



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**MAPA GENÉTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL MAÍZ TROPICAL
(*Zea mays* L.) ASOCIADAS CON LA RESISTENCIA A LA PLAGA DE
ALMACENAMIENTO, *Sitophilus zeamais* MOTSCH.
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

M BIOL. EXP. SILVERIO GARCÍA LARA

COMITE TUTORIAL

Director: Dr. David J. Bergvinson

Director: Dr. David M. Díaz Pontones

Asesor: Dr. J. Antonio Serratos Hernández

Asesor: Dr. Manilal William

Asesor: Dr Manuel Vázquez Arista

Asesor: Dr John T. Arnason

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE DE 2004

DEDICATORIA

A mi princesa, Lizeth.

*“A aquella airosa andaluza, que en las riberas de Cádiz,
es por lo blanca y lo hermosa, la esposa de mis cantares”.*

CREDITOS

La presente tesis es un esfuerzo de colaboración conjunta entre el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, Int.) México, la Universidad de Ottawa, Canadá, y la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

La investigación científica generada en este trabajo se realizó en los siguientes laboratorios: Lab. de Entomología, CIMMYT; Lab. de Servicio y Lab. de Genética Molecular Aplicada del Centro de Biotecnología Aplicada, CIMMYT; Lab. del Dr. Arnason, Facultad de Ciencias, Universidad de Ottawa; Lab. de Histoquímica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

La presente investigación se realizó a través del financiamiento de la “Canadian International Development Agency” (CIDA) por el proyecto titulado “Reducing postharvest Losses in Maize”, generado en colaboración entre el CIMMYT y la Universidad de Ottawa.

El financiamiento de estudios de Doctorado para el alumno Silverio García Lara fue brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca-crédito número 95352.

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, formó parte del programa de postgrados de Excelencia del CONACYT (Registro 309-0) y actualmente se encuentra en el padrón de programas del PIFOP-CONACYT (C/PFPN-2002-35-32).

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis

Dr. David J. Bergvinson

Programa de Maíz, CIMMYT, Int.

Director de Tesis

Dr. David M. Díaz Pontones

Depto. Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa

Asesor

Dr. J. Antonio Serratos Hernández

Campo Experimental Valle de México, INIFAP.

Centro de Biotecnología Aplicada, CIMMYT, Int.

Asesor

Dr. Manilal William

Centro de Biotecnología Aplicada, CIMMYT, Int.

Asesor

Dr. Manuel Vázquez Arista

Departamento de Biotecnología y Bioquímica,

CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato

Asesor

Dr. John T. Arnason

Instituto de Biología Ottawa-Carleton,

Depto. de Biología. Universidad de Ottawa

La presente tesis titulada MAPA GENÉTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL MAÍZ TROPICAL (*Zea mays* L.) ASOCIADAS CON LA RESISTENCIA A LA PLAGA DE ALMACENAMIENTO, *Sitophilus zeamais* MOTSCH. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) realizada por el alumno Silverio García Lara, bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada y aceptada por los integrantes del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa el 3 de diciembre del 2004 como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Dr. David M. Díaz Pontones

Presidente

Dr. David J. Bergvinson

Secretario

Dr. J. Antonio Serratos Hernández

Vocal

Dr. Manuel Vázquez Arista

Vocal

Dr. John T. Arnason

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco profundamente al director de esta tesis Dr. David J. Bergvinson, por brindarme la oportunidad de realizar la investigación doctoral en CIMMYT, México y la Universidad de Ottawa en Canadá, donde tuve la experiencia valiosa de trabajar y conocer un país distinto. En estos años de convivencia he apreciado su vasta experiencia científica, confianza, dirección, ayuda, estímulo y amistad. Al co-director Dr. David Díaz Pontones por su excelente disposición para iniciar este trabajo y colaborar nuevamente juntos. De manera especial al Dr. John T. Arnason por hacer posible mi estancia en Canadá y por sus invaluable contribuciones al proyecto de Doctorado. Gracias Dr. Arnason, por todo el apoyo, la amistad y la camarería que me brindó durante mi estancia en su laboratorio y por mostrarme cual hermoso es su país. A mis asesores Dr. Antonio Serratos, Dr. Manilal William, Dr. Manuel Vázquez por sus enriquecedoras aportaciones a este trabajo, por su valioso tiempo y su admirable disposición. A todos ellos, gracias por poner a mi alcance toda su tradición y experiencia científica. A Al Ramputh por su generosa amistad y ayuda durante mi aprendizaje de técnicas de extracción de ácidos fenólicos y análisis por HPLC. A mi amigo y entrañable colaborador Andrew Burt con quien he compartido no solo la investigación, sino también momentos agradables en Canadá y México al lado de Zoë y Sofía. Gracias por compartir. Estoy en deuda con Eloisa Carrillo, secretaria del programa de maíz, de quien recibí en todo momento apoyo y ayuda. Te agradezco tu amistad, colaboración, entusiasmo y optimismo. A los integrantes de los siguientes laboratorios donde tuve la fortuna de trabajar, aprender y convivir. A todos ellos mi mas sincero aprecio. Lab. de Entomología, Froylan Meraz, Emiliano Guitierrez, Nazario Balderas, Crecencio Canto, Miguel Rivas, MC. Sergio Amacende, Andrés Molar y Mario Gómez; Lab. de Servicio del ABC, Margarita Crosby y Basiliza Luna; Lab. de Genética Molecular Aplicada, Sofía Ortiz, Virginia García, Enrique Balderas; Lab. de Histoquímica, Mtra. Elvira Gonzalez y Citlalli Moreno; Lab. del Dr. Arnason, Ian Scott, Sam Omar, Antoine Bily, John Livesey y Dr. Bernard Philogene. A la Dra. Mirelle Khairallah por su guía y apoyo en el mapa genómico y a Mateo Vargas por sus lecciones y asesoramiento en el análisis de QTLs. Al Dr. Philippe Monneveux por el resumen en Frances.

Finalmente a mi esposa Sofía y a mi familia quienes siempre estuvieron cerca de mi. Gracias por toda su paciencia y apoyo en los tiempos difíciles. A ustedes les brindo todo mi esfuerzo.

INDICE GENERAL

Indice General	I
Indice de Figuras	V
Indice de Tablas	VI
Abreviaturas	IX
Resumen	XI
Abstract	XII
Résumé	XIII
Declaración Legal	XIV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1 Importancia Actual del Maíz	2
2.2 Sistema Grano de Maíz- <i>Sitophilus zeamais</i>	3
2.3 Ciclo de vida de <i>S. zeamais</i>	4
2.4 Desarrollo de Plantas Resistentes	7
2.5 Fuentes de Germoplasma Resistente	7
2.5.1 Variedades Modernas	7
2.5.2 Métodos de Evaluación de la Resistencia	10
2.6 Mecanismos de Defensa Natural	10
2.7 Bases de la Resistencia	11
2.7.1 Características Biofísicas	11
2.7.2 Características Bioquímicas	12
2.7.2.1 Amidas Aromáticas	12
2.7.2.2 Acidos Fenólicos	12
2.7.3 Fortalecimiento de la Pared Celular del Pericarpio	14
2.7.4 Modelo de la Pared Celular del Pericarpio	15
2.7.5 Proteínas en la Resistencia	15
2.8 Aspectos Genéticos de la Resistencia	18
2.9 Alcances Biotecnológicos	18
2.9.1 Marcadores Moleculares	18
2.9.2 Plantas Transgénicas	19

3. Justificación	20
4. Objetivos	22
5. Metodología	
5.1 Genotipos de Maíz	23
5.2 Condiciones y Medio de Cultivo para <i>Sitophilus zeamais</i>	23
5.3 Establecimiento y Cría de Colonias de <i>Sitophilus zeamais</i>	24
5.4 Evaluación de Parámetros de Susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i>	24
5.5 Determinación de Parámetros Físicos	25
5.5.1 Dureza del grano	25
5.5.2 Características del Grano	26
5.5.3 Pruebas de Germinación	26
5.6 Bases Bioquímicas de la Resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i>	27
5.6.1 Obtención de Fracciones Enriquecidas	27
5.6.2 Extracción de Acidos Fenólicos	27
5.6.3 Análisis por HPLC Fase Reversa en Beckman	27
5.6.4 Análisis por HPLC Fase Reversa en Hewlett-Packard	28
5.6.5 Extracción y Cuantificación de Amidas Aromáticas	29
5.6.6 Extracción y Cuantificación de Proteínas Ricas en Hidroxiprolina	29
5.6.7 Extracción y Cuantificación de la Actividad de Peroxidasa	30
5.6.8 Localización Histoquímica de la Peroxidasa de Maíz	30
5.7 Desarrollo de la Población para Cartografía Genética	31
5.7.1 Selección de Líneas y Desarrollo de Cruzas.	31
5.7.2 Evaluación y Selección de Cruzas	31
5.7.3 Diseño Experimental en Campo de la Población para Cartografía	32
5.8 Bases Genómicas de la Resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i>	32
5.8.1 Obtención del Material Genómico y Calidad de DNA	32
5.8.1.1 Cosecha de Tejido Foliar.	32
5.8.1.2 Aislamiento del ADN Genómico	33
5.8.1.3 Cuantificación y Control de Calidad del DNA	34
5.8.1.4 Prueba de la Digestibilidad del DNA	35
5.8.1.5 Electroforesis en Gel de Agarosa	35

5.8.2 Ensayos con RFLPs	35
5.8.3 Ensayos con SSRs	36
5.8.3.1 Electroforésis en Gel de Agarosa para SSRs	36
5.8.4 Generación y Diseño del Croquis Molecular	36
5.8.4.1 Captura y Análisis de Datos Genotípicos de RFLPs y SSRs	36
5.8.4.2 Construcción del Cartograma	37
5.8.4.3 Datos fenotípicos	37
5.8.4.3 Determinación de QTLs de Susceptibilidad y Resistencia	38
6. Resultados	
6.1 Bases Bioquímicas de la Resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i>	40
6.1.1 Componentes de la Pared Celular del Pericarpio	40
6.1.1.1 Parámetros de Susceptibilidad	40
6.1.1.2 Ácidos Fenólicos, Parámetros Bioquímicos y Biofísicos	40
6.1.1.3 Relación entre los Factores de Susceptibilidad y Resistencia	45
6.1.2 Funciones de la Peroxidasa del Grano de Maíz	49
6.1.2.1 Datos de Bioensayo y Viabilidad	49
6.1.2.2 Actividad de Peroxidasa	49
6.1.2.3 Relación entre el Bioensayo y la Viabilidad con Peroxidasa	52
6.1.2.4 Localización Estructural de la Peroxidasa	52
6.2 Bases Genómicas de la Resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i>	56
6.2.1 Cartografía de QTLs asociados con la Susceptibilidad a <i>S. zeamais</i>	56
6.2.1.1 Mapa de Marcadores Moleculares	56
6.2.1.2 Análisis de Parámetros de Susceptibilidad	56
6.2.1.3 Análisis de QTLs para Parámetros de Susceptibilidad	59
6.2.1.4 Factores Biofísicos de Resistencia	65
6.2.1.5 Regiones Genómicas Comunes	65
6.2.2 Mapeo Genético de los Mecanismos de Resistencia contra <i>S. zeamais</i>	68
6.2.2.1 Mapa de Marcadores Moleculares	68
6.2.2.2 Análisis de Parámetros Fitoquímicos y Propiedades Relacionadas	68
6.2.2.3 Relación entre los Parámetros de Susceptibilidad vs. Resistencia	71
6.2.2.4 Análisis de QTLs para Factores Fitoquímicos	71

6.2.2.5 Regiones Genómicas Comunes para Componentes Fitoquímicos	81
7. Discusión	
7.1 Bases Bioquímicas de la Resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i>	84
7.1.1 Componentes de la Pared Celular del Pericarpio	84
7.1.2 Funciones de la Peroxidasa del Grano de Maíz	86
7.2 Bases Genómicas de la Resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i>	89
7.2.1 Cartografía de QTLs asociados con la Susceptibilidad a <i>S. zeamais</i>	89
7.2.2 Mapeo Genético de los Mecanismos de Resistencia contra <i>S. zeamais</i>	93
7.2.3 Eficiencia de la Selección Asistida por Marcadores Moleculares	96
8. Conclusiones	98
8.1 Principales Conclusiones	98
8.2 Perspectivas	99
9. Contribuciones	100
10. Bibliografía	104
APENDICE	117

INDICE DE FIGURAS

2.1	Estructura del grano de maíz: corte longitudinal (X30).	4
2.2	Ciclo de vida de <i>Sitophilus zeamais</i> en el grano de maíz.	6
2.3	Proceso de desarrollo y liberación de variedades de maíz resistente a plagas de almacén	8
2.4	Estructura de los metabolitos secundarios implicados en la resistencia de maíz a la plaga de almacén <i>Sitophilus zeamais</i> (Motsch).	13
2.5	Vía metabólica y subcelular de la producción de diferuloil-polisacáridos en cultivos celulares de maíz	16
2.6	Modelo de la pared celular del pericarpio de maíz señalando las uniones entre ácidos fenólicos, carbohidratos y proteínas.	17
6.1	Localización de la actividad de peroxidasa en secciones del grano de maíz teñido con guayacol y H ₂ O ₂ .	55
6.2	Mapa Genómico combinado de RFLPs y SSRs construido a partir de 163 familias F ₂ a partir de la cruza CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.	67
6.3	Mapa Genómico combinado de RFLPs y SSRs construido a partir de 163 familias F ₂ a partir de la cruza CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. Se muestran las posiciones de QTLs para los componentes de la pared celular del pericarpio, amidas y respuesta a <i>Sitophilus zeamais</i> .	83

INDICE DE TABLAS

2.1	Germoplasma de maíz identificado con resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i> .	9
2.2	Mecanismos y bases de la resistencia en maíz a <i>Sitophilus zeamais</i>	11
6.1.1	Parámetros de susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i> bajo infestaciones artificiales en nueve genotipos de maíz. Datos combinados de 1999 y 2000.	41
6.1.2	Contenido de ácidos fenólicos adheridos a la pared celular del pericarpio de nueve genotipos de maíz. Datos de 1999 y 2000.	42
6.1.3	Parámetros bioquímicos evaluados en el grano completo y en el pericarpio de nueve genotipos de maíz.	43
6.1.4	Promedios de las características físicas evaluadas en grano completo y pericarpio de nueve genotipos de maíz.	44
6.1.5	Correlaciones de Pearson entre los parámetros de susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i> con propiedades bioquímicas y biofísicas de nueve genotipos de maíz.	47
6.1.6	Ecuaciones de regresiones múltiples para predecir parámetros de susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i> utilizando nueve genotipos de maíz.	48
6.1.7	Datos de bioensayo y viabilidad de nueve genotipos de maíz con diferentes niveles de resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i> . Datos provenientes de una época, 2000.	50
6.1.8	Actividad de peroxidasa, total y específica, de las principales estructuras de nueve genotipos de maíz con diferentes niveles de resistencia a <i>Sitophilus zeamais</i> . Datos provenientes de una época, 2000.	51
6.1.9	Correlaciones de Pearson entre parámetros del bioensayo con <i>Sitophilus zeamais</i> y las actividades total y específica de la peroxidasa en las principales estructuras de nueve genotipos de maíz	53
6.2.1	Media y rangos de parámetros de susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i> y dureza del grano de las cuatro mejores cruas de la población 28.	57
6.2.2	Medias, estimados de los componentes de varianza y heredabilidades para los parámetros de susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i> . Valores combinados de todos los parámetros para los padres susceptible (S) y resistente (R) y las familias F _{2:3} derivadas de la crua CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.	58
6.2.3	Correlaciones fenotípicas entre los parámetros de susceptibilidad a <i>Sitophilus zeamais</i> y	60

-
- los ambientes evaluados en las familias $F_{2:3}$ generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.
- 6.2.4 Parámetros asociados con los QTL de daño en grano (GD) y pérdida de peso (GWL) 61 causados por *Sitophilus zeamais*, así como los efectos genéticos estimados a partir de datos de 163 familias $F_{2:3}$ generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.
- 6.2.5 Parámetros asociados con los QTL de índice Dobie (ID) y progenie adulta (AP) de 62 *Sitophilus zeamais*, así como los efectos genéticos estimados a partir de datos de 163 familias $F_{2:3}$ generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.
- 6.2.6 Parámetros asociados con los QTL de dureza de grano (GH) y proporción 63 pericarpio/grano (P/G) como probables componentes de la resistencia a *Sitophilus zeamais*, así como los efectos genéticos estimados a partir de datos de 163 familias $F_{2:3}$ generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.
- 6.2.7 Medias, estimados de los componentes de varianza y heredabilidades para los ácidos 69 fenólicos del pericarpio. Valores combinados para los padres susceptible (S) y resistente (R) y las familias $F_{2:3}$ derivadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0.
- 6.2.8 Medias, estimados de los componentes de varianza y heredabilidades para los ácidos 70 fenólicos totales, amidas aromáticas y proteínas en el pericarpio. Valores combinados para los padres susceptible (S), resistente (R) y en las familias $F_{2:3}$ derivadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.
- 6.2.9 Correlaciones fenotípicas y genotípicas entre los componentes de la pared celular del 72 pericarpio y amidas aromáticas con los ambientes evaluados en las familias $F_{2:3}$ originadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.
- 6.2.10 Correlaciones fenotípicas entre los componentes de la pared celular del pericarpio y 73 amidas aromáticas con los parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* y dureza de grano en las familias $F_{2:3}$ de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0.
- 6.2.11 Parámetros asociados con QTLs de los componentes de la pared celular y sus efectos 75 genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias $F_{2:3}$ de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.
- 6.2.12 Parámetros asociados con QTLs de los componentes de la pared celular y sus efectos 77 genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias $F_{2:3}$ de la cruce

CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

- 6.2.13 Parámetros asociados con QTLs de los componentes de la pared celular y amidas, así como sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias $F_{2:3}$ de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos. 79

ABREVIATURAS

AL, aleurona
AP, progenie adulta
CA, ácido coumárico
CFP, *p*-coumaroil-feruloil putrescina
CIM, cartografía de intervalo compuesto
CIMMYT, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
cM, centiMorgan
Co, coleoriza
Cx, cortex
DFP, diferuloil putrescina
DiFA, ácido diferúlico
DiFAB, ácido diferúlico forma benzofuranósida
Ed, endospermo
Em, embrión
En, endodermis
Er, raíz del embrión
FA, ácido ferúlico
GD, daño en grano
GH, dureza del grano
GM, gorgojo del maíz (MW)
GWL, pérdida de peso del grano
HRGP, gluco-proteína rica en hidroxiprolina
ID, índice Dobie
MAS, selección asistida por marcadores moleculares
MDT ó TMD, tiempo medio de desarrollo
POD, peroxidasa
Pr, pericarpio
P/G, proporción pericarpio: grano
QTL, loci de carácter o característica cuantitativa
R, resistente

RFLP, fragmentos polimórficos de longitud restringida

ROS, especies reactivas de oxígeno

R^2 , coeficiente de determinación

S, susceptible

Sc, escutelo

SSR, secuencias simples repetitivas

Vc, cilindro vascular

σ^2_p , variación fenotípica

σ^2_g , variación genotípica

Nota Aclaratoria: La mayoría de las abreviaturas utilizadas en esta tesis provienen de sus siglas en inglés.

RESUMEN

En áreas tropicales, los problemas de manejo de maíz (*Zea mays* L) en postcosecha son una limitante de seguridad alimentaria. El gorgojo de maíz (GM), *Sitophilus zeamais* (Motsch) es una plaga que causa pérdidas severas en países en desarrollo. Esta tesis examina las bases bioquímicas y genéticas de la resistencia del maíz tropical al GM. Inicialmente se investigó la función de los componentes de la pared celular del pericarpio en la resistencia al GM utilizando genotipos de maíz tropical. Los principales componentes de la pared celular asociados a la resistencia fueron ácidos fenólicos simples, diferulatos y gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina. El estudio detallado de los compuestos fenólicos indicó la presencia de ácido *trans*-ferúlico, ácido *p*-coumárico y cuatro isómeros de ácidos diferúlicos. Los componentes de enlace de la pared celular contribuyen a la resistencia contra el GM por medio del fortalecimiento de esta estructura en el pericarpio incrementado así la dureza del grano. El segundo objetivo fue investigar la función de la peroxidasa (POD) de grano en la resistencia al GM y en la viabilidad. La actividad de la POD se detectó en el embrión, endospermo y la región micropilar. La actividad en el endospermo mostró una correlación negativa con la resistencia al GM. Las actividades específicas determinadas en el embrión y la región micropilar correlacionaron con la viabilidad. La tinción histoquímica confirmó la localización de la POD en embrión y la aleurona del endospermo.

Utilizando análisis de QTLs (locus de características cuantitativas) se asoció la resistencia al GM en maíz tropical. El mapa genético fue desarrollado con la cruce CML290 (susceptible) x Muneng-8128C0HC1-18-2-1-1 (resistente) utilizando RFLPs y SSRs. Varias áreas genómicas fueron asociadas con la resistencia al GM. Estas explicaron entre el 8 y 31% de la variación genotípica. QTLs de factores fitoquímicos asociados con la resistencia al GM también se analizaron. Un promedio de diez a doce QTLs se encontró para el ácido ferúlico, ácidos diferúlicos y amidas aromáticas. Estos QTLs se localizaron a lo largo del genoma de maíz explicando entre un 25 a 47% de la variación fenotípica. Los efectos genéticos encontrados fueron principalmente dominantes y aditivos afectados por el ambiente. Estos QTLs se localizan en áreas de genes de resistencia enfermedades e insectos. Nueve regiones de QTLs fueron declaradas comunes entre los parámetros de susceptibilidad y de resistencia fitoquímica, demostrando asociaciones genéticas. Estos estudios deben considerarse en el desarrollo de maíz resistente a factores bióticos para las regiones donde las plagas de almacén son un desafío de seguridad alimentaria.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays*, L) postharvest problems in tropical areas are a constraint to food security. The maize weevil (MW), *Sitophilus zeamais* (Motsch.) is a pest that causes severe losses in developing countries. This thesis examines the biochemical and genetic bases of MW resistance in tropical maize.

First, we investigated the role of pericarp cell wall components in MW resistance in tropical maize genotypes. The principal cell wall components associated with MW resistance were simple phenolic acids, diferulates, and hydroxyproline-rich glycoproteins. A detailed analysis of phenolics indicated the presence of *trans*-ferulic acid, *p*-coumaric acid and four isomers of diferulic acids. Cell wall cross-linking components contribute to MW resistance by fortification of the pericarp cell wall as well as increase grain hardness. Our second objective was to investigate the role of peroxidases POD in maize grain resistant to the MW and seed viability. Activity was detected in the germ, the endosperm and the tip area. POD founded within the endosperm shows a negative correlation with MW resistant. Specific activities recorded in the germ and tip area show a positive and significant correlation with seed viability. Histochemical stain confirmed the POD location in the germ and the aleurone layer.

We analyzed quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to MW in tropical maize. The map was developed from the cross CML290 (susceptible) x Muneng-8128C0HC1-18-2-1-1 (resistant) using RFLP and SSR. We detected several genomic areas involved in resistance to the MW explaining between 8 to 31% of the phenotypic variance. Using the same mapping population we analyzed QTL of phytochemical factors associated with MW resistance. An average of ten QTL were founded for *trans* and *cis* FA, 8,5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, 8,5'-DiFAB, FAP, and CFP while a mean of seven QTL were determined to affect *p*-CA, 5,5'-DiFA, total FA, total DiFAs, and total phenolic acids. These QTL were dispersed across the maize genome and explaining between 25% and 47% of the phenotypic variance. Genetic effects were mainly dominant and additive. The environment affects these QTL. Cluster areas between QTL of MW with genes of disease and insect resistance were also founded. Nine regions were common between QTL of susceptibility and phytochemical, demonstrating genetic associations for MW resistance. These studies should be considered in the development of maize resistant to biotic stress for regions where storage pests are a threat to food security.

La conservation post-récolte du maïs (*Zea mays* L.) est un problème majeur pour la sécurité alimentaire en régions tropicales. Le charançon du maïs (CM), *Sitophilus zeamais* (Motsch) est un parasite qui cause des pertes importantes dans les pays en développement. Cette thèse examine les bases biochimiques et génétiques de la résistance du maïs tropical au CM. Les recherches ont d'abord concerné le rôle des composants de la paroi cellulaire du péricarpe dans la résistance au CM chez le maïs tropical. Les principaux composants de la paroi cellulaire associés à la résistance sont les acides phénoliques simples, l'acide diférulique et les glycoprotéines riches en hydroxiproline. L'étude détaillée des composés phénoliques a indiqué la présence d'acide *trans*-férulique, d'acide *p*-coumarique et de quatre isomères des acides diféruliques. Les composants de liaison de la paroi cellulaire contribuent à la résistance au CM en renforçant cette structure dans le péricarpe, accroissant ainsi la dureté du grain. Le second objectif était d'étudier le rôle des peroxydases (POD) du grain dans la résistance au CM et dans la viabilité de la graine. L'activité de la POD a été détectée dans l'embryon, l'endosperme et la région du micropyle. L'activité dans l'endosperme présente une corrélation négative avec la résistance au CM. Les activités spécifiques déterminées dans l'embryon et la région du micropyle présentent une corrélation positive et significative avec la viabilité de la graine. La coloration histochimique a confirmé la présence de POD dans l'embryon et l'aleurone de l'endosperme. Les QTL (loci des traits quantitatifs) associés à la résistance au GM en maïs tropical ont été localisés. La carte génétique du croisement CML290 (susceptible) x Muneng-8128C0HC1-18-2-1-1 (résistant) a été développée en utilisant des marqueurs RFLP et SSR. Plusieurs régions du génome ont été associées à la résistance au CM, expliquant entre 8 à 31% de la variation phénotypique. Les QTL des facteurs phytochimiques associés à la résistance au CM ont également été analysés. Une moyenne de dix à douze QTL a été trouvée pour les acides phénoliques simples, les acides diféruliques, et les amides phénoliques. Ces QTL sont répartis sur l'ensemble du génome du maïs et expliquent entre 25 et 47% de la variation. Les effets génétiques observés sont principalement dominants et additifs, et dépendent de l'environnement. Neuf régions QTL communes entre les paramètres de susceptibilité et de résistance phytochimique ont été identifiées, révélant des associations génétiques pour la résistance au CM. Ces résultats doivent être pris en compte dans le développement de maïs résistants à des stress biotiques pour les régions où les pertes en cours de stockage sont un défi pour la sécurité alimentaire.

Declaración Legal Sobre el Formato y Contenido de esta Tesis en su versión en Español

Se declara que esta tesis escrita en su versión en español esta basada en los lineamientos definidos por la Coordinación del Postgrado en Biología Experimental. En el formato de monografía no es posible colocar los artículos publicados en su formato original. Por lo tanto:

Se declara que por el tipo de formato utilizado, la INTRODUCCIÓN de esta tesis esta basada en el artículo de divulgación publicado en el año 2003 y cuya referencia se enuncia a continuación para proteger todos los derechos reservados de la Revista de Educación Bioquímica, México. El texto entre comillas indica que su procedencia es integra del artículo publicado.

García-Lara, S, Burt, A.J., Serratos J. A., Díaz-Pontones D.M., Arnason J.T. and Bergvinson D.

2003. Defensas naturales en el grano de maíz al ataque de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae): mecanismos y bases de la resistencia. REB (México) 22 (3), 138-145.

Se declara que por el tipo de formato utilizado parte de la METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIONES de esta tesis esta sustentada en una versión en español del artículo de arbitraje internacional publicado en la revista CROP SCIENCE en el año 2004 y cuya referencia se enuncia a continuación en orden de proteger todos los derechos reservados la Crop Science Society of America.

García-Lara, S., D.J. Bergvinson, A.J. Burt, A.I. Ramputh, D.M. Díaz-Pontones, and J.T. Arnason.

2004. The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance. Crop Science 44:1546-1552.

Se declara que la citación correcta de cualquiera de las secciones enunciadas previamente deberá ser acompañada de la cita original del artículo publicado. Los artículos originales se anexan en el Apéndice I.

“El maíz, *Zea mays* L., es considerado actualmente como la base de la alimentación en los países en desarrollo, sin embargo su producción y conservación esta limitada por factores bióticos como las plagas. *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) o el gorgojo del maíz es el insecto considerado como la plaga de maíz almacenado más importante a escala mundial. Se estima que genera pérdidas del 20 al 90% en áreas subtropicales y tropicales (Markham et al., 1994), afectando principalmente a los agricultores de escasos recursos. En México, la incidencia de esta plaga supera el 80% en regiones húmedas y es la primera causa de daño en postcosecha (Tigar et al., 1994). El alto costo de los insecticidas, el riesgo de contaminación del ambiente y el peligro potencial que representa su utilización ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas opciones de control en el manejo integral de esta plaga (Gudrups et al., 2001). Una alternativa ha sido el uso de variedades de maíz resistentes (Wiseman y Davis, 1990). Éste método de control es de fácil adaptación, ambientalmente seguro, económico y compatible con medidas de control biológico.

En las últimas décadas se han caracterizado variedades de maíz resistentes a *S. zeamais*. Se ha establecido que los mecanismos de resistencia en estas variedades se localizan en el pericarpio y la aleurona del endospermo. Las bases bioquímicas de estos mecanismos de resistencia se deben en parte a los niveles elevados de compuestos fenólicos que limitan la entrada del insecto al grano y disminuyen la disponibilidad de nutrientes. Los ácidos fenólicos se encuentran enlazados con los carbohidratos de la pared celular y se consideran particularmente importantes en el fortalecimiento del pericarpio. La herencia de este mecanismo ha sido establecida como poligénica con efectos maternos dominantes.

En la revisión de antecedentes se describen los mecanismos de defensa presentes en el grano de maíz contra *S. zeamais*, haciendo énfasis en las bases bioquímicas de la resistencia. Asimismo, se señala el uso de marcadores moleculares en el estudio de regiones genómicas asociadas a los mecanismos de defensa y posibilidad de incorporar genes de resistencia. Todo esto como preámbulo para definir los objetivos de la presente tesis que involucran la generación de un mapa genético de maíz tropical para la localización de regiones genéticas asociadas con la susceptibilidad y resistencia a *S. zeamais*.” (García-Lara et al., 2003).

2.1 Importancia Actual del Maíz

Originario de América, el maíz, *Zea mays* L, fue domesticado hace unos 7000 años por los pueblos americanos (Pollak y White, 1995). Esta domesticación se encuentra íntimamente ligada con el inicio de las culturas mesoamericanas (Díaz-Pontones, 2001), para las cuales no solo representó la fuente más importante de alimento, sino que fue objeto de diferentes cultos y origen de arraigadas tradiciones. Según la cultura maya, por ejemplo, el origen de la humanidad se dio a partir del maíz a través de su dios Yum Kax, al que representaban siempre como un joven sosteniendo una o varias mazorcas de maíz (Gubre, 2000).

El origen del maíz se dio entre la antigua mesoamérica (México y América Central), a partir de la cual se distribuyó por todo el continente y posteriormente al resto del mundo. Este cultivo constituye el alimento base de los países más pobres, y es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales de mayor importancia económica a nivel mundial. Con una producción global de casi 800 millones de toneladas constituye el principal alimento para la quinta parte de la humanidad y se considera el cultivo de mayor distribución del planeta.

Dado que México se considera el centro de origen y diversidad del maíz, su producción y conservación es de especial importancia para el desarrollo agrícola del país. En la última década, sin embargo, la producción nacional de maíz no ha rebasado los 20 millones de toneladas anuales, mientras que las importaciones han aumentado paulatinamente por encima de los 5 millones. Este déficit en la producción se atribuye a un complejo de factores que ha limitado la eficiencia y rendimiento en la producción del maíz. Desde el punto de vista agrícola los factores bióticos y abióticos son los de mayor importancia en este complejo. Se ha establecido que estos factores son responsables de pérdidas entre un 70 a 95% de la cosecha cuando las condiciones de cultivo y almacenamiento son deficientes. Las plagas generan bajos rendimientos durante el proceso de producción (> 10%), así como pérdidas durante el periodo de postcosecha (10-20%) (Bergvinson et al., 2004).

2.2 Sistema: Grano de Maíz-*Sitophilus zeamais*

El sistema maíz-*Sitophilus* es un ejemplo de modelo de interacción negativa planta-granívoro, el cual permite el análisis de los mecanismos naturales de defensa del maíz al proceso de colonización e infestación de este insecto. *S. zeamais* se desarrolla en el interior del grano desde la etapa de huevo hasta adulto reproductivo (Serratos, 1993).

La estructura del grano de maíz maduro o cariopsis comprende: 1) la cubierta que incluye el pericarpio y la testa (5-6%), 2) el endospermo (80-85%) que incluye la capa de aleurona (2-3%) y 3) el embrión o esporofito (10-12%) y el pedicelo o piloriza (0.8-1.1%) que es tejido inerte en que se unen el grano y el carozo (FAO, 1993) (Figura 2.1).

El desarrollo de la semilla inicia cuando el polen germina sobre el estigma y forma el tubo polínico, el cual penetra en el estilo y transporta a los dos núcleos espermáticos hacia el saco embrionario. Uno de los núcleos fecunda a la célula huevo formando el cigoto (2n). El segundo núcleo espermático se fusiona con la célula central y se une a los dos núcleos polares para formar el endospermo primario (generalmente 3n). El embrión consiste de un eje embrionario rodeado por un cotiledón denominado escutelo. Al final del eje embrionario se encuentra la plúmula, la cual formara el tallo y las hojas posteriormente. En el extremo opuesto del eje se encuentra la radícula la cual generara la raíz de la planta. El eje embrionario esta rodeado por el endospermo. En el maíz este tejido permanece hasta la madurez y representa gran parte del volumen de la semilla. El endospermo consiste de células muertas que contienen altas cantidades de almidón, proteínas y en menor proporción lípidos. La capa mas exterior del endospermo consiste de una o varias capas de células vivas denominadas aleurona y presentan numerosos cuerpos proteicos. Rodeando a estas estructuras se encuentra la testa y el pericarpio, los cuales se derivan de tejidos maternos. Estas estructuras están compuestas de células muertas con paredes celulares lignificadas, lo que representa una barrera para entrada de oxígeno, agua y ataque por agentes bióticos y abióticos externos (Hopkins, 1995).

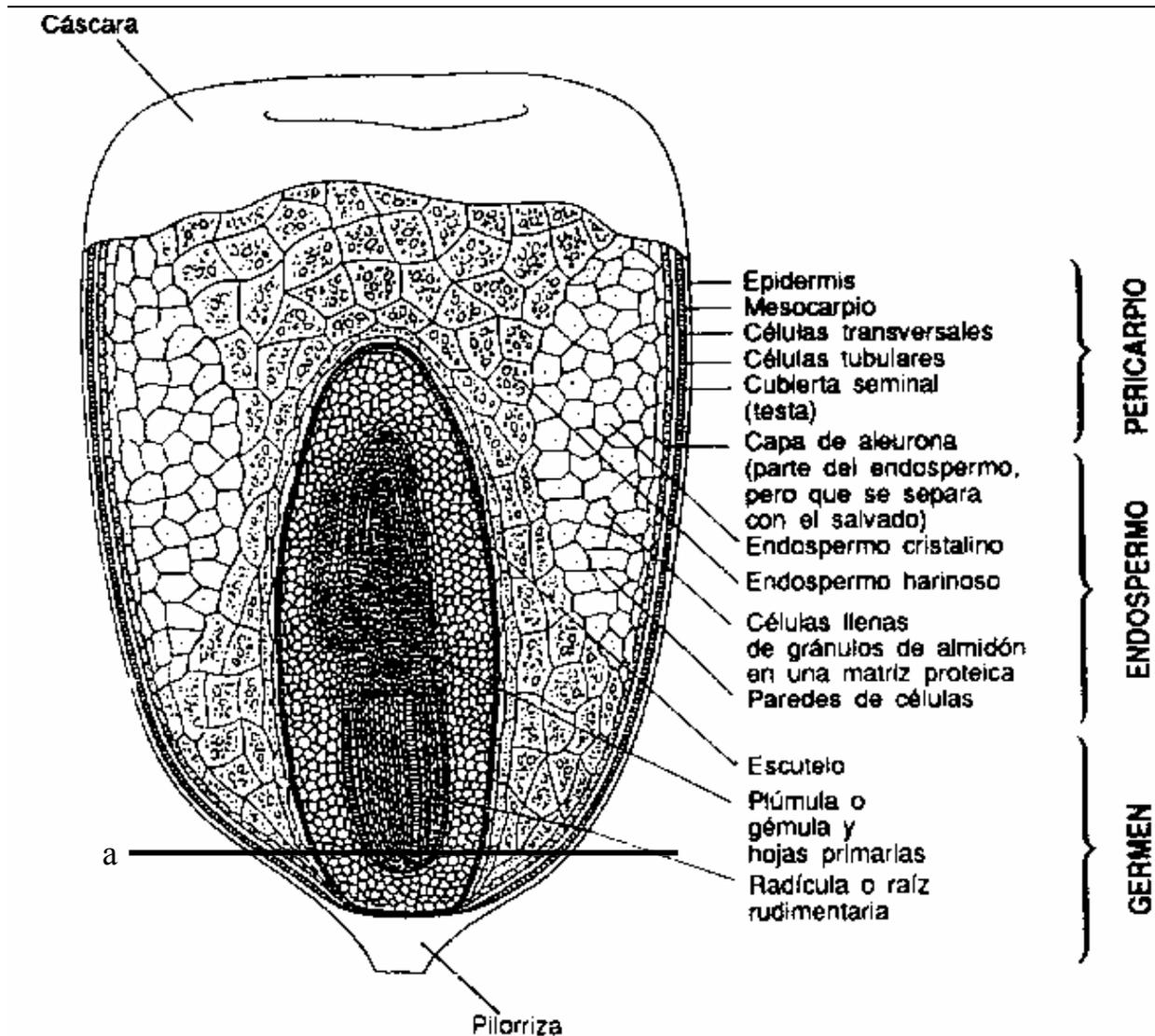


Figura 2.1 Estructura del grano de maíz: corte longitudinal (X30) (FAO, 1992). a, zona de corte para la obtención del pedicelo o región micropilar

2.3 Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais*

S. zeamais se distribuye en las zonas tropicales húmedas y templadas alrededor del mundo. Comúnmente infesta al maíz desde que éste se encuentra en el campo donde el contenido de humedad de los granos excede el 20%. El ciclo de vida de *S. zeamais* inicia cuando la hembra después de aparearse y localizar un grano, excava un hoyo por masticación y deposita un huevecillo, posteriormente secreta un mucílago que cubre a éste hasta llenar el compartimiento. Este mucílago que sostiene al huevecillo es la única evidencia del grano infestado. Los huevos pueden ser ovipositados en cualquier zona del grano, pero pocos son colocados a nivel del

embrión. Usualmente se coloca más de un huevo por grano, pero es raro que más de una larva llegue a la madurez debido al canibalismo entre ellas. Esta especie presenta cuatro estadios larvales, los cuales se desarrollan dentro del grano y duran alrededor de 20 días. El huevo eclosiona después de 6 días e inmediatamente después de que la larva emerge, se inicia el primer instar y la larva consume el alimento que le rodea dentro del grano. Al final del cuarto instar la larva utiliza una mezcla de secreciones para desplazarse y cerrar la madriguera e iniciar la forma pupal. La larva entonces asume la forma de pre-pupa y en un período corto de tiempo se convierte en pupa. (Longstaff, 1981) (Figura 2.2).

Cuando el adulto se ha desarrollado, este permanece en el grano por varios días antes de emerger. La extensión de este periodo depende de la temperatura. El ciclo de vida completo comprende de entre 36.3 y 40.3 días a 27 y 25°C respectivamente. La duración de la fase inmadura depende de las condiciones de temperatura y humedad. Se considera que el primer instar larval es el estado de mayor susceptibilidad. Durante los primeros instares larvales el consumo de oxígeno aumenta drásticamente (3 y 4 instar). Los requerimientos alimenticios durante estas etapas se resumen en amilo-pectinas, proteínas, lípidos y ciertas vitaminas. Durante la fase adulta los cambios en la temperatura fuera del intervalo de 15-30°C incrementa la mortalidad y la reducción en la humedad tiene el mismo efecto. Los adultos llegan a vivir hasta 30 semanas. La reproducción de estos insectos se considera que está en función de la densidad de población, es decir, del número de huevos que puede depositar una hembra durante su vida. Se sabe que se ajusta a una función hiperbólica y que el máximo de huevo generados por hembra en condiciones de baja densidad llega a ser de más de 50 por semana. Una hembra produce hasta 250 huevos en su vida reproductiva. La oviposición depende de factores ambientales entre los que se encuentran el sustrato, es decir, las características del grano, variaciones geográficas, densidad de población, competencia y presencia de parásitos (Dobie, 1974; Longstaff, 1981)

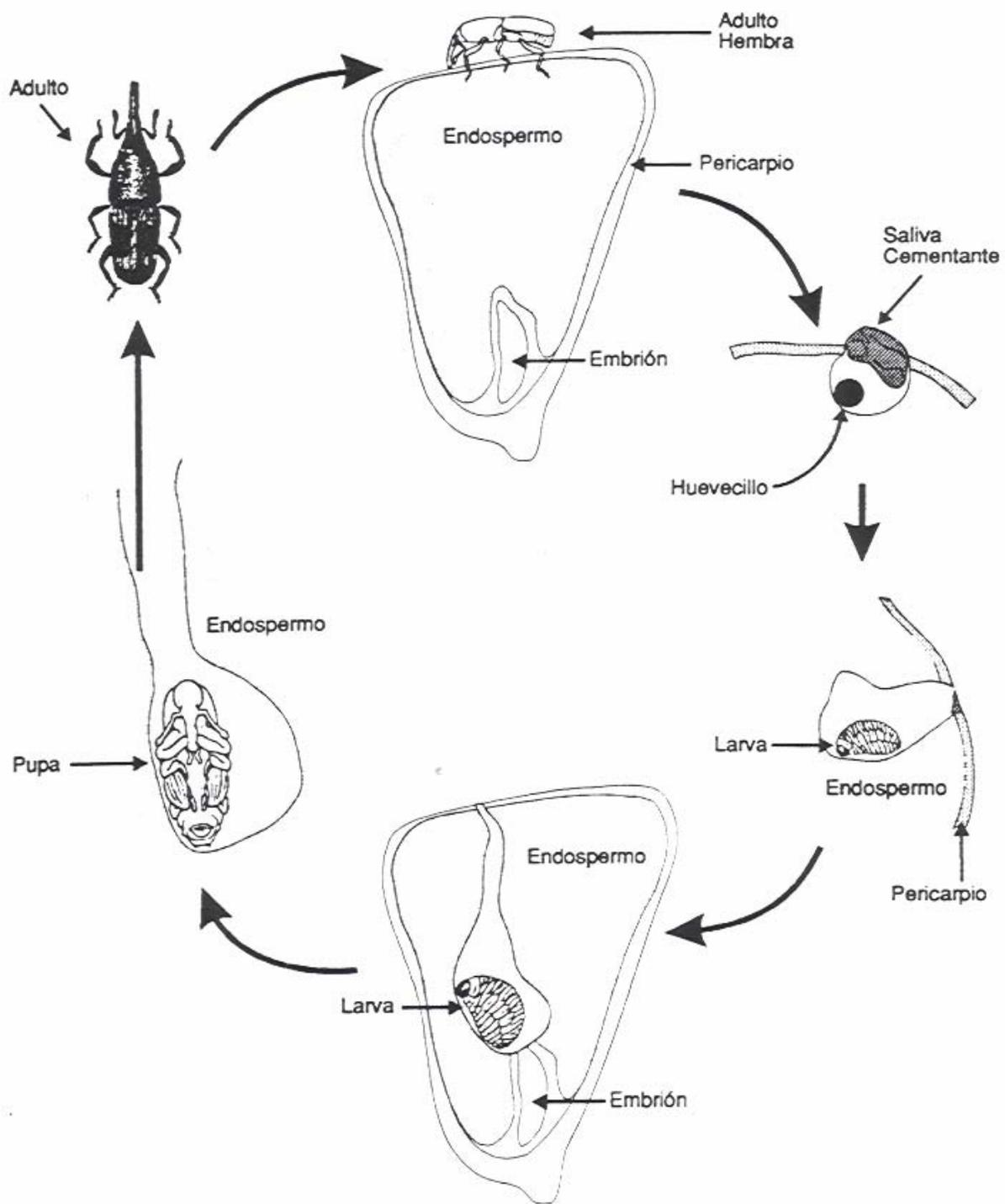


Figura 2.2 Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais* en el grano de maíz (Serratos, 1993)

2.4 “Desarrollo de Plantas Resistentes

La resistencia de la planta huésped al ataque de insectos se define como el conjunto de caracteres heredables que confiere protección contra el ataque de éstos (Painter, 1951). La importancia de emplear variedades resistentes se debe a que éstas contienen mecanismos de defensa desarrollados a lo largo de la co-evolución entre plantas e insectos. El proceso de identificación de estas variedades y de sus mecanismos de resistencia requiere de la participación de científicos de distintas áreas y de trabajo interdisciplinario. Un modelo para el desarrollo y liberación de variedades con ventajas de resistencia al ataque de plagas de almacén se presenta en la figura 3. Entre los elementos más importantes destacan el estudio de fuentes de germoplasma resistente, las bases y los mecanismos de defensa.

2.5 Fuentes de Germoplasma Resistente

Desde la década de los años cincuenta se iniciaron los estudios para la identificación de variedades de maíz resistentes a *S. zeamais* partiendo de una amplia diversidad genética. Se ha establecido que las variedades indígenas ancestrales procedentes de México y América Central, como las razas Nal Tel, Chapalote y Palomero toluqueño, y las variedades tradicionales de África, presentan niveles de resistencia significativamente altos (Tabla 2.1) (Dobie, 1974; Fortier et al., 1982; Arnason et al., 1994; Derera et al., 2001a y b). Varios autores coinciden en señalar que los insectos han ejercido una presión selectiva sobre las variedades locales, la cual ha sido favorecida por la selección de los agricultores.

2.5.1 Variedades Modernas

El germoplasma de maíz presenta niveles de resistencia a insectos muy diversos (Kang et al., 1995; Derera et al., 1998, Li, et al., 1998; Gupta et al., 1970; Giga y Mazarura, 1991). La liberación y uso de variedades modernas se ha acompañado de reportes que indican un incremento en la susceptibilidad a plagas de almacén (Fortier et al., 1982, Kossou et al., 1993). Ejemplos de estas variedades incluyen híbridos (Pioneer 230, El Salvador) y poblaciones (TZSR-W, IITA y Población 43 "La Posta", CIMMYT). Esta desventaja se debe a que el germoplasma mejorado se selecciona con criterios agronómicos que no consideran la evaluación de caracteres como la susceptibilidad a plagas de almacén (Throne et al., 2002).

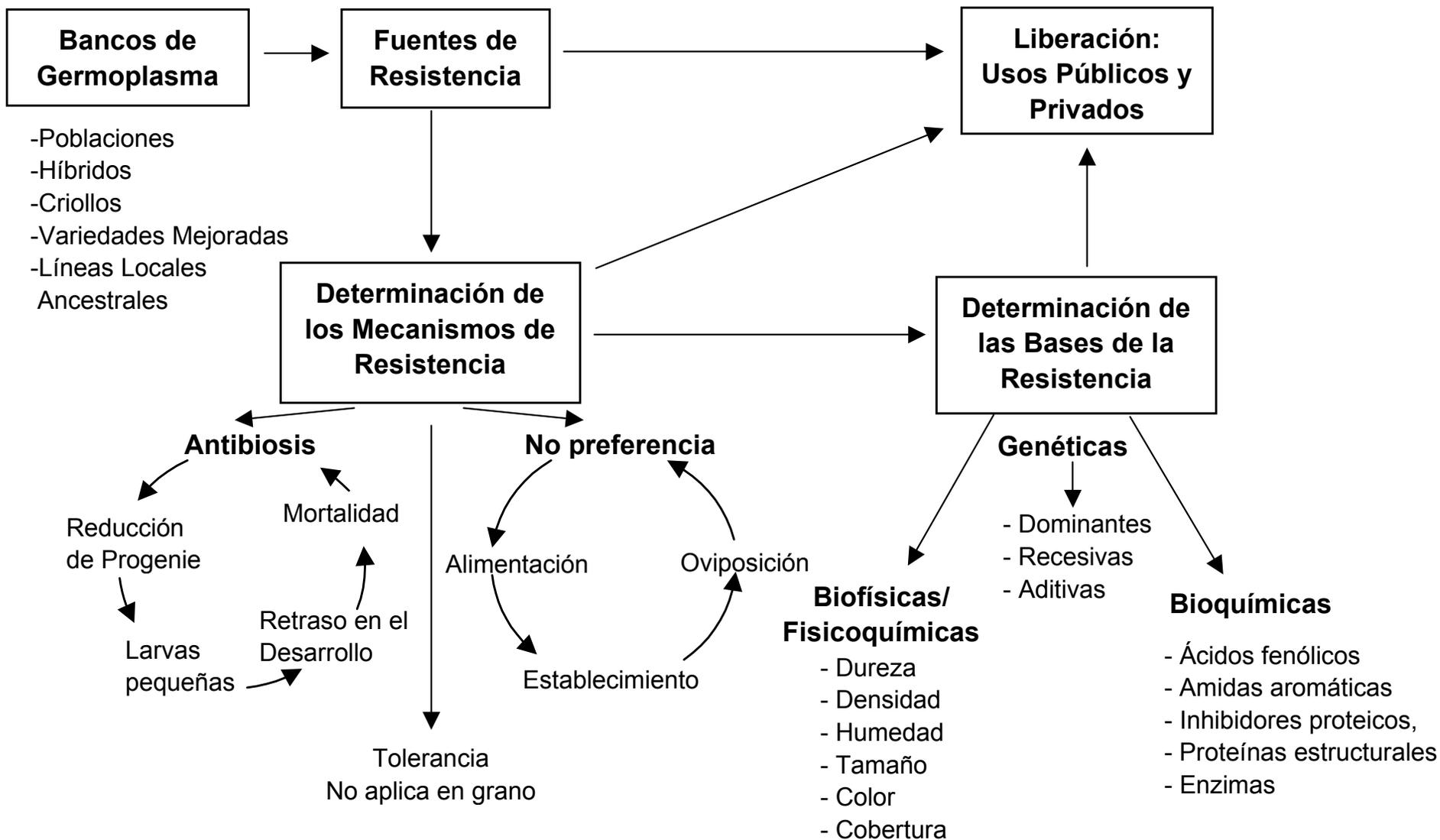


Figura 2.3 Proceso de desarrollo y liberación de variedades de maíz resistente a plagas de almacén (García-Lara et al., 2003)

A pesar de ello, se han identificado nuevas fuentes de resistencia en algunos grupos y se han caracterizado los factores que confieren dicha protección (Serratos et al., 1987; Classen et al., 1990; Arnason et al., 1992; Serratos et al., 1993; Arnason et al., 1993; Kossou et al., 1993; Arnason et al., 1994).

TABLA 2.1 Germoplasma de maíz identificado con resistencia a *Sitophilus zeamais* (García-Lara et al., 2003).

GENOTIPO	VARIEDAD	ORIGEN ^a
Criollos del grupo Nal-Tel	Razas indígenas locales	Variedad local, Belice
L578 y L690	Líneas e híbridos mejorados	USDA, ARS
Pools y criollos locales	Pools y razas locales	CIMMYT, Banco de germoplasma
Criollos	Razas indígenas locales	Variedad local, Malawi y Zimbabwe
Gdogbe, NH2	Razas locales	IITA, variedad local
Pool 17,18 y 33	MCPs ¹	CIMMYT, Banco de germoplasma
Nal-Tel, chapalote, palomero	Razas indígenas locales	CIMMYT, Banco de germoplasma
L108, L605 y L654	Híbridos mejorados	USDA, ARS
p.e. Hi41, Tzi18 y 8329-15	Líneas tropicales, híbridos y VPL ²	IITA, CIMMYT
B37, B68, R805 y T220	Líneas e híbridos mejorados	USDA
Híbridos, Pob28 y Pool 23MCP	Híbridos, MCPs ¹ y poblaciones	CIMMYT Zimbabwe

^aUSDA: Departamento de Agricultura, E.U.A; ARS: Servicio de Investigación Agrícola, E.U.A; CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo; IITA: Instituto Internacional de Agricultura Tropical.¹Maíz de alta calidad proteica. ² Variedades de polinización libre.

2.5.2 Métodos de Evaluación de la Resistencia

Los criterios para detectar y evaluar resistencia en el grano de maíz contra el ataque de *S. zeamais* se fundamentan en la cuantificación del daño causado por el insecto (porcentaje de daño, pérdida de peso del grano y nivel de infestación), parámetros biológicos y reproductivos del insecto en contacto con el grano (sobrevivencia, oviposición, cantidad y aptitud de la progenie, tiempo de desarrollo e índice de susceptibilidad) y características fenotípicas del grano asociadas con la resistencia (aspectos biofísicos y bioquímicos) (Widstrom et al., 1972; Dobie, 1974). Algunos métodos consideran relevante clasificar el tipo de bioensayo (libre elección o confinamiento en variedades de maíz), el lugar donde ocurre la infestación (campo o almacén) y la forma de almacenamiento (mazorca con o sin cubierta o en grano) (Kirk y Manwiller, 1964; MacMillian et al., 1968, VanDerShaaf et al., 1969). Recientemente, la implementación de nuevas técnicas se fundamentan en el conocimiento de las bases bioquímicas de la resistencia (Classen et al., 1990; Sen et al., 1994), las cuales han permitido disminuir tiempo, costos y variabilidad en la selección.

2.6 Mecanismos de Defensa Natural

Se ha establecido que en las variedades resistentes a insectos funciona alguno de los siguientes mecanismos de defensa: no preferencia, antibiosis y tolerancia. La no preferencia se define como la capacidad que tiene una planta para mantener alejados a los insectos evitando que la utilicen como sitio de refugio, oviposición o alimento. La antibiosis consiste en la acción de sustancias que son producidas por las plantas y que afectan negativamente el desarrollo, reproducción o sobrevivencia de los insectos. La tolerancia involucra la capacidad de una planta para crecer, reparar daños y reproducirse aún bajo presión de poblaciones de insectos que mataría a plantas susceptibles (Painter, 1958), pero es un mecanismo que no opera en granos y semillas debido a su estado de latencia. En el grano de maíz se ha establecido que la no preferencia y la antibiosis funcionan contra *S. zeamais* (Widstrom et al., 1975; Arnason et al., 1994; Derera et al., 2001a y b). Estos mecanismos están localizados en el pericarpio (no preferencia) y en el endospermo (antibiosis) y sus bases involucran propiedades biofísicas y bioquímicas que se describen a continuación (Tabla 2.2).

TABLA 2.2 Mecanismos y bases de la resistencia en maíz a *Sitophilus zeamais* (García-Lara et al., 2003).

MECANISMO	BASE BIOQUIMICA	COMPUESTO	LOCALIZACION
Antibiosis y no preferencia	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido ferúlico y derivados: ácidos diferúlicos y quinonas	Pericarpio
No preferencia	Enzimas	Peroxidasas	Pericarpio
No preferencia	Proteínas estructurales	Extensinas??	Pericarpio
Antibiosis	Amidas aromáticas	Diferuloil putrescina y <i>p</i> -dicoumarilputrescina	Aleurona, Endospermo
Antibiosis	Inhibidores enzimáticos	Inhibidor de proteasa e inhibidor de amilasas	Endospermo

2.7 Bases de la Resistencia

2.7.1 Características Biofísicas

La cubierta de la mazorca es la primera barrera de aislamiento contra el ataque de insectos. El número, la longitud y la rigidez de las hojas están relacionadas con el grado de infestación en el campo y el daño al grano producido por *S. zeamais*. La mazorca representa un segundo obstáculo para el ataque del insecto. La obstrucción debido al arreglo y espacio entre granos adyacentes influye en el proceso de infestación. El grano ha sido el más estudiado debido a que representa la última barrera de defensa y es la estructura que utiliza el insecto para su reproducción. Las propiedades del grano como la dureza se correlacionan de manera negativa con el daño y el índice de susceptibilidad a *S. zeamais*. La proporción de endospermo córneo guarda esta misma relación (Dobie, 1974). En cambio el contenido de humedad del grano correlaciona en forma positiva con la susceptibilidad (Arnason et al., 1994). Varios autores han analizado posibles relaciones con la forma del grano, tamaño, textura, color y olor sin poder establecer hasta este momento correlaciones consistentes.

2.7.2 Características Bioquímicas

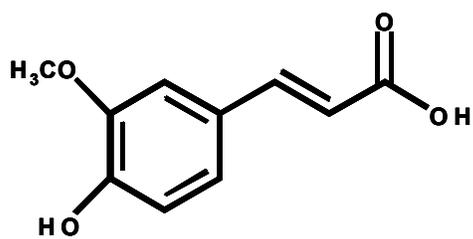
En el maíz se han estudiado dos grupos de compuestos relacionados con la resistencia: 1) factores de calidad nutricional: carbohidratos solubles, almidón, lípidos y proteínas, y 2) factores no nutritivos o metabolitos secundarios como flavonoides, ácidos fenólicos, amidas aromáticas y lignina. En particular, los factores nutricionales del metabolismo primario se relacionan de manera directa con la supervivencia y reproducción de las poblaciones de insectos; sin embargo, no es clara su relación específica con la susceptibilidad. Por el contrario, el grupo de los ácidos fenólicos y las amidas aromáticas son la base de los mecanismos de no preferencia y antibiosis en el grano de maíz.

2.7.2.1 Amidas Aromáticas

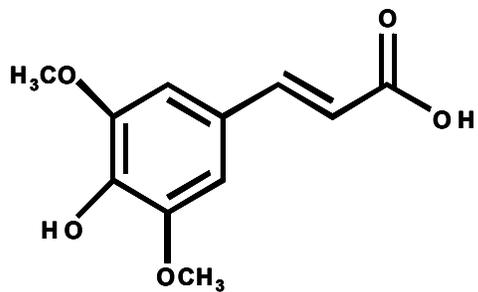
Las amidas aromáticas que están involucradas en la resistencia a la invasión del insecto se localizan tanto en las paredes celulares de la aleurona como en las del pericarpio. Las amidas más abundantes son la diferuloil putrescina y la *p*-dicoumaril putrescina (Fig. 2.4), aunque recientemente se ha demostrado la presencia de una tercera amida conjugada *p*-coumaroil-feruloil-putrescina (Moreau et al., 2001). Se ha propuesto que estas amidas pueden tener efectos de antibiosis sobre *S. zeamais* (Sen et al., 1994), debido a sus propiedades insecticidas y su estrecha similitud estructural con toxinas de artrópodos (Panagabko et al., 2000).

2.7.2.2 Ácidos Fenólicos

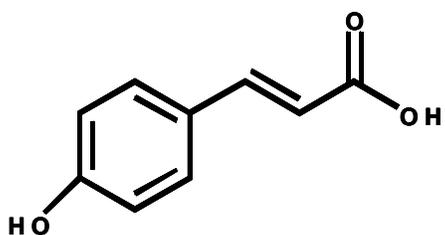
Los ácidos fenólicos fueron identificados como los primeros factores de resistencia contra *S. zeamais* en maíces locales de Belice. Al evaluar la toxicidad de extractos fenólicos en dietas artificiales se encontró que reducían el consumo de alimento en insectos adultos, aunque las etapas más susceptibles a estos compuestos son los primeros estadios larvarios (Serratos et al., 1987). Los niveles de concentración de estos ácidos correlacionan negativamente con los parámetros de desarrollo de este insecto (Classen et al., 1990). Estos compuestos al parecer constituyen una base general de resistencia debido a que se han demostrado efectos similares con el barrenador grande del grano (*Prostephanus truncatus* Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), otra plaga de almacén (Arnason et al., 1992).



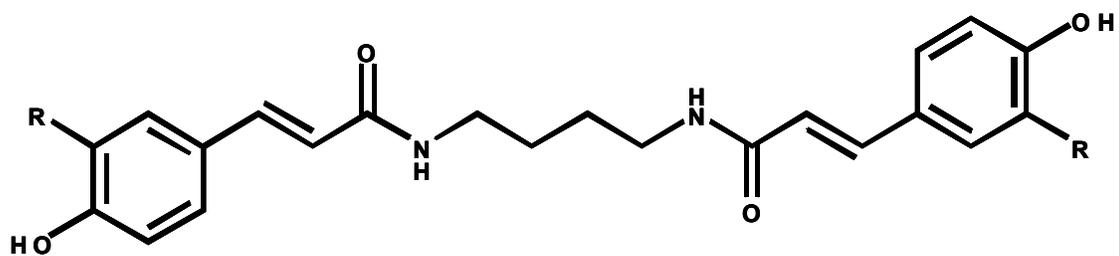
Acido Ferúlico



Acido Sinápico



Acido *p*-Coumárico



Dihidroxicinnamoil Putrescina

Coumaroil R = H-
Feruloil R = CH₃O-

Figura 2.4 Estructura de los metabolitos secundarios implicados en la resistencia de maíz a la plaga de almacén *Sitophilus zeamais* (Motsch) (García-Lara et al., 2003).

Dentro de este grupo destacan los ácidos hidroxicinámicos. Estos ácidos se encuentran concentrados en mayor cantidad en el pericarpio e incluyen al ácido *cis*-ferúlico, ácido *trans*-ferúlico, ácido *p*-coumárico y ácido sinápico (Fig. 2.4). El ácido *trans*-ferúlico es el más abundante y el principal ácido asociado con la resistencia. Este compuesto se ha propuesto como un indicador bioquímico confiable en la evaluación de resistencia en maíz y como una herramienta útil de pre-selección en programas de mejoramiento (Sen et al., 1991).

2.7.3 Fortalecimiento de la Pared Celular del Pericarpio

A pesar de que se han demostrado efectos directos de repelencia al ácido ferúlico (Serratos et al., 1987), éste no se encuentra libre en el grano. El mecanismo por el cual este ácido contribuye a la resistencia es mediante la formación de diferulatos que coadyuvan al fortalecimiento de las paredes celulares (Arnason et al., 1994). Este fortalecimiento estructural puede hacer que los nutrimentos sean menos accesibles y por lo tanto, el grano menos atractivo para los insectos (Fry, 1986). Una ventaja adicional de la presencia de estos ácidos en maíz es que brindan beneficios en la salud humana al funcionar como antioxidantes en dietas ricas en fibra (Kroon y Williams, 1999; García-Conesa et al., 1999).

El entrecruzamiento de los componentes de la pared celular del pericarpio influye sobre las propiedades de accesibilidad, extensibilidad, plasticidad, digestibilidad y adherencia (Hatfield et al., 1999a). Las paredes celulares vegetales contienen ácidos fenólicos que están estratificados entre los polisacáridos. En maíz, el ácido *p*-coumárico y el ácido *trans*-ferúlico se encuentran en forma de feruloil y *p*-coumaroil arabinosilanos (Hatfield et al., 1999b). Existen dos mecanismos de enlace entre carbohidratos y ácidos fenólicos. El primero es la ciclo-adición entre los carbonos etilénicos de los dos ácidos fenólicos catalizado por la presencia de luz UV y cuyo resultado es la formación de los llamados ácidos truxílicos y truxínicos (Hatfield et al., 1999a). Este mecanismo ocurre con el ácido *p*-coumárico. El ácido *p*-coumárico es importante en la formación de lignina y puede contribuir en el fortalecimiento estructural. El otro mecanismo es una reacción oxidativa acoplada, la cual puede ser catalizada por varios sistemas enzimáticos como la peroxidasa/peróxido de hidrógeno, polifenol oxidasa y lacasa (Hatfield et al., 1999a).

En estas reacciones los radicales fenoxi pueden reaccionar juntos para formar varios isómeros diméricos (5-5', 8-0-4', 8-5' y 8-8'). Se especula que los diferulatos también

pueden participar en la unión entre polisacáridos y la lignina. Recientemente se ha descubierto que en cultivos celulares de maíz los feruloil arabinosilanos pueden unirse mediante la acción de la peroxidasa en las vesículas de Golgi y posteriormente secretarse durante los procesos de expansión de la pared (Fry et al., 2000). Esto sucede preferentemente cuando el tejido es joven, sin embargo en tejido maduro se enlazan a nivel de la pared celular aumentando su rigidez (Fig. 2.5).

2.7.4 Modelo de la Pared Celular del Pericarpio

El modelo de la pared celular del pericarpio de maíz propuesto por Saulniery y Thibault (1999) indica la presencia de heterosilanos (arabinosa y xilosa, 50%), microfibrillas de celulosa (22%), compuestos fenólicos (5%), ácidos diferúlicos (2.5%) y trazas de lignina y proteínas. En este modelo los heterosilanos se encuentran altamente entrelazados por medio de puentes diferúlicos, constituyendo una red junto con las microfibrillas de celulosa. Asimismo, las proteínas estructurales pueden unirse entre sí por medio de puentes de isoditrosina y con los ferulatos adheridos a heterosilanos, generando una compleja red insoluble (Fig. 2.6). Este tipo de entrecruzamientos contribuye al fortalecimiento de la pared celular formando una barrera mecánica, la cual influye directamente en la dureza de esta estructura.

2.7.5 Proteínas en la Resistencia

Las proteínas, como base de algunos mecanismos de defensa, representan una alternativa de marcadores bioquímicos en variedades resistentes. Se incluyen en este grupo a los inhibidores enzimáticos, proteínas estructurales y enzimas. La presencia de inhibidores enzimáticos en estructuras latentes, como los granos, funcionan como sustancias protectoras contra plagas y representa un descubrimiento reciente en las interacciones planta-insecto. Algunos tipos de inhibidores de proteinasas y amilasas que afectan los procesos digestivos de plagas como *S. zeamais* han sido descritos en granos de maíz (Blanco-Labra y Iturbe-Chinas, 1981; Baker, 1982; Blanco-Labra et al., 1995). Sin embargo, su caracterización no ha sido completada pues se desconocen aspectos de su especificidad y efectividad (Serratos et al., 1997).

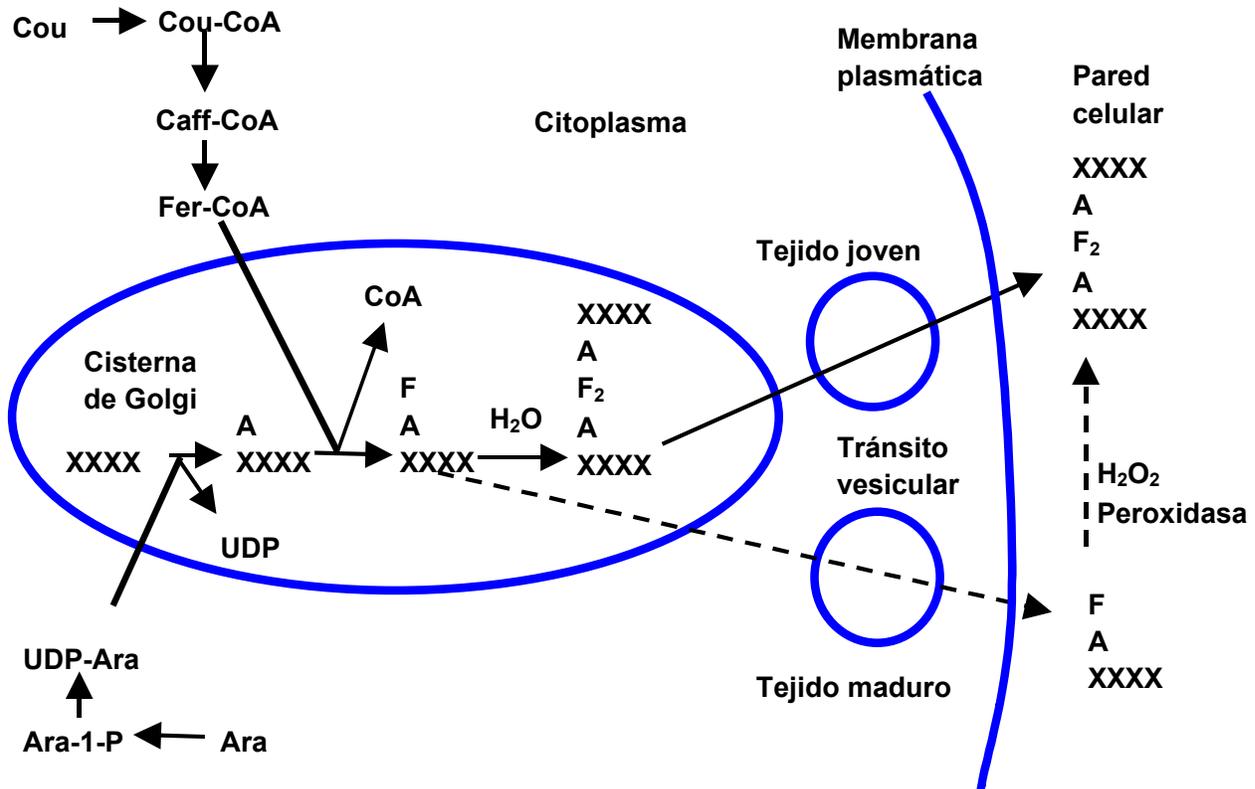


Figura 2.5 Vía metabólica y subcelular de la producción de diferuloil-polisacáridos en cultivos celulares de maíz. Cou: ácido coumárico, Caff: ácido caféico, Fer: ácido ferúlico, Ara: arabinosa. Diagramas, XXXXX: cadena de xilanos, A: cadena con extremo de arabinosa, F: cadena con extremo feruloil, F₂: puente de diferuloil (García-Lara et al., 2003).

Por otro lado, las enzimas oxidativas como las peroxidasas y las polifenol oxidasas se encuentran asociadas a la resistencia de manera indirecta. Se ha demostrado que la actividad de estas enzimas permite la implementación de mecanismos de defensa al catalizar la oxidación de varios compuestos en maíz, los cuales limitan la penetración del insecto a través del pericarpio. Un ejemplo es la hidroxilación de fenoles en quinonas cuyo resultado visible es el oscurecimiento del pericarpio. Estas quinonas son tóxicas para las plagas de almacén (Dowd, 1994). Además, estas enzimas pueden participar en el aumento de la rigidez de la pared celular catalizando uniones entre proteínas ricas en hidroxiprolina ó extensinas con lignina y a su vez ácidos fenólicos con heteroxilanos (Fig. 2.6).

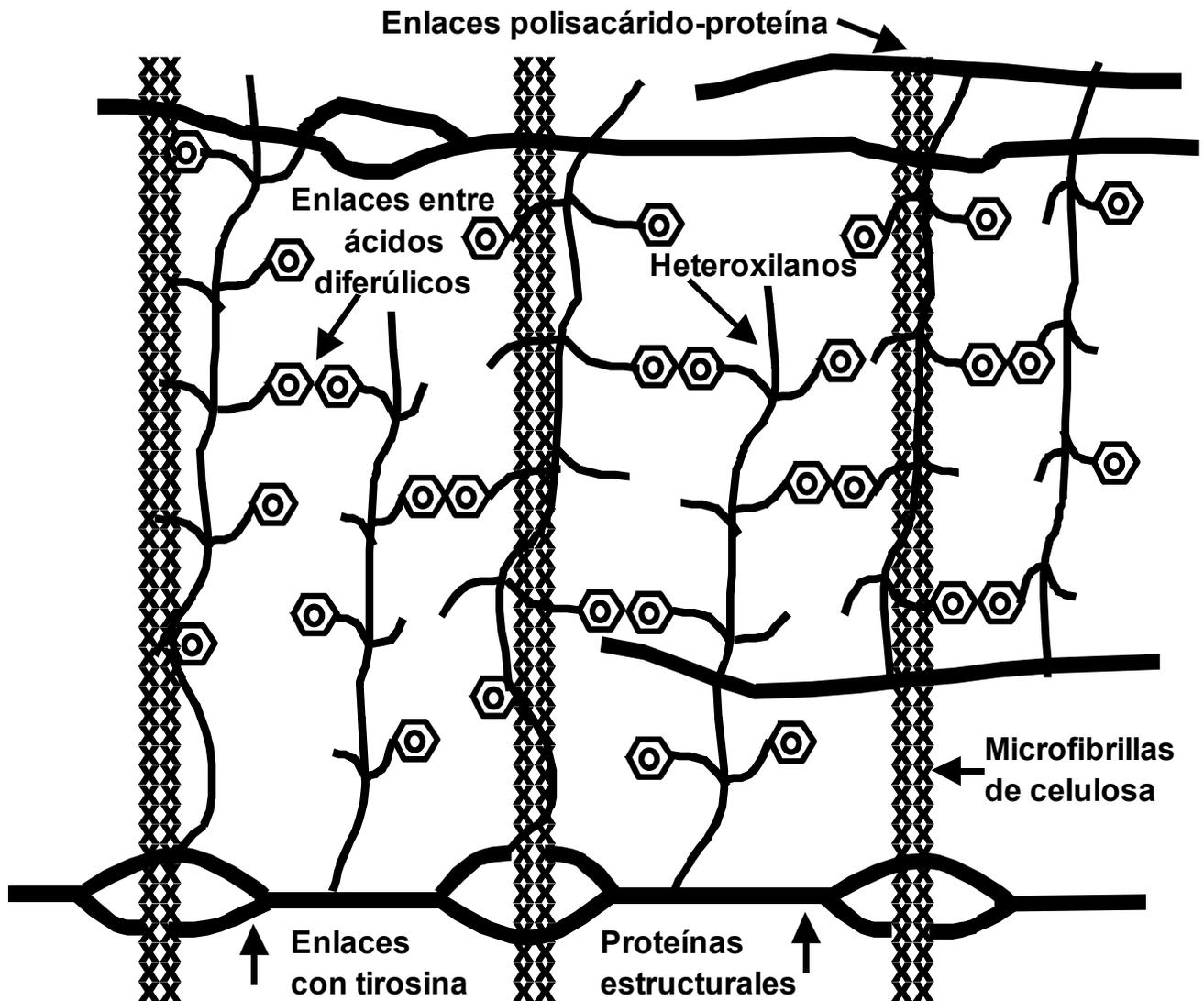


Figura 2.6 Modelo de la pared celular del pericarpio de maíz señalando las uniones entre ácidos fenólicos, carbohidratos y proteínas (García-Lara et al., 2003).

Las extensinas son proteínas estructurales que se sintetizan durante el desarrollo y se acumulan en altas concentraciones en las paredes celulares de las estructuras de protección como el pericarpio (Fig. 2.6). La presencia de extensinas se ha relacionado con mecanismos de defensa en varias plantas (Cassab, 1998) y con el grosor y dureza del pericarpio (Hood et al., 1991; Fritz et al., 1991), pero hasta el momento sólo se ha sugerido una asociación discreta entre éstas y la resistencia a *S. zeamais*.

2.8 Aspectos Genéticos de la Resistencia

Los mecanismos y bases de la resistencia mencionados presentan variaciones en su expresión, vinculada con la contribución genética del grano. Las características heredables de defensa se han establecido con base en modelos que consideran la correspondencia entre las estructuras del grano en diferentes generaciones y carga genética. Por medio de la aplicación de varios modelos genéticos lineales se ha podido determinar que la concentración de compuestos fenólicos en pericarpio, de inhibidores de proteinasas en endospermo y la resistencia estructural del grano, tienen una acción genética significativa. Estos análisis han definido efectos aditivos y dominantes de los genes asociados con la expresión de estas características (Serratos, 1993; Serratos et al., 1993 y 1997). Otros estudios indican que la herencia de la resistencia es poligénica y de origen materno (Widstrom et al., 1975). Se sabe además que factores ontogénicos, ecológicos y ambientales afectan significativamente la expresión de la resistencia en el grano de maíz (Tipping et al., 1989; Kang et al., 1995). Los procesos que ocurren durante el desarrollo de la semilla inciden en la acumulación de los metabolitos asociados con la resistencia (Serratos et al., 1993). Las enzimas involucradas son codificadas por genes, cuya expresión es específica de tejidos y que es controlada a diferentes niveles, no obstante aún se desconocen muchos aspectos de su regulación.

2.9 Alcances Biotecnológicos

El avance en el conocimiento de las bases y mecanismos de resistencia de maíz al ataque de *S. zeamais* establece posibilidades de manipular estas características a escala molecular. Actualmente existen dos estrategias biotecnológicas de mejoramiento e incorporación de características agronómicas deseables en maíz: 1) el uso de marcadores moleculares para la selección genotípica asistida y la identificación de genes y 2) la incorporación de genes de resistencia a estas plagas.

2.9.1 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares (características genotípicas) ofrecen ventajas en la identificación de grupos de genes, determinación de mecanismo de defensa e incremento de la estabilidad y duración de la resistencia. Marcadores del tipo de RFLPs (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y SSRs (microsatélites) se han utilizado para

construir mapas genéticos de resistencia en maíz a distintos lepidópteros, catalogando regiones genómicas y permitiendo la selección genotípica asistida (Yencho et al., 2000). Recientemente nuestro grupo ha iniciado la construcción de un mapa genético en maíz para caracterizar las regiones cromosómicas involucradas en la resistencia a la infestación de *S. zeamais*. Se espera que con esta información sea posible seleccionar variedades de manera más eficaz y permita identificar genes que confieran resistencia a esta plaga.

2.9.2 Plantas Transgénicas

Alternativamente se han reportado los primeros resultados de maíz transgénico resistente a plagas de almacén utilizando el gen de avidina (Kramer, et al., 2000) y de genes involucrados en los mecanismos naturales de resistencia, como la sobre-expresión de peroxidasas aniónicas en maíz (Dowd y Lagrimini, 1997; Dowd et al., 1998). Se sabe que el maíz transgénico comercial que expresa δ -endotoxinas (CryI y II) de *Bacillus thuringiensis* es específico para lepidópteros y no funciona para coleópteros como *S. zeamais*. Cabe mencionar que esta tecnología tiene todavía una aceptación limitada y esta sujeta a regulaciones en muchos países. En el caso particular de la avidina se ha establecido que puede ser tóxica para mamíferos. Otros genes como el de la enzima fenilalanina amonio liasa y de proteínas estructurales están consideradas como candidatos idóneos a evaluar.

En el futuro inmediato se espera que la biotecnología permita avances significativos en los estudios de resistencia a insectos a través de la manipulación de vías metabólicas y la localización de genes nativos, para su aplicación en la búsqueda y la generación de variedades de maíz resistentes.” (García-Lara et al., 2003).

A finales de las próximas dos décadas, el mundo tendrá que alimentar a aproximadamente 2.5 mil millones más de personas, con menos tierra de labranza, menos recursos renovables y no renovables, y menos agricultores. Este desafío emerge en un contexto de urbanización acelerada, de cambios climáticos, de globalización, y de fluctuación en los precios de los granos básicos. Esta situación está acentuada especialmente en los países menos desarrollados, donde se presenta la mayor concentración del crecimiento poblacional. De manera contraria, el nivel de producción de los cultivos alimenticios se ha reducido de una tasa de 2.9% durante la revolución verde a 1.9% actualmente (Bergvinson y García-Lara, 2004).

Para aumentar la cantidad y la calidad del grano de alimento es necesario reducir el daño producido por los insectos que atacan al maíz almacenado, (*Zea mays* L). *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleóptera: Curculionidae) es considerado a nivel mundial como una de las plagas de mayor importancia durante el almacenamiento de maíz, especialmente en las regiones tropicales húmedas (Markham et al., 1994). El daño producido por *S. zeamais* es esencialmente importante en el ámbito de pequeños productores, sobre todo en países de bajos recursos, donde gran parte de lo que se siembra es utilizado para autoconsumo y como banco de semilla para el siguiente ciclo. El gorgojo de maíz como es conocida esta plaga, no solo consume grandes cantidades de grano, sino que también reduce la calidad y la viabilidad de la semilla almacenada. Las pérdidas producidas por este insecto van desde el 25 hasta el 50%, mientras que los niveles de daño exceden el 90%. Las pérdidas causadas por insectos de granos almacenados inciden de manera general en la pérdida real del peso del grano, decremento en el valor alimenticio, reducción de la viabilidad, incremento en el crecimiento de hongos y la reducción de su valor comercial.

En México esta plaga representa uno de los problemas más serios durante el almacenamiento y aún cuando no se tienen cabalmente cuantificadas las pérdidas, se tienen datos de incidencia de esta especie en regiones específicas del país. En un muestreo realizado en varias bodegas alrededor del país se encontró que más del 61% estaba infestado con *S. zeamais* con una incidencia del 42% del total de insectos encontrados (Ramírez, 1979). Para zonas húmedas la presencia de esta plaga supera el 80% causando el mayor daño debido a insectos presentes en grano almacenado (Tigar, et al 1994). Se conoce

también que en la zona del bajo, 63.6% del maíz almacenado durante varios meses se encuentra infestado con *S. zeamais* (Tigar, et al, 1994). Considerando que México es un país donde el maíz es el principal grano cultivado y base de la alimentación cotidiana, es imprescindible generar esfuerzos encaminados a desarrollar variedades de maíz que presente niveles altos de resistencia contra *S. zeamais*.

Durante las últimas décadas el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ha desarrollado variedades de maíz con resistencia a diferentes plagas, basado en el conocimiento de la resistencia de la planta huésped, en los métodos y técnicas eficientes para selección y el mejoramiento, así como las facilidades para generar infestaciones artificiales de insectos y la evaluación adecuada de daño. Actualmente existen mas de 300 variedades de maíz resistentes a insectos y muchas de ellas se ha desarrollado en CIMMYT o en colaboración con instituciones internacionales (Smith, 1997). Estas variedades no son suficientes considerando el espectro de plagas que se tiene que atacar, mas aún la diversidad de ambientes donde el maíz es cultivado implica una lucha contra plagas específicas para condiciones determinadas. Tal es el caso en la postcosecha. En este campo es necesario continuar con la identificación, cuantificación y desarrollo de variedades de maíz resistente a plagas de almacén, principalmente *S. zeamais*.

Con base en lo anterior el objetivo inicial de este proyecto fue la selección de una población de maíz resistente a *S. zeamais*, adaptado a climas tropicales, como preámbulo para la generación y desarrollo de un mapa genético que permita en un futuro la selección asistida por marcadores específicos. El uso de estas herramientas biotecnológicas permitirá en primera instancia determinar las fuentes genéticas de la resistencia, así como las regiones genómicas implicadas. Así mismo, con el conocimiento de las bases bioquímicas de la resistencia será factible correlacionar estos parámetros con regiones genómicas involucradas en la expresión de estos mecanismos. La generación de este conocimiento también permitirá que la selección de variedades resistentes a *S. zeamais* sea más eficiente y precisa, y en términos del mejoramiento de germoplasma, una importante reducción en el tiempo del desarrollo y liberación de germoplasma resistentes.

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un mapa genético de las características del maíz tropical (*Zea mays* L.) que estén asociadas con la resistencia a la plaga de almacenamiento, *Sitophilus zeamais* (Motsch).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Bases Bioquímicas de la Resistencia

Determinación de compuestos y metabolitos involucradas en la resistencia del maíz tropical a la plaga de almacenamiento *S. zeamais*

- a) Establecer la función de los ácidos fenólicos adheridos a la pared celular en la resistencia del maíz tropical a la plaga de almacenamiento *S. zeamais*.
- b) Determinar la función de las proteínas estructurales en la resistencia a la plaga de almacenamiento *S. zeamais*.
- c) Estudiar la relación entre la actividad de la peroxidasa y la resistencia del maíz tropical a *S. zeamais*.

d) 4.2.2 Bases Genómicas de la Resistencia

Cartografía genética e identificación de los QTL's involucrados en la resistencia del maíz tropical a *S. zeamais*.

- a) Evaluar los niveles de resistencia del maíz tropical (población 28, población 21) con resistencia a *S. zeamais* por medio de índices de susceptibilidad
- b) Desarrollar una población de maíz tropical $F_{2:3}$ como base para realizar el mapeo de QTL's involucrados en la resistencia a *S. zeamais*
- c) Construir el mapa molecular con la F_2 de la población del maíz tropical utilizando RFLP's y SSR's como marcadores moleculares.
- d) Cartografiar los QTL's involucrados en la resistencia a *S. zeamais*, así como de los factores fitoquímicos involucrados en los mecanismos de resistencia
- e) Correlacionar los diferentes parámetros de susceptibilidad y bioquímicos con la localización e identificación los QTL's involucrados en la resistencia

5.1 Genotipos de Maíz

En este estudio se utilizaron inicialmente nueve genotipos provenientes de las colecciones de CIMMYT. La semilla se incrementó durante 1999 y 2000 en la estación experimental de Tlaltizapán Morelos México (18°41' N, 940m snm). La producción de semilla se realizó por medio de auto-polinizaciones en grupo, colectando polen de 20 plantas con el cual se polinizaron las 20 plantas vecinas y viceversa. Los granos colectados se mezclaron de manera balanceada por grupo y bloque para su posterior análisis. Se utilizaron dos razas locales subtropicales como testigos resistentes: Sinaloa 35 y Yucatán 7 (Arnason et al., 1994). Por otra parte, dos poblaciones de polinización libre desarrolladas en CIMMYT con un grado de endogamia S_3 y con mejoramiento bajo infestaciones artificiales para resistencia a *S. zeamais*: i)P80, desarrollada entra la crusa de una variedad de QPM de Ghana, “Ejura” con Sinaloa 35 y ii)P84, derivada de 20 accesiones del Caribe con moderada resistencia a *Prostephanus truncatus*. Se incluyó la población 47 en una crusa recíproca con P84: Cruza P84 x P47 y su recíproco P47 x P84. Adicionalmente se estudiaron dos líneas tropicales y un híbrido de valles altos: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1, CML290 y CML 244 x 349 respectivamente. Los dos últimos genotipos se consideraron como los testigos susceptibles.

5.2 Condiciones y Medio de Cultivo para *Sitophilus zeamais*

Para mantener las colonias de *S. zeamais* se utilizó una cámara de cultivo con las siguientes condiciones: 70 ± 5 % de humedad relativa (HR), $27 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y un foto-período de 12:12 hrs. El medio utilizado fue grano completo de maíz del genotipo susceptible CML244XCML349 (híbrido de valles altos, blanco dentado), así como harina del mismo genotipo. El grano se obtuvo de la cosecha anual de la estación experimental del Batán, Texcoco. Se sometió a secado y limpieza para retirar detritos, granos dañados o granos infestados en campo. Se colocaron a -20°C durante dos semanas para eliminar cualquier insecto presente. Posteriormente se colocaron a 70 ± 5 % HR y $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante tres semanas para permitir que el grano se equilibre. La humedad óptima del grano para utilizarse como medio de cultivo esta en un intervalo de 13-14%. Una vez alcanzada la

humedad requerida, el grano se almacena a -4°C . Antes de usarlo se colocó una semana en la cámara de cría.

5.3 Establecimiento y Cría de Colonias de *Sitophilus zeamais*

Para establecer un nuevo cultivo o renovación del mismo con insectos procedentes de campo, éstos deben aislarse de los ya establecidos al menos por tres generaciones. Los sitios de los cuales se obtuvieron las colonias de *S. zeamais* fueron las Estaciones experimentales de Poza Rica Veracruz (clima tropical) y Tlaltizapán Morelos (clima subtropical). Los contenedores con las nuevas colonias se colocaron en charolas cubiertas con una capa de aceite y en áreas distintas a los cultivos anteriores con el fin de evitar migración, transmisión de enfermedades o contaminación. Se seleccionaron los insectos deseados y se realizaron verificaciones periódicas del estado del cultivo para detectar problemas de enfermedad o contaminación (Wright et al, 1984).

Las colonias de *S. zeamais* se mantuvieron en contenedores de vidrio de 460 ml con medio de cultivo. Para preparar un cultivo se colocaron 200g de maíz susceptible equilibrado. Se colocó harina del mismo en una proporción de peso 1:40. En el caso de cultivos nuevos se colocaron granos quebrados en proporción de peso 20:80. Los cultivos de *S. zeamais* muestran un máximo de emergencia a las seis semanas. Por esta razón se tomaron adultos de esta edad, los cuales se separaron del grano por medio de un sistema de tamices. Posteriormente se transfirieron 200 adultos no sexados al nuevo contenedor. Después de 1 semana de oviposición los adultos fueron retirados del medio. Debido a que *S. zeamais* es capaz de moverse sobre superficies lisas, los contenedores fueron sellados con parafilm para evitar que escapen. Se etiquetaron con la fecha y nombre de la especie así como el origen (Wright et al, 1984).

5.4 Evaluación de Parámetros de Susceptibilidad a *Sitophilus zeamais*

La evaluación de todos los genotipos utilizados en este estudio se realizó por medio del índice de susceptibilidad ó Dobie (ID). Granos de las familias a evaluar se colocaron a $70 \pm 5\%$ HR y $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante tres semanas. Después de este periodo el grano se ubicó en un intervalo de humedad del 13 al 14%. Posteriormente se determinó la humedad del grano. Se prepararon pruebas de 30 g de granos de cada genotipo por triplicado. Se colocaron 25 adultos de *S. zeamais* (no sexados) de 1-7 días de edad durante una semana en condiciones

de bioensayo (70 ± 5 % HR, 27 ± 1 °C y foto período de 12:12 hrs). Después de 1 semana los adultos fueron retirados. Los adultos fueron removidos cada dos días hasta que el total de la F1 emergió. Se calculó el índice de susceptibilidad o Dobie (Dobie, 1974) con base en la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Susceptibilidad} = (\ln N \times 100)/T$$

Donde N es el número de la progenie y T es el tiempo promedio de desarrollo. De aquí se obtuvo la progenie y el tiempo promedio de desarrollo como parámetros independientes. Al finalizar cada bioensayo se determinaron los siguientes parámetros: el porcentaje de daño, porcentaje de pérdidas y harina producida (Widstrom et al, 1972).

$$\text{Daño (\%)} = ND \times 100/(NS + ND)$$

$$\text{Pérdidas (\%)} = 100 \times PF/(PI)$$

Donde ND, número de granos dañados; NS, número de granos sanos; PI, peso inicial de la muestra; PF, peso final de la muestra.

5.5 Determinación de Parámetros Físicos

5.5.1 Dureza del grano

La dureza del grano se evaluó por medio de un equipo móvil de medición estándar de fuerza Instron, (Modelo 921A, Tricor Systems Inc, Elgin Illinois 60123). Este sistema está equipado con un sensor de 20Kg y una broca de 0.8 mm de diámetro para determinar la fuerza de ruptura del grano. La broca se desplazó a una velocidad de 1cm/s hasta el momento de tocar el grano. El grano se orientó con la superficie anterior (opuesta al embrión) hacia arriba y se sujetó firmemente sobre una plataforma de metal construida para este fin. Los parámetros del programa (DFR Operation for Windows, ver 4.25, Tricor Systems Inc.) fueron: sensor 921-650-04 de 20 kg, sensibilidad de 0.5 kg, velocidad de desplazamiento 0.048 pulg/seg, intervalo de fuerza máxima 22.680 Kg, fuerza mínima 0.101Kg, tiempo máximo 0.4724 seg, tiempo mínimo 0.0040 seg e incremento de la fuerza (delta force) 0.302 Kg. Estos parámetros permitieron obtener un perfil de fuerza de ruptura

que refleja la dureza del grano. El número de determinaciones fue de 50 granos por genotipo analizado. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

5.5.2 Características del Grano

Se determinó la densidad relativa definida como el peso de un volumen dado de grano incluyendo los espacios de acuerdo con Korunic et al. (1998). Se tomaron muestras de grano de cada familia y se colocaron en un contenedor cuyo volumen correspondía a 120 mL. Se pesó la cantidad de grano y se determinó la densidad en g/ml. El peso específico (g) se calculó tomando una muestra de 100 granos por triplicado que posteriormente fueron pesados. La proporción pericarpio/grano se determinó retirando el pericarpio de 20 granos por duplicado previamente humedecidos y desecándolos a 25°C durante 24 hrs. Esta proporción fue calculada al dividir el peso del pericarpio entre el peso del grano completo (Hood et al., 1991). Utilizando un vernier electrónico (SPIModel 10-891-0, Mitutoyo, Japón) se determinó el grosor del grano tomado en la zona de la corona así como el grosor del pericarpio que cubre la zona del embrión y la zona opuesta a éste. Se evaluaron 30 granos por triplicado de cada genotipo estudiado.

5.5.3 Pruebas de Germinación

Granos sanos fueron utilizados en estas pruebas. Estos granos fueron colocados a 27°C y 75% HR durante 3 semanas para equilibrio, posteriormente permanecieron bajo las mismas condiciones de infestación durante dos meses. Al final de la evaluación las semillas fueron retiradas y colocadas a ventilación durante 1 hr. Posteriormente se sometieron a lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 0.001% durante 5 min. Se colocaron 100 semillas en papel filtro y se enrollaron en forma de taco por triplicado. Se humedecieron y se colocaron a 30°C y 100% HR durante 5 días. Al final se registró el número de semillas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación (Justice y Bass, 1978).

5.6 Bases Bioquímicas de la Resistencia a *Sitophilus zeamais*

5.6.1 Obtención de Fracciones Enriquecidas

Se obtuvieron fracciones enriquecidas de pericarpio-aleurona para cada genotipo y familia estudiada con ayuda de un molino de avena (Sen et al., 1994). Alternativamente las fracciones se obtuvieron disectando manualmente granos hidratados a 4°C durante 15 min. En ambos casos las muestras fueron desecadas por 15 min y pulverizadas en un molino de café. Se colocaron a -20 °C hasta su análisis.

5.6.2 Extracción de Ácidos Fenólicos

La extracción de los ácidos fenólicos adheridos a la pared celular se realizó mediante una hidrólisis alcalina. Un gramo de tejido pulverizado se hidrolizó en 30 ml de NaOH 2N, utilizando un frasco cubierto con papel aluminio bajo una atmósfera de nitrógeno, con el fin de hidrolizar los ésteres fenólicos unidos a hemicelulosas. El frasco fue colocado en agitación durante 4 hrs y subsecuentemente se acidificó a pH 2.0 con HCl 6.0N. La solución resultante fue centrifugada a 750g durante 10 min. El sobrenadante fue decantado en un embudo de separación. El botón fue lavado dos veces con agua destilada y centrifugado después de cada lavado. Todos los sobrenadantes se combinaron y los ácidos fenólicos se extrajeron con 40 mL de acetato de etilo. La fase orgánica superior y la fase soluble se colectaron de manera separada. La fase acuosa fue re-extraída con 40 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y desecaron en un evaporador rotatorio. Finalmente el extracto desecado se resuspendió en 1.5 mL de metanol y se almacenó a -20°C hasta su análisis en HPLC. El sobrante del botón fue desecado para obtener un estimado del contenido de fibra (Classen et al., 1990).

5.6.3 Análisis por HPLC Fase Reversa en Equipo Beckman

La primera fase del análisis se realizó con un sistema de HPLC Beckman (Arnason et al., 1994). Este equipo consta de un detector fotodiodo mod. 126, sistema automático de muestreo modelo 502, loop de inyección de 5 µL. El programa para análisis fue el System Gold Software ver 8.10. La detección de compuestos se realizó a 325 nm. Las separaciones fueron realizadas utilizando una columna de fase reversa C18 ODS (250x4.6 mm, partícula 5µm, Beckman Fullerton CA). Para los ácidos fenólicos adheridos a la pared celular, el

extracto se resuspendió en 1 ml de metanol, se filtró y se colocó en viales para su inyección automática. La fase móvil comprendió el siguiente sistema de solventes: metanol (A) y H₂PO₄ 10mM, pH 2.4 (B) y un intervalo de flujo de 1.5 mL/min. El gradiente utilizado fue el siguiente: equilibrio inicial 15% A y 85% B, de 25 a 55% A en 15 min, de 55 a 80% A en 5 min, de 80 a 100% A en 2 min, 100% A por 8 min, se realizó el proceso inverso de concentración, de 100 a 25% A en 2 min y 25 % A por 3 min.

5.6.4 Análisis por HPLC Fase Reversa en Equipo Hewlett-Packard

La segunda fase del análisis se realizó con un sistema HPLC Hewlett-Packard (Bily et al., 2004). Este equipo consta de un detector fotodiodo DE91607659, sistema automático de muestreo modulo G1313A, loop de inyección de 100 µL, sistema de liberación de solvente, comba cuaternaria Modulo G1315A. El programa para análisis fue el System Gold software ver 8.10. Las separaciones fueron ejecutadas utilizando una columna de fase reversa de 3 µm C18 ODS (YMC ODS-AM 100 mm x 2mm analytical cartridge). El intervalo de flujo fue de 0.3 mL/min. El extracto se resuspendió en 1 mL de metanol, se filtró y se colocó en viales para su inyección automática. La fase móvil comprendió el siguiente sistema de solventes: 0.05% TFA pH= 3.4 en agua (A) y Acetonitrilo (B) a un intervalo de flujo de 0.3 mL/min. El gradiente utilizado fue el siguiente: equilibrio inicial 80% A y 10% B, de 10 a 30% B en 3.5 min, de 30-32% B en 6.5 min, de 32 a 100% B en 4 min, 100% A por 4.5 min, se realizó el proceso inverso de concentración, de 100 a 10% B en 3 min y 10 % b por 3 min para equilibrio. La detección de componentes se realizó a 280 y 325 nm.

En ambos análisis los estándares de ácido *p*- cumárico, ácido *E*- ferúlico, y ácido diferúlico fueron adquiridos de Sigma, mientras el ácido 5-5 difelúrico fue sintetizado por el grupo del Dr. Towers (University of British Columbia). La identidad de los compuestos fue confirmada con el espectro UV al comparar los tiempos de retención y máximos de los estándares con los de los extractos (Sen et al., 1991; Waldron et al., 1996).

5.6.5 Extracción y Cuantificación de Amidas Aromáticas

La extracción de amidas aromáticas se realizó de acuerdo a Panagabko et al. (2000), pero con algunas modificaciones. Un gramo de muestra se disolvió en 10 mL de metanol al 80% acidificada previamente para obtener una concentración final del 0.25% con HCl. La

solución se homogeneizó durante 10 minutos por ultrasonido para posteriormente centrifugarse. El sobrenadante se sometió a roto-evaporación y finalmente la muestra se resuspendió en 3 mL de metanol (100%) y se guardó a 4°C hasta su uso.

El análisis y separación de la muestra por HPLC se realizó de acuerdo con Burt (2003). Brevemente, el análisis de HPLC se realizó con un equipo Hewlett-Packard LC Series 1100. El sistema de solvente consistió de acetonitrilo (A), metanol (B) y un amortiguador de fosfatos (C) (fosfato de sodio 25 mM, con 0.5% de ácido acético). Las condiciones iniciales fueron 0% A, 5% B, 95% C. El gradiente de corrida fue el siguiente: 5% B durante toda la corrida; 0-10% A en 10 min; 10-70% A en 10 min; 70-0% A en 5 min; re-equilibrio de la columna en 10 min (0% A, 5% B, 95% C). La columna utilizada fue A C4 Phenomenex Kromasil 3.5m, 150x2.0mm, la cual fue acoplada a una pre-columna Prosphere 300 5m C4, 7.5x3.2mm. Ambas se llevaron a 50°C para permitir la separación eficiente de los compuestos. El flujo se fijó a 0.200 mL/min y la detección de compuestos se realizó a 290 nm y 320 nm. La muestra se diluyó en metanol al 20% mediante un programa de inyección para mejorar la resolución de los picos de separación. La identificación de compuestos se determinó comparando los tiempos de retención y el espectro de los compuestos purificados obtenidos del Dr. J. Atkinson (Brock University).

5.6.6 Extracción y Cuantificación de Proteínas ricas en Hidroxiprolina

Una muestra de 0.125 g de tejido se homogeneizó en amortiguador de acetatos (0.1% de acetato de potasio, pH 5.0) y 4mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Las paredes celulares fueron lavadas con 0.5% de Nonidet P40 (Sigma) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 2mM para remover membranas y contenido citoplásmico. Posteriormente los extractos fueron resuspendidos y centrifugados seis veces con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 2mM frío. El botón fue extraído con 2mL de CaCl_2 0.2M durante una noche con agitación constante y a 4°C. El botón y el sobrenadante fueron separados por centrifugación y liofilizados (Hood et al., 1991). El tejido o las muestras de proteína fueron hidrolizadas en HCl 6N durante 24 hrs a 110 °C.

La determinación de hidroxiprolina tanto en la fracción soluble como en el remanente del botón fue realizada espectrofotométricamente de acuerdo al método propuesto por Woessner (1961).

5.6.7 Extracción y Cuantificación de Actividad de Peroxidasa

Este estudio se realizó en grano completo y por estructura. El proceso de extracción de la peroxidasa se realizó sobre hielo. El tejido se colocó en un mortero con amortiguador de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 50 mM, pH 6.8) a 4°C y durante 2 hrs para su hidratación. Se homogeneizó la muestra durante 1 min en una proporción de 6 mL de amortiguador de extracción por 1g de tejido. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue colocado a 4°C hasta su uso. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976). El ensayo enzimático se realizó en un volumen final de 920 μL a 25°C en espectrofotometría de luz UV/visible. Se determinó la absorbencia de los productos de reacción, la cual vario dependiendo del sustrato ensayado.

Para determinar la actividad de la peroxidasa en presencia de guayacol (A470) el ensayo consistió de 440 μL de guayacol 20 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.58, 10 a 20 μL del sobrenadante del extracto, 430 a 440 μL de amortiguador de fosfatos, pH 6.58 y 20 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 3%) (Dr. Díaz Pontones, comunicación personal). La actividad de peroxidasa en presencia de TMB (tetrametil-bezidina, Sigma) fue medida a 654 nm. El ensayo contenía 50 μL de TMB 20 mM disuelto en etanol absoluto, 840 μL de amortiguador fosfatos-citratos (Na_2HPO_4 90 mM y de ácido cítrico 55 mM, pH 4.5), de 10 a 20 μL del extracto soluble, 20 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 3%). Para el ensayo con ácido caféico, consistió de 840 μL de amortiguador McIlvaine (0.043 M ácido cítrico y 0.114 M de Na_2HPO_4 , pH 5.5), 50 μL de ácido caféico 80 mM, 10 a 20 μL de extracto, y 20 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 3%). Todos los ensayos de peroxidasa fueron realizados iniciando con la adición de H_2O_2 (Modificado de Bestwick et al., 1998).

5.6.8 Localización Histoquímica de la Peroxidasa de Maíz

Granos íntegros de maíz maduro de la Población 84 se hidrataron en agua destilada a 4°C durante 6 hrs. Alternativamente, granos de la misma población se colocaron en condiciones de germinación durante 24 hrs. Las muestras se colocaron sobre una superficie de papel filtro para eliminar el exceso de agua. El grano se seccionó de manera longitudinal y transversal. Las secciones de tejido se realizaron a mano con ayuda de una navaja de rasurar (5 mm de longitud) e inmediatamente se colocaron en agua durante 30 seg. Posteriormente se colocaron en la solución de actividad. Para visualizar la actividad de la peroxidasa *in situ* e *in vivo* se utilizó guayacol. La solución consistió de 440 μL de

guayacol 20 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.58, 440 μ L de amortiguador de fosfatos, pH 6.58 y 20 μ L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 3%). Se permitió el desarrollo de la reacción durante 15 minutos hasta que el color se presentó completamente. La reacción se desarrolló en ausencia de luz. Finalmente el tejido se transfirió a un recipiente con agua destilada y se agitó suavemente por algunos minutos. Se observó bajo un microscopio óptico y de disección Zeiss. Se fotografió con una cámara digital Epson (Modelo Photo PC 800).

5.7 Desarrollo de la Población para Cartografía Genética

5.7.1 Selección de Líneas y Desarrollo de Cruzas.

Se seleccionaron dos poblaciones (Pob. 21 y Pob. 28) para cartografía provenientes del programa de mejoramiento de maíz que realiza el CIMMYT para zonas tropicales. El primer grupo de cruzas de líneas mejoradas corresponde a los genotipos blancos mientras que el segundo grupo se integró a por los genotipos amarillos. Estos genotipos fueron incrementados durante el ciclo de primavera 1998B en la estación experimental de Tlaltizapán, Morelos. En 1999 se desarrollaron la cruzas de estos materiales en la estación experimental de CIMMYT en Poza Rica, Veracruz, México (20.26°N, 60.0m snm). Del primer grupo (blancos) se obtuvieron 20 cruzas mientras que del segundo grupo (amarillos) se obtuvieron 56 cruzas. Durante el ciclo de invierno 1999A se desarrollo la F_1 en la estación de Poza Rica y las siguientes generaciones en 1999B, y 2000 A en ambas estaciones.

5.7.2 Evaluación y Selección de Cruzas

Las cruzas procedentes de las líneas fueron inicialmente evaluadas para su selección utilizando como criterios los aspectos agronómicos básicos como el aspecto de la planta, la altura, la coloración foliar, el número de mazorcas y el aspecto de las mismas. De esta selección preliminar se descartaron 16 de 20 cruzas del genotipo amarillo y 52 de 56 del blanco. Las ocho cruzas resultantes fueron sometidas a evaluación y selección en bioensayos con *S. zeamais* así como un ensayo exploratorio de los perfiles de dureza de grano en las diferentes familias. El bioensayo se realizó durante tres meses y al final se obtuvieron datos de porcentaje de daño y pérdidas producidas. Estos parámetros fueron

utilizados como criterios de exclusión para seleccionar la cruza a utilizar en el desarrollo del mapa genético (Tabla 6.2.1). Las líneas seleccionadas para la generación del mapa genético fueron CML290 y Muneng-8128 de cuya cruza se generaron 163 familias segregantes.

5.7.3 Diseño Experimental en Campo de la Población de Cartografía

Las familias de segregación procedentes de la cruza CML290 X Muneng-8128 (163) fueron avanzadas a F₂ y F₃ durante los ciclos de 2000B y 2001A en la estación experimental de Tlaltizapán, Morelos, México (18°41' N, 940 m snm). Las familias fueron evaluadas en dos replicas de 12X13 bajo el diseño de alfa lattice. Los surcos fueron de 5.0 m de longitud con 0.17 cm de distancia entre ellos. Los lotes fueron sembrados manualmente, cada una con al menos 25 plantas. Esta siembra se realizó con aproximadamente 20 cm de distancia entre plantas. Los regímenes de cultivos y fertilidad fueron consistentes con los parámetros óptimos de producción de maíz en esta región. Las condiciones climáticas fueron medidas en la estación para complementar los parámetros de crecimiento de las plantas. Los parámetros agronómicos básicos fueron evaluados: aspecto de la planta, altura, coloración foliar, número de mazorcas y aspecto de las mismas.

5.8 Bases Genómicas de la Resistencia a *Sitophilus zeamais*

5.8.1 Obtención del Material Genómico y Calidad de DNA

5.8.1.1 Cosecha de Tejido Foliar.

En 1999 se realizó la cosecha de hojas de las plantas de los progenitores de la cruza así como las familias F₂ generadas de la cruza (163) provenientes de la estación experimental de Poza Rica, Veracruz. Se seleccionaron las hojas de al menos 10 plantas sin áreas necróticas o lesiones y se cosecharon cuando la planta tenía 8 hojas de desarrollo. Las hojas se liofilizaron y molieron en un molino mecánico (Tecator Cyclotec Sample Mill, Modelo 1093) hasta obtener un polvo fino. Este se colocó en un frasco de plástico para detección de centelleo. Las muestras molidas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.8.1.2 Aislamiento del ADN Genómico

Se pesaron de entre 300-400 mg de tejido liofilizado de hoja en un tubo de polipropileno de 15 mL para centrifuga. Se agregaron 9.0 mL amortiguador CTAB (Tris 1 M, pH 7.5; NaCl 5 M; EDTA 0.5 M, pH 8.0; CTAB 1% y BME 14 M) para extracción previamente calentado a 65°C. Se mezcló e incubó durante 60-90 min con agitación constante. Transcurrido este tiempo se retiraron los tubos del horno y después de 5 min de enfriamiento, a temperatura ambiente, se agregó 4.5 mL de cloroformo/octanol (24:1). Se agitaron suavemente los tubos durante 10 min para mezclar. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 1500 g a temperatura ambiente. La capa acuosa superior se colocó en otro tubo de 15 mL. Se agregó 4.5 mL de cloroformo/octanol al botón y se repitió el proceso. Después de la centrifugación, la capa acuosa superior se traslado a otro tubo de 15 mL que contenían 25-50 µL de RNasa (10 mg/mL) previamente hervida. Se mezcló invirtiendo suavemente los tubos y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar esta etapa se agregaron 6.0 mL de isopropanol (2-propanol) y se mezcló suavemente. El DNA se precipitó y se retiró con ayuda de un gancho de vidrio. El gancho con DNA se colocó en un tubo de plástico de 5 mL que contenía 3-4 ml de la solución de lavado 1 (EtOH 76%, NaOAc 0.2 M) durante 20 min. Posteriormente se enjuagó en 1-2 mL de la solución de lavado 2 (EtOH 76%, NH₄Oac 10 mM) por un espacio breve y se transfirió a un tubo de plástico de 5 mL que contenía 1 mL de solución de TE (Tris 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 M y NaCl 10 mM). El gancho se giró suavemente hasta que el DNA se deslizó del gancho. Finalmente el tubo se tapó y se colocó en agitación a temperatura ambiente hasta el día siguiente. El DNA disuelto se almacenó a 4°C (Hoisington et al., 1994)

5.8.1.3 Cuantificación y Control de Calidad del DNA

La cuantificación de DNA se realizó mediante espectrofotometría de UV. Se agregaron 15 µL de cada muestra a 735 µL de TE, se mezcló suavemente y se leyó a 260 y 280 nm. La muestra se diluyó a 0.3 µg/µL con TE y se almacenó a 4° C.

$$\text{DNA Total } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{DO } 260 \times 50 \text{ (factor de dilución)} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}) / 1000$$

Se determinó la relación 260/280 con el fin de evaluar la pureza de la muestra. Se verificó el 20% de las muestras, tomando una selección totalmente aleatoria. Después de cuantificar y ajustar la concentración de DNA a 0.3 µg/µL se preparó una dilución de 10

ng/ μ L de las muestras seleccionadas (4 μ L de DNA a 0.3 μ g/ μ L + 116 μ L de TE). Se cargaron 100 ng de cada muestra diluida, es decir 10 μ L de DNA más 2 μ L de 5XSGB (Tris 1M, pH 8.0; EDTA 0.5 M, pH 8.0; Sacarosa al 50%, Azul de bromofenol 2mg/mL; sal sódica) en un gel de agarosa al 0.7%. Se incluyó en un carril DNA lambda no fragmentado como marcador de peso molecular a una concentración de 100 ng. Este marcador sirvió para verificar tanto la calidad como la cantidad de DNA de las muestras. Se corrió el gel a 50 mA por 90 min (ver sección de electroforésis en gel de agarosa; Hoisington et al., 1994).

5.8.1.4 Prueba de la Digestibilidad del DNA

Se colocaron 2 μ g de cada muestra de DNA en un tubo de 0.5 mL para centrifuga. Se preparó una mezcla de digestión por separado y se colocó bajo hielo húmedo. Esta consistió de 7.0 μ L de DNA (0.3 μ g/ μ L), 5.6 μ L de agua bidestilada, 1.5 μ L de amortiguador TE (10X), 0.4 μ L de espermidina (0.1 M), 0.5 μ L de enzima (10 U/ μ L Eco RI o HindIII). Se incubó a 37°C durante 1.5 a 3 h. La reacción se detuvo agregando 3 μ L de 5X SGB. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0.7 % y se corrieron a 40 mV durante 2-3 h. Se utilizó DNA Lambda digerido con HindIII como marcador de peso molecular (ver sección de electroforesis en gel de agarosa; Hoisington et al, 1994).

5.8.1.5 Electroforesis en Gel de Agarosa

Para preparar los geles de agarosa al 0.7% se pesaron 0.70 g y se agregan 100 ml de amortiguador para gel TAE (Tris 400 mM, Acetato de Sodio 50 mM, EDTA 7.7 mM) 1X. Se derritió la agarosa en un horno de microondas, mezclando varias veces durante el calentamiento. Se enfrió a 55°C manteniendo el recipiente cubierto para evitar evaporación. Al mismo tiempo se colocó una cinta adhesiva en los extremos de la charola del gel o bien los soportes de plástico destinados para estos. La agarosa se midió en una probeta y posteriormente se vertió en la charola e insertaron los peines. Se eliminaron las burbujas. Se permitió que solidificara durante 30 min. Las cintas de la charola se retiraron y ésta se colocó en un tanque de electroforésis que contenía amortiguador TAE 1X para gel. Se colocó amortiguador hasta cubrir 0.5 cm el gel. Inicialmente las muestras en el gel se corrieron a 100mA durante 5 min y posteriormente se colocaron a 40 mA de corriente constante hasta que el colorante azul de bromofenol emigró hasta justo antes del siguiente

conjunto de pozos. Al finalizar el corrimiento la charola se retiró del tanque y se colocó en una charola de tinción con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de bromuro de etidio durante 20 minutos con agitación lenta. El gel se enjuagó con agua destilada durante 10 min y se colocó en un transiluminador UV. Se tomaron fotos con una cámara Fotodyne PCM-10 con película polaroid tipo 667 y exposición de 5 seg (Hoisington et al., 1994).

5.8.2 Ensayos con RFLPs

El DNA genómico extraído fue digerido con enzimas de restricción EcoRI y HindII. Los fragmentos de DNA resultantes se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon con carga por el procedimiento de transferencia de Southern. La hibridación de membranas se realizó con 100 sondas de DNA con una o más copias a la vez, todas provenientes de la colección de sondas disponibles de la Universidad de Missouri (Gardier et al., 1993). Estas combinaciones enzima-sonda produjeron un total de 75 RFLP marcadores. Las sondas se marcaron con digoxigenina-dUTP y los fragmentos de DNA se detectaron por medio de luminiscencia con CSPD de acuerdo con Hoisington et al (1994).

5.8.3 Ensayos con SSRs

El DNA genómico se diluyó a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se utilizaron cebadores o iniciadores de DNA con secuencias determinadas provenientes de la colección de “primers” disponibles de la Universidad de Missouri, <http://www.agron.missouri.edu>. La amplificación de estos iniciadores se realizó por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La mezcla de reacción se describe en Hoisington et al. (1994). A esta mezcla se le colocó 25 μL de aceite mineral y se centrifugó. Posteriormente las placas se colocaron en el termo-ciclador (MJ Research DNA Engine Tetrad, System Thermocycles) y se amplificaron bajo programa para amplificación de SSRs largo y corto (Hoisington et al., 1994).

5.8.3.1 Electroforesis en Gel de Agarosa para SSRs

Los fragmentos de DNA amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa (SFR, Sigma ó Metaphor: Seakem proporción 1:1) al 4%. Los geles se prepararon en amortiguador para geles 1X TBE (Tris-Borato 0.45 M, EDTA 10 mM). Se derritió la agarosa en un horno de microondas y se eliminaron las burbujas con vacío. La agarosa se

vertió en la charola eliminando burbujas y permitiendo la solidificación durante 30 min. El gel se corrió a 150 Volts durante 5 min en un tanque de electroforesis (Sunrise TM 96 o 192, Life Technologies) con amortiguador 1X TBE. Posteriormente se colocó a 140 mA de corriente constante hasta que el colorante azul de bromofenol haya emigrado hasta justo antes del siguiente conjunto de pozos (2-3 hrs). Para la evaluación de polimorfismo en las líneas progenitoras, se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió a una y 3 hrs (Hoisington et al, 1994)

5.8.4 Generación y Diseño del Croquis Molecular

5.8.4.1 Captura y Análisis de Datos Genotípicos de RFLPs y SSRs

Para cada sonda (RFLPs) o iniciador (SSRs) utilizado como marcador molecular se obtuvieron los datos de segregación de polimorfismo en la población F_2 . Los datos fueron capturados utilizando el programa HIPERMAPDATA versión 1.6 (Applied Biotechnology Lab, CIMMYT, Int. México). Este programa permitió la captura de datos de los marcadores en diferentes hojas de trabajo, así como la verificación, análisis estadístico de segregación y la exportación posterior de datos genotípicos. La segregación de proporciones Mendeliana de cada locus marcador en la progenie se analizó mediante la prueba de Chi-cuadrada. Se calculó para la F_2 proporciones Mendelianas para características co-dominantes 1:2:1 y para dominantes del progenitor A, 3:1, mientras que para el B, 1:3 con significancia estadística de al menos $P < 0.05$.

5.8.4.2 Construcción del Cartograma

La construcción del mapa o análisis cartográfico basado en los marcadores moleculares se realizó con el programa MAPMAKER (Lander, et al, 1987) versión 2.0 (Whitehead Institute, Cambridge MA). Para declarar la existencia de ligamiento significativo entre dos marcadores, se fijaron los umbrales de LOD (Log_{10} de la máxima probabilidad de ligamiento entre dos estimaciones) en 3.0 y la frecuencia de recombinación máxima en 0.4. Las distancias entre marcadores en el cartograma genético se estimaron con las frecuencias de recombinación y se transformaron en centiMorgans (cM) usando la función cartográfica de Haldane. Se permitió un máximo de distancia entre marcadores de 40 cM. Como referencias para localizar los loci se utilizaron cartogramas genómicos de

maíz públicos (Gardier et al., 1993, Davis et al., 1999; MaizeGDB DataBase, Universidad de Missouri y del Brookhaven National Laboratory, www.agron.missouri.edu).

5.8.4.3 Datos fenotípicos

Semillas provenientes de las 163 plantas F₂ (grano F₃, ver sección 5.7) fueron separadas de cada familia para obtener datos fenotípicos. Se realizaron tres grupos de pruebas de resistencia consistentes en parámetros biológicos, biofísicos y bioquímicos. Se evaluaron bioensayos de resistencia en contacto con el insecto obteniendo datos durante dos periodos o ambientes de estudio. Los parámetros fueron: índice de susceptibilidad o Dobie, tiempo promedio de desarrollo, progenie, producción de harina, porcentaje de pérdida y porcentaje de daño (de forma similar a la sección 5.4).

En el ámbito bioquímico se determinó la concentración de ácidos fenólicos adheridos a la pared celular del pericarpio. Estos incluyeron: ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-felúrico, ácido *cis*-felúrico, ácido 8-5 difelúrico, ácido 5-5 difelúrico, ácido 8-O-4 difelúrico, ácido 8-5 difelúrico forma benzofuranosida, ácidos difenólicos totales, ácidos fenólicos totales (ver sección 5.6.2). También se determinaron en fracciones dos amidas aromáticas: diferuloil-putrescina y *p*-coumaroil-feruloil-putrescina (ver sección 5.6.5). Además se determinó en una sola época la concentración de extensinas solubles y adheridas a la pared celular en 70 familias de la población (ver sección 5.6.6). Respecto a los parámetros biofísicos se determinó en dos épocas la dureza del grano y en una época el peso del pericarpio (ver sección 5.5).

Cuando los datos fenotípicos se obtuvieron en dos ambientes se sometieron a un análisis de varianza para estimar los componentes de la varianza y calcular las heredabilidades en sentido estrecho (Hallauer y Miranda, 1988; Knapp et al., 1995). Se calcularon los coeficientes de correlación para conocer la similitud de respuesta en los distintos ambientes estudiados.

5.8.4.3 Determinación de QTLs de Susceptibilidad y Resistencia

Se usaron los datos genotípicos y fenotípicos obtenidos en los distintos ambientes y se correlacionaron mediante el programa de cartografía de intervalos compuestos (CIM) propuesto por Jansen y Stam (1994) y Zeng (1994) y modificado por Jiang y Zeng (1995), para conformar un análisis combinado de ambientes múltiples.

La hipótesis para la presencia de un QTL se evaluó usando cuatro variantes del modelo descrito por Bohn et al. (1996): 1) Modelo I, cartografía de intervalo simple (SIM) para la selección de los cofactores no ligados; 2) Modelo II, cartografía de intervalo compuesto con marcadores no ligados como cofactores (Zeng, 1994); 3) Modelo III, cartografía de intervalo compuesto con marcadores seleccionados como cofactores y dos marcadores flanqueando el intervalo bajo prueba en un tamaño de intervalo a 30 cM (Zeng, 1994); y 4) Modelo IV, al modelo III se le modifica el tamaño de intervalo a 20 cM. Se considero que existía un QTL donde quiera que las proporciones de máxima verosimilitud (LR, “Likelihood ratio”) fueran significativas en el análisis separado para un ambiente o en el análisis combinado, manifestándose al menos en dos de los modelos propuestos, siendo uno de ellos por definición el modelo III.

Para detectar los QTLs se consideraron tres grados de libertad (por ser una población F_2). Para un ambiente se consideró un LR de 13.81 (equivalente a $LOD = 3.0$) y $LR = 11.51$ ($LOD = 2.5$). Estos valores críticos son equivalentes en significancia a un nivel de $\alpha = 0.00317$ y $\alpha = 0.00925$ respectivamente. Por lo tanto los valores críticos de α en dos ambientes fueron de 0.00317 ($LR = 17.52$), 0.00925 ($LR = 15.270$) y 0.0266 ($LR = 12.67$). El valor crítico para la prueba de significancia en el cálculo de la interacción QTL X Ambiente, para dos ambientes fueron: $LR = 5.99$ ($X^2_{0.05}$) y $LR = 9.21$ ($X^2_{0.01}$).

También se calcularon los valores de aditividad y dominancia para cada QTL obtenido con el modelo III. Los valores negativos en los efectos aditivos estimados, significan que el efecto de sustitución de un alelo A del progenitor susceptible por un alelo B del progenitor resistente, tiende a reducir el daño o la respuesta de susceptibilidad o parámetro en ese locus. Por su parte, los valores negativos en los estimados de dominancia indican que el promedio de los heterocigotos (AB) reduce el daño o la respuesta de susceptibilidad en comparación con la media de los dos homocigotos (AA y BB). El tipo de acción génica para los QTLs detectados se analizó mediante la proporción de dominancia (DR) propuesta por Stuber et al. (1987), en el cual $DR = |d/a|$ y se considera aditiva para $DR < 0.2$, dominante parcial para $0.2 < DR < 0.8$, dominante para $0.8 < DR < 1.2$ y sobre-dominante para $DR > 1.2$. El coeficiente de determinación (R^2) se calculó como una medida del grado en que cada QTL explica la varianza fenotípica del carácter. Los R^2 se estimaron mediante análisis de regresión múltiple, de manera particular para cada QTL probable,

considerando el mayor LR obtenido con el modelo III y de forma general, para ambiente estudiado con los valores de LR de cada QTL en dicho ambiente (Bohn et al., 1996).

6.1 Bases Bioquímicas de la Resistencia a *Sitophilus zeamais***6.1.1 Componentes de la Pared Celular del Pericarpio****6.1.1.1 Parámetros de Susceptibilidad**

Los nueve genotipos estudiados mostraron una variación significativa en los parámetros de susceptibilidad (Tabla 6.1.1). Además se observó interacción por ambiente en el caso del daño, progenie e índice Dobie. Los estimados de los componentes de la varianza mostraron que el ambiente contribuye en menos del 10% de la variación fenotípica (datos no mostrados). El ANOVA indicó variación significativa ($P < 0.001$) entre los genotipos para en el caso de daño, pérdida de peso, producción de harina, progenie e índice Dobie. Todos los parámetros de susceptibilidad estuvieron correlacionados entre si ($r > 0.9$, $P < 0.001$). Los genotipos más resistentes fueron la P84 y Sinaloa 35, mientras que los de mayor susceptibilidad fueron CML290 y CML244 x CML349. Sobre la base del índice Dobie se encontraron tres grupos principales: 1) resistente (P84, P84 x P47, Sinaloa 35, Yucatán 7, P47 x P84), 2) moderadamente resistente (P80 y Muneng-8128) y 3) susceptible (CML290 y CML244 x CML349). El análisis de comparación ortogonal de los parámetros de susceptibilidad mostraron una diferencia significativa entre el grupo resistente vs. susceptible ($P < 0.001$).

6.1.1.2 Ácidos Fenólicos de pared Celular, Parámetros Bioquímicos y Biofísicos

Utilizando HPLC fue posible separar tres ácidos simples encontrados en mayor concentración: ácido *p*-coumárico (*p*-CA), ácido ferúlico (*cis*-FA y *trans*-FA) y cuatro isómeros de ácidos diferúlicos (DiFA): 5,5'-DiFA, 8,5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, 8,5'-DiFAB. Los ácidos fenólicos mostraron variación significativa entre los genotipos ($P < 0.01$, Tabla 6.1.2), con excepción del *cis*-FA, el cual es considerado como un producto de la fotoisomerización de *trans*-FA. El *trans*-FA representó más del 70% del total de ácidos fenólicos, mientras que el *p*-CA y DiFA totales representaron el 16% y 8%, respectivamente. Los ácidos difenólicos más abundantes fueron el 5,5' y el 8-O-4'. El análisis ortogonal demostró diferencias significativas entre grupos para el contenido de *p*-CA, *trans*-FA, 5,5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, 8,5'-DiFAB y DiFA totales (Tabla 6.1.2). En todos los casos los genotipos resistentes presentaron la mayor concentración de estos compuestos.

Tabla 6.1.1 Parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* bajo infestaciones artificiales en nueve genotipos de maíz. Datos combinados de 1999 y 2000.

Genotipo	Daño	Pérdida en Peso	Producción de Harina	Progenie	TMD†	Índice Dobie‡	Grupo§
	_____ % _____	_____ g	_____ no	_____ d			
P84 c2	27.23	5.18	0.213	27.60	41.70	3.25	R
P84 x P47	39.09	5.06	0.215	29.20	41.89	3.34	R
Sinaloa 35	24.02	6.79	0.247	36.00	36.82	3.80	R
Yucatán 7	38.45	7.27	0.269	38.20	32.79	4.04	R
P47 x P84	54.37	6.69	0.288	41.20	38.05	4.24	R
P80 c2	65.04	11.25	0.379	53.00	37.62	5.05	MR
Muneng-8128 C0HC1-18-2	61.21	14.96	0.583	74.60	32.32	7.34	MR
CML290	91.56	22.27	0.760	99.80	26.32	11.39	S
CML244 x CML349	94.93	22.61	0.899	109.60	28.40	13.55	S
Media	55.10	11.34	0.428	56.57	35.10	6.22	
LSD (0.05)	28.81	6.44	0.302	32.24	5.52	3.41	
Prueba de F ¶	***	***	***	***	***	***	
CV	50.09	64.07	64.91	57.53	16.44	62.71	
G X A#	**	NS	NS	*	NS	*	

* Significativo a $P < 0.05$. ** Significativo a $P < 0.01$. *** Significativo a $P < 0.001$. † TMD, Tiempo medio de desarrollo; n=5. ‡ Valor de 0-5 sugiere que el genotipo es resistente, 6-10 moderadamente resistente y por encima de 11, altamente susceptible. § R, resistente; MR, moderadamente resistente; S, susceptible. ¶ Comparación ortogonal de medias utilizando dos grupos de contraste (resistente vs. susceptible). # Genotipo X Ambiente, interacción durante dos épocas de estudio (1999 y 2000).

Tabla 6.1.2 Contenido de ácidos fenólicos adheridos a la pared celular del pericarpio de nueve genotipos de maíz. Datos de 1999 y 2000.

Genotipo	Ácidos fenólicos†								
	Simples‡			Ácidos Diferúlicos§				Total¶	
	<i>p</i> -CA	<i>cis</i> -FA	<i>trans</i> -FA	5,5'-DiFA	8,5'-DiFA	8-O-4'-DiFA	8,5'-DiFAB	TDiFA	TPhA
	mg g ⁻¹ ps								
P84 c2	3.18	1.06	32.73	2.18	0.84	2.27	1.59	6.88	43.85
P84 x P47	2.25	0.91	26.73	2.18	0.55	2.21	1.57	6.50	36.39
Sinaloa 35	5.50	0.81	25.21	2.31	0.86	2.99	2.28	8.43	39.95
Yucatán 7	3.03	0.90	28.40	2.14	0.85	2.22	1.52	6.73	39.06
P47 x P84	2.29	0.85	22.50	1.75	0.45	1.92	1.22	5.33	30.97
P80 c2	3.22	1.44	29.35	2.15	1.05	2.29	1.54	7.03	41.03
Muneng-8128 C0 HC1	1.91	0.73	28.11	1.80	0.31	0.83	0.63	3.57	34.33
CML290	1.48	0.68	16.74	1.45	0.25	0.76	0.45	2.91	21.82
CML244 x CML349	2.06	0.82	29.00	1.49	0.33	15.1	1.04	4.38	36.27
Media	2.80	0.89	25.97	1.95	0.60	1.86	1.31	5.74	35.40
LSD (0.05)	1.53	0.71	14.11	0.70	0.68	1.11	1.59	2.95	16.22
Prueba de <i>F</i> #	***	*	**	***	***	***	***	***	***
CV	47.31	31.21	22.63	18.22	54.94	44.22	54.94	35.46	22.21
G X A††	*	*	NS	*	***	NS	*	NS	NS

* Significativo a $P < 0.05$. ** Significativo a $P < 0.01$. *** Significativo a $P < 0.001$. † n=3. ‡ CA, ácido coumárico; FA, ácido ferúlico. § DiFA, ácido diferúlico; DiFAB, ácido diferúlico forma benzofuranósida. ¶ TDiFA, ácidos diferúlicos totales; TPhA, ácidos fenólicos totales. # Comparación ortogonal de medias utilizando dos grupos de contraste (resistente vs. susceptible). †† Genotipo X Ambiente, interacción durante dos épocas de estudio (1999 y 2000).

Tabla 6.1.3 Parámetros bioquímicos evaluados en el grano completo y en el pericarpio de nueve genotipos de maíz.

Genotipo	HRGPs†		Grano Completo				Índice de Calidad‡
	Soluble	Pared Celular	Nitrógeno	Triptófano	Lisina	Azúcares	
	— $\mu\text{g g}^{-1}$ ps —		g 100g^{-1} ps				
P84 c2	0.097	1.476	2.09	0.065	0.390	4.10	0.54
P84 x P47	0.106	1.374	1.88	0.060	0.344	5.10	0.56
Sinaloa 35	0.111	1.579	2.24	0.061	0.357	5.30	0.47
Yucatán 7	0.097	1.478	2.32	0.063	0.360	5.00	0.47
P47 x P84	0.077	1.007	1.83	0.058	0.329	5.30	0.56
P80 c2	0.096	1.324	2.12	0.067	0.357	4.30	0.55
Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1	0.120	1.262	1.84	0.057	0.339	4.27	0.50
CML290	0.105	0.917	1.83	0.066	0.363	5.71	0.58
CML244 x CML349	0.092	0.987	1.94	0.052	0.313	6.20	0.47
Medias	0.099	1.305	1.99	0.061	0.352	4.99	0.52
LSD (0.05)	0.053	0.445	0.05	0.010	0.035	0.14	0.04
Prueba de $F\text{\S}$	NS	***	**	NS	NS	***	NS
CV	22.68	20.88	9.44	6.64	15.23	12.23	8.17
G X A#	NS	NS	-	-	-	-	-

** Significativo a $P < 0.01$. *** Significativo a $P < 0.001$. † HRGPs, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total soluble en CaCl_2 y fracción insoluble de paredes celulares del pericarpio. Media de datos combinados de dos épocas. $n = 4$.

‡ Índice de calidad calculado como $\% \text{ triptófano} \times 100 / \% \text{ proteína}$, valor > 0.8 es considerado maíz de alta calidad de proteína. § Comparación ortogonal de medias utilizando dos grupos de contraste (resistente vs. susceptible). # Genotipo X Ambiente, interacción durante dos épocas de estudio (1999 y 2000). –, no determinado.

Tabla 6.1.4 Promedios de las características físicas evaluadas en grano completo y pericarpio de nueve genotipos de maíz.

Genotipo	Grano Completo			Pericarpio			
	Dureza†	Peso‡	Densidad‡	Fibra‡	P/K§	Grosor	
						Embrión¶	Opuesto#
N††	g	g cm ⁻³	mg	µm			
P84 c2	195.36	16.66	0.77	370.44	0.071	98.10	96.10
P84 x P47	183.78	27.88	0.76	393.27	0.060	85.60	88.00
Sinaloa 35	191.63	13.59	0.78	424.35	0.076	94.80	85.80
Yucatán 7	162.40	17.07	0.76	270.65	0.053	72.90	61.10
P47 x P84	174.76	26.76	0.78	363.13	0.057	85.30	80.90
P80 c2	164.27	26.00	0.75	376.13	0.058	70.60	64.20
Muneng-8128 C0 HC1-18-2	152.17	17.81	0.79	231.00	0.067	71.80	71.30
CML290	150.86	22.47	0.74	235.33	0.050	66.80	60.50
CML244 x CML349	140.26	31.50	0.73	405.40	0.048	61.80	62.50
Media	165.19	22.19	0.76	334.19	0.060	78.60	74.50
LSD (0.05)	18.04	0.94	0.01	156.13	0.005	8.92	8.28
Prueba de $F_{‡‡}$	***	**	***	*	***	*	*
CV	17.95	26.74	2.18	25.80	15.67	18.68	20.07

* Significativo a $P < 0.05$. ** Significativo a $P < 0.01$. *** Significativo a $P < 0.001$. † Medias de datos combinados en dos épocas. Total $n = 60$. Genotipo X Ambiente no significativa ($P > 0.1$). ‡ $n = 3$. § P/K, peso seco de las paredes celulares del pericarpio/peso seco del grano completo. $n = 20$. ¶ Grosor del pericarpio en la zona del embrión. $n = 20$. # Grosor del pericarpio en la zona opuesta al embrión, $n = 20$. †† N = Newton. ‡‡ Comparación ortogonal de medias utilizando dos grupos de contraste (resistente vs. susceptible).

Las proteínas del pericarpio determinadas en este estudio incluyeron gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) en forma soluble e insoluble. Las HRGPs de mayor abundancia correspondieron a la fracción insoluble o adherida a la pared celular. Esta fracción representó más del 90% de las HRGPs totales (Tabla 6.1.3). Los genotipos resistentes, tales como Sinaloa 35, Yucatán 7 y P84 presentaron los valores más altos en cantidad de HRGP, mientras que CML290 y CML244 x CML349 presentaron los valores más bajos. El contenido de nitrógeno, triptófano, lisina y azúcares variaron entre los genotipos estudiados (Tabla 6.1.3), presentando en los genotipos resistentes una tendencia de mayor contenido de nitrógeno y menor cantidad de azúcares.

Algunas propiedades adicionales del grano se evaluaron con el fin de analizar posibles relaciones entre las características biofísicas y las de resistencia. Estas características incluyeron la dureza del grano, el peso y la densidad del mismo. Adicionalmente se midieron tres propiedades enfocadas en el pericarpio, denominadas en este caso como fibra, proporción pericarpio/grano (P/K) y grosor (Tabla 6.1.4). Estos parámetros mostraron variación significativa entre genotipos ($P < 0.001$) y diferencias significativas entre los grupos resistente y susceptible ($P < 0.01$). En general, P84 y el control susceptible CML244 x CML349 representaron los valores más extremos.

Se observaron efectos maternos en la herencia de la resistencia a *S. zeamais* entre la cruce de la P84 y la P47. P84 x P47 presentó un nivel mayor de resistencia que su recíproca, sin embargo esta diferencia resultó únicamente significativa ($P < 0.05$) mediante una prueba de *t* para el tiempo medio de desarrollo (MDT), 5,5'-DiFA, ácidos fenólicos totales, densidad, largo y ancho del grano, proporción P/K y grosor del pericarpio (datos no mostrados). Estos datos son consistentes con reportes anteriores donde se establecen los efectos maternos de la resistencia a este insecto (Derera et al., 2001; Dhliwayo y Pixley, 2003).

6.1.1.3 Relación entre los Factores de Susceptibilidad y de Resistencia

La Tabla 6.1.5 muestra los resultados de los análisis de correlación entre los parámetros de susceptibilidad, bioquímicos y biofísicos. Los ácidos fenólicos adheridos a la pared celular del pericarpio correlacionaron negativamente con los parámetros de susceptibilidad. Los ácidos fenólicos totales, diméricos y las HRGPs insolubles correlacionaron de manera inversa con el daño, la producción de harina, progenie e índice Dobie. La fracción soluble de HRGPs no correlacionó con la susceptibilidad. El contenido de nitrógeno del grano correlacionó

negativamente con los parámetros de susceptibilidad, mientras que el contenido de azúcares mostró únicamente una correlación positiva con el índice Dobie.

Las propiedades biofísicas del grano como la dureza, densidad y características del pericarpio (proporción P/K, fibra y grosor) presentaron una relación negativa con la susceptibilidad. La dureza del grano correlacionó significativamente ($P < 0.001$) con HRGPs ($r = 0.61$), 5,5'-DiFA ($r = 0.68$), 8-O-4'-DiFA ($r = 0.77$), 8,5'-DiFAB ($r = 0.68$), total DiFAs ($r = 0.75$), proporción P/K ($r = 0.68$) y grosor del pericarpio ($r = 0.83$).

No se observaron relaciones entre los parámetros de susceptibilidad con el contenido de triptófano, lisina, índice de calidad y peso del grano. El índice de calidad correlacionó con *p*-CA ($r = -0.56$, $P < 0.01$), HRGPs ($r = -0.61$, $P < 0.01$), proporción P/K ($r = -0.44$, $P < 0.05$) y ácidos fenólicos totales ($r = -0.44$, $P < 0.05$).

Las regresiones múltiples avanzadas para predecir los parámetros de susceptibilidad se reportan en la Tabla 6.1.6. Con base en estas regresiones de etapa-discreta, los parámetros de susceptibilidad se predijeron con mayor precisión utilizando HRGPs, dureza del grano, 5,5'-DiFA, y *p*-CA ($r^2 = 0.80$ a 0.92). Utilizando solo los componentes bioquímicos más abundantes a través de un modelo fijo de regresión, la variabilidad en los parámetros de susceptibilidad se explicó por la presencia de HRGPs, dureza del grano, fibra, 8-O-4'-DiFA, y *trans*-FA ($r^2 = 0.77$ a 0.91).

Tabla 6.1.5 Correlaciones de Pearson entre los parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* con propiedades bioquímicas y biofísicas de nueve genotipos de maíz.

Propiedades	Parámetros de Susceptibilidad				
	Daño	Índice Dobie	Producción de harina	Pérdida de Peso	Progenie
<i>Bioquímicos</i> †					
<i>p</i> -CA	-0.681***	-0.525*	-0.549**	-0.516*	-0.534*
<i>cis</i> -FA	-0.153	-0.327	-0.314	-0.286	-0.311
<i>trans</i> -FA	-0.525*	-0.413	-0.369	-0.417	-0.405
5,5'-DiFA	-0.782***	-0.765***	-0.763***	-0.745***	-0.765***
8-O-4'-DiFA	-0.756***	-0.728***	-0.774***	-0.755***	-0.769***
8,5'-DiFA	-0.550*	-0.583**	-0.593**	-0.546**	-0.581**
8,5'-DiFAB	-0.687***	-0.625**	-0.663***	-0.649**	-0.660***
TDiFA	-0.777***	-0.745***	-0.779***	-0.755***	-0.744***
TPhA	-0.639**	-0.602**	-0.582**	-0.604**	-0.604**
HRGPs PC	-0.826***	-0.693***	-0.672**	-0.656**	-0.677***
HRGPs soluble	+0.004	+0.209	+0.278	+0.292	+0.275
Nitrógeno	-0.600**	-0.481*	-0.511*	-0.462*	-0.497*
Triptófano	+0.008	-0.094	-0.131	-0.004	-0.088
Lisina	-0.319	-0.253	-0.286*	-0.189	-0.273
Azúcares	+0.388	+0.498*	+0.387	+0.391	+0.401
Índice de Calidad	+0.401	+0.148	+0.122	+0.167	+0.135
<i>Físicos</i> **					
Dureza	-0.878***	-0.827***	-0.871***	-0.856***	-0.875***
Peso	+0.514*	+0.262	+0.231	+0.196	+0.22
Densidad	-0.574**	-0.543*	-0.451*	-0.506*	-0.460*
Fibra del Pericarpio	-0.488*	-0.472*	-0.527*	-0.554*	-0.538*
Proporción P/K‡	-0.689***	-0.580**	-0.609**	-0.667***	-0.648**
Grosor del Pericarpio§	-0.862***	-0.751***	-0.788***	-0.798***	-0.801***
Grosor del Pericarpio¶	-0.689***	-0.580**	-0.609**	-0.667***	-0.649**

* Significativo a $P < 0.05$. ** Significativo a $P < 0.01$. *** Significativo a $P < 0.001$. † CA, ácido coumárico; FA, ácido ferúlico; DiFA, ácido diferúlico; DiFAB, ácido diferúlico forma benzofuranósida; TDiFA, ácido diferúlico total; TPhA, ácido fenólico total; HRGPs, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total soluble en CaCl_2 y fracción insoluble de paredes celulares del pericarpio. ‡ P/K, peso seco de las paredes celulares del pericarpio/peso seco del grano completo. §Grosor del pericarpio en la zona del embrión. ¶ Grosor del pericarpio en la zona opuesta al embrión.

Tabla 6.1.6 Ecuaciones de regresiones múltiples para predecir parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* utilizando nueve genotipos de maíz.

Parámetro	Ecuación†	P	r ²
Daño	A‡ = 230.9 - 44.95(HRGPs) - 2.173(Dureza) - 0.01031(5,5'-DiFAb) + 0.00178(p-CA)	< 0.0001	0.921
Índice Dobie	B§ = 248.8 - 38.71(HRGPs) - 8.812(Dureza) + 0.054(PF) - 0.0031(8-O-4'-DiFA) - 0.000254(trans-FA)	< 0.0001	0.914
	A = 37.09 - 4.649(HRGPs) - 2.008(Dureza) - 0.00159(5,5'-DiFAb) + 0.00056(p-CA)	0.0001	0.804
Pérdida de Peso	B = 30.77 - 1.859(HRGPs) - 1.266(Dureza) + 0.009(PF) - 0.000847(8-O-4'-DiFA) - 0.0000832(trans-FA)	0.0002	0.774
	A = 7.093 - 6.967(HRGPs) - 3.297(Dureza) - 0.00325(5,5'-DiFAb) + 0.0011(p-CA)	0.0001	0.807
Progenie	B = 61.66 - 1.077(HRGPs) - 2.634(Dureza) + 0.012(PF) - 0.0016(8-O-4'-DiFA) - 0.000186(trans-FA)	0.0001	0.793
	A = 333.5 - 32.50(HRGPs) - 18.46(Dureza) - 0.0113(5,5'-DiFAb) + 0.00474(p-CA)	< 0.0001	0.856
Producción de harina	B = 273.3 - 7.528(HRGPs) - 11.45(Dureza) + 0.064(PF) - 0.0079(8-O-4'-DiFA) - 0.000658(trans-FA)	< 0.0001	0.828
	A = 2.704 - 0.234(HRGPs) - 0.167(Dureza) - 0.00008(5,5'-DiFAb) + 0.00002(p-CA)	< 0.0001	0.828
	B = 2.087 - 0.072(HRGPs) - 0.089(Dureza) + 0.00058(PF) - 0.00008(8-O-4'-DiFA) - 0.000003(trans-FA)	< 0.0001	0.821

† HRGPs, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total soluble en CaCl₂ y fracción insoluble de paredes celulares del pericarpio; PF, fibra del pericarpio; p-CA, ácido p-coumárico; trans-FA, ácido trans-ferúlico; DiFA, ácido diferúlico. ‡ Modelo de regresión en etapas discretas. § Modelo de regresión fijo basado en los componentes bioquímicos y biofísicos más abundantes.

6.1.2 Funciones de la Peroxidasa del Grano de Maíz

6.1.2.1 Datos de Bioensayo y Viabilidad

Con fines comparativos los parámetros del bioensayo y viabilidad obtenidos únicamente de la cosecha 2000 mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre ellos a través del análisis de ANOVA (Tabla 6.1.7), además, se encontraron diferencias en la comparación de grupos resistentes vs. susceptibles al ataque de *S. zeamais* ($P < 0.001$). Los parámetros estudiados presentaron correlaciones significativas y altas entre ellos ($r > 0.9$, $P < 0.001$) y con base en el índice Dobie como criterio de resistencia, se obtuvieron tres grupos de respuesta: 1) resistente, 2) moderadamente resistente, y 3) susceptible (Tabla 6.1.7). Estos resultados corroboran los datos obtenidos en un reporte previo utilizando el mismo germoplasma (García-Lara et al., 2004).

Los datos de viabilidad obtenidos después de 45 días de almacenamiento bajo condiciones subtropicales mostraron diferencias significativas entre los genotipos ($P < 0.05$), sin embargo el análisis de comparación ortogonal no indicó diferencias entre los grupos resistentes vs. susceptibles a *S. zeamais* (Tabla 6.1.7). La pérdida en la viabilidad medida como porcentaje de germinación presentó un decremento promedio de 2.9% en comparación con los controles evaluados antes del almacenamiento. CML244 x CML349 fue la variedad más afectada con una reducción del 8% de viabilidad.

6.1.2.2 Actividad de Peroxidasa

La técnica utilizada para la medición de la actividad de peroxidasa (POD) consistió en probar varios sustratos de la POD como el guayacol, TMB, ácido caféico y ácido ferúlico. Las pruebas realizadas en el embrión demostraron que el guayacol presentó la mayor sensibilidad y precisión en la medición de la actividad de POD (datos no mostrados).

Se detectó actividad de POD en variedades de maíz resistentes a *S. zeamais*. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) en la actividad de POD entre los genotipos y entre las estructuras estudiadas. Actividad de POD fue detectada en el grano completo a nivel del embrión, del endospermo y del área micropilar, esta última incluye la porción inferior del embrión y de la aleurona (Tabla 6.1.8). El método de extracción utilizado en este estudio no permitió detectar actividad de POD adsorbida en las paredes del pericarpio.

Tabla 6.1.7 Datos de bioensayo y viabilidad de nueve genotipos de maíz con diferentes niveles de resistencia a *Sitophilus zeamais*. Datos provenientes de una época, 2000.

Genotipo	Grupo†	Daño	Pérdida	Producción	Progenie	Índice	
			de Peso	de Harina		Dobie‡	Viabilidad§
			%	g	no		%
P84 c2	R	28.82	5.69	0.240	30.67	3.44	97.0
P84 x P47	R	48.80	6.63	0.275	37.67	3.89	100.0
Sinaloa 35	R	28.05	7.72	0.287	43.33	4.28	96.0
P47 x P84	R	64.76	8.47	0.357	49.33	4.85	99.0
Yucatán 7	MR	50.06	9.91	0.394	54.33	5.18	97.5
P80 c2	MR	70.75	12.73	0.498	60.33	5.65	98.0
Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1	MR	65.77	16.64	0.679	86.00	8.70	100.0
CML244 x CML349	S	92.41	23.69	0.861	113.67	12.03	92.0
CML290	S	90.60	24.05	0.815	105.33	12.74	94.0
Media		60.00	12.84	0.490	64.52	6.75	97.1
LSD (0.05)		22.64	4.90	0.233	27.71	2.20	4.0
Prueba de F ¶		***	***	***	***	***	NS
CV		22.0	22.3	27.8	20.5	19.0	1.83

*** Significativo a $P < 0.001$. NS, No significativo. † R, resistente; MR, moderadamente resistente; S, susceptible. ‡ Valor de 0-5 sugiere que el genotipo es resistente, 6-10 moderadamente resistente y por encima de 11, altamente susceptible. § Viabilidad evaluada como porcentaje de germinación. ¶ Comparación ortogonal de medias utilizando dos grupos de contraste (resistente vs. susceptible).

Tabla 6.1.8 Actividad de Peroxidasa, total y específica, de las principales estructuras de nueve genotipos de maíz con diferentes niveles de resistencia a *Sitophilus zeamais*. Data provenientes de una época, 2000.

Genotipo	Actividad Total				Actividad Específica			
	Grano	Embrión	Endospermo	Micrópilo†	Grano	Embrión	Endospermo	Micrópilo†
	U mg ⁻¹ ps				U mg ⁻¹ proteína			
P84 c2	0.328	0.290	2.2E-03	0.038	4.969	4.47	0.817	5.469
P84 x P47	0.306	0.268	1.3E-03	0.038	5.160	4.59	0.582	5.733
Sinaloa 35	0.147	0.131	1.3E-03	0.016	2.500	2.41	0.584	2.594
P47 x P84	0.229	0.209	1.4E-03	0.021	3.325	3.07	0.568	3.576
Yucatán 7	0.174	0.147	7.0E-04	0.027	2.918	2.64	0.296	3.200
P80 c2	0.205	0.168	1.5E-03	0.037	3.928	2.94	0.641	4.915
Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1	0.391	0.352	7.0E-04	0.039	5.160	4.89	0.276	5.430
CML244 x CML349	0.043	0.038	3.2E-04	0.004	0.522	0.56	0.141	0.487
CML290	0.105	0.073	1.3E-04	0.032	2.239	1.27	0.043	3.204
Media	0.214	0.186	1.1E-03	0.028	3.413	2.98	0.448	3.878
LSD (0.05)	0.069	0.039	4.2E-04	0.004	1.417	0.69	0.113	0.830
Prueba de <i>F</i> ‡	***	***	***	***	***	***	***	***
CV	14.32	14.37	31.67	11.79	18.35	15.9	20.31	18.56

*** Significativo a $P < 0.001$. † El área micropilar se removió del grano mediante un corte transversal en la región del pedicelo del grano (ver fig. 2.1). Esta estructura contiene el pedicelo, una pequeña sección del pericarpio, del endospermo, y zona baja del escutelo y raíz del embrión.

‡ Comparación ortogonal de medias utilizando dos grupos contraste basados en la resistencia a *S. zeamais* (resistente vs. susceptible).

La actividad de POD presente en el embrión representó más del 86% de la actividad total, mientras que en el endospermo y la zona micropilar fue de 0.5% y 13% respectivamente. Las actividades específicas fueron altas en el embrión y área micropilar, pero bajas en el endospermo. Se presentaron diferencias significativas en la actividad total y específica de POD por estructura entre los grupos resistentes y susceptibles basadas en la comparación ortogonal (Tabla 6.1.8).

Sin embargo, únicamente en casos como en la actividad total y específica del endospermo y actividad específica de área micropilar, los genotipos resistentes tuvieron mayor actividad de POD. Los efectos genéticos de la actividad de POD se observaron entre la cruce de la P84 y la P47. P84 x P47 presentó mayor actividad del POD, exceptuando en la actividad total del endospermo. Estas diferencias fueron únicamente significativas bajo la prueba de t ($P < 0.05$) para la actividad total y específica del grano embrión y área micropilar (datos no mostrados).

6.1.2.3 Relación entre el Bioensayo de *S. zeamais* y la Viabilidad con POD

Los análisis de correlación entre el bioensayo, la viabilidad y la actividad de POD se muestran en la Tabla 6.1.9. La actividad de POD correlacionó negativamente con los parámetros del bioensayo y positivamente con la viabilidad. Sin embargo, únicamente la actividad total y específica de la POD en el endospermo correlacionó de manera significativa ($P < 0.05$) con el daño, la pérdida de peso, la producción de harina, la progenie y el índice Dobie. Por otro lado, la actividad total y específica de la POD en el grano, el embrión y el área micropilar correlacionó significativamente con la viabilidad del grano. No se encontraron correlaciones significativas entre la viabilidad y los parámetros del bioensayo (datos no mostrados). Las actividades totales y específicas determinadas por estructura correlacionaron positivamente entre en el grano, el embrión y el área micropilar ($r > 0.9$, $P > 0.01$), pero no con las actividades del endospermo

6.1.2.4 Localización Estructural de la POD

La actividad de POD se localizó en granos maduros de P84 resistente a *S. zeamais* (debido a su nivel de actividad) (Fig. 6.1.1). La tinción histoquímica realizada con guayacol en presencia de peróxido demostró que la POD esta activa en el embrión y el endospermo, pero no en el pericarpio (Fig. 6.1b, d), sin embargo, en ausencia de peroxido estas actividades no se detectaron (Fig. 6.1a, c).

Tabla 6.1.9 Correlaciones de Pearson entre parámetros del bioensayo con *Sitophilus zeamais* y las actividades total y específica de la peroxidasa en las principales estructuras de nueve genotipos de maíz. Datos provenientes de una época, 2000.

Componente Actividad		Daño	Pérdida de Peso	Producción de Harina	Progenie	Índice Dobie	Viabilidad
Grano	Total	-0.474	-0.535	-0.460	-0.511	-0.518	0.851**
	Específica	-0.507	-0.601	-0.548	-0.607	-0.596	0.872**
Embrión	Total	-0.487	-0.546	-0.468	-0.514	-0.528	0.847**
	Específica	-0.584	-0.555	-0.589	-0.535	-0.541	0.883***
Endospermo	Total	-0.750*	-0.839**	-0.830**	-0.862**	-0.850**	0.472
	Específica	-0.755*	-0.873**	-0.864**	-0.892***	-0.892***	0.513
Micrópilo	Total	-0.245	-0.309	-0.285	-0.360	-0.314	0.750*
	Específica	-0.419	-0.529	-0.489	-0.557	-0.531	0.825**

* Significativo a $P < 0.05$. ** Significativo a $P < 0.01$. *** Significativo a $P < 0.001$.

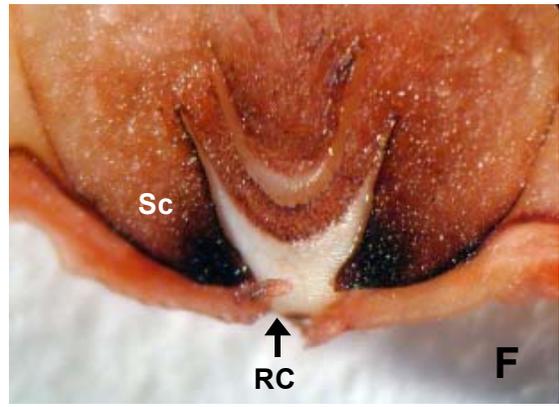
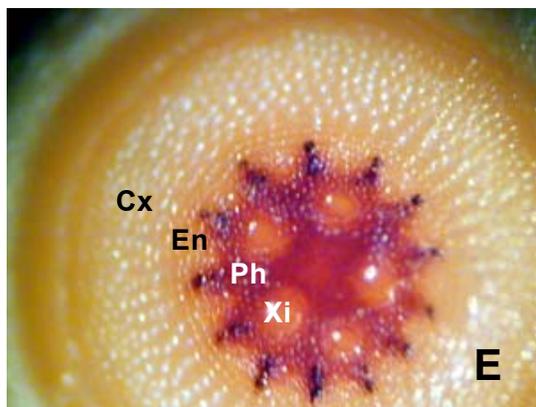
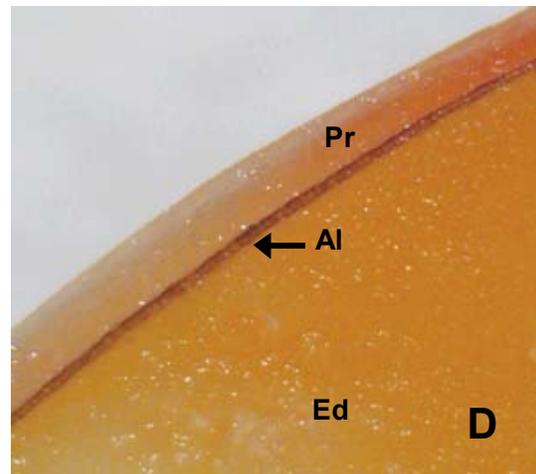
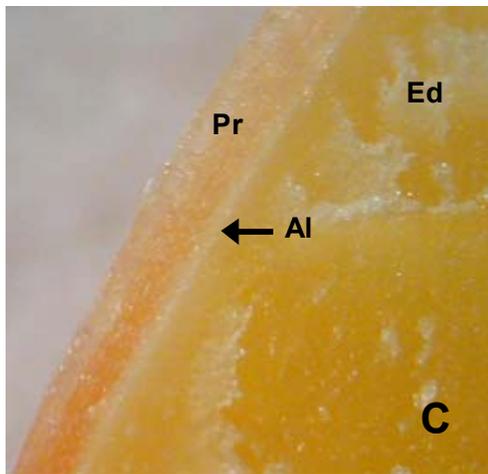
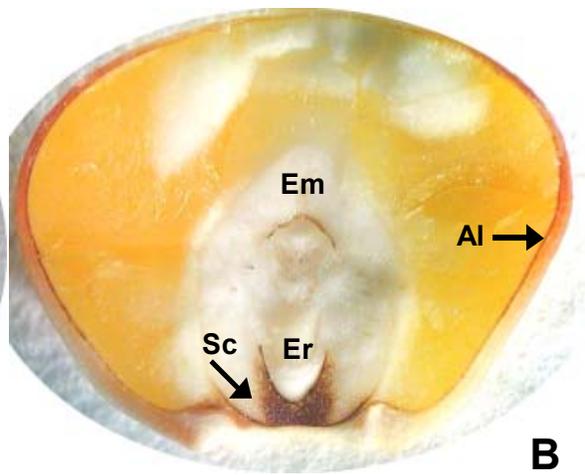
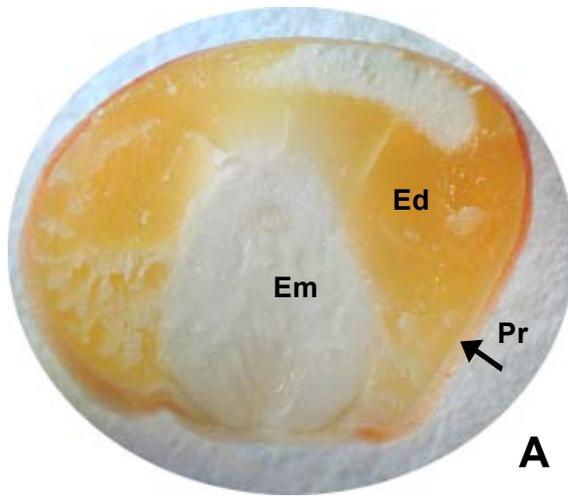


Figure 6.1 Localización de la actividad de Peroxidasa en secciones del grano de maíz teñido con guayacol y H_2O_2 . A y C, Control, corte longitudinal del grano completo incubado con guayacol: no se presenta tinción café en el endospermo (Ed), embrión (Em) o pericarpio (Pr). B y D, Igual que sección A y B, pero adicionando H_2O_2 : tinción café en la aleurona del endospermo (Al), radícula/raíz del embrión (Er) y escutelo (Sc). E, Tinción de una sección transversal de la radícula/raíz: tinción café del cilindro vascular (VC), endodérmis (En) y cortex (Cx). F, Tinción de una sección longitudinal del área de protrusión de un grano germinado (24 hr.): tinción café en el área micropilar: escutelo y aleurona. Coleoriza (Co). Aumentos: A y B, 10x; C, D y E, 40x; F, 20x.

La actividad de la POD en el embrión se localizó en la región basal del escutelo, cercana al área micropilar (Fig. 6.1b), en el cilindro vascular de la radícula y la endodérmis (Fig. 6.1.1e). A nivel del endospermo, la actividad de POD se restringió a la aleurona (Fig. 6.1c). La actividad de POD en granos germinados (24 hr. de imbibición) se localizó en el área de protrusión de la radícula con una intensa tinción en las células del escutelo y aleurona, sin presentarse tinción en la coleoriza (Fig. 6.1d).

6.2 Bases Genómicas de la Resistencia a *Sitophilus zeamais*

6.2.1 Cartografía de QTL asociados con la Susceptibilidad a *Sitophilus zeamais*

6.2.1.1 Mapa de Marcadores Moleculares

El mapa de marcadores moleculares se obtuvo a partir de 163 familias F₂ de la cruce CML290 x Muneng-8128C0HC1-18-2-1-1, utilizando 61 marcadores RFLPs (fragmentos polimórficos de longitud restringida) y 90 marcadores SSRs (secuencias simples repetitivas). Los marcadores y sus diferentes loci generaron un mapa con una distancia total de 2334.3 centiMorgans (cM) y un promedio de distancia entre marcadores de 16.4 cM (Fig. 6.2). En total, 44 loci (30% del total) se determinaron como marcadores dominantes con contribución igual de ambos padres. Siete RFLPs y catorce SSRs presentaron distorsiones significativas de las frecuencias Mendelianas esperadas. Esta desviación representa el 11.8 % de los loci utilizados y se encuentra en el intervalo de distorsión reportada en maíz (Groh et al., 1998; Khairallah et al., 1998). Se encontró una distribución normal en las proporciones del genoma del padre susceptible CML290 entre las 163 familias F₂ con un intervalo de 11.57% a 59.86%, una media de 29.61% y una DS = 7.14%. El padre resistente presentó valores en el intervalo de 22.37% a 54.48%, con una media 37.75% y DS = 6.37%. El nivel de heterocigosidad en plantas F₂ también mostró una distribución normal con variaciones del 21.05% al 53.31%, media de 36.32% y DS = 6.07 %. En los cromosomas 3, 4, y 10 se observó un espacio mayor a los 35 cM, donde no se ubicó ningún marcador molecular disponible. El mapa molecular construido con germoplasma de maíz tropical es consistente con el orden de marcadores RFLP y SSR previamente publicados en otros mapas (Gardier et al., 1993; Davis et al., 1999) y con la posición en bins reportada en la base de datos MaizeGDB database (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>). Pocos marcadores (8 RFLPs y 2 SSRs) fueron cartografiados en posiciones diferentes o nuevas no reportadas con anterioridad (Fig. 6.2).

6.2.1.2 Análisis de Parámetros de Susceptibilidad

Las medias de las líneas paternas y familias F₃ difieren significativamente ($P < 0.005$) entre ellas para el caso de daño de grano (GD), pérdida de peso del grano (GWL), índice Dobie (ID), progenie de adultos (AP), dureza de grano (GH), y proporción pericarpio/grano (P/G) (Tabla 6.2.1). Las líneas parentales presentaron valores intermedios en todos estos parámetros.

Tabla 6.2.1 Media y rangos de parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* y dureza del grano de las cuatro mejores cruzas de la Población 28.

Cruzas†	Daño del Grano		Pérdida de Peso		Progenie		Dureza de Grano					
	Media‡	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango				
	%		%		no	N§						
P28 MG F11 (3x5)	92.6	13.9-99.3	ab	38.3	1.1-84.8	b	168	7-296	b	183	116-223	a
P28 MG F6 (2x6)	86.8	3.1-99.5	b	31.0	0.0-96.5	c	128	27-240	c	186	113-222	a
P28 MG F15 (5x1)	65.2	0.5-99.4	c	20.6	0.0-72.8	d	117	22-298	d	160	96-223	b
P28 MG F8 (3x4)	93.8	65.3-99.4	ab	51.4	20.9-78.5	a	223	95-352	a	169	93-223	b

† 3 X 5 = Muneng-8128 C0HC1-18-2-1-3 X CML290; 2 X 6 = Muneng-8128 C0HC1-18-2-1-2 X CML293; 5 X 1 = CML290 X Muneng-8128 C0HC1-18-2-1-1; 3 X 4 = Muneng-8128 C0HC1-18-2-1-3 X Muneng-8128 C0HC1-1-2-1-3. ‡ Medias con la misma letra indica que no hay diferencias significativas entre estas bajo la prueba de Tukey ($P < 0.05$). § N = Newton.

Tabla 6.2.2 Medias, estimados de los componentes de varianza y heredabilidades para los parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais*. Valores combinados de todos los parámetros para los padres susceptible (S) y resistente (R) y las familias F_{2,3} derivadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

Parámetro	Daño en Grano	Pérdida en Peso	Índice Dobie†	Progenie Adulta	Dureza de Grano	Pericarpio/Grano‡
	%	%		no	N§	
Media						
P(S) ¶	91.56 ± 0.13	22.27 ± 0.65	11.39 ± 0.82	99.80 ± 0.39	150.86 ± 1.19	0.050 ± 0.002
P(R) #	61.21 ± 0.64	14.96 ± 0.55	7.34 ± 0.92	74.60 ± 0.42	152.17 ± 1.63	0.067 ± 0.001
P††	78.07 ± 0.39	18.78 ± 0.60	10.44 ± 0.87	92.10 ± 0.40	151.52 ± 1.01	0.058 ± 0.002
F ₃ ‡‡	72.21 ± 0.34	11.74 ± 0.14	12.09 ± 0.03	118.26 ± 0.87	146.63 ± 0.26	0.050 ± 0.001
Rango	42.8-100.0	3.88-30.07	9.65-14.99	66.95-276.15	115.23-189.37	0.030-0.080
σ^2_g	233.01***	24.75***	0.76***	1302**	6.32**	-
$\sigma^2_{g \times e}$	196.11***	18.35***	1.33***	2178***	24.51**	-
h^2	0.56	0.48	0.34	0.45	0.30	-
90% C.I. de h^2	(0.65-0.45)	(0.58-0.35)	(0.47-0.18)	(0.56-0.32)	(0.44-0.13)	-

** Significativo a la probabilidad < 0.01. *** Significativo a la probabilidad < 0.001. † Valores de 0-5 sugieren que el genotipo es resistente, 6-10 moderadamente resistente, 11-14 susceptible, y encima de 14, altamente susceptible. ‡ N = Newton. § Pericarpio/grano = peso seco de las paredes celulares del pericarpio/peso seco del grano completo. ¶ S, susceptible: CML290. *n* = 7. # R, moderadamente resistente: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. *n* = 12. †† P = Media de padres CML290 y Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. *n* = 19. ‡‡ F = media de familias F_{2,3}. *n* = 163.

La media general para DI y AP en las 163 familias $F_{2:3}$ fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la media de los dos padres (P). De manera inversa, la media de los padres fue mayor que la media de las familias $F_{2:3}$ para el caso de GWL, GD y GH (Tabla 6.2.2). En general se presentó una distribución normal para los datos fenotípicos de las familias $F_{2:3}$, con segregaciones transgresivas en ambas direcciones. Los componentes de la varianza: Genotípica (σ^2_g) y Genotipo x Ambiente ($\sigma^2_{g \times e}$) de la familias $F_{2:3}$ fueron altamente significativas ($P < 0.001$) para todos los parámetros y la heredabilidad (h^2) estimada presentó valores intermedios para GD, GWL y AP, y valores bajos para DI y GH.

Los parámetros medidos durante dos ciclos (2000B y 2001A) mostraron correlaciones altamente significativas ($P < 0.001$) de magnitud intermedia y en la mayoría de las combinaciones (Tabla 6.2.3). El GD y la GWL obtuvieron valores de severidad mayores durante el ciclo del 2000B. Para cada ciclo, de manera independiente, los parámetros se correlacionaron significativamente entre ellos ($r > 0.6$, $P < 0.001$). La dureza del grano correlacionó negativamente con los parámetros de susceptibilidad en ambos ciclos, mientras que la proporción P/G se correlacionó en el ciclo 2001A únicamente con la GWL (Tabla 6.2.3). La heterocigosidad relativa y el porcentaje estimado del genoma procedente de la línea CML290 en familias $F_{2:3}$ no mostraron correlación alguna con GD, GWL, DI y AP (datos no mostrados). Es importante mencionar que las condiciones ambientales variaron entre los dos ciclos de producción. La temperatura mínima y la lluvia total fueron significativamente diferentes (datos no mostrados).

6.2.1.3 Análisis de QTL para Parámetros de Susceptibilidad

Siete áreas genómicas se declararon como probables QTL (Loci de carácter o característica cuantitativa) para el daño en grano generado por *S. zeamais*. Esta detección se realizó bajo el análisis combinado de dos ambientes (dos años en una localidad), utilizando una población F_2 de maíz tropical y con ayuda de un marcador SSR como cofactor (Fig. 6.2, Tabla 6.2.4). Estos QTLs se localizaron en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6 (2 QTLs) y 10. Se encontró una variación considerable en los valores de LR (proporciones de máxima verosimilitud “Likelihood ratio”) para cada ambiente. En general los valores de LR para el análisis combinado de CIM (cartografía de intervalos compuestos) se incrementaron substancialmente en comparación con los valores LR en ambientes simples.

Tabla 6.2.3 Correlaciones fenotípicas entre los parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* y los ambientes evaluados en las familias F_{2:3} generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

2000B Parámetro	2001A				Dureza de Grano (2000B)
	Daño en Grano	Pérdida de Peso	Índice Dobie	Progenie	
Daño en Grano	0.502***	0.288***	0.450***	0.382***	-0.247**
Pérdida de Peso	0.245**	0.382***	0.200*	0.170**	-0.206*
Índice Dobie	0.362***	0.292***	0.631***	0.529***	-0.304***
Progenie	0.481***	0.462***	0.474***	0.488***	-0.110
Dureza del Grano (2001A)	-0.163	-0.144	-0.252**	-0.227**	0.289*
P/G (2001A)†	-0.173	-0.291*	-0.122	-0.086	

* Significativo a la probabilidad < 0.05. ** Significativo a la probabilidad < 0.01. *** Significativo a la probabilidad < 0.001.

† Pericarpio/grano = peso seco de las paredes celulares del pericarpio/peso seco del grano completo.

Tabla 6.2.4. Parámetros asociados con los QTL de daño en grano (GD) y pérdida de peso (GWL) causados por *Sitophilus zeamais*, así como los efectos genéticos estimados a partir de datos de 163 familias F_{2:3} generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

	QTL		LR‡			R ² §	Efecto Genético¶		Acción	
	Cr†	Rango de Marcadores	LR	LOD	QTL x E	Total	Ad	Dom	P#	Génica††
						%				
GD	1.10	<i>bnlg1347-umc12</i>	12.1	2.62	11.8**	5.1	-0.01	0.00	R	A
	3.04	<i>bnlg1019-bnlg1113</i>	11.6	2.51	4.4	0.5	0.07	0.02	S	PD
	4.10	<i>bnlg0589-bnlg1890</i>	15.3	3.22	3.7	0.3	0.08	0.08	S	D
	5.03	<i>phi113-csu68d</i>	13.9	3.01	7.1*	6.2	0.01	0.05	S	OD
	6.01	<i>bnlg1583-umc1083</i>	11.6	2.51	3.1	5.0	-0.03	-0.03	R	D
	6.05	<i>bnlg1443-bnlg1759</i>	19.6	4.25	9.7**	9.5	-0.06	-0.08	R	OD
	10.07	<i>umc1084-bnlg1839</i>	13.3	2.88	12.4**	4.8	0.01	0.02	S	OD
					25.3					
GWL	2.09	<i>bnlg1233-bnlg1520</i>	12.8	2.77	1.0	5.2	0.01	-0.08	S	OD
	4.03	<i>bnlg1126-umc1088</i>	12.0	2.60	8.9*	2.1	0.02	0.04	S	OD
	4.07	<i>umc156-umc104a</i>	11.7	2.54	6.2*	5.2	0.05	-0.02	S	PD
	6.00	<i>bnlg1600-bnlg1538</i>	12.5	2.71	2.0	4.2	0.01	0.08	S	OD
	6.05	<i>bnlg1443-bnlg1759</i>	12.1	2.62	9.9**	2.7	-0.03	0.05	R	OD
	7.01	<i>csu129-umc1016</i>	20.8	4.51	11.2**	10.1	-0.02	0.07	R	OD
					26.9					

*, ** QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas a la probabilidad < 0.05 y < 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ LR, proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores (GD: *bnlg1443*; GWL: *csu29*). Para análisis combinado los valores críticos fueron LR = 17.82 (LOD = 3.0) con $\alpha = 0.0032$, LR = 13.81 (LOD = 2.5) con $\alpha = 0.009$ y LR = 11.51 (LOD = 2.0) con $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # P, Padre de donde los genes de resistencia provienen; S, susceptible: CML290; R, moderadamente resistente: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. †† Acción génica, A: Aditividad, PD: dominancia parcial, D: dominancia, OD: sobre dominancia.

Tabla 6.2.5. Parámetros asociados con los QTL de índice Dobie (ID) y progenie adulta (AP) de *Sitophilus zeamais*, así como los efectos genéticos estimados a partir de datos de 163 familias F_{2:3} generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

	Cr†	QTL		LR‡		R ² §	Efecto Genético¶			Acción
		Rango de Marcadores	LR	LOD	QTL X E	Total	Ad	Dom	P#	Génica††
						%				
DI	1.05	<i>bnlg1832-umc1395</i>	20.4	4.42	0.4	1.0	-0.05	0.03	R	PD
	3.06	<i>bnlg1798-umc3b</i>	12.7	2.75	7.9*	0.5	-0.01	-0.02	R	OD
	3.07	<i>umc3b-bnlg1605</i>	12.7	2.75	9.6**	6.0	0.01	-0.02	S	OD
	3.09	<i>umc63a-bnlg1754</i>	11.9	2.58	7.4**	5.9	0.01	0.02	S	OD
	4.10	<i>bnlg0589-bnlg1890</i>	22.3	4.84	6.2**	4.1	0.07	0.06	S	D
	5.03	<i>phi113-csu68d</i>	11.7	2.54	5.4	6.3	-0.01	0.03	R	OD
	6.05	<i>bnlg11154-mmc0241</i>	11.7	2.54	2.1	4.3	0.02	-0.02	S	D
	7.01	<i>csu29-umc1016</i>	17.7	3.84	17.6**	4.9	0.01	0.01	S	D
	7.03	<i>umc39f-bnlg339</i>	12.7	2.75	9.2*	4.0	-0.02	0.03	R	OD
	9.05	<i>umc1078-bnl8.17</i>	19.8	4.29	18.2**	3.2	0.01	0.01	S	D
						31.5				
AP	1.05	<i>bnlg1832-umc1395</i>	16.0	3.47	1.6	1.9	-0.06	0.05	R	D
	3.04	<i>bnlg1628-bnlg1601</i>	13.5	2.93	3.8	5.0	-0.05	0	R	A
	4.10	<i>bnlg0589-bnlg1890</i>	29.5	6.40	6.5*	1.3	0.13	0.01	S	A
	5.01	<i>npi409-bnlg143</i>	12.3	2.67	6.0	1.3	0.03	-0.01	S	PD
						8.4				

*, ** QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas a la probabilidad < 0.05 y < 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ LR, Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores (DI: *bnlg1798* y *umc1078*; AP: *csu68d* y *umc1078*). Para análisis combinado los valores críticos fueron LR = 17.82 (LOD = 3.0) con $\alpha = 0.0032$, LR = 13.81 (LOD = 2.5) con $\alpha = 0.009$ y LR = 11.51 (LOD = 2.0) con $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # P, Padre de donde los genes de resistencia provienen; S, susceptible: CML290; R, moderadamente resistente: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. †† Acción génica, A: Aditividad, PD: dominancia parcial, D: dominancia, OD: sobre dominancia.

Tabla 6.2.6 Parámetros asociados con los QTL de dureza de grano (GH) y proporción pericarpio/grano (P/G) como probables componentes de la resistencia a *Sitophilus zeamais*, así como los efectos genéticos estimados a partir de datos de 163 familias F_{2:3} generadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

	QTL		LR‡			R ² §	Efecto Genético¶			Acción Génica††
	Cr†	Rango de Marcadores	LR	LOD	QTL X E	Total	Ad	Dom	P#	
						%				
GH	1.02	<i>bnlg1007-bnlg2180</i>	18.8	4.08	8.7*	7.7	-0.03	0.00	R	A
	1.07	<i>umc128-phi094</i>	17.3	3.75	5.3	3.1	-0.04	-0.01	R	PD
	2.08	<i>bnlg1633-umc1042</i>	12.6	2.73	8.5*	2.9	0.02	0.00	S	A
	3.04	<i>bnlg1447-bnlg1904</i>	14.8	3.21	3.2	0.6	-0.04	0.03	R	PD
	6.08	<i>umc62-csu68a</i>	11.9	2.58	1.3	1.6	0.02	-0.02	S	D
	7.04	<i>umc149a-umc151</i>	15.2	3.30	7.5*	7.4	-0.02	0.02	R	D
						22.4				
P/G‡‡	3.06	<i>bnlg1601-bnlg1798</i>	14.9	3.23	-	6.6	-0.09	0.04	R	PD
	3.07	<i>umc3b-bnlg1605</i>	18.2	3.95	-	8.9	0.05	0.08	S	OD
	5.05	<i>mmc0282-bnlg609</i>	11.8	2.56	-	14.7	0.08	0.06	S	D
	8.06	<i>umc81-bnlg1031</i>	14.8	3.21	-	12.0	0.02	-0.14	S	OD
	10.02	<i>bnlg2233-bnlg1023</i>	18.6	4.03	-	22.8	-0.14	0.15	R	D
						57.0				

*, QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas a la probabilidad < 0.05. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ LR, Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores (GH: *bnlg1007* y *umc149a*; P/G: *bnlg2233*). Para análisis combinado los valores críticos fueron LR = 17.82 (LOD = 3.0) con $\alpha = 0.0032$, LR = 13.81 (LOD = 2.5) con $\alpha = 0.009$ y LR = 11.51 (LOD = 2.0) con $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # P, Padre de donde los genes de resistencia provienen; S, susceptible: CML290; R, moderadamente resistente: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. †† Acción génica, A: Aditividad, PD: dominancia parcial, D: dominancia, OD: sobre dominancia.

El segundo QTL de GD ubicado en el cromosoma 6 presentó en valor más alto y significativo de LR y representa la región más importante al explicar casi el 10% de la variación fenotípica (σ_p^2). La interacción QTL X Ambiente (QTL X E) fue significativa ($P < 0.05$) para cuatro QTLs (cromosoma 1, 5, 6 y 10). En su conjunto todos los QTL explicaron el 25.3% de σ_p^2 y el 45.2% de la variación genotípica (σ_g^2). Ambos padres contribuyen con alelos para disminuir el grado de daño en el grano. La acción genética cuantificada mostró características de sobre dominancia, dominancia parcial, dominancia y aditividad.

Se detectaron seis QTLs para la GWL en los cromosomas 2, 4, 6 (2 QTLs) y 7 apoyado de un RFLP como cofactor (Fig. 6.2, Tabla 6.2.4). De estos, cuatro mostraron interacción significativa QTL x E. El QTL localizado en el cromosoma 7 expresó el valor más alto de σ_p^2 (10%). Los seis QTLs en conjunto explicaron el 26.9% de σ_p^2 y el 56.1% de σ_g^2 . Alelos del padre resistente (2 QTLs) y del padre susceptible (4 QTLs) contribuyeron a reducir la pérdida de peso del grano. La acción genética determinada fue principalmente dominancia parcial y sobre dominancia.

Un total de diez QTLs dispersos entre los cromosomas 1, 3 (3 QTLs), 4, 5, 6, 7 (2 QTLs) y 9 se detectaron para el índice Dobie utilizando dos cofactores (Fig. 6.2, Tabla 6.2.5). Siete QTLs mostraron efecto significativo del ambiente. Cinco QTLs fueron significativos en al menos uno de los ambientes, teniendo el ciclo 2001A los valores más altos. El QTL más importante se localizó en el cromosoma 5, el cual expresa 6% de la σ_p^2 . En conjunto estos QTLs explican el 31.4% de σ_p^2 y el 92.5% de la σ_g^2 . Alelos de ambos padres (4 QTLs del resistente y 6 QTLs del susceptible) contribuyen a la reducción del índice Dobie. Los efectos genéticos presentados por estos QTLs fueron de dominancia.

La tabla 6.2.5 muestra información de cuatro QTLs para la progenie adulta explicando el 8.4% de la σ_p^2 y el 18.6% de la σ_g^2 . Dos marcadores se seleccionaron como cofactores. Estos QTLs se localizaron en el cromosoma 1, 3, 4 y 5 siendo uno de ellos afectado por el ambiente (Fig. 6.2). Los QTLs con mayores efectos se localizaron en el cromosoma 1 y 3. Dos QTLs mostraron dominancia, mientras que los restantes mostraron acción genética aditiva. Los alelos para disminuir la cantidad de progenie adulta provinieron de ambos padres en igual contribución.

6.2.1.4 Factores Biofísicos de Resistencia

Seis áreas se declararon como probables QTLs de resistencia para dureza de grano (GH) en dos ambientes y cinco QTLs se encontraron para la proporción pericarpio/grano (P/G) en un solo ambiente explicando el 22.4 y 56.9% de la σ_p^2 respectivamente, así como el 74.7% de la σ_g^2 para GH (Tabla 6.2.6). Estos factores de resistencia se localizaron en el cromosoma 1 (2 QTLs), 2, 3, 6 y 7 para GH, mientras que para P/G en el 3 (2 QTLs) 5, 8 y 10. El primer QTL de GH localizado en el cromosoma 1 presentó el valor más alto de LR, el cual explicó casi el 8% de la σ_p^2 . Tres QTLs presentaron interacciones significativas de QTL X E. Ambos padres contribuyeron con alelos para incrementar la GH y la proporción P/G. Ambas características revelaron efectos genéticos dominantes.

6.2.1.5 Regiones Genómicas Comunes

Siete regiones genómicas se declararon como áreas comunes en los cromosomas 1, 3, 4, 6 (2 regiones) y 7, donde QTLs provenientes de dos o más parámetros de susceptibilidad cartografiaron en la misma posición (hasta 20 cM de distancia) (Fig. 6.2). Las principales asociaciones encontradas fueron entre GD con GWL (6 y 7) y DI con AP (3, 4 y 5). Dos regiones de especial interés se localizaron en el bin 4.10 y 6.05. En estas áreas tres parámetros de susceptibilidad cartografiaron en la misma región. Los factores de resistencia también se localizaron en regiones cercanas a los parámetros de susceptibilidad como en el caso del bin 3.04 (con GD y GH), 3.06 y 3.07 (con DI y P/G).

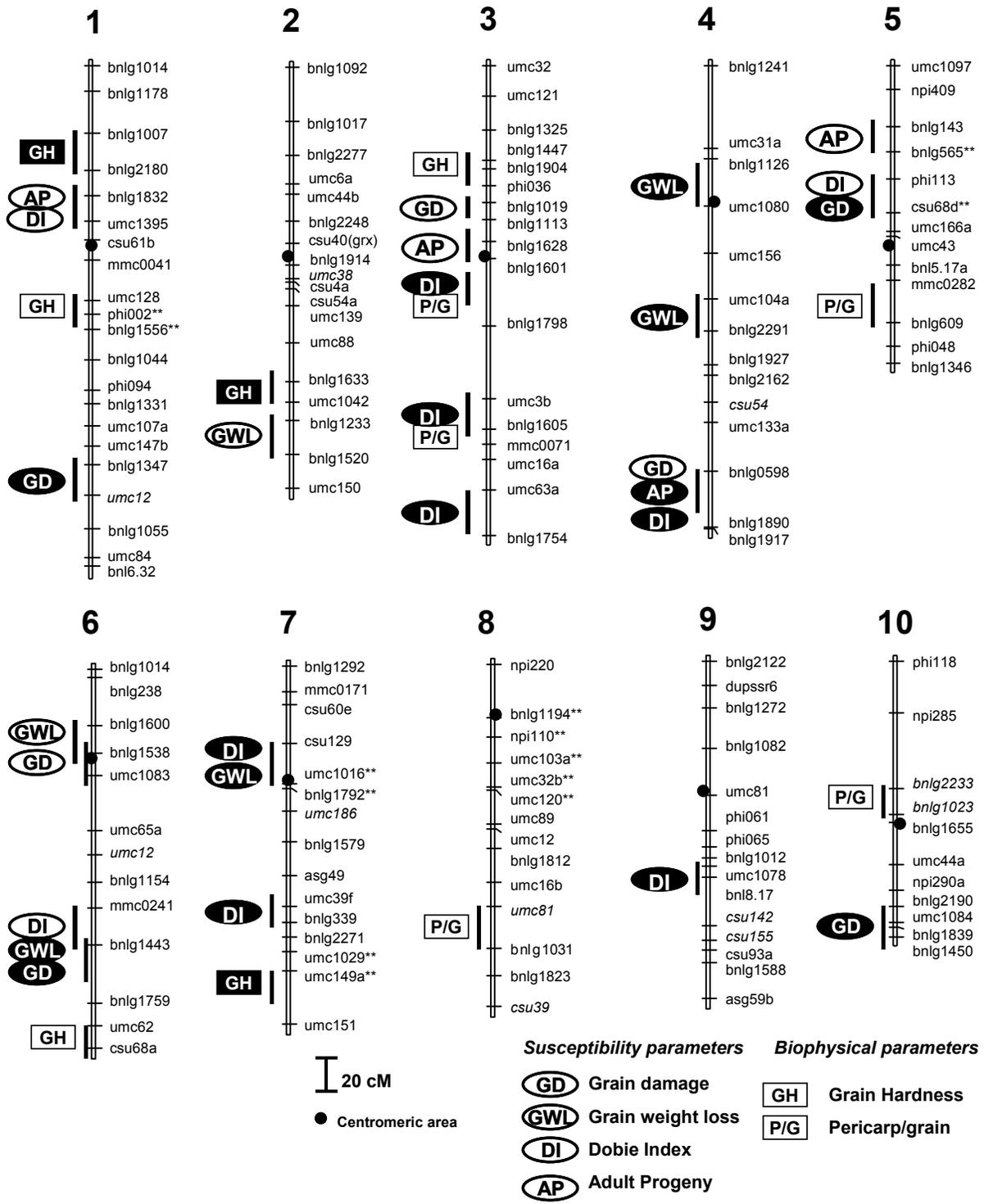


Figura 6.2. Mapa Genómico combinado de RFLP y SSR construido a partir de 163 familias F₂ a partir de la cruza CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. Se muestran las posiciones de QTL aproximadas para la dureza del grano (GD), pérdida de peso del grano (GWL), índice Dobie de susceptibilidad (DI) y progenie adulta (AP) de *Sitophilus zeamais*. Las nuevas posiciones de marcadores se presentan en *itálicas*. **, Loci de segregación distorsionada a una probabilidad del 99.0%. QTL en negritas indica una interacción significativa entre el QTL con el ambiente.

6.2.2 Mapeo Genético de los Mecanismos de Resistencia contra *Sitophilus zeamais*

6.2.2.1 Mapa de Marcadores Moleculares

El mapa de marcadores moleculares se obtuvo a partir de 163 familias F₂ de la cruce CML290 x Muneng-8128C0HC1-18-2-1-1, utilizando 61 RFLPs y 90 SSRs (ver sección anterior). El mapa molecular construido con germoplasm de maíz tropical es consiente en el orden de marcadores RFLPs y SSRs de otros mapas previamente publicados (Gardier et al., 1993; Davis et al., 1999) y con la posición en bins reportada en la base de datos MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>) (Fig. 6.3).

6.2.2.2 Análisis de Parámetros Fitoquímicos y Propiedades Relacionadas

El análisis de compuestos fenólicos por HPLC permitió cuantificar tres principales ácidos fenólicos simples (*p*-CA, *cis*-FA y *trans*-FA), cuatro isómeros de DiFA (5,5'-DiFA, 8,5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, 8,5'-DiFAB) (Tabla 6.2.7) y dos amidas aromáticas (CFP, diferuloil putrescina; DFP, *p*-coumaroil-feruloil putrescina) en las 163 familias segregantes (Tabla 6.2.8). El ácido *trans*-felúrico nuevamente fue el mas abundante y representó el 77.4% del total de estos compuestos en las familias F_{2:3}, seguido del total de DiFA y *p*-CA (11.3% y 7.2%, respectivamente). Los isómeros de DiFA encontrados en mayor concentración fueron el 5,5' y el 8-O-4'. Las proteínas del pericarpio determinadas incluyeron HRGPs en forma soluble e insoluble. Las HRGPs de mayor abundancia correspondieron a la fracción insoluble o adherida a la pared celular (HRGP-I). Esta fracción representó más del 90% de las HRGPs totales (Tabla 6.2.8).

Las medias de las líneas paternas y familias F₃ difieren significativamente ($P < 0.005$) entre ellas para el caso de *p*-CA, *cis*-FA, *trans*-FA, 8,5'-DiFAB, TPhA, DPF, CFP, y HRGP-I ($P < 0.001$). Las líneas parentales presentaron valores extremos para *trans*-FA, 5,5'-DiFA, 8,5'-DiFAB, TDiFA y TPhA, mientras que para el resto de los parámetros presentaron valores intermedios. La media en las 163 familias F_{2:3} para *p*-CA, *cis*-FA, DFP y HRGP-I fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la media de los dos padres (Tabla 6.2.7 y 6.2.8). En general se presentó una distribución normal para los datos fenotípicos de las familias F_{2:3}, con segregaciones transgresivas en ambas direcciones.

Tabla 6.2.7 Medias, estimados de los componentes de varianza y heredabilidades para los ácidos fenólicos del pericarpio. Valores combinados para los padres susceptible (S) y resistente (R) y las familias F_{2:3} derivadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0.

Parámetro	Ácidos Fenólicos †						
	Simples‡			Ácidos Diferúlicos§			
	<i>p</i> -CA	<i>cis</i> -FA	<i>trans</i> -FA	5,5'-DiFA	8,5'-DiFA	8-O-4'-DiFA	8,5'-DiFAB¶
mg g ⁻¹ ps							
Medias							
P(S) #	1.48 ± 0.04	0.68 ± 0.03	16.74 ± 0.41	1.45 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.45 ± 0.02
P(R) ††	1.91 ± 0.11	0.73 ± 0.01	28.11 ± 0.42	1.80 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.63 ± 0.02
$\bar{P}‡‡$	1.69 ± 0.11	0.70 ± 0.03	22.42 ± 2.56	1.63 ± 0.08	0.28 ± 0.01	0.80 ± 0.02	0.54 ± 0.04
F ₃ §§	2.17 ± 0.50	1.25 ± 0.29	23.65 ± 3.19	1.77 ± 0.38	0.21 ± 0.12	0.89 ± 0.14	0.56 ± 0.09
Rango	1.06-3.88	0.69-2.36	15.72-35.19	0.90-3.15	0.03-.59	0.60-1.48	0.19-0.85
σ_p^2	0.208***	0.043***	7.704*	0.057**	0.004**	0.011**	0.006***
σ_g^2	0.165***	0.004	5.239**	0.022**	-0.001	0.004*	0.002**
$\sigma_{g \times e}^2$	0.085	0.078**	4.931**	0.070***	0.008**	0.015**	0.006***
h^2	0.79	0.09	0.68	0.38	-0.14	0.33	0.42
90% C.I.	(0.74, 0.84)	(-0.13, 0.27)	(0.60, 0.74)	(0.23, 0.51)	(-0.42, 0.09)	(0.17, 0.47)	(0.28, 0.54)

*, **, *** Significativo a la probabilidad < de 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. † Compuestos extraídos de fracciones del pericarpio mediante hidrólisis alcalina y separación por medio de HPLC. ‡ CA, ácido coumárico; FA, ácido ferúlico. § DiFA, ácido diferúlico. ¶ DiFAB, ácido diferúlico forma benzofuranósida. # S, susceptible: CML290. *n* = 7. †† R, moderadamente resistente: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. *n* = 12. †† P = Media de padres CML290 y Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. *n* = 19. §§ F = media de familias F_{2:3}. *n* = 163.

Tabla 6.2.8 Medias, estimados de los componentes de varianza y heredabilidades para los ácidos fenólicos totales, amidas aromáticas y proteínas en el pericarpio. Valores combinados para los padres susceptible (S) y resistente (R) y las familias F_{2,3} derivadas de la cruz CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

Parámetro	ácidos Fenólicos Totales †		Amidas Aromáticas‡		HRGPs§	
	TDiFA	TPhA	CFP	DFP	Soluble	Pared Celular
	mg g ⁻¹ dry ps				µg g ⁻¹ ps	
Medias						
P(S) ¶	2.91 ± 0.02	21.82 ± 0.45	0.32 ± 0.01	0.63 ± 0.07	0.10 ± 0.01	0.91 ± 0.13
P(R) #	3.57 ± 0.03	34.33 ± 0.56	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.12 ± 0.01	1.26 ± 0.12
\bar{P} ††	3.24 ± 0.15	28.07 ± 2.81	0.25 ± 0.03	0.41 ± 0.10	0.11 ± 0.01	1.08 ± 0.11
F ₃ ‡‡	3.45 ± 0.59	30.54 ± 3.73	0.38 ± 0.18	0.68 ± 0.37	0.12 ± 0.05	1.32 ± 0.12
Rango	2.17-5.80	21.67-44.14	0.00-1.03	0.08-2.43	0.05-0.28	0.87-1.73
σ_p^2	0.187***	9.961**	0.022**	0.105	-	-
σ_g^2	0.060*	6.159**	0.012**	0.068**	-	-
$\sigma_{g \times e}^2$	0.253***	7.604**	0.021**	0.074*	-	-
h^2	0.32	0.62	0.53	0.65	-	-
90% C.I.	(0.16, 0.46)	(0.52, 0.69)	(0.41, 0.62)	(0.56, 0.72)	-	-

*, **, *** Significativo a la probabilidad de 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. – no determinado debido a que el arámetro se determinó en una sola época. † TDiFA, ácidos diferúlicos totales; TPhA, ácidos fenólicos totales. ‡ CFP, diferuloil putrescina; DFP, *p*-coumaroil-feruloil putrescina. § HRGPs, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total soluble en CaCl₂ y fracción insoluble de paredes celulares del pericarpio. ¶ S, susceptible: CML290. *n* = 7. # R, moderadamente resistente: Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. *n* = 12. †† P = Media de padres CML290 y Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. *n* = 19. ‡‡ F = media de familias F_{2,3}. *n* = 163.

Los componentes de la varianza genotípica (σ_g^2) y genotipo x ambiente ($\sigma_{g \times e}^2$) de la familias F_{2:3} resultaron altamente significativas ($P < 0.001$) para todos los parámetros, con la excepción de *p*-CA ($\sigma_{g \times e}^2$), *cis*-FA (σ_g^2) y 8,5'-DiFA(σ_g^2). La heredabilidad (h^2) estimada presentó valores altos para *p*-CA y *trans*-FA, (0.68 - 0.79), intermedios para 8,5'-DiFAB, TPhA y DFP (0.42 - 65), y bajos para *cis*-FA, 5,5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, 8,5'-DiFA, TDiFA, y CFP (<0.40) (Tabla 5.1, 5.2).

Los compuestos fenólicos de pared celular mostraron correlaciones fenotípicas y genotípicas altamente significativas ($P < 0.001$) entre y durante los dos ciclos (2000B y 2001A) de estudio. Estas correlaciones fueron en su mayoría de magnitud alta e intermedia, sin embargo en el caso de las amidas aromáticas y las HRGPs estas fueron de magnitud baja y significativas solo en algunos casos (Tabla 6.2.9). Para cada ciclo y de manera independiente, los compuestos fenólicos determinados correlacionaron significativamente entre ellos ($r > 0.5$, $P < 0.05$). La heterocigosidad relativa y el porcentaje estimado del genoma procedente del padre resistente en plantas F₂ correlacionaron únicamente con *p*-CA ($r > 0.22$ $P < 0.01$) y DFP ($r > 0.18$ $P < 0.05$).

6.2.2.3 Relación entre los Parámetros de Susceptibilidad vs. Resistencia

La tabla 6.2.10 muestra las correlaciones fenotípicas entre los parámetros de susceptibilidad y los factores fitoquímicos en un análisis combinado de dos ciclos de estudio. Los componentes de la pared celular del pericarpio correlacionaron de manera negativa con los parámetros de susceptibilidad: GD, GWL, DI y AP, mientras que esta relación resulto positiva con la dureza del grano. Las correlaciones más significativas se encontraron para el caso de *p*-CA, *cis*-FA, *trans*-FA y TPhA. Las amidas aromáticas correlacionaron negativamente con GD y en menor magnitud con GH. La fracción insoluble de las HRGPs determinada en un único ciclo correlacionó de manera inversa con los parámetros de susceptibilidad y positivamente con GH (Tabla 6.2.10).

6.2.2.4 Análisis de QTLs para Factores Fitoquímicos

De cuatro a diez áreas genómicas distribuidos a lo largo de los diez cromosomas de maíz fueron declaradas como probables QTLs de los componentes de la pared celular del pericarpio (Tabla 6.2.11 a 13). Estos QTLs en conjunto explican del 25 al 43% de la σ_p^2 y del 50% al 98% de la σ_g^2 de los parámetros estudiados. Alelos procedentes del padre resistente (30%) y del padre susceptible (70%) contribuyen para incrementar el contenido de cada componente.

Tabla 6.2.9 Correlaciones fenotípicas y genotípicas entre los componentes de la pared celular del pericarpio y amidas aromáticas con los ambientes evaluados en las familias F_{2:3} originadas de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1.

Comps†	<i>p</i> -CA	<i>cis</i> -FA	<i>trans</i> -FA	8,5'-DiFA	5,5'-DiFA	8-O-4'-DiFA	8,5'-DiFAB	TDiFA	TPhA	CFP	DFP	HRGP-I‡
<i>p</i> -CA		0.138	0.143	-	0.138	0.279 ⁺	0.234 ⁺	0.299 ⁺	0.326 ⁺	0.322 ⁺	0.184	0.251 ⁺
<i>cis</i> -FA	0.147***		¶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -FA	0.097	0.347***		-	0.352 ⁺	0.439 ⁺⁺	0.357 ⁺	0.409 ⁺⁺	0.963 ⁺⁺	-0.030	-0.050	0.158
8,5'-DiFA	0.424***	0.220***	0.007		-	-	-	-	-	-	-	-
5,5'-DiFA	0.094	0.630***	0.388***	-0.091		0.758 ⁺⁺	0.631 ⁺⁺	0.905 ⁺⁺	0.505 ⁺⁺	0.057	-0.098	0.175
8-O-4'-DiFA	0.250***	0.658***	0.445***	0.188**	0.805***		0.628 ⁺⁺	0.889 ⁺⁺	0.600 ⁺⁺	0.021	-0.162	0.286 ⁺
8,5'-DiFAB	0.201***	0.643***	0.358***	0.249***	0.660***	0.668***		0.793 ⁺⁺	0.509 ⁺⁺	0.066	-0.152	0.095
TDiFA	0.245***	0.717***	0.417***	0.241***	0.928***	0.910***	0.802***		0.601 ⁺⁺	0.147	-0.103	0.212 ⁺
TPhA	0.271***	0.517***	0.964***	0.120*	0.543***	0.613***	0.514***	0.608***		0.052	-0.036	0.214 ⁺
CFP	0.349***	0.091	-0.007	0.353***	0.071	0.056	0.106	0.152***	0.073		0.842 ⁺⁺	-0.002
DFP	0.226***	-0.018	0.003	0.086	-0.046	-0.100	-0.063	-0.046	0.024	0.848***		-0.058
HRGP-I‡	0.248***	0.113	0.139	0.035	0.134	0.230*	0.090	0.186*	0.184*	-0.018	-0.033	

*, **, *** Correlaciones fenotípicas significativas < a 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente. ⁺, ⁺⁺ Correlaciones genotípicas exceden una o dos veces su error estándar respectivamente. † CA, ácido coumárico; FA, ácido ferúlico. § DiFA, ácido diferúlico; DiFAB, ácido diferúlico forma benzofuranósida; TDiFA, ácidos diferúlicos totales; TPhA, ácidos fenólicos totales; CFP, diferuloil putrescina; DFP, *p*-coumaroil-feruloil putrescina. ‡ HRGP-I, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total en la fracción insoluble de paredes celulares del pericarpio. Parámetro evaluado en un único ciclo. ¶ Correlaciones genotípicas no estimadas debido a que la σ_g^2 para *cis*-FA y 8,5'-DiFA resulto no significativa ($P < 0.05$).

Tabla 6.2.10 Correlaciones fenotípicas entre los entre los componentes de la pared celular del pericarpio y amidas aromáticas con los parámetros de susceptibilidad a *Sitophilus zeamais* y dureza de grano en las familias F_{2:3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0.

Comp†	Parámetros de Susceptibilidad‡				
	GD	GWL	DI	AP	GH§
<i>p</i> -CA	-0.161**	-0.184***	-0.208***	-0.208***	0.041
<i>cis</i> -FA	-0.172***	-0.113*	0.008	0.028	0.291***
<i>trans</i> -FA	-0.149**	-0.109*	-0.260***	-0.196***	0.202***
8,5'-DiFA	-0.132*	-0.123*	-0.062	-0.061	0.399***
5,5'-DiFA	-0.117*	-0.084	-0.169**	-0.116*	0.526***
8-O-4'-DiFA	-0.132*	-0.119*	-0.236***	-0.110*	0.330***
8,5'-DiFAb	-0.025	-0.023	-0.033	-0.192**	0.278***
TDiFA	-0.120*	-0.097	-0.166**	-0.128*	0.378***
TPhA	-0.181***	-0.140*	-0.252***	-0.199***	0.251***
CFP	-0.130*	-0.085	-0.131*	-0.141*	-0.119*
DFP	-0.177**	-0.055	-0.096	-0.113*	-0.112*
HRGP-I¶	-0.475***	-0.488***	-0.483***	-0.263*	0.285*
HRGP-S	-0.185	-0.166	0.053	-0.055	-0.190

*, **, *** Correlaciones fenotípicas significativas a 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente. † CA, ácido coumárico; FA, ácido ferúlico. § DiFA, ácido diferúlico; DiFAb, ácido diferúlico forma benzofuranósida; TDiFA, ácidos diferúlicos totales; TPhA, ácidos fenólicos totales; CFP, diferuloil putrescina; DFP, *p*-coumaroil-feruloil putrescina. ‡ GD, Daño en grano; GWL, pérdida de peso del grano; DI, índice Dobie; AP, progenie adulta. § GH, dureza de grano. ¶ ‡ HRGP, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total solubilizadas (S) en CaCl₂ y la fracción insoluble (I) de paredes celulares del pericarpio. Parámetro evaluado en un único ambiente.

Se encontró una interacción QTL X E significativa ($P < 0.05$) en la mitad de los QTLs detectados. Los compuestos con mayor influencia del ambiente fueron *cis*-FA y 8,5'-DiFA. La acción genética determinada para estos QTLs fue 10% aditiva, 48% de dominancia parcial, 20% dominante y 22% sobre dominante. Varias regiones se detectaron como comunes entre los componentes de la pared celular del pericarpio (Tabla 6.2.11 al 13, Fig. 6.3).

De manera particular se detectaron ocho QTLs para *p*-CA dando un valor R^2 total de 39.71%. Los principales QTLs se localizaron en el bin 1.10 y 9.07. Diez QTL se localizaron para *cis*-FA y *trans*-FA explicando el 32 y 47% de la σ_p^2 . Un área común se localizó entre ambos ácidos (bin 3.06/07), aun cuando el *cis*-FA es considerado un producto de la foto isomerización del *trans*-FA. Los mayores QTLs para *trans*-FA se encontraron en éstas áreas además del bin 6.04 y 10.06 (Tabla 6.2.11, Fig. 6.3). En el caso de los cuatro isómeros de DiFAs, treinta y seis QTLs se detectaron, los cuales explicaron entre el 25 al 40% del valor de R^2 total. Los más importantes se localizaron en el bin 3.09 para 5,5'-DiFA, 4.11 para 8,5'-DiFA, 6.04 para 8-O-4'-DiFA, y 6.02 para 8,5'-DiFAB (Tabla 6.2.11, 6.2.12, Fig. 6.3). Se determinaron seis áreas comunes para QTLs de los DiFAs ubicadas en los bins 1.10, 3.09, 4.10, 6.00/01, 6.04 y 8.03. Los parámetros TDiFA y TPhA son producto de la suma de los compuestos simples, éstos en su conjunto explicaron el 33 y 41% de la R^2 total en siete QTLs. La mayoría de estos QTLs cartografió en la mismas áreas de sus compuestos origen. Los principales QTLs para ambos parámetros se localizaron en el bin 6.04 (Tabla 6.2.12, 6.1.13, Fig. 6.3).

Un total de once y nueve QTLs distribuidos en el genoma de maíz se detectaron para las dos amidas aromáticas cuantificadas: CFP y DFP (Tabla 6.2.13, Fig. 6.3). En conjunto los QTLs de ambos compuestos explicó el 43 y 34% de la σ_p^2 respectivamente. Todos los QTLs del CFP presentaron interacciones significativas de QTL x E, mientras que para DFP únicamente cinco resultaron significativos. Los QTLs más importantes para estas amidas se localizaron en el bin 10.06 (CFP), y 7.04 (DFP), los cuales expresaron los valores más altos de σ_p^2 (10 y 8%). Áreas genómicas comunes entre estas amidas se localizaron únicamente en el bin 1.10 y 10.06. Ambos padres contribuyen con alelos para aumentar el contenido de estos compuestos. La acción genética principal caracterizada para las amidas fue dominante (Tabla 6.2.13, Fig. 6.3).

Tabla 6.2.11 Parámetros asociados con QTL de los componentes de la pared celular y sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias F_{2:3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

QTL			R ² §				QTL			R ²		
Cr†	cM	Intervalo de Marcadores	LOD‡	Total R ²	Efecto¶	E#	Cr	cM	Intervalo de Marcadores	LOD	Total R ²	Efecto E
<i>ácido p-Coumárico</i>						<i>ácido cis-Ferúlico</i>						
1.09	197	<i>bnlg1044-phi094</i>	3.53	0.38	0.06	**	1.02	44	<i>bnlg1007-bnlg2180</i>	2.85	0.87	0.01 **
1.10	234	<i>umc147b-bnlg1347</i>	2.91	7.71	0.16		1.10	232	<i>umc107a-umc147b</i>	4.48	4.57	0.06 **
3.06/07	205	<i>umc3b-bnlg1605</i>	3.17	6.05	0.14		2.02	60	<i>bnlg2277-umc6a</i>	2.83	3.81	-0.10
4.05	85	<i>bnlg1126-umc1088</i>	2.75	5.40	-0.01	**	3.06/07	204	<i>umc3b-bnlg1605</i>	2.92	4.77	-0.02 *
6.02	66	<i>umc1083-umc65a</i>	2.51	3.57	0.10		4.05	97	<i>umc1088-umc156</i>	2.60	2.03	0.02
7.00/01	19	<i>mmc171-csu60e</i>	3.03	5.34	0.11		6.05	140	<i>mmc0241-bnlg1443</i>	3.55	11.46	0.02 **
8.02	58	<i>umc103a-umc32b</i>	2.57	5.38	-0.15		8.01/02	27	<i>npi220-bnlg1194</i>	2.70	0.28	0.01 **
9.07	177	<i>csu93a-bnlg1588</i>	2.59	11.58	0.16		8.03	72	<i>umc32b-umc120</i>	3.43	1.22	-0.03 **
				39.71			9.02	28	<i>bnlg1272-bnlg1082</i>	3.32	4.52	0.00 *
							10.02	41	<i>npi285-bnlg2233</i>	3.02	2.57	-0.06
											32.13	

*,** significativo a $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores. LOD = 3.0, $\alpha = 0.0032$; LOD = 2.5, $\alpha = 0.009$; LOD = 2.0, $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas al nivel de probabilidad indicado.

Tabla 6.2.11 (Cont.). Parámetros asociados con QTL de los componentes de la pared celular y sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias F_{2:3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

QTL							QTL						
Cr†	cM	Intervalo de Marcadores	LOD‡	R ² §			Cr	cM	Intervalo de Marcadores	LOD	R ²		
				Total R ²	Efecto¶	E#					Total R ²	Efecto	E
<i>ácido trans-Ferúlico</i>							<i>ácido 5,5'-Diferúlico</i>						
2.09	258	<i>bnlg1520-umc150</i>	3.46	0.87	0.01	**	2.01	1	<i>bnlg1092-bnlg1017</i>	2.67	5.74	0.10	
3.01	22	<i>umc121-bnlg1325</i>	3.54	4.46	0.01		2.06	139	<i>csu54a-umc139</i>	4.06	7.01	0.11	
3.04	75	<i>phi36-bnlg1019</i>	2.63	0.51	0.00	**	3.09	259	<i>umc63a-bnlg1754</i>	2.52	6.72	-0.09	
3.06/07	205	<i>umc3b-bnlg1605</i>	2.66	8.89	-0.01		6.00	33	<i>bnlg1600-bnlg1538</i>	2.50	1.47	0.07	
3.07	238	<i>mmc0071-umc16a</i>	2.81	5.74	-0.01	*	6.05	146	<i>mmc0241-bnlg1443</i>	3.14	4.20	0.00 **	
3.09	288	<i>umc63a-bnlg1754</i>	2.63	3.43	-0.01		8.03	72	<i>umc32b-umc120</i>	3.11	3.77	-0.07 *	
5.03	104	<i>umc166a-umc43</i>	2.81	2.29	0.01						25.88		
6.04	85	<i>umc1083-umc65a</i>	2.52	9.34	0.01								
7.03	142	<i>umc39f-bnlg339</i>	3.50	6.85	0.01								
10.06	125	<i>umc44a-npi290a</i>	4.39	13.76	0.01								
				47.25									

*,** significativo a $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores. LOD = 3.0, $\alpha = 0.0032$; LOD = 2.5, $\alpha = 0.009$; LOD = 2.0, $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas al nivel de probabilidad indicado.

Tabla 6.2.12 Parámetros asociados con QTL de los componentes de la pared celular y sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias F_{2:3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

QTL			R ² §				QTL			R ²				
Cr†	cM	Intervalo de Marcadores	LOD‡	Total R ²	Efecto¶	E#	Cr	cM	Intervalo de Marcadores	LOD	Total R ²	Efecto	E	
<u>ácido 8,5'-Diferúlico</u>							<u>ácido 8-O-4'-Diferúlico</u>							
	1.07	168	<i>bnlg1556-bnlg1044</i>	2.51	2.72	-0.01	*	1.10	233	<i>umc107a-umc147b</i>	3.58	4.30	0.03	*
	1.10	230	<i>umc107a-umc147b</i>	4.19	6.49	-0.01	**	1.10	265	<i>bnlg1347-umc12</i>	2.91	1.80	-0.02	*
	1.10	270	<i>bnlg1347-umc12</i>	3.68	3.71	0.02	*	3.09	283	<i>umc63a-bnlg1754</i>	3.48	7.20	-0.06	
	2.08	224	<i>bnlg1233-bnlg1520</i>	2.69	4.96	0.01	**	4.10	248	<i>umc133a-bnlg0589</i>	3.03	1.98	0.02	**
	4.10	245	<i>umc133a-bnlg0589</i>	2.51	3.38	-0.01	**	5.01	24	<i>npi409-bnlg143</i>	2.68	1.90	0.03	
	4.11	283	<i>bnlg1890-bnlg1917</i>	2.59	7.84	-0.02	*	5.03	89	<i>csu68d-umc166a</i>	2.89	0.78	-0.02	*
	8.01/02	21	<i>npi220-bnlg1194</i>	2.99	0.30	0.01	**	6.04	94	<i>umc1083-umc65a</i>	2.60	6.73	0.04	
	8.03	67	<i>umc103a-umc32b</i>	4.46	5.52	-0.03	*	6.05	140	<i>mmc0241-bnlg1443</i>	2.96	2.57	-0.02	**
	8.07	195	<i>bnlg1823-csu39</i>	2.72	3.16	-0.01	**	6.05	175	<i>bnlg1443-bnlg1759</i>	2.63	2.26	0.01	**
	9.02	14	<i>bnlg2122-dupssr6</i>	3.34	4.12	0.02	**	8.03	73	<i>umc32b-umc120</i>	4.46	5.02	-0.04	**
					33.87							32.41		

*,** significativo a $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores. LOD = 3.0, $\alpha = 0.0032$; LOD = 2.5, $\alpha = 0.009$; LOD = 2.0, $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas al nivel de probabilidad indicado.

Tabla 6.2.12 (Cont.) Parámetros asociados con QTL de los componentes de la pared celular y sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias F_{2:3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

Cr†	QTL			R ² §			Cr	QTL			R ²		
	cM	Intervalo de Marcadores	LOD‡	Total R ²	Efecto¶	E#		cM	Intervalo de Marcadores	LOD	Total R ²	Efecto	E
	<i>ácido 8,5'-Diferúlico forma benzofuranósida</i>							<i>ácidos Diferúlicos Totales</i>					
1.08	182	<i>bnlg1044-phi094</i>	3.57	1.41	-0.04		1.10	233	<i>umc107a-umc147b</i>	2.89	4.53	0.08	*
2.02	33	<i>bnlg1092-bnlg1017</i>	3.05	5.85	0.03		2.01	18	<i>bnlg1092-bnlg1017</i>	3.11	6.72	0.20	
2.08	219	<i>bnlg1233-bnlg1520</i>	3.71	8.12	0.03*		2.08	221	<i>bnlg1233-bnlg1520</i>	2.59	6.01	0.10	*
3.03	39	<i>umc121-bnlg1325</i>	2.63	2.89	-0.01**		3.09	260	<i>umc63a-bnlg1754</i>	2.68	5.25	-0.15	
4.08	215	<i>csu54-umc133a</i>	2.78	2.98	-0.04		6.04	89	<i>umc1083-umc65a</i>	2.50	8.08	0.17	
6.01	49	<i>bnlg1600-bnlg1538</i>	2.62	8.67	0.03		6.05	144	<i>mmc0241-bnlg1443</i>	3.26	5.11	-0.04	**
6.02	73	<i>umc1083-umc65a</i>	3.61	11.00	0.03		8.03	73	<i>umc32b-umc120</i>	4.72	5.08	-0.19	**
6.05	147	<i>mmc0241-bnlg1443</i>	2.50	5.21	-0.01*						33.33		
8.03	74	<i>umc32b-umc120</i>	4.72	4.34	-0.04*								
9.02	9	<i>bnlg2122-dupssr6</i>	2.92	3.44	0.02								
				40.83									

*,** significativo a $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores. LOD = 3.0, $\alpha = 0.0032$; LOD = 2.5, $\alpha = 0.009$; LOD = 2.0, $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas al nivel de probabilidad indicado.

Tabla 6.2.13 Parámetros asociados con QTL de los componentes de la pared celular y amidas, así como sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias F_{2,3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

Cr†	QTL		LOD‡	R ² §		E#	Cr	QTL		LOD	R ²		Ecto E	
	cM	Intervalo de Marcadores		Total R ²	Efecto¶			cM	Intervalo de Marcadores		Total R ²	Efecto E		
<i>ácidos fenólicos Totales</i>						<i>p-Coumaroil feruloil putrescina</i>								
	2.03	76		<i>umc6a-umc44b</i>	2.51	1.88	-0.02	1.10	264		<i>bnlg1347-umc12</i>	4.61	8.80	0.00**
	3.01	18		<i>umc32-umc121</i>	2.93	5.69	0.01	3.01	0		<i>umc32-umc121</i>	3.68	0.95	-0.05*
	3.09	275		<i>umc63a-bnlg1754</i>	4.14	9.62	-0.02	3.03	39		<i>umc121-bnlg1325</i>	2.58	2.35	0.03*
	4.11	283		<i>bnlg1890-bnlg1917</i>	2.82	2.84	-0.01	3.04	79		<i>phi36-bnlg1019</i>	2.94	1.86	-0.05**
	6.04	88		<i>umc1083-umc65a</i>	2.91	10.96	0.01	3.05	131		<i>bnlg1601-bnlg1798</i>	3.65	1.53	0.05**
	7.03	141		<i>umc39f-bnlg339</i>	3.06	5.78	0.01	3.06/07	225		<i>bnlg1605-mmc0071</i>	3.49	2.12	-0.01**
	10.06	126		<i>umc44a-npi290a</i>	2.90	10.33	0.01	3.09	263		<i>umc63a-bnlg1754</i>	3.38	2.62	0.04**
						41.82		5.03	112		<i>umc43-bnl5.71a</i>	2.68	7.72	-0.03*
								6.05	161		<i>mmc0241-bnlg1443</i>	8.34	4.31	0.00**
								8.02	53		<i>npi110-umc103a</i>	2.51	4.20	0.04*
								10.06	132		<i>umc44a-npi290a</i>	4.66	10.16	0.01**
												43.49		

*,** significativo a $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores. LOD = 3.0, $\alpha = 0.0032$; LOD = 2.5, $\alpha = 0.009$; LOD = 2.0, $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. # QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas al nivel de probabilidad indicado.

Tabla 6.2.13 (Cont.) Parámetros asociados con QTL de los componentes de la pared celular y amidas, así como sus efectos genéticos estimados a partir de datos fenotípicos de 163 familias F_{2:3} de la cruce CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1 durante dos ciclos.

QTL						QTL					
Cr†	cM	Intervalo de Marcadores	LOD‡	R ² §		Cr	cM	Intervalo de Marcadores	LOD	R ²	
				Total R ²	Efecto¶ E#					Total R ²	Efecto
<i>Diferuloil putrescina</i>						<i>HRGP-I</i> ††					
1.10	254	<i>bnlg1347-umc12</i>	3.08	0.52	0.05**	2.02	37	<i>bnlg1017-bnlg2277</i>	2.00	5.41	0.09
2.03	95	<i>bnlg2248-csu40(grx)</i>	2.90	4.48	0.01**	3.06	159	<i>bnlg1601-bnlg1798</i>	2.01	7.48	-0.07
4.11	283	<i>bnlg1890-bnlg1917</i>	3.23	3.35	-0.05	5.05	131	<i>bnl5.71a-mmc0282</i>	2.00	4.06	0.02
6.00	20	<i>bnlg238-bnlg1600</i>	3.55	7.41	-0.01*	8.05	107	<i>bnlg1812-umc16b</i>	2.02	8.44	0.16
7.03	141	<i>umc39f-bnlg339</i>	4.59	7.61	0.03	9.03	86	<i>umc81-phi061</i>	2.14	16.8	0.16
7.04	179	<i>umc1029-umc149a</i>	3.37	8.05	-0.06					40.5	
9.05	120	<i>bnlg1012-umc1078</i>	2.77	5.78	0.05	<i>HRGP-S</i> ††					
10.06	150	<i>npi290a-bnlg2190</i>	5.95	7.19	0.01**	1.08	117	<i>csu61b-mmc0041</i>	2.70	5.34	0.08
10.07	140	<i>bnlg2190-umc1084</i>	5.03	4.88	0.01**	3.06	129	<i>bnlg1601-bnlg1798</i>	2.73	7.45	0.04
				34.46		5.05	132	<i>bnl5.71a-mmc0282</i>	2.05	23.61	-0.02
						10.02	50	<i>npi285-bnlg2233</i>	2.24	8.77	0.04
										41.88	

*,** significativo a $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente. †Cr, cromosoma definido en bins. La localización en bin es designada por el código X.Y, donde X es el cromosoma y Y es la localización dentro del cromosoma (Gardiner et al., 1993). ‡ Proporciones de máxima verosimilitud estimadas bajo el modelo II y utilizando marcadores moleculares como cofactores. LOD = 3.0, $\alpha = 0.0032$; LOD = 2.5, $\alpha = 0.009$; LOD = 2.0, $\alpha = 0.026$. § Variación fenotípica explicada por cada QTL y para todos los QTL que afectan el parámetro. ¶ Efectos de QTL estimados en el Modelo I; un valor positivo implica que los alelos del padre susceptible incrementan el valor numérico del parámetro. #. QTL X E, interacciones de QTL X Ambiente significativas al nivel de probabilidad indicado. †† HRGP-I, gluco-proteínas ricas en hidroxiprolina expresadas como equivalentes de hidroxiprolina total solubilizadas (S) en CaCl₂ y la fracción insoluble (I) de paredes celulares del pericarpio. Parámetro evaluado en un único ciclo

En el análisis sencillo de un ciclo de estudio se detectaron cinco y cuatro QTLs para HRGPs en su fracción adherida a la pared celular (HRGP-I) y soluble (HRGP-S). Estos QTL en su conjunto explicaron el 40 y 41% de la σ_p^2 (Tabla 6.2.13, Fig. 6.3). Estas proteínas se localizaron en loci de los cromosomas 2, 3, 5, 8 y 9 para HRGP-I y 1, 3, 5 y 8 para HRGP-S. Estas fracciones mostraron dos áreas genéticas comunes localizadas en los bins 3.06 y 5.05, lo cual puede indicar la localización del un gen. Con respecto a esto, el QTL de mayor importancia para HRGP-I se localizó en el bin 8.05 mientras que para HRGP-S en el bin 5.05 explicando el 8 y 23% de la σ_p^2 respectivamente. Ambos padres contribuyen con alelos para incrementar el contenido de estas proteínas. La acción genética principal caracterizada fue sobre dominante.

6.2.2.5 Regiones Genómicas Comunes para Componentes Fitoquímicos

Los ácidos fenólicos de pared celular y las amidas aromáticas se cartografiaron principalmente en los cromosomas 3, 6 y 8 (Fig. 6.3). Once regiones genómicas se declararon como áreas comunes en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 10, donde QTLs provenientes de tres o más componentes cartografiaron en la misma posición. Las principales asociaciones encontradas fueron entre DiFAs (2.06, 3.09, 4.10, 6.05 y 8.03) ácidos fenólicos simples (3.06 y 6.04), o combinaciones con CFP y DFP (1.10, 4.11, 7.03 y 10.06). Dos áreas específicas para ambas fracciones de HRGPs se localizaron en el bin 3.06 y 5.05.

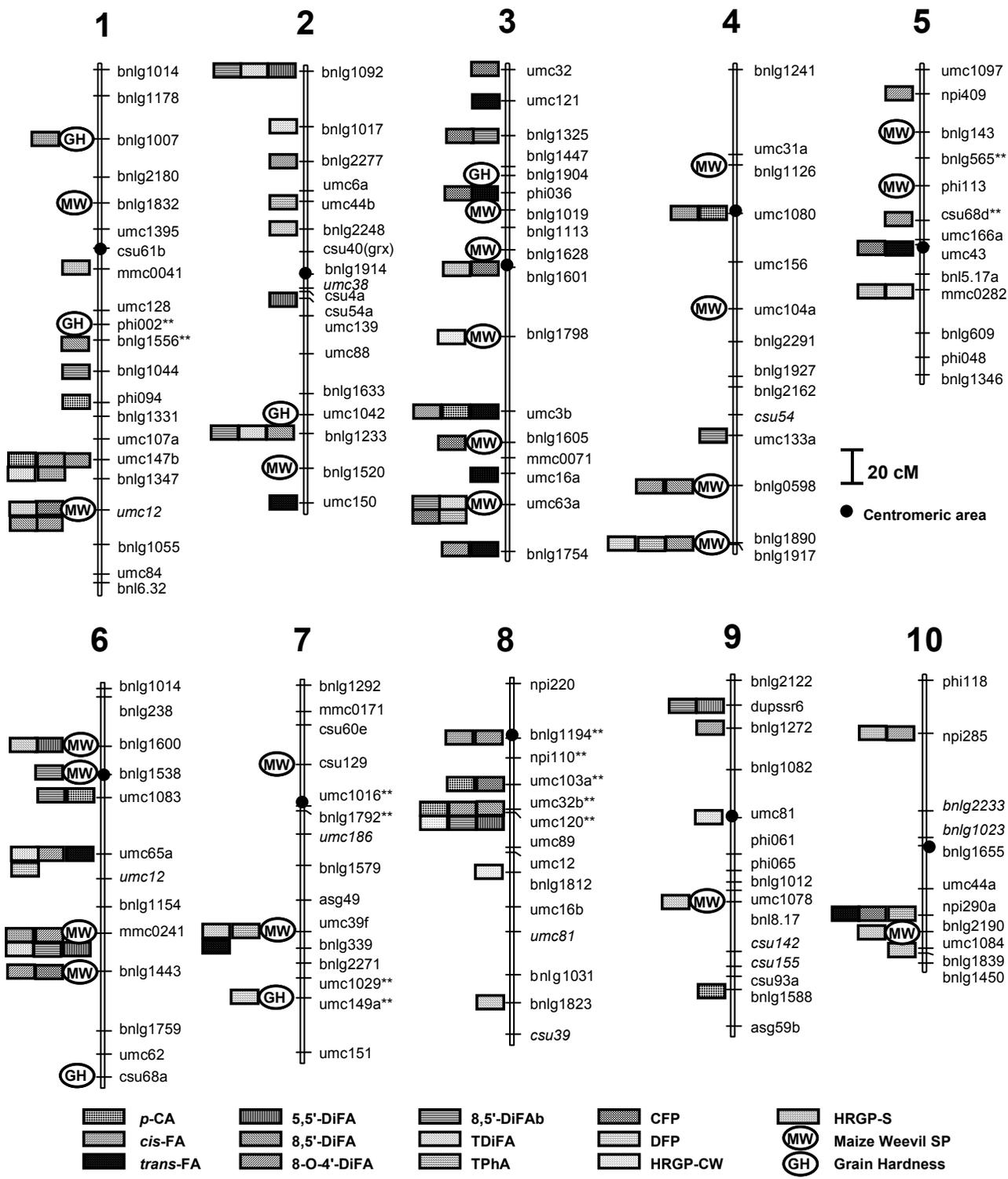


Fig. 6.3 Mapa Genómico combinado de RFLPs y SSRs construido a partir de 163 familias F₂ a partir de la cruza CML290 x Muneng-8128 C0 HC1-18-2-1-1. Se muestran las posiciones de QTL para los componentes de la pared celular del pericarpio, amidas y respuesta a *Sitophilus zeamais*.

7.1 Bases Bioquímicas de la Resistencia a *Sitophilus zeamais*

7.1.1 Componentes de la Pared Celular del Pericarpio

Los genotipos de maíz resistentes a *S. zeamais* presentaron las más altas concentraciones de componentes de la pared celular en el pericarpio. Los principales compuestos asociados con la resistencia incluyeron a los ácidos fenólicos simples, los ácidos diferúlicos y las proteínas HRGPs. Estos componentes mostraron correlaciones negativas importantes con los parámetros de susceptibilidad y una correlación positiva con la dureza del grano. La correlación entre los ácidos fenólicos y la susceptibilidad fue similar en magnitud con lo reportado previamente (Serratos et al., 1987; Classen et al., 1990). Los ácidos fenólicos se encuentran diez veces más concentrados en el pericarpio en comparación con lo reportado para el grano completo (Arnason et al., 1994, 1997).

Con el objetivo de comprender la importancia de los ácidos diferúlicos se realizó un análisis detallado de estos compuestos. Este análisis reveló la presencia de cuatro isómeros de estos ácidos, los cuales han sido reportados recientemente para el pericarpio de maíz (Bily et al., 2003). Los ácidos más abundantes fueron 5,5'-DiFA y 8-O-4-DiFA seguidos de 8,5'-DiFAB. Los componentes principales que explicaron la mayor parte de la variación fenotípica de la resistencia a *S. zeamais* fueron los ácidos 5,5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, *p*-CA y *trans*-FA. Estos resultados son consistentes con estudios previos donde se ha reportado a los ácidos diferúlicos como factores de resistencia al barrenador del tallo (Bergvinson et al., 1997) y a la pudrición de la mazorca (Bily et al., 2003).

La fracción insoluble de las HRGPs se identificó como un nuevo factor de resistencia a *S. zeamais*. Esta fracción se reportó previamente en las paredes celulares del pericarpio de maíz y se ha relacionado con el grosor y dureza de esta estructura (Hood et al., 1991; Fritz et al., 1991), pero hasta el momento no se había asociado con la resistencia a este insecto. Se ha demostrado que las extensinas se acumulan en el pericarpio durante el desarrollo del grano (Fritz et al., 1991), y de acuerdo con algunos reportes éstas pueden actuar como barreras físicas en contra de estrés biótico (Mazau et al., 1987). Esta investigación provee la primera evidencia de que las HRGPs adheridas a la pared celular del pericarpio están correlacionadas con la resistencia en maíz a *S. zeamais*.

Los ácidos fenólicos simples, ácidos diferúlicos y HRGPs correlacionaron con el incremento a la fuerza mecánica del grano y la resistencia a *S. zeamais*. El ácido *trans*-ferúlico esterificado con heteroxilanos de la pared celular pueden unirse para formar diferulatos en presencia de peróxido de hidrógeno vía la acción de una peroxidasa de la pared celular (Fry et al., 2000). En este estudio los dímeros de DiFA correspondieron al 8% del contenido total de ácidos fenólicos, así en los genotipos resistentes estos compuestos estuvieron concentrados tres veces más que los genotipos susceptibles. Por otro lado, las extensinas se encuentran unidas entre si mediante puentes de isoditirosina (Fry, 1986), y a su vez se encuentran unidas a heteroxilanos esterificados con ferulatos, formando de esta manera una red insoluble dentro de la pared celular (Saulnier y Thibault, 1999). Este proceso de entrecruzamiento y unión de DiFA y extensinas se ha establecido como una función normal de protección en las células maduras (Fritz et al., 1991; Cassab, 1998; Fry et al., 2000).

En este estudio se definieron las relaciones entre la dureza del grano y la resistencia a *S. zeamais*, ambas altamente correlacionadas con las uniones de extensinas y DiFAs dentro de las paredes celulares del pericarpio de maíz. Estos entrecruzamientos proveen el mecanismo bioquímico para el control de las propiedades mecánicas de la pared celular (Waldron et al., 1996) y limitan la biodegradación de los polisacáridos de la pared celular (Ishii, 1997). Este complejo contribuye muy probablemente a la resistencia contra este insecto al fortificar la pared celular del pericarpio, de tal modo que se incrementa la dureza física de esta estructura, así como dureza del grano completo. Otros componentes de la pared celular pueden contribuir a la resistencia, tales como el contenido de celulosa y de xilanos; sin embargo, la fibra, como una medida indirecta de estos componentes, se correlacionó negativamente con los parámetros de susceptibilidad (Tabla 6.1.5). Los hallazgos presentados en este estudio confirman la importancia del pericarpio en la resistencia a *S. zeamais* así como sus efectos maternos (Tipping et al., 1988; Serratos et al., 1993; Derera et al., 2001; Dhliwayo y Pixley, 2003), y amplían nuestra comprensión de los factores bioquímicos y biofísicos involucrados en la resistencia a *S. zeamais*.

La falta de correlación entre los parámetros de desarrollo del insecto y el contenido de lisina, triptófano y el índice de calidad fue similar a lo observado para maíces de alta calidad proteica (Arnason et al., 1993). Los datos de este estudio no son suficientes para

aclarar si la calidad del grano puede verse afectada adversamente por el alto nivel de componentes de entrecruzamiento de la pared celular del pericarpio, sin embargo, estudios recientes han establecido los beneficios en la salud de los compuestos hidroxicinámicos en fibra de maíz (Kroon y Williamson, 1999).

En resumen, los componentes de la pared celular del pericarpio de maíz juegan un papel significativo en la resistencia a *S. zeamais*. Estos mecanismos de resistencia estructural contra las plagas de almacén deben considerarse como caracteres importantes en los programas de mejoramiento de maíz, sobre todo en las regiones donde las plagas de almacén son una amenaza para la seguridad alimentaria.

7.1.2 Funciones de la Peroxidasa del Grano de Maíz

La actividad de la enzima peroxidasa (POD) se detectó en genotipos de maíz con diferentes niveles de resistencia a *S. zeamais*. Esta actividad se asoció con la resistencia a este insecto y la viabilidad del grano de maíz. La actividad de POD localizada en el endospermo presentó una correlación negativa importante con los parámetros del bioensayo con *S. zeamais*, mientras que la actividad registrada en el embrión correlacionó positivamente con la viabilidad del grano. Este patrón funcional de isoenzimas de POD tejido-específicas se ha observado anteriormente en muchos modelos vegetales (Fraignier et al., 2000).

La presencia de peroxidasas en maíz ha sido establecida anteriormente (Brewbaker et al., 1985; Boyes et al., 1997) y ciertas isoenzimas se han confinado a tejidos particulares o a más de un tejido en el grano. Las isoformas de POD extraídas y medidas en este estudio corresponden a la fracción soluble, dado que ésta es la fracción donde las POD son más abundantes en el grano de maíz (Boyes et al., 1997), mientras que la fracción de POD asociadas a la membrana y pared celular no fueron estudiadas. Las peroxidasas activas en el grano de maíz se localizaron en la endodérmis, el cilindro vascular y las células de escutelo del embrión, así como en la aleurona del endospermo. Estos resultados son consistentes con las diversas isoformas reportadas en el embrión y endospermo del grano de maíz (Brewbaker et al., 1985; Kim et al., 1996). Sin embargo, en el pericarpio de grano maduro no se detectó actividad de POD. Esto puede explicarse porque algunas isoformas reportadas como presentes en el pericarpio se encuentran asociadas a la pared celular o a la

membrana (Brewbaker et al., 1985; Kim et al., 1996), las cuales no fueron objeto de este estudio. Sin embargo, también es posible establecer que estas enzimas están presentes y activas durante el desarrollo del pericarpio y desaparecen cuando esta estructura alcanza la madurez.

El papel de la POD del endospermo en la resistencia a insectos puede tener algunas explicaciones. Primeramente, se ha establecido que la aleurona de maíz esta compuesta de células vivas que contienen compuestos fenólicos (Sen et al., 1994). Basados en lo anterior, el mecanismo de resistencia de esta estructura puede establecerse por la generación de quinonas bajo la acción de POD. Estos compuestos derivados de los ácidos fenólicos se unen a proteínas o carbohidratos y se ha reportado que generan complejos que reducen la digestibilidad de los insectos (Dowd, 1994; Dowd y Lagrimini, 1997). Estos compuestos modificados inhiben enzimas haciendo que los recursos proteicos sean menos nutritivos para los insectos. Estas sustancias son consideradas como inhibidores enzimáticos y con niveles importantes de cito-toxicidad dada su naturaleza electrofílica, altamente reactiva y a la generación de ROS. Segundo, en un estudio reciente de Caruso et al. (2001) se ha reportado por primera vez que una peroxidasa básica del grano maduro de trigo provee protección por sí misma contra el ataque de patógenos como los hongos. Brewbaker et al. (1985) ha reportado una POD básica presente en el endospermo de maíz, la cual es mayoritaria y se encuentra en altas concentraciones. Esta evidencia permite presuponer que la POD medida y localizada en el endospermo es una POD básica y que puede actuar por sí misma en la resistencia a *S. zeamais*. Nuevas investigaciones deberán dirigirse hacia el aislamiento, caracterización y funcionalidad de la POD de endospermo de genotipos resistentes a *S. zeamais*.

Varios estudios han establecido una asociación entre la presencia de la POD y H₂O₂ con su función en el sistema de defensa de plantas contra el ataque de patógenos (Milosevic and Slusarenko, 1996; Bestwick et al., 1998; Schopfer et al., 2001.). Se ha establecido que la POD y las especies reactivas de oxígeno (ROS) se liberan en el apoplasto de las capas de aleurona y del embrión de semillas de rábano, justo antes de la emergencia de la radícula (Schopfer et al., 2001). Esta expresión de actividad de peroxidasa va acompañada de la generación de H₂O₂ y compuestos fenólicos, como se ha demostrado en diferentes cultivos (Cochrane, 1994; Lamb y Dixon, 1997). Este es un mecanismo preventivo de protección

contra el ataque de patógenos o lesiones (Morohashi, 2002). Este trabajo proporciona evidencia estructural de que la POD está localizada en la zona micropilar del grano de maíz y que la mayor actividad se presenta en las células del escutelo y la aleurona de esta región. La evidencia bioquímica de la actividad de POD medida en el embrión soporta la función de esta enzima en el mantenimiento de la viabilidad y capacidad de germinación. Por lo tanto, es posible sugerir que la POD del endospermo y embrión localizada en el área de protrusión cumpla funciones de defensa en los estados de pre-emergencia.

La POD puede también funcionar en el rompimiento de las paredes celulares de las estructuras asociadas a la región micropilar incluyendo células del pericarpio y del pedicelo. Este reblandecimiento de la pared se ha propuesto en otros modelos vegetales y ayudan a permitir la protrusión de la raíz.

La actividad localizada en la raíz al nivel de la endodérmis se ha asociado en otros modelos vegetales (*Cuscuta*) con procesos de lignificación. Esta función se ha propuesto en la banda de Caspari que tiene una enorme influencia sobre la morfogénesis de la raíz y la funcionalidad de la misma.

En este mismo sentido se encontró variación en la viabilidad de la semilla después de un periodo corto de dos meses de almacenamiento de maíz bajo condiciones subtropicales, demostrando así diferencias en la sensibilidad al almacenamiento. Estas variaciones se han reportado con anterioridad en variedades de maíz con mayores tiempos de almacenamiento (Moreno-Martinez, et al., 1987; Bernal-Lugo et al., 2000). La pérdida de viabilidad se correlacionó con los niveles de actividad de la POD determinada en el embrión y en el área micropilar, coincidiendo con su localización estructural y su probable función en la germinación. En varios cultivos, incluyendo maíz, se ha establecido que el deterioro en los granos almacenados está acompañado por una disminución en la actividad de la POD y enzimas involucradas en el sistema oxidante del grano (Lugo-Bernal and Leopold, 1998; Lugo-Bernal et al., 2000; Chen and Chen, 2003). Recientemente esta respuesta al deterioro del grano se ha reportado en arroz para periodos cortos de almacenamiento y con temperaturas menores a las subtropicales (Chen and Chen, 2003). Esta evidencia indica que la POD del embrión es importante para mantener la viabilidad de la semilla y depende de las condiciones de almacenamiento y la edad del grano. Los presentes resultados demuestran por lo tanto que existe pérdida de la actividad de POD durante periodos cortos

de almacenamiento y esta pérdida de actividad esta relacionada con la disminución de la viabilidad y edad de los granos de maíz. Estudios posteriores deberán enfocarse para determinar si existen cambios durante el almacenamiento con respecto a la resistencia a insectos. En resumen, la evidencia presentada en este trabajo indica que las PODs encontradas en granos de maíz resistentes a insectos son tejido-específicas y se encuentran involucradas en funciones de resistencia a insectos y para mantener la viabilidad. Estas PODs podrían ser utilizadas como marcadores bioquímicos de resistencia a plagas de almacén, indicador de edad del grano y viabilidad del mismo.

7.2 Bases Genómicas de la Resistencia a *Sitophilus zeamais*

7.2.1 Cartografía de QTLs asociados con la Susceptibilidad a *Sitophilus zeamais*

En este mapa genético se determinaron veintisiete regiones cromosómicas agrupadas en cuatro parámetros de susceptibilidad como probables QTLs asociados con la resistencia a *S. zeamais*. El análisis de mapeo utilizado fue de intervalo compuesto o CIM (Jiang and Zeng, 1995). El uso de CIM presenta varias ventajas: 1) detecta interacciones genotipo x ambiente para un QTL específico, 2) presenta un alto poder estadístico en su prueba de hipótesis, y 3) una baja estimación de la varianza de la muestra para cada parámetro (Khairallah et al., 1998). Esta aproximación metodológica es utilizada actualmente como método estándar en de detección de QTL en maíz (e.g. Krakowsky et al., 2004); sin embargo, el error tipo I que presenta este método aun no se ha resuelto (Groh et al., 1998). Una nota importante acerca de esta metodología es que un QTL se define cuando tiene efectos significativos en al menos una época y en los casos donde existe un efecto importante del ambiente, como en este estudio.

De manera particular, en este trabajo se detectaron siete QTLs para GD, seis para GWL, nueve para DI y cuatro para AP. Contrario a nuestras expectativas más de la mitad de los QTL determinados provienen del padre susceptible CML290. Sin embargo, este tipo de resultados han sido reportados por otros autores para QTLs de resistencia a insectos (Schon et al, 1993; Bohn, et al., 2000). Las contribuciones del padre susceptible pueden explicarse debido a la estrecha relación de origen que tiene las líneas progenitoras. Sin embargo, el uso de líneas isogénicas cercanas había sido propuesto como una estrategia para localizar QTLs únicos y específicos utilizando cartografía fina (Paterson, et al. 1991).

Dado este antecedente, es muy probable que los QTLs detectados en este estudio para resistencia a *S. zeamais* se encuentren asociados a los de mayor importancia. Aun así, es importante aclarar que estas líneas progenitoras no son genotipos extremos en su respuesta a la resistencia de insectos y esto podría afectar el poder de detección de los QTLs.

Numerosos estudios han indicado la predominancia de la acción genética de adición en la expresión de resistencia de maíz contra varias plagas de insectos (Bohn et al., 1996; Khairallah et al., 1998; Byrne et al., 1998). En este estudio, los principales efectos genéticos de resistencia a *S. zeamais* fueron dominantes para GD, DI y GWL y de adición para AP. Estos resultados confirman estudios previos donde se ha demostrado la importancia de los efectos genéticos aditivos y no-aditivos en la resistencia de maíz a *S. zeamais* (Tipping et al., 1989; Kang et al., 1995; Serratos et al., 1997; Derera et al., 2001; Dhliwayo y Pixley, 2003). De manera adicional, la suma de los efectos dominantes para cada QTL demostró la presencia de heterosis en todos los parámetros de susceptibilidad estudiados. Este hecho sustenta la posibilidad de desarrollar germoplasma con resistencia a este insecto, como ya había sido propuesto previamente (Widstrom et al., 1993).

Los mecanismos de resistencia reportados en maíz contra *S. zeamais* incluyen proteínas, fibra, varios compuestos fenólicos de pared celular, proteínas estructurales y enzimas como la peroxidasa (Arnason et al., 1997; Garcia-Lara et al., 2004), muchos de los cuales están involucrados en la estructuración y síntesis de la pared celular. Algunos QTLs de respuesta a *S. zeamais* se localizaron en áreas donde se ha establecido la presencia de genes involucrados en la composición bioquímica de la pared celular. En el bin 1.10, el GD se localiza con genes (*cesa5* y *cesa6*) de la celulosa sintasa (Holland et al., 2000), mientras que en el bin 3.04 se ubica con QTLs de azúcares (arabinosa y galactosa) que componen la pared celular del pericarpio de maíz (Hazen et al., 2003), además de la fibra (Cardinal et al., 2003). Algunos genes de la peroxidasa se han reportado en el bin 2.09 (*px1*) y 5.03 (*px13*, gen candidato), donde se localizaron los QTL de GWL y DI, y GD respectivamente. Un caso interesante se presenta en el bin 6.05 donde GD, GWL y DI se localizan en la misma posición que el gen de la celulosa sintetasa (Holland, et al., 2000), azúcares que componen la pared celular del pericarpio de maíz como la galactosa y la xilosa (Hazen et al., 2003), componentes de la pared celular como el contenido de fibra y de lignina (Cardinal et al., 2003) y finalmente un QTL de contenido de proteína (Goldman et al.,

1994). Cercano a esta áreas (bin 6.04 y 6.06), nuevos QTLs se han reportado recientemente para hemicelulosa, celulosa y ácido *p*-coumárico (Fontaine et al., 2003). En el bin 7.01, DI y GWL se ubicaron nuevamente con la celulosa sintetasa (Holland et al., 2000). Además, un QTL de la hemicelulosa (Fontaine et al., 2003) se localiza en el bin 9.05 donde se encuentran DI y AP. Dada esta relación genómica cercana entre la resistencia a *S. zeamais* y componentes de la pared así como genes involucrados, es importante cartografiar estos compuestos en la misma población.

La dureza del grano (GH) y la proporción pericarpio/grano (P/G) se han asociado con la resistencia a *S. zeamais* (Dobie, 1977; Tipping et al., 1988; Arnason et al., 1994; García-Lara et al., 2004). Dado lo anterior, estos parámetros también se estudiaron y cartografiaron como probables factores de resistencia. Las correlaciones encontradas entre GD, GWL, DI y AP con GH y P/G fueron bajas en magnitud y significativas solo en algunos casos. Sin embargo, para nuestra sorpresa los seis QTLs de GH se localizaron en posiciones cercanas o incluso las misma que los GD, GWL, DI y AP. En el caso de P/G, dos de los cinco QTL localizados en los bins 3.04 y 3.07 resultaron comunes para el QTL de DI. En estos casos también se encontró una relación de localización en áreas donde QTLs y genes relacionados con características del grano de maíz han sido reportados (datos disponibles en la base de datos MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>). El QTL del GH cartografió con genes del grano del maíz como el grano marrón (1.02), grano defectuoso (1.02, 1.07, 2.08, 6.08), grano pequeño (1.02), grano miniatura (7.04), endospermo suave (1.02, 1.07, 2.08, 7.04), endospermo opaco (6.08) y endospermo reducido (7.04). El gen del grano rugoso (3.06, 3.07,10.02) se asoció con un QTL de P/G. Aún no existe suficiente evidencia que indique si las características del grano de maíz tienen una función trascendental en la resistencia a *S. zeamais* (Gudrups et al., 2001; García-Lara et al., 2004), sin embargo las asociaciones encontradas en este estudio sugieren bases genéticas comunes.

Áreas en conjunto se encontraron entre QTLs de respuesta a *S. zeamais* con genes y QTLs de resistencia a enfermedades y otros insectos (McMullen y Simcox, 1995; Bohn et al., 1996, 1997, 2000; Krakowsky et al., 2004; MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>). Varias asociaciones se determinaron con áreas de resistencia a insectos tales como el barrenador europeo del tallo (ECB), barrenador sub-occidental del tallo (SWCB), barrenador de la caña de azúcar (SCB) y gusano elotero (CEW). También se encontraron

asociaciones con enfermedades como la marchites de Stewart, el punto gris de la hoja (GLS), el carbunco de la hoja y el hongo algodonoso. En el bin 1.05, DI y AP cartografiaron con QTL de la marchites de Stewart, ECB, SWCB y SCB. El QTL de GD co-localiza en el bin 1.10 con SCB. GD esta agrupado con GLS en varias áreas (5.03, 6.01, 10.07). In bin 6.00-01, GD y GWL se ubica en conjunto con múltiples genes de resistencia a enfermedades (*rhm2*, *scmv1* and *wsm1*) y QTLs de resistencia a insectos (SWCB, CEW y ECB). Una situación similar se presenta en el bin 6.05, donde DI, GWL y GD se ubica en conjunto con CEW, SWCB, ECB, y varios hongos algodonosos (George et al., 2003). DI (7.03) cartografía con SCB, SWCB, ECB, NCLB y pudrición de mazorca, mientras que DI (9.05) con QTL de SCB, SWCB y un gene del carbunco (*hm2*). Aún no esta aclarada la relación funcional entre genes y QTL que se localizan en la misma áreas para diferentes enfermedades e insectos (McMullen y Simcox, 1995), sin embargo estas agrupaciones pueden aprovecharse para generar germoplasma de maíz resistente a ambos estrés. Con base en estos resultados, las asociaciones más importantes para resistencia de maíz a *S. zeamais* se localizan en los bins 1.05, 1.10, 6.00-01, 6.05, 7.03 y 9.05. Estas áreas pueden considerarse para mapeo fino en el futuro.

Para todos los parámetros de susceptibilidad evaluados resulto altamente significativa la interacción σ^2_{gxe} y más de la mitad de los QTLs mostraron una influencia significativa de QTL x E. Esto puede deberse a las condiciones climáticas que prevalecieron durante el ciclo verano e invierno en Tlaltizapán Morelos, las cuales fueron significativamente distintas en temperatura y precipitación pluvial. Estas diferencia podrían influenciar el nivel de susceptibilidad que fue mayor durante el ciclo 2000B y por ende los mecanismos de resistencia estarían alterados en su expresión. Parte de estas diferencias se reflejan en los QTLs detectados en cada ciclo. Este hecho también revela la enorme influencia que tiene el ambiente en la expresión de la resistencia en maíz a *S. zeamais*. Todos los QTLs identificados para parámetros de susceptibilidad explicaron la mitad de la σ^2_g y menos de una tercera parte de σ^2_p . Esto indica que muy probablemente varios QTLs no fueron detectados.

7.2.2 Mapeo Genético de los Mecanismos de Resistencia contra *Sitophilus zeamais*

Más de un centenar de probables QTLs se declararon como responsables de la composición fitoquímica del grano de maíz. El promedio de QTLs encontrados para estos componentes se encontró entre los 6 y 11 QTLs, lo cual es consistente con otros reportes para componentes similares (Cardinal et al., 2003). La mitad de estos QTLs presentó un valor de LOD de 2.5, mientras que el resto superó el valor de 3.0. Los valores de la variación fenotípica explicada por cada parámetro (25 al 43%) se encontraron en el intervalo de los valores reportados (Fontaine, et al., 2003). Sin embargo, en este estudio se detectó una influencia significativa del ambiente en la expresión de estos compuestos (50% de los QTL con interacción significativa). Esto se corroboró con los valores de heredabilidad, los cuales fueron altos para los componentes de mayor abundancia (*p*-CA, *trans*-FA), pero intermedio y bajo para el resto de los parámetros medidos.

Los alelos involucrados en la composición fitoquímica provenientes del padre resistente fueron bajos (30%) en comparación con el padre susceptible (70%). Este resultado parece contradictorio, ya que el padre resistente debiera tener la mayor contribución, sin embargo, este fenómeno se detectó previamente en la respuesta a *S. zeamais* en la misma población. Este resultado puede explicarse por la composición genética del grano de maíz. En la cruce del mapa, la hembra seleccionada correspondió al padre susceptible CML290, por lo que la composición del pericarpio se vio completamente afectada por la herencia materna. Serratos et al. (1997) ha demostrado este hecho anteriormente por medio de la estimación de la variación genética de los factores bioquímicos del grano. Ellos encontraron efectos significativos de dominancia en el contenido de compuestos fenólicos del grano para el endospermo-pericarpio y de los compuestos fenólicos expresados en el pericarpio. Nuestros resultados son consistentes con este trabajo, debido a que la acción genética computada para los QTLs de compuestos fenólicos fue principalmente dominante. Los hallazgos presentados en este estudio confirman la importancia del pericarpio en la resistencia a *S. zeamais* y sus efectos maternos dominantes (Tipping et al., 1988; Serratos et al., 1993).

Los componentes de la pared celular mostraron correlaciones fenotípicas y genotípicas altamente significativas entre ellos y esta relación se comprobó con la agrupación de QTLs y su localización en el genoma del maíz. Recientemente hemos reportado la importancia de los componentes de la pared celular del pericarpio de maíz en la resistencia a *S. zeamais*

(García-Lara et al., 2004). Los principales compuestos incluyeron a los ácidos fenólicos simples, los ácidos diferúlicos y las proteínas HRGPs. Estos componentes mostraron correlaciones negativas importantes con los parámetros de susceptibilidad y una correlación positiva con la dureza del grano. En este reporte nosotros corroboramos estas relaciones entre los parámetros de susceptibilidad y factores fitoquímicos en un análisis combinado de 163 familias de la población de mapeo durante dos ciclos de estudio. Los componentes de la pared celular del pericarpio de maíz correlacionaron negativamente con los parámetros de susceptibilidad y positivamente con la dureza del grano. Adicionalmente, este estudio provee nuevos datos de la presencia de las amidas aromáticas en el endospermo (Moreau et al., 2001). Estas amidas correlacionaron negativamente con el daño en grano producido por *S. zeamais* y ratifica la probable función de estos compuesto en la resistencia como ha sido reportado anteriormente para gorgojos (Sen et al., 1994; Fixon-Owoo et al., 2003). Este complejo de factores de resistencia están involucrados en los mecanismo de antibiosis y mecánicos descritos para maíz (Arnason et al., 1997) y muy probablemente su función es complementaria y sinérgica.

Las mayores áreas de QTL determinados para ácidos fenólicos de la pared celular y amidas aromáticas se ubicaron en once regiones genómicas de los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 10. En estas áreas tres o más componentes cartografiaron juntos. Estas importantes áreas se ubicaron en regiones genómicas de bins, en los cuales ha establecido la presencia de genes involucrados en la composición bioquímica de la pared celular y genes de la ruta metabólica de los compuestos fenilpropanoicos. Algunos genes de la enzima peroxidase se han localizaron en los bins 2.08, 2.09 y 5.03 (Brewbaker et al., 1985), mientras que los genes de la celulosa sintetasa se han descrito en los bins 1.10, 2.08 y 6.05 (Holland et al., 2000). En estas áreas se ubicaron QTLs de DiFAs, ácidos fenólicos simples y amidas. Estos compuestos también se localizaron en el bin 2.09, donde se ha reportada la localización del gen de la enzima chalcona sintetasa (Szalma et al., 2002) y en el bin 4.05 del gen de la fenil-alanin amonio liasa (PAL) y la cafeato O-metiltransferasa (Davis et al., 1999; Barriere et al., 1998). Otros QTLs de componentes del pericarpio de maíz reportados por Hazen et al. (2003), tales como la galactosa (3.04), xilosa (2.02, 3.04, 6.05), arabinosa (3.04) y glucosa (6.05 y 10.06) se situaron en las misma posiciones de los compuestos fenólicos. QTLs para hemicelulosa (1.02), celulosa (2.04) localizados en el áreas cercana a 6.04 y

6.06 has sido reportados recientemente por Fontaine et al. (2003) recientemente. Ellos también reportan QTLs para el ácido *p*-coumárico y FA, los cuales no coinciden con la localización que reportamos aquí, con excepción del bin 3.04 para FA. Davis et al. (1999) reportó la localización de un gen de HRGP en el bin 2.04 utilizando sondas de cDNA. Nosotros reportamos en este estudio nuevas posiciones de QTLs para estas proteínas HRGPs (adheridas a pared celular y solubles) ubicadas en coincidencia en el bin 3.06 y 5.05. El mayor QTL de HRGP soluble explica alrededor del 23% de la variación fenotípica, por lo cual consideramos que este QTL podría ser considerado como un gen candidato. Esta aproximación vía análisis de QTL remarca la importancia del uso de marcadores moleculares para la localización y determinación de genes nativos tejido-específicos en plantas.

El análisis de ubicación de QTLs de respuesta a *S. zeamais* en comparación con los QTLs provenientes de los componentes de la pared celular del pericarpio y amidas aromáticas reveló la presencia de grupos de QTLs en las mismas áreas (Fig. 6.4.1). Las principales áreas determinadas corresponden a las ubicadas en los bins 1.10, 3.06/07, 3.09, 4.10/11, 6.00/01, 6.05, 7.03 y 10.06. En algunas de estas áreas determinadas se asocian genes y QTLs de resistencia a enfermedades y otros insectos se han cartografiado (información disponible en la base de datos MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org>). Dada la cerca relación entre los componentes estructurales de la pared celular del pericarpio, incluidas las enzimas reportadas para la vía de síntesis de pared y compuestos involucrados con los parámetros de respuesta a *S. zeamais* a nivel bioquímico y genómico, algunos de estos genes reportados podrían utilizarse como marcadores moleculares para resistencia a este insecto en los programas de mejoramiento. Finalmente estos estudios refuerzan la relación funcional entre el mapeo QTLs y genes involucrados en diferentes enfermedades y ataque de insectos en maíz como se ha reportado previamente (McMullen y Simcox, 1995). Esta ventaja de genes ubicados en las mismas posiciones puede utilizarse para el mejoramiento de maíz con resistencia a enfermedades e insectos.

7.2.3 Eficiencia de la Selección Asistida por Marcadores Moleculares

La efectividad de la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) sobre la selección fenotípica convencional depende de la consistencia, precisión y efectos de los

QTLs detectados a través de las diferentes poblaciones. Aún se encuentra en discusión la eficiencia en el uso de QTLs para MAS en el mejoramiento de la resistencia a insectos (Melchinger et al., 1998; Bohn et al., 2000; Willcox et al., 2002). Sin embargo y de acuerdo con Landen y Thompson (1990), la eficiencia relativa (RE) del uso de MAS sobre la selección fenotípica proporciona un valor para predecir si el uso de MAS es o no prometedor para cualquier característica.

Los datos de RE para GD, GWL y AP resultaron menores a 0.56, mientras que para GH fue de 0.75. Sin embargo para DI el valor RE fue de 0.93 indicando que para esta característica ambos métodos de selección podrían tener casi la misma eficiencia bajo condiciones idénticas de intensidad de selección. Para el caso de componentes bioquímicos, los valores de RE para ácidos fenólicos simples y totales se encontró alrededor de 0.6, mientras que para DiFA fue de 0.9 indicando nuevamente la posibilidad de que tanto la selección convencional como la MAS proporcione la misma eficiencia en la selección. Por lo anterior y considerando las altas correlaciones encontradas entre los mismos componentes de resistencia y de respuesta a *S. zeamais*, solo sería necesario medir alguno de los componentes para selección y mejoramiento. Por lo tanto al menos un parámetro de respuesta a *S. zeamais* y un parámetro de resistencia podrían utilizarse como marcadores para MAS.

La identificación de QTLs que afectan la susceptibilidad y resistencia a *S. zeamais* en maíz tropical es esencial para el análisis de la variación genética y consecuentemente para incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento de maíz. Serán necesarios estudios puntuales con el fin de verificar la consistencia de los QTLs encontrados en este estudio y su posible aplicación y uso en esquema de MAS para resistencia a plagas de almacén. Por lo tanto las perspectivas de MAS deberán evaluarse en un mayor número de ambientes, poblaciones mayores, tipos de progenie y diferentes bases de germoplasma. En esta etapa nosotros sugerimos el uso combinado de MAS y selección convencional para mejoramiento.

8.1 Conclusiones Principales

1. Los componentes de la pared celular del pericarpio de maíz juegan un papel significativo en la resistencia a *S. zeamais* e incluyen a los ácidos fenólicos simples, los ácidos diferúlicos y las proteínas HRGPs.
2. La actividad de peroxidasa encontrada en granos de maíz resistentes a insectos es tejido-específica y se encuentra involucrada en funciones de resistencia a *S. zeamais* y para mantener la viabilidad.
3. El mapa genético de maíz tropical permitió declarar veintisiete regiones cromosómicas agrupadas en cuatro parámetros de susceptibilidad como probables QTLs asociados con la resistencia a *S. zeamais*.
4. Más de un centenar de QTLs se declararon como probables responsables de la composición fitoquímica del grano de maíz.
5. QTLs de respuesta a *S. zeamais* y composición fitoquímica se localizaron en áreas donde se ha establecido la presencia de genes involucrados en la composición bioquímica de la pared celular, vía metabólica de los fenilpropanoides, de resistencia a enfermedades y a otros insectos.
6. Los componentes de la pared celular mostraron correlaciones fenotípicas y genotípicas altamente significativas con los parámetros de susceptibilidad a *S. zeamais* y esta relación se comprobó con la agrupación de QTLs y su localización en el genoma del maíz.
7. QTL y genes asociados puede utilizarse en la MAS para el mejoramiento de germoplasma resistente tanto a plagas de almacén, otros insectos y enfermedades.

8.2 Perspectivas

Las nuevas bases bioquímicas de resistencia a *S. zeamais* presentadas en esta tesis deberán estudiarse utilizando proteómica, dado que algunos de los mecanismos de resistencia están fundamentados en proteínas. Otro punto importante es el almacenamiento del maíz, su deterioro y los cambios asociados a las condiciones y tiempo de almacenamiento. Esta característica deberá considerarse en los programas de mejoramiento. En este sentido es prioritario profundizar en el estudio de estas nuevas variedades con respecto a la calidad del grano, beneficios en la salud de los componentes que lo integran y su impacto en la calidad nutritiva. El reto inmediato es la incorporación biotecnológica de cualidades adicionales del grano como la bio-fortificación en variedades de maíz mejoradas contra estrés biótico.

En el área genómica, serán necesarios más estudios con el fin de verificar la consistencia de los QTLs encontrados en este estudio y su posible aplicación y uso en esquema de MAS para resistencia a plagas de almacén. Por lo tanto las perspectivas de MAS deberán evaluarse en un mayor número de ambientes, poblaciones mayores, tipos de progenie y diferentes bases de germoplasma. Sin embargo, dada la relación tan cercana entre la localización de QTLs y genes, la ingeniería genética podrá utilizarse para incorporar estos genes e incrementar la resistencia del maíz a *S. zeamais*, al mismo tiempo mejorar la calidad del grano al almacenamiento y propiedades nutricionales.

La reducción de las pérdidas en postcosecha a través de estrategias bioquímicas y genéticas es urgente para enfrentar las demandas de alimento. Actualmente se está dando un aumento significativo del uso de variedades resistentes para minimizar las pérdidas en almacenamiento, especialmente en las zonas donde la infraestructura para el almacenamiento del grano no existe. Para capitalizar la diversidad genética existente en resistencia a plagas de almacén, en los siguientes años estas áreas del conocimiento deberán realizar aportaciones significativas e importante para ampliar nuestra comprensión de las bases biofísicas, bioquímicas y genéticas de los mecanismos de resistencia natural en el grano de maíz. Este conocimiento asegurará que estas características sean seleccionadas y contribuyan al manejo integrado de plagas con lo cual se puedan satisfacer las exigencias de los agricultores de escasos recursos en el mundo, especialmente en los países en desarrollo.



Declaración de Contribuciones por parte de los Colaboradores en este Trabajo

Esta declaración detalla a los principales colaboradores y sus contribuciones en artículos sometidos a arbitraje internacional y aquellos que serán sometidos en el futuro. También se incluyen contribuciones de las presentaciones de trabajos en congresos, resúmenes en extenso, capítulos de libro, conferencias y reconocimientos. Algunos documentos originales se anexan en el Apéndice I. A todos los colaboradores les agradezco su apoyo y ayuda en estas contribuciones.

Artículos Originales

- García-Lara, S, Burt, A.J., Serratos J. A., Díaz-Pontones D.M., Arnason J.T. and Bergvinson D. 2003. Defensas naturales en el grano de maíz al ataque de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae): mecanismos y bases de la resistencia. REB (México) 22 (3), 138-145.
- Bergvinson, D.J., S. García-Lara. 2004. Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. Curr. Opin Plant Biology 7: 480-485.
- García-Lara, S., D.J. Bergvinson, A.J. Burt, A.I. Ramputh, D.M. Díaz-Pontones, J.T. Arnason. 2004. The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance. Crop Science 44:1546-1552.

Artículos para Someter

- D.J. Bergvinson, S. García-Lara, M. Vargas, and M. M. Khairallah. Mapping of QTL associated with Maize Weevil Resistance in Tropical Maize.
- A.J. Burt, S. García-Lara, D.J. Bergvinson, D.M. Díaz-Pontones, J.T. Arnason. QTL Mapping of Phytochemical Compounds Associated with Maize Weevil Resistance in Tropical Maize.
- S. García-Lara, D.J. Bergvinson, E. Gonzalez, A. Serratos, J.T. Arnason, and D.M. Díaz-Pontones. Kernel Peroxidases in Stored Maize: Their Role for Insect Resistance and Grain Viability.

Resúmenes en Extenso

- Bergvinson, D.J., García-Lara, S., Ramputh, A., Burt, A., Arnason, J.T. Biochemical and genetic basis for Storage Pest Resistance in maize. XI Curso Internacional de Actualización en Tecnología de Semillas: Postcosecha, Saltillo, México (del 24 al 26 de octubre de 2001)

D.J. Bergvinson, S. Garcia-Lara. Advances in Tropical Maize Resistance to Storage Pests. Arnel R. Hallauer International Symposium on Plant Breeding. Mexico, D.F. (17-22 Agosto, 2003)

Capítulos en Libro

D. Bergvinson, S. García-Lara, D. Díaz-Pontones. 2004. Estrategias en postcosecha para reducir las pérdidas en maíz debido a plagas. En Nuestra Agricultura en el 3er Milenio... a diez años del TLC. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México DF. (En impresión).

Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales

- A. Bily, A. Ramputh, C. Regnault-Roger, S. García-Lara, D. Bergvinson, J. Arnason, B. Philogene. Felurics acids (DFAs) profiles of corn grain: are the same factors operational for *Sitophilus zeamais* and *Fusarium graminearum*?. Reunión anual de la Société d'Entomologie du Québec, Entomological Society of Canada, Entomological Society of America. Montreal Québec, Canada (3-6 de diciembre de 2000)
- D. Bergvinson, S. García-Lara, A. Ramputh, J.T Arnason. Bases Bioquímicas de la resistencia del maíz a plagas de almacenamiento. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Acapulco Gro, México (24- 28 de noviembre de 2000)
- S. García-Lara, A.J. Burt, D.J. Bergvinson, J.T Arnason. Cartografía de QTL asociados con la resistencia del maíz tropical a *Sitophilus zeamais* (Motsch). *XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*. Puerto Vallarta Jal, México (3-8 de noviembre de 2002)
- AJ Burt, S García-Lara, J Liversey, D Bergvinson, JT Arnason, BJR Philogene. The hydroxycinnamic acid amides in tropical maize grain & their effect on specialits and generalist. Reunion de la Phytochemical Society of Noth America: Integrative Phytochemistry: from ethnobotany to molecular ecology. Merida, Yucatán. México (Julio, 2002).
- S. García-Lara, D.J. Bergvinson, J.A. Serratos-Hernández, A.J. Burt, J.T. Arnason, M. Vázquez-A, D.M. Díaz-Pontones. Cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins of maize pericarp and their role in resistance to maize weevil. 5th Symposium México-USA, SMB-ASP, XI National Congress of Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Acapulco, Guerrero, México (3-7 november, 2003).
- S. García-Lara, D.J. Bergvinson. QTL Analysis for Maize Weevil Resistance in Tropical Maize. 46th Maize Genetics Conference. México City México (11-14 March 2004).
- D.J. Bergvinson, S. García-Lara. Métodos de evaluación de germoplasma de maíz para el desarrollo de resistencia contra plagas de post-cosecha. 50th Reunión anual del Programa Cooperativo

-
- Centroamericano para Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA). San Salvador, El Salvador (19-23 de abril, 2004).
- D.J. Bergvinson, S García-Lara, A. Burt, J.T. Arnason. Mapping weevil and larger grain borre resistance and putative resistance factors in tropical maize. XXII International Congress of Entomology Brisbane, Australia, (15 - 21 August 2004).
- DJ Bergvinson, S García-Lara, AJ Burt, JT Arnason. Maize Resistance to Storage Pest: New Biochemical Bases for Biotechnology Breeding. 5th Agriculture Biotechnology International Conference, Cologne Germany (September 12-25, 2004).
- DJ Bergvinson, S García-Lara, A Burt, JT Arnason. Genetic approaches to reducing storage losses: Delivering our science to farmers. XXVIII Congreso Nacional de Histología. México D.F. (September, 2004).
- S. García-Lara, D.J. Bergvinson, J.T Arnason, D.M. Díaz-Pontones. Proteomics Bases of Maize Grain Resistant to the Maize Weevil: Extensins and Peroxidases. XXVIII Congreso Nacional de Histología. México D.F. (September, 2004).
- García-Lara, S., Bergvinson, D.J., Gonzalez-Soto, E., Arnason, J.T., Díaz-Pontones, D.M. The Role of Maize Peroxidases in Determining Seed Viability Under Harsh Storage Conditions. XXV Congreso Nacional de la SMB. Iztapa, Gro. México (Noviembre, 2004)

Conferencias

- S. García-Lara. Bases Bioquímicas y genéticas del maíz resistente a plagas de almacén. *Café Experimental*, Depto. de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (Octubre 30, 2002).
- S. García-Lara. Bases Biochemical and genetic bases of maize resistance to storage pests. Maize Seminar Series of Maize Program. CIMMYT, El Batán México (Noviembre 12, 2001).
- S. García-Lara. The Role of Pericarp Cell Wall Components in Maize Weevil Resistance. 5th Symposium Mexico-USA, SMB-ASP, XI National Congress of Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Acapulco, Guerrero, Mexico. (November 4, 2003).
- S. García-Lara. Estrategias en postcosecha para reducir las pérdidas en maíz debido a plagas. 1er Congreso Nacional de Agronomía. México, D. F. (May 20, 2004).

Distinciones.

2003. Award for Abstract. Work Selected as a talk in a plenary session for the 5th Symposium Mexico-USA by the abstract "The Role of Pericarp Cell Wall Components in Maize Weevil Resistance". Acapulco, Mexico

2004. Award for Travel Bursary to attend the ABIC conference 2004 by the abstract “Maize Resistance to Storage Pest: New Biochemical Bases for Biotechnology Breeding”. Cologne, Germany.

BIBLIOGRAFIA

- Arnason, J.T., J. Gale, B. Conilh de Beyssac, A. Sen, S.S. Miller, B.J.R. Philogene, J.D.H. Lambert, R.G. Fulcher, A. Serratos and J. Mihm. 1992. Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects, *Prostephanus truncatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch). J. Stored Prod. Res. 28: 119-126.
- Arnason, J.T., J.D.H. Lambert, J. Gale, J. Mihm, M. Bjarnason, D. Jewell, J.A. Serratos, J. Fregeau-Reid, and L. Pietrzak. 1993. Is "quality protein" maize more susceptible than normal cultivars to attack by the maize weevil *Sitophilus zeamais*?. Postharvest Biol. Technol. 2:349-358.
- Arnason, J.T., B. Baum, J. Gale, J.D.H. Lambert, D. Bergvinson, B.J.R. Philogène, J.A. Serratos, J. Mihm, and D.C. Jewell. 1994. Variation in resistance of Mexican landraces of maize to maize weevil *Sitophilus zeamais*, in relation to taxonomic and biochemical parameters. Euphytica 74:227-236.
- Arnason, J.T., B. Conilh de Beyssac, B.J.R. Philogène, D. Bergvinson, J.A. Serratos, and J.A. Mihm. 1997. Mechanism of resistance in maize grain to the maize weevil and the larger grain borer. p. 91-95. In J.A. Mihm (ed.) Insect resistance maize: recent advances and utilization; proceeding of an international symposium held at CIMMYT. CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.
- Baker, J.E. 1982. Digestive proteinases of *Sitophilus* weevil (Coleoptera:curculionidae), and their response to inhibitors from wheat and corn flour. Can J. Zool. 60: 3206-3214
- Barriere, Y., O. Argillier, and V. Méchin. 1998. In vivo digestibility and biomass yield in normal and bm3 hybrids, made from crossing early and medium late lines of maize. Maydica 43:131-136.
- Bergvinson, D.J. 2001. Storage pest resistance in maize. p. 32-39. In: Maize Program (ed.) Maize Research Highlights 1999-2000. CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.
- Bergvinson, D.J. 2004. Opportunities and challenges for IMP in developing countries. p. 281-312. In: O. Koul, G.S. Dhaliwal, and G.W. Cuperus (ed.) Integrate pest management potential, constraints and challenges. CAB International.
- Bergvinson, D.J., J.T. Arnason, J.A. Mihm, and D.C. Jewell. 1997. Phytochemical basis for multiple borer resistance in maize. p. 82-90. In J.A. Mihm (ed.) Insect resistance maize:

-
- recent advances and utilization; proceeding of an international symposium held at CIMMYT. CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.
- Bergvinson D, García-Lara S, Díaz-Pontones D. 2004. Estrategias en postcosecha para reducir las pérdidas en maíz debido a plagas. In: UAM. Nuestra Agricultura en el tercer milenio. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (In press).
- Bernal-Lugo, I. and A.C. Leopold. 1998. The dynamics of seed mortality. *J. Exp. Bot.* 49:1455-1461.
- Bernal-Lugo, I., A. Camacho, and A. Carballo. 2000. Effects of seed ageing on the enzymatic antioxidant system of maize cultivars. p. 151-160. In M. Black, K.J. Bradford and J.M. Vázquez-Ramos (eds.) *Seed biology advances and applications*. CABI Publishing. Oxford, UK.
- Bestwick, C.S., I.R. Brown, and J.W. Mansfield. 1998. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in Lettuce. *Plant Physiol.* 118: 1067-1078.
- Bily, A.C., L.M. Reid, J.H. Taylor, D. Johnston, C. Malouin, A.J. Burt, B. Bakan, C. Regnault-Roger, K.P. Pauls, J.T. Arnason, and B.J.R. Philogene. 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93:712-719.
- Blanco-Labra, A. and F.A. Iturbe-Chinas. 1981. Purification and characterization of an amylase inhibitor from maize. *J Food Chemistry* 5:1-17.
- Blanco-Labra, A., A. Chagolla-Lopez, N. Martinez-Gallardo and S. Valdez-Rodriguez. 1995. Further characterization of the 12 kDa proteasa/alpha amylase inhibitor present in maize seeds. *J Food Chemistry* 19:27-41.
- Bohn, M., M.M. Khairallah, C. Jiang, D. González-de-León, D. A. Hoisington, H.F. Utz, Deutsch, D.C. Jewell, J.A. Mihm, and A.E. Melchinger. 1997. QTL mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. *Crop Sci.* 37:1892-1902.
- Bohn, M., M.M. Khairallah, D. González-de-León, D.A. Hoisington, H.F. Utz, J.A. Deutsch, D.C. Jewell, J.A. Mihm, and A.E. Melchinger. 1996. QTL mapping in tropical maize: I. genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. *Crop Sci.* 36:1352-1361.

-
- Bohn, M., B. Schulz, R. Kreps, D. Klein, and A.E. Melchinger. 2000. QTL mapping for resistance against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* H.) in early maturing European dent germoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 101:907-917.
- Boyes, S., P. Chevis, and C. Perera. 1997. Peroxidase isoforms of corn kernels and corn on the cob: preparation and characteristics. *Lebens. -Wiss. U. -Technol.* 30:192-201.
- Brewbaker, J.L., C. Nagai, and E.H. Lui. 1985. Genetic polymorphism of 13 maize peroxidases. *J. Hered.* 76:159-167.
- Brisson L.F., R. Tenhaken, and C.J. Lamb. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* 6:1703-1712.
- Burt, A.J. 2003. Phytochemical mediation of post-harvest insect resistance in tropical maize. Thesis. MSc. University of Ottawa, Ottawa, ON. Canada.
- Byrne, P.F., M.D. McMullen, B.R. Wiseman, M.E. Snook, T.A. Musket, J.M. Theuri, N.W. Widstrom, and E.H. Coe. 1998. Maize silk maysin concentration and corn earworm antibiosis: QTLs and genetic mechanisms. *Crop Sci.* 38:461-471.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cardinal, A.J., M. Lee, N. Sharopova, W.L. Woodman-Clikeman, and M. J. Long. 2001. Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci for resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. *Crop Sci.* 41: 835-845.
- Cardinal, A.J., M. Lee, and K.J. Moore. 2003. Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci affecting fiber and lignin content in maize. *Theor. Appl. Genet.* 106:866-874.
- Caruso, C. G. Chilosi, L. Leonardi, L. Bertini, P. Magro, V. Buonocore, and C. Caporale. 2001. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry.* 58: 743-750.
- Cassab, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:281-309.
- Chen, T.F., and C.L. Chen. 2003. Analysing the freshness of intact rice grains by colour determination of peroxidase activity. *J. Sc. Food Agric.* 83:1214-1218.

-
- Classen D., J.T. Arnason, J.A. Serratos, J.D.H. Lambert, C. Nozzolillo y B.J.R. Philogene. 1990. Correlation of phenolics acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT's collections. *J. Chem. Ecol.* 16: 301-315.
- Cochrane, M.P. 1994. Observations on the germ aleurone of barley. Phenol oxidase and peroxidase activity. *Annals of Botany.* 73:121-128.
- Davis G.L., M.D. MCMullen, C. Baysdorfer, T. Musket, D. Grant, M. Staebell, G. Xu, M. Polacco, L. Koster, S. Melia-Hancock, K. Houchins, S. Chao, and E.H. Coe. 1999. *Genetics.* 152:1137-1172.
- Derera, J., K.V. Pixley, and D.P. Giga. 1998. Inherence of maize weevil resistance in maize hybrids among lines from Southern Africa, Mexico, and CIMMYT-Zimbabwe. p. 24-27. In CIMMYT and EARO (ed.) *Maize production technology for the future: challenges and opportunities; proceeding f the Sixth East and Southern Africa Maize Conference.* Sep 21-25. Addis Ababa, Ethiopia.
- Derera, J., K.V. Pixley and P. D. Giga. 2001a. Resistance of maize to the maize weevil: I. Antibiosis. *Afr. Crop Sci. J.* 9:431-440.
- Derera, J., D.P. Giga, and K.V. Pixley. 2001b. Resistance of maize to the maize weevil: II. Non-preference. *Afr. Crop Sci. J.* 9:441-450.
- Dhliwayo, T., and K.V. Pixley. 2003. Divergent selection for resistance to maize weevil in six maize populations. *Crop Sci.* 43:2043-2049.
- Díaz-Pontones, D. 2001. El endospermo y sus usos. *Ciencia y Desarrollo.* 161:17-21.
- Dobie, P. 1974. The laboratory assessment of the inherent susceptibility of maize varieties to post-harvest infestation by *Sitophilus zeamais* Mosth (Coleoptera, Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 10: 183-197
- Dobie, P. 1977. The contribution of the Tropical Stored Products Center to the study of insect resistance in stored maize. *Trop. Stored Prod. Inf.* 34:7-22.
- Dowd, P.F. 1994. Enhanced maize (*Zea mays* L.) pericarp browning: associations with insect resistance and involvement of oxidizing enzymes. *J. Chem. Ecol.* 20:2777-2803.
- Dowd, P.F., and L.M. Lagrimini. 1997. The role of peroxidase in host insect defenses. p. 195-223. In J.N. Carozzi and M. Koziel (eds.) *Advances in insect control. The role of transgenic plants.* Taylor & Francis. Great Britain.

-
- Dowd, P.F., L.M. Lagrimini, and D.A. Herms. 1998. Differential leaf resistance to insects of transgenic sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) expressing tobacco anionic peroxidase. *CMLS Cell Mol. Life Sci.* 54:712-720.
- Dowd P F, Herms D A, Berhow M A y Lagrimini L M. 2000. Mechanism of insects resistance in transgenic plants (over) expressing a tobacco anionic peroxidase. *Plant Perox Newslett* 14: 93-100.
- FAO.1992. Maize in human nutrition. FAO Food and Nutrition Series, No. 25. Rome Italy.
- Fixon-Owoo S., F. Levasseur, K. Williams, T.N. Sabado, M. Lowe, M. Klose, A.F. Mercier, P. Fields, J. Atkinson. 2003. Preparation and biological assessment of hydroxycinnamic acids amides of polyamines. *Phytochem.* 63:315-334.
- Fontaine A.S., M. Briand, and Y. Barrière. 2003. Genetic variation and QTL mapping of para-coumaric and ferulic acid contents in maize stover at silage harvest. *Maydica.* 48:75-84.
- Fortier, G.,J.T. Arnason, J.D.H. Lambert, J. McNeill, C. Nozzolillo y B.J.R. Philogene. 1982. Local and improved corns (*Zea mays*) in small farm agriculture en Belice, C.A.; their taxonomy, productivity and resistance to *Sitophilus zeamais*. *Phytoprotection* 63: 68-78
- Fraignier, M-P., N. Michaux-Ferrière, and K. Kobrehel. 2000. Distribution of peroxidase in durum wheat (*Triticum durum*). *Cereal Chem.* 77:11-17.
- Fritz, S.E., K.R. Hood, and E.E. Hood. 1991. Localization of soluble and insoluble fractions of hydroxyproline-rich glycoproteins during maize kernel development. *J. Cell Sci.* 98:545-550.
- Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:165-186.
- Fry, S.C., S.C. Willis, and A.E.J. Paterson. 2000. Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and large ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta.* 211:679-692.
- Garcia-Conesa, M.T., P.D Wilson, G.W. Plumb, J. Ralph and G. Williamson. 1999. Antioxidant properties in 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- β,β' -bicycinnamic acid (8-8 diferulic acid, non-cyclic form). *J.Sc. Food Agric.* 79:379-384.
- Galanat, W.C. 1992. Evolution of corn. *Advances in agronomy* 47:203-231

-
- García-Lara, S., D.J. Bergvinson, A.J. Burt, A.I. Ramputh, D.M. Díaz-Pontones, and J.T. Arnason. 2004. The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance. *Crop Sci.* 44:1546-1552.
- Gardiner, J., E. Coe, S. Melia-Hancock, D. Hoisington, and S. Chao. 1993. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F2 population. *Genetics.* 134:917-930.
- George M.L.C., B.M. Prasanna, R.S. Rathore, T.A.S Setty, F. Kasim, M. Azrai, S. Vasal, O. Balla, D. Hautea, A. Canama, E. Regalado, M. Vargas, M.M. Khairallah, D. Jeffers, and D. Hoisington. Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia. *Theor. Appl. Genet.* 107:544-551.
- Giga, D.P., and U.W. Mazarura. 1991. Levels of resistance to the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motsch) in exotic, local open-pollinated and hybrid maize germplasm. *Insect Sci. Applic.* 12:159-169.
- Goldman, I. L., T.R. Rocheford, J.W. Dudley. 1994. Molecular markers associated with maize kernel oil concentration in an Illinois high protein x Illinois low protein cross. *Crop Sci.* 34:908-915.
- Groh, S., D. González-de-León M.M. Khairallah, C. Jiang, D. Bergvinson, M. Bohn, D.A. Hoisington, and A.E. Melchinger. 1998. QTL mapping in tropical maize: III. genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two RIL populations. *Crop Sci.* 38:1062-1072.
- Grube, A. 2000. *Los Mayas: Una civilización Milenaria.* Konemann. Italia. 480 p.
- Gudrups, I., S. Floyd, J.G. Kling, N.A. Bosque-Perez, and J.E. Orchard. 2001. A comparison of two methods of assessment of maize weevil resistance to the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, and the influence of kernel hardness and size on susceptibility. *J. Stored Prod. Res.* 37:287-302.
- Gupta, S.C., V.I. Asnani, B.P. Khare (1970) Effect of the opaque -2 gene in maize (*Zea mays* L.) on the extent of infestation by *Sitophilus oryzae* L. *J Stored Prod Res.* 6:191-194.
- Hallauer, A.R., J.B. Miranda. 1988. *Quantitative genetics in maize breeding.* Iowa State Univ. Press. Ames, IA.

-
- Hatfield RD, Ralph J, Grabber JH. 1999. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food and Agric.* 79:403-407.
- Hazen SP, Hawley RM, David GL, Henrissat B, Walton JD: Quantitative trait loci and comparative genomics of cereal cell wall composition. *Plant Physiol* 2003, 132:263-271.
- Hazen, S.P., R.M. Hawley, G.L. Davis, B. Henrissat, and J.D. Walton. 2003. Quantitative trait loci and comparative genomics of cereal cell wall composition. *Plant Physiol.* 132:263-271.
- Hoisington, D., M. Khairallah, and D. González-de-León. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Third edition. CIMMYT. Mexico D.F.
- Holland, N., D. Holland, T. Helentjaris, K.S. Dhugga, B. Xoconostle-Cazares, and D.P. Delmer. 2000. A comparative analysis of the plant cellulose synthase (*CesA*) gene family. *Plant Physiol.* 123:1313-1324.
- Hood, E.E., K.R. Hood, and S.E. Fritz. 1991. Hydroxyproline-rich glycoproteins in cell walls of pericarp from maize. *Plant Sci.* 79:13-22.
- Hopkins W.G. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons Inc. Toronto, Canadá. 464 p.
- Howard KJ, Morgan TD, Throne JE, Dowell FE, Bailey M, Howard JA: Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature Biotech* 2000, 18:670-674.
- Ishii, T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127:111-127.
- Jansen, R.C., and P. Stam. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics.* 136:1447-1455.
- Jiang, C., and Z.B. Zeng. 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics.* 140:1111-1127.
- Justice, O.L. y L.N. Bass. 1978. *Principles and practices of seed storage*. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C. 289 pp.
- Kang, M.S., Y. Zhang, and R. Magari. 1995. Combining ability for maize weevil preference of maize grain. *Crop Sci.* 35:1556-1559.
- Khairallah, M.M., M. Bohn, C. Jiang, J.A. Deutsch, D.C. Jewell, J.A. Mihm, A.E. Melchinger, D. González-de-León, D.A. Hoisington. 1998. Molecular mapping of QTL

-
- for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. *Plant Breeding*. 117:309-318.
- Kirk, V.M., and A. Manwiller. 1964. Rating dent corn for resistance to rice weevils J. *Economic Entomology*. 57: 850-852.
- Kim, S.K. and D.K. Kossou. 2003. Responses and genetic of maize germoplasm resistant to the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky in West Africa. *J. Stored Prod. Res.* 39:489-505.
- Kim, S-H., M. Dauwalder, and S.J. Roux. 1996. Immunocytolocalization of cell wall peroxidase and other wall antigens from maize seedling. *J. Plant Biol.* 39:99-105.
- Knapp, S.J., W.W. Stroup, and W.M. Ross. 1985. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Sci.* 25:192-194.
- Korunic, Z., S. Cenkowski, and P.G. Fields. 1998. Grain bulk density as affected by diatomaceous earth and application method. *Postharvest Biol. Tech.* 13:81-89.
- Kossou, D.K., J.H. Marech and N.A. Bosque-Perez. 1993. Comparison of improved and local maize varieties in the republic of Benin with emphasis on susceptibility to *Sitophilus zeamais* (Mots.) *J of Stored Prod Res.* 29: 333-343
- Krakowsky, M.D., M. Lee, W.L. Woodman-Clikeman, M.J. Long, and N. Sharopova. 2004. QTL mapping of resistance to stalk tunnelling by the European corn borer in RILs of maize population B73 x De811. *Crop Sci.* 44:274-282.
- Kramer JK, TD Morgan, JE Throne, FE Dowell, M Bailey, JA Howard. 2000. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pest. *Nat. Biotechnol.* 18:670-674.
- Kroon, P.A., and G. Williamson. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 79:355-361.
- Lamb, C., and R.A. Dixon. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:251-275.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural populations. *Genomics.* 1:174-181.
- Lander, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvements of quantitative traits. *Genetics.* 124:743-756.

-
- Li, R., M.S. Kang, O.J. Moreno y L.M. Pollak. 1998. Genetic variability in exotic X adapted maize (*Zea mays* L.) germoplasm for resistance to maize weevil. *Plant Genetic Resources Newsletter* 114: 22-25.
- Longstaff, B.C. 1981. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): a critical review. *Protection Ecol.* 2:83-130.
- Markham R.H., N.A. Bosque-Pérez, C. Borgemeister y W.G. Meikle. 1994. Developing pest management strategies for the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, and the large grain borer, *Prostephanus truncatus*, in the humid and sub-humid tropics. *FAO Plant Prot Bull* 42: 125-136.
- Mazau, D., D. Rumeau, and M-T. Esquerré-Tugayé. 1987. Molecular approaches to understanding cell surface interactions between plants and fungal pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 25:337-343.
- MacMilliam, W.W., N. W. Winstrom y K.J. Starks. 1968. Rice weevil damage as affected by husk treatment methods of artificially infesting field corn plots. *J Economic Entomology*: 61: 918-921.
- McMullen, M.D., and K.D. Simcox. 1995. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. *Mol. Pl.-Microbe Inter.* 8:811-815.
- Melchinger, A.E., H.F. Utz, and C.C. Schön. 1998. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population sample in maize reveals the low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics.* 149:383-403.
- Milosevic N., and A.J. Slusarenko. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiol Plant Pathol.* 49:143-158.
- Moreau, R.A., A. Nuñez, and V. Singh. 2001. Diferuloylputrescine and p-coumaroyl-feruloylputrescine, abundant polyamine conjugates in lipid extracts of maize kernels. *Lipids*, 36: 839-844.
- Moreno Martinez, E., M. Ramirez González, M. Mendoza Ramírez, and G. Valencia Ramirez. 1987. Comparison of Mexican maize races stored under adverse humidity and temperature. p. 94-98. In CIMMYT (ed.) *Recent advances in the conservation and utilization of genetic resources. Proceeding of the global maize germoplasm workshop held at CIMMYT.* CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.

-
- Morohashi, Y. 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm to tomato seeds prior to radicle protrusion. *J. Exp. Botany*. 53:1643-4650.
- Painter, R.H. 1951. Insect resistance in crop plants. The university Press of Kansas. Lawrence. 520 p.
- Painter, R.H. 1958. Resistance of plants to insects. *Annu. Rev Entomol*. 3:267-290.
- Panagabko, C., D. Chenier, S. Fixon-Owoo, J.K. Atkinson. 2000. Ion-pair HPLC determination of hydroxycinnamic acid monoconjugates of putrescine, spermidine and spermine: potential plant defence compounds. *Phytochemical Analysis* 11:11-17.
- Paterson, A.H., S. Damon, J.D. Hewitt, D. Zamir, H.D. Rabinowitch, S.E. Lincoln, E.S. Lander, and S.D. Tanksley. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*. 127:181-197.
- Pollack, L. M. y P. J. White (1995) Corn as a food source in the United States: Part I. Historical and current perspectives. *Cereal Foods World* 40: 749-754.
- Ramirez, G.M. 1979. Almacenamiento y conservacion de granos y semillas. Continental, México D.F. 230 pp
- Saulnier, L., and J-F. Thibault. 1999. Feluric acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric*. 79:396-402.
- Schön, C.C., A.E. Melchinger, W.D. Guthrie, and W. Woodman. 1993. Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second-generation European corn borer in maize with aid of RFLPs. *Heredity*. 70:648-659.
- Schopfer, P., C. Plachy, and G. Frahry. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol*. 125:1591-1602.
- Sen A., S.S. Miller and J.T. Arnason. 1991. Quantitative determination by high performance liquid chromatography and microspectro-fluorimetry of phenolic acids in maize grain. *Phytochemical Analysis*. 2:225-229.
- Sen, A., D. Bergvinson, S.S. Miller, J. Atkinson, R.G. Fulcher, and J.T. Arnason. 1994. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. *J. Agric. Food Chem*. 42:1879-1883.

-
- Serratos, A., J.T. Arnason, C. Nozzolillo, J.D.H. Lambert, B.J.R. Philogene, G. Fulcher, K. Davidson, L. Peacock, J. Atkinson, and P. Morand. 1987. Factors contributing to resistance of exotic maize populations to maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J. Chem. Ecol.* 13:751-762.
- Serratos, A. 1993. Análisis genético de algunas características bioquímicas y estructurales del grano de maíz (*Zea mays*) y su relación con la resistencia a la infestación de *Sitophilus zeamais*, PhD Thesis. CINVESTAV, Mexico. 106p.
- Serratos JA, Blanco-Labra A, Mihm JA, Pietrzak L, Arnason JT. 1993. Generation means analysis of phenolic compounds in maize grain and susceptibility to maize weevil *Sitophilus zeamais*. *Can J Bot.* 71:1176-1181.
- Serratos, J.A., J.T. Arnason, A. Blanco-Labra, and J.A. Mihm. 1997. Genetics of maize grain resistance to maize weevil. p. 132-138. In J.A. Mihm (ed.) *Insect resistance maize: recent advances and utilization; proceeding of an international symposium held at CIMMYT.* CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.
- Sharma HC and R. Ortiz. 2002. Host plant resistance to insects: an eco-friendly approach for pest management and environment conservation. *J. Environm.Biol.* 23:111-135.
- Smith, C.M. 1997. An overwrite of the mechanism and bases of insect resistance in maize. En J.A. Mihm (ed.) *Insect resistance maize: recent advances and utilization; proceeding of an international symposium held at CIMMYT.* CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.
- Stuber, C.W., M.D. Edwards and J.F. Wendel. 1987. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II factors influencing yield and its components traits. *Crop. Sci.* 27:639-648.
- Szalma, S.J., M.E. Snook, B.S. Bushman, K.E. Houchins, and M.D. McMullen. 2002. Duplicate loci as QTL: The role of chalcone synthase loci in flavone and phenylpropanoid biosynthesis in maize. *Crop Sci* 42:1679-1687.
- Throne JE, Eubanks MW. 2002. Resistance of tripsacorn to *Sitophilus zeamais* and *Oryzaephilus surinamensis*. *J Stored Prod Res.*38:239-245.
- Tigar, B.J., P.E. Osborne, G.E. Key, M.E. Flores-S, and M. Vazquez-A. 1994. Insect pest associated with rural maize stores in Mexico with particular reference to *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *J. Stored Prod. Res.* 30:267-281.

-
- Tipping, P.W., D.E. Legg, J.G. Rodriguez, and C.G. Poneleit. 1988. Influence of maize pericarp surface relief on the resistance to the maize weevil. *J. Kans. Entomol. Soc.* 61:237-241.
- Tipping, P.W., P.L. Cornelius, D.E. Legg, C.G. Poneleit, and J.G. Rodriguez. 1989. Inherence of resistance in whole kernel maize to oviposition by the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 82:1466-1460.
- Villegas, E., E. Ortega, and R. Baner. 1984. Chemical methods used at CIMMYT for determining protein quality in cereals grains. CIMMYT. Mexico D.F., Mexico.
- VanDerSchaaf, D., D.A. Wilbur y R.H. Painter. 1969. Resistance of corn to laboratory infestation of the larger rice weevil, *Sitophilus zeamais*. *J. Economic Entomology.* 62: 352-355.
- Waldron, K.W., A.J. Parr, A. Ng, and J. Ralph. 1996. Cell wall esterified phenolic dimmers: identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem. Anal.* 7:305-312.
- Widstrom, N.W., L.M Redlinger, and W.J. Wiser. 1972. Appraisal of methods for measuring corn kernels resistance to *Sitophilus zeamais*. *J. Econ. Entomol.* 65:790-792.
- Widstrom, N.W., W.D. Hanson and L.M. Redlinger. 1975. Inherence of maize weevil resistance in maize. *Crop Sci.* 15:467-470.
- Widstrom, N.M., W.W. McMillian, L.M Redlinger, and W.J. Wiser. 1983. Dent corn inbred sources of resistance to the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 76:31-33.
- Widstrom, N.W., K. Bondari, and W.W. McMillian. 1993. Heterosis among insect-resistant maize populations. *Crop Sci.* 33:989-994.
- Willcox, M.C., M.M. Khairallah, D. Bergvinson, J. Crossa, J.A. Deutsch, G.O. Edmeades, D. González-de-León, C. Jiang, D.C. Jewell, J.A. Mihm, W.P. Williams, and D. Hoisington. 2002. Selection for resistance to southwestern corn borer using marker-assisted and conventional backcrossing. *Crop Sci.* 42:1516-1528.
- Wiseman, B.R., F.M. Davis (1990) Plant resistance to insects attacking corn and grain sorghum. *Florida Entomologist* 73: 446- 458
- Woessner, J.F. 1961. Determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this iminoacid. *Arch. Biochem. Biophys.* 39:487-492.

-
- Wright V.F. R.B. Mills y B.J. Willcutts. 1984. Methods for culturing stored –Grain Insects. En Toward Insects Resistance Maize for the Third World. Proceeding of the International Symposium on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects. CIMMYT. p. 72-83.
- Yencho G.C., M.B. Cohen, and P.F. Byrne. 2000. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 393-422.
- Zen, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics.* 136:1457-1468.