

## IDENTIFICACIÓN DEL GEN ANTIFÚNGICO *TI14-kD* EN TEOCINTLES Y MAÍZ, Y SU RELACIÓN CON *Aspergillus*

### IDENTIFICATION OF THE ANTIFUNGAL GENE *TI14-kD* IN TEOCINTLES AND MAIZE, AND ITS RELATIONSHIP WITH *Aspergillus*

<sup>1</sup>José Luis Hernández-Morales<sup>ORCID</sup>, <sup>1</sup>María del Socorro Pina-Canseco<sup>ORCID</sup>, <sup>2</sup>Nora Hilda Rosas-Murrieta<sup>ORCID</sup>,  
<sup>3</sup>Marco Antonio Sánchez-Medina<sup>ORCID</sup>, <sup>3</sup>Patricia Vázquez-Luis<sup>ORCID</sup>, <sup>3</sup>Iván Antonio García-Montalvo<sup>ORCID</sup>, <sup>3</sup>Alma  
Dolores Pérez-Santiago<sup>ORCID</sup>

<sup>1</sup> UNAM-UABJO, Centro de Investigación, Facultad de Medicina, , Avenida San Felipe del Agua (269 km), C.P. 68020 Oaxaca. México. <sup>2</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. 4 Sur 104 Centro Histórico, C.P. 72000. Puebla. México. <sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Oaxaca. Avenida Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030, Oaxaca. México. <sup>§</sup>Autor de correspondencia: ([alma.ps@oaxaca.tecnm.mx](mailto:alma.ps@oaxaca.tecnm.mx)).

#### RESUMEN

Los teocintles son morfológica y genéticamente parecidos al maíz. Una de las enfermedades que afecta gravemente a este cultivo es causada por especies del género *Aspergillus*, hongos productores de aflatoxinas. Estudios proteómicos y genéticos realizados en híbridos comerciales y líneas endogámicas de maíz permitió el descubrimiento de la resistencia natural del maíz a esta infección fúngica, sin embargo, en los teocintles no se han realizado estudios similares; en este sentido, el objetivo del trabajo fue identificar y analizar *in silico* el gen *TI14-kD* de maíz y los teocintles: *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*, y su relación con el hongo fitopatógeno *Aspergillus*. Para la identificación del gen se diseñaron oligonucleótidos específicos y mediante la reacción en cadena de la polimerasa se obtuvieron los amplicones en maíz cónico, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*. Las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación sanger se depositaron en un banco de genes. Las secuencias se compararon en la base de datos del NCBI con otras secuencias TI que fueron altamente similares. Por su parte, el análisis *in silico* indicó dos cambios de aminoácidos en la secuencia de maíz y una en *Zea diploperennis*.

**Palabras clave:** inhibidor de la tripsina, PCR, *Zea diploperennis*, *Zea luxurians*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

#### ABSTRACT

Teosintes are morphologically and genetically similar to corn. One of the diseases that seriously affects this crop is caused by species of the genus *Aspergillus*, aflatoxin-producing fungi. Proteomic and genetic studies carried out on commercial hybrids and inbred lines of corn allowed the discovery of the natural resistance of corn to this fungal infection, however, similar studies have not been carried out on teosintes; in this sense, the objective of the work was to identify and analyze *in silico* the *TI14-kD* gene of corn and the teosintes: *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea diploperennis* and *Zea luxurians*, and its relationship with the phytopathogenic fungus *Aspergillus*. Specific oligonucleotides were designed to identify the gene and amplicons were obtained by polymerase chain reaction in cone corn, *Zea diploperennis* and *Zea luxurians*. The nucleotide sequences obtained by sanger sequencing were deposited in a gene bank. The sequences were compared in the NCBI database with other TI sequences that were highly similar. *In silico* analysis indicated two amino acid changes in the maize sequence and one in *Zea diploperennis*.

**Index words:** trypsin inhibitor, PCR, *Zea diploperennis*, *Zea luxurians*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

## INTRODUCCIÓN

Los teocintles son un conjunto de pastos con ciclo de maduración anual o perennes; morfológica y genéticamente muy parecidos al maíz (CONABIO, 2021). Estudios genéticos han revelado que el teocintle de la cuenca del río Balsas, México; *Zea mays* ssp. *parviglumis*, es el progenitor directo del maíz y el resto de los teocintles son sus parientes silvestres (Matsuoka et al., 2002), los cuales representan un importante banco de genes para el mejoramiento del maíz (CONABIO, 2021) dado que éste ha perdido entre 4 % y 6 % de su genoma aproximadamente (Wright et al., 2005). Este grupo de plantas se encuentra en áreas tropicales y subtropicales de México, Guatemala, Costa Rica, Honduras, El Salvador y Nicaragua, creciendo en una variedad de condiciones ecológicas, desde regiones cálidas y húmedas, hasta valles templados y secos (Sánchez-González et al., 2018).

El maíz es uno de los cultivos más importantes para la alimentación humana, sin embargo, el cambio climático ha planteado nuevos retos en el cultivo, entre ellos, la resistencia a enfermedades (Ramos-Girona et al., 2020), si bien, no se había considerado que en el proceso de domesticación hubo reducción genómica en el cultivo, actualmente los mejoradores y genetistas de maíz tienen en consideración esta reducción para el mejoramiento y adaptación del cultivo a las condiciones climáticas venideras (Chen et al., 2020; Flint-García, 2013). Por su parte, los teocintles son objeto de estudio en la incorporación de alelos de interés agronómico para el maíz, entre ellos, de resistencia a infección fúngica (Cui et al., 2024; Wang et al., 2022; Sahoo et al., 2021).

Los hongos fitopatógenos que atacan al maíz tanto en campo como en almacén pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*

(Montes et al., 2009); del género *Aspergillus*, las dos especies más importantes son: *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, hongos productores de micotoxinas llamadas aflatoxinas que afectan la salud humana y animal (Chang, 2009).

El descubrimiento de la resistencia natural del maíz a la pudrición de la mazorca, la infección del grano y la contaminación por aflatoxinas causadas por *Aspergillus flavus* permitió el estudio a nivel proteómico en líneas resistentes y susceptibles al fitopatógeno, comparando perfiles proteínicos y secuenciando las proteínas sobreexpresadas o de perfil único (Chen et al., 2004; Chen et al., 2002). Entre las proteínas identificadas se encuentra el Inhibidor de la Tripsina de 14 kilodaltones (TI-14 kDa), una proteína antifúngica presente en concentraciones relativamente altas en granos de maíz resistente a la infección por *Aspergillus flavus* y ausente o en baja concentración en líneas susceptibles (Chen et al., 1998).

Actualmente, se analizan los niveles de expresión génica en maíz como una herramienta para identificar otros genes relacionados a la resistencia a la infección y contaminación de aflatoxinas por *Aspergillus* (Baisakh et al., 2023; Warburton et al., 2022; Castano-Duque et al., 2021). El estudio de genes de resistencia a la infección por este fitopatógeno se ha desarrollado principalmente en líneas endogámicas de maíz (Han et al. 2020; Warburton et al., 2015; Luo et al., 2011), mientras que los trabajos en razas nativas de México son escasos (Ortega-Beltran et al., 2021; Ortega-Beltran & Cotty, 2020). En Oaxaca se han estudiado algunos genes resistencia a este fitopatógeno en diferentes razas nativas (Vásquez-Luis et al., 2023; Varapizuela-Sánchez et al., 2022). A diferencia del maíz, los estudios genéticos en teocintles se han enfocado a la historia evolutiva de genes quitinasa (Tiffin, 2004), genes de resistencia a la mancha gris de la hoja de maíz (Zhang et al., 2017), resistencia a *Fusarium verticillioides* (Feng et al., 2022) y ataque de herbívoros (Han et al., 2021).

El papel del inhibidor de la tripsina en maíz, trigo y otros cereales ha mostrado un gran

potencial de aplicaciones en la agricultura (Chiu et al., 2022; Mishra et al., 2020). Por lo anterior, el estudio de este y otros genes relacionados con la resistencia a la infección por *Aspergillus* en los teocintles puede favorecer los programas de mejoramiento. Por tal motivo, el objetivo del trabajo fue identificar y analizar *in silico* el gen *TI 14-kD* de maíz y los teocintles: *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*, y su relación con el hongo fitopatógeno *Aspergillus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del material vegetal

Las especies de teocintles analizadas fueron: *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*. El maíz cónico fue colectado en la comunidad de Monte Frío, perteneciente al municipio de San Juan Tamazola, Nochistlán, Oaxaca, México.

### Extracción de ADN genómico

Para la obtención del ADN se desinfectaron 10 semillas de cada teocintle y maíz con etanol al 70 % y se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada estéril, los granos desinfectados se colocaron en cámaras húmedas, posteriormente se incubaron a una temperatura de 28 °C. Después de 8 días de germinación se extrajo el ADN genómico de los coleóptilos siguiendo el método propuesto por Keb-Llanes et al. (2002). La integridad de ADN extraído se verificó en gel de agarosa al 1 % en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE), la cantidad y calidad del ADN se verificó por espectrofotometría (Thermo Scientific, Nano Drop 2000).

### Diseño de oligonucleótido

La búsqueda de las secuencias nucleotídicas del gen *TI 14-kD* de maíz se realizó en la base de datos del GeneBank, administrada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI). El alineamiento múltiple de las secuencias EU976659, EU976629, NM\_001111591 y EU976428 mostró los sitios conservados apropiados para el diseño de los oligonucleótidos, los cuales se diseñaron con el software en línea

Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). El juego de oligonucleótidos elegido fue *TI-14kD* (Forward; 5' ACCAAGAAATCCATCGAGAGGC 3' y Reverse; 5' ATTGTTCCGGATGAACGATCC 3'). Finalmente se enviaron a sintetizar a la empresa T4 Oligo.

### Reacción en cadena de la polimerasa

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un kit comercial (goTaq® Green Master Mix 2X, Promega). Los oligonucleótidos fueron ajustados a una concentración final de 2 µM µL<sup>-1</sup>, mientras que el ADN genómico se ajustó a una concentración final de 6 ng µL<sup>-1</sup>. El termociclador (Techne® Prime) se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, 30 ciclos; con desnaturalización de 94 °C por 2 min, alineamiento de 58 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 43 s; extensión final a 72 °C por 5 min y refrigeración temporal a 4°C. Como control positivo de la PCR se utilizó el gen *MAcI* (5' GTGACAATGGCACTGGAATG 3' y 5' GACCTGACCATCAGGCATCT 3') (Baker et al., 2009). Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2 % en buffer TAE.

### Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó por gel de agarosa al 1 % en buffer TAE, utilizando el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). El amplicón purificado se cuantificó por NanoDrop y se analizó en gel de agarosa, posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su envío.

### Secuenciación y análisis *in silico* de secuencias

Los amplicones del gen *TI 14-kD* de *Zea diploperennis* y maíz fueron enviados al Instituto de Biotecnología (IBt)–UNAM para su secuenciación mediante el método de Sanger. En el análisis *in silico* de las secuencias se utilizó la herramienta BLAST y needle (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) para cotejar las secuencias recuperadas con la herramienta básica de búsqueda de alineación local

(BLAST), se consideraron en el análisis las secuencias con un valor E de 0.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción de ADN genómico

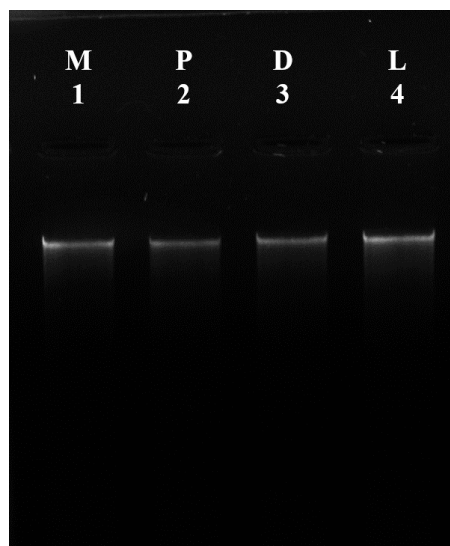
El rendimiento en concentración de ADN genómico de los teocintles y el maíz se encontró entre 200 a 500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  mientras que el índice de pureza A260/280 se encontró en el rango

generalmente aceptable de 1.8 -2.0. En la **Tabla I** se puede apreciar la concentración y la pureza de cada una de las muestras obtenidas.

La integridad del ADN se verificó en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE. En la **Figura I**, carril 1 se observa la integridad del ADN de la muestra de maíz (M), en el carril 2, la muestra de *ssp. parviglumis* (P), en el carril 3, la muestra de *Zea diploperennis* (D), en el carril 4, la muestra de *Zea luxurians* (L).

**Tabla I.** Concentración de ADN genómico de maíz y teocintles.

| No. Muestra | Especie                                        | Concentración<br>(ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) | A260/280 |
|-------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|
| 1           | <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> (maíz cónico) | 367.4                                     | 1.90     |
| 2           | <i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i>        | 494.1                                     | 1.87     |
| 3           | <i>Zea diploperennis</i>                       | 290.0                                     | 1.90     |
| 4           | <i>Zea luxurians</i>                           | 293.1                                     | 1.98     |



**Figura I.** Integridad de ADN genómico. ADNg de maíz (M), *ssp. parviglumis* (P), *Zea diploperennis* (D) y *Zea luxurians* (L) en gel de agarosa al 1 %.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la **Figura 2** se observa el marcador de peso molecular (MP) (100 bp DNA Ladder, Promega) en el primer carril, seguido del amplicón de *ssp. parviglumis*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians* en los carriles 3-5 respectivamente, en los carriles 6 y 7 se observan los amplicones de los controles negativo y positivo (gen de actina *MAcI*). El tamaño de los amplicones de PCR del maíz, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians* corresponde con el tamaño esperado de 617 pb aproximadamente, mientras que en *ssp. parviglumis* el juego de oligonucleótidos no favoreció la amplificación del gen.

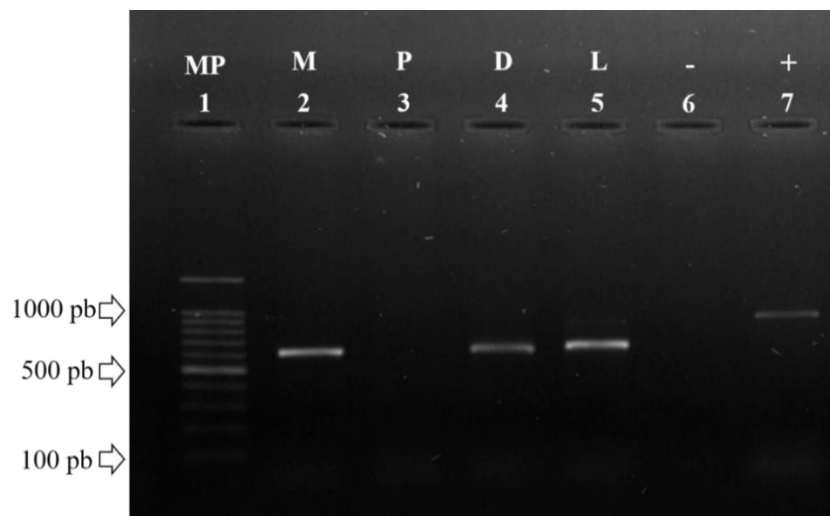
### Secuenciación y análisis *in-silico* de secuencias

Los amplicones purificados de maíz y *Zea diploperennis* fueron secuenciados, los nombres asignados para las secuencias fueron: TI-I4M para el maíz cónico y para *Zea diploperennis* fue TI-I4D. Las dos secuencias nucleotídicas obtenidas fueron depositadas en el NCBI: el número de acceso asignado para TI-I4M fue MZ458531 y para TI-I4D fue MZ458532.

Adicionalmente, las secuencias fueron alineadas por separado en la base de información NCBI utilizando la herramienta BLAST. MZ458531

presenta una identidad del 99.65 %, cobertura de 100 % y valor E= 0.0 con secuencias de Maíz con número de acceso BT087963, DQ244553, BT016288, AY105998 y NM\_001111591.1; mientras que con las secuencias EU976659, EU976629, NM\_001111591 y EU976428 el porcentaje de identidad fue de 99.47 %. Por su parte, con la secuencia X54064.1 comparte una identidad del 99.29 %, la cobertura es del 100 % y valor E = 0.0.

Respecto a secuencias de teocintles, la *ssp. parviglumis* presentó una identidad del 99.65 % - 93.85 %, una cobertura de 100 % y un valor E= 0.0 con secuencias de los siguientes números de acceso; DQ147254, DQ147268, EU724290..EU724364, dichas secuencias están anotadas como Inhibidor de la Tripsina (*TI14-kD*) e Inhibidor del Factor Hageman (*hag*). Con la secuencia DQ147270 de *Zea diploperennis* presentó una identidad del 94.02 %, cobertura de 100 % y un valor E = 0.0, sin embargo, con las secuencias DQ147271, DQ147273, EU724350 y DQ147276 compartieron una identidad del 98.75-98.54 %, cobertura de 100 % y valor E= 0.0, registradas como Inhibidor del Factor Hageman (*hag*).



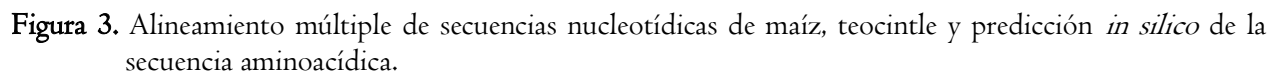
**Figura 2.** Amplificación del gen *TI14-kD* en maíz y teocintles. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso (MP); carril 2, amplicón de maíz, carril 3 al 5: amplicones de *ssp. parviglumis*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians* respectivamente; carril 6 y 7 control negativo y positivo.

La secuencia MZ458532 se alineó con el 94.76 – 94.44 % de identidad con las secuencias de maíz; EU724353, EU724353, EU976629, BT016288, NM\_001111591, AY105998 y EU976428, la cobertura fue del 100 % y valor E = 0.0. Con secuencias de *Zea diploperennis*, compartió una identidad del 98.99 – 97.69 %, una cobertura del 100 % y un valor E = 0.0, mientras que con la secuencia DQ147273 compartió una identidad de 99.00 % y una cobertura de 97.84 %. Con respecto a secuencias de spp. *parviglumis*, DQ147254..DQ147268, EU724290..EU724364 tiene una identidad del 97.98-94.11 %, una cobertura de 100 % y un valor E = 0.0.

También se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de maíz cónico (MZ458531), *Zea diploperennis* (MZ458532) y la secuencia de referencia de maíz (EU976659.1) con el programa BioEdit, la traducción a aminoácidos de la región codificante se realizó al código de una letra. Se puede observar que las secuencias MZ458531 y MZ458532 tienen una longitud parcial de nucleótidos de 569 y 592 pb respectivamente, mientras que la secuencia nucleotídica completa del gen de referencia tiene una longitud de 694 pb (**Figura 3**). La secuencia de referencia contiene un único exón al igual que las secuencias MZ458531 y MZ458532. En la secuencia de maíz cónico se observaron dos cambios en las secuencias de aminoácidos; en el aminoácido 7, cisteína (C) por una serina (S) y en el aminoácido 143, triptófano (W) por una citocina (C); mientras que en *Zea diploperennis* se observó un cambio en el aminoácido 95, valina (V) por adenina (A) respecto a la secuencia de referencia.

Las plantas utilizan a los inhibidores de las proteasas entre ellas el inhibidor de la tripsina para su protección contra depredadores e infecciones causadas por fitopatógenos, (Jain et al., 2022; Gutiérrez-Gongora & Geddes-McAlister, 2021; Pesoti et al., 2015). La proteína TI de 14 kDa de maíz es una proteína bifuncional reportada para la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus*, causante de la pudrición de mazorca y contaminación de aflatoxinas en granos (Behnke et al., 1998; Chen et al., 1998); la sobreexpresión de *TI* 14-kDa en *Escherichia coli* confirmó la inhibición del crecimiento de hifas y la germinación de conidios en *A. flavus* y otros hongos productores de micotoxinas (Baker et al., 2009; Chen et al., 1999). En trigo, también se ha registrado inhibición *in vitro* contra varios hongos, entre ellos *Botrytis cinerea* (Xie et al., 2021; Chilosi et al., 2000), además de otros cereales (Sagu et al., 2021), en leguminosas (García et al., 2004;), cacao (do Amaral et al., 2022) y papa (Wang et al., 2023). Estas proteínas bifuncionales tienen un importante papel fisiológico en la regulación de la  $\alpha$ -amilasa endógena (Hellinger & Gruber, 2019), tienen además una alta especificidad por las amilasas de insectos (Divekar et al., 2022).

En este trabajo identificamos el gen *TI* 14-kD, en maíz cónico y en los teocintles: *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*. Este gen es de interés en la resistencia a la infección por *Aspergillus* (Brown et al., 2010), el cual afecta la producción del cultivo, la salud humana y animal por la contaminación de aflatoxinas en el grano (Udomkun et al., 2017). Hasta el momento no se han reportados trabajos sobre el gen *TI* 14-kD o sobre la proteína en razas nativas ni en teocintles, ya que las investigaciones se han desarrollado en líneas endogámicas no mexicanas.



El análisis *in silico* tiene múltiples aplicaciones para identificar un gran número de moléculas, compuestos y estructuras génicas en plantas (Riyaphan et al., 2021; Jiang et al., 2020). El análisis de nuestras secuencias nucleotídicas evidenció el único exón característico del gen *TI* en maíz y *Zea diploperennis*. Por otra parte, el análisis de la traducción de las secuencias nucleotídicas a aminoácidas mostró dos cambios de aminoácidos en la secuencia de maíz y uno en *Zea diploperennis* respecto a la secuencia de referencia. Está documentado que la sustitución del residuo 34 en el inhibidor de la tripsina anula la actividad inhibidora (Hamad et al., 2017), sin embargo, se desconoce el efecto biológico de los cambios de aminoácidos en nuestras secuencias.

Se ha planteado que, durante la domesticación, el maíz perdió características agronómicas importantes (Wright et al., 2005) que podrían favorecer la adaptación al cambio climático (Pourkheirandish et al., 2020; Ortiz, 2015) como el trigo y el arroz cuyas características agronómicas deseables se han recuperado a partir de sus progenitores silvestres (Cakmak et al., 2004). Por su parte, los teocintles pueden servir como donadores de genes de resistencia a diversos tipos de estrés (Sahoo et al., 2021; Adhikari et al., 2021), dentro de estos, el gen *TI* 14-kD que juega un papel importante en la defensa ante la infección causada por *Aspergillus*.

## CONCLUSIONES

Se identificó el gen *TI* 14 kD en *Zea luxurians*, maíz cónico y *Zea diploperennis*; los dos últimos se secuenciaron y depositaron en el banco de genes del NCBI. El gen del inhibidor de la tripsina se encuentra conservado en el maíz y en *Zea diploperennis*, la predicción de las secuencias aminoácidas mostró pocos cambios en ambas secuencias, sin embargo, se desconoce si estos cambios afectan la actividad de la proteína. Evaluar los niveles de expresión génica permitirá comprender la importancia de este gen en la defensa natural de los teocintles ante la infección por *Aspergillus*. El cambio climático plantea

nuevos retos en la producción del maíz y en la interacción cultivo-fitopatógeno, por lo cual, los teocintles son un recurso genético para su mejoramiento, como se ha realizado en otros cultivos con sus parientes silvestres.

## AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Flavio Aragón Cuevas, Investigador en Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Oaxaca, México) por proporcionar las semillas de los teocintles que se utilizaron en este estudio.

## REFERENCIAS

- Adhikari, S., Joshi, A., Kumar, A., & Singh, N. K. (2021). Diversification of maize (*Zea mays* L.) through teosinte (*Zea mays* subsp. *parviglumis* Ilitis & Doebley) allelic. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(7), 2983–2995. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01170-z>
- Baisakh, N., Da Silva, E.A., Pradhan, A. K. & Rajasekaran, K. (2023). Comprehensive meta-analysis of QTL and gene expression studies identify candidate genes associated with *Aspergillus flavus* resistance in maize. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1214907>
- Baker, R.L., Brown, R.L., Chen, Z.-Y., Cleveland, T.E. & Fakhoury, A.M. (2009). A maize Trypsin Inhibitor (ZmTIp) with limited activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 72(1), 185–188. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.1.185>
- Behnke, C.A., Yee, V.C., Trong, I.L., Pedersen, L.C., Stenkamp, R.E., Kim, S.-S., Reeck, G.R. & Teller, D.C. (1998). Structural determinants of the bifunctional corn Hageman Factor Inhibitor: X-ray crystal structure at 1.95 Å resolution. *Biochemistry*, 37(44), 15277–15288. <https://doi.org/10.1021/bi9812266>

- 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>
- Cakmak, I., Torun, A., Millet, E., Feldman, M., Fahima, T., Korol, A., Nevo, E., Braun, H. J., & Özkan, H. (2004). *Triticum dicoccoides*: An important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7), 1047–1054. <https://doi.org/10.1080/00380768.2004.10408573>
- Castano-Duque, L., Gilbert, M.K., Mack, B.M., Lebar, M.D., Carter-Wientjes, C.H., Sickler, C.M., Cary, J.W. & Rajasekaran, K. (2021). Flavonoids modulate the accumulation of toxins from *Aspergillus flavus* in maize kernels. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.761446>
- Chang, P.-K. (2009). Aflatoxin Biosynthesis and Sclerotial Development in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In: *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, 77–92. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00725-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00725-5_6)
- Chen, Q., Samayoa, L. F., Yang, C. J., Bradbury, P. J., Olukolu, B. A., Neumeyer, M. A., Romay, M. C., Sun, Q., Lorant, A., Buckler, E. S., Ross-Ibarra, J., Holland, J. B., & Doebley, J. F. (2020). The genetic architecture of the maize progenitor, teosinte, and how it was altered during maize domestication. *PLOS Genetics*, 16(5), e1008791. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008791>
- 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(9), 938–945. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.9.938>
- Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2002). Identification of Unique or Elevated Levels of Kernel Proteins in Aflatoxin-Resistant Maize Genotypes Through Proteome Analysis. *Phytopathology*, 92(10), 1084–1094. <https://doi.org/10.1094/phyto.2002.92.10.1084>
- Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Lax, A. R., Guo, B. Z., Cleveland, T. E., & Russin, J. S. (1998). Resistance to *Aspergillus flavus* in Corn Kernels Is Associated with a 14-kDa Protein. *Phytopathology*, 88(4), 276–281. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.4.276>
- Chen, Z.Y., Brown, R.L., Lax, A.R., Cleveland, T.E. & Russin, J. S. (1999). Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1320–1324. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1320-1324.1999>
- Chilosi, G., Caruso, C., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Buzi, A., Nobile, M., Magro, P. & Buonocore, V. (2000). Antifungal activity of a Bowman–Birk-type Trypsin Inhibitor from wheat Kernel. *Journal of Phytopathology*, 148(7–8), 477–481. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00527.x>
- Chiu, T., Poucet, T. & Li, Y. (2022). The potential of plant proteins as antifungal agents for agricultural applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7(4), 1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.06.009>
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2021). Teocintles. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/teocintles>
- Cui, Y., Xiao, X., Wang, M., Zhu, M., Yuyama, N., Zheng, J., Xiong, C., Liu, J., Wang, S., Yang, Y., Chen, J., & Cai, H. (2024). The construction of a maize-teosinte introgression population and quantitative trait loci analysis

- of their 21 agronomic traits. *Plant Science*, 348, 112226. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112226>
- Divekar, P.A., Rani, V., Majumder, S., Karkute, S.G., Molla, K.A., Pandey, K.K., Behera, T.K. & Govindharaj, G.P.P. (2022). Protease inhibitors: an induced plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(10), 6057–6073. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10767-2>
- do Amaral, M., Freitas, A.C.O., Santos, A.S., dos Santos, E.C., Ferreira, M.M., da Silva Gesteira, A., Gramacho, K.P., Marinho-Prado, J.S. & Pirovani, C.P. (2022). TcTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from cocoa associated with defense against pathogens. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04700-y>
- Feng, X., Xiong, H., Zheng, D., Xin, X., Zhang, X., Wang, Q., ... & Lu, Y. (2022). Identification of *Fusarium verticillioides* resistance alleles in three maize populations with teosinte gene introgression. *Frontiers in Plant Science*, 13, 942397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942397>
- Flint-Garcia, S. A. (2013). Genetics and Consequences of Crop Domestication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8267–8276. <https://doi.org/10.1021/jf305511d>
- García, V.A., Freire, M. das G.M., Novello, J.C., Marangoni, S. & Macedo, M.L.R. (2004). Trypsin Inhibitor from *Poecilanthe parviflora* Seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal*, 23(5), 343–350. <https://doi.org/10.1023/b:jopc.0000032654.67733.d5>
- Gutiérrez-Gongora, D. & Geddes-McAlister, J. (2021). From naturally-sourced protease inhibitors to new treatments for fungal infections. *Journal of Fungi*, 7(12), 1016. <https://doi.org/10.3390/jof7121016>
- Hamad, B.K., Pathak, M., Manna, R., Fischer, P.M., Emsley, J. & Dekker, L.V. (2017). Assessment of the protein interaction between coagulation factor XII and corn trypsin inhibitor by molecular docking and biochemical validation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(9), 1818–1828. <https://doi.org/10.1111/jth.13773>
- Han, G., Li, C., Xiang, F., Zhao, Q., Zhao, Y., Cai, R., Cheng, B., Wang, X. & Tao, F. (2020). Genome-wide association study leads to novel genetic insights into resistance to *Aspergillus flavus* in maize kernels. *BMC Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02404-5>
- Han, Y., Taylor, E.B. & Luthe, D. (2021). Maize Endochitinase expression in response to fall armyworm herbivory. *Journal of Chemical Ecology*, 47(7), 689–706. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01284-9>
- Hellinger, R. & Gruber, C. W. (2019). Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1877–1889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.026>
- Jain, M., Amera, G.M., Muthukumaran, J. & Singh, A.K. (2022). Insights into biological role of plant defense proteins: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 40, 102293. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102293>
- Jiang, C., Wang, L., Shao, J., Jing, H., Ye, X., Jiang, C., Wang, H. & Ma, C. (2020). Screening and identifying of  $\alpha$ -amylase inhibitors from medicine food homology plants: Insights from computational analysis and experimental studies. *Journal of Food Biochemistry*, 44(12). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13536>
- Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B., & Infante, D. (2002). A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(3), 299–299. <https://doi.org/10.1007/bf02782465>
- 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>
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez G.J., Buckler, E. & Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6080–6084.
- Mishra, U.N., Reddy, M.V. & Prasad, D.T. (2020). Plant serine protease inhibitor (SPI): A potent player with bactericidal, fungicidal, nematocidal and antiviral properties. *International Journal of Chemical Studies*, 8(1), 2985–2993. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1.at.8724>
- Montes, G. N., Reyes, M. C. A., Montes, R. N., & Cantu, A. M. A. (2009). Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *CyTA - Journal of Food*, 7(2), 119–125. <https://doi.org/10.1080/19476330902940432>
- Ortega-Beltran, A. & Cotty, P.J. (2020). Influence of wounding and temperature on resistance of maize landraces from Mexico to aflatoxin contamination. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572264>
- Ortega-Beltran, A., Jaime, R. & Cotty, P.J. (2021). Resistance of maize landraces from Mexico to aflatoxin contamination: influence of aflatoxin-producing fungi genotype and length of incubation. *European Journal of Plant Pathology*, 162(1), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02385-7>
- Ortiz, R. (2015). *The Importance of Crop Wild Relatives, Diversity, and Genetic Potential for Adaptation to Abiotic Stress-Prone Environments*. Chapter 5, Wiley online library. 80–87 pp. <https://doi.org/10.1002/9781118854396.ch5>
- Pesoti, A.R., Oliveira, B.M.D., Oliveira, A.C.D., Pompeu, D.G., Gonçalves, D.B., Marangoni, S., ... & Granjeiro, P.A. (2015). Extraction, purification and characterization of inhibitor of trypsin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Science and Technology*, 35, 588–597. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6655>
- Pourkheirandish, M., Golicz, A. A., Bhalla, P. L., & Singh, M. B. (2020). Global Role of Crop Genomics in the Face of Climate Change. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00922>
- Ramos-Girona, A. J., Marín Sillué, S., Molino Gahete, F., Vila Donat, P., & Sanchis Almenar, V. (2020). Las micotoxinas: el enemigo silencioso. *Arbor*, 196(795), 540. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1004>
- Riyaphan, J., Pham, D.-C., Leong, M.K. & Weng, C.-F. (2021). *In silico* approaches to identify polyphenol compounds as  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitors against Type-II Diabetes. *Biomolecules*, 11(12), 1877. <https://doi.org/10.3390/biom11121877>
- Sagu, S.T., Landgräber, E., Henkel, I.M., Huschek, G., Homann, T., Bußler, S., ... & Rawel, H. (2021). Effect of cereal  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitors on developmental characteristics and abundance of digestive enzymes of mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.). *Insects*, 12(5), 454. <https://doi.org/10.3390/insects12050454>
- Sahoo, S., Adhikari, S., Joshi, A., & Singh, N. K. (2021). Use of Wild Progenitor Teosinte in Maize (*Zea mays* subsp. *mays*) Improvement: Present Status and Future Prospects. *Tropical Plant Biology*, 14(2), 156–179. <https://doi.org/10.1007/s12042-021-09288-1>
- Sánchez-González, J. de J., Ruiz Corral, J. A., García, G. M., Ojeda, G. R., Larios, L. D. la C., Holland, J. B., Medrano, R. M., & García Romero, G. E. (2018). Ecogeography of teosinte. *PLOS ONE*, 13(2), e0192676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192676>
- Tiffin, P. (2004). Comparative evolutionary histories of chitinase genes in the genus *Zea* and family *Poaceae*. *Genetics*, 167(3), 1331–1340.

- <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026856>
- Udomkun, P., Wiredu, A. N., Nagle, M., Müller, J., Vanlauwe, B., & Bandyopadhyay, R. (2017). Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review. *Food*, 76, 127-138. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.01.008
- Varapizuela-Sánchez, C.F., Sánchez-Medina, M.A., Pina-Canseco, M.D.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 de Zulia*, 39(4). [https://doi.org/10.47280/revfacagron\(luz\).v39.n4.01](https://doi.org/10.47280/revfacagron(luz).v39.n4.01)
- Vásquez-Luis, P., del Socorro Pina-Canseco, M., Pérez-Santiago, A.D., Matías-Pérez, D., García-Montalvo, I.A., Hernández-Morales, J.L. & Sánchez-Medina, M.A. (2023). Expresión del gen antifúngico *zeamatina* en coleóptilos de maíz arrocillo ante infección por *Aspergillus*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 10(2), 68-77. <https://doi.org/10.60158/rma.v10i2.401>
- Wang, B., Wang, Y., He, W., Huang, M., Yu, L., Cheng, D., ... & Chen, H. (2023). StMLPI, as a Kunitz trypsin inhibitor, enhances potato resistance and specifically expresses in vascular bundles during *Ralstonia solanacearum* infection. *The Plant Journal*, 116(5), 1342-1354. <https://doi.org/10.1111/tpj.16428>
- Wang, Q., Liao, Z., Zhu, C., Gou, X., Liu, Y., Xie, W., Wu, F., Feng, X., Xu, J., Li, J., & Lu, Y. (2022). Teosinte confers specific alleles and yield potential to maize improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(10), 3545–3562. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04199-5>
- Warburton, M. L., Tang, J. D., Windham, G. L., Hawkins, L. K., Murray, S. C., Xu, W., Boykin, D., Perkins, A., & Williams, W. P. (2015). Genome-Wide Association Mapping of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Accumulation Resistance in Maize. *Crop Science*, 55(5), 1857–1867. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.06.0424>
- Warburton, M.L., Jeffers, D., Smith, J.S., Scapim, C., Uhdre, R., Thrash, A. & Williams, W.P. (2022). Comparative analysis of multiple GWAS results identifies metabolic pathways associated with resistance to *A. flavus* infection and aflatoxin accumulation in maize. *Toxins*, 14(11), 738. <https://doi.org/10.3390/toxins14110738>
- Wright, S. I., Bi, I. V., Schroeder, S. G., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., & Gaut, B. S. (2005). The Effects of Artificial Selection on the Maize Genome. *Science*, 308(5726), 1310–1314. <https://doi.org/10.1126/science.1107891>
- Xie, Y., Ravet, K. & Pearce, S. (2021). Extensive structural variation in the Bowman-Birk inhibitor family in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07475-8>
- Zhang, X., Yang, Q., Rucker, E., Thomason, W. & Balint-Kurti, P. (2017). Fine mapping of a quantitative resistance gene for gray leaf spot of maize (*Zea mays* L.) derived from teosinte (*Z. mays* ssp. *parviglumis*). *Theoretical and Applied Genetics*, 130, 1285-1295. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2888-2>