in teosinte. *Genetics*, 167(4), 1949–1959. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026997>
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 95–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035949>
- Lowry, D. B., & Willis, J. H. (2010). A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000500>
- Luan, S., Kudla, J., Rodríguez-concepcion, M., Yalovsky, S., & Grisse, W. (2002). Calmodulins and

- Calcineurin B – like Proteins : Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants, 389–400. <https://doi.org/10.1105/tpc.001115.S390>
- Mahajan, S., Sopory, S. K., & Tuteja, N. (2006). CBL-CIPK paradigm: Role in calcium and stress signaling in plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 72(2), 63–78.
- Mano, Y., & Omori, F. (2007). Breeding for flooding tolerant maize using “teosinte” as a germplasm resource. *Plant Root*, 1, 17–21. <https://doi.org/10.3117/plantroot.1.17>
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.08.004>
- Pyhäjärvi, T., Hufford, M. B., Mezouk, S., & Ross-Ibarra, J. (2013). Complex patterns of local adaptation in teosinte. *Genome Biology and Evolution*, 5(9), 1594–1609. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt109>
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate Acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 665–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.665>
- Rajhi, I., Yamauchi, T., Takahashi, H., Nishiuchi, S., Shiono, K., Watanabe, R., ... Nakazono, M. (2011). Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *The New Phytologist*, 190(2), 351–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03535.x>
- Remenyi, A., Scholer, H. R., & Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, 11(9), 812–815. <https://doi.org/10.1038/nsmb820>
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Mart'in, A. C., Iglesias, J., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development*, 15(16), 2122–2133. <https://doi.org/10.1101/gad.204401.availability>
- Ruiz Corral, J. A., Durán Puga, N., Sánchez González, J. D. J., Ron Parra, J., González Eguiarte, D. R., Holland, J. B., & Medina García, G. (2008). Climatic adaptation and ecological descriptors of 42 Mexican maize races. *Crop Science*, 48(4), 1502–1512. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0518>
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). Calcineurin : Form and Function, 80(4), 1483–1521.
- Sanchez, J. J., Stuber, C. W., & Goodman, M. M. Sanchez, G. J. J. (2000). Isozymatic and Morphological Diversity in the Races of Maize of Mexico. *Economic Botany*, 54(1931), 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- Sánchez González, J. de J. (2011). Diversidad Del Maiz Y Teocintle. *Ixmati.Biodiversidad.Gob.Mx*, 1–98. Retrieved from http://ixmati.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo9_Analisis_Especialistas/Jesus_Sanchez_2011.pdf
- Shahmuradov, I. A., Gammerman, A. J., Hancock, J. M., Bramley, P. M., & Solovyev, V. V. (2003). PlantProm: A database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 114–117. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg041>
- Shi, J., Kim, K. N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., ... Kudla, J. (1999). Novel protein

- kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11(12), 2393–2405. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.12.2393>
- Steele, K. W., McCormick, S. J., Percival, N., & Brown, N. S. (1981). Nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium, and sulphur requirements for maize grain production. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 9(3–4), 243–249. <https://doi.org/10.1080/03015521.1981.10425421>
- Thornalley, P. J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *The Biochemical Journal*, 269, 1–11. <https://doi.org/10.1042/bj2690001>
- Tuteja, N., & Mahajan, S. (2007). Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant Signaling & Behavior*, 2(2), 79–85. <https://doi.org/10.4161/psb.2.2.4176>
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramírez, M., Girard, L., Sánchez, F., Vance, C. P., ... Hernández, G. (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell and Environment*, 31(12), 1834–1843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01883.x>
- Vander Jagt, D. L. (1993). Glyoxalase II: molecular characteristics, kinetics and mechanism. *Biochemical Society Transactions*, 21(2), 522–7. <https://doi.org/10.1042/BST0210522>
- Wang, Z., Fast, W., Valentine, A. M., & Benkovic, S. J. (1999). Metallo-β-lactamase: Structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(5), 614–622. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00017-4)
- Warburton, M. L., Reif, J. C., Frisch, M., Bohn, M., Bedoya, C., Xia, X. C., ... Melchinger, A. E. (2008). Genetic diversity in CIMMYT nontemperate maize germplasm: Landraces, open pollinated varieties, and inbred lines. *Crop Science*, 48(2), 617–624. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.02.0103>
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., & Sopory, S. K. (2008). An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 23(1–2), 51–68. <https://doi.org/10.1515/DMDI.2008.23.1-2.51>
- Zhang, H., Uddin, M. S., Zou, C., Xie, C., Xu, Y., & Li, W. X. (2014). Meta-analysis and candidate gene mining of low-phosphorus tolerance in maize. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 262–270. <https://doi.org/10.1111/jipb.12168>