

## EXPRESIÓN DEL GEN ANTIFÚNGICO ZEAMATINA EN COLEÓPTILOS DE MAÍZ ARROCILLO ANTE INFECCIÓN POR *Aspergillus*

### EXPRESSION OF THE ANTIFUNGAL GENE ZEAMATIN IN ARROCILLO MAIZE COLEOPTILES BEFORE INFECTION BY *Aspergillus*

<sup>1</sup>Patricia Vásquez-Luis , <sup>3</sup>María del Socorro Pina-Canseco , <sup>2</sup>Alma Dolores Pérez-Santiago , <sup>2</sup>Diana Matías-Pérez , <sup>2</sup>Iván Antonio García-Montalvo , <sup>3</sup>José Luis Hernández-Morales , <sup>2</sup>Marco Antonio Sánchez-Medina 

<sup>1,2</sup> Estudiante, investigador. Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO). Avenida Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125, esquina Calzada Tecnológico. C.P. 68030, Oax. Méx. <sup>3</sup>Centro de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM-UABJO), Av. San Felipe del Agua (2,69 km). CP 68020, Oax. Méx. <sup>§</sup>Autor de correspondencia: ([marco.s.medina@itoaxaca.edu.mx](mailto:marco.s.medina@itoaxaca.edu.mx)).

#### RESUMEN

Los hongos productores de micotoxinas responsables de la pudrición de la mazorca en campo y almacenamiento incluyen algunas especies del género *Aspergillus* de importancia económica en México y otros países donde se cultiva el maíz. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la expresión del gen *zlp* en tres muestras de maíz arrocillo ante la infección por *Aspergillus parasiticus* entre los meses de agosto a diciembre de 2022 en el Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Oaxaca. Las muestras infectadas con *A. parasiticus* presentaron cambios morfológicos en comparación con las muestras control o sin infección como oscurecimiento y marchites en los meristemos apicales de coleóptilos y radícula. La calidad e integridad del ARN extraído fue aceptable. El análisis de la expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de las muestras analizadas mostró que arrocillo blanco control fue la muestra que exhibió mayor expresión de *zlp*, e incluso fue mayor a la muestra infectada con *Aspergillus* con una diferencia de 18.42 %. La muestra arrocillo amarillo control e inoculado presentó una baja expresión del gen, mientras que arrocillo azul inoculado mostró inducción en un 11.81 % comparado con el control, posterior a la infección fúngica. La expresión del gen de *zlp* se correlacionó con el desarrollo de los coleóptilos, las muestras de color blanco y azul presentaron mejor crecimiento a

diferencia de la muestra de color amarillo. Los resultados obtenidos sugieren la expresión del gen *zlp* como respuesta a la infección de *A. parasiticus* en la primera etapa de desarrollo del maíz.

**Palabras clave:** *Aspergillus parasiticus*, expresión génica, gen *zlp*, maíz nativo.

#### ABSTRACT

Mycotoxin-producing fungi responsible for ear rot in the field and in storage include some species of the *Aspergillus* genus of economic importance in Mexico and other countries where corn is grown. The objective of the present investigation was to evaluate the expression of the *zlp* gene in three arrocillo maize samples in response to infection by *Aspergillus parasiticus* between the months of August to December 2022 at the UNAM-UABJO Faculty of Medicine Research Center, Oaxaca. Samples infected with *A. parasiticus* presented morphological changes compared to control or uninfected samples, such as darkening and wilting in the apical meristems of coleoptiles and radicle. The quality and integrity of the extracted RNA was acceptable. The expression analysis by semiquantitative RT-PCR of the samples analyzed showed that control white arrocillo was the sample that exhibited the highest expression of *zlp*, and was even higher than the sample infected with *Aspergillus* with a difference of 18.42 %. The control and inoculated yellow arrocillo sample

presented a low expression of the gene, while the inoculated blue arrocillo showed induction of 11.81 % compared to the control, after the fungal infection. The expression of the *zlp* gene was correlated with the development of coleoptiles, the white and blue samples presented better growth unlike the yellow sample. The results obtained suggest the expression of the *zlp* gene in response to *A. parasiticus* infection in the first stage of maize development.

**Index words:** *Aspergillus parasiticus*, gene expression, *zlp* gene, native maize.

## INTRODUCCIÓN

El maíz es el cultivo de mayor importancia en México (López y Becerra, 2018), cerca del 75 % proviene de semillas nativas mientras que el 25 % restante es de origen comercial (Orozco-Ramírez, Perales & Hijmans, 2017). En el país se han reportado alrededor de 64 razas, de las cuales 59 son consideradas nativas y a su vez, diferentes poblaciones de teocintle, parientes silvestres del maíz (Torres-Peña et al., 2015; CONABIO, 2011). Estos maíces han estado en resguardo de las comunidades rurales quienes las seleccionan a través de su conocimiento, preferencias y prácticas adaptadas de acuerdo a sus necesidades, manteniendo así la diversidad de este importante cultivo (Escalante y Trigo, 2018) Dentro de las variedades de maíces nativos de mayor producción en el estado se encuentra la raza arrocillo, caracterizada por presentar mazorcas delgadas y cónicas con un gran número de hileras de granos por mazorca y una diversidad de colores que van de blanco hasta azul. En Oaxaca, esta raza está distribuida en las zonas altas de la Sierra Sur (CONABIO, 2020; Aragón et al., 2006).

Durante su crecimiento y almacenamiento el maíz está expuesto a sufrir infecciones que derivan en la pudrición de la mazorca y el grano causada por fitopatógenos, entre ellos las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. *Aspergillus* en condiciones óptimas de crecimiento produce metabolitos secundarios denominados aflatoxinas que son

altamente tóxicos para quienes consumen granos contaminados. A la fecha, se han realizado estudios con la finalidad de identificar germoplasmas que presenten resistencia a la infección de este hongo y su contaminación por aflatoxinas (Álvarez-Días et al., 2022; Shabeer et al., 2022; Sarma et al., 2017) representando una solución viable y económica para contrarrestar esta problemática (Sheoran et al., 2022; Mwamahonje et al., 2021; Luo et al., 2011).

Con ayuda de nuevos estudios moleculares se han identificado múltiples genes y sus proteínas en líneas puras e híbridos comerciales con resistencia, sin embargo, estos análisis se han realizado en otros países (Brown et al., 2010). Actualmente, son pocas las investigaciones que se han realizado con la finalidad de identificar genes y/o proteínas en maíces nativos de México (Varapizuela-Sánchez, 2020; Sandoval-Flores, 2016; Sánchez-Medina, 2016) y los teocintles (Hernández-Morales, 2022), que respondan ante la infección causada por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Las razas nativas que se han evaluado son: bolita, conejo, tuxpeño, zapalote, elotes cónicos, vandeño, tepecintle, serrano, y arrocillo; mientras que los genes evaluados son; *ZmCOR*, *glx-I*, *perI* y *zlp*.

Los cuatro genes son catalogados como genes de resistencia, sin embargo, por la actividad de su proteína, *zlp* sintetiza una proteína con actividad antifúngica aislada de maíz (Shatters et al., 2006; Schimoler-O'Rourke et al., 2001; Roberts et al., 1996) mientras que *ZmCOR*, *glx-I* y *perI* sintetizan proteínas relacionadas al estrés. En bioensayos, la proteína *zlp* provocó la permeabilización de la membrana plasmática en el ápice de las hifas de *Aspergillus* (Batalia, Monzingo, Ernst, Roberts & Robertus, 1996; Roberts & Selitrennikoff, 1990;), desde su descubrimiento se ha usado también contra otros patógenos, como: *Neurospora crassa*, *Candida*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Chaetomium* (Perri et al., 2009, Roberts et al., 1996).



**Figura I.** Muestras de maíz de la raza arrocillo: a) blanco, b) amarillo y c) azul.

Por lo anterior, es de suma importancia conocer la respuesta de estos genes de resistencia y sus proteínas en razas de maíces nativos debido a la importancia cultural y económica que tienen en México. El objetivo de la investigación fue evaluar la expresión del gen *zlp* en coleóptilos de maíz arrocillo ante la infección causada por *A. parasiticus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de maíz

Las tres muestras de la raza arrocillo (blanco, amarillo y azul) fueron obtenidas por colecta directa en el municipio de Santa María Lachixio, distrito Sola de Vega, Oaxaca, donde se han identificado poblaciones del material para su conservación in situ al presentar las versiones más puras de esta raza en el estado (Aragón et al., 2006). Las características de las mazorcas son: mazorcas delgadas y cortas, cónicas, con un número mediano de hileras; promedio de 15.4 hileras. Granos del tipo reventador, pequeños, muy angostos y delgados, redondeados, en forma de cuña, endospermo muy córneo, aleurona sin color; pericarpio sin color (Figura I).

### Preparación del inoculo e infección de coleóptilos de maíz

Para los ensayos se utilizó una cepa de *A. parasiticus*, ATCC I6992 caracterizada por su alta producción de aflatoxinas. Se inocularon placas con medio PDA con 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión concentrada de esporas y se incubaron siete días en una incubadora INDELAB a  $28 \pm 2$  °C. La recuperación de esporas se llevó a cabo en agua estéril con tritón al 0.01 % y se conservaron en tubos de vidrio a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta su utilización.

Para la obtención de coleóptilos de maíz, 60 semillas de cada muestra se desinfectaron en alcohol etílico al 70 % durante 10 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron 10 semillas en una caja Petri estéril con papel filtro y algodón humedecidos, siendo estos una unidad experimental. Tres placas se utilizaron como control positivo (sin infección fúngica) inoculados con 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril y tres más se inocularon con 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas de *A. parasiticus* a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Las placas se etiquetaron de la siguiente manera: arrocillo blanco (Ablc y Ablí), arrocillo amarillo (Aamc y Aami) y arrocillo azul (Aazc y Aazi), control e infectado. Finalmente, se incubaron a  $28 \pm 2$  °C durante 8 días (Varapizuela-Sánchez et al., 2022), y se determinó el porcentaje de germinación de los granos con y sin inoculación a partir del quinto día de incubación.

## Extracción y cuantificación de ARN

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

## Expresión génica por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) semicuantitativa

La síntesis de la primera cadena de ADN se obtuvo usando el kit ADNc RevertAid (ThermoScientific™) en un termociclador BIO-RAD MyCycler siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando una concentración final de 25 ng de ARN como plantilla para la reacción.

La síntesis de las siguientes cadenas de ADN se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega). Para la amplificación del gen *zlp*, se diseñó el juego de oligonucleótidos “*zlp*” Forward 5' GGTAGTGAAGCCTCGAAGG 3' y Reverse 5' GCATTACTACATCCTAGCACAGC 3', utilizando el software Primer3 (v. 0.4.0). Para la

amplificación del gen de referencia *actina* (*MAcI*) se usó el juego de oligonucleótidos reportado por Baker et al. (2009) (Forward 5' GTGACAATGGCACTGGAATG 3' y Reverse 5' GACCTGACCATCAGGCATCT 3'). El termociclador se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos; con desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento de 53 °C por 30 seg para ambos oligonucleótidos y extensión a 72 °C por 39 y 51 seg para *zlp* y *MAcI*, respectivamente. La extensión final fue de 72 °C por 5 min.

Los productos obtenidos de la PCR se corrieron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % con buffer TAE IX a 70 volts por 30 min y las imágenes se obtuvieron en un transiluminador con luz UV (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). El análisis fue por triplicado. Las imágenes de los productos de PCR se analizaron por densitometría con el programa ImageJ® (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012), la imagen se ajustó a escala de grises de 8 bits, el brillo y contraste se ajustaron en modo automático y se invirtió a blanco y negro utilizando la herramienta invert LUT del mismo programa. Los resultados obtenidos por densitometría de la expresión del gen *zlp* se compararon mediante un análisis de varianza y la prueba de medias (Tukey, 0.05) utilizando el software Minitab (Versión 18), expresando el área de cada producto en porcentaje.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras control o sin infección germinaron, el 100 % de las semillas (las tres unidades experimentales). Los coleóptilos y radículas mostraron un color amarillo hialino, con vigorosidad y así mismo raíces seminales abundantes (Figura 2a); por su parte, las muestras infectadas con el patógeno *A. parasiticus* presentaron un 70 % de germinación, en los tejidos de coleóptilo y radícula se observó oscurecimiento causado por la infección (Figura 2b), además, el 20 % de las plántulas presentaron marchitamiento en los ápices. Estas características son similares a las reportadas por Varapizuela

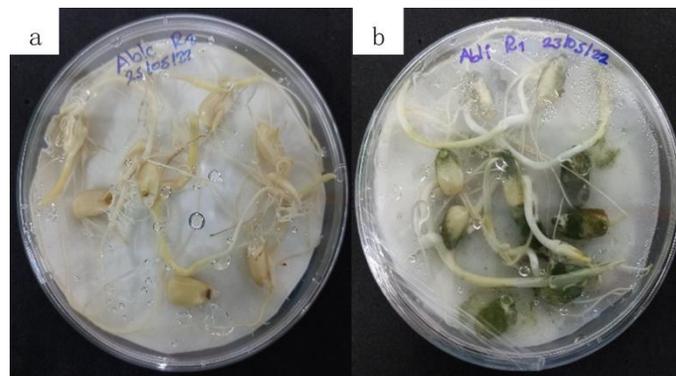


Figura 2. Coleóptilos de maíz. a) control, b) inoculado con *Aspergillus parasiticus*.

et al. (2022) en el que se infectaron muestras de maíz nativo con *A. flavus*, otra especie productora de aflatoxinas. El daño en el tejido de los coleóptilos también se ha reportado por otros hongos, y en teocintle, se presentó marchitamiento y clorosis en coleóptilos inoculados con el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis* (Pérez et al., 2017).

El ARN total obtenido presentó las bandas características 28s y 18s bien definidas y sin trazas de material degradado, además de tener valores aceptables de calidad, pureza e integridad de acuerdo con los parámetros reportados (Vennapusa et al., 2020; Conde et al., 2012). Se comparó la expresión del gen *zlp* en coleóptilos control (Ablc, Aamc y Aazc) e inoculados con *A. parasiticus* (Abli, Aami y Aazi). De acuerdo con los resultados obtenidos por densitometría de los productos de RT-PCR, la muestra Ablc presentó la mayor expresión génica de *zlp* y gen de referencia *MAC1* de todas las muestras analizadas. Los niveles de expresión obtenidos de Ablc superaron significativamente a la muestra infectada (Abli) con un 18.42 % y 5.35 % para el gen *zlp* y al gen de referencia *MAC1* respectivamente. Por otra parte, la mayor inducción estadísticamente superior en coleóptilos infectados se presentó en la muestra Aazi con un valor de 11.81 % superior al control, mientras que en la muestra Aam no hubo diferencia significativa en la expresión génica entre el control y el coleóptilo infectado (Figura 3).

En un estudio realizado por Sajjad et al. (2016) se analizó la expresión del gen *zlp* ante la infección

por *Aspergillus niger* en tejidos de hojas jóvenes de maíces híbridos, encontrando una transcripción baja respecto al gen de referencia gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), pero obteniendo una mayor expresión de *zlp* en muestras infectadas en comparación con las muestras sanas, datos similares a los obtenidos en este trabajo de investigación, donde en dos de las tres muestras infectadas presentaron respuesta ante la infección fúngica, siendo Aaz la muestras que tuvo una mejor inducción en la expresión del gen.

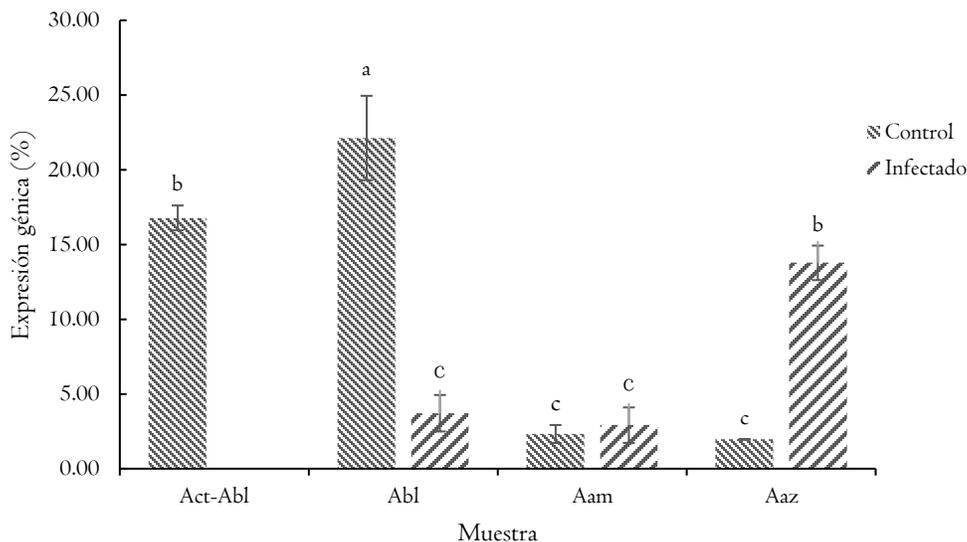
En otro estudio en donde se analizó la expresión de los genes *ZmCOR* y *zlp* ante la infección por *A. flavus* en embriones de maíz nativo elotes cónicos negro (susceptible a la infección por *Aspergillus*), elotes cónicos rojo (resistente) y B73 línea endogámica susceptible formada en Estados Unidos, no se identificaron transcritos del gen *zlp* en ninguna de las muestras analizadas (Sandoval-Flores, 2016). Estos resultados difieren con los obtenidos en la presente investigación, en la cual se observó transcripción del gen en las tres muestras de arrocillo tanto sanas como inoculadas con *A. parasiticus*, lo cual podría deberse a que se evaluaron en etapas de desarrollo diferente. Por otra parte, Sánchez-Medina (2016) evaluó la expresión de tres genes relacionados con la resistencia a la infección de *A. parasiticus* en razas de maíces nativos, entre ellas dos muestras de arrocillo, reportando niveles significativos de la expresión de estos genes en dos muestras (morado y blanco) que, además, presentaron niveles bajos de concentración de aflatoxina BI por kilogramo de

maíz. Los estudios en la raza arrocillo proporcionan evidencia de la respuesta positiva que tiene este maíz nativo ante la infección fúngica.

La actividad de la proteína zeamatina fue analizada como respuesta al estrés causado por *A. flavus* y *Fusarium moniliforme* en genotipos de maíz resistente (GT-MAS: gk y Mp420) y susceptibles (Pioneer 3154 y Deltapine G-4666). En ambos bioensayos, se inhibió el crecimiento de hifas en los discos de cultivo, paralelamente se identificó mayor actividad antifúngica en ensayos con granos germinados a las 72 h, en contraste con los no germinados, sugiriendo una resistencia asociada a la germinación (Guo et al., 1997). Una investigación adicional identificó mayores concentraciones de la proteína zeamatina en el germen del grano en comparación con el endospermo (Guo et al., 1999). Posteriormente, Chen et al (2001) reportaron altos niveles de zeamatina y otras proteínas antifúngicas en embriones de genotipos de maíz resistentes a *A. flavus* respecto a las semillas no germinadas de genotipos susceptibles. Considerando la importancia de la actividad de la proteína en la

etapa germinativa, las muestra de Abl y Aaz podrían tener una buena respuesta en el suelo ante la presencia de hongos fitopatógenos.

Si bien, estudios previos reportan el aislamiento del gen y la proteína zeamatina en diferentes tejidos del maíz y su aplicaciones en tratamientos contra diferentes especies fúngicas con fines terapéuticos (Perri et al., 2009; Wilson et al., 2000; Selitrennikoff et al., 1992), su aplicación para el control de especies del género *Aspergillus* en cultivos de importancia económica como el maíz ha sido escasa, así como la identificación de germoplasma nativo con resistencia a la infección *Aspergillus* y acumulación de aflatoxinas. Si bien la resistencia es un fenómeno multigénico (Singh et al., 2023; Chen et al., 2015;), los resultados de esta investigación sugieren la participación del gen *zlp* como respuesta a la infección de *A. parasiticus* en la primera etapa de desarrollo del maíz como se observó en la muestra Ablc, ya que presentó una alta expresión constitutiva y en el caso de la muestra Aazi donde se indujo la expresión del gen ante la presencia del hongo, en ambos casos con mecanismos de defensa presentes en el maíz nativo.



**Figura 3.** Porcentaje de expresión génica de *zlp* en muestras de maíz nativo arrocillo. *Actina* (*MAc I*) de arrocillo blanco (Act-Abl), arrocillo blanco (Abl), arrocillo amarillo (Aam), arrocillo azul (Aaz). Letras distintas presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05). Las líneas verticales sobre las barras representan el error estándar.

Se ha considerado de gran relevancia conocer los mecanismos de resistencia natural en este importante cultivo que puede servir como punto de partida para estudios similares en otros cultivos de importancia agrícola (Spencer-Smith et al., 2019; Cary et al., 2011), incluso se ha considerado el uso de la biotecnología en el cultivo de maíz para resolver el grave problema de la contaminación con aflatoxinas (Bhatnagar-Mathur et al., 2015).

## CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó la expresión del gen *zlp* en coleóptilos de tres muestras de maíz nativo de la raza arrocillo ante la infección causada por *A. parasiticus*. De estos, la muestra Aaz presentó la mayor inducción del gen tras la infección del patógeno, la cual fue estadísticamente significativa en comparación al control (sin infección). Por otra parte, la expresión constitutiva de la muestra Abl no inoculada fue estadística y numéricamente superior a la muestra con infección. La expresión de este gen puede favorecer la germinación y desarrollo de la planta de maíz frente a la infección por *A. parasiticus* en los coleóptilos de las muestras de maíz arrocillo de color blanco y azul.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca de doctorado número 732413.

## REFERENCIAS

- Álvarez-Días, F., Torres-Parga, B., Valdivia-Flores, A.G., Quezada-Tristán, T., Alejos-De La Fuente, J.I., Sosa-Ramírez, J. & Rangel-Muñoz, E.J. (2022). *Aspergillus flavus* and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin MI in bovine milk in Aguascalientes, Mexico. *Toxins*, 14(5), 292. <https://doi.org/10.3390/toxins14050292>
- Aragón, C.F., Taba, S., Hernández, J.M., Figueroa, J.D. y Serrano, V. (2006). *Actualización de la información sobre los maíces criollos de Oaxaca*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS002 México D. F. 119 p.
- Batalia, M.A., Monzingo, A.F., Ernst, S., Roberts, W. & Robertus, J.D. (1996). The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural Biology*, 3(1), 19-22. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-19>
- Bhatnagar-Mathur, P., Sunkara, S., Bhatnagar-Panwar, M., Waliyar, F. & Sharma, K.K. (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.009>
- Brown, R.L., Chen, Z.Y., Warburton, M., Luo, M., Menkir, A., Fakhoury, A. & Bhatnagar, D. (2010). Discovery and characterization of proteins associated with aflatoxin-resistance: Evaluating their potential as breeding markers. *Toxins*, 2(4), 919-933. <https://doi.org/10.3390/toxins2040919>
- Cary, J.W., Rajasekaran, K., Brown, R.L., Luo, M., Chen, Z.Y. & Bhatnagar, D. (2011). Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins*, 3(6), 678-696. <https://doi.org/10.3390/toxins3060678>
- Chen, Z.Y., Rajasekaran, K., Brown, R.L., Saylor, R.J. & Bhatnagar, D. (2015). Discovery and confirmation of genes/proteins associated with maize aflatoxin resistance. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 211-224. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1732>
- Chen, Z.Y., Brown, R.L., Cleveland, T.E., Damann, K.E. & Russin, J.S. (2001). Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production. *Journal of Food Protection*, 64(11), 1785-1792. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.11.1785>
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2011). *Proyecto global "Recopilación, generación, actualización y análisis de*

- información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México". <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyecto-Maices>
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2020). *Raza arrocillo*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-conico/arrocillo>
- Conde, M.C.M., Nedel, F., Campos, V.F., Smith, A.J., Nör, J.E., Demarco, F.F. & Tarquinio, S.B.C. (2012). Odontoblast RNA stability in different temperature-based protocols for tooth storage. *International Endodontic Journal*, 45(3), 266-272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01971.x>
- Escalante, L.N. y Trigo, Y.C.M. (2018). Campesinos maiceros en Tlaxcala: viabilidad, caracterización y respuestas ante el maíz transgénico. *Sociedad y Ambiente* 16(6): 179-206.
- Guo, B.Z., Cleveland, T.E., Brown, R.L., Widstrom, N.W., Lynch, R.E. & Russin, J.S. (1999). Distribution of antifungal proteins in maize kernel tissues using immunochemistry. *Journal of Food Protection*, 62(3), 295-301. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.3.295>
- Guo, B.Z., Chen, Z.Y., Brown, R.L., Lax, A.R., Cleveland, T.E., Russin, J.S., Mehta, A.D., Selitrennikoff, C.P. & Widstrom, N.W. (1997). Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology*, 87(11), 1174-1178. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.11.1174>
- Hernández-Morales, J.L. (2022). Identificación de los genes *glx-1*, *TI 14-kD* y *pr-10* relacionados a la resistencia a aflatoxinas, en *Zea diploperennis*, *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea luxurians*. Tesis de Doctorado. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO).
- López, R.L.F. y Becerra L.A. (2018). Eficiencia de los productores de maíz en Sinaloa: una propuesta metodológica. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(3): 651-664. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1222>
- Luo, M., Brown, R.L., Chen, Z.Y., Menkir, A., Yu, J. & Bhatnagar, D. (2011). Transcriptional profiles uncover *Aspergillus flavus*-induced resistance in maize kernels. *Toxins*, 3(7), 766-786. <https://doi.org/10.3390/toxins3070766>
- Mwamahonje, A., Eleblu, J.S.Y., Ofori, K., Deshpande, S., Feyissa, T. & Tongoona, P. (2021). Drought tolerance and application of marker-assisted selection in sorghum. *Biology*, 10(12), 1249. <https://doi.org/10.3390/biology10121249>
- Orozco-Ramírez, Q., Perales, H. & Hijmans, R.J. (2017). Geographical distribution and diversity of maize (*Zea mays* L. subsp. *mays*) races in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64, 855-865. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0405-0>
- Pérez, D.M.C., Medina, M.A.S., Canseco, M.D.S.P., Campos, E.P., García-Montalvo, I.A. & Santiago, A.D.P. (2017). Inducción de infección en Teosinte (*Zea diploperennis*) con el fitopatógeno *Ustilago maydis*. *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*, 2(1), 17-22.
- Perri, F., Della P., S., Rufini, F., Patamia, M., Bonito, M., Angiolella, L. & Vitali, A. (2009). Antifungal-protein production in maize (*Zea mays*) suspension cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52(4), 273-281. <https://doi.org/10.1042/BA20080060>
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P., Laue, B.E. and Potter, S.L. (1996). *Synergistic antifungal protein and compositions containing same*. U.S. Patent, 5,521,153.
- Roberts, W.K. & Selitrennikoff, C.P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Microbiology*, 136(9), 1771-1778.

- <https://doi.org/10.1099/00221287-136-9-177>
- Sajjad, A.M., Bahsiri, T., Saeed, S., Iqbal, M., Ahmad, S. & Islam, S. (2016) Zeamatin like protein (*zlp*) gene is associated with resistance against *A. niger* in maize (*Zea mays* L.). *Cercetări Agronomice în Moldova* XLIX, 2(166):29–39.  
<https://doi.org/10.1515/cerce-2016-0013>
- Sánchez-Medina, M.A. (2016). *Identificación de la expresión de los genes glx-1, per1 y ZmCOR ante la presencia de Aspergillus parasiticus en coleóptilos de maíces criollos de Oaxaca*. Tesis de Doctorado. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO).
- Sandoval-Flores, V. (2016). *Identificación de razas de maíz criollo del Valle de Oaxaca resistente y susceptible a la acumulación de Aflatoxina BI producida por Aspergillus flavus y la expresión de los genes: ZmCOR, Zeamatin, aflR y norB*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Repositorio Institucional- Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato.
- Sarma, U.P., Bhetaria, P.J., Devi, P. & Varma, A. (2017). Aflatoxins: implications on health. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 32, 124-133.
- Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M. & Selitrennikoff, C. P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and  $\alpha$ -amylase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2365-2366.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2365-2366.2001>
- Selitrennikoff, C.P., Vigers, A.J. & Roberts, W.K. (1992). Antifungal proteins from plants: a possible new source of human therapeutics. In *New Approaches for Antifungal Drugs*, 88-113. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6729-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6729-9_6)
- Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A. & Ali, A. (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins*, 14(5), 307.  
<https://doi.org/10.3390/toxins14050307>
- Shatters, R.G., Boykin, L.M., Lapointe, S.L., Hunter, W.B. & Weathersbee, A.A. (2006). Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. *Journal of Molecular Evolution*, 63, 12-29. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0053-z>
- Sheoran, S., Kaur, Y., Kumar, S., Shukla, S., Rakshit, S. & Kumar, R. (2022). Recent advances for drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): present status and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 13, 872566.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872566>
- Singh, A., Sharma, S., Choudhir, G. & Kumar, S. (2023). Fungal pathogen-induced modulation of structural and functional proteins in *Zea mays* L. In *Maize Improvement: Current Advances in Yield, Quality, and Stress Tolerance under Changing Climatic Scenarios* (pp. 303-322). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-21640-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-031-21640-4_14)
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Spencer-Smith, J., Paul-Williams, W. & Windham, G. L. (2019). Aflatoxin in maize: a review of the early literature from “moldy-corn toxicosis” to the genetics of aflatoxin accumulation resistance. *Mycotoxin Research*, 35, 111-128.  
<https://doi.org/10.1007/s12550-018-00340-w>
- Torres-Peña, G., De la Cruz-Larios L., Sánchez-González, J.J., Ruíz-Corral, J.A., Castañeda-Nava J.J., Santacruz-Ruvalcaba, F. y Miranda-Medrano, R. (2015). Relaciones entre poblaciones de teocintle (*Zea* spp.) de México, Guatemala y Nicaragua. *Acta Botánica*

Mexicana III: 17-45.  
<https://doi.org/10.21829/abmIII.2015.185>

- Varapizuela-Sánchez, C.F., Sánchez-Medina, M.A., Pina-Canseco, M.S., Rosas-Murrieta, N.H., Pérez-Santiago, A.D. & García-Montalvo, I.A. (2022). Glyoxalase I (GLX-I) analysis in native maize from Oaxaca, Mexico, infected with *Aspergillus flavus* in vitro. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 39(4). [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n4.01](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n4.01)
- Varapizuela-Sánchez, C.F. (2020). *Análisis de la actividad de glioxalasa I (GLX-I) como respuesta a la infección por Aspergillus flavus in vitro en maíces nativos del estado de Oaxaca*. Tesis de Doctorado. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO).
- Vennapusa, A.R., Somayanda, I.M., Doherty, C.J. & Jagadish, S.K. (2020). A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. *Scientific Reports*, 10(1), 16887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>
- Vigers, A.J., Roberts, W.K. & Selitrennikoff, C.P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, 4(4), 315-323. <https://doi.org/10.1094/mpmi-4-315>
- Wilson, S., Mahiou, B., Reiger, R., Tentler, S., Schimoler, R., Orndorff, S. & Selitrennikoff, C.P. (2000). Pilot-scale purification of zeamatin, an antifungal protein from maize. *Biotechnology Progress*, 16(1), 38-43. <https://doi.org/10.1021/bp9901365>