

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Análisis de la acumulación y actividad de enzimas de síntesis de almidón y su relación con la modificación del endospermo en maíz QPM

TESIS

Que presenta

IBQ DAVID GUILLERMO GONZÁLEZ NÚÑEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR JOSÉ ANGEL LÓPEZ VALENZUELA DRA KAREN VIRGINIA PINEDA HIDALGO

Culiacán, Sinaloa, México

Octubre de 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José Ángel López Valenzuela y la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo, así como la asesoría de la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas. Contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El IBQ David Guillermo González Núñez recibió Beca de Estudios de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de <u>Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 19</u> del mes <u>octubre</u> del año <u>2016</u>, el (la) que suscribe <u>IBQ. David Guillermo González Núñez</u> alumno (a) del Programa de <u>Maestría en</u> <u>Ciencia y Tecnología de Alimentos</u> con número de cuenta <u>0603990-1</u>, de la Unidad Académica <u>Facultad de Ciencias Químico Biológicas</u>, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de <u>Dr. José Angel López Valenzuela y Dra.</u> <u>Karen Virginia Pineda Hidalgo</u> y cede los derechos del trabajo titulado "<u>Análisis de la</u> <u>acumulación y actividad de enzimas de síntesis de almidón y su relación con la modificación</u> <u>del endospermo en maíz QPM</u>", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

bonzalez N.

IBQ. David Guillermo González Núñez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias por la vida y la salud.

- A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado a través del Programa Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.
- A todos los profesores de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, por poseer la firme intención de cultivar el conocimiento, gracias por ayudarme en mi formación académica.
- Al **Dr José Ángel López Valenzuela,** gracias por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y formar parte de su equipo de trabajo, pero sobre todo gracias por permitirme crecer tanto en el ámbito profesional como en el personal.
- A la **Dra Karen Virginia Pineda Hidalgo,** gracias por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de este trabajo, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo. En verdad ¡Muchas Gracias!
- A la **MC Jeanett Chávez Ontiveros**, por estar siempre al pendiente de mí y del proyecto, por brindarme su apoyo en todo momento. ¡Gracias maestra Jeanett!

A la Dra Nancy Yareli Salazar Salas, por la asesoría y ayuda brindada.

A mis compañeros de laboratorio Elthon, Fernanda (la crack), Lulú, Anayanci, Erika (la compa), Milton, Alejandro (el pa), Grimaldy (esoo), Itzel, Glenda, Dennise y Alexis por la amistad, la ayuda brindada y sobre todo que hacían posible un ambiente de trabajo agradable y lleno de flow para que este trabajo resultará lo mejor posible. ¡Gracias!

- A mis amigos y compañeros de genética Gisela, Alma y Christian, gracias por el compañerismo y las carnes asadas.
- Y en especial gracias a mis **padres** Braulio y Luz, a mi **abuela** Antonia y a mis **hermanos** Rafael y Esthela por el apoyo otorgado en todo momento. ¡muchas Gracias!

Y dí mi corazón a conocer la sabiduría, y también a entender las locuras y los desvaríos: conocí que aún esto era aflicción de espíritu. Porque en la mucha sabiduría hay mucha molestia; y quien añade ciencia, añade dolor. Eclesiastés 1:17-18

ÍNDICE GENERAL

ÍNI		Pág.
í NL	DICE DE FIGURAS	v
ÍN	DICE DE CUADROS	vii
I	RESUMEN	1
	ABSTRACT	3
II	INTRODUCCIÓN	5
	REVISIÓN DE LITERATURA	7
	A GENERALIDADES DEL MAÍZ	7
	1 Importancia económica y social	7
	2 Estructura y composición del grano	10
	B ALMIDÓN	14
	1 Estructura del almidón	15
	2 Biosíntesis del almidón	17
	a ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	17
	b Almidón sintasas	20
	1) Síntesis de amilosa	21
	2) Síntesis de amilopectina	21
	c Enzimas ramificadoras de almidón (SBE)	22
	d Enzimas desramificadoras de almidón (DBE)	23
	3 Interacciones entre las enzimas de biosíntesis de almidón	23

	4 Genes relacionados en la biosíntesis de almidón	24
	5 Proteínas asociadas al gránulo de almidón	27
	6 Propiedades fisicoquímicas del almidón	28
	C MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA	30
	1 Mecanismos propuestos para la modificación del endospermo	31
	en maíz QPM	
	a Mecanismo relacionado al incremento de gamma zeínas	31
	b Relación entre la estructura del granulo de almidón y la	34
	modificación del endospermo en QPM	
	2 Análisis genéticos, bioquímicos y moleculares relacionados con	35
	la modificación del endospermo en maíz QPM	
	D ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS DE ALMIDÓN EN	38
	CEREALES	
IV	JUSTIFICACIÓN	43
V	OBJETIVOS	44
	A OBJETIVO GENERAL	44
	B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	45
	A MATERIALES	45
	B MÉTODOS	45
	1 Determinación de almidón total	45
	2 Determinación de amilosa	46
	a Pretratamiento del almidón	46

	b Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa	47		
	c Determinación de almidón total	48		
3 Aislamiento de gránulos de almidón 4 Propiedades térmicas del almidón				
	almidón			
	a Extracción de proteínas asociadas al gránulo	49		
	b Separación de proteínas por electroforesis en geles de	50		
	poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)			
	6 Análisis de la actividad de enzimas de biosíntesis de almidón	51		
	a ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	51		
	b Almidón sintasas	52		
	1) Determinación de la actividad enzimática de SSS	53		
	2) Determinación de la actividad enzimática de GBSSI	54		
	c Enzima ramificadora de almidón	55		
	d Enzima pululanasa (<i>PUL</i>)	56		
	7 Análisis estadístico	57		
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58		
	A COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES TÉRMICAS DEL ALMIDÓN EN	58		
	LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD			
	1 Composición y contenido del almidón	58		
	2 Propiedades térmicas del almidón	63		
	B ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE	69		

ALMIDÓN (PAG) EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN
VITROSIDAD

C ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS DE ALMIDÓN EN EL 74 ENDOSPERMO DE LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD

1 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	
2 Almidón sintasas	79
a Almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSSI)	79
b Almidón sintasa soluble (SSS)	83
3 Enzima ramificadora de almidón (SBE)	87
4 Enzima pululanasa (PUL)	91
VIII CONCLUSIONES	95
IX BIBLIOGRAFÍA	97
ABREVIATURAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.				
1	Corte longitudinal del grano de maíz.	11				
2	Estructura química de amilosa y amilopectina.	16				
3	Estructura del granulo de almidón.					
4	Ruta de biosíntesis de almidón en el endospermo de cereales.	19				
5	Comparación de endospermos de diferentes genotipos de maíz.	33				
6	6 Microscopía electrónica de barrido en gránulos de almidón aislados de					
	endospermos maduros de muestras contrastantes en vitrosidad.					
7	Separación por SDS-PAGE de proteínas asociadas al gránulo de	70				
	almidón en endospermo en estado de desarrollo medio (20 DDP) de					
	líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.					
8	Separación por SDS-PAGE de proteínas asociadas al gránulo de	71				
	almidón en endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de					
	líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.					
9	Actividad de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) en	75				
	endospermo en estado de desarrollo medio (20 DDP) de las líneas					
	K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.					
10	Actividad de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) en	77				
	endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas					
	K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.					

11 Actividad de la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI) en 80

endospermo en estado de desarrollo medio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64A*o*2 contrastantes en vitrosidad.

- 12 Actividad de la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI) en 81 endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.
- 13 Actividad de la enzima almidón sintasa soluble (SSS) en endospermo en 84 estado de desarrollo intermedio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.
- Actividad de la enzima almidón sintasa soluble (SSS) en endospermo
 en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM
 y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad
- 15 Actividad de la enzima ramificadora de almidón (SBE) en endospermo 88 en estado de desarrollo intermedio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.
- Actividad de la enzima ramificadora de almidón (SBE) en endospermo
 90 en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM
 y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.
- 17 Actividad de la enzima pululanasa (PUL) en endospermo en estado de 92 desarrollo intermedio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.
- 18 Actividad de la enzima pululanasa (PUL) en endospermo en estado en 93 desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad.

vi

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Principales países productores de maíz en 2014.	8
2	Principales estados productores de maíz en el año 2014.	9
3	Composición química del grano de maíz (% en base seca).	13
4	Principales genes de biosíntesis de almidón en endospermo de maíz	25
	y su localización en el mapa genético.	
5	Contenido de almidón total en endospermo en desarrollo de líneas	59
	de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	
6	Contenido de amilosa en endospermo en desarrollo de líneas de	61
	maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	
7	Propiedades térmicas del almidón obtenido de endospermo en	64
	desarrollo de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	

I RESUMEN

El maíz de calidad proteínica (QPM) resulta de la conversión del endospermo blando de la mutante opaco2 (o2) en vítreo. Un análisis de expresión génica en líneas recombinante puras (RIL) derivadas de la cruza entre K0326Y QPM y W64Ao2 encontró que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios en la expresión de genes de síntesis almidón a nivel transcripcional y proteínas durante el desarrollo del endospermo, pero no se ha determinado su asociación con la actividad enzimática. El objetivo del presente estudio fue analizar la acumulación y actividad de las enzimas de síntesis de almidón y su relación con el fenotipo vítreo del endospermo QPM. Se utilizaron las líneas K0326Y QPM y W64Ao2, así como una selección de líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruza y contrastantes en vitrosidad. De cada línea se obtuvieron endospermos en desarrollo a los 20 y 30 días después de la polinización (DDP) y se les extrajo el almidón, el cual se analizó en su composición, propiedades térmicas y acumulación de proteínas asociadas al gránulo. También se prepararon extractos para medir la actividad de las enzimas ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasa unido al gránulo (GBSSI). almidón sintasa soluble (SSS), enzima ramificadora (SBE) v desramificadora (PUL). A los 20 DDP se observó una mayor acumulación de almidón y amilosa en endospermos de líneas opacas, mientras que a 30 DDP se observo mayor acumulación de amilosa en líneas vítreas, lo cual se atribuyó a una mayor precocidad de los endospermos opacos. La entalpía de gelatinización mostró una relación inversa con el contenido de amilosa en ambos estados de desarrollo. El análisis de la acumulación de proteínas asociadas al gránulo mostró una mayor acumulación de GBSSI en las muestras opacas a 20 DDP y en muestras vítreas a 30

DDP, lo cual se relacionó con un mayor contenido de amilosa en estas muestras. En cuanto al análisis de actividad, a los 20 DDP la línea vítrea K0326Y QPM mostró mayor actividad de las enzimas SBE y PUL respecto a la línea opaca W64Ao2, mientras que las actividades de las enzimas GBSSI y SSS no presentaron diferencias significativas; la enzima AGPasa presentó mayor actividad en la línea W64Ao2, lo cual correspondió con un mayor contenido de almidón en esta línea. A los 30 DDP, la línea K0326Y QPM presentó mayor actividad de las enzimas GBSSI, SSS y PUL y menor actividad de SBE respecto a la línea W64Ao2, mientras que la actividad de AGPasa no presentó diferencia significativa; la actividad de GBSSI correspondió con una mayor acumulación de esta proteína y un mayor contenido de amilosa en la línea K0326Y QPM, mientras que la menor actividad de SBE en esta línea correspondió con una menor proporción de amilopectina. Los resultados sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios en la actividad de las enzimas de biosíntesis de almidón, las cuales afectan la composición del almidón durante el desarrollo del endospermo y como consecuencia sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Una mayor actividad de GBSSI y una menor actividad de SBE dan lugar a la formación de un gránulo de almidón con una mayor proporción de amilosa y regiones amorfas en la periferia, lo cual podría estar favoreciendo una mayor compactación entre los gránulos, contribuyendo al fenotipo vítreo en maíz QPM.

ABSTRACT

Quality protein maize (QPM) was developed by the conversion of the soft opaque2 (o2) endosperm into a vitreous phenotype. Transcriptional analyses with recombinant inbred lines (RILs) derived from the cross between the lines K0326Y QPM (vitreous endosperm) and W64Ao2 (opaque endosperm) suggested that this modification is associated with alterations in starch properties as a consequence of changes in the expression of starch biosynthetic genes. The aim of this study was to analyze the activity of starch biosynthetic enzymes and its relationship with the vitreous phenotype in QPM. The parental lines K0326Y QPM and W64Ao2, as well as RILs contrasting in vitrosity were used. Developing endosperms were obtained at 20 and 30 days after pollination (DAP). Starch was isolated and analyzed for its composition, thermal properties and granule-associated proteins. Protein extracts were also prepared to evaluate the activity of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), granule bound starch synthase (GBSSI), soluble starch synthase (SSS), starch branching enzyme (SBE) and pullulanase (PULL). A greater accumulation of starch and amylose was observed in opaque endosperms at 20 DAP, while at 30 DAP the greater accumulation of amylose was observed in vitreous endosperms, which was attributed to the precocity of opaque endosperm. The enthalpy of gelatinization showed an inverse relationship with the amylose content at both developmental stages. The analysis of granule-associated proteins showed greater accumulation of GBSSI in opague samples at 20 DAP and in vitreous samples at 30 DAP, which was associated with greater amylose content in these samples. Regarding enzyme activity at 20 DAP, the vitreous line KY0326Y QPM showed higher activities of SBE and PULL than W64Ao2, while GBSSI and SSS showed non-

significant differences; AGPase activity was higher in W64Ao2, which corresponded with the higher starch content observed in this line. At 30 DAP, the QPM line showed higher activities of GBSSI, SSS and PULL and lower activity of SBE than W64Ao2, while AGPase showed no significant differences. The activity of GBSSI, the enzyme responsible for amylose synthesis, corresponded with the greater accumulation of the protein and the higher amylose content observed in the QPM line, while the lower SBE activity of this line corresponded with the smaller proportion of amylopectin. The results suggest that the endosperm modification in QPM is associated with changes in the activity of starch biosynthetic enzymes, which affect the starch composition during endosperm development as well as its physicochemical and structural properties. The higher activity of GBSSI and the lower activity of SBE produce starch granules with a larger proportion of amylose and amorphous regions at the periphery, which may be favoring a greater compaction between these structures, contributing to the vitreous phenotype in QPM.

II INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L) ocupa el primer lugar de producción entre los cereales y representa la base de la alimentación en países en desarrollo como México. Sin embargo, al igual que otros cereales las proteínas del maíz son deficientes en aminoácidos esenciales, principalmente lisina y triptófano (Yau y col 1999).

Mertz y col (1964) descubrieron que la mutación *opaco-2* (*o2*) casi duplica el contenido de lisina presente en el endospermo de maíz y mejora la calidad proteínica del grano, pero presenta un endospermo blando que limitó su desempeño agronómico y uso. La introducción de genes modificadores del fenotipo blando dió lugar al maíz de calidad proteínica (QPM, del inglés, Quality Protein Maize), el cual posee un endospermo duro (vítreo) y mantiene la calidad nutricional de la mutante *o2* (Villegas y col 1992). Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos involucrados en la conversión del fenotipo blando vítreo en QPM. Dentro de los factores involucrados en esta modificación se incluyen una mayor acumulación de cuerpos proteínicos ricos en γ -zeína (Dannenhoffer y col 1995), alteración de la estructura y composición del almidón (Gibbon y col 2003; Salazar-Salas y col 2014), con la consecuente modificación de las propiedades de los gránulos.

El almidón es el principal componente del maíz y por lo tanto, es el que tiene mayor influencia sobre las propiedades del grano; está formado por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, las cuales se acumulan en gránulos. La biosíntesis de almidón involucra principalmente la actividad de cuatro grupos de enzimas: las ADP-glucosa pirofosforilasas (AGPasa), las almidón sintasas (GBSS, SS), enzimas ramificadoras de almidón (SBE) y enzimas desramificadoras de almidón (DBE) (Hannah y James 2008). Los seis principales genes que intervienen en la biosíntesis

de almidón son sh1, sh2, bt2, wx1, ae1 y su1, los cuales codifican para las diferentes enzimas en esta ruta. Existe una amplia diversidad en estos genes dependiendo del genotipo de maíz, por lo que la acumulación y actividades de las enzimas codificadas también presentan una amplia variación, lo que se ve reflejado en diferencias en la composición del almidón y sus propiedades. El análisis genético en una población de líneas recombinantes puras (RIL) derivada de la cruza entre K0326Y QPM (endospermo vítreo) y W64Ao2 (endospermo blando) identificó tres loci genéticos asociados con vitrosidad, una característica relacionada con dureza, en los cromosomas 1, 7 y 9 (Holding y col 2011). Recientemente, Salazar-Salas y col (2014) evaluaron el efecto de estos loci genéticos sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón y acumulación de proteínas en el endospermo maduro. Los resultados obtenidos por estos investigadores apoyan la idea de que alteraciones en la estructura/interacción de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón juegan un papel importante en la modificación del endospermo en QPM. El análisis de expresión de genes de síntesis de almidón indican que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios significativos en los niveles de transcritos de dichos genes (Soto-López 2015), lo cual repercute en cambios en la acumulación y posiblemente en las actividades de las principales enzimas biosintéticas, con la consiguiente variación en las propiedades fisicoquímicas y estructurales del almidón. Sin embargo, no existe información donde se analice la acumulación y actividad de las enzimas de síntesis de almidón, de tal manera que pueda asociarse con cambios en la composición y propiedades fisicoquímicas del gránulo. La información nos ayudaría a comprender mejor el mecanismo de transformación del endospermo blando en vítreo del maíz QPM.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A GENERALIDADES DEL MAÍZ

1 Importancia económica y social

El maíz es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, ocupando el primer lugar de producción con aproximadamente 1,021 millones de toneladas en el año 2014, seguido del arroz y el trigo con una producción de 740 y 728 millones de toneladas para ese mismo año, respectivamente (FAOSTAT 2016). En el Cuadro 1 se muestran los principales países productores de maíz, destacando Estados Unidos de América que ocupa el primer lugar de producción al aportar el 35.33% del total mundial, mientras que México ocupa el séptimo lugar con una producción de 23.3 millones de toneladas (FAOSTAT 2016).

En cuanto a la producción de maíz en nuestro país, Sinaloa es el principal estado productor con el 15.83 % de la producción nacional, seguido de Jalisco y Michoacán, con 14.91 y 8.31 %, respectivamente (Cuadro 2). Nuestro estado es altamente productivo gracias a la calidad de sus tierras y la tecnificación de las prácticas agrícolas, logrando así obtener rendimientos altos que se pueden comparar incluso con los de los principales países productores de maíz (SAGARPA 2016).

El maíz es de gran importancia social en países como el nuestro, ya que representa la base de la alimentación, aportando aproximadamente un 70 % de las calorías y hasta un 60 % de las proteínas ingeridas en la dieta. En la actualidad el consumo *per cápita* de maíz en México es de alrededor de 115.8 Kg/año (FAOSTAT 2016), lo cual se debe a la incorporación de este cereal en la mayoría de los platillos de la alimentación habitual de sus habitantes.

País	Producción (Ton)
Estados Unidos do Américo	001 000 000 00
Estados Unidos de America	361,000,000.00
China	216,000,000.00
Brasil	79,900,000.00
Argentina	33,000,000.00
Ucrania	28,500,000.00
India	23,700,000.00
México	23,300,000.00
Indonesia	19,000,000.00
Sudáfrica	15,000,000.00
Otros	222,216,583.00
Total	1,021,616,583.00

Cuadro 1. Principales países productores de maíz en 2014.

FAOSTAT (2016)

Estado	Producción (ton)
Sinaloa	3,686,274.43
Jalisco	3,472,284.51
Michoacán	1,935,286.73
Edo. México	1,856,138.09
Guanajuato	1,420,029.46
Chihuahua	1,373,409.72
Guerrero	1,331,607.65
Otros	8,198,225.95
Total	23,273,256.54

Cuadro 2. Principales estados productores de maíz en el año 2014

SAGARPA (2016)

2 Estructura y composición del grano

El grano de maíz está constituido por cuatro estructuras principales (Figura 1), pericarpio, endospermo, germen y pedicelo, las cuales se describen a continuación.

El pedicelo es la estructura celular mediante la cual el grano se encuentra unido al olote. Está compuesto de haces vasculares que terminan en la porción basal del pericarpio, consta de una capa exterior de abscisión con la función de sellar la punta del grano maduro. A esta capa le sigue una serie de células parenquimatosas en forma de estrella, unidas entre sí por medio de sus puntas formando una estructura frágil y porosa. El pedicelo constituye un 0.8% del peso total del grano (Watson 1987).

El pericarpio es la capa exterior dura y fibrosa que encierra al grano. Comprende el pericarpio (epidermis, mesocarpio, células cruzadas y tubulares), la testa (cubierta de la semilla) y la cofia, un pequeño casquete que cubre la punta del grano y protege al embrión. El grosor del pericarpio es menor en la parte central del grano y mayor en la base del mismo. En el cereal ya maduro, tiene la función de impedir el ingreso de hongos y bacterias. Todos los componentes del pericarpio constituyen aproximadamente un 5.3% del peso total del grano. El pericarpio está constituido en su gran mayoría de fibra (Watson 1987).

El endospermo constituye la mayor proporción del grano con aproximadamente un 80-84% del peso total. Funciona como la principal reserva energética de la planta durante su etapa temprana de desarrollo. Está compuesto mayoritariamente de almidón (90%) y proteínas (7%), y en menor proporción de lípidos, minerales y otros compuestos (Watson 1987).



Figura 1. Corte longitudinal del grano de maíz.

Cortesía de Joao T. Leiva (Departamento de Ciencia de Plantas de la Universidad de Arizona).

El germen aporta un 9.5-12% del peso total del grano y se localiza en la parte inferior del mismo. Posee dos partes destacables, el eje embrionario y el escutelo. El escutelo (cotiledón único) constituye cerca del 90% del germen y sirve como almacén de nutrientes que utiliza el embrión durante la germinación. El germen contiene aproximadamente el 35-40% del contenido total de lípidos encontrados en el grano (Watson 1987).

En lo que respecta a la composición química del grano de maíz, esta se ve afectada por el genotipo, así como por las condiciones climáticas y de crecimiento; a su vez, la composición química varía entre las diferentes estructuras del grano como se puede observar en el Cuadro 3. Los componentes mayoritarios son el almidón (~70 %) y las proteínas (~10 %). El almidón está formado a su vez por amilosa y amilopectina, cuyas características serán descritas en mayor detalle en la siguiente sección. Las proteínas representan en promedio un 10.3 % y se encuentran en mayor porcentaje en el germen. Las proteínas de reserva más abundantes en el grano de maíz son las prolaminas (solubles en alcohol), denominadas zeínas, ocupando el 70-80 % del total en el endospermo, mientras que las albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones salinas) se encuentran principalmente en el germen (Glover y Mertz 1987). Debido a que las zeínas son las proteínas mayoritarias del endospermo de maíz, una clasificación más sencilla divide a las proteínas totales en zeínas y no zeínas (Hamaker y Larkins 2000). Las nozeínas son un grupo heterogéneo de proteínas, las cuales forman parte del citoplasma y de la pared celular, pero ocupan una menor proporción en el endospermo del maíz normal.

Componente	Grano	Pericarpio	Endospermo	Germen	Pedicelo
Almidón	71.5	7.3	86.4	8.2	5.3
Proteína	10.3	3.7	9.4	18.8	9.1
Lípidos	4.8	1.0	0.8	34.5	3.8
Azúcares	2.0	0.3	0.6	10.8	1.6
Cenizas	1.4	0.8	0.3	10.1	1.6

Cuadro 3. Composición química del grano de maíz (% en base seca).

FAO (1993)

En la composición química del grano de maíz se distinguen también otros componentes como son lípidos (~5 %), cenizas (~1-3 %) y fibra (1-2 %). El contenido lipídico se encuentra en su mayoría en el germen del grano y los ácidos grasos no saturados (oleico y linoleico) son los que predominan en general. Con respecto al contenido de cenizas, los minerales se encuentran principalmente en el germen del grano (78 %), donde el más abundante es el fósforo que puede llegar a representar el 1 % del peso del grano (Astiazarán y Martínez 1999).

B ALMIDÓN

El almidón es la principal forma de reserva de carbono en los cereales, representando cerca del 70-80% del peso del grano, por lo que este componente es mayormente responsable del valor energético, nutricional y económico que tienen los granos (Paredes-López y col 2006). Las moléculas de almidón se encuentran formando gránulos que se depositan en las células del endospermo, ocupando la mayor parte de su volumen (Hamaker y Larkins 2000). En los últimos años, el estudio de la estructura del almidón y su relación con la actividad de las diferentes enzimas involucradas en su biosíntesis se ha incrementado, ya que esto repercute en las características morfológicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón. Por ello, el entendimiento de los procesos relacionados con la biosíntesis de almidón es esencial para el mejoramiento del rendimiento y la calidad de los cereales, así como de sus usos en la industria.

1 Estructura del almidón

El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Figura 2). Estas moléculas se organizan en anillos concéntricos para dar lugar a la estructura granular. La distribución de amilosa dentro de los anillos concéntricos difiere entre el centro y la periferia del granulo, ya que solo ocupa los lugares disponibles que deja la amilopectina después de sintetizarse (Tetlow y col 2004a).

La amilosa es una molécula esencialmente lineal formada por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1,4) y tiene un peso molecular de alrededor de 1 x 10⁵⁻⁶ correspondiente al grado de polimerización (GP) de 1000-10,000 unidades de glucosa. Un porcentaje menor al 0.5% de la glucosa en amilosa se encuentra unida por enlaces α -(1,6), resultando en un bajo grado de ramificación y una estructura de 3-11 cadenas de aproximadamente 200-700 residuos de glucosa por molécula (Copeland y col 2009).

La amilopectina es un polímero de mayor tamaño con un peso molecular alrededor de 1 x 10⁸ y GP de hasta un millón de unidades de glucosa. La mayoría de los almidones contienen entre el 60 y 90% de amilopectina; sin embargo, algunos almidones con alto contenido de amilosa pueden llegar a tener al menos 30% de amilopectina, mientras que los almidones de maíces tipo ceroso (*waxy*) prácticamente contienen el 100% de amilopectina.

Amilosa



Amilopectina



Figura 2. Estructura química de amilosa y amilopectina.

Tester y Karkalas (2002).

Aproximadamente el 5 % de las unidades de glucosa de la amilopectina están unidas mediante enlaces α -(1,6), otorgándole un alto grado de ramificación a la molécula. La estructura tipo árbol y la compleja arquitectura molecular puede variar sustancialmente entre almidones, lo cual va a depender de la posición y la longitud de la ramificación (Copeland y col 2009). La organización de estos racimos genera la formación de zonas semicristalinas y amorfas del gránulo de almidón (Figura 3).

2 Biosíntesis del almidón

La síntesis del almidón se lleva a cabo a través de la acción coordinada de múltiples enzimas de síntesis de almidón, así como de enzimas involucradas en su degradación (Tetlow y col 2004a). Dentro de estas enzimas se encuentran la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasas (GBSS, SS), enzimas ramificadoras de almidón (SBE) y enzimas desramificadoras de almidón (DBE) (Figura 4).

a ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

El catabolismo de la sacarosa en el citosol produce glucosa-6-fosfato y en la mitocondria ATP, sustratos para la biosíntesis de almidón. La glucosa-6-fosfato es trasladada al interior del amiloplasto y convertida en glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. Posteriormente, la glucosa-1-fosfato es convertida a ADP-Glucosa (ADP-Glu) mediante la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa), considerándose éste el paso regulatorio que controla el flujo de carbono hacia la biosíntesis de almidón.



Figura 3. Estructura del gránulo de almidón. (A) Cadena de amilopectina formando varios clusters, zonas de laminillas amorfas y cristalinas. (B) Gránulo entero formado por el apilamiento de las zonas amorfas (a) y cristalinas (c).

Jong-Seong y col (2010).



Figura 4. Ruta de biosíntesis de almidón en el endospermo de cereales. Los compartimentos del citosol y plástido se indican en cada recuadro. Las enzimas se indican en cursiva: *Susy*: sacarosa sintasa; *UGPasa:* UDP glucosa pirofosforilasa; *PGM*: fosfoglucomutasa; *FK*: fructocinasa; *PGI:* fosfoglucosa isomerasa; *PPiasa*, pirofosfatasa; *AGPasa*, ADP-glucosa pirofosforilasa; *GBSS*: almidón sintasa unida al gránulo; *SS*: almidón sintasa; *SBE*: enzima ramificadora de almidón.

Adaptada de Comparot-Moss y Denyer (2009)

En la mayoría de los tejidos vegetales donde se sintetiza almidón la AGPasa está localizada en el amiloplasto; sin embargo, en los cereales se encuentra en dos lugares diferentes, en el citosol, donde tiene su mayor actividad, y en el plástido, donde tiene una menor actividad (Nagai y col 2009). La AGPasa es una enzima heterotetramérica compuesta por dos subunidades grandes y dos pequeñas; las diferencias en la composición de subunidades y consecuentemente las propiedades de AGPasa dentro y entre los órganos de las plantas se refleja como la variación en la manera de como el flujo de síntesis de almidón es regulado (Smith y col 1997). Las subunidades pequeñas son generalmente las responsables de la actividad catalítica del complejo enzimático, mientras que las subunidades grandes participan en la modulación de las propiedades regulatorias que incrementan la respuesta alostérica de las subunidades pequeñas con 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fósforo inorgánico (Jeon y col 2010).

b Almidón sintasas

Las enzimas almidón sintasas (SS) añaden una unidad de glucosa del precursor ADP-Glu al extremo no reductor de una cadena de glucosas unidas por enlaces α -(1,4) para sintetizar los polímeros insolubles, amilosa y amilopectina. Una gran cantidad de isoformas de almidón sintasas han sido identificadas en el endospermo de cereales (Jeon y col 2010), las cuales se pueden dividir en dos grupos principales, uno de ellos involucrado principalmente en la biosíntesis de amilosa, y el segundo grupo limitado a la biosíntesis de amilopectina.

1) Síntesis de amilosa

El primer grupo de genes de almidón sintasas incluye almidón sintasas unidas al gránulo I y II (GBSSI y GBSSII). La enzima GBSSI es codificada por el locus *waxy* en cereales, funcionando especialmente en la elongación de la amilosa y encontrándose esencialmente dentro de la matriz del gránulo, mientras que la GBSII, codificada por otro gen, es la responsable de la síntesis de almidón en hojas y otros tejidos que no son de reserva, los cuales acumulan almidón de manera transitoria (James y col 2003). Además de su papel en la producción de amilosa, existen estudios donde se demuestra la participación de GBSSI en la síntesis de amilopectina, añadiendo unidades de glucosa a las cadenas largas de la amilopectina en lugar de las cadenas de amilosa (Vrinten y Nakamura 2000; Yoo y Jane 2002).

2) Síntesis de amilopectina

El segundo grupo de genes de almidón sintasas, designadas SSI, SSII, SSII y SSIV, está involucrado exclusivamente en la síntesis de las cadenas de amilopectina y se encuentran asociadas a los gránulos de almidón. Estudios genéticos y bioquímicos indican que cada isoforma de SS tiene diferentes propiedades y un papel distinto en la síntesis de amilopectina (Zeeman y col 2010) formando cadenas de diferente longitud.

En el endospermo de maíz, la mayor actividad de SS es de la isoforma SSI (Li y col 1999). El análisis de la distribución de cadenas de amilopectina en mutantes para esta isoforma sugiere que la SSI produce cadenas cortas, con grados de polimerización (GP) de 8-12 a partir de cadenas con GP de 6-7 que surgen de los puntos de ramificación en las cadenas A o B₁; mientras que las isoformas SSII y SSIII

parecen estar involucradas en la formación de cadenas intermedias (GP 13-25) y largas (GP>30), respectivamente (Nakamura y col 2005).

c Enzimas ramificadoras de almidón (SBE)

Las enzimas ramificadoras de almidón (SBE) también están presentes en múltiples isoformas. Estas enzimas generan los enlaces α -(1,6) rompiendo los enlaces α -(1,4) y transfiriendo la cadena al C₆ de un residuo de glucosa de otra cadena formando la estructura ramificada de la molécula de amilopectina. En el endospermo de cereales se expresan dos isoformas de enzimas ramificadoras: enzima ramificadora I (SBEI) y enzima ramificadora II (SBEII) (Sun y col 1997). Estas isoformas difieren en términos de longitud de la cadena de glucano transferida y de la especificidad del sustrato; SBEI muestra mayor afinidad por amilosa y transfiere cadenas más largas que SBEII, la cual transfiere cadenas más cortas y presenta mayor afinidad hacia amilopectina (Guan y Preiss 1993). La isoforma SBEIIa se expresa en todos los tejidos de los cereales que sintetizan almidón, mientras que SBEIIb se encuentra únicamente en las células del endospermo. La isoforma SBEIIa tiene la función de apoyar el papel que juegan otras SBE sin cambio aparente en la estructura de la amilopectina cuando ésta enzima es deficiente; sin embargo, un defecto en la isoforma SBEIIb resulta en un incremento en amilosa, jugando un papel muy importante en la producción de cadenas tipo A (cortas) de la amilopectina (Yun y Matheson 1993). Por lo general la isoforma SBEIIa es más activa en trigo y cebada, mientras que la SBEIIb es más activa en arroz y maíz (Regina y col 2010).

d Enzimas desramificadoras de almidón (DBE)

Las enzima desramificadoras de almidón (DBE) catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1,6). Existen dos tipos de enzimas desramificadoras (DBE) en plantas superiores y se definen sobre la base de sus especificidades de sustrato: enzimas desramificadoras tipo isoamilasa y tipo pululanasa (James y col 2003). Se ha reportado que la DBE tipo isoamilasa rompe las ramificaciones de amilopectina y fitoglucógeno, mientras que la DBE tipo pululanasa actúa sobre pululanos y amilopectina pero no fitoglucógeno. El fitoglucógeno es un polímero de glucosa con enlaces α -(1,4) y α -(1,6), que presenta un patrón de ramificación diferente a la amilopectina, siendo este más ramificado y menos organizado, lo cual impide la formación de cristales dentro del gránulo de almidón (Wong y col 2003). Se ha propuesto que las enzimas DBE pueden ser las responsables de la remoción de ramificaciones mal posicionadas (pre-amilopectina) generadas en la superficie de los gránulos de almidón en desarrollo, lo cual pudiera, por otro lado, prevenir la cristalización (Tetlow y col 2004b).

3 Interacciones entre las enzimas de biosíntesis de almidón

Una gran cantidad de enzimas son necesarias para la biosíntesis de almidón y la formación del gránulo; sin embargo, la manera en como éstas interaccionan aún no se conoce por completo. Diversos estudios sugieren que las enzimas se asocian formando uno o más complejos multienzimáticos (Tetlow y col 2004b; Hennen-Bierwagen y col 2008; 2009) debido al efecto pleiotrópico que se observa sobre las SS, SBE y DBE como resultado de estudios en mutantes de genes que codifican enzimas de biosíntesis de almidón.

Estudios realizados por Hennen-Bierwagen y col (2008, 2009) en maíz y trigo en desarrollo reportaron fracciones de proteínas de alto peso molecular, proporcionando así evidencias sobre la formación de complejos multienzimáticos que contienen las enzimas SSI, SSIIa y/o SBEIIb. Particularmente en maíz, la isoforma SSIII se encuentra formando un complejo de ~670 kDa y la enzima SSIIa se encuentra formando principalmente un complejo de ~300 kDa. La purificación parcial de estos complejos reveló que el complejo que contenía SSIII interaccionaba con la isoforma SSIIa, SBEIIa y SBEIIb, mientras que el análisis proteómico identificó proteínas como las subunidades grande y pequeña de AGPasa, piruvato fosfato dicinasa 2 (PPDK2) y sacarosa sintasa 1 (SH1) como proteínas que forman parte de estos complejos (Hennen-Bierwagen y col 2009).

Un análisis proteómico en el endospermo de maíz sugiere que la PPDK es una enzima clave en la regulación del flujo de carbono entre la biosíntesis de almidón y proteína durante el desarrollo del endospermo debido al efecto negativo que presenta la acumulación de PPi sobre la enzima AGPasa, enzima clave en la síntesis de almidón, cambiando el flujo de carbono hacia la biosíntesis de proteínas (Mechin y col 2007).

4 Genes relacionados en la biosíntesis de almidón

Se han realizado distintos estudios enfocados en identificar los principales genes que participan en la biosíntesis del almidón, destacando los siguientes: *Shrunken 1* y 2 (*Sh1 y Sh2*) *Brittle 2 (Bt2), Waxy 1 (Wx1), Amylose extender 1 (Ae1) y Sugary 1(Su1)*; la localización de estos genes en los cromosomas del maíz se muestra en el Cuadro 4.
Nombro	Mutanta	Docoringión	Cromosoma	
Nombre Mutante		Descripcion	(BIN)	
SuSyl	sh1	Sacarosa sintasa I	9.01	
AGPS1	bt2	ADP-glucosa pirofosforilasa, subunidad	4.05	
		pequeña		
AGPL1	sh2	ADP-glucosa pirofosforilasa, subunidad	3.09	
		grande		
GBSSI	wx1	Almidón sintasa unida al granulo I	9.03	
SSI		Almidón sintasa I	9.02	
SSIIa	su2	Almidón sintasa Ila	6.04	
SSIIIa	du1	Almidón sintasa IIIa	10.03	
SBEIIb	ae1	Enzima ramificadora de almidón Ilb	5.04	
ISA1	su1	Enzima desramificadora tipo isoamilasa	4.05	

Cuadro 4. Principales genes de biosíntesis de almidón en endospermo de maíz y su localización en el mapa genético.

Fuente: MaizeGDB (2016)

El gen Sh1 codifica para la enzima sacarosa sintasa (SuSy), que cataliza la producción de sacarosa a partir de NDP-glucosa y D-glucosa en la biosíntesis de almidón. Sh2 y Bt2 codifican para las subunidades grande y pequeña de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), Wx1 para la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), mientras que Ae1 y Su1 codifican para la enzima ramificadora de almidón IIb y desramificadora tipo isoamilasa, respectivamente. Existe una amplia diversidad en estos genes dependiendo del genotipo del maíz y como consecuencia la acumulación y actividades de las enzimas codificadas también presentan una amplia variabilidad, lo que se ve reflejado en diferencias en la composición del almidón (amilosa/amilopectina) y las propiedades del grano sobre las cuales este impacta. En este sentido Wilson y col (2004) evaluaron el efecto de mutantes en cada uno de los genes de síntesis de almidón sobre los contenidos de amilosa y amilopectina. Los resultados indicaron que las mutantes presentaron una reducción drástica en las concentraciones de almidón, así como proporciones alteradas de amilosa/amilopectina.

Un estudio realizado en una mutante cerosa de trigo *wx1* mostró una ausencia completa de acumulación y actividad de GBSS, viéndose reflejado en ausencia absoluta de amilosa (Fujita y col 2001).

Aún no se conocen mutantes para la enzima SSI en maíz; sin embargo, Fujita y col (2006) reportan que en una mutante de arroz para la enzima SSI se observaron alteraciones en la longitud de cadenas de la amilopectina, presentándose una menor cantidad de cadenas cortas (GP 8-12) y una mayor cantidad de cadenas con GP 16-19 comparado con su contraparte normal sin aparente cambio en el contenido de almidón, lo cual sugiere que otras enzimas SS pueden ser capaces de compensar, al

menos parcialmente, la reducción o completa ausencia de SSI. La mutación de la enzima SSIIa en maíz (mutante *su2*) muestra una disminución en las cadenas intermedias con GP de 12-25 y un incremento en las cadenas cortas de 6-10 de la amilopectina (Zhang y col 2004). En la mutante *du1* (SSIII) en arroz se observa una disminución de cadenas largas e incremento en cadenas cortas e intermedias de la amilopectina, con alteraciones significativas sobre la estructura de la misma (Fujita y col 2007).

Por otro lado, la mutante de maíz *ae1* (BEIIb) presenta un fenotipo con un alto contenido de amilosa (Fisher y col 1996; Kim y col 1998); además en estudios recientes se ha encontrado que esta mutante también provoca una disminución en la frecuencia de ramificación en el almidón (Liu y col 2012). En el caso de la mutante *su1* (ISA1) en maíz, la alteración en la actividad desramificadora se asoció con una reducción en el contenido de amilopectina, una mayor proporción de cadenas cortas, así como la acumulación de fitoglucógeno, un polisacárido soluble altamente ramificado (James y col 1995; Dinges y col 2001; Lin y col 2012). Se ha encontrado que la mutante de maíz *Zpu1* que codifica para la enzima pululanasa ocasiona una mayor acumulación de maltooligosacáridos ramificados y menor acumulación de fitoglucogeno, sugiriendo una participación como degradadora en la síntesis del almidón (Dinges y col 2003).

5 Proteínas asociadas al gránulo de almidón

Las proteínas asociadas al gránulo de almidón se pueden dividir en dos categorías en función de su grado de asociación. Un grupo se compone de proteínas

asociadas a la superficie y el otro comprende proteínas en el interior del gránulo. Las proteínas asociadas a la superficie se pueden separar de los gránulos por digestión con proteasas (con proteinasa K) o por lavado extenso con un amortiguador que contiene un detergente y un agente reductor, a una temperatura por debajo la temperatura de gelatinización de almidón (Boren y col 2004). Por el contrario, la extracción de proteínas en el interior del gránulo requiere la gelatinización del almidón en presencia de SDS y un agente reductor (Denyer y col 1993).

Grimaud y col (2008) caracterizaron las proteínas localizadas en el interior del gránulo de almidón en el endospermo de maíz (proteómica del gránulo), además de investigar interacciones funcionales entre las enzimas biosintéticas de almidón. Para ello utilizaron diferentes mutantes afectadas en cada una de las enzimas involucradas, entre ellas GBSSI que es responsable de la síntesis de amilosa y SSIIa, SSIII y SBEIIb responsables de la síntesis de amilopectina. Los autores encontraron que una mutación específica en una de las enzimas como SSIIa, SSIII o SBEIIb presentaba un efecto pleiotrópico sobre la acumulación de otras enzimas; por otro lado, una mutación en GBSSI no representaba ningún cambio sobre las otras enzimas involucradas en la biosíntesis de almidón, lo que sugiere que la síntesis de amilosa no interfiere con la síntesis de amilopectina.

6 Propiedades fisicoquímicas del almidón

La estabilidad y propiedades fisicoquímicas del almidón dependen grandemente de la naturaleza de las regiones cristalinas y amorfas que lo conforman. Debido a ello, muchas técnicas han sido aplicadas para probar el orden estructural de los polímeros del almidón. Dentro de las más utilizadas se encuentran la calorimetría

diferencial de barrido (DSC), ya que permite establecer diferencias en la estructura del almidón, cambios en estados físicos e interacciones de los polímeros del almidón con otros constituyentes.

Debido a su estructura semicristalina, los gránulos de almidón son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando estos son colocados en suficiente agua, los gránulos de almidón tienden a absorber una parte y se hinchan. Cuando se calienta el almidón, ocurre una pérdida del orden estructural debido al desarreglo molecular de los polímeros amilosa y amilopectina. Se ha demostrado que el rompimiento del orden estructural dentro de los gránulos de almidón está caracterizado por ser un proceso endotérmico llamado transición de orden-desorden (Cooke y Gidley 1992). Esta reacción endotérmica (gelatinización del almidón) corresponde a la disociación de las moléculas de almidón de una estructura de doble hélice (cristalina) en los gránulos de almidón en una conformación amorfa, incrementando la viscosidad de la pasta formada y la digestibilidad enzimática (Srichuwong y Jane 2007). Este proceso de gelatinización es medido a partir de DSC; el almidón es calentado a una velocidad constante conocida y los cambios en la capacidad de calor es medida en función de la temperatura (Wang y col 1998); registrándose la temperatura (T_a) y entalpía de gelatinización (Δ H).

La gelatinización comienza con la absorción de agua en la región amorfa, los puentes de hidrógeno son más débiles y menos rígidos en esta región, y no tan numerosos como en las regiones cristalinas. Cuando la parte amorfa se ha hidratado completamente, la cristalina inicia un proceso semejante pero requiere mayor energía (entalpía de gelatinización), cuando se alcanza cierta temperatura (temperatura de gelatinización, 65-75°C) el gránulo hinchado, se rompe parcialmente

alterando significativamente su estructura debido a la solubilización de la amilosa y amilopectina. La amilosa comienza a difundirse hacia el agua y la amilopectina queda dentro del gránulo para posteriormente perder su orden, la amilosa fuera del gránulo forma una malla y produce un gel (Biliaderis 1991). La gelatinización y el hinchamiento del gránulo son controlados en parte por la estructura molecular de la amilopectina (longitud de cadena, patrón de ramificaciones, peso molecular), la composición del almidón (relación amilosa/amilopectina y contenido de fósforo) y la arquitectura del gránulo (Tester 1997).

La temperatura y entalpía de gelatinización son parámetros que han sido relacionados con las características del gránulo de almidón, así como el grado de cristalinidad (Krieger y col 1998). Se ha reportado que una alta temperatura de gelatinización indica un alto grado de cristalinidad, lo cual provee una estabilidad estructural y hace más resistente al gránulo a la gelatinización (Barichello y col 1990).

C MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA

Debido a las deficiencias en los aminoácidos lisina y triptófano que presenta el grano de maíz normal y la importancia que posee como base en la alimentación humana, se han realizado diversas investigaciones tratando de mejorar su calidad proteínica. En este sentido, Mertz y col (1964) descubrieron que la mutación *opaco-2* (*o2*) casi duplica el contenido de lisina presente en el maíz normal (1.5-2.0%) aumentando la calidad proteínica en esta mutante; sin embargo, el endospermo blando de la mutante se asoció con una menor densidad del grano y mayor susceptibilidad a insectos, agentes patógenos y daño mecánico, lo que impidió que la

mutante *o2* fuese agronómicamente aceptable. Por tal motivo, investigadores del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con sede en México (Villegas y col 1992) y de la Universidad de Natal en Sudáfrica (Gevers y Lake 1992), desarrollaron mediante retrocruzas recurrentes mutantes *o2* modificadas conocidas como Maíz de Calidad Proteínica o QPM por sus siglas en inglés (Quality Protein Maize), las cuales combinan la alta calidad nutricional de *o2* con un endospermo vítreo y rendimiento normal (Zarkadas y col 2000). Debido a los beneficios potenciales del maíz QPM en la nutrición humana y animal, es importante investigar los mecanismos responsables de la mejora en la calidad proteínica y dureza del grano.

1 Mecanismos propuestos para la modificación del endospermo en maíz QPM a Mecanismo relacionado al incremento de gamma zeínas

En maíz QPM la acumulación de γ -zeínas de 27 kDa es de 2 a 4 veces mayor que la encontrada en un maíz normal o la mutante *o*2, mientras que los niveles de α zeínas parecen no presentar ningún cambio en QPM comparado con *o*2 (Wallace y col 1990). Aunque los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de este aumento son desconocidos, un mapeo genético de genes modificadores *o*2 (*mo*2) reveló una asociación estrecha entre la dureza del grano y el contenido de la proteína de almacenamiento γ -zeína de 27 kDa (Lopes y col 1995).

El endospermo del QPM acumula un mayor número de cuerpos proteínicos ricos en γ-zeínas de 27 kDa, lo que sugiere la formación de una matriz más rígida, además de que estas proteínas son ricas en cisteína y se orientan en la periferia de los

cuerpos proteínicos (Lending y Larkins 1989), por lo que se ha hipotetizado que los enlaces covalentes de las γ-zeínas y otras proteínas ricas en cisteína promueven la formación de una red proteínica alrededor de los gránulos de almidón (Lopes y Larkins 1991). Como resultado de estos estudios se propuso que un incremento en el número de cuerpos proteínicos y su compactación entre los gránulos de almidón es, al menos parcialmente, responsable de la modificación del endospermo *o2* (Figura 5). Evidencias moleculares sugieren que una mayor estabilidad del mRNA de γ-zeína y/o una mayor velocidad de transcripción de éste pueden ser responsables de una mayor expresión de proteína γ-zeína de 27 kDa en genotipos *o2* modificados (Geetha y col 1991, Or y col 1993). Wu y col (2010) bloquearon la expresión de γ-zeínas de 27 kDa en la línea de maíz CM105*mo2* mediante técnicas moleculares de RNA de interferencia (RNAi), encontrando que esta proteína juega un papel esencial en la modificación del endospermo en QPM, es decir que el RNAi causo la reversión del QPM a *opaco-2*.

Hallazgos similares fueron reportados por Yuan y col (2014) quienes utilizaron mutagenesis por radiación- γ para identificar genes relacionados con la modificación de la mutante *o*2, encontrando que la línea K0326Y comparada con W64A+ mostraba una disminución generalizada de las α -zeinas y un incremento de las γ -zeínas, principalmente la de 27 kDa y 50 kDa; los autores propusieron que las γ -zeínas de 27 kDa juegan un papel importante en la formación de cuerpos proteínicos y que la γ -zeína de 50 kDa a pesar de estar en menor proporción pudiera estar también implicada en la modificación del endospermo.



Figura 5. Comparación de endospermos de diferentes genotipos de maíz. Los círculos grandes blancos representan los gránulos de almidón, mientras que los círculos más pequeños grises los cuerpos proteínicos. Comparado con el genotipo silvestre y *opaco 2,* el maíz QPM presenta un endospermo con un mayor número de cuerpos proteínicos más pequeños debido a un incremento de la proteína γ-zeína de 27 kDa. Adaptada de Yuan y col (2014).

b Relación entre la estructura del gránulo de almidón y la modificación del endospermo en QPM

Para identificar otros factores involucrados en la formación del fenotipo vítreo, Gibbon y col (2003) realizaron un análisis de proteómica del endospermo de las líneas de maíz casi isogénicas CM105+, CM105o2 y CM105mo2, con la finalidad de investigar proteínas del tipo no-zeínas que pudieran contribuir a la modificación del endospermo en maíz QPM. Uno de los cambios más importantes encontrados en CM105mo2 fue el aumento en el contenido de la enzima almidón sintasa unida al gránulo. El análisis de la estructura del almidón en CM105mo2 reveló la presencia de ramificaciones más cortas en la amilopectina con respecto al almidón normal y o2. Como consecuencia de estas diferencias, el almidón de QPM presenta una mayor expansión y los gránulos en el endospermo se asocian unos con otros. Un modelo derivado del estudio anterior sugiere que moléculas de amilopectina amorfa presentes en la superficie de los gránulos de almidón del endospermo QPM, pueden interaccionar y formar contactos que unen los gránulos entre sí. Estos contactos proveen un mecanismo que complementa lo mencionado anteriormente, donde se propone que cuerpos proteínicos ricos en y- zeína (27 kDa) llenan los espacios entre los gránulos de almidón creando el fenotipo vítreo (Dannenhoffer y col 1995; Chandrashekar y Mazhar 1999). El endospermo de los granos se caracteriza por tener una mezcla compleja de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón, y la estructura física del mismo depende del tipo de interacciones que se dan entre estos componentes. Las proteínas de almacenamiento también juegan un papel muy importante en la estructura física del grano maduro. En los granos vítreos, el empaquetamiento es más organizado, y los espacios intergranulares son

perfectamente llenados (Gibbon y col 2003; Gibbon y Larkins 2005). Normalmente, las proteínas de almacenamiento son las responsables de la asociación entre los gránulos de almidón y la matriz proteínica del endospermo, influenciando la dureza del grano. Pereira y col (2008) realizaron una caracterización bioquímica y estructural de los gránulos de almidón y cuerpos proteínicos en cultivares de maíz de endospermo vítreo y blando, así como de baja y alta calidad proteínica, ellos observaron que los granos de maíz de endospermo vítreo presentaron un mayor número de cuerpos proteínicos los cuales, sugieren ellos estos favorecen a tener gránulos de almidón mayor asociados y organizados. Todos estos resultados sugieren que la mayor resistencia física de los granos de maíz está influenciada por el alto porcentaje de proteína total, alta síntesis de γ-zeína de 27 kDa, presencia de cuerpos proteínicos y una perfecta organización de los gránulos de almidón en el endospermo, independientemente de su tamaño.

2 Análisis genéticos, bioquímicos y moleculares relacionados con la modificación del endospermo en maíz QPM.

Investigaciones recientes acerca de la modificación del endospermo en QPM han creado una oportunidad para entender de mejor manera esta característica. Sin embargo, hace falta mayor información acerca de cuáles son los genes específicos, su localización en los cromosomas, así como el mecanismo de acción que genera este fenotipo. Una de las herramientas utilizadas para este fin es la identificación de *loci* genéticos asociados al fenotipo vítreo del endospermo que presenta QPM. Se han identificado marcadores moleculares ligados a *loci* asociados a la modificación de la dureza del grano (Gutierrez-Rojas y col 2010). Holding y col (2008) en una

progenie F2 identificaron 7 *loci* asociados a genes m*o*2 los cuales explican el 75 % de la variación fenotípica; dos de estos *loci* fueron localizados en los cromosomas 7 y 9 y tienen el mayor efecto en la dureza del endospermo (~40 % de la variación). Holding y col (2011) crearon una población de líneas recombinantes puras derivada de la cruza entre K0326Y QPM y W64A*o*2 (*o*2), las cuales fueron caracterizadas para tres caracteres relacionados con la dureza del endospermo: vitrosidad, densidad y dureza. El mapeo genético en estas líneas confirmó los *loci* previamente identificados asociados con la modificación del endospermo en K0326Y QPM.

Salazar-Salas y col (2014) evaluaron el efecto de estos loci genéticos sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón y acumulación de proteínas en el endospermo maduro de dos grupos de RILs contrastantes en vitrosidad que fueron derivadas de la cruza de K0326Y QPM y W64Ao2. Los autores observaron que en general las líneas vítreas presentaban mayores contenidos de la proteína y-zeína de 27-kDa, así como un almidón con mayor contenido de amilosa asociado con una mayor acumulación de la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSS) que sintetiza este polímero, menor entalpía de gelatinización y porcentaje de cristalinidad, lo cual se relacionó con una mayor compresibilidad de los gránulos que presentaron formas poligonales y una mayor compactación (Figura 6). Estos resultados apoyan la idea de que alteraciones en la estructura/interacción de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón juegan un papel importante en la modificación del endospermo en QPM; la mayor acumulación de y-zeína de 27-kDa podría estar facilitando la formación de más cuerpos proteínicos, aunado a modificaciones en la composición y estructura de los gránulos que facilitan una mayor compactación como consecuencia de cambios en la acumulación de enzimas involucradas en la biosíntesis del almidón.



Figura 6. Microscopía electrónica de barrido en gránulos de almidón aislados de endospermos maduros de muestras contrastantes en vitrosidad. (A-B) Gránulos de almidón de las líneas parentales K0326Y QPM y W64A*o*2. (C-D) Gránulos de almidón de las líneas Q208 (vítreo) y O39 (opaco). Tomada de Salazar-Salas y col (2014).

Recientemente, Soto-López (2015) evaluó a nivel transcripcional la expresión de genes de síntesis de almidón (Wx1, Ae1, Bt2, Sh2, Su1 y Zpu1) en endospermo en desarrollo (20 días después de la polinización) de las líneas de maíz K0326Y QPM y W64Ao2, así como una selección de líneas recombinantes puras derivadas de su cruza; en general encontró cambios significativos en los niveles de transcritos de los genes estudiados, destacando una mayor expresión en endospermos opaco del gen Waxy-1, el cual codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), responsable de la síntesis de amilosa, lo cual correspondió con el hecho de que estas muestras presentaron los mayores contenidos de amilosa en endospermo en desarrollo y a su vez una mayor acumulación de dicha enzima. Los estudios reportados sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios significativos en la expresión de genes de síntesis almidón a nivel transcripcional y proteína, los cuales se ven reflejados en cambios en la acumulación y probablemente en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis del almidón, resultando en variaciones en la composición del almidón durante el desarrollo que repercuten en las propiedades fisicoquímicas y estructurales del mismo. Sin embargo, se requiere la realización de estudios de actividad enzimática para establecer dichas asociaciones.

D ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS DE ALMIDÓN EN CEREALES

Se han realizado diversos estudios en cereales enfocados en evaluar la actividad de enzima involucradas en la biosíntesis de almidón, esto debido a la gran importancia que tiene el almidón como fuente de alimento, buscando con ello obtener un mayor conocimiento molecular para producir cereales que puedan aportar un mayor rendimiento de este polisacárido o bien almidón con diferentes aplicaciones.

Doehlert y Knutson (1991) analizaron la actividad de las enzimas desramificadoras de almidón isoamilasa (I y II) y pululanasa en líneas híbridas del maíz OH43. Los resultados obtenidos por estos investigadores muestran que la actividad de la pululanasa fue mayor para la hidrólisis de sustratos como el pululano y β -dextrina límite y en menor proporción para la amilopectina y el fitoglucógeno, reportando que la velocidad de hidrólisis de β -dextrina límites fue 5 veces mayor respecto a la de amilopectina. Por el contrario, la actividad de la isoamilasa II fue superior en la degradación de amilopectina y fitoglucógeno, obteniendo una velocidad de degradación de amilopectina 15 veces mayor que la pululanasa y demostrando que esta enzima no degrada pululano. La actividad de estas enzimas repercutió en un incremento en el índice de tinción de almidón con yodo, lo que sugiere que juegan un papel muy importante en la degradación del almidón, teniendo que la pululanasa podría encargarse de las ramificaciones α (1-6) más expuestas y la isoamilasa de las menos expuestas.

Respecto a la enzima ramificadora de almidón, Nishi y col (2001) realizaron un estudio en arroz donde observaron el efecto de la mutación del gen *amilosa-extender* (*ae*) sobre la biosíntesis de los componentes del almidón. Se encontró que las líneas mutantes presentaron una disminución de la actividad de la enzima ramificadora de almidón IIb (BEIIb) con respecto a las líneas de arroz normales. También observaron una disminución en la actividad de la enzima almidón sintasa I (SSI), lo cual sugieren se debe a un efecto pleiótropico causado por la mutación; la disminución de la actividad de la actividad de la enzima se relacionó con una disminución del

contenido de amilopectina, así como en el grado de polimerización de las cadenas ramificadas de amilopectina, concluyendo que la mutación *ae* tiene un gran efecto sobre la actividad enzimática de BEIIb y que dicho efecto puede ser usado para modificar las propiedades fisicoquímicas y reológicas del almidón, de tal forma que dicha información puede ser aplicada en la producción de arroz con características específicas para su uso en la preparación de alimentos.

Zhang y col (2008) evaluaron la actividad de las enzimas claves implicadas en la biosíntesis y acumulación de almidón durante el llenado del grano en líneas híbridas de maíz con contenido alto (415084-2 y 314068-4) y bajo (314168-2 y 315062-1) de almidón; las líneas de alto contenido de almidón presentaron una mayor acumulación de almidón, amilosa y amilopectina, además de que las tasas de acumulación de almidón y sus componentes en todas las líneas fue mayor a los 25 y 32 días después de la polinización (DDP). Dichos resultados concuerdan con una mayor actividad de las enzimas ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasa soluble (SSS) y almidón sintasa unida al granulo (GBSS) a los 24 y 32 DDP en todas las líneas, mientras que la enzima ramificadora (Q) presentó una mayor actividad a los 23 DDP en líneas de alto contenido de almidón, no así en las de bajo contenido de almidón donde se observaron dos periodos de mayor actividad de esta enzima (15-20 y 30-35 DDP). También se observó una mayor actividad de la enzima GBSS en las líneas con mayor contenido de amilosa, mientras que las líneas que presentaron mayor acumulación de amilopectina tuvieron una actividad superior de SSS y enzima-Q. Además, se encontró que las enzimas GBSS, SSS y AGPasa presentaron una correlación positiva significativa con el contenido de almidón, amilosa y amilopectina en todas las líneas, sugiriendo una acción coordinada de

estas enzimas en la síntesis de almidón operando como complejos multiproteínicos con actividad funcional. Resultados similares también fueron observados por Bing y col (2008), quienes analizaron los efectos de la actividad de enzimas de síntesis de almidón sobre el desarrollo del endospermo en granos de arroz; los autores reportan una correlación significativa entre las tasas de máxima actividad de AGPasa, SSS y SBE con el contenido de almidón, amilosa y amilopectina, además de que observaron una correlación significativa entre las tasas máximas de actividad de las enzimas pululanasa e isoamilasa con el contenido de amilopectina, confirmando el papel importante de estas enzimas en la biosíntesis de almidón.

En el mismo sentido, Wang y col (2011) evaluaron la actividad de enzimas de síntesis de almidón en dos líneas de trigo de alto (E28) y bajo (Annong9912) contenido de almidón, encontrando que ambas líneas mostraban una correlación en las actividades enzimáticas de SSS, GBSS y SBE con la tasa de síntesis de almidón en el periodo de llenado del grano, reportando que las líneas de alto contenido de almidón presentaban una mayor actividad enzimática. Los autores concluyeron que la actividad de la GBSS tiene un efecto importante en la biosíntesis de amilosa, especialmente en el periodo de retraso; además encontraron que las actividades de SSS y SBE se asocian con la biosíntesis de amilopectina, contribuyendo de esta manera al desarrollo del endospermo.

Ahmed y col (2015) analizaron el efecto de las altas temperaturas en el desarrollo del grano de arroz variedad basmati (extra largo comercial), encontrando cambios significativos en la composición del granulo de almidón (amilosa/amilopectina), los cuales atribuyeron a una disminución de la actividad de la

enzima GBSS, sugiriendo que es la única enzima responsable de la síntesis de amilosa.

Recientemente, Wu y col (2015) analizaron la actividad de la enzima desramificadora pululanasa y almidón sintasa soluble isoforma III (SSS III) en líneas en desarrollo (18 DDP) de maíz QPM contrastantes en vitrosidad, encontrando una mayor abundancia y actividad de SSS III en la línea parental vítrea K0326Y QPM respecto a la línea parental opaca W64A*o*2. De manera similar, encontraron una mayor actividad de pululanasa en la línea parental vítrea K032Y6 QPM que en la opaca W64A*o*2. Estos investigadores además reportaron una correlación positiva entre la actividad de la pululanasa y la vitrosidad, proponiendo que la pululanasa y SSS III son dos factores muy importantes en la modificación del endospermo en maíz QPM.

Los estudios realizados de actividad enzimática indican que las enzimas de síntesis de almidón juegan un papel muy importante en la formación del endospermo en los granos de los cereales, entre ellos el maíz, lo que nos sugiere a su vez que estas enzimas podrían estar jugando un papel muy importante en la modificación del endospermo en maíz QPM; Sin embargo, existen muy pocos estudios de este tipo en maíz QPM, por lo que resulta de interés analizar la acumulación y actividad de las enzimas que participan en la síntesis de almidón y su relación con las características de vitrosidad y las propiedades fisicoquímicas del almidón, de tal manera que nos permita un mejor entendimiento de las bases moleculares de la conversión del endospermo blando en vítreo en este cereal.

IV JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones en líneas recombinantes puras derivadas de la cruza entre K0326Y QPM y W64A*o2* han permitido identificar *loci* genéticos asociados con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica así como la variación que presentan estos materiales en la expresión de genes de biosíntesis de almidón. Sin embargo, existe poca información acerca de la acumulación y actividad de las enzimas que participan en la síntesis de almidón en líneas de QPM estudiadas y su relación con características fisicoquímicas del gránulo durante el desarrollo del endospermo, lo cual permitiría entender y explicar de mejor manera las bases moleculares de la modificación del endospermo en el maíz QPM, facilitando con ello el desarrollo más rápido y eficiente de materiales de este tipo con buenas características agronómicas y que reúnan las recomendaciones de aminoácidos para la nutrición humana y animal.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Analizar la acumulación y actividad de enzimas de síntesis de almidón y su relación con la modificación del endospermo en maíz QPM.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición y propiedades térmicas de gránulos de almidón en endospermo en desarrollo de las líneas parentales (K0326Y QPM y W64A*o2*) y una selección de líneas recombinantes puras (RIL) QPM contrastantes en vitrosidad.
- Analizar la acumulación de proteínas asociadas al gránulo de almidón en el endospermo en desarrollo de las líneas parentales y una selección de líneas recombinantes puras (RIL) QPM contrastantes en vitrosidad.
- Analizar la actividad de enzimas de síntesis de almidón (ADP glucosa pirofosforilasa, almidón sintasas, enzimas ramificadoras y desramificadoras) en el endospermo en desarrollo de las líneas parentales contrastantes en vitrosidad.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizaron las líneas de maíz K0326Y QPM (endospermo vítreo) y W64Ao2 (endospermo blando), así como líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruza (Holding y col 2011); tres RIL vítreas, homocigotas para el alelo de K0326Y QPM y tres RILs opaco, homocigotas para el alelo de W64Ao2. Estas líneas fueron propagadas en el campo experimental de la Facultad de Agronomía. Se realizó una polinización controlada y se cosecharon granos en desarrollo a los 20 y 30 días después de la polinización (DDP). Los granos en desarrollo cosechados se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Algunos de los granos fueron liofilizados para obtener harinas las cuales fueron posteriormente utilizadas en los análisis fisicoquímicos.

B MÉTODOS

1 Determinación de almidón total

El contenido de almidón total se determinó utilizando un kit de análisis de almidón total (K-TSTA, Megazyme, Irlanda). A 100 mg de harina de endospermo se le agregó 5 mL de etanol al 80 % y se incubó durante 5 min a 80-85 °C. Posteriormente se lavó la pastilla dos veces con etanol al 80 % para eliminar maltodextrinas. Se agregaron 3 mL de α -amilasa y se incubó 6 min en agua hirviendo con agitación cada 2 min, se dejó enfriar y se le agregó 0.1 mL de amiloglucosidasa, se incubó 30 min a 50 °C y posteriormente se aforó a 100 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 10 mL y se centrifugó a 1,600 *g* por 10 min; del sobrenadante se tomaron 100 µL de muestra por duplicado y se agregaron 3 mL de glucosa

oxidasa peroxidasa (GOP) para una posterior incubación durante 20 min a 50 °C. Para la obtención del blanco se tomaron 100 µL de agua desionizada y por último se agregaron 3 mL de GOP; el mismo procedimiento se realizo para la obtención del estándar de glucosa. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia de las muestras a 510 nm. El porcentaje de almidón se obtuvo con la siguiente fórmula:

%Almidón =
$$\Delta A \times F/P \times VF \times 0.9$$

 ΔA = absorbancia de la muestra menos el blanco

F = 100 µg de D-glucosa/ abs para 100 µg de D-glucosa

(factor de conversión de absorbencia a glucosa)

P = Peso de la muestra (mg)

VF = Volumen final del extracto (mL)

0.9 = ajuste de masa molecular de D-glucosa a glucosa anhidra en almidón (162/180)

2 Determinación de amilosa

a Pretratamiento del almidón

La determinación de amilosa se realizó con un kit de amilosa (K-AMYL 04/06 Megazyme, Irlanda). A 25 mg de harina se le agregó 1 mL de DMSO, se mezclaron en un vórtex a baja velocidad y se calentaron a 100 °C en un baño maría aproximadamente 1 min. El tubo se mezcló vigorosamente y se volvió a colocar en baño maría por 15 min con agitación intermitente. Una vez retirado el tubo se dejó en reposo por 5 min y se le agregaron 2 mL de etanol al 95 % con agitación continua en un vórtex. Se añadieron otros 4 mL de etanol y se mezcló por inversión formando un

precipitado y dejando reposar por al menos 15 min. Las muestras se centrifugaron a una velocidad de 2, 000 *g* por 5 min y el precipitado se escurrió por 10 min para asegurarse de que todo el etanol se eliminara. Posteriormente al precipitado se le añadieron 2 mL de DMSO y se colocó en baño maría por 15 min con mezclado intermitente. Al retirar el precipitado, inmediatamente se le añadió 4 mL de solvente con Concanavalina A (Con A), se mezcló vigorosamente y se transfirió el contenido a un matraz volumétrico (25 mL), realizando varios lavados con el solvente de Con A hasta aforar (solución A).

b Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa

Se tomó 1 mL de la solución A y se colocó en un tubo de 2 mL, se añadió 0.5 mL de la solución de Con A y se mezcló por inversión evitando formar espuma. El tubo se dejó reposar por 1 h y posteriormente se centrifugó a 14,000 *g* por 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de 15 mL y se añadieron 3 mL de amortiguador de acetato de sodio 100 mM, se mezcló y se calentó por 5 min en baño maría en ebullición. Posteriormente el tubo se colocó en baño maría a 40 °C por 5 min. Se le agregó 0.1 mL de las enzimas amiloglucosidasa/ α -amilasa, se mezcló e incubó por 30 min a 40 °C y se centrifugó por 5 min a 2,000 *g*. A una alícuota de 1 mL del sobrenadante se le agregaron 4 mL del reactivo GOPOD (glucosa oxidasa/peroxidasa) y se incubó por 20 min a 40 °C, incluyendo un blanco y el estándar de Glucosa (D-Glucosa). Se medio la absorbancia de las muestras y del estándar a 510 nm.

c Determinación de almidón total

Se mezclaron 0.5 mL de la solución A con 4 mL del amortiguador de acetato 100 mM, pH 4.5. Se agregaron 0.1 mL de la solución enzimática amiloglucosidasa/αamilasa y se incubó la mezcla a 40 °C por 10 min. Se tomó una alícuota de 1 mL y se mezcló con 4 mL del reactivo GOPOD. Se incubó a 40°C por 20 min, lo mismo se realizo para las muestras y el estándar.

La determinación de amilosa se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% Amilosa = \frac{Abs (sobrenandante Con A)}{Abs (alicuota de almidón total)} x 66.8$$

66.8= Factor de dilución de la relación del solvente de Con A y almidón total

3 Aislamiento de gránulos de almidón

Los gránulos de almidón se aislaron de granos de maíz en desarrollo según lo reportado por Grimaud y col (2008) con algunas modificaciones. Los granos se remojaron en una solución de metabisulfito de sodio 0.3 % (p/v) y ácido láctico al 85 % (v/v) pH 3.8, por 48 h a 50 °C. El germen y el pedicelo fueron retirados de manera manual y los endospermos fueron homogenizados con un amortiguador de extracción de almidón [Tris-HCl 50 mM pH 7, glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, DTT 1.25 mM] a 4 °C, macerados en un mortero con la ayuda de un pistilo, pasados a través de un filtro de 100 μ m y centrifugados a 13,000 *g* por 15 min. El almidón obtenido se lavó dos veces con amortiguador de extracción, etanol al 95 % y acetona fría, y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h.

4 Propiedades térmicas del almidón

Las propiedades térmicas del almidón se determinaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido modelo DSC-2920 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). El equipo se calibró con indio y se utilizó una charola de aluminio vacía como referencia. Se pesaron 2.2 mg de muestra en una charola de aluminio y se adicionaron 7 µL de agua desionizada, se dejó en reposo durante 1 h y posteriormente la charola se selló herméticamente. La muestra de almidón se sometió a calentamiento en un intervalo de temperatura de 30 a 120 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las muestras gelatinizadas se almacenaron a 4 °C por 7 días para someterse nuevamente a calentamiento bajo las mismas condiciones.

La temperatura pico de gelatinización (T_p), la entalpía de gelatinización (ΔH_g) y la entalpía de retrogradación (ΔH_r) se obtuvieron del análisis realizado con el programa TA Universal Analysis 2000 incluido con el equipo (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Los datos representaron el promedio de tres réplicas.

El porcentaje de retrogradación se calculó con la siguiente fórmula:

% Retrogradación =
$$\frac{\Delta H_r}{\Delta H_g} \times 100$$

5 Análisis de la acumulación de proteínas asociadas al gránulo de almidón

a Extracción de proteínas asociadas al gránulo

Para la extracción de las proteínas asociadas al gránulo (PAG) según lo reportado por Grimaud y col (2008) con algunas modificaciones, el almidón (150 mg) se lavó con agua fría, amortiguador de gelatinización [Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS

2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v)] y etanol 95 % (v/v) para remover proteínas superficiales; las muestras de almidón fueron incubadas con amortiguador de gelatinización por 15 min en un baño maría en ebullición para la liberación de las PAG. Inmediatamente después la pasta formada fue congelada por 1 h a -20 °C, descongelada por 20 min a 40 °C en un baño maría y centrifugada a 13,000 *g* por 30 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % en acetona para la precipitación de las proteínas por al menos 2 h a -20 °C. Después de centrifugar durante 15 min a 4 °C y 13,000 *g*, la pastilla obtenida de PAG se lavó dos veces con acetona fría y se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Las proteínas se resuspendieron en un amortiguador de tiourea [Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4 % (p/v), DTT 20 mM, Triton-X100 0.2 % (v/v)].

b Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). Se utilizó una unidad electroforética vertical MP3 (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, EUA). Extractos de proteínas equivalente a 8 y 21 mg de almidón se mezclaron con un amortiguador de carga [Tris-HCI 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2 % (p/v), glicerol 25 % (v/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 %] y después se aplicaron en los pozos de geles de poliacrilamida al 10 % (p/v) para su separación a voltaje constante (100 V) por aproximadamente 2 h. Las proteínas se visualizaron por tinción con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0.25 % (p/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) en metanol 40 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v). Las imágenes de los geles se adquirieron con un sistema de fotodocumentación XRS (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA). El contenido relativo de las diferentes proteínas asociadas al gránulo se estimó por triplicado mediante un análisis densitométrico utilizando el programa Quantity One (BioRad, Hércules, CA, EUA).

6 Análisis de la actividad de enzimas de biosíntesis de almidón

a ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

Se usó la metodología reportada por Nishi y col (2001) con algunas modificaciones. Se tomaron granos en desarrollo a los cuales se les retiró el germen y pericarpio. Los endospermos fueron pesados y macerados en un mortero a temperatura de 0 a 4 °C empleando 5 µL de amortiguador de extracción frío [HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.2), MgCl₂ 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, glicerol 12.5 % (v/v)] por mg de endospermo. El macerado se centrifugó a 15,000 *g* por 15 min a 2 °C y el sobrenadante resultante se recolectó y se consideró como el extracto enzimático. Posteriormente se tomaron 0.5 mL del extracto enzimático y se diluyó con 2.5 mL de amortiguador de extracción; esta dilución se usó para la determinación de la actividad de la enzima AGPasa.

La determinación de la actividad se llevó a cabo con una primer incubación a 30 °C por 20 min mezclando 150 μ L de solución de reacción (HEPES-NaOH 100 mM (pH 7.4), 3-fosfoglicerato 3 mM, ADP-Glucosa 1.2 mM, pirofosfato de sodio 3 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 4 mM) y 100 μ L de la dilución del extracto enzimático. La mezcla de reacción fue detenida por inactivación de las enzimas colocando la mezcla en agua en ebullición por 2 min. Después se le adicionaron 350 μ L de agua destilada y

se centrifugó a 15,000 *g* por 10 min a 2 °C. Se tomaron 500 μ L del sobrenadante, se mezclaron con 0.15 mg de NADP⁺, 0.4 U de fosfoglucomutasa (Sigma, P3397) y 0.5 U de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tipo XV, Sigma G6378), seguido de incubación a 30 °C por 30 min. La actividad enzimática se registró como el aumento en absorbancia a 340 nm.

La actividad de AGPasa se expresó en unidades internacionales (UI) correspondientes a los µmoles de NADPH producido por unidad de tiempo (min). Para el análisis se utilizó un control negativo, el cual consistió de 100 µL del extracto enzimático diluido desnaturalizado en agua hirviendo por 2 min. Se utilizó un blanco donde los 100 µL del extracto enzimático diluido fueron reemplazados por 100 µL de amortiguador de extracción.

b Almidón sintasas

Previo a evaluar la actividad de las enzimas almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI) y almidón sintasa soluble (SSS) se realizó una extracción a partir de los endospermos de maíz en desarrollo siguiendo lo descrito por Umemota y Terashima (2002) y Lee y col (2014) con algunas modificaciones. Una muestra de 0.5 g de endospermo de maíz fueron macerados manualmente con 2 mL de amortiguador de extracción en frío [Tris 100 mM, pH 7.2, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, etilenglicol 10 % (v/v)]; el macerado fue recolectado en tubos de 15 mL, se lavó el mortero con 1 mL de amortiguador y se mezcló en el mismo tubo. El homogenizado fue centrifugado a 15,500 *g* por 30 min a 2 °C, se tomó el sobrenadante y se filtró (membrana 0.45 μ m, Whatman); el filtrado se usó para el ensayo de SSSI. El sedimento se lavó tres veces con 3 mL de amortiguador de extracción a 15,500 *g* /10 min a 2 °C. La pastilla

obtenida se suspendió en 3 mL de amortiguador de extracción y se utilizó para la determinación de la actividad de GBSSI.

1) Determinación de la actividad enzimática de SSS

Para medir la actividad se siguió la metodología reportada por Nishi y col (2001) y Lee y col (2014) con ligeras modificaciones. Se tomaron 0.15 mL del extracto enzimático SSS y se mezcló con 0.15 mL de solución A (Citrato-Na 0.5 M, pH 7.5, bicina-NaOH 50 mM pH 7.5, ADP-glucosa 1.7 mM, 0.7 mg de glucógeno de ostra Tipo II, DTT 16.7 mM) y se incubó a 30 °C durante 20 min. La reacción enzimática se detuvo colocándola en un baño con agua en ebullición durante 30-40 s, posteriormente se incubó en hielo durante 10 min. A esta mezcla se le agregó 0.1 mL de solución B (HEPES-NaOH 50 mM pH 7.4, fosfocreatina 10 mM, KCI 200 mM, MgCl₂ 10 mM, 5 U de creatina fosfoguinasa (Tipo I, Sigma C3755) y se incubó a 30 °C durante 30 min. En esta reacción el ADP producido por la SSS fue convertido en ATP y la solución resultante fue calentada en un baño con agua hirviendo durante 30-40 s, se incubó en hielo durante 10 min y a continuación se centrifugó a 17,000 g durante 25 min a 2 °C. El sobrenadante (0.3 mL) se mezcló con 0.3 mL de solución C (HEPES-NaOH 125 mM pH 7.4, glucosa 10 mM, MgCl₂ 20 mM, NADP⁺ 0.67 mM). La actividad de SSS se midió como el aumento de la absorbancia a 340 nm después de la adición de 1.54 U de hexoquinasa (Sacharomyces cerevisiae, Sigma H6380) y 0.525 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tipo XV, Sigma G6378) a 25 °C durante 30 min.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y la actividad de la SSS fue expresada en unidades internacionales (UI) µmoles de NADPH producido por unidad

de tiempo (min). Para el análisis se utilizó un control negativo el cual se utilizaron 0.15 mL del extracto enzimático desnaturalizado en agua hirviendo por 40 s e incubado en hielo por 10 min. Se utilizó como blanco una mezcla conteniendo 0.15 mL de amortiguador de extracción en lugar de los 0.15 mL del extracto enzimático.

2) Determinación de la actividad enzimática de GBSSI

Se empleó la metodología descrita por Nakamura y col (1989) y Lee y col (2014) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 0.15 mL del extracto enzimático de GBSSI con 0.15 mL de solución A (HEPES-NaOH 50 mM pH 7.4, ADP glucosa 1.6 mM, 0.7 mg de amilopectina, DTT 15 mM) y se incubó a 30 °C durante 1 h. La reacción fue detenida colocando la mezcla en un baño con agua hirviendo durante 30-40 s y luego se incubó en hielo durante 10 min. Después, a la mezcla se le añadió 0.1 mL de solución B (HEPES-NaOH 50 mM pH 7.4, fosfocreatina 10 mM, KCI 200 mM, MgCl₂ 10 mM, 5 U de creatina fosfoquinasa (Tipo I)) y se incubó a 30 °C durante 30 min. El ADP producido por la reacción de la GBSSI fue convertido en ATP y la solución resultante se calentó en un baño con agua hirviendo durante 30-40 s, seguido de incubación en hielo durante 10 min y después se centrifugó a 17,000 q durante 25 min a 2 °C. El sobrenadante (0.3 mL) se mezcló con 0.3 mL de solución C (HEPES-NaOH 50 mM pH 7.4, glucosa 10 mM, MgCl₂ 20 mM, NADP⁺ 2 mM). La actividad de GBSSI se midió como el aumento en la absorbancia a 340 nm después de la adición de 1.4 U de hexoquinasa (Sacharomyces cerevisiae, Sigma H6380) y 0.35 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tipo XV, Sigma G6378) a 25 °C durante 30 min.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y la actividad de la GBSSI fue expresada en unidades internacionales (UI), µmoles de NADPH producido por

minuto. Para el análisis se utilizó un control negativo en el cual se utilizaron 0.15 mL del extracto enzimático desnaturalizado en agua hirviendo por 40 s e incubado en hielo por 10 min. Se utilizó como blanco una mezcla conteniendo 0.15 mL de amortiguador de extracción en lugar de los 0.15 mL del extracto enzimático.

c Enzima ramificadora de almidón

Se siguió la metodología reportada por Yamanouchi y Nakamura (1992) y Lee y col (2014) con algunas modificaciones. Se pesaron endospermos de maíz en desarrollo y se maceraron con 5 μ L amortiguador de extracción en frío [HEPES-NaOH 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 4 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, glicerol 12.5 %(v/v)] por cada mg de endospermo. El macerado se centrifugó a 17,000 *g* por 25 min a 2 °C y el sobrenadante se filtró (0.45 μ m, Whatman). Los filtrados se tomaron como el extracto enzimático para evaluar la actividad.

La actividad enzimática se determinó a partir de monitorear la estimulación de la síntesis de α -glucano a partir de glucosa-1-fosfato por una fosforilasa de músculo de conejo (Hawker y col 1974). Una alícuota de 100 µL del filtrado se mezcló con 100 µL de solución de reacción (HEPES-NaOH 50 mM pH 7.0, glucosa-1-fosfato 50 mM, AMP 2.5 mM, 1.2 U de fosforilasa a de músculo de conejo, Sigma P1261) fría e inmediatamente se incubo a 30 °C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de HCl 1 M y se mezcló con 500 µL de DMSO. Posteriormente, se agregaron 700 µL de una solución de yodo-potasio y yoduro (KI 120 mM, I₂ 8 mM) y a continuación se incubó a 30 °C durante 30 min en la oscuridad. La actividad de SBE se determinó por la medición de la absorbancia a 540 nm.

La actividad de la enzima ramificadora fue expresada como µmol por minuto (UI). Para el análisis se usó un control negativo conteniendo 100 µL del filtrado enzimático desnaturalizado con 50 µL de HCl 1M. Para la elaboración del blanco se tomaron 100 µL de amortiguador de extracción para remplazar los 100 µL de la preparación de enzimas.

d Enzima pululanasa (*PUL*)

Para evaluar la actividad de pululanasa se llevó a cabo una extracción de acuerdo a lo reportado por Wu y col (2015) con algunas modificaciones. Se pesaron endospermos en desarrollo y se molieron hasta obtener un polvo fino en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. Por cada mg de polvo fino se añadieron 2 μ L de amortiguador de extracción frío (Tris-Acetato 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, DTT 5 mM), se mezcló por suspensión por 2 min y se centrifugó a 16,000 *g* por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína colorimétricamente usando el método de Bradford (1976). Se diluyó la concentración de proteína con amortiguador de acetato de sodio (200 mM pH 5) a 1 μ g/µL.

Para medir la actividad se usó el kit Red-pullulan (Megazyme, Wicklow, Ireland). La solución diluida de proteína y la solución de red-pullulan (2 % p/v, KCl 0.5 M) se pre-equilibraron a 40 °C por 5 min. Posteriormente se tomaron 500 µL de solución de proteína y se mezcló con 250 µL de solución de red-pullulan. Rápidamente se pusieron en incubación a 40 °C por 10 min. La reacción se detuvo añadiendo 1.25 mL de etanol al 95 % seguido de un mezclado en un vortex por 10 s. Se dejó en reposo por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1,000 *g* por 10 min y se

utilizó el sobrenadante para medir la absorbancia a 510 nm. La actividad se determinó usando la siguiente ecuación proporcionada por el Kit:

mUnidades / mL =
$$906 \times Abs + 17$$

Los resultados fueron convertidos y expresados como UI/gramo de peso freso (g PF) donde cada unidad correspondió a la cantidad de enzima requerida para liberar un µmol de D-glucosa en equivalentes de azúcar reductor por minuto.

7 Análisis estadístico

Las evaluaciones se realizaron por triplicado y los resultados de las características evaluadas se analizaron mediante un ANOVA unifactorial completamente al azar, tomando como factor la línea de maíz con niveles que variaron de 2 a 8 (K0326Y QPM, W64A*o*2, 33, 338, 346, 55, 73 y 185). Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Fisher (LSD) con un α =0.05. Todos los análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurión versión 15.2.06 (Stat Point Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA).

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES TÉRMICAS DEL ALMIDÓN EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD

1 Composición y contenido de almidón

En el Cuadro 5 se muestra el contenido de almidón total de endospermos en desarrollo (20 y 30 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. El contenido de este polisacárido en el endospermo de 20 DDP fue significativamente diferente entre las líneas parentales y las RIL, con un rango de variación de 20.70 a 39.76 %, el cual corresponde con valores reportados por Zhang y col (2008) en líneas híbridas de maíz de alto contenido de almidón (20 - 28%) y Pereira y col (2008) en diferentes líneas de maíz de Brasil (20.74 - 33. 96 %). La línea parental W64A*o2* presentó un contenido de almidón significativamente mayor con respecto al parental K0326Y QPM. Así mismo, las líneas opacas presentaron en general un mayor contenido de almidón total respecto a las líneas vítreas (Cuadro 5). Este comportamiento también fue observado por Juárez-García y col (2013) en maíces con endospermo vítreo y harinoso a los 20 DDP.

Estos resultados sugieren que las RIL opacas presentan un estado de desarrollo más avanzado a los 20 DDP, y por ende un incremento en sus componentes como lo es el almidón. Esto corresponde con el hecho de que en campo se observó que el periodo desde la siembra hasta la floración en RIL opacas fue aproximadamente 15 días menor que en las RIL vítreas.

Cuadro 5. Contenido de almidón total en endospermo en desarrollo de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.

Línea de M	Maíz	20 DDP	30 DDP
K0326Y QPM	V	29.80 ^d	59.41 ^d
W64Ao2	0	34.77 ^c	59.63 ^{cd}
33	V	20.70 ^g	61.59 ^{bc}
338	V	27.51 ^e	61.09 ^{bcd}
346	V	22.58 ^f	62.28 ^b
55	0	39.76 ^a	64.59 ^a
73	0	37.83 ^b	62.52 ^{ab}
185	0	28.68 ^{de}	59.46 ^d

V: Línea vítrea; O: Línea opaca. El contenido de almidón está expresado en g/100 g de harina de endospermo. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher: Almidón total 20 DDP (LSD=1.28); Almidón total 30 DDP (LSD=2.1).

En lo que respecta al contenido de almidón total en endospermo a los 30 DDP, se obtuvo un promedio general de 61.3 %, valor inferior al reportado por Li y col (2007) (88.9 %) al analizar líneas híbridas de maíz B73 en desarrollo (30 DDP), lo cual pudiera atribuirse a las diferencias en el genotipo y condiciones de cultivo. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de almidón total entre la línea parental opaca W64A*o2* y la vítrea K0326Y QPM. Este resultado es similar a lo reportado por Pereira y col (2008), quienes tampoco observaron diferencia significativa en el contenido de almidón entre la mutante *opaco-2* y una línea de maíz QPM a 30 DDP. En el caso de la RILs, salvo algunas excepciones, en general tampoco se observaron diferencias en el contenido de almidón entre las líneas

El contenido de amilosa en el endospermo en desarrollo (20 y 30 DDP) de las líneas contrastantes en vitrosidad se muestra en el Cuadro 6. A los 20 DDP, se observaron diferencias significativas (P<0.05) en el contenido de esta molécula entre las líneas parentales y las RIL, con un rango de variación de 9.1 a 13.5 %. La línea parental W64A*o2* presentó un contenido de amilosa significativamente mayor (12.16 %) respecto al parental K0326Y QPM (10.81 %). Así mismo, las RIL opacas presentaron en general un mayor contenido de amilosa que las RIL vítreas (Cuadro 6). Un comportamiento similar fue observado por Juárez-García y col (2013) en el endospermo en desarrollo (20 DDP) de dos genotipos de maíz contrastantes en la dureza del grano.
Cuadro 6. Contenido de amilosa en endospermo en desarrollo de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.

Línea de Maíz		20 DDP	30 DDP
K0326Y QPM	V	10.81 ^c	19.84 ^a
W64Ao2	0	12.16 ^b	17.28 ^b
33	V	12.30 ^{ab}	16.36 ^{cd}
338	V	9.09 ^d	16.18 ^d
346	V	9.42 ^d	16.94 ^{bcd}
55	0	12.24 ^{ab}	14.86 ^e
73	0	13.50 ^a	14.78 ^e
185	0	12.48 ^{ab}	17.20 ^{bc}

V: Línea vítreas; O: Línea opaca. El contenido de amilosa esta expresado como g/100 g de almidón. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher: Amilosa 20 DDP (LSD=1.29); Amilosa 30 DDP (LSD=0.90).

Sidebottom y col (1998) reportaron que la mayoría de las enzimas involucradas en la síntesis de almidón en el endospermo presentan una mayor actividad en etapas tempranas (16-20 DDP), favoreciendo así la síntesis de ciertos compuestos como amilosa. Los resultados del presente estudio sugieren que la síntesis de amilosa en el endospermo de las líneas opacas ocurre en etapas más tempranas con respecto a las líneas vítreas, es decir, las líneas opacas alcanzan un estado de desarrollo del endospermo más avanzado a los 20 DDP.

En cuanto al contenido de amilosa a los 30 DDP, se obtuvo un rango de variación entre las líneas parentales y las RIL de 14.78 a 19.84 % (Cuadro 6). Se observó un mayor contenido de este polisacárido en el parental vítreo K0326Y QPM (19.84 %) respecto al parental opaco W64A*o2* (17.28 %) y de manera similar las RIL vítreas presentaron los mayores porcentajes de amilosa. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Zhang y col (2008) en líneas de maíz en desarrollo (30 DDP) de alto contenido de almidón (8-12 %).

En general se observó un incremento considerable en amilosa de los 20 DDP a los 30 DDP en todas las líneas en desarrollo, aunque este aumento fue mayor en las líneas vítreas (33-83 %) que en las opacas (10-42 %). Este incremento en el contenido de amilosa durante el desarrollo del grano se le atribuye a la actividad de la enzima almidón sintasa unida al granulo tipo 1 (GBSSI), ya que es la responsable de la síntesis de amilosa en el endospermo (Vrinten y Nakamura 2000).

Los resultados del Cuadro 6 revelan que a 20 DDP las líneas opacas presentaron mayores contenidos de amilosa que las vítreas, mientras que a 30 DDP se observó lo opuesto, siendo las líneas vítreas las que presentaron los mayores contenidos de amilosa. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estado de

desarrollo más avanzado corresponden con lo reportado en el grano maduro por Salazar-Salas y col (2014), quienes observaron mayor contenido de amilosa en las líneas vítreas respecto a las opacas. En el mismo sentido, Dombrink y Knutson (1997) encontraron un mayor contenido de amilosa en la fracción vítrea comparado con la fracción opaca del endospermo de maíz, mientras que Robutti y col (2000) reportaron una correlación positiva entre el contenido de amilosa y la dureza del grano. De acuerdo con estos resultados, Soto-López (2012) encontró una correlación significativa (r=0.523, p<0.01) entre el contenido de amilosa y vitrosidad en la población de RIL de la cual se seleccionaron las líneas utilizadas en el presente estudio.

2 Propiedades térmicas del almidón

Las propiedades térmicas del almidón obtenido de endospermos en desarrollo (20 y 30 DDP) de las líneas de maíz QPM se muestran en el Cuadro 7. La gelatinización es un fenómeno que involucra la disociación de las dobles hélices de la estructura cristalina de la amilopectina en presencia de agua (arriba del 70 % en base al peso seco de almidón) por efecto de la temperatura (Agama-Acevedo y col 2013). Por ello, usualmente se determina la temperatura a la que ocurre este fenómeno y la energía requerida. A los 20 DDP, la temperatura pico de gelatinización (T_p) no presentó diferencia significativa entre las muestras de endospermo de las líneas parentales K0326Y QPM y W64A*o*2.

Línea de Maíz		20 DDP			30 DDP		
		Τ _p	ΔH _g	%R	Т _р	ΔH_g	%R
K0326Y QPM	V	69.41 ^b	11.11 ^a	49.18 ^c	71.60 ^a	10.37 ^d	46.31 ^a
W64Ao2	0	68.95 ^{bc}	8.90 ^b	51.97 ^{bc}	70.71 ^{bc}	12.72 ^a	33.23 ^b
33	V	70.87 ^a	10.81 ^a	49.81 ^c	71.07 ^b	9.78 ^{ef}	42.69 ^a
338	V	70.37 ^a	11.58 ^a	50.48 ^c	70.29 ^{cd}	10.04 ^{de}	44.10 ^a
346	V	68.40 ^{cd}	11.31 ^a	48.95 ^c	69.98 ^{de}	9.44 ^f	46.40 ^a
55	0	67.82 ^d	9.01 ^b	51.40 ^{bc}	69.81 ^e	12.30 ^{ab}	33.28 ^b
73	0	67.58 ^d	8.92 ^b	63.60 ^{ab}	70.08 ^{de}	11.60 ^c	36.40 ^b
185	0	67.82 ^d	9.59 ^b	65.42 ^a	68.18 ^f	12.00 ^{bc}	34.50 ^b

Cuadro 7. Propiedades térmicas del almidón obtenido de endospermo en desarrollo de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.

T_p: Temperatura pico de gelatinización (°C); Δ H_g: Entalpía de gelatinización (J/g); %R: Porcentaje de retrogradación. V: Línea vítrea; O: Línea opaca. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher: T_p 20 DDP (LSD=0.88); Δ H_g 20 DDP (LSD=1.24); %R 20 DDP (LSD=12.38); T_p 30 DDP (LSD=0.47); Δ H_g 30 DDP (LSD=0.57); %R 30 DDP (LSD=4.17). Estos resultados son similares a los obtenidos por Wu y col (2015), quienes no encontraron diferencias significativas entre las propiedades térmicas de almidones de endospermos en desarrollo (18 DDP) de los parentales K0326Y QPM vítreo y W64A*o2* opaco. Por otro lado, las RIL presentaron valores de T_p que variaron de 67.6 a 70.9 °C (Cuadro 7) y en general las vítreas presentaron valores significativamente mayores de T_p con respecto a las opacas. Jia y col (2013) reportaron un valor de T_p de 74.8 °C para almidón de endospermo en desarrollo (22 DDP) de la línea W64A*o2*, el cual es superior al observado en el presente estudio y podría atribuirse a diferencias en la proporción amilosa/amilopectina del almidón por las condiciones de cultivo y estado de desarrollo, o bien por diferencias en el equipo utilizado para la medición. De manera similar, Agama-Acevedo y col (2013) reportan valores más altos de temperaturas picos de gelatinización (73.68 y 73.30 °C) en granos en desarrollo (20 DDP) de maíces criollos blancos y azules de México.

En relación a las propiedades térmicas de almidones de endospermo a los 30 DDP, el parental vítreo presentó un valor de T_p (71.60 °C) significativamente mayor respecto al parental opaco (70.71 °C). Las RIL presentaron una variación de 68.18 a 71.07 °C y de manera general se observaron diferencias significativas de T_p entre ellas. Li y col (2007) reportaron una temperatura pico de gelatinización de 71.0 °C en una línea híbrida de maíz B73 en desarrollo (30 DDP), el cual es similar al valor promedio de 70.2 °C obtenido en el presente estudio. Este parámetro es importante para determinar las variables de cocimiento, ya que maíces con mayor T_p se podrían utilizar para elaborar productos que requieran altas temperaturas durante su procesamiento. Raguzzoni y col (2013) realizaron una caracterización de las propiedades térmicas en almidón de seis maíces criollos de Brasil en estado maduro;

la mayoría de los maíces presentaron una T_p alta (70-72 °C), valores similares a los reportados en el presente estudio. Los autores sugieren que dichos materiales pueden ser dirigidos para propósitos específicos en la industria alimentaria y tomando en cuenta la variación observada en los materiales del presente estudio, también podrían considerarse como candidatos para diferentes aplicaciones en alimentos.

Los resultados obtenidos para la entalpia de gelatinización (ΔH_{a}) del almidón de endospermos en desarrollo (20 y 30 DDP) se muestran en el Cuadro 7. A 20 DDP la entalpía de gelatinización varió de 8.92 a 11.58 J/g en las RIL, observándose valores significativamente mayores en las RIL vítreas respecto a las opacas. De manera similar, la entalpía de la línea parental vítrea (11.11 J/g) fue mayor que la de la línea opaca (8.90 J/g). Juárez-García y col (2013) al analizar maíces con endospermo vítreo y harinoso a los 20 DDP reportaron valores de ΔH_g similares a los obtenidos en este estudio y de manera similar encontraron que esta propiedad térmica fue significativamente mayor en el almidón de endospermo vítreo respecto al del endospermo harinoso. No obstante, Wu y col (2015) reportaron una mayor entalpía en la línea parental opaca W64Ao2 respecto a la vítrea K0326Y QPM a los 18 DDP, lo cual podría atribuirse a diferencias en el estado de desarrollo del grano por las condiciones climáticas donde los materiales fueron cultivados. Al parecer el estado de desarrollo alcanzado por los materiales bajo las condiciones utilizadas por Wu y col (2015) es mayor al alcanzado bajo las condiciones del presente estudio a los 20 DDP, por lo que sus resultados corresponden con lo observado en el presente estudio a los 30 DDP.

A los 30 DDP se observó que el parental opaco W64Ao2 presentó una mayor entalpía de gelatinización (12.72 J/g) respecto al parental vítreo K0326Y QPM (10.37 J/g) (Cuadro 7). Las RIL presentaron un rango de variación de 9.44 a 12.3 J/g, siendo las líneas opacas las que obtuvieron mayores entalpías de gelatinización. Li y col (2007) reportaron para una línea híbrida de maíz B73 un valor promedio de entalpía de gelatinización de 14.7 J/g a los 30 DDP, el cual es superior a los obtenidos en el presente estudio y sugiere una mayor proporción de amilopectina en el almidón de esa línea con respecto a las del presente estudio. De manera general las líneas opacas presentaron mayores valores de entalpía de gelatinización respecto a las líneas vítreas (Cuadro 7). La entalpía de gelatinización se ha utilizado como medida general de la cristalinidad (calidad y cantidad de los cristales) y como indicador de la pérdida del orden molecular en el gránulo (Tester y Morrison 1990; Cooke y Gidley 1992; Hoover y Vansanthan 1994). Además, algunos autores han reportado que la entalpía de gelatinización se correlaciona negativamente con el contenido de amilosa (Sandhu y Singh 2007), lo cual corresponde con lo observado en el presente estudio ya que las líneas que presentaron mayor contenido de amilosa en ambos estados de desarrollo (20 y 30 DDP), también presentaron menores valores de entalpía de gelatinización.

El porcentaje de retrogradación (%R) indica la cantidad de re-arreglo estructural del almidón en un tiempo determinado. Los resultados obtenidos para este parámetro en las muestras de maíz en desarrollo (20 y 30 DDP) se muestran en el Cuadro 7. A los 20 DDP, los valores oscilaron entre 48.9 y 65.42 %. En el caso de las líneas parentales no se observaron diferencias significativas en retrogradación. Por otro lado, las RIL opacas presentaron los mayores porcentajes de retrogradación

respecto a las RIL vítreas y en la mayoría de los casos las diferencias fueron significativas. Hyun-Jung y Quian (2009) y Shifeng y col (2009) mencionaron que la amilosa es la principal responsable de la retrogradación, debido a que sus cadenas lineales se unen a través de puentes de hidrógeno formando una malla que empieza a crecer o engrosarse conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, por lo que a mayor contenido de amilosa mayor retrogradación. De la misma manera, Jane y Robyt (1984) indicaron que durante el proceso de retrogradación las fracciones de amilosa y las cadenas cortas (lineales) de la amilopectina forman una zona cristalina con organización muy rígida, la cual requiere de una mayor energía para poder romperse. En el presente estudio, las muestras opacas en desarrollo (20 DDP) presentaron los mayores contenidos de amilosa así como también mayores entalpías de retrogradación y porcentajes de retrogradación, lo cual concuerda con lo mencionado por los diferentes autores. Juárez-García y col (2013) reportan un porcentaje de retrogradación mayor para un maíz vítreo respecto a un maíz harinoso a los 20 DDP, lo cual es contrario a lo encontrado en el presente estudio. La retrogradación es un proceso complejo y depende de muchos factores, por lo que esta discrepancia puede relacionarse quizá con el tipo y concentración de almidón utilizado, regímenes de calentamiento-enfriamiento, pH y sobre todo con la presencia de solutos como lípidos, sales y azúcares típico de las muestras en desarrollo (Singh y col 2003). Sin embargo, las relaciones en cuanto amilosa y porcentaje de retrogradación obtenidas son similares a las reportadas por Agama-Acevedo y col (2013) al analizar líneas de maíz criollo Blanco y Azul en desarrollo (20 DDP), encontrando mayores porcentajes de retrogradación en las líneas de maíz azul, lo cual coincidió a la vez con un mayor contenido de amilosa en estas líneas.

A los 30 DDP se obtuvo un rango de 33.23 a 46.40 % de retrogradación, donde el parental vítreo K0326Y QPM presentó un mayor porcentaje de retrogradación respecto al parental opaco W64A*o2*; de la misma manera entre las RIL se observaron diferencias significativas, siendo las RIL vitreas las que presentaron mayor porcentaje de retrogradación (Cuadro 7). Li y col (2007) determinaron las propiedades fisicoquímicas del almidón de endospermo durante el desarrollo de la línea híbrida de maíz B73, encontrando que el porcentaje de retrogradación entre los 20 y 45 DDP presentó un rango de variación de 42.7 a 57.4 %, valores similares a los encontrados en el presente estudio. De manera general a los 30 DDP las líneas vítreas presentaron mayor porcentaje de retrogradación, lo cual correspondió a la vez con el mayor contenido de amilosa en estas líneas.

La retrogradación es un indicativo del almidón gelatinizado, el cual es capaz de recristalizarse (reorganización de polímeros) durante el almacenamiento. Almidones con mayores valores de retrogradación son menos aptos para productos que requieran ser almacenados en refrigeración (Raguzzoni y col 2013).

B ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE ALMIDÓN (PAG) EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD

La separación electroforética de las proteínas asociadas al gránulo (PAG) en endospermo en desarrollo (20 DDP y 30 DDP) se muestra en las Figuras 7 y 8. Los patrones electroforéticos obtenidos tanto a 20 como a 30 DDP son similares a los reportados por Grimaud y col (2008) al analizar endospermos de maíz en desarrollo (16 DDP), así como Juárez-García y col (2013) quienes analizaron diferentes genotipos de maíz en dos estados de desarrollo (20 y 50 DDP).



Figura 7. Separación por SDS-PAGE de proteínas asociadas al gránulo de almidón en endospermo en estado de desarrollo medio (20 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Los tamaños moleculares de marcadores preteñidos se indican a la izquierda y la identidad de la proteína se indica a la derecha. GBSSI, Almidón sintasa unida al gránulo I; SSI, Almidón sintasa I; SSIIa, Almidón sintasa IIa; SBEIIb, Enzima ramificadora de almidón IIb; SHI, Sacarosa sintasa I; PPDK2, Piruvato fosfato dicinasa 2.



Figura 8. Separación por SDS-PAGE de proteínas asociadas al gránulo de almidón en endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Los tamaños moleculares de marcadores preteñidos se indican a la izquierda y la identidad de la proteína se indica a la derecha. GBSSI, Almidón sintasa unida al gránulo I; SSI, Almidón sintasa I; SSIIa, Almidón sintasa IIa; SBEIIb, Enzima ramificadora de almidón IIb; SHI, Sacarosa sintasa I; PPDK2, Piruvato fosfato dicinasa 2.

En ambos estados de desarrollo, la proteína más abundante presentó un peso molecular de alrededor de 55 kDa y fue identificada como la enzima almidón sintasa unida al gránulo I (GBSSI), la cual es responsable de la síntesis de amilosa. Pesos similares fueron reportados para esta enzima en cebada, arroz y maíz (Boren y col 2004; Umemoto y Aoki 2005; Agama-Acevedo y col 2013).

Los patrones electroforéticos a 20 DDP mostraron una acumulación significativamente mayor de GBSSI en el parental opaco W64A*o2* respecto al vítreo K0326Y QPM (Figura 7), lo cual corresponde con el mayor contenido de amilosa obtenido para el parental opaco; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la acumulación de esta enzima entre las RIL vítreas y opacas, a pesar de que las líneas opacas presentaron mayor contenido de amilosa, lo cual sugiere una mayor actividad de la enzima GBSSI en estas líneas.

Contrario a lo observado a 20 DDP, a los 30 DDP la acumulación de GBSSI fue mayor en el parental vítreo K0326Y QPM respecto al opaco W64A*o2*; este mismo comportamiento fue observado en las RIL, teniendo mayor acumulación de GBSSI en las líneas vítreas, lo cual corresponde a su vez con los mayores contenidos de amilosa en estas líneas.

Sidebottom y col (1998) en un estudio realizado en variedades de maíces de bajo contenido de amilopectina en desarrollo reportaron una mayor acumulación de la enzima GBSSI en todos los estados de desarrollo estudiados (20, 30, 40, 50 DDP), lo cual fue similar a lo observado en el presente estudio.

Juárez-García y col (2013) no encontraron diferencias significativas en la acumulación de la enzima GBSSI entre un maíz con endospermo vítreo y otro harinoso a los 20 y 50 DDP, lo cual se puede atribuir principalmente a las diferencias

entre los genotipos, pero sobre todo a que estos autores realizaron la separación electroforética de las PAG con base en la misma cantidad de proteína, mientras que en el presente estudio se utilizó como base la misma cantidad de almidón.

Recientemente, Salazar-Salas y col (2014) reportaron una acumulación significativamente mayor de GBSSI en endospermo madura del parental K0326Y QPM con respecto a W64A*o2*, así como en muestras vítreas respecto a opacas al evaluar el efecto de *loci* asociados con la modificación de la dureza del endospermo en maíz QPM.

Las otras proteínas presentes en ambos estados de desarrollo fueron identificadas como almidón sintasa I (SSI), almidón sintasa IIa (SSIIa), enzima ramificadora de almidón IIb (SBEIIb), sacarosa sintasa 1 (SH1) y piruvato fosfato dicinasa 2 (PPDK2) (Figuras 7 y 8), las cuales corresponden a enzimas involucradas en la biosíntesis de amilopectina y en el metabolismo de carbohidratos. Dichas enzimas también fueron identificadas por Grimaud y col (2008) y Juarez-Garcia y col (2013) en endospermos en desarrollo (16 y 20 DDP, respectivamente).

Estudios con amiloplastos de endospermo de maíz sugieren que las enzimas interaccionan formando complejos para establecer la estructura de la amilopectina. Liu y col (2009) propusieron que un complejo trimérico conteniendo SSI, SSIIa y SBEIIb está involucrado en el ensamblaje de los clusters de amilopectina de tamaño pequeño a intermedio en la superficie del gránulo. Sin embargo, la poca abundancia encontrada para estas isoformas en el presente estudio (Figuras 7 y 8) no permitió analizar diferencias en su acumulación que pudieran relacionarse con la variación observada en la composición y propiedades fisicoquímicas del almidón en las líneas estudiadas.

En el caso de las enzimas PPDK2 y SH1 no se ha reportado previamente que estén involucradas en la síntesis de almidón. No obstante, Hennen-Bierwagen y col (2009) encontraron estas proteínas formando complejos con enzimas de biosíntesis de almidón (SSIII, SSIIa, SBEIIa and SBEIIb) en amiloplastos de maíz, lo que sugiere que juegan un papel en la regulación global del metabolismo del carbono durante el desarrollo de la semilla.

C ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS DE ALMIDÓN EN EL ENDOSPERMO DE LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD

La variabilidad observada en las propiedades fisicoquímicas de los gránulos de almidón en las líneas estudiadas sugiere un papel importante de esta macromolécula en la modificación de la dureza del endospermo en maíz QPM. Esta variabilidad puede deberse a cambios en la actividad de las enzimas clave en la biosíntesis de almidón, por lo que se analizó la actividad de 5 de ellas (AGPasa, GBSS, SSS, SBE, PUL) en endospermo en desarrollo (20 y 30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64A*o2* contrastantes en vitrosidad.

1 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

La ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) es una enzima clave en la biosíntesis de almidón ya que cataliza la formación del sustrato ADP-glucosa a partir de glucosa 1-fosfato y ATP (Boehlein y col 2010). La actividad de esta enzima a 20 DDP fue mayor en la línea opaca W64A*o*2 (4.30 KU/ g PF) respecto a la línea vítrea K0326Y QPM (3.67 KU/ g PF) (Figura 9), lo cual correspondió a su vez con un mayor contenido de almidón en el mismo estado de desarrollo en esta línea.



Figura 9. Actividad de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) en endospermo en estado de desarrollo medio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64A*o2* contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (p<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=614.05).

A los 30 DDP se observó lo opuesto, de tal manera que la línea vítrea K0326Y QPM tuvo un valor de actividad (4.15 KU/ g PF) ligeramente mayor respecto a W64A*o2* (3.83 KU/ g PF) (Figura 10), aunque dicha diferencia no fue significativa. Esto coincidió con lo observado en el contenido de almidón a 30 DDP (Cuadro 5) donde tampoco se observó diferencia significativa entre estas líneas.

Diversos estudios en cereales muestran que los picos máximos de actividad de AGPasa en general se observan en estados de desarrollo inferiores a 30 DDP, aunque estos resultados se deben tomar con cautela debido a que las diferencias genotípicas y ambientales influyen en el estado de desarrollo del grano para un mismo periodo de tiempo. Tsai y col (1970) analizaron el efecto que tienen diferentes enzimas en la formación del endospermo en una línea híbrida de maíz, encontrando un pico máximo de actividad de AGPasa a los 22 DDP. De manera similar, Sidebottom y col (1998) reportaron picos máximos de actividad de esta enzima a los 20 DDP en una línea de maíz de bajo contenido de amilopectina. Whang y Zhang (2008) analizaron la línea de trigo de alto contenido en gluten ZM 9023, encontrando un pico máximo de actividad de AGPasa a los 20 días después de la antesis (DDA). En otro estudio realizado en trigo se reportó un pico máximo de actividad a los 28 DDP, encontrando además una relación entre este y la tasa máxima de acumulación de almidón (Dai 2010). Dicha relación también fue observada por Zhang y col (2008) al analizar líneas híbridas de maíz de alto y bajo contenido de almidón, observando una correlación positiva entre la actividad y el contenido de almidón con picos máximos entre los 25 y 30 DDP.



Figura 10. Actividad de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) en endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=525.62).

Otra correlación similar fue observada por Bing y col (2008) al analizar líneas de arroz normal y transgénico en desarrollo. Los resultados del presente estudio indican que la máxima actividad de AGPasa también se encuentra entre los 20 y 30 DDP. A 20 DDP se observó una mayor actividad de la enzima y contenido de almidón en la línea W64A*o*2, mientras que en el caso de la línea K0326Y QPM estos máximos se observaron a los 30 DDP. Estos resultados también corresponden con la idea de que las líneas opacas son más precoces que las vítreas.

Soto-López (2015) analizó a nivel transcripcional la expresión de genes de síntesis de almidón en endospermo en desarrollo (20 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad, encontrando una mayor expresión del gen *Bt2* en la línea W64A*o2* respecto a la línea K0326Y QPM; este gen codifica para la subunidad pequeña de la AGPasa, la cual generalmente es responsable de la actividad catalítica del complejo enzimático, por lo que su mayor expresión coincide con la mayor actividad de la enzima observada en el presente estudio en la línea W64A*o2* a los 20 DDP.

Entre los 20 y 30 DDP la línea K0326Y QPM mostró un incremento en la actividad de AGPasa mientras que la línea W64A*o2* mostró una disminución; estas variaciones en actividad a su vez se asociaron con el contenido de almidón en el endospermo en desarrollo de ambas líneas, lo cual nos confirma el papel esencial de ADP-glucosa pirofosforilasa como moduladora de carbono en la biosíntesis del almidón.

2 Almidón sintasas

a Almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSSI)

Este grupo de enzimas es principalmente responsable de la síntesis de amilosa en los gránulos de almidón (Jeon y col 2010). A los 20 DDP, no se observaron diferencias significativas en la actividad de GBSSI entre la línea parental opaca W64A*o2* (4.14 U/g PF) y la vítrea K0326Y QPM (3.99 U/g PF) (Figura 11). No obstante, el contenido de amilosa de la línea W64A*o2* fue mayor respecto al de la línea K0326Y QPM en endospermos con el mismo estado de desarrollo (20 DDP). Estos resultados sugieren que debido a la mayor precocidad de la línea W64A*o2* la acumulación de amilosa en el endospermo inició en un estado de desarrollo más temprano, alcanzando un mayor contenido de este polisacárido a los 20 DDP a pesar de que en este punto de su desarrollo no se encontraron diferencias en la actividad de GBSSI con respecto a la línea K0326Y QPM.

En cuanto a la actividad a los 30 DDP (Figura 12), se observó que la línea vítrea K0326Y QPM presentó una actividad de GBSSI significativamente mayor (4.55 U/g PF) respecto a la línea opaca W64A*o*2 (3.3 U/g PF), lo cual corresponde con los resultados obtenidos para el contenido de amilosa donde la línea K0326Y QPM presentó mayor contenido de este polisacárido respecto a W64A*o*2; esto a su vez coincide con el nivel de acumulación de dicha enzima, cuya abundancia fue significativamente mayor en la línea K0326Y QPM respecto a la línea W64A*o*2 a los 30 DDP.



Figura 11. Actividad de la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI) en endospermo en estado de desarrollo medio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64A*o*2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=1.46).



Figura 12. Actividad de la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI) en endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=0.81).

Los estados de desarrollo del endospermo estudiados en este trabajo (20 y 30 DDP) comprenden aquellos donde se han observado las tasas de máxima actividad de GBSSI en otros cereales. Por ejemplo, en trigo se han reportado picos máximos de actividad para esta enzima entre los 21 y 28 DDP (Dai 2010; Jiang y col 2003; Zhang y col 2010), encontrando además una relación positiva entre la actividad de GBSSI y la acumulación de amilosa (Jiang y col 2003). En el mismo sentido, Zhang y col (2008) reportaron mayores niveles de actividad de GBSSI entre los 24 y 32 DDP en líneas híbridas de maíz, observando que los picos de máxima actividad coincidieron con los de mayor acumulación de amilosa. Esta relación positiva coincide con lo observado en el presente trabajo a los 30 DDP. De manera similar, Sidebottom y col (1998) reportaron picos máximos de actividad de GBSSI a los 16 y 30 DDP en líneas de maíces de bajo contenido de amilopectina; además observaron que estas líneas presentaron mayor actividad con respecto a los maíces normales, lo cual atribuyeron a una compensación de la baja cantidad de amilopectina con amilosa y una mayor acumulación de la enzima GBSSI, lo cual corresponde con lo observado en el presente trabajo. En otro estudio realizado por Zhang y col (2007) reportaron una mayor actividad de GBSSI en líneas de maíz de alto contenido de almidón a los 30 DDP, presentando además una correlación significativa entre las tasas de acumulación de amilosa y la actividad enzimática, concluyendo que GBSSI tienen un papel muy importante en la regulación de la síntesis de amilosa.

Un análisis de expresión a nivel transcripcional en líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad reveló una mayor expresión del gen *Wx1* en la línea K0326Y QPM respecto a línea W64A*o2* a 30 DDP (Elthon Vega Alvarez, comunicación personal); el gen *Wx1* codifica para GBSSI y su expresión coincide con

la mayor acumulación y actividad de la enzima en la línea K0326Y QPM a 30 DDP en el presente estudio.

En general se pudo observar una disminución de la actividad de GBSSI en la línea opaca W64A*o2* a los 30 DDP, lo cual corresponde con el hecho de que esta línea presenta un estado de desarrollo más avanzado a los 20 DDP. Además, la mayor actividad de GBSSI en la línea vítrea K0326Y QPM a los 30 DDP podría explicar el porqué esta línea presentó mayor contenido de amilosa en estado maduro y la influencia que podría tener esta enzima en la modificación del endospermo en QPM. Salazar-Salas y col (2014) sugirieron que un mayor contenido de amilosa favorece la compactación de los gránulos de almidón, lo cual podría contribuir a la formación del fenotipo vítreo en QPM.

b Almidón sintasa soluble (SSS)

Este grupo de enzimas se encuentran asociadas a los gránulos de almidón y están involucradas exclusivamente en la elongación de las cadenas de amilopectina (Zeeman y col 2010). A los 20 DDP se pudo observar que la actividad de SSS no fue significativamente diferente entre la línea vítrea K0326Y QPM (5.47 U/g PF) y la línea opaca W64A*o*2 (4.54 U/g PF) (Figura 13). Por otro lado, a los 30 DPP (Figura 14) la actividad de esta enzima fue significativamente mayor en K0326Y QPM (5.61 U/g PF) con respecto a W64A*o*2 (4.00 U/g PF).



Figura 13. Actividad de la enzima almidón sintasa soluble (SSS) en endospermo en estado de desarrollo intermedio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=2.11).



Figura 14. Actividad de la enzima almidón sintasa soluble (SSS) en endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=0.81).

De manera general se observó que entre los 20 y 30 DDP se dió una disminución en la actividad de enzima SSS en la línea opaca W64A*o*2, mientras que la línea vítrea K0326Y QPM presentó un incremento, lo cual corresponde con la precocidad de los endospermos opacos.

Sidebottom y col (1998) analizaron líneas híbridas de maíz con bajo contenido de amilopectina y observaron la mayor actividad de la enzima SSS entre los 16 y 20 DDP. Como se esperaba, los valores de actividad en estas líneas fueron menores que los encontrados en líneas de maíz normal. Zhang y col (2008) analizaron líneas híbridas de maíz en desarrollo de bajo y alto contenido de almidón y encontraron mayor actividad de SSS a los 20 DDP. La mayor actividad de esta enzima alrededor de los 20 DDP también fue observada en otros cereales como trigo (Zhang y col 2010) y arroz (Bing y col 2008).

Zhang y col (2007) reportaron que la actividad de SSS es un factor limitante en la velocidad de la biosíntesis de almidón durante el desarrollo del grano al analizar cultivares de maíz con contenidos de almidón normal y alto. Algo similar fue reportado por Zhang y col (2008) al analizar líneas de maíz en desarrollo de bajo y alto contenido de almidón, observando una correlación positiva entre la actividad de SSS y el contenido de amilopectina, lo que confirma el papel importante que tiene esta enzima en la biosíntesis de este polisacárido

La isoforma SSIII es una importante sintasa de almidón involucrada en la elongación de la cadena de glucano. Diversos estudios indican que las mutantes SSIII alteran el patrón de ramificación resultando en gránulos de almidón con racimos de amilopectina más grandes (Jeon y col 2010; Zhu y col 2013). Wu y col (2015) reportaron una mayor abundancia y actividad de la isoforma SSIII en endospermo en

desarrollo (18 DDP) de la línea K0326Y QPM respecto a la W64A*o2*; la mayor actividad de esta isoforma podría estar contribuyendo a la actividad de SSS observada en el presente estudio a 20 DDP, aunque en este caso no se encontraron diferencias significativas entre K032Y6 QPM y W64A*o2*, lo cual podría deberse a la influencia que tienen las otras isoformas de la enzima. Wu y col (2015) también observaron que una disminución en la abundancia de SSIII se asoció con una disminución de la actividad de la enzima pululanasa, por lo que la actividad de esta enzima parece estar influenciada de manera indirecta por la presencia de SSIII.

Salazar-Salas y col (2014) reportó una mayor proporción de cadenas de cortas y medianas de la amilopectina en almidón de endospermo maduro de la línea vítrea K0326Y QPM con respecto a W64A*o*2, lo que sugiere una mayor actividad de las isoformas SSSI y SSSII en esta línea. En este sentido, la actividad de estas isoformas podría estar contribuyendo a la actividad de SSS, explicando así la mayor actividad observada en el presente estudio en la línea K0326Y QPM a los 30 DDP, sugiriendo además la biosíntesis de una amilopectina con un mayor número de ramificaciones cortas e intermedias.

3 Enzima ramificadora de almidón (SBE)

Este grupo de enzimas se encarga de formar las ramificaciones en enlaces α-(1,6) durante la biosíntesis de la amilopectina en el gránulo de almidón. La actividad de SBE obtenida a 20 DDP (Figura 15) fue significativamente mayor en la línea vítrea K0326Y QPM (81.57 U/g PF) con respecto a la línea opaca W64A*o*2 (57.56 U/g PF).



Figura 15. Actividad de la enzima ramificadora de almidón (SBE) en endospermo en estado de desarrollo intermedio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=19.03).

Esta actividad se relacionó de manera inversa con los contenidos de amilosa obtenidos a 20 DDP en estas líneas, siendo K0326Y QPM la que presentó menor porcentaje de amilosa (10.81 %) que W64A*o2* (12.16 %). A 30 DDP se observó lo opuesto (Figura 16), siendo ahora la línea opaca W64A*o2* la que presentó mayor actividad (214.11 U/g PF) respecto a la línea vítrea K0326Y QPM (162.89 U/g PF); esto corresponde a su vez con el cambio en el contenido de amilosa observado en estas líneas a 30 DDP (Cuadro 6).

Diversos investigadores han estudiado la actividad de esta enzima en otros cereales, encontrando valores máximos de actividad entre los estados de desarrollo analizados en el presente estudio. Dai (2010) reportó un pico máximo de actividad de SBE a los 28 DDP al analizar dos variedades de trigo en desarrollo. De manera similar, Zhang y col (2007) reportaron máximos de actividad de SBE a los 20 DDP en líneas de maíz con contenido normal y alto de almidón.

Zhang y col (2008) sugieren que la SBE induce la acumulación de amilopectina, por consiguiente un grano con mayor contenido de amilopectina implicaría una disminución en el porcentaje de amilosa y una mayor actividad de SBE. Esto se pudo observar en el presente estudio ya que en ambos estados de desarrollo (20 y 30 DDP) se presentó una relación inversa entre la actividad de SBE y el contenido de amilosa en las líneas evaluadas. Otros investigadores también han sugerido que la SBE induce la acumulación de amilopectina. Zhang y col (2007) y Wang y Zhang (2008) encontraron una correlación significativa entre la actividad de SBE y el contenido de amilopectina al analizar maíces en desarrollo, mientras que Bing y col (2008) reportaron esta misma correlación al analizar líneas arroz.



Figura 16. Actividad de la enzima ramificadora de almidón (SBE) en endospermo en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=19.59).

Diversos estudios han sugerido que las isoformas de las enzimas SSS y SBE interactúan formando complejos multi-proteínicos para llevar a cabo la biosíntesis de amilopectina, indicando además que dependiendo de la actividad de dichas isoformas varía el grado de ramificación y elongación de las cadenas de la amilopectina (Liu y col 2009; Nakamura y col 2014; Natsuko y col 2014). En el presente estudio no se pudo observar tal interacción en términos de la actividad de isoformas específicas de SSS, ya que el caso particular de SBE su actividad a los 20 y 30 DDP si mostró una relación directa con el contenido de amilopectina en ambas líneas.

4 Enzima pululanasa (PUL)

La enzima pululanasa pertenece al grupo de enzimas desarramificadoras de almidón (DBE) e hidroliza principalmente los enlaces α-(1,6) de la amilopectina y glucógeno, produciendo así un polímero lineal de unidades de maltotriosa (Beatty y col 1999). En endospermos con un estado de desarrollo intermedio (20 DDP), la actividad de PUL fue significativamente mayor en la línea vítrea K0326Y QPM (6.2 U/g PF) respecto a la línea opaca W64A*o2* (4.39 U/g PF) (Figura 17). A los 30 DDP se observó la misma tendencia, siendo la línea vítrea la que presentó la mayor actividad (8.37 U/g PF) con respecto a la línea opaca (4.61 U/g PF) (Figura 18).

En ambos estados de desarrollo se presentó mayor actividad de PUL en la línea vítrea K0326Y QPM, lo cual corresponde con lo reportado por Wu y col (2015) quienes también encontraron una mayor actividad de esta enzima en el parental K0326Y con respecto a W64A*o*2 a los 18 DDP.



Figura 17. Actividad de la enzima pululanasa (PUL) en endospermo en estado de desarrollo intermedio (20 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=1.72).



Figura 18. Actividad de la enzima pululanasa (PUL) en endospermo en estado en desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas K0326Y QPM y W64Ao2 contrastantes en vitrosidad. La barras indican diferencias mínimas significativas (P<0.05) basadas en la prueba de Fisher (LSD=1.65).

Estos autores también sugirieron que la actividad de PUL y la isoforma SSSIII son dos factores importantes en la modificación del endospermo en QPM; los resultados obtenidos en el presente estudio corresponden con esa observación ya que si bien no se midió la isoforma SSSIII se encontró una mayor actividad de SSS y PUL en ambos estados de desarrollo en la línea vítrea K0326Y QPM. La contribución de ambas enzimas en la formación del endospermo vítreo podría ser primeramente mediante la acción de PUL para cortar las ramificaciones y proveer de polímeros lineales de glucosa, los cuales podrían luego ser utilizados por las SSS para formar cadenas lineales de diferente longitud en la amilopectina.

VIII CONCLUSIONES

- El almidón de endospermos en estado de desarrollo avanzado (30 DDP) de las líneas vítreas presentó mayor proporción de amilosa, menor entalpía de gelatinización (ΔH_g) y mayor porcentaje de retrogradación (%R), lo cual sugiere una mayor proporción de regiones amorfas en los gránulos de almidón que podrían estar favoreciendo su compactación.
- El análisis de las proteínas asociadas al gránulo de almidón mostró una mayor acumulación de la enzima almidón sintasa unida al granulo (GBSSI) en las muestras opacas a 20 DDP y en muestras vítreas a 30 DDP, lo cual se relacionó con un mayor contenido de amilosa en estas muestras.
- Los análisis enzimáticos mostraron una mayor actividad de almidón sintasa unida al granulo (GBSSI) y menor actividad de la enzima ramificadora de almidón (SBE) en la línea vítrea K0326Y QPM a los 30 DDP, lo cual se relacionó con el mayor contenido de amilosa y menor contenido de amilopectina en esta línea.
- Los resultados del presente estudio sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios en la actividad de las enzimas de biosíntesis de almidón, los cuales se relacionan con cambios en la composición del almidón durante el desarrollo del endospermo y como consecuencia en sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Una mayor actividad de GBSSI y una menor actividad de SBE dan lugar a la formación de gránulos de almidón con una mayor proporción de amilosa y regiones amorfas

en la periferia, lo cual podría estar favoreciendo una mayor compactación entre ellos, contribuyendo al fenotipo vítreo en maíz QPM.
IX BIBLIOGRAFÍA

- Agama-Acevedo E, Juarez-Garcia E, Evangelista-Lozano S, Rosales-Reynoso OL, Bello-Pérez. 2013. Características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis. Agrociencia 47: 1-12.
- Ahmed N, Tetlow IJ, Nawaz S, Iqbal A, Mubin M, Rehman MSNu, Butt A, Lightfoot DA, Maekawa M. 2015. Effect of high temperature on grain filling period, yield, amylose content and activity of starch biosynthesis enzymes in endosperm of basmati rice. Journal of Science Food Agriculture 95: 2237–2243.
- Astiazarán I, Martínez JA. 1999. Alimentos composición y propiedades. 1^{ra} ed. España: McGraw-Hill. p 137-138.
- Barichello V, Yada RY, Coffin RH, Stanley DW. 1990. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: starch structure and composition. Journal of Food Science 54:1054-1059.
- Beatty MK, Rahman A, Cao H, Woodman W, Lee M, Myers AM, James MG. 1999. Purification and molecular genetics characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. Plant Physiology 119:255-266.
- Biliaderis CG. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 69:60-78.
- Bing L, Zhi G, Jian L. 2008. Effects of the activities of key enzymes involved in starch biosynthesis on the fine structure of amylopectin in developing rice (*Oryza sativa* L.) endosperms. Life Sciences 51:863-871.
- Boehlein SK, Shaw JR, Stewart JD, Hannah LC. 2010. Studies of the kinetic mechanism of maize endosperm ADP-Glucose Pyrophosphorylase uncovered complex regulatory properties. Plant Physiology 152:1056-1064.
- Boren M, Larsson H, Falk A, Jansson C. 2004. The barley starch granule proteome: internalized granule polypeptides of the mature endosperm. Plant Science 166:617-626.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

- Chandrashekar A, Mazhar H. 1999. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. Journal of Cereal Science 30:193-207.
- Comparot-Moss M, Denver K. 2009. The evolution of the steel biosynthetic pathway in cereals and other grasses. Journal Experimental Botany 9:2481-2492.
- Cooke D, Gidley MJ. 1992. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization and origin of the enthalpic transition. Carbohydrate Research 227: 103-112.
- Copeland L, Blazek J, Salman H, Chiming-Tang M. 2009. Form and functionality of starch. Food Hydrocolloids 23: 1527-1534.
- Dai Z. 2010. Activities of enzymes involved in starch synthesis in wheat grains differing in starch content. Plant Physiology 57:74-78.
- Dannenhoffer JM, Bostwick DE, Or E, Larkins BA. 1995. Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective opaque-2 modifier. Plant Biology 92:1931-1935.
- Denyer K, Sidebottom C, Hilton CM, Smith AM. 1993. Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. The Plant Journal 4:191-198.
- Dinges JR, Colleoni C, James MG, Myers AM. 2003. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. Plant Cell 15:666-680.
- Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, James MG. 2001. Molecular structure of three mutations at the maize *sugary1* locus and their allele-specific phenotypic effects. Plant Physiology 125:1406–1418.
- Doehlert DC, Knutson CA.1991. Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels. Plant Physiology 138:566-572.
- Dombrink MA, Knutson CA. 1997. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. Cereal Chemistry 74:776-780.
- FAO 1993. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO. Alimentación y nutrición Disponible en: http://www.fao.org/docrep/T0395 E/T0395E00.html. (Consultado en Marzo de 2016).

- FAOSTAT. 2016. Food and Agriculture Organization. Database FAOSTAT. Disponible en: http://faostat.fao.org. (Consultado en Marzo 2016).
- Fisher DK, Gao M, Kim KN, Boyer CD, Guiltinan MJ. 1996. Allelic analysis of the maize amylase-extenders locus suggests that independent genes encode starchbranching enzymes IIa and IIb. Plant Physiology 110:611-619.
- Fujita N, Hasegawa H, Taira T. 2001. The isolation and characterization of a *waxy* mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). Plant Science 160: 595-602.
- Fujita N, Yoshida M, Kondo T, Saito K, Utsumi Y, Tokunaga T, Nishi A, Satoh H, Park JH, Jane JL, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. 2007. Characterization of SSIIIa deficient mutants of rice: the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. Plant Physiology 144:2009-2023.
- Fujita N,Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. 2006. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. Plant Physiology 140:1070-1084.
- Geetha KB, Lending CR, Lopes MA, Wallace JC, Larkins BA. 1991. Opaque2 modifier increase γ-zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. Plant Cell 3:1207-1219.
- Gevers HO, Lake JK. 1992. Development of modified *opaque2* maize in South Africa. En: Mertz ET editores. Quality Protein Maize. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. p 49-78.
- Gibbon BC, Larkins BA. 2005. Molecular genetics approaches to developing quality protein maize. Trends in Genetics 21:227-233.
- Gibbon BC, Wang X, Larkins BA. 2003. Altered starch structure is associated with endosperm modification in quality protein maize. Proceedings of the National Academy Sciences USA 100:15329-15334.
- Glover DV, Mertz ET. 1987. Corn. En: Olson RA, Frey KJ editores. Nutritional Quality of Cereal Grains: Genetic and Agronomic Improvement. Madison: American Society for Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. p 183–336.
- Grimaud F, Rogniaux H, James MG, Myers AM, Planchot V. 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal

maize and mutants affected in starch biosynthesis. Journal of Experimental Botany 59: 3395-3406.

- Guan HP, Preiss J. 1993. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). Plant Physiology 102:1269-1273.
- Gutierrez-Rojas A, Bertrán J, Scott MP, Atta H, Menz M. 2010. Quantitative trait loci for endosperm modification and aminoacid contents in quality protein maize. Crop Science 50:870-879.
- Hamaker BR, Larkins BA. 2000. Maize Food and Feed: A Current Perspective and Consideration of Future Possibilities. En: Kachatourians A, McHughen R, Scora WK, Hui YH (Eds). Transgenic Plants. Marcel Dekker, Inc. NY, EUA, pp 637-653.
- Hannah LC, James M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. Current Opinion in Biotechnology 19:160-165.
- Hawker JS, Ozbun JL, Ozaki H, Greenberg E, Preiss J. 1974. Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose alpha-1,4-glucan alpha-4-glucosyl transferase and alpha- 1,4-glucan, alpha-1,4-glucan-6-glycosyl transferase in synthesis of branched alpha-glucan. Archives of Biochemistry and Biophysics 160: 530-551.
- Hennen-Bierwagen TA, Lin Q, Grimaud F, Planchot V, Keeling PL. 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: A model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. Plant Physiology 149:1541-1559.
- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, Tetlow IJ, Emes MJ, James MG, Myers AM. 2008. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. Plant Physiology 146:1892-1908.
- Holding DR, Hunter BG, Chung T, Gibbon BC, Ford CF, Bharti AK, Messing J, Hamaker BR, Larkins BA. 2008. Genetic analysis of *opaque-2* modifier loci in quality protein maize. Theoretical and Applied Genetics 117:157-170.
- Holding DR, Hunter BG, Klingler JP, Wu S, Guo X, Gibbon BC, Wu R, Schulze JM, Jung R, Larkins BA. 2011. Characterization of *opaque-2* modifier QTLs and candidate genes in recombinant inbred lines derived from the K0326Y quality protein maize inbred. Theoretical and Applied Genetics 122:783-794.

- Hoover R, Vasanthan T. 1994. The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. Journal of Food Biochemistry 17:303-325.
- Hyun-Jung C, Quiag L. 2009. Impact of molecular of amylopectin and amylose chain association during cooling. Carbohydrate Polymers 77: 809-815.
- James MG, Denyer K, Myers AM. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. Current Opinion in Plant Biology 6:215-222.
- James MG, Robertson DS, Myers AM. 1995. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernel. The Plant Cell 7:417-429.
- Jane JL, Robyt JF. 1984. Structure studies of amylose V complexes and retrogradaded amylose by action of alpha amylase, a new method for preparing amylodextrins. Carbohydrate Research 132:105–110
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. Plant Physiology and Biochemistry 48: 383-392.
- Jia M, Wu H, Clay KL, Jung R, Larkins BA, Gibbon BC. 2013. Identification and characterization of lysine rich proteins and starch biosynthesis genes in the opaque2 mutant by transcriptional and proteomic analysis. BMC Plant Biology 13:60-74.
- Jiang D, Cao W, Dai T, Jing Q. 2003. Activities of key enzymes for starch synthesis in relation to growth of superior and inferior grains on winter wheat (*Triticum aestivum* L.) spike. Plant Growth Regulation 41: 247–257.
- Jong-Seong J, Nayeon R, Tae-Ryong H, Harkamal W, Yasunori N. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. Plant Physiology and Biochemistry 48:383-392.
- Juárez-García E, Agama-Acevedo E, Gómez-Montiel NO, Pando-Robles V, Bello-Pérez LA. 2013. Proteomic analysis of the enzymes involved in the starch biosynthesis of maize with different endosperm type and characterization of the starch. Journal of the Science of Food and Agriculture 93:2660-2668.
- Kim KN, Fisher DK, Gao M, Guiltinan MJ. 1998. Molecular cloning and characterization of the amylase-extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize. Plant Molecular Biology 38:945-956.

- Krieger KM, Pollak LM, Brumm TJ, White PJ. 1998. Effects of pollination method and growing location on starch thermal properties of corn hybrids. Cereal Chemistry 75:656-659.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lee HJ, Jee MG, Kim J, Nogoy F, Niño MC, Dal Y, Yu DA, Kim MS, Sun M, Kang KK, Nou I, Cho YG. 2014. Modification of starch composition Using RNAi targeting soluble starch synthase I in Japonica Rice. Plant Breeding Biotechnology 2: 301-312.
- Lending CR, Larkins BA. 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. Plant Cell 1:1011–1023.
- Li L, Blanco M, Jane JL. 2007. Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. Carbohydrate Polymers 67: 630–639.
- Jiang L, Yu X, Qi X, Yu Q, Deng S, Bai B, Li N, Zhang A, Changfu Z, Liu B, Pang J. 2013. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. Transgenic Research 1:1-10.
- Li Z, Chu X, Mouille G, Yan L, Kosar-Hashemi B, Hey S, Napier J, Shewry P, Clarke B, Appels R, Morell MK, Rahman S. 1999. The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. Plant Physiology 120:1147–1156.
- Lin Q, Huang B, Zhang M, Zhang X, Rivenbark JG, Lappe RL, James MG, Myers A, Hennen-Bierwagen TA. 2012. Functional interactions between starch synthase III and isoamylase-type starch-debranching enzyme in maize endosperm. Plant Physiology 158:679-692.
- Liu F, Ahmed Z, Lee EA, Donner E, Liu Q, Ahmed R, Morel MK, Emes MJ, Tetlow, IJ. 2012. Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions. Journal of Experimental Botany 63:1167-1183.
- Liu F, Makhmoudova A, Lee EA, Wait R, Emes MJ, Tetlow J. 2009. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between

starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. Journal of Experimental Botany 60: 4423-4440.

- Lopes MA, Larkins BA. 1991. γ-zein content is related to endosperm modification in Quality Protein Maize. Crop Science 31:1655-1662.
- Lopes MA, Takasaki K, Bostwick DE, Helentjaris T, Larkins BA. 1995. Identification of two opaque2 modifier loci in Quality Protein Maize. Molecular and General Genetics 247:603-613.
- MaizeGDB. 2016. Maize Genetics and Genomics Database. Disponible en: http://www.maizegdb.org. (Consultado en Marzo 2016).
- Mechin V, Thévenot C, Le Guilloux M, Prioul JL, Damerval C. 2007. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate orthophosphate dikinase. Plant Physiology 143:1203–1219.
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE. 1964. Mutant gene that changes the protein composition and increases the lysine content of maize endosperm. Science 145:279-280.
- Nagai YS, Sakulsingharoj C, Edwards GE, Satoh H, Greene TW, Blakeslee B, Okita TW. 2009. Control of starch synthesis in cereals: Metabolite analysis of transgenic rice expressing an up-regulated cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds. Plant Cell Physiology 50:635-643.
- Nakamura Y, Aihara S, Crofts N, Sawada T, Fujita N. 2014. In vitro studies of enzymatic properties of starch synthases and interactions between starch synthase I and starch branchingenzymes from rice. Plant Science 224: 1–8.
- Nakamura Y, Francisco PB, Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A, Fujita N. 2005. Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties. Plant Molecular Biology 58:213-227.
- Nakamura Y, Yuki K, Park SY. 1989. Carbohydrate Metabolism in the Developing Endosperm of Rice Grains. Plant Cell Physiology 30: 833-839.
- Natsuko A, Hiroki A, Hikari Y, Naoko FO, Rumiko I, Naoko C, Yasunori N, Naoko F. 2014. Relationships between starch synthase I and branching enzyme isozymes determined using double mutant rice lines. BMC Plant Biology 14:80-92.

- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. Plant Physiology 127: 459-472.
- Or E, Boyer SK, Larkins BA. 1993. *Opaque2* modifiers act post-transcriptionally and in a polar manner on γ -zein gene expression in maize endosperm. Plant Cell 5:1599-1609.
- Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA. 2006. Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas. México: Fondo de Cultura Económica 205 p
- Pereira RC, Davide LC, Pedrozo CA, Carneiro NP, Souza IRP, Paiva E. 2008. Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grains. Genetics and Molecular Research 7:498-508.
- Raguzzoni JC, López da Silva JA, Maraschin M, Delgadillo I. 2013. Characterization of the physicochemical and thermal properties of unexplored starches with potential industrial uses from six Brazilian maize landraces. Starch/Stärke 65: 938-946.
- Regina A, Kosar-Hashemi B, Ling S, Li ZY, Rahman S, Morell M. 2010. Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. Journal of Experimental Botany 61:1469-1482.
- Robutti J, Borras F, Ferrer M, Percibaldi M, Knutson CA. 2000. Evaluation of quality factors in Argentine maize races. Cereal Chemistry 77:24-26.
- SAGARPA. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario de la Producción Agrícola. México, D.F. Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx (Consultado en Marzo 2016).
- Salazar-Salas NY, Pineda-Hidalgo KV, Chavez-Ontiveros J, Gutierrez-Dorado R, Reyes-Moreno C, Bello-Pérez LA, Larkins BA, Lopez-Valenzuela JA. 2014. Biochemical characterization of QTLs associated with endosperm modification in quality protein maize. Journal of Cereal Science 60:255-263.
- Sandhu KS, Singh N. 2007. Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. Food Chemistry 101: 1499-1507.

- Shifeng Y, Ying M, Da-Weng S. 2009. Impact of amylose content on starch retrogradation and textute of cooked milled rice during storage. Journal of Cereal Science 50: 139-144.
- Sidebottom C, Kirkland M, Strongitharm B, Jeffcoat R. 1998. Characterization of the difference of starch branching enzyme activities in normal and low-amylopectin maize during kernel development. Journal of Cereal Science 27:279-287.
- Singh N, Singh J, Kaur L, Singh-Sodi N, Singh-Gill B. 2003. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Food Chemistry 81:219-231.
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegle J. 1997. An evaluation of utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. Theoretical and Applied Genetics 95:163–173.
- Soto-López OA. 2012. Mapeo de *loci* genéticos asociados con la composición de zeínas y almidón en el endospermo de maíz de calidad proteínica. [Tesis de Licenciatura]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 93 p.
- Soto-López OA. 2015. Análisis de la expresión de genes de síntesis de almidón y su relación con la modificación de la dureza del endospermo de maíz de calidad proteínica [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 130 p.
- Srichuwong S, Jane J. 2007. Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: a review. Food Science and Biotechnology 16:234-332.
- Sun C, Sathish P, Ahlandsberg S, Deiber A, Jansson C.1997. Identification of four starch-branching enzymes in barley endosperm: partial purification of forms I, Ila and Ilb. New Phytologist 137:215-222.
- Tester RF, Karkalas J. 2002. Starch: Biopolymers. Polysaccharides. En: Steinbüchel A, Vandamme EJ, de Beats S, Steinbüchel A editores. II Polysaccharides from Eukaryote. Vol. 6. Wiley-VCH: Weinheim. p 328-438.

- Tester RF, Morrison WR. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. Cereal Chemistry 67:558-563.
- Tester RF. 1997. Starch: the polysaccharide fractions. En: Frazier PJ, Donald AM, Richmond P editores. Starch: Structure and Functionality. Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry. p 163-171.
- Tetlow IJ, Morrell MK, Ernes MJ. 2004a. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. Journal of Experimental Botany 55:2131-2145.
- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ. 2004b. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein–protein interactions. The Plant Cell 16:694-708.
- Tsai CY, Salamini F, Nelson OE. 1970. Enzymes of Carbohydrate Metabolism in the Developing Endosperm of Maize. Plant Physiology 46:299-306.
- Umemota T, Terashima K. 2002. Activity of granule-bound starch synthase is an important determinant of amylase content in rice endosperm. Functional Plant Biology 29: 1121-1124.
- Umemoto T, Aoki N. 2005. Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase Ila that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme. Functional Plant Biology 32:763–768.
- Villegas E, Vasal SK, Bjarnarson M. 1992. Quality protein maize: what is it and how was it developed. En: Mertz ET, editor. Quality Protein Maize. St Paul: American Society of Cereal Chemists. p 27-48.
- Vrinten PL, Nakamura T. 2000. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. Plant Physiology 122:255-264
- Wallace JC, Lopes MA, Paiva E, Larkins BA. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified *opaque-2* maize. Plant Physiology 92:191-196.

- Wang TL, Bogracheva TY, Hedley CL. 1998. Starch: as simple as A, B, C. Journal of Experimental Botany 49: 481–502.
- Wang WJ, Zhang HH. 2008. Effect of soil texture on starch accumulation and activities of key enzymes of starch synthesis in the kernel of ZM 9023. Agricultural Sciences 7:686-691.
- Wang Z, Li W, Qi J, Shi P, Yin Y. 2011. Starch accumulation, activities of key enzyme and gene expression in starch synthesis of wheat endosperm with different starch contents. Association of Food Scientists y Technologists 51:419-419.
- Watson SA. 1987. Structure and composition. En: Watson SA, Ramstad PE, editores. Corn: Chemistry and Technology. St. Paul, MN, EUA: American Association of Cereal Chemists. p 52-82.
- Wilson LM, Whit SR, Ibáñez AM, Rocheford TR, Goodman MM, Buckler ES. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. The Plant Cell 16:2719-2733.
- Wong KS, Kubo A, Jane JL, Harada K, Satoh H, Nakamura Y. 2003. Structures and properties of amylopectin and phytoglycogen in the endosperm of sugary-1 mutants of rice. Journal of Cereal Science 37:139–149.
- Wu H, Clay K, Thompson SS, Hennen-Bierwagen TA, Andrew BJ, Zechmann B, Gibbon BC. 2015. Pullulanase and Starch Synthase III Are Associated with Formation of Vitreous Endosperm in Quality Protein Maize. Plos One 10: e0130856.
- Wu Y, Holding DR, Messin J. 2010. γ-zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107:12810-12815.
- Yamanouchi H, Nakamura Y. 1992. Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-Enzyme). Plant cell physiol. 33: 985-991.
- Yau JC, Bockholt AJ, Smith JD, Rooney LW, Waniska RD. 1999. Maize endosperm proteins that contribute to endosperm lysine content. Cereal Chemistry 76:668-672.
- Yoo SH, Jane J. 2002. Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. Carbohydrate Polymers 49:297-305.

- Yuan L, Dou Y, Kianian SF, Zhang C, Holding DR. 2014. Deletion mutagenesis identifies a haploinsufficient role for γ-Zein in opaque2 endosperm modification. Plant Physiology 164:119-130.
- Yun SH, Matheson NK. 1993. Structure of the amylopectins of *waxy*, normal, *amylose-extender*, and *wx:ae* genotypes and of the phytoglycogen of maize. Carbohydrate Research 243:307-321.
- Zarkadas CG, Hamilton RI, Zi RY, Choi VK, Khanizadeh S, Nicholas GW, Pattison R, Pattison PL. 2000. Assessment of the protein quality of 15 new northern adapted cultivars of quality protein maize using amino acid analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:5351-5361.
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. 2010. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. Annual Review of Plant Biology 61:209-234.
- Zhang Ch, Jiang D, Liu F, Cai J, Dai T, Cao W. 2010. Starch granules size distribution in superior and inferior grains of wheat is related to enzyme activities and their gene expressions during grain filling. Journal of Cereal Science 51:226–233.
- Zhang HY, Dong ST, Gao RQ, Sun QQ. 2007. Starch accumulation and enzyme activities associated with starch synthesis in maize kernels. Agricultural Sciences 6: 808-815.
- Zhang JJ, Hu YF, Huang YB. 2008. Relationship between activities of key enzymes involved in starch synthesis and accumulation in maize inbred lines during grain filling. Journal of Plan Physiology 55:249-255.
- Zhang X, Colleoni C, Ratushna V, Sirghie-Colleoni M, James MG, Myers AM. 2004. Molecular characterization demonstrates that the Zea mays gene sugary2 codes for the starch synthase isoform SSIIa. Plant Molecular Biology 54:865-879.
- Zhu F, Bertoft E, Seetharaman K. 2013. Composition of clusters and building blocks in amylopectins from maize mutants deficient in starch synthase III. Journal of Agriculture and Food Chemistry 61: 12345–12355.

ABREVIATURAS

3-PGA	3-Fosfoglicerato
ADP-Glu	ADP-Glucosa
ae1	Mutación amylose extender 1
AGPasa	ADP- glucosa pirofosforilasa
AGPS2	ADP- glucosa pirofosforilasa, subunidad pequeña de endospermo
AGPL3	ADP- glucosa pirofosforilasa, subunidad grande de endospermo
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trisfostato
bt2	Mutación brittle 2
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
Con A	Concanavalina A
DBE	Enzimas desramificadoras del almidón
DDP	Días después de la polinización
DMSO	Dimetil sulfóxido
du1	Mutación sintasa soluble Ila
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
FAO	Organización para la Alimentación y Agricultura
FAOSTAT	Estadística de la Organización para la Alimentación y Agricultura
FK	Fructosa cinasa
g	Gravedad
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GBSS	Almidón sintasa unida al gránulo
Glc-1-P	Glucosa-1-fosfato
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
GOP	Glucosa oxidasa peroxidasa
GOPOD	Glucosa oxidasa peroxidasa
GP	Grado de polimerización

HCI	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
l ₂	Yodo
KI	Yoduro de potasio
ISA 1	Isoamilasa 1
kDa	Kilodalton(es)
kU	Kilounidades
KCI	Cloruro de potasio
Loci	Plural de locus
Locus	Posición que ocupa un gen en el genoma
LSD	Diferencia mínima significativa
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mМ	Milimolar
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanómetro
o2	Mutación opaco2
PAG	Proteínas asociadas al gránulo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PF	Peso fresco
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
pН	Potencial de hidrógeno
PPDK2	Piruvato fosfato dicinasa 2
PPi	Pirofosfato
PPiasa	Pirofosfatasa
PUL	Pululanasa
p/v	Peso/volumen
QPM	Maíz de calidad proteínica
RIL	Líneas recombinantes puras
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

RNAi	Acido ribonucleico de interferencia
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y
	Alimentación
SBE	Enzimas ramificadoras del almidón
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH1	Sacarosa sintasa 1
Sh1	Mutación Shrunken 1
Sh2	Mutación Shrunken 2
SS	Almidón sintasa
SSS	Almidón sintasas solubles
su1	Mutación sugary 1
TCA	Ácido tricloroacético
T _p	Temperatura pico de gelatinización
Ton	Toneladas
UI	Unidades internacionales
UGPasa	UDP glucosa pirofosforilasa
v/v	Volumen/volumen
Wx1	Waxy1
Zpu1	Mutación pululanasa 1
ΔH_g	Entalpía de gelatinización
ΔH_r	Entalpía de retrogradación
%R	Porcentaje de retrogradación