



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**  
**Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología**

**Caracterización de Genes de Síntesis  
de Almidón y su Asociación con la  
Modificación del Endospermo en Maíz  
de Calidad Proteínica**

**T E S I S**

que presenta

**LBG Jesús Christian Grimaldi Olivas**

como requisito para  
obtener el grado de

**Maestro en Ciencias  
con Orientación en  
Biotecnología Agroalimentaria**

**Director**

**Dra Nancy Yareli Salazar Salas**  
**Dr José Ángel López Valenzuela**

**Culiacán de Rosales, SIN, MEX**

**Enero 2020**

## **Presentación**

La presente investigación, titulada “Caracterización de Genes de Síntesis de Almidón y su Asociación con la Modificación del Endospermo en Maíz de Calidad Proteínica”, se realizó en el “Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular”, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la Dirección de la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas y el Dr. José Ángel López Valenzuela. Como Asesores Académicos participaron la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo y el Dr. José Antonio Garzón Tiznado. Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “Análisis de Expresión Génica y Actividad de Enzimas de Síntesis de Almidón y su Asociación con la Modificación del Endospermo en Maíz de Calidad Proteínica”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACyT CB2016/284552) cuyo Responsable Técnico es Dra. Nancy Yareli Salazar Salas. El LBG. Jesús Christian Grimaldi Olivas recibió “Beca Nacional para Estudios de Posgrado” (Maestría) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, por medio de la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas** por permitirme realizar mis estudios de posgrado a través del **Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por el apoyo económico brindado para este proyecto.

Eternamente agradecido con **Dios** por permitirme cumplir una meta más en la vida, ya que a pesar de las malas rachas siempre me dio la fortaleza para seguir adelante.

Agradecido con todos mis **profesores** que me fueron formando como todo un profesionalista durante mis estudios de posgrado.

Al **Dr. José Ángel López Valenzuela** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo del “Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular”, así como también brindarme las herramientas necesarias para crecer más en mi formación profesional.

A la **Dra. Nancy Yareli Salazar Salas** por sus asesorías brindadas y por el apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A la **Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo** por siempre estar al pendiente de mí en todo momento, siendo un pilar fundamental para el desarrollo de mi investigación, gracias por sus consejos, sus críticas constructivas siendo éstas de gran importancia para mi formación profesional.

A la **MC. Jeanett Chávez Ontiveros** por siempre al pendiente de todos nosotros de las actividades realizadas y por el apoyo que me brindo durante mi estancia.

A mis compañeros y amigos del “Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular”: **Marifer, David, Milton, Cinthya, Cinthya Juarez, Brianda, Adán, Yanelit, Diana** por el gran compañerismo y apoyo que me brindaron en todo momento, haciendo el ambiente de trabajo más divertido y menos estresante.

A **Fernanda y David** por su amistad y por todas las experiencias vividas durante este periodo, apoyándome en todo momento tanto en el desarrollo de mi proyecto como en el aspecto personal.

A todos mis compañeros y amigos de generación de la Maestría en Biotecnología **Marco, Daniel, Nadia, Marycruz, Anna, Luz** gracias por todas esas experiencias inolvidables que vivimos dentro y fuera del plantel educativo.

A mis amigos **Rodrigo, Marco y Cruz** por su amistad y apoyo que me brindaron siempre desde la licenciatura, gracias por tantas experiencias inolvidables.

A mi novia **Ana María** ya que a pesar de todos los tropiezos en el aspecto académico y emocional siempre estuvo a mi lado apoyándome en todo momento, gracias por ser tan comprensiva conmigo y por brindarme grandes consejos que me hicieron crecer más como persona.

A toda mi familia por el apoyo que siempre me brindaron, principalmente a mis padres **Guillermo y Blanca** gracias por todo su cariño amor y comprensión y por fomentar en mí uno de los valores más grandes que es la educación y guiarme por el buen camino en todo momento, agradezco a mis hermanos **Guillermo, Carlos, Blanca, Rubí y Heidi** al igual por su cariño y por siempre estar pendiente de mí.

## ÍNDICE GENERAL

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>  | iv   |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b>  | v    |
| <b>I RESUMEN</b>  | 1    |
| <b>ABSTRACT</b>   | 3    |
| <b>II INTRODUCCIÓN</b>  | 5    |
| <b>III REVISION DE LITERATURA</b>                               | 7    |
| <b>A MAÍZ</b>   | 7    |
| 1 Importancia económica y social                                | 7    |
| 2 Estructura y composición química del grano                    | 7    |
| <b>B ALMIDÓN</b>  | 9    |
| 1 Estructura del gránulo de almidón                             | 9    |
| 2 Biosíntesis de almidón  | 12   |
| 3 Enzimas involucradas en la síntesis de amilosa y amilopectina | 15   |
| a ADP-glucosa fosforilasa (AGPasa)                              | 15   |
| b Enzimas almidón sintasas                                      | 15   |
| 1) Síntesis de amilosa  | 16   |
| 2) Síntesis de amilopectina                                     | 16   |
| c Enzimas ramificadoras de almidón (SBE)                        | 17   |
| d Enzimas desramificadoras en la síntesis de almidón (DBE)      | 17   |
| 4 Variación alélica en genes de síntesis de almidón             | 17   |
| 5 Propiedades fisicoquímicas del almidón                        | 19   |
| <b>C MAIZ DE CALIDAD PROTEÍNICA</b>                             | 22   |
| 1 Mecanismo relacionado al incremento de $\gamma$ -zeínas       | 24   |

|   |           |
|---|-----------|
| 2 Mecanismo relacionado con la modificación de la estructura del almidón  | 26        |
| D ANÁLISIS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON LA MODIFICACIÓN DEL ENDOSPERMO EN MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA                        | 27        |
| <b>IV JUSTIFICACIÓN</b>   | <b>33</b> |
| <b>V HIPÓTESIS</b>  | <b>34</b> |
| <b>VI OBJETIVOS</b>   | <b>35</b> |
| A OBJETIVO GENERAL  | 35        |
| B OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 35        |
| <b>VII MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>36</b> |
| A MATERIALES  | 36        |
| B MÉTODOS   | 36        |
| 1 Extracción de RNA   | 36        |
| 2 Tratamiento con DNAsa   | 37        |
| 3 Síntesis de cDNA  | 37        |
| 4 Diseño de oligos iniciadores y amplificación de fragmentos a partir de cDNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 38        |
| 5 Secuenciación de genes de síntesis de almidón   | 40        |
| 6 Diseño de oligos alelo específico para K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2  | 40        |
| 7 Extracción de DNA   | 40        |
| 8 Evaluación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)   | 41        |
| 9 Evaluación de propiedades fisicoquímicas del gránulo de almidón   | 41        |
| a Determinacion de amilosa  | 42        |
| b Grado de hinchamiento   | 43        |
| 10 Análisis de asociación   | 43        |

|   |    |
|---|----|
| <b>VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | 45 |
| A ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN<br>EN LAS LÍNEAS DE MAÍZ K0326Y-QPM, CML176-QPM Y W64A <sub>o</sub> 2  | 45 |
| B EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN<br>RIL DERIVADAS DE K0326Y-QPM x W64A <sub>o</sub> 2 Y CML176-QPM x<br>W64A <sub>o</sub> 2                                   | 61 |
| C VARIABILIDAD EN PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN<br>EN EL ENDOSPERMO DE RIL DERIVADAS DE CML176-QPM x<br>W64A <sub>o</sub> 2.   | 66 |
| 1 Contenido de amilosa  | 66 |
| 2 Grado de hinchamiento   | 67 |
| D ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE GENES DE SÍNTESIS<br>DE ALMIDÓN Y CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA<br>MODIFICACIÓN DEL ENDOSPERMO EN LÍNEAS DE MAÍZ DE<br>CALIDAD PROTEÍNICA | 70 |
| <b>IX CONCLUSIONES</b>  | 75 |
| <b>X BIBLIOGRAFÍA</b>   | 76 |
| <b>Abreviaturas</b>   | 86 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>Fig</b> | <b>Descripción</b>   | <b>Pág.</b> |
|------------|--|-------------|
| 1          | Corte longitudinal del grano de maíz   | 8           |
| 2          | Estructura química de amilosa y amilopectina   | 11          |
| 3          | Ruta de biosíntesis de almidón en el endospermo de cereales  | 13          |
| 4          | Cambios en el almidón durante el calentamiento en exceso de agua   | 21          |
| 5          | Secuencia de nucleótidos del gen <i>Amilose extender 1 (Ae1)</i> en las líneas CML176-QPM, K0326Y-QPM y W64Ao2                               | 46          |
| 6          | Secuencia de nucleótidos del gen <i>Waxy 1 (Wx1)</i> en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2   | 52          |
| 7          | Secuencia de aminoácidos de la enzima SBEIIb en las líneas de maíz K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen <i>Ae1</i>      | 56          |
| 8          | Secuencia de aminoácidos de aminoácidos de la enzima GBSSI en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen <i>Waxy 1</i> | 58          |
| 9          | Análisis electroforético de polimorfismos en el gen <i>Wx1</i> ubicado en la posición 1,173 (C>G).   | 63          |
| 10         | Mapeo de los marcadores Ae1-1136, Ae1-1509, Wx1-1173, Wx1-2266 y Wx1-2177 en una población derivada de K0326Y-QPM x W64Ao2.                  | 64          |
| 11         | Mapeo de los marcadores Ae1-1509, Ae1-1579, Wx1-1173, Wx1-2266 y Wx1-2177 en una población derivada de CML176-QPM x W64Ao2.                  | 65          |
| 12         | Variación en el contenido de amilosa de las líneas de maíz CML176-QPM, W64Ao2 y 76 RIL derivadas de su cruce.                                | 68          |
| 13         | Variación en grado de hinchamiento de las líneas de maíz CML176-QPM, W64Ao2 y 76 RIL derivadas de su cruce.                                  | 69          |



## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Descripción   | Pág. |
|--------|---|------|
| 1      | Composición química del grano de maíz en base seca (%)  | 10   |
| 2      | Principales genes de biosíntesis de almidón en el endospermo de maíz y su localización en el mapa genético  | 14   |
| 3      | Híbridos QPM liberados desde 1996   | 23   |
| 4      | Descripción de loci genéticos asociados con $\gamma$ -zeína 27 kDa y propiedades fisicoquímicas del almidón en 100 RIL de maíz derivadas de la cruce de K0326Y-QPM y W64Ao2 | 29   |
| 5      | Localización y efecto de loci asociados con la composición de zeínas y almidón en RIL de maíz derivadas de la cruce de CML176-QPM y W64Ao2                                  | 31   |
| 6      | Oligonucléotidos iniciadores utilizados para la amplificación de genes de síntesis de almidón   | 39   |
| 7      | Descripción de los marcadores utilizados para el mapeo genético   | 62   |
| 8      | Asociación entre polimorfismos de genes de síntesis de almidón y características relacionadas con la modificación del endospermo en 90 RIL derivadas de K0326Y-QPM x W64Ao2 | 71   |
| 9      | Asociación entre polimorfismos de genes de síntesis de almidón y características relacionadas con la modificación del endospermo en 76 RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2 | 72   |

## I RESUMEN

El maíz de calidad proteínica (QPM) es una mutante *opaco2* (*o2*) modificada que posee un endospermo vítreo y rendimiento normal, pero su desarrollo ha sido lento debido al poco conocimiento de los mecanismos responsables de la modificación del endospermo blando en vítreo. Estudios previos han propuesto dos mecanismos relacionados con esta conversión, uno relacionado con un incremento en la acumulación de cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -zeínas y el otro con la alteración de la estructura del gránulo de almidón. Los genes de síntesis de almidón (*Sh1*, *Sh2*, *Bt2*, *Wx1*, *Ae1* y *Su1*) presentan variaciones alélicas dependiendo del genotipo de maíz, reflejándose en diferencias en la composición del almidón y en las propiedades del grano sobre las cuales este impacta. El mapeo genético de características relacionadas con la modificación del endospermo de maíz QPM en dos poblaciones de líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de las cruzas de K0326Y-QPM y CML176-QPM con W64Ao2 identificó loci cercanos a genes de síntesis de almidón. Sin embargo, se requiere información acerca de las variantes específicas de estos genes que controlan dichas características. El objetivo del presente estudio fue determinar la variación molecular de genes de síntesis de almidón y su asociación con características relacionadas con la modificación del endospermo en dos poblaciones de maíz de alta calidad proteínica. Se utilizaron las líneas K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 y RIL derivadas de su cruce. Primeramente se extrajo ARN total del endospermo de los parentales K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 a partir de granos cosechados 30 días después de la polinización (DPP). Posteriormente se sintetizaron cDNA y se utilizaron para amplificar por PCR fragmentos de los genes *Ae1* y *Wx1* usando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias reportadas para la línea de maíz B73. Los productos de PCR fueron secuenciados y los polimorfismos encontrados para cada gen entre los parentales se usaron para diseñar oligonucleótidos alelo-específicos, los cuales se emplearon como marcadores en un mapeo genético utilizando características relacionadas con la modificación del endospermo en maíz QPM; se utilizaron datos reportados previamente en las RIL derivadas de K0326Y-QPM x W64Ao2 y los obtenidos en el presente estudio para RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2. El análisis de secuenciación permitió

identificar 24 polimorfismos entre las líneas parentales, donde siete de ellos resultaron en un cambio de un aminoácido en la secuencia de las enzimas codificadas. El mapeo genético identificó cinco polimorfismos asociados significativamente con características relacionadas con la modificación del endospermo. Los marcadores Ae1-1509, Ae1-1136, Wx1-1173 y Wx1-2266 explicaron en promedio más del 15% de la variación en vitrosidad, amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización en la población derivada de K0326Y-QPM x W64Ao2, mientras que los marcadores Ae1-1509, Ae1-1579, Wx1-1173 y Wx1-2266 explicaron más del 25% en promedio de la variación en vitrosidad, amilosa y grado de hinchamiento en RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2. Dos marcadores en los genes *Ae1* (Ae1-1509) y *Wx1* (Wx1-1173) presentaron una mayor asociación con las propiedades fisicoquímicas del almidón, lo que sugiere que estos polimorfismos son los mayormente responsables de cambios en la proporción amilosa/amilopectina y propiedades del gránulo de almidón, los cuales tienen una gran influencia en la modificación del endospermo en el maíz QPM.

## ABSTRACT

Quality protein maize (QPM) is a modified opaque2 (*o2*) mutant with a vitreous endosperm and normal yield, but its development has been slow due to the poor knowledge about the mechanisms responsible for the modification of the endosperm from soft to vitreous. Previous studies have proposed two mechanisms related with this conversion, one related with an increase in the accumulation of  $\gamma$ -zein rich protein bodies and the other with the alteration of the starch granule structure. Starch synthesis genes (*Sh1*, *Sh2*, *Bt2*, *Wx1*, *Ae1* y *Su1*) show allelic variations depending of the maize genotype, which are reflected in changes in starch composition and related kernel properties. Genetic mapping of characteristics associated with endosperm modification in QPM using two populations of recombinant inbred lines (RIL) derived from the crosses of K0326Y-QPM and CML176-QPM by W64A*o2* identified loci near starch synthesis genes. However, it is necessary to get information about the specific variants of these genes that control such characteristics. The aim of this study was to determine the molecular variation of starch synthesis genes and their association with characteristics related to endosperm modification in two quality protein maize populations. The lines K0326Y-QPM, CML176-QPM, W64A*o2* and RIL derived from their cross were used. ARN was extracted from developing endosperms of the parental lines using kernels harvested 30 days after pollination (DAP). ARN samples were used for cDNA synthesis, which were used in PCR reactions to amplify fragments of the genes *Ae1* and *Wx1* using primers designed based on the sequences reported for the maize line B73. PCR products were sequenced and the polymorphisms found for each gene between the parental lines were used to design allele-specific primers, which were used as markers for the genetic mapping of characteristics related with endosperm modification in QPM; data for the RIL of the cross K0326Y-QPM x W64A*o2* were reported previously, whereas those for RIL of CML176-QPM x W64A*o2* were obtained in the present study. Sequencing analysis revealed 24 polymorphisms between the parental lines, but only seven changed one amino acid in the encoded enzymes. Genetic mapping identified five polymorphisms significantly associated with characteristics related to endosperm modification. The markers Ae1-1509, Ae1-1136, Wx1-1173 and Wx1-2266 explained on average more than 15% of the variation in

vitreousness, amylose, swelling power and enthalphy of gelatinization in the population derived of K0326Y-QPM x W64Ao2, whereas the markers Ae1-1509, Ae1-1579, Wx1-1173 and Wx1-2266 explained on average more than 25% of the variation in vitreousness, amylose and swelling power in the RIL derived of CML176-QPM x W64Ao2. Two markers in the genes *Ae1* (Ae1-1509) and *Wx1* (Wx1-1173) showed the highest association with starch physicochemical properties, suggesting that these polymorphisms are mainly responsible of the changes in the amylose/amylopectin ratio and starch granule properties, which have a great influence in the endosperm modification of QPM.

## II INTRODUCCION

La mutación *opaco2* (*o2*) incrementa el contenido de lisina en el endospermo de maíz mejorando la calidad de las proteínas (Mertz y col., 1964), pero presenta un pobre desempeño agronómico debido a su endospermo blando. Esta problemática se superó mediante el desarrollo del maíz de calidad proteínica o QPM (del inglés, Quality Protein Maize), el cual se obtiene mediante la selección de genes que modifican el endospermo blando de la mutante *o2* en vítreo sin afectar la calidad proteínica. Los mecanismos responsables de esta modificación aún no se conocen completamente, pero los dos principales que se han propuesto son el incremento en la acumulación de cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -zeína (Dannenhoffer y col., 1995), así como la alteración de la estructura del almidón con la consecuente modificación de las propiedades de los gránulos (Gibbon y col., 2003; Salazar-Salas y col., 2014).

El almidón es el principal componente del endospermo de maíz y por lo tanto es el que tiene mayor efecto sobre las características del grano. Su síntesis involucra cuatro grupos de enzimas, ADP-glucosa fosforilasas, almidón sintasas, ramificadoras y desramificadoras de almidón, cuya acumulación depende del genotipo de maíz (Hannah y James, 2008). En este sentido, los estudios de almidón en maíz se han enfocado sobre los seis principales genes que codifican para estas enzimas: *Amylose extender 1* (*Ae1*), *Brittle 2* (*Bt2*), *Shrunken 1* (*Sh1*), *Shrunken 2* (*Sh2*), *Sugary 1* (*Su1*) y *Waxy 1* (*Wx1*) (Shin y col., 2006).

Análisis genéticos en líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de la cruce entre líneas de maíz *o2* (W64Ao2, endospermo blando) y líneas con genes modificadores (K0326Y-QPM, CML176-QPM, endospermo vítreo) identificaron loci genéticos asociados con la dureza o vitrosidad del endospermo (Holding y col., 2011; Álvarez Hernández, 2014; Apodaca Tamayo, 2017; Grimaldi-Olivas, 2017). Algunos loci ubicados en los cromosomas 5, 7 y 9 resultan interesantes por su cercanía con genes involucrados en la biosíntesis de almidón. Sin embargo, los mecanismos relacionados con esta modificación podrían variar dependiendo del genotipo QPM utilizado como donador del fenotipo vítreo. En este sentido, se requiere caracterizar las variantes alélicas de genes de síntesis de almidón en diferentes líneas QPM como K0326Y y

CML176 y contrastarlas con las de la línea opaca W64Ao2, de tal forma que se puedan establecer asociaciones entre esas variantes y propiedades fisicoquímicas del almidón relacionadas con la modificación del endospermo en maíz QPM, lo cual además de contribuir en el entendimiento del mecanismo involucrado en dicha modificación también permitiría apoyar programas de mejoramiento asistido por marcadores.

### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A MAÍZ

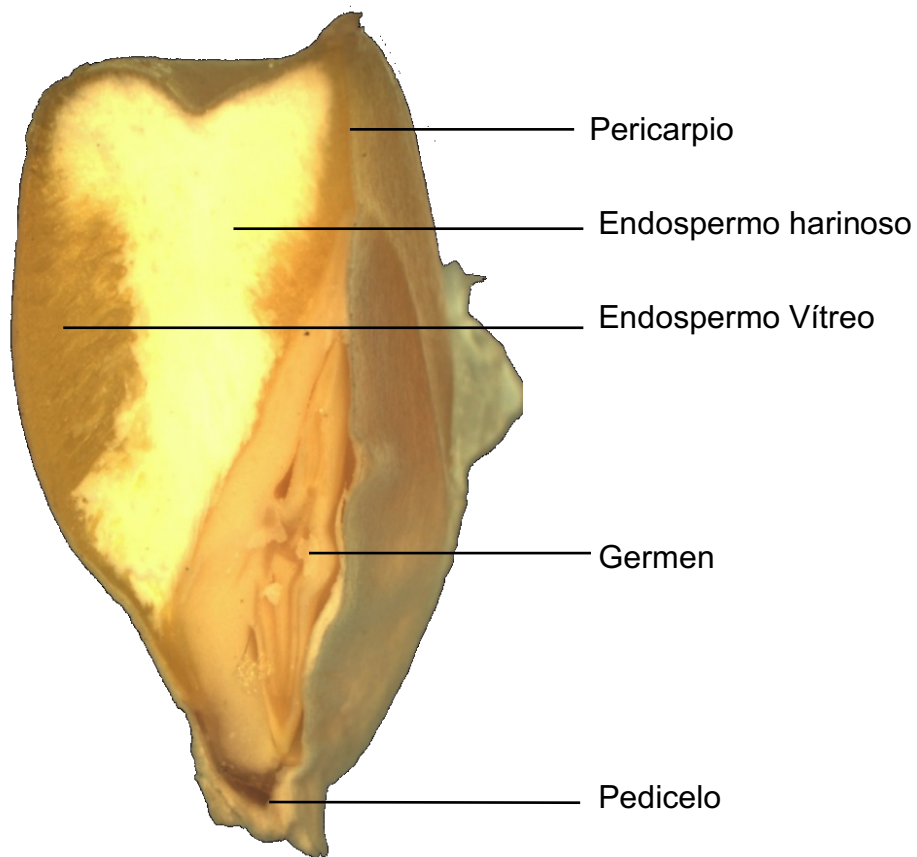
##### 1 Importancia económica y social

El maíz es el cereal de mayor importancia económica en el mundo ya que ocupa el primer lugar de producción con aproximadamente 1,060 millones de toneladas en el año 2017 (FAOSTAT, 2019). Estados Unidos de América es el principal país productor y aporta el 36.2 % del total, mientras que México ocupó el cuarto lugar aportando el 2.6 % de la producción (FAOSTAT, 2019). En cuanto a la producción nacional de maíz, Sinaloa se ha convertido en los últimos años en el principal estado productor, con una producción en el año 2017 de 3.68 millones de toneladas, contribuyendo con aproximadamente el 16 % de la producción nacional, seguido de Jalisco y Estado de México, con 15 y 8 %, respectivamente (SAGARPA, 2019). El maíz tiene 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, 2019), lo cual se debe a la incorporación de este cereal en la mayoría de los platillos de la alimentación habitual de sus habitantes.

##### 2 Estructura y composición química del grano

El grano de maíz tiene como principales partes anatómicas el pericarpio, endospermo, germen y pedicelo (**Fig 1**), las cuales varían en su composición química (Eckhoff y col., 2003). El pericarpio es una capa de células fibrosas que comprenden el 5% del peso del grano y que está cubierta por la cutícula, está a su vez es una capa impermeable cerosa que recubre al grano. El endospermo comprende aproximadamente el 83% del peso del grano, es el segundo tejido de reserva, teniendo un alto contenido de almidón (Eckhoff y col., 2003).





**Fig 1.** Corte longitudinal del grano de maíz.

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

El endospermo está compuesto de una región harinosa y una vítrea, cuya proporción normalmente es de 2:1; la capa exterior del endospermo o aleurona contiene proteínas, minerales, así como pigmentos que hacen que los granos presenten un color azul, negro o púrpura en ciertos genotipos. El germen representa el 11% del grano, siendo considerado el primer tejido de reserva puesto que almacena una gran cantidad de nutrientes utilizados durante la germinación y contiene la mayoría de los lípidos. El pedicelo es la continuación del pericarpio, y permite la unión del grano con el olote (Paredes-López y col., 2006).

El endospermo es la parte anatómica más grande del grano de maíz y se compone mayoritariamente por proteínas y carbohidratos (**Cuadro 1**). Las proteínas ocupan el 9.4% siendo las prolaminas ó zeínas las de mayor abundancia, pero la limitante en este tipo de proteínas es que son deficientes en los aminoácidos esenciales lisina y triptófano por lo que el grano de maíz es considerado nutricionalmente pobre. En el caso de los carbohidratos, el almidón ocupa el 86.4% y se acumula en forma de gránulos, sirviendo como reserva energética.

## **B ALMIDÓN**

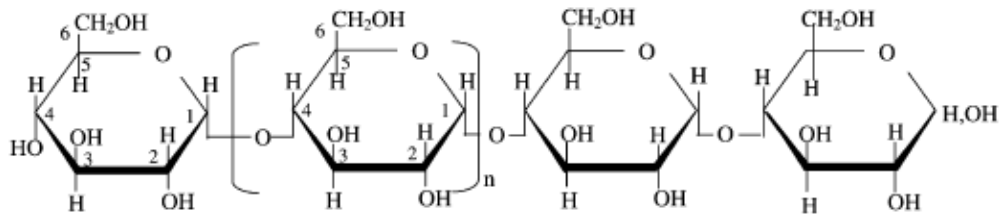
### **1 Estructura del granulo de almidón**

El almidón se deposita en forma de gránulos, particularmente cristalinos, cuya morfología, composición química y estructura molecular son características particulares de cada especie de planta (Pfister y Zeeman, 2016). El almidón debe gran parte de su funcionalidad a dos componentes principales de alto peso molecular, amilosa y amilopectina, así como a la organización física de estas macromoléculas en la estructura granular (James y col., 2003). Es un homopolisacárido de glucosa unidas mayormente por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 en el caso de amilosa y además ramificado con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 en el caso de amilopectina (**Fig 2**) (Zeeman y col., 2010).

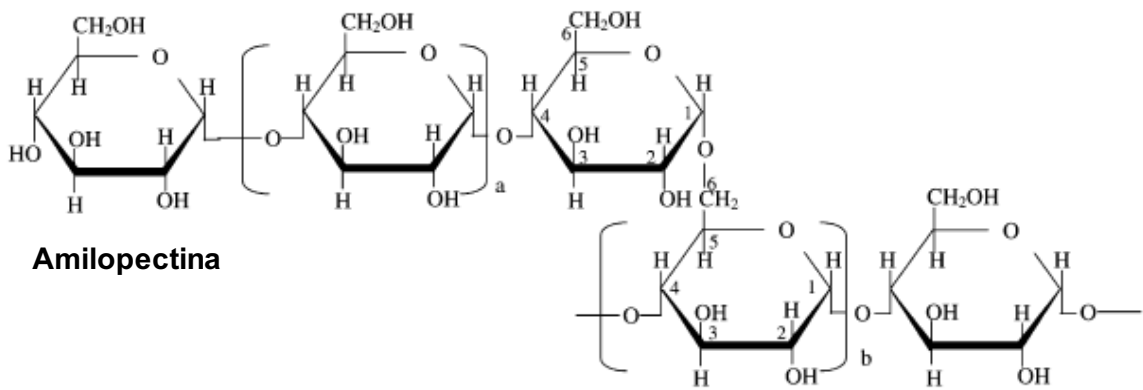
**Cuadro 1.** Composición química del grano de maíz en base seca (%).

| <b>Componente</b> | <b>Grano</b> | <b>Pericarpio</b> | <b>Endospermo</b> | <b>Germen</b> | <b>Pedicelo</b> |
|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|
| 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             |

Watson (1987)



**Amilosa**



**Amilopectina**

**Figura 2.** Estructura química de amilosa y amilopectina

Adaptada de Tester y col. (2004)

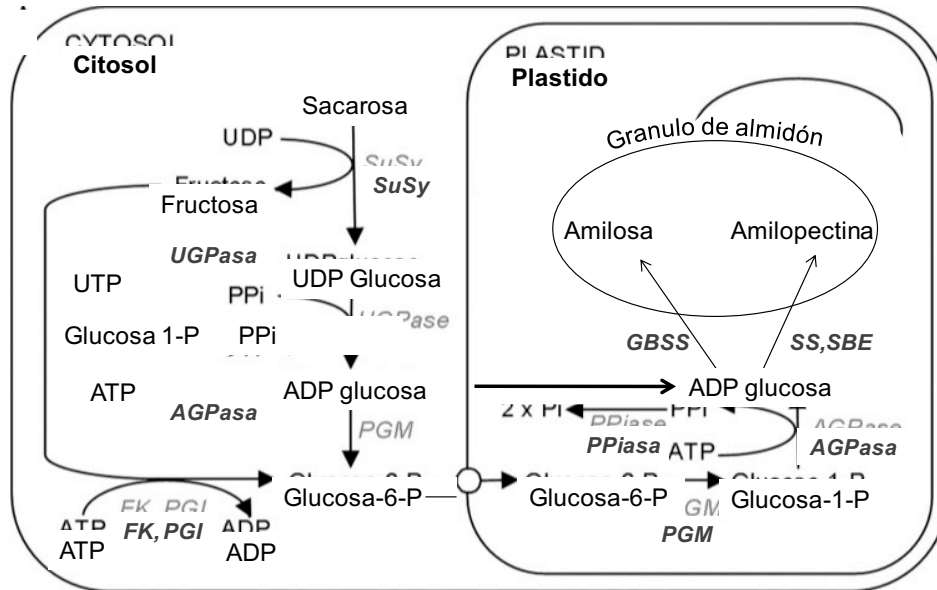
Los gránulos de almidón son estructuras semicristalinas, los cuales varían en tamaño y forma entre distintas fuentes botánicas, con diámetros que varían desde 1

hasta 200  $\mu\text{m}$  y con formas elípticas, esféricas o angulares (Huang y Rooney, 2001). La compleja estructura del gránulo de almidón puede ser descrita a distintos niveles de organización; el primer nivel está conformado por cadenas lineales de amilosa y amilopectina las cuales están unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4. Las cadenas individuales se unen mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 en los puntos de ramificación y así formar las moléculas de amilopectina dando como resultado el segundo nivel de organización. En el nivel tres, las ramificaciones de la amilopectina de doble hélice forman estructuras conocidas como laminillas cristalinas, mientras que la zona donde nacen las ramificaciones son conocidas como zonas amorfas; en conjunto las zonas cristalinas y amorfas constituyen el cuarto nivel de organización. El quinto nivel está constituido por un crecimiento alterno de zonas cristalinas y amorfas en el gránulo de almidón (Wang y col., 2014).

## **2 Biosíntesis de almidón**

El principal sitio de síntesis y almacenamiento del almidón en los cereales es el endospermo, donde los gránulos de almidón se encuentran localizados dentro de los amiloplastos (Tester y col., 2004). 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 Emes, 2014). 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 3).

Diferentes estudios han caracterizado mutantes en maíz que presentan alteraciones en la biosíntesis de almidón y el estudio de estas ha sido de gran utilidad para conocer las funciones de cada isoforma enzimática (Jeon y col., 2010). Los seis principales genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de almidón corresponden a *Shrunken 1 (Sh1)*, *Shrunken 2 (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 2.



**Figura 3.** 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; *UGPase*: UDP glucosa pirofosforilasa; *PGM*: Fosfoglucomutasa; *FK*: fructocinasa; *PGI*: fosfoglucosa isomerasa; *PPiase*, pirofosfatasa; *AGPase*, ADP-glucosa pirofosforilasa; *GBSS*: almidón sintasa unida al gránulo; *SS*: almidón sintasa; *SBE*: enzima ramificadora de almidón.

Adaptada de Comparot-Moss y Denyer (2009)

**Cuadro 2.** Principales genes de biosíntesis de almidón en endospermo de maíz y su localización en el mapa genético.

| <b>Nombre</b> | <b>Mutante</b> | <b>Descripción</b>                                | <b>Cromosoma<br/>(BIN)</b> |
|---------------|----------------|---|----------------------------|
| SuSyl         | <i>sh1</i>     | Sacarosa sintasa I                                | 9.01                       |
| AGPS1         | <i>bt2</i>     | ADP-glucosa pirofosforilasa,<br>subunidad pequeña | 4.05                       |
| AGPL1         | <i>sh2</i>     | ADP-glucosa pirofosforilasa,<br>subunidad grande  | 3.09                       |
| GBSSI         | <i>wx1</i>     | Almidón sintasa unida al gránulo I                | 9.03                       |
| SSI           |                | Almidón sintasa I                                 | 9.02                       |
| SSIIa         | <i>su2</i>     | Almidón sintasa IIa                               | 6.04                       |
| SSIIIa        | <i>du1</i>     | Almidón sintasa IIIa                              | 10.03                      |
| SBEIIb        | <i>ae1</i>     | Enzima ramificadora de almidón IIb                | 5.04                       |
| ISA1          | <i>su1</i>     | Enzima desramificadora tipo<br>isoamilasa         | 4.05                       |

MaizeGDB (2019)

### **3 Enzimas involucradas en la síntesis de amilosa y amilopectina**

#### **a ADP-glucosa fosforilasa (AGPasa)**

El catabolismo de la sacarosa en el citosol y mitocondria produce glucosa-6-fosfato y ATP, sustratos para la biosíntesis de almidón. Éstos son trasladados al interior del amiloplasto y convertidos en glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa. Posteriormente, la glucosa-1-fosfato se convierte en ADP-Glucosa (ADP-Glu) por la enzima ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa), considerándose éste el paso regulatorio que controla el flujo de carbono hacia la biosíntesis de almidón (Li y col., 2013).

La AGPasa es una enzima heterotetramérica compuesta por dos subunidades grandes y dos pequeñas con diferente masa molecular. Las diferencias en la composición de subunidades y consecuentemente las propiedades de AGPasa dentro y entre los órganos de las plantas refleja variabilidad en la regulación del flujo a través de la ruta de la síntesis de almidón (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 fosforo inorgánico (Jeon y col., 2010). Diversos estudios en mutantes de síntesis de almidón han demostrado que tanto las dos subunidades grandes como las dos pequeñas son necesarias para la actividad (Zhou y Cheng, 2005). La ADP-Glu es transportada a los amiloplastos mediante la proteína brittle-1 (bt1), la cual posee un sitio de unión similar al de la enzima almidón sintasa y actúa normalmente mediante intercambio con AMP (Shannon y col., 1998).

#### **b Enzimas 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  $\alpha$ -(1,4) para sintetizar los polímeros insolubles, amilosa y amilopectina. Se han identificado



una gran cantidad de isoformas de almidón sintasas 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 isoformas de almidón sintasas incluye a las almidón sintasas unidas al gránulo I y II (GBSSI y GBSSII). La enzima GBSSI es codificada por el gen *Waxy* en cereales, funcionando especialmente en la elongación de la amilosa y encontrándose esencialmente dentro de la matriz del gránulo, mientras que la GBSSII, 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 isoformas de almidón sintasas, designadas SSI, SSII, SSIII 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 formando cadenas de diferente longitud (Zeeman y col., 2010).

La mayor actividad de SS en el endospermo de maíz 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 B<sub>1</sub>; 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  $\alpha$ -(1,6) rompiendo los enlaces  $\alpha$ -(1,4) y transfiriendo la cadena al C<sub>6</sub> 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 cuanto a la 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.

### **d Enzimas desramificadoras de almidón (DBE)**

Las enzimas desramificadoras de almidón (DBE) catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(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 y la de tipo pululanasa actúa sobre pululanos y amilopectina, pero no fitoglucógeno (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., 2004)

## **4 Variación alélica en genes de síntesis de almidón**

Las mutaciones son las principales fuentes de variabilidad genética y pueden dar lugar a nuevos alelos (Hastings y col., 2009). Estas causan diversos tipos de cambios en las secuencias del ADN, los cuales pueden tener efectos neutros, positivos (alterando el producto génico) o negativos (impidiendo que funcione el gen). Las

mutaciones pueden implicar grandes secciones de ADN que pudieran ser duplicados o eliminados, pero también existe la posibilidad de que se lleven a cabo mutaciones puntuales que implican la inserción, delección o sustitución de un solo nucleótido y a su vez estas variaciones alélicas podrían tener un impacto en la actividad de los productos codificados, provocando cambios en las características fenotípicas de los individuos (Hastings y col., 2009). En el caso de las variantes alélicas en genes de síntesis de almidón, éstas podrían estar implicadas en las alteraciones de las propiedades fisicoquímicas que presenta este polímero.

Liu y col. (2011) examinaron la variante alélica de una mutante de maíz (*ae1.2*), la cual expresa una forma catalíticamente inactiva de SBEIIb debido a que carece de un péptido de 28 aminoácidos (Val272-Pro299) y no permite la unión a la amilopectina. Esta mutante fue comparada con la mutante *ae1.1* (carece de la enzima SBEIIb) previamente evaluada por Liu y col. (2009) y una de tipo silvestre. Las muestras *ae1.1* y *ae1.2* presentaron un mayor contenido de amilosa, así como una disminución en la entalpía de gelatinización y grado de ramificación del almidón con respecto al material silvestre; estas diferencias en propiedades fisicoquímicas de almidón se relacionaron a su vez con cambios en la morfología y diámetro de los gránulos de almidón, presentándose en *ae1.2* gránulos irregulares y de menor tamaño

Teng y col. (2012) reportaron la variación alélica del locus *Wx* en 16 líneas de arroz (*Oryza sativa* L.). Los autores identificaron una inserción / delección (InDel) y tres polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), al igual que una duplicación de 23 pb en el gen *Wx* de uno de los materiales. El contenido aparente de amilosa varió entre las líneas de arroz evaluadas y mostró una correlación positiva con la actividad enzimática de GBSS y con las variantes alelicas de *Wx*.

## **5 Propiedades fisicoquímicas del almidón**

Las múltiples interacciones que existen entre la amilosa y la amilopectina proveen al gránulo de almidón una alta organización y estabilidad, lo que ocasiona que

sea insoluble en agua fría; sin embargo, cuando se somete a altas temperaturas en exceso de agua (>70%) pierde su cristalinidad, debido principalmente al desarreglo molecular de sus dos constituyentes. Los cambios térmicos ocurridos durante esta transición de orden-desorden han sido registrados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés Differential scanning calorimetry), una técnica que cuantifica la cantidad de calor absorbido o liberado durante los cambios de estado físico o químico (Tester y Debon, 2000).

La DSC ha permitido inferir cambios estructurales relacionados con las condiciones de procesamiento como las utilizadas durante la gelatinización y retrogradación del almidón. La gelatinización (Figura 4) comienza con la absorción de agua en la región amorfa del gránulo donde los puentes de hidrógeno son más débiles y menos numerosos que en las regiones cristalinas. Después de la hidratación completa de la parte amorfa, la cristalina inicia un proceso similar pero requiere mayor energía (entalpía de gelatinización); cuando se alcanza la temperatura de gelatinización (65-75°C) el gránulo ya no puede retener agua, se rompe parcialmente alterando su estructura debido a la solubilización de la amilosa y amilopectina. La amilopectina queda dentro del gránulo y pierde su orden, mientras que la amilosa se difunde hacia el agua y produce un gel (Biliaderis, 1991).

La temperatura y entalpía de gelatinización se han relacionado con las características del gránulo de almidón, como el grado de cristalinidad (Krieger y col., 1998). Se ha reportado que una alta temperatura de transición indica un alto grado de cristalinidad, el cual provee estabilidad estructural y hace más resistente al gránulo a la gelatinización (Barichello y col., 1990). 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 y Karkalas, 1997).

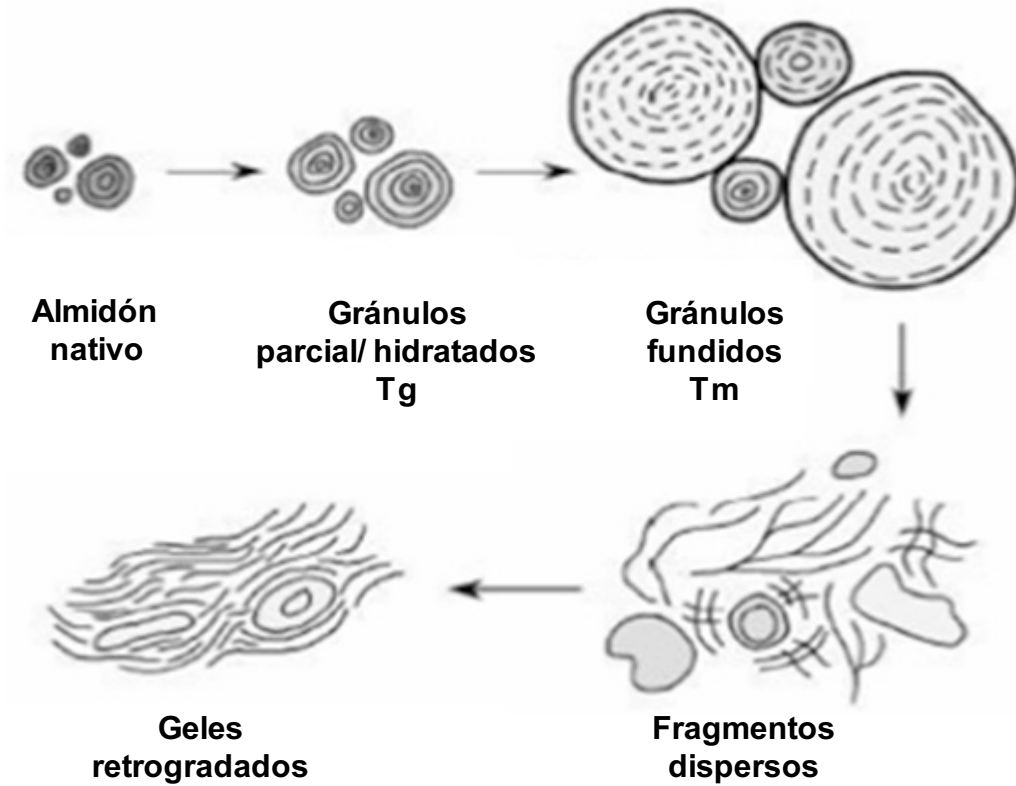
Las interacciones moleculares (puentes de hidrógeno entre las cadenas de almidón) durante el enfriamiento del almidón posterior a la gelatinización ha sido denominada retrogradación (Figura 4) (Hoover 2001). El material amorfo, obtenido

después de la gelatinización no se encuentra en un estado de equilibrio, presentándose entonces una tendencia a un proceso de re-asociación y re-cristalización de las cadenas del polisacárido (Eliasson, 2017).

La retrogradación de la amilopectina sucede en un periodo de tiempo mayor que el de la amilosa (Miles y col., 1985; Van Soest y col., 1994) quizá por la magnitud de su estructura. Durante este proceso, las fracciones de amilosa o las secciones lineales de amilopectina forman una zona con organización cristalina muy rígida. En la amilosa, se lleva a cabo un ordenamiento conformacional de sus cadenas, constituidas de 40 a 70 unidades de glucosa como mínimo, las cuales se orientan paralelamente e interaccionan entre sí por puentes de hidrógeno para formar dobles hélices (Jane y Robyt, 1984).

La cristalización de la amilopectina requiere de menos unidades de glucosa para la formación de las hélices en comparación con la amilosa. Una vez que las hélices se forman, se mantienen unidas a la cadena principal a través de los enlaces  $\alpha$ -(1,6), promoviendo una agregación que da lugar a la formación de los cristales. La retrogradación es un proceso complejo y depende de muchos factores, como el tipo y concentración de almidón, regímenes de calentamiento-enfriamiento, pH y la presencia de solutos como lípidos, sales y azúcares (Singh y col., 2003).

En el caso de la retrogradación del almidón, el valor de la entalpía provee una medida cuantitativa de la transformación de la energía que ocurre durante la fusión de la amilopectina recristalizada como medida precisa de la temperatura de transición del evento endotérmico (Karim y col., 2000). Las entalpías de retrogradación son usualmente 60-80% más pequeñas que las entalpías de gelatinización (Baker y Rayas-Duarte, 1998). Los almidones retrogradados muestran menores temperaturas y entalpías de transición que el almidón nativo debido a la formación de una estructura cristalina débil (Singh y col., 2003).



**Figura 4.** Cambios en el almidón durante el calentamiento en exceso de agua. Tg: Temperatura de gelatinización; Tm: Temperatura de fusión. Adaptada de Huang y Rooney (2001).

## C MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA

Las deficiencias que presenta el grano de maíz en los aminoácidos lisina y triptófano y la importancia que posee como base en la alimentación humana han motivado el desarrollo de diversas investigaciones para mejorar su calidad proteínica. 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%), pero a pesar de esta mejora en la calidad proteínica el uso potencial del maíz *o2* ha sido limitado debido a las características agronómicas indeseables asociadas a su endospermo suave, lo que lo hace más susceptible al daño mecánico y al ataque de enfermedades e insectos, además de presentar bajos rendimientos (Glover y Mertz, 1987).

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 (QPM), las cuales combinan la alta calidad nutricional de *o2* con un endospermo vítreo y rendimiento normal (Zarkadas y col., 2000).

A pesar de la superioridad nutricional y el rendimiento agronómico de QPM, el cultivo y adopción de estos materiales a mayor escala no se ha alcanzado. Los programas de desarrollo de estos materiales iniciaron con el desarrollo de híbridos comerciales con el fin asegurar características agronómicas y calidad proteínica. En este sentido se han desarrollado diferentes híbridos de QPM, en los cuales se han utilizado principalmente materiales de CIMMYT en México para el desarrollo de los mismos en diferentes regiones del mundo, principalmente países en los cuales el maíz tiene gran impacto en la alimentación directa o indirectamente (Cuadro 3). Uno de los materiales que ha sido muy utilizado como donador QPM es CML176, el cual fue desarrollado por CIMMYT a partir de la población 63 (Tuxpeño 1 QPM x (La Posta QPM x Pool 24 QPM)) y la población 67 (Pool 31 QPM) (Sierra Macías y col., 2005).

**Cuadro 3.** Híbridos QPM liberados desde 1996.

| <b>Nombre</b> | <b>Pedigree</b>           | <b>País</b> |
|---------------|---------------------------|-------------|
| HQ INTA-993   | (CML144 x CML159) CML176  | Nicaragua   |
| HB PROTICTA   | (CML144 x CML159) CML176  | Guatemala   |
| HQ-61         | (CML144 x CML159) CML176  | El Salvador |
| HQ-31         | (CML144 x CML159) CML176  | Honduras    |
| Zhongdan 9409 | Pool 33 x Temp QPM        | China       |
| Zhongdan 3850 | Pool 33 x Temp QPM        | China       |
| QUIAN 2609    | (Tai19 x Tai02) CML171    | China       |
| Shaktiman-1   | (CML142 x CML150) CML176  | India       |
| Shaktiman-2   | CML176 x CML186           | India       |
| QS7705        | CML176 x CML186           | Sudáfrica   |
| BHQP542       | (CML144 x CML159) CML176  | Etiopia     |
| INIA          | CML161 x CML165           | Perú        |
| FONAIAP       | (CML144 x CML159) CML176  | Venezuela   |
| H441C         | CML186 x CML142           | México      |
| H367C         | CML142 x CML150           | México      |
| H553C         | (CML42 x CML150)CML176    | México      |
| H519C         | (CML144 x CML159)CML176   | México      |
| H368C         | CML186 x CML149           | México      |
| H469          | CML176 x CML186           | México      |
| KH631Q        | (CML144 x CML159)CML182   | Kenia       |
| LisheH1       | (CML4 x CML159)CML176     | Tanzania    |
| LisheH2       | Obatampa(CML144 x CML176) | Tanzania    |

Sofi y col. (2009)

Okello y col. (2006) evaluaron el desempeño de diferentes líneas CIMMYT donadoras de QPM, encontrando que las líneas CML176 y CML173 presentaron mejor



desempeño agronómico y mejor calidad proteínica, así como mayor resistencia a enfermedades como el virus del rayado fino de maíz y el tizón foliar de maíz.

La generación de maíz QPM podría tener un impacto relevante en la nutrición humana. De acuerdo con datos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), durante el periodo de 2014 al 2016 un total de 792.5 millones de personas padecían desnutrición, de las cuales 398 son infantes (FAOSTAT, 2019). El 98% de estas personas son de países en desarrollo, por lo que el maíz QPM podría tener un impacto relevante en su nutrición; para las comunidades campesinas, así como los núcleos de población de escasos ingresos en las ciudades, el consumo de este maíz representa una buena opción.

Sin embargo, se requieren esfuerzos adicionales para lograr que el maíz QPM cubra las recomendaciones de lisina (5 mg/100 mg de proteína) para la nutrición humana (Young, 1998). Además, el desarrollo de los materiales *o2* modificados ha sido lento debido al poco conocimiento sobre las bases genéticas y bioquímicas relacionadas con la modificación del endospermo en QPM (Gibbon y Larkins, 2005).

## **1 Mecanismo relacionado al incremento de $\gamma$ -zeínas**

El mecanismo por el cual se da la conversión del fenotipo opaco a vítreo en QPM no está completamente entendido, pero la proteína  $\gamma$ -zeína parece iniciar y facilitar la formación de cuerpos proteínicos (Lending y Larkins, 1989) ya que endospermos con mayor contenido de esta proteína contienen un mayor número de estas estructuras (Dannenhoffer y col., 1995). El contenido de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa en el maíz QPM es de 2 a 4 veces mayor que el observado en genotipos normales o la mutante *o2*, mientras que la acumulación de  $\alpha$ -zeínas no parece variar entre QPM y *o2* (Wallace y col., 1990). Lopes y col. (1995) reportaron por primera vez a nivel genético una asociación entre la dureza del grano y el contenido de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa en líneas de maíz QPM.

Debido a que las  $\gamma$ -zeínas están altamente ligadas con puentes disulfuro durante la desecación del grano (Lopes y Larkins, 1991), se ha hipotetizado que los enlaces covalentes de las  $\gamma$ -zeínas y otras proteínas ricas en cisteína promueven la

formación de una red proteínica alrededor de los gránulos de almidón. 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*.

Un estudio realizado por Wu y col. (2010) demostró el papel esencial que juegan las proteínas  $\gamma$ -zeínas en la formación del fenotipo vítreo. Los autores bloquearon la expresión de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa en la línea de maíz CM105*mo2* (QPM) mediante RNA de interferencia (RNAi), observando la reversión del fenotipo vítreo de QPM a *opaco*.

Yuan y col. (2014) utilizaron mutagenesis por radiación- $\gamma$  para identificar genes relacionados con la modificación de la mutante *o2*, encontrando que la línea K0326Y en comparación con W64A+ mostró una disminución generalizada de las  $\alpha$ -zeínas y un incremento de las  $\gamma$ -zeínas, principalmente la de 27 kDa y 50 kDa, sugiriendo que las  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa juegan un papel importante en la formación de cuerpos proteínicos y que la  $\gamma$ -zeína de 50 kDa a pesar de estar en menor proporción pudiera estar también implicada en la modificación del endospermo.

Liu y col. (2016) realizaron un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en 492 líneas puras de maíz, además de un análisis de mapeo de ligamiento en una población de líneas dobles haploides QPM, lo que permitió identificar al locus *qy27* fuertemente ligado a la región modificadora *opaco 1* en el cromosoma 7, el cual está cercano al locus de gamma zeínas de 27 kDa. El locus identificado presenta una duplicación de genes de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa, lo que favorece una elevada transcripción y síntesis de la proteína en maíz QPM. Debido a lo anterior, se sugiere al locus *qy27* como un marcador de interés en programas de mejoramiento de maíz.

## **2 Mecanismo relacionado con la modificación de la estructura del almidón**

Gibbon y col. (2003) encontraron diferencias en la acumulación de la enzima GBSS responsable de la síntesis de amilosa en las líneas isogénicas CM105+, CM105*o2* y CM105*mo2*. El análisis de la estructura del almidón en CM105*mo2* reveló

la presencia de ramificaciones más cortas en la amilopectina con respecto al almidón normal y  $\alpha$ 2. Como consecuencia de estas diferencias, el almidón del maíz QPM presenta más expansión y los gránulos en el endospermo presentan una mayor compactación. Un modelo derivado del estudio anterior sugiere que moléculas de amilopectina amorfa presentes en la superficie de los gránulos de almidón del endospermo del maíz QPM pueden interactuar 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  $\gamma$ -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 del grano de maíz posee una mezcla compleja de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón, por lo que la estructura física del mismo depende del tipo de interacciones que se dan entre estos componentes. Normalmente, las proteínas de almacenamiento son las responsables de la asociación entre los gránulos de almidón y la matriz proteínica del endospermo lo que puede influenciar la vitrosidad del grano (Chandrashekar y Mazhar, 1999).

En los granos vítreos el empaquetamiento es más organizado y los espacios intergranulares son perfectamente llenados (Gibbon y col., 2003; Gibbon y Larkins, 2005). 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 favorecen una mayor asociación y organización de los gránulos de almidón. 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  $\gamma$ -zeína de 27 kDa, presencia de cuerpos proteínicos y una perfecta organización de los gránulos de almidón en el endospermo, independientemente de su tamaño.

Salazar-Salas y col. (2014) evaluaron el efecto de loci genéticos asociados con la modificación del endospermo QPM sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón y acumulación de proteínas en el endospermo maduro de dos grupos de RIL

contrastantes en vitrosidad derivadas de la cruce entre K0326Y QPM y W64Ao2. Los autores observaron que en general las líneas vítreas presentaban mayores contenidos de la proteína  $\gamma$ -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. Estos resultados sugieren 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  $\gamma$ -zeína de 27-kDa podría estar facilitando la formación de más cuerpos proteínicos, lo cual aunado a modificaciones en la composición y estructura de los gránulos facilitan una mayor compactación y el fenotipo vítreo del grano.

#### **D ANÁLISIS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON LA MODIFICACIÓN DEL ENDOSPERMO EN MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA**

Estudios previos acerca de la modificación del endospermo en QPM han contribuido al entendimiento de esta característica. Sin embargo, se necesita mayor información acerca de los genes específicos, así como su localización en cromosomas y los mecanismos de acción involucrados en este fenotipo.

Holding y col. (2008) analizaron la progenie F2 de una cruce entre K0326Y-QPM y W64Ao2 (o2) e identificaron 7 *loci* asociados a genes modificadores (*mo2*), los cuales explicaron el 75% de la variación fenotípica en vitrosidad, dureza y densidad; tres de estos *loci* fueron localizados en los cromosomas 7 y 9 y presentaron el mayor efecto en la dureza del endospermo (~46% de la variación). A partir de esta progenie, Holding y col. (2011) desarrollaron una población de 314 líneas recombinantes puras (RIL, del inglés recombinant inbred line), las cuales fueron caracterizadas para tres propiedades relacionadas con la dureza del endospermo: vitrosidad, densidad y dureza. El mapeo genético con estas líneas confirmó los loci genéticos previamente asociados con la

modificación del endospermo en K0326Y-QPM; adicionalmente se reportó un incremento en la expresión de algunos genes en líneas vítreas en comparación con la progenie opaca, alguno de ellos asociados con la regulación de respuesta a etileno y un gen que codifica para la subunidad PFP, una fosfotransferasa que participa en rutas glucolíticas.

Guo y col. (2012) reportaron un incremento en los niveles de transcripción y acumulación de proteínas de la subunidad regulatoria  $\alpha$  de fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa (PFP)(PFP $\alpha$ ) en el endospermo QPM, los cuales a su vez se asociaron con un incremento en actividad enzimática en relación con los del material silvestre y o2. Álvarez Hernández (2014) utilizó las RIL previamente evaluadas por Holding y col. (2011) para identificar loci genéticos asociados con el contenido de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa y propiedades fisicoquímicas del almidón (Cuadro 4). Uno de los loci corresponde a genes que codifican para  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa y los niveles de esta proteína mostraron una correlación positiva con la vitrosidad del grano en polisacárido en las líneas también presentó una correlación positiva con la vitrosidad del grano, lo cual corresponde con lo reportado previamente por Holding y col. (2011). Algunos de los loci identificados para el contenido de amilosa y propiedades fisicoquímicas de almidón de los cromosomas 5 y 9 resultan interesantes por su cercanía con genes para las enzimas ramificadora de almidón II (SBEIIb) y almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI); ambas enzimas están involucradas en la biosíntesis de almidón, lo cual a su vez impacta sobre las propiedades fisicoquímicas del gránulo.

**Cuadro 4.** Descripción de loci asociados con  $\gamma$ -zeína 27 kDa y propiedades fisicoquímicas del almidón en 100 RIL de maíz derivadas de la cruce de K0326Y-QPM y W64Ao2

| <b>Cromosoma</b>                         | <b>Ubicación</b> | <b>LRS</b> | <b>LRS<br/>Límite<br/>(<math>\alpha=0.05</math>)</b> | <b>Varianza<br/>(%)</b> | <b>Efecto<br/>aditivo</b> |
|--|------------------|------------|--|-------------------------|---------------------------|
| <b><math>\gamma</math>-Zeínas 27 kDa</b> |                  |            |  |                         |                           |

|                                   |                    |      |     |    |   |
|-----------------------------------|--------------------|------|-----|----|---|
| 1.06                              | Umc1076-Umc1335    | 12.3 | 9.1 | 12 | - |
| 7.02                              | Umc1036- Gzein     | 74.9 | 9.1 | 53 | - |
| 9.03                              | Wx1-BnlG127        | 21.9 | 8.5 | 20 | - |
| 9.04                              | Umc1771-Umc1231    | 25.4 | 8.5 | 22 | - |
| <b>Amilosa</b>                    |                    |      |     |    |   |
| 1.06                              | Umc1335-Umc1278    | 12.9 | 9.0 | 10 | - |
| 3.06                              | Umc1167- BnlG197   | 22.9 | 8.4 | 19 | - |
| 5.04                              | BnlG2323-Mmc0081   | 14.1 | 8.6 | 13 | - |
| 7.02                              | Umc1036 – Gzein    | 18.2 | 8.6 | 16 | - |
| 9.02                              | BnlG244-BnlG1401   | 9.2  | 8.7 | 9  | - |
| <b>Grado de Hinchamiento</b>      |                    |      |     |    |   |
| 2.08                              | Dupssr25- Umc1516  | 19.0 | 9.0 | 18 | + |
| 4.01                              | Cyp3 - Umc2150     | 20.9 | 9.1 | 16 | + |
| 7.02                              | Gzein - BnlG1022   | 35.3 | 8.4 | 30 | + |
| 9.04                              | Umc1771-Umc1078    | 20.5 | 8.7 | 18 | + |
| <b>Entalpía de Gelatinización</b> |                    |      |     |    |   |
| 1.03                              | BnlG176-BnlG439    | 19.4 | 9.4 | 11 | + |
| 2.08                              | Umc1516- Umc1551   | 16.0 | 8.8 | 14 | + |
| 5.04                              | Incw1- Umc1153     | 18.3 | 8.6 | 16 | + |
| 7.02                              | Gzein-BnlG1022     | 12.3 | 8.8 | 11 | + |
| 8.06                              | BnlG1031- BnlG1065 | 17.3 | 7.8 | 14 | + |
| 9.03                              | Wx1 - BnlG127      | 20.1 | 8.7 | 19 | + |

LRS: cociente de máxima verosimilitud, obtenido a partir de mapeo por intervalos compuesto. Valores significativos ( $\alpha=0.05$ ).

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 W64Ao2. De manera similar, encontraron una mayor actividad de pululanasa en la línea parental vítrea K032Y6-QPM que en la opaca W64Ao2. 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.

La modificación del endospermo en QPM depende grandemente del genotipo utilizado como donador QPM. Grimaldi-Olivas (2017) evaluó una población de 76 RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2, identificando 12 loci que explicaron en promedio más del 25% de la variación en el contenido de  $\gamma$ -zeínas 27 kDa, amilosa y amilopectina (Cuadro 5). El loci en el cromosoma 7 se ubicó cerca de un locus para  $\gamma$ -zeína de 27 kDa, mientras que loci ubicados en los cromosomas 3, 5 y 9 se encontraron cercanos a genes que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de almidón, lo que confirma lo observado previamente para la población derivada de K0326Y-QPM y W64Ao2.

El análisis transcripcional de genes de síntesis de almidón (*Wx1*, *Ae1*, *Bt2*, *Sh2*, *Su1* y *Zpu1*) en endospermo en desarrollo (20 DPP) de las líneas de maíz K0326Y-QPM, W64Ao2 y una selección de RIL derivadas de su cruce, reveló 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 (Soto Lopez, 2015).

**Cuadro 5.** Localización y efecto de loci asociados con la composición de zeínas y almidón en RIL de maíz derivadas de la cruce de CML176-QPM y W64Ao2.

| Cromosoma                               | Ubicación | LRS | LRS<br>Límite<br>( $\alpha=0.05$ ) | Varianza<br>(%) | Efecto<br>aditivo |
|---|-----------|-----|------------------------------------|-----------------|-------------------|
| <b><math>\gamma</math>-zeína 27 kDa</b> |           |     |                                    |                 |                   |

|                     |                   |      |     |    |   |
|---------------------|-------------------|------|-----|----|---|
| 1                   | Phi001-Umc1335    | 12.9 | 8.0 | 22 | - |
| 2                   | Bnlg1633-Bnlg1329 | 13.3 | 8.4 | 21 | - |
| 6                   | Bnlg2249-Phi078   | 16.3 | 5.8 | 25 | - |
| 7                   | Phi034-Gzein      | 18.3 | 7.8 | 29 | - |
| <b>Amilosa</b>      |                   |      |     |    |   |
| 1                   | Umc1335-Phi037    | 12.4 | 8.1 | 40 | - |
| 5                   | Bnlg2323-Dupssr10 | 15.6 | 7.9 | 29 | - |
| 7                   | Bnlg2132-Gzein    | 8.0  | 7.6 | 9  | - |
| 9                   | Phi022-Bnlg127    | 9.5  | 8.8 | 16 | + |
| <b>Amilopectina</b> |                   |      |     |    |   |
| 1                   | Umc1335-Phi037    | 12.4 | 8.1 | 40 | + |
| 5                   | Bnlg2323-Dupssr10 | 15.6 | 7.9 | 29 | + |
| 7                   | Bnlg2132-Gzein    | 8.0  | 7.6 | 9  | + |
| 9                   | Phi022-Bnlg127    | 9.5  | 8.8 | 16 | - |

LRS: cociente de máxima verosimilitud, obtenido a partir de mapeo por intervalos compuesto. Valores significativos ( $\alpha=0.05$ )

Los resultados observados en los estudios anteriores apoyan la idea de que la modificación del endospermo en maíz QPM está asociada con cambios en la expresión de genes y acumulación de enzimas de síntesis de almidón, resultando en alteraciones en la composición y estructura de los gránulos que favorecen la formación del endospermo vítreo. Sin embargo, los mecanismos relacionados con esta modificación



podrían variar dependiendo del genotipo QPM utilizado como donador del fenotipo vítreo. En este sentido, se requiere caracterizar las variantes alélicas de genes de síntesis de almidón en diferentes líneas de maíz como K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2, que permita asociar esas variantes con propiedades fisicoquímicas del grano.

#### **IV JUSTIFICACIÓN**

Estudios recientes acerca de la modificación del endospermo en el maíz QPM han proporcionado información valiosa para entender de mejor manera los mecanismos involucrados en este fenotipo. Análisis genéticos de poblaciones de líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de las cruzas K0326Y-QPM x W64Ao2 y

CML176-QPM x W64Ao2 identificaron varios *loci* asociados a características fisicoquímicas del grano ubicados cerca de genes de síntesis de almidón. Sin embargo, es necesario caracterizar las variantes alélicas de estos genes y asociarlas con propiedades fisicoquímicas del grano, lo cual además de contribuir al entendimiento del mecanismo por el cual se lleva a cabo la modificación del endospermo de maíz QPM, facilitará el diseño de estrategias que apoyen a programas de mejoramiento genético mediante el uso de marcadores moleculares desarrollando materiales con mejores características agronómicas y nutrimentales.

## **V HIPÓTESIS**

La variación alélica en genes de síntesis de almidón de las líneas de maíz K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 está asociada con la modificación del endospermo en líneas QPM derivadas de su cruce.

## **VI OBJETIVOS**

### **A OBJETIVO GENERAL**

Determinar la variación molecular de genes de síntesis de almidón y su asociación con características relacionadas con la modificación del endospermo en dos poblaciones de maíz de alta calidad proteínica.

## **B OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la secuencia de genes de síntesis de almidón (*Ae1* y *Wx1*) en líneas de maíz contrastantes en vitrosidad (K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2).
2. Evaluar los polimorfismos de los genes *Ae1* y *Wx1* encontrados entre las líneas K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 (marcadores alelo específico) en dos poblaciones de líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de las cruzas K0326Y-QPM x W64Ao2 y CML176-QPM x W64Ao2.
3. Determinar el contenido de amilosa y grado de hinchamiento en una población de RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2.
4. Establecer asociaciones entre los polimorfismos de genes de síntesis de almidón y características relacionadas con la modificación del endospermo en las líneas de maíz estudiadas.

## **VII MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A MATERIALES**

Se utilizaron las líneas de maíz de calidad proteínica K0326Y-QPM y CML176-QPM (endospermo vítreo) y la línea de maíz opaco W64Ao2 (endospermo blando), así como dos poblaciones de líneas recombinantes puras (RIL) contrastantes en

vitrosidad, derivadas de la cruce entre K0326Y-QPM x W64Ao2 y CML176-QPM x W64Ao2. Para la extracción de RNA se utilizaron granos en desarrollo cosechados 30 días después de la polinización (30 DDP).

## **B MÉTODOS**

### **1 Extracción de RNA**

El RNA de endospermo en desarrollo se extrajo de acuerdo con la metodología de Leiva y col (2002) con algunas modificaciones. Se mezclaron 100 mg de endospermo en desarrollo con 200  $\mu$ L de amortiguador de extracción [Tris-HCl 50 mM (pH 8), LiCl 150 mM, EDTA 5 mM (pH 8), SDS 1 % (v/v)] y la mezcla se homogenizó inmediatamente con la ayuda de un pistilo (potem), seguido de la adición de 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo (1:1), donde el fenol fue previamente equilibrado con Tris-HCl (pH 8). Tras una agitación, la muestra se colocó en hielo durante 5 min mezclando ocasionalmente. Posteriormente la solución se transfirió a tubos de bloqueo de fase para una posterior centrifugación a 10,000 g por 10 min a 4°C. Se añadieron 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo y se agitó, la muestra se centrifugó (10,000 g, 10 min, 4°C), se le agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó, se colocó en hielo durante 5 min mezclando ocasionalmente y se centrifugó de nuevo bajo las condiciones antes mencionadas. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 1 mL de trizol, se agitó por 15 s y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó, se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó (10,000 g, 10 min, 4 °C). La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol, se agitó y se incubó durante 10 min en hielo, seguido de de centrifugación a 10,000 g por 10 min a 4 °C. Una vez que las fases se separaron se pudo visualizar el precipitado de RNA. El sobrenadante se retiró del tubo, se agregó 1 mL de etanol 70% (v/v) y se centrifugó (10,000 g, 10 min, 4 °C). Se retiró de nuevo la fase acuosa, se secó la pastilla de RNA y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC), inhibidor irreversible de ribonucleasas.

### **2 Tratamiento con DNAsa**

El DNA contaminante se eliminó del RNA utilizando el kit DNase I (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). A 1-2  $\mu\text{g}$  de RNA se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción 10X, 1  $\mu\text{L}$  de DNAsa I (1 U/ $\mu\text{L}$ ) y 6  $\mu\text{L}$  de agua DEPC. La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de la solución Stop y se incubó 15 min a 65 °C. Finalmente se colocó en hielo para posteriormente llevar a cabo la síntesis de cDNA.

### **3 Síntesis de cDNA**

El cDNA se sintetizó utilizando el kit Go Script™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Se tomaron 8  $\mu\text{L}$  del RNA tratado con DNAsa I (1 U/ $\mu\text{L}$ ) y se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de primer oligo (dT)15 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la mezcla se incubó 5 min a 70 °C e inmediatamente después se colocó en hielo durante 5 min; posteriormente se centrifugó 10 s y se colocó en hielo.

En otro tubo se preparó la mezcla de reacción de transcripción reversa, la cual consistió de 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción 5X, 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de mezcla de nucleótidos (dNTPs) (10 mM), 2  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasas (20 U/ $\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima transcriptasa reversa (RT) (200 U/ $\mu\text{L}$ ). Ambas mezclas fueron combinadas para tener un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 5 min (etapa de alineamiento), posteriormente se llevó a cabo otra incubación a 42 °C por 50 min (etapa de extensión) y finalmente se inactivó la enzima transcriptasa reversa por calentamiento a 70 °C por 15 min; la mezcla de cDNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

### **4 Diseño de oligos iniciadores y amplificación de cDNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se obtuvieron secuencias completas de cDNA para genes de síntesis de almidón de la línea de maíz B73 en la base de datos del genoma del maíz <http://www.maizegdb.org/>. A partir de estas secuencias se diseñaron oligos iniciadores para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las secuencias

de los genes de síntesis de almidón en las líneas K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 (Cuadro 6), para lo cual se utilizó el programa Primer-BLAST disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. La amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA de cada uno de los genes se realizó como se describe por Pineda-Hidalgo y col. (2011). La mezcla consistió de 1  $\mu$ L de cDNA (50 ng/ $\mu$ L), 1.5  $\mu$ L de amortiguador de reacción de PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0.6  $\mu$ L de dNTPs 100  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 Mm, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa, 0.25  $\mu$ L de oligonucleótidos iniciadores 25  $\mu$ M y agua desionizada estéril para un volumen final de 15  $\mu$ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, CA, USA), programado con un período inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturalización), 1 min a X°C (unión de iniciadores) (Cuadro 6) y 1 min a 72°C (extensión), con un período final de extensión a 72°C por 5 min (Pineda-Hidalgo y col., 2011). La separación de los fragmentos amplificados se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (p/v) con amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM). El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.01  $\mu$ g/mL) y los productos se digitalizaron bajo luz ultravioleta con un fotodocumentador Chemidoc XRS (BIO-RAD, CA, USA).

**Cuadro 6.** Oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación de genes de síntesis de almidón

| Genes      | Nombre | Secuencia de los iniciadores<br>(5' - 3') | Ta<br>(°C) | MgCl <sub>2</sub><br>(mM) |
|------------|--------|---|------------|---------------------------|
| <i>ae1</i> | AE-F1  | GTAGCCCTGCAGTCA                           | 52         | 3                         |

|            |            |                           |    |     |
|------------|------------|---------------------------|----|-----|
|            | AE-R644    | CCCATTCTCGATATGTGATAC     |    |     |
|            | AE-F571    | GGAAGCCTTCTCCCGTAGTTA     | 58 | 3   |
|            | AE-R1106:  | ATGAGTGCTCTTGGATTGCCA     |    |     |
|            | Ae1-981F   | AGCCCGGAACCGAAGATAAA      | 58 | 1.5 |
|            | Ae1-1649R  | ACCTACCCACCATCGTGAA       |    |     |
|            | Ae1-1627F  | CTGTTACGATGGTGGGGTA       | 58 | 1.5 |
|            | Ae1-2403R  | TATCATGCGAACAGTCGGCG      |    |     |
|            | Ae1-2024F  | CCAAGAGGTCCGCAAAGACT      | 58 | 1.5 |
|            | Ae1-2743R  | CAAACAATCAGCCATCAAGCA     |    |     |
| <i>wx1</i> | Wx-236F    | CCAGTGAAGGGGGAGAAGTG      | 42 | 2.5 |
|            | Wx-712R    | ACGAAGAAGACGCGATCCAA      |    |     |
|            | Wx-F1-211  | AGGAAGGAATAAACTCAC        | 58 | 1.5 |
|            | Wx-R7-1203 | CCTGTAGATGCCGTGGGACT      |    |     |
|            | Wx1-2507-F | ACCTCAAGAGCAACTACCAGTC    | 58 | 1.5 |
|            | Wx2207R    | CAGCACGTTCTCCCAGTTCT      | 58 | 1.5 |
|            | Wx1816F    | AGAAGTCCCAGGCAAGGTG       | 58 | 1.5 |
|            | Wx2640R    | ACACTTGAAAAACGTAGGATTCAGA | 58 | 1.5 |

F: Forward (5'-3'); R: Reverse (3'-5'); Ta: Temperatura de alineamiento.

*ae1: amylose extender 1; wx1: Waxy*

## 5 Secuenciación de genes de síntesis de almidón

Las secuencias de los genes de síntesis de almidón se obtuvieron a partir de los fragmentos amplificados por PCR usando oligos iniciadores diseñados a partir de las secuencias de la línea B73. Previo a la secuenciación, los fragmentos se purificaron



con el kit UltraClean 15 DNA Purification (MO BIO, California, USA). Se utilizó un gel de agarosa al 2% (p/v) donde se cargó el 50% del producto obtenido por PCR. A continuación, se cortó la banda visualizada en el gel y se colocó en un tubo de 1.5 mL. Se determinó el peso de las bandas de agarosa y se le agregó 0.3 mL/ 0.1 g de agarosa de una solución caotrópica (Nal), seguido de una incubación por 5 min a 55°C. Posteriormente se le agregaron 12 µL de una solución 50:50 de silica y buffer, el tubo se agitó por 5 min y después se centrifugó por 5 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 1mL de etanol al 50% para eliminar cualquier residuo de agarosa presente y mantener el ADN ligado a la silica. La pastilla obtenida se resuspendió en 25 µL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó por 1 min a 10,000 g, recuperando el sobrenadante y almacenándolo a -20 °C. La secuencia de los fragmentos purificados se obtuvo mediante el método de terminación de cadena (Sanger y col., 1977) en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

## **6 Diseño de oligos alelo específicos para K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2**

A partir de las secuencias obtenidas para los genes de síntesis de almidón, se identificaron los polimorfismos entre las líneas parentales, los cuales se utilizaron para diseñar oligos alelo específicos para K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2.

## **7 Extracción de DNA**

El DNA se extrajo de dos poblaciones de RIL obtenidas de las cruzas K0326Y-QPM x W64Ao2 y CML176 x W64Ao2 utilizando la metodología de Shen y col (1994) con algunas modificaciones. Aproximadamente 1 g de tejido vegetativo se maceró en presencia de nitrógeno líquido y luego se incubó con 9 mL de amortiguador de extracción [CTAB 1% (p/v), Tris-HCl 1 M (pH 7.5), EDTA 0.5 M, NaCl 5 M, 2-mercaptoetanol 1% (v/v)] a 65 °C por 1 h. Se realizó una extracción con 4 mL de cloroformo:octanol (24:1 v/v) y los ácidos nucleicos se precipitaron de la fase acuosa con 6 mL de isopropanol frío. A la pastilla obtenida se le realizó un lavado con 1 mL de acetato de sodio 0.2M + etanol 76% (v/v), seguido de otro lavado con 1 mL de acetato

de amonio 10 mM + etanol 76% (v/v) y finalmente se resuspendió en 200 mL de agua desionizada estéril.

## **8 Evaluación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)**

Las condiciones de PCR fueron de acuerdo a lo descrito por Pineda-Hidalgo y col. (2011) con algunas modificaciones. La mezcla de la reacción consistió de 1  $\mu$ L de ADN (50 ng/ $\mu$ L), 1.5  $\mu$ L de amortiguador de reacción de PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0.5  $\mu$ L de dNTPs 100  $\mu$ M, 0.63  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 unidad de Taq ADN polimerasa, 0.25  $\mu$ L de oligonucleótidos iniciadores 25  $\mu$ M y agua desionizada estéril hasta completar 15  $\mu$ L. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, CA, USA), utilizando un período inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a X °C (unión de iniciadores) y 1.5 min a 72 °C (extensión), con un período final de extensión a 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados se separaron en geles de poli(acrilamida) al 15% (p/v) con amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM). El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.01  $\mu$ g/mL) y se digitalizó en presencia de luz ultravioleta con un fotodocumentador Chemidoc XRS (BIO-RAD, CA, USA), utilizando el programa Quantity One para la adquisición y análisis de las imágenes.

## **9 Evaluación de propiedades fisicoquímicas del gránulo de almidón**

Se evaluó el contenido de amilosa y grado de hinchamiento en la población de RIL derivadas de la cruce CML176-QPM x W64o2, ya que en el caso de la población derivada de K0326Y-QPM x W64o2 las propiedades fisicoquímicas del almidón fueron evaluadas previamente por Álvarez Hernández (2014) y estos datos fueron tomados de dicho estudio.

### **a Determinación de amilosa**

El contenido de amilosa se determinó utilizando el kit K-AMYL 04/06 (Megazyme, Wicklow, Irlanda). Se pesaron 25 mg de la harina de endospermo, se

agregó 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y la mezcla se colocó en un baño maría en ebullición durante 1 min. La muestra se mezcló vigorosamente y se colocó nuevamente en el baño maría por 15 min con agitación intermitente. Se dejó en reposo por 5 min, se le agregaron 6 mL de etanol al 95% (v/v), y se mezcló por inversión formando un precipitado que se dejó reposar durante toda la noche. La muestra se centrifugó (2,000 g, 5 min) y el precipitado se retiró del sobrenadante por decantación por 10 min. Se añadieron 2 mL de DMSO y la mezcla se colocó en baño maría por 15 min con agitación intermitente. Inmediatamente se añadieron 4 mL del solvente de Concanavalina A (Con A), se mezcló vigorosamente y el contenido se transfirió a un matraz volumétrico (25 mL) con lavados constantes con el solvente de Con A hasta aforar (solución A). Se tomó una alícuota de 1 ml de la solución A para la precipitar la amilopectina mediante la adición de 0.5 mL de Concanavalina A, mezclando por inversión y dejando reposar por 1 h a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó por 10 min a 14,000 g y se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de 15 mL, se añadieron 3 mL de amortiguador de acetato de sodio (100 mM, pH 4.5), se mezcló y se calentó por 5 min en baño maría a ebullición para desnaturalizar la Con A. Posteriormente, la muestra se colocó en baño maría a 40°C durante 5 min y se le agregaron 0.1 mL de las enzimas amiloglucosidasa/  $\alpha$ -amilasa, se mezcló el contenido e incubó por 30 min a 40°C. Por otro lado, se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución A para la determinación de almidón total. A esta alícuota se le adicionaron 4 mL del amortiguador de acetato de sodio (100 mM, pH 4.5); se agregó 0.1 mL de las enzimas amiloglucosidasa/ $\alpha$ -amilasa y se incubó la mezcla a 40°C durante 10 min. La muestra tratada con Con A y la utilizada para el almidón total se centrifugaron por 5 min a 2,000 g, de las cuales se tomó una alícuota de 1 mL y se hizo reaccionar con 4 mL del Glucosa Oxidasa/Peroxidasa; se incubaron por 20 min a 40°C, incluyendo un blanco y estándar de glucosa (D-Glucosa). Se midió la absorbancia de las muestras y el estándar a 510 nm y el porcentaje de amilosa se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Amilosa} = \frac{\text{Abs (sobrenadante Con A)}}{\text{Abs (alícuota de almidón total)}} \times 66.8$$

#### **b Grado de hinchamiento**

Se determinó de acuerdo con Konik-Rose y col. (2001). Se utilizaron 40 mg de harina, de la cual se determinó la humedad para obtener el peso seco de la misma (S); se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se mezcló con 1 mL de agua, se agitó vigorosamente y se incubó en un termoagitador (Eppendorf, Hamburg, Alemania) por 30 min a 92.5°C con agitaciones suaves por inversión (20 veces/1 min y 2 veces por periodos de 1.5, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15 y 25 min). La muestra se enfrió en un baño de agua por 3 min a 20°C, realizando dos agitaciones suaves al tiempo cero y después de 1.5 min. La muestra se centrifugó a 17,000 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se obtuvo el peso de la pastilla obtenida (B). El grado de hinchamiento se determinó mediante la siguiente relación:

$$\text{Grado de hinchamiento} = \frac{\text{peso de la pastilla (B)}}{\text{peso seco de la muestra (S)}}$$

## 10 Análisis de asociación

Los polimorfismos de genes de síntesis de almidón fueron utilizados como marcadores alelo específicos para K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2, mismos que fueron utilizados para evaluar las variantes alélicas en las dos poblaciones de RIL derivadas de las cruza de dichas líneas. Se realizó un mapeo de ligamiento entre las variantes alélicas de cada uno de los genes y el genotipo de microsatélites de los cromosomas 5 y 9 obtenidos previamente para las poblaciones derivadas de K0326Y-QPM x W64Ao2 (Álvarez-Hernández, 2014) y CML176-QPM x W64Ao2 (Grimaldi-Olivas (2017). La distancia genética entre los marcadores SNP y SSR se determinó con el programa Map Manager QTX20 utilizando la función de mapeo Kosambi.

A partir de los datos genotípicos y las propiedades fisicoquímicas del almidón en cada una de las poblaciones de estudio se realizó un mapeo por intervalos utilizando un modelo de regresión aditivo. Se realizaron pruebas de permutación (1000 permutaciones) en cada cromosoma con el fin de establecer valores límite de significancia (LRS, del inglés likelihood ratio statistic,  $\alpha=0.05$ ) (Churchill y Doerge, 1994); valores de LRS arriba del límite indicaron asociaciones significativas entre

regiones del genoma y las características de interés. Todos estos análisis se realizaron con ayuda del programa MapManager QTX 20 (Manly y col., 2001)

## VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN LAS LÍNEAS DE MAÍZ K0326Y-QPM, CML176-QPM Y W64Ao2

El análisis de las variantes alélicas de las líneas K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 se realizó en los genes *Amilose extender 1 (Ae1)* y *Waxy 1 (Wx1)*, los cuales codifican para las enzimas ramificadora de almidón (SBE) y almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI). La secuencia de estos genes se obtuvo mediante la amplificación y ensamble de diversos contigs de cDNA amplificados por RT-PCR utilizando oligos iniciadores obtenidos a partir de las secuencias reportadas para la línea de maíz B73 (Cuadro 6). En el diseño de estos oligos se tomó en cuenta el porcentaje de guanina-citosina (40-60%), la autocomplementariedad, el tamaño de los amplicones, así como las temperaturas de alineamiento (Ye y col., 2012).

En la Figura 5 se muestran las secuencias del gen *Ae1* en las líneas de maíz estudiadas. El tamaño de la secuencia obtenida para las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2 fue de 2,680 pares de bases (pb), lo cual corresponde con lo reportado por Schnable y col (2009) para el mismo gen en la línea de maíz de referencia B73 (ID: AFW71659). Sin embargo, en la línea CML176-QPM solo se logró obtener una secuencia de 2,380 pb, representando una cobertura del 86% para dicho gen.

El alineamiento de las secuencias reveló la presencia de 13 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la región codificante localizados en las posiciones: 992 (G>A), 993 (G>A), 1044 (A>G), 1137 (T>A), 1138 (A>T), 1530 (T>A), 1531 (G>A), 1534 (C>A), 1535 (T>A), 1551 (T>G) 1558 (T>G), 1575 (C>G) 1578 (T>C) (Figura 5). Con respecto a la línea opaca W64Ao2, las líneas vítreas CML-176-QPM y K0326Y-QPM presentaron 12 y 11 SNP, respectivamente. Los 11 SNP encontrados en CML176-QPM también se encontraron K0326Y-QPM. Shin y col. (2006) caracterizaron la secuencia del gen *Ae1* e identificaron 2 SNP en la región codificante de maíces tipo ceroso, dentado y dulce en las posiciones 12,919 (T>C) y 19,605 (A>G). Estos SNP no fueron identificados en el presente estudio, lo cual se puede atribuir a la diferencia genética entre estos materiales.

|            | 5  | 75                  |
|------------|--|---------------------|
| Ae1-CML176 | -----  | -----               |
| Ae1-K0326Y | ATGGCGTTTCG CGGTTTCTGG GGCGGTGCTC GGTGGGGCCG TAAGGGCTCC CCGACTCACC GGCGGCGGGG AGGGTAGTCT |                     |
| Ae1-W64Ao2 | ATGGCGTTTCG CGGTTTCTGG GGCGGTGCTC GGTGGGGCCG TAAGGGCTCC CCGACTCACC GGCGGCGGGG AGGGTAGTCT |                     |
|            | <b>85</b>  | <b>155</b>          |
| Ae1-CML176 | -----  | -----               |
| Ae1-K0326Y | AGTCTTCCGG CACACCGGCC TCTTCTTAAC TCGGGGTGCT CGAGTTGGAT GTTCGGGGAC GCACGGGGCC ATGCGC GCGG |                     |
| Ae1-W64Ao2 | AGTCTTCCGG CACACCGGCC TCTTCTTAAC TCGGGGTGCT CGAGTTGGAT GTTCGGGGAC GCACGGGGCC ATGCGC GCGG |                     |
|            | <b>165</b>   | <b>235</b>          |
| Ae1-CML176 | -----  | -----               |
| Ae1-K0326Y | CGGCCCGGGC CAGGAAGGCG GTCATGGTTC CTGAGGGCGA GAATGATGGC CTCGCATCAA GGGCTGACTC GGCTCAATTC  |                     |
| Ae1-W64Ao2 | CGGCCCGGGC CAGGAAGGCG GTCATGGTTC CTGAGGGCGA GAATGATGGC CTCGCATCAA GGGCTGACTC GGCTCAATTC  |                     |
|            | <b>245</b>   | <b>315</b>          |
| Ae1-CML176 | -----  | -----               |
| Ae1-K0326Y | CAGTCGGATG AACTGGAGGT ACCAGACATT TCTGAAGAGA CAACGTGCGG TGCTGGTGTG GCTGATGCTC AAGCCTTGAA  |                     |
| Ae1-W64Ao2 | CAGTCGGATG AACTGGAGGT ACCAGACATT TCTGAAGAGA CAACGTGCGG TGCTGGTGTG GCTGATGCTC AAGCCTTGAA  |                     |
|            | <b>325</b>   | <b>395</b>          |
| Ae1-CML176 | -----  | -----               |
| Ae1-K0326Y | CAGAGTTCGA GTGGTCCCC CACCAAGCGA TGGACAAAAA ATATTCCAGA TTGACCCCAT GTTGCAAGGC TATAAGTACC   |                     |
| Ae1-W64Ao2 | CAGAGTTCGA GTGGTCCCC CACCAAGCGA TGGACAAAAA ATATTCCAGA TTGACCCCAT GTTGCAAGGC TATAAGTACC   |                     |
|            | <b>405</b>   | <b>475</b>          |
| Ae1-CML176 | -----  | -----GGA AGCCTTCTCC |
| Ae1-K0326Y | ATCTTGAGTA TCGGTACAGC CTCTATAGAA GAATCCGTTC AGACATTGAT GAACATGAAG GAGGCTTGGA AGCCTTCTCC  |                     |
| Ae1-W64Ao2 | ATCTTGAGTA TCGGTACAGC CTCTATAGAA GAATCCGTTC AGACATTGAT GAACATGAAG GAGGCTTGGA AGCCTTCTCC  |                     |
|            | <b>485</b>   | <b>555</b>          |
| Ae1-CML176 | CGTAGTTATG AGAAGTTTGG ATTTAATCGC AGCGCGGAAG GTATCACATA TCGAGAATGG GCTCCTGGAG CATTCTTCTGC |                     |
| Ae1-K0326Y | CGTAGTTATG AGAAGTTTGG ATTTAATCGC AGCGCGGAAG GTATCACATA TCGAGAATGG GCTCCTGGAG CATTCTTCTGC |                     |
| Ae1-W64Ao2 | CGTAGTTATG AGAAGTTTGG ATTTAATCGC AGCGCGGAAG GTATCACATA TCGAGAATGG GCTCCTGGAG CATTCTTCTGC |                     |
|            | <b>565</b>   | <b>635</b>          |
| Ae1-CML176 | AGCATTGGTG GGTGACTTCA ACAACTGGGA TCCAAATGCA GATCGTATGA GCAAAAATGA GTTTGGTGTG TGGGAAATTT  |                     |
| Ae1-K0326Y | AGCATTGGTG GGTGACTTCA ACAACTGGGA TCCAAATGCA GATCGTATGA GCAAAAATGA GTTTGGTGTG TGGGAAATTT  |                     |
| Ae1-W64Ao2 | AGCATTGGTG GGTGACTTCA ACAACTGGGA TCCAAATGCA GATCGTATGA GCAAAAATGA GTTTGGTGTG TGGGAAATTT  |                     |

**Figura 5.** Secuencia de nucleótidos del gen *Amilose extender 1 (Ae1)* en las líneas CML176-QPM, K0326Y-QPM y W64Ao2. Las variantes o SNP más representativos presentes entre ambas secuencias se encuentran señalados con asteriscos.

|            |   |  |             |
|------------|---|--|-------------|
|            | <b>645</b>  |  | <b>715</b>  |
| Ae1-CML176 | TTCTGCCTAA CAATGCAGAT GGTACATCAC CTATTCCTCA TGGATCTCGT GTAAAGGTGA GAATGGATAC TCCATCAGGG |  |             |
| Ae1-K0326Y | TTCTGCCTAA CAATGCAGAT GGTACATCAC CTATTCCTCA TGGATCTCGT GTAAAGGTGA GAATGGATAC TCCATCAGGG |  |             |
| Ae1-W64A02 | TTCTGCCTAA CAATGCAGAT GGTACATCAC CTATTCCTCA TGGATCTCGT GTAAAGGTGA GAATGGATAC TCCATCAGGG |  |             |
|            | <b>725</b>  |  | <b>795</b>  |
| Ae1-CML176 | ATAAAGGATT CAATCCAGC CTGGATCAAG TACTCAGTGC AGGCCCCAGG AGAAATACCA TATGATGGGA TTTATTATGA  |  |             |
| Ae1-K0326Y | ATAAAGGATT CAATCCAGC CTGGATCAAG TACTCAGTGC AGGCCCCAGG AGAAATACCA TATGATGGGA TTTATTATGA  |  |             |
| Ae1-W64A02 | ATAAAGGATT CAATCCAGC CTGGATCAAG TACTCAGTGC AGGCCCCAGG AGAAATACCA TATGATGGGA TTTATTATGA  |  |             |
|            | <b>805</b>  |  | <b>875</b>  |
| Ae1-CML176 | TCCTCCTGAA GAGGTAAAGT ATGTGTTTCA GATGCGCAA CCTAAACGAC CAAAATCATT GCGGATATAT GAAACACATG  |  |             |
| Ae1-K0326Y | TCCTCCTGAA GAGGTAAAGT ATGTGTTTCA GATGCGCAA CCTAAACGAC CAAAATCATT GCGGATATAT GAAACACATG  |  |             |
| Ae1-W64A02 | TCCTCCTGAA GAGGTAAAGT ATGTGTTTCA GATGCGCAA CCTAAACGAC CAAAATCATT GCGGATATAT GAAACACATG  |  |             |
|            | <b>885</b>  |  | <b>955</b>  |
| Ae1-CML176 | TCGGAATGAG TAGCCCGGAA CCGAAGATAA ACACATATGT AACTTTAGG GATGAAGTCC TCCAAGAAT AAAAAAAGTT   |  |             |
| Ae1-K0326Y | TCGGAATGAG TAGCCCGGAA CCGAAGATAA ACACATATGT AACTTTAGG GATGAAGTCC TCCAAGAAT AAAAAAAGTT   |  |             |
| Ae1-W64A02 | TCGGAATGAG TAGCCCGGAA CCGAAGATAA ACACATATGT AACTTTAGG GATGAAGTCC TCCAAGAAT AAAAAAAGTT   |  |             |
|            | <b>965</b>  |  | <b>1035</b> |
| Ae1-CML176 | GGATACAATG CAGTGCAAAT AATGGCAATC CGGAGCACT CATATTATGG AAGCTTTGGA TACCATGTAA CTAATTTTTT  |  |             |
| Ae1-K0326Y | GGATACAATG CAGTGCAAAT AATGGCAATC CAAGAGCACT CATATTATGG AAGCTTTGGA TACCATGTAA CTAATTTTTT |  |             |
| Ae1-W64A02 | GGATACAATG CAGTGCAAAT AATGGCAATC CAAGAGCACT CATATTATGG AAGCTTTGGA TACCATGTAA CTAATTTTTT |  |             |
|            | <b>1045</b>   |  | <b>1115</b> |
| Ae1-CML176 | TGCACCAAGT AGTCGTTTTG GTACCCAGA AGATTTGAAG TCTTTGATTG ATAGAGCACA TGAGCTTGGT TTGCTAGTTC  |  |             |
| Ae1-K0326Y | TGCACCAAGT AGTCGTTTTG GTACCCAGA AGATTTGAAG TCTTTGATTG ATAGAGCACA TGAGCTTGGT TTGCTAGTTC  |  |             |
| Ae1-W64A02 | TGCACCAAGT AGTCGTTTTG GTACCCAGA AGATTTGAAG TCTTTGATTG ATAGAGCACA TGAGCTTGGT TTGCTAGTTC  |  |             |
|            | <b>1125</b>   |  | <b>1195</b> |
| Ae1-CML176 | TCATGGATGT GGTTCATAGT CATGCGTCAA GTAATACTCT GGATGGGTTG AATGGTTTTG ATGGTACAGA TACACATTAC |  |             |
| Ae1-K0326Y | TCATGGATGT GGTTCATAGT CATGCGTCAA GTAATACTCT GGATGGGTTG AATGGTTTTG ATGGTACAGA TACACATTAC |  |             |
| Ae1-W64A02 | TCATGGATGT GGTTCATAGT CATGCGTCAA GTAATACTCT GGATGGGTTG AATGGTTTTG ATGGTACAGA TACACATTAC |  |             |

**Figura 5.** Continuación.



|            |  |  |             |
|------------|--|--|-------------|
|            | <b>1205</b>  |  | <b>1275</b> |
| Ae1-CML176 | TTTCACAGTG GTCCACGTGG CCATCACTGG ATGTGGGATT CTCGCCTATT TAACTATGGG AACTGGGAAG TTTTAAGATT                    |  |             |
| Ae1-K0326Y | TTTCACAGTG GTCCACGTGG CCATCACTGG ATGTGGGATT CTCGCCTATT TAACTATGGG AACTGGGAAG TTTTAAGATT                    |  |             |
| Ae1-W64A02 | TTTCACAGTG GTCCACGTGG CCATCACTGG ATGTGGGATT CTCGCCTATT TAACTATGGG AACTGGGAAG TTTTAAGATT                    |  |             |
|            | <b>1285</b>  |  | <b>1355</b> |
| Ae1-CML176 | TCTTCTCTCC AATGCTAGAT GGTGGCTCGA GGAATATAAG TTTGATGGTT TCCGTTTTGA TGGTGTGACC TCCATGATGT                    |  |             |
| Ae1-K0326Y | TCTTCTCTCC AATGCTAGAT GGTGGCTCGA GGAATATAAG TTTGATGGTT TCCGTTTTGA TGGTGTGACC TCCATGATGT                    |  |             |
| Ae1-W64A02 | TCTTCTCTCC AATGCTAGAT GGTGGCTCGA GGAATATAAG TTTGATGGTT TCCGTTTTGA TGGTGTGACC TCCATGATGT                    |  |             |
|            | <b>1365</b>  |  | <b>1435</b> |
| Ae1-CML176 | ACACTCACCA CGGATTACAA GTAACATTTA CGGGGAACTT CAATGAGTAT TTTGGCTTTG CCACCGATGT AGATGCAGTG                    |  |             |
| Ae1-K0326Y | ACACTCACCA CGGATTACAA GTAACATTTA CGGGGAACTT CAATGAGTAT TTTGGCTTTG CCACCGATGT AGATGCAGTG                    |  |             |
| Ae1-W64A02 | ACACTCACCA CGGATTACAA GTAACATTTA CGGGGAACTT CAATGAGTAT TTTGGCTTTG CCACCGATGT AGATGCAGTG                    |  |             |
|            | <b>1445</b>  |  | <b>1515</b> |
| Ae1-CML176 | GTTTACTTGA TGCTGGTAAA TGATCTAATT CATGGACTTT ATCCTGAGGC TGTAACCATT GGTGAAGATG TTAGTGGAAAT                   |  |             |
| Ae1-K0326Y | GTTTACTTGA TGCTGGTAAA TGATCTAATT CATGGACTTT ATCCTGAGGC TGTAACCATT GGTGAAGATG TTAGTGGAAAT                   |  |             |
| Ae1-W64A02 | GTTTACTTGA TGCTGGTAAA TGATCTAATT CATGGACTTT ATCCTGAGGC TGTAACCATT GGTGAAGATG TTAGTGGAAAT                   |  |             |
|            | <b>1525</b>  |  | <b>1595</b> |
| Ae1-CML176 | GCCTACATTT GCCCTTCCTG TTCACGATGG TGGGGTAGTT TTTGACTATC GGATCCATAT GGCTGTGGCT GACAAATGGA                    |  |             |
| Ae1-K0326Y | GCCTACATTT GCCCTTCCTG TTCACGATGG TGGGGTAGTT TTTGACTATC GGATGCATAT GGCTGTGGCT GACAAATGGA                    |  |             |
| Ae1-W64A02 | GCCTACATTA ACCAATCCTG TTCACGATGG GGGGGTAGGT TTTGACTATC GGATGCACAT GGCTGTGGCT GACAAATGGA<br>* * * * * * * * |  |             |
|            | <b>1605</b>  |  | <b>1675</b> |
| Ae1-CML176 | TTGACCTTCT CAAGCAAAGT GATGAAACTT GGAAGATGGG TGATATTGTG CACACACTGA CAAATAGGAG GTGGTTAGAG                    |  |             |
| Ae1-K0326Y | TTGACCTTCT CAAGCAAAGT GATGAAACTT GGAAGATGGG TGATATTGTG CACACACTGA CAAATAGGAG GTGGTTAGAG                    |  |             |
| Ae1-W64A02 | TTGACCTTCT CAAGCAAAGT GATGAAACTT GGAAGATGGG TGATATTGTG CACACACTGA CAAATAGGAG GTGGTTAGAG                    |  |             |
|            | <b>1685</b>  |  | <b>1755</b> |
| Ae1-CML176 | AAGTGTGTAA CTTATGCTGA AAGTCATGAT CAAGCATTAG TCGGCGACAA GACTATTGCG TTTTGTTGA TGGACAAGGA                     |  |             |
| Ae1-K0326Y | AAGTGTGTAA CTTATGCTGA AAGTCATGAT CAAGCATTAG TCGGCGACAA GACTATTGCG TTTTGTTGA TGGACAAGGA                     |  |             |
| Ae1-W64A02 | AAGTGTGTAA CTTATGCTGA AAGTCATGAT CAAGCATTAG TCGGCGACAA GACTATTGCG TTTTGTTGA TGGACAAGGA                     |  |             |

**Figura 5.** Continuación

|            |  |             |             |
|------------|--|-------------|-------------|
|            | <b>1765</b>  |             | <b>1835</b> |
| Ae1-CML176 | TATGTATGAT TTCATGGCCC TCGATAGACC TTCAACTCCT ACCATTGATC GTGGGATAGC ATTACATAAG ATGATTAGAC  |             |             |
| Ae1-K0326Y | TATGTATGAT TTCATGGCCC TCGATAGACC TTCAACTCCT ACCATTGATC GTGGGATAGC ATTACATAAG ATGATTAGAC  |             |             |
| Ae1-W64A02 | TATGTATGAT TTCATGGCCC TCGATAGACC TTCAACTCCT ACCATTGATC GTGGGATAGC ATTACATAAG ATGATTAGAC  | <b>1845</b> | <b>1915</b> |
| Ae1-CML176 | TTATCACAAAT GGGTTTAGGA GGAGAGGGCT ATCTTAATTT CATGGGAAAT GAGTTTGGAC ATCCTGAATG GATAGATTTT |             |             |
| Ae1-K0326Y | TTATCACAAAT GGGTTTAGGA GGAGAGGGCT ATCTTAATTT CATGGGAAAT GAGTTTGGAC ATCCTGAATG GATAGATTTT |             |             |
| Ae1-W64A02 | TTATCACAAAT GGGTTTAGGA GGAGAGGGCT ATCTTAATTT CATGGGAAAT GAGTTTGGAC ATCCTGAATG GATAGATTTT |             |             |
|            | <b>1925</b>  |             | <b>1995</b> |
| Ae1-CML176 | CCAAGAGGTC CGCAAAGACT TCCAAGTGGT AAGTTTATTC CAGGGAATAA CAACAGTTAT GACAAATGTC GTCGAAGATT  |             |             |
| Ae1-K0326Y | CCAAGAGGTC CGCAAAGACT TCCAAGTGGT AAGTTTATTC CAGGGAATAA CAACAGTTAT GACAAATGTC GTCGAAGATT  |             |             |
| Ae1-W64A02 | CCAAGAGGTC CGCAAAGACT TCCAAGTGGT AAGTTTATTC CAGGGAATAA CAACAGTTAT GACAAATGTC GTCGAAGATT  |             |             |
|            | <b>2005</b>  |             | <b>2075</b> |
| Ae1-CML176 | TGACCTGGGT GATGCAGACT ATCTTAGGTA TCATGGTATG CAAGAGTTTG ATCAGGCAAT GCAACATCTT GAGCAAAAAT  |             |             |
| Ae1-K0326Y | TGACCTGGGT GATGCAGACT ATCTTAGGTA TCATGGTATG CAAGAGTTTG ATCAGGCAAT GCAACATCTT GAGCAAAAAT  |             |             |
| Ae1-W64A02 | TGACCTGGGT GATGCAGACT ATCTTAGGTA TCATGGTATG CAAGAGTTTG ATCAGGCAAT GCAACATCTT GAGCAAAAAT  |             |             |
|            | <b>2085</b>  |             | <b>2155</b> |
| Ae1-CML176 | ATGAATTCAT GACATCTGAT CACCAGTATA TTTCCCGGAA ACATGAGGAG GATAAGGTGA TTGTGTTCTGA AAAGGGAGAT |             |             |
| Ae1-K0326Y | ATGAATTCAT GACATCTGAT CACCAGTATA TTTCCCGGAA ACATGAGGAG GATAAGGTGA TTGTGTTCTGA AAAGGGAGAT |             |             |
| Ae1-W64A02 | ATGAATTCAT GACATCTGAT CACCAGTATA TTTCCCGGAA ACATGAGGAG GATAAGGTGA TTGTGTTCTGA AAAGGGAGAT |             |             |
|            | <b>2165</b>  |             | <b>2235</b> |
| Ae1-CML176 | TTGGTATTTG TGTTCAACTT CCACTGCAAC AACAGCTATT TTGACTACCG TATTGGTTGT CGAAAGCCTG GGGTGTATAA  |             |             |
| Ae1-K0326Y | TTGGTATTTG TGTTCAACTT CCACTGCAAC AACAGCTATT TTGACTACCG TATTGGTTGT CGAAAGCCTG GGGTGTATAA  |             |             |
| Ae1-W64A02 | TTGGTATTTG TGTTCAACTT CCACTGCAAC AACAGCTATT TTGACTACCG TATTGGTTGT CGAAAGCCTG GGGTGTATAA  |             |             |
|            | <b>2245</b>  |             | <b>2315</b> |
| Ae1-CML176 | GGTGGTCTTG GACTCCGACG CTGGACTATT TGGTGGATTT AGCAGGATCC ATCACGCAGC CGAGCACTTC ACCGCCGACT  |             |             |
| Ae1-K0326Y | GGTGGTCTTG GACTCCGACG CTGGACTATT TGGTGGATTT AGCAGGATCC ATCACGCAGC CGAGCACTTC ACCGCCGACT  |             |             |
| Ae1-W64A02 | GGTGGTCTTG GACTCCGACG CTGGACTATT TGGTGGATTT AGCAGGATCC ATCACGCAGC CGAGCACTTC ACCGCCGACT  |             |             |

**Figura 5.** Continuación.

|            |  |  |      |
|------------|--|--|------|
|            | 2325   |  | 2395 |
| Ae1-CML176 | GTTTCGCATGA TAATAGGCCA TATTCATTCT CGGTTTATAC ACCAAGCAGA ACATGTGTCG TCTATGCTCC AGTGGAGTGA |  |      |
| Ae1-K0326Y | GTTTCGCATGA TAATAGGCCA TATTCATTCT CGGTTTATAC ACCAAGCAGA ACATGTGTCG TCTATGCTCC AGTGGAGTGA |  |      |
| Ae1-W64A02 | GTTTCGCATGA TAATAGGCCA TATTCATTCT CGGTTTATAC ACCAAGCAGA ACATGTGTCG TCTATGCTCC AGTGGAGTGA |  |      |
|            | 2405   |  | 2475 |
| Ae1-CML176 | TAGCGGGGTA CTCGTTGCTG CGCGGCATGT GTGGGGCTGT CGATGTGAGG AAAAACCTTC TTCCAAAACC GGCAGATGCA  |  |      |
| Ae1-K0326Y | TAGCGGGGTA CTCGTTGCTG CGCGGCATGT GTGGGGCTGT CGATGTGAGG AAAAACCTTC TTCCAAAACC GGCAGATGCA  |  |      |
| Ae1-W64A02 | TAGCGGGGTA CTCGTTGCTG CGCGGCATGT GTGGGGCTGT MGATGTGAGG AAAAACCTTC TTCCAAAACC GGCAGATGCA  |  |      |
|            | 2485   |  | 2555 |
| Ae1-CML176 | TGCATGCATG CTACAATAAG GTTCTGATAC TTTAATCGAT GCTGGAAAGC CCATGCATCT CGCTGCGTTG TCCTCTCTAT  |  |      |
| Ae1-K0326Y | TGCATGCATG CTACAATAAG GTTCTGATAC TTTAATCGAT GCTGGAAAGC CCATGCATCT CGCTGCGTTG TCCTCTCTAT  |  |      |
| Ae1-W64A02 | TGCATGCATG CTACAATAAG GTTCKGATAC TTTAATCGAT GCTGGAAAGC CCATGCATCT CGCTGCGTTG TCCTCTCTAT  |  |      |
|            | 2565   |  | 2635 |
| Ae1-CML176 | ATATATAAGA CCTTCAAGGT GTCAAT-AAA CATAGAGTTT -----  |  |      |
| Ae1-K0326Y | ATATATAAGA CCTTCAAGGT GTCAATTTAA CATAGAGTTT TCGTTTTTCG CTTTCCTAAT GMTTGATGGC TGAWMRWWWG  |  |      |
| Ae1-W64A02 | ATATATAAGA CCTTCAAGGT GTCAATTTAA CATAGAGTTT TCGTTTTTCG CTTTCCTAAT GCTTGATGGC TGATTGTTTG  |  |      |
|            | 2645   |  | 2675 |
| Ae1-CML176 | -----  |  |      |
| Ae1-K0326Y | CACTTGTTTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA-----  |  |      |
| Ae1-W64A02 | CAMTWRWWWM AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAATTAT  |  |      |

**Figura 5.** Continuación.

En relación al gen *Wx1*, el cual codifica la enzima GBSSI responsable de la síntesis de amilosa, la línea de referencia B73 presenta una longitud de 2,570 pb (ID: AFW85998). En este caso solo se logró obtener información de la secuencia para los parentales K0326Y-QPM y W64Ao2, donde se obtuvieron secuencias de 1,540 pb que comprende de la posición 1,021 a la 2,570, cubriendo parte de la región codificante y la región 3' UTR para cada una de ellas. Al analizar las secuencias obtenidas para este gen en K0326Y- QPM y W64Ao2 se observaron 11 SNP, de los cuales 3 se localizaron dentro de la región codificante en las posiciones: 213 (G>C), 327 (G>C) y 1,149 (C>T); los otros 8 SNP se ubicaron en la región 3'UTR en las posiciones: 1,216 (C>G), 1,217 (C>G), 1,237 (A>G), 1,305 (C>A) y 1,498 (G>A), 1,504 (A>T), 1,516 (C>T), 1,518 (T>C) (Figura 6). Shin y col. (2006) caracterizaron la secuencia de este gen en 83 accesiones de maíz de tipo ceroso, dentado y dulce, reportando 4 SNP en las posiciones 1,425 (T>G), 1,588 (A>G), 1,874 (T>G) y 2,057 (C>G), tres de de ellos localizados en la región codificante. El SNP en la posición 2,057 (G>C) coincide con uno identificado en el presente estudio, donde el parental K0326Y-QPM posee una guanina en esa posición a diferencia de W64Ao2 que presenta una citosina.

Los SNP localizados en secuencia de genes pueden modificar o no la cadena de aminoácidos que producen, pudiéndose encontrar tres tipos: aquellos que alteran la secuencia de aminoácidos en la proteína, las “mutaciones silenciosas” que no tienen efecto sobre la secuencia y por último mutaciones que crean un sitio de alto/paro para la traducción en un lugar prematuro en la cadena polipeptídica (proteína trunca) (Liao y Lee, 2010). Para comprobar de qué manera influyen los SNP encontrados en las secuencias obtenidas, se llevó a cabo la traducción de los nucleótidos a aminoácidos utilizando la plataforma TranslateTool de ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), permitiendo identificar diferentes alteraciones en la secuencia de aminoácidos de las proteínas predichas, mismas que se describen a continuación.

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| Wx1-K0326Y | CTGAGCCTCA ACAACAACCC ATACTTCTCC GGACCATACG GGGAGGACGT CGTGTTTCGTC TGCAACGACT GGCACACCGG |            |
| Wx1-W64Ao2 | CTGAGCCTCA ACAACAACCC ATACTTCTCC GGACCATACG GGGAGGACGT CGTGTTTCGTC TGCAACGACT GGCACACCGG |            |
|            | <b>85</b>  | <b>155</b> |
| Wx1-K0326Y | CCCTCTCTCG TGCTACCTCA AGAGCAACTA CCAGTCCCAC GGCATCTACA GGACAAAGAC CGCTTTCTGC ATCCACAACA  |            |
| Wx1-W64Ao2 | CCCTCTCTCG TGCTACCTCA AGAGCAACTA CCAGTCCCAC GGCATCTACA GGACAAAGAC CGCTTTCTGC ATCCACAACA  |            |
|            | <b>165</b>   | <b>235</b> |
| Wx1-K0326Y | TCTCCTACCA GGGCCGGTTC GCCTTCTCCG ACTACCCGGA GCTGAACCTC CCGGAGAGAT TCAAGTCGTC CTTCGATTTT  |            |
| Wx1-W64Ao2 | TCTCCTACCA GGGCCGGTTC GCCTTCTCCG ACTACCCGGA GCTGAACCTC CCGGAGAGAT TCAAGTCGTC CTTCGATTTT  |            |
|            | <b>245</b>   | <b>315</b> |
|            |  | *          |
| Wx1-K0326Y | ATCGACGGCT ACGAGAAGCC CGTGGAAAGGC CGGAAGATCA ACTGGATGAA GGCCGGGATC CTCGAGGCCG ACAGGGTCCT |            |
| Wx1-W64Ao2 | ATCGACGGCT ACGAGAAGCC CGTGGAAAGGC CGGAAGATCA ACTGGATGAA GGCCGGGATC CTCGAGGCCG ACAGGGTCCT |            |
|            | <b>325</b>   | <b>395</b> |
| wx1-K0326Y | CACCGTGAGC CCCTACTACG CCGAGGAGCT CATCTCCGGC ATCGCCAGGG GCTGCGAGCT CGACAACATC ATGCGCCTCA  |            |
| Wx1-W64Ao2 | CACCGTGAGC CCCTACTACG CCGAGGAGCT CATCTCCGGC ATCGCCAGGG GCTGCGAGCT CGACAACATC ATGCGCCTCA  |            |
|            | <b>405</b>   | <b>475</b> |
|            |  | *          |
| Wx1-K0326Y | CCGGCATCAC CGGCATCGTC AACGGCATGG ACGTCAGCGA GTGGGACCCC AGCAGGGACA AGTACATCGC CGTGAAGTAC  |            |
| Wx1-W64Ao2 | CCGGCATCAC CGGCATCGTC AACGGCATGG ACGTCAGCGA GTGGGACCCC AGCAGGGACA AGTACATCGC CGTGAAGTAC  |            |
|            | <b>485</b>   | <b>555</b> |
| Wx1-K0326Y | GACGTGTCGA CGGCCGTGGA GGCCAAGGCG CTGAACAAGG AGGCGCTGCA GGC GGAGGTC GGGCTCCCGG TGGACCGGAA |            |
| Wx1-W64Ao2 | GACGTGTCGA CGGCCGTGGA GGCCAAGGCG CTGAACAAGG AGGCGCTGCA GGC GGAGGTC GGGCTCCCGG TGGACCGGAA |            |
|            | <b>565</b>   | <b>635</b> |
| Wx1-K0326Y | CATCCCCTG GTGGCGTTCA TCGGCAGGCT GGAAGAGCAG AAGGGCCCCG ACGTCATGGC GGCCGCCATC CCGCAGCTCA   |            |
| Wx1-W64Ao2 | CATCCCCTG GTGGCGTTCA TCGGCAGGCT GGAAGAGCAG AAGGGCCCCG ACGTCATGGC GGCCGCCATC CCGCAGCTCA   |            |
|            | <b>645</b>   | <b>715</b> |
| Wx1-K0326Y | TGGAGATGGT GGAGGACGTG CAGATCGTTC TGCTGGGCAC GGGCAAGAAG AAGTTCGAGC GCATGCTCAT GAGCGCCGAG  |            |
| Wx1-W64Ao2 | TGGAGATGGT GGAGGACGTG CAGATCGTTC TGCTGGGCAC GGGCAAGAAG AAGTTCGAGC GCATGCTCAT GAGCGCCGAG  |            |
|            | <b>725</b>   | <b>795</b> |

**Figura 6.** Secuencia de nucleótidos del gen *Waxy 1 (Wx1)* en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2. Las variantes o SNP presentes entre ambas secuencias se encuentran señalados con asteriscos.

|            |   |             |
|------------|---|-------------|
| Wx1-K0326Y | GAGAAGTTCC CAGGCAAGGT GCGCGCCGTG GTCAAGTTCA ACGCGGCGCT GGCGCACCAC ATCATGGCCG GCGCCGACGT |             |
| Wx1-W64A02 | GAGAAGTTCC CAGGCAAGGT GCGCGCCGTG GTCAAGTTCA ACGCGGCGCT GGCGCACCAC ATCATGGCCG GCGCCGACGT |             |
|            | <b>805</b>  | <b>875</b>  |
| Wx1-K0326Y | GCTCGCCGTC ACCAGCCGCT TCGAGCCCTG CGGCCTCATC CAGCTGCAGG GGATGCGATA CGGAACGCC TCGCCTGCG   |             |
| Wx1-W64A02 | GCTCGCCGTC ACCAGCCGCT TCGAGCCCTG CGGCCTCATC CAGCTGCAGG GGATGCGATA CGGAACGCC TCGCCTGCG   |             |
|            | <b>885</b>  | <b>955</b>  |
| Wx1-K0326Y | CGTCCACCGG TGGACTCGTC GACACCATCA TCGAAGGCAA GACCGGGTTC CACATGGGCC GCCTCAGCGT CGACTGCAAC |             |
| Wx1-W64A02 | CGTCCACCGG TGGACTCGTC GACACCATCA TCGAAGGCAA GACCGGGTTC CACATGGGCC GCCTCAGCGT CGACTGCAAC |             |
|            | <b>965</b>  | <b>1035</b> |
| Wx1-K0326Y | GTCGTGGAGC CGGCGGACGT CAAGAAGGTG GCCACCACCT TGCAGCGCGC CATCAAGGTG GTCGGCACGC CGGCGTACGA |             |
| Wx1-W64A02 | GTCGTGGAGC CGGCGGACGT CAAGAAGGTG GCCACCACCT TGCAGCGCGC CATCAAGGTG GTCGGCACGC CGGCGTACGA |             |
|            | <b>1045</b>   | <b>1115</b> |
| Wx1-K0326Y | GGAGATGGTG AGGAACTGCA TGATCCAGGA TCTCTCTGG AAGGGCCCTG CCAAGAACTG GGAGAACGTG CTGCTCAGCC  |             |
| Wx1-W64A02 | GGAGATGGTG AGGAACTGCA TGATCCAGGA TCTCTCTGG AAGGGCCCTG CCAAGAACTG GGAGAACGTG CTGCTCAGCC  |             |
|            | <b>1125</b>   | <b>1195</b> |
| Wx1-K0326Y | TCGGGGTCGC CGGCGGCGAG CCAGGGGTCG AAGGCGAGGA GATCGCGCCG CTCGCCAAGG AGAACGTGGC CGCGCCCTGA |             |
| Wx1-W64A02 | TCGGGGTCGC CGGCGGCGAG CCAGGGGTTG AAGGCGAGGA GATCGCGCCG CTCGCCAAGG AGAACGTGGC CGCGCCCTGA |             |
|            | <b>1205</b>   | <b>1275</b> |
| Wx1-K0326Y | AGAGTTCGGC CTGCAGCCCC CCTGATCTCG CGCGTGATGC AAAGATGTTG GGACATCTTC TTATATATGC TGTTCGTTT  |             |
| Wx1-W64A02 | AGAGTTCGGC CTGCAGGGCC CCTGATCTCG CGCGTGGTGC AAAGATGTTG GGACATCTTC TTATATATGC TGTTCGTTT  |             |
|            | <b>1285</b>   | <b>1355</b> |
| Wx1-K0326Y | ATGTGATATG GACAAGTATG TGTAGCTGCT TGCTTGCT AGTGTAATGT AGTGATAGTG TGGCCAGTGG CACAACCTAA   |             |
| Wx1-W64A02 | ATGTGATATG GACAAGTATG TGTAGATGCT TGCTTGCT AGTGTAATGT AGTGATAGTG TGGCCAGTGG CACAACCTAA   |             |
|            | <b>1365</b>   | <b>1435</b> |
| Wx1-K0326Y | TAAGCGCATG AACTAATTGC TTGCGTGTGT AGTTAAGTAC CGATCGGTAA TTTTATATTG CGAGTAAATA AATGGACCTG |             |
| Wx1-W64A02 | TAAGCGCATG AACTAATTGC TTGCGTGTGT AGTTAAGTAC CGATCGGTAA TTTTATATTG CGAGTAAATA AATGGACCTG |             |

**Figura 6.** Continuación.

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|            | 1445       |            | 1515       |            |            |            |            |            |
| Wx1-K0326Y | TAGTGGTGGA | GTAAATAATC | CCTGCTGTTC | GGTGGTCTTA | TCGCTCCTCG | TATAGATGTT | ATAAAGAGTA | CATTTCTTT- |
| Wx1-W64A02 | TAGTGGTGGA | GTAAATAATC | CCTGCTGTTC | GGTGGTCTTA | TCGCTCCTCG | TATAGATATT | ATATAGAGTA | CATTTTCTC  |
|            |            |            |            |            |            | *          | *          | * *        |
|            | 1525       | 1535       |            |            |            |            |            |            |
| Wx1-K0326Y | --TCTGAATC | CTACGTTTTT |            |            |            |            |            |            |
| Wx1-W64A02 | TCTCTGAATC | CTACGTTTTT |            |            |            |            |            |            |

**Figura 6.** Continuación.

En la Figura 7 se muestra la secuencia de aminoácidos de la enzima ramificadora SBEIIb predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *Ae1*. Se puede observar que de los 13 SNP encontrados en este gen, 6 de ellos resultan en cambios en aminoácidos en la secuencia de la enzima en la línea CML176-QPM con respecto a W64Ao2 ubicados en las posiciones 379 His→Gln, 380 Ser→Cys, 510 Phe→Leu, 511 Ala→Thr, 512 Leu→Asn y 520 Gly→Val. El parental K0326Y-QPM presentó 5 cambios de aminoácidos en las posiciones 379 His→Gln, 380 Ser→Cys, 510 Phe→Leu, 511 Ala→Thr y 512 Leu→Asn.

La longitud de la secuencia de aminoácidos de SBEIIb predicha para K0326Y-QPM, W64Ao2 es idéntica a la reportada para la línea B73 (799 aa); sin embargo, para el parental CML176-QPM solo se obtuvieron 537 aa debido a que no se tuvo la secuencia completa para este gen. Las líneas de maíz K0326Y-QPM y CML176-QPM presentaron una mayor similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a B73, en comparación con lo observado para W64Ao2, lo cual pudiera relacionarse con la mayor similitud fenotípica que guardan estas líneas de maíz.

En el caso de la enzima GBSSI codificada por el gen *Wx1*, la línea de referencia B73 presenta una longitud de 609 aa (ID: NM\_001111531). Las secuencias obtenidas en el presente estudio para las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2 solo comprende 478 aminoácidos (Figura 8). Bao y col (2012) reportaron variaciones en la longitud para esta enzima entre los 600 y 605 aa en maíces tipo waxy procedentes de China. En relación a los 11 SNP encontrados en el gen *Wx1* solo uno de ellos provocó el cambio en un aminoácido, ubicado en la posición 54 dando como resultado Val (V) para la línea K0326Y-QPM y Asp (D) para W64Ao2 (Figura 8).

Con el fin de corroborar si los cambios obtenidos en nuestra secuencia de aminoácidos podrían jugar un papel fundamental en la actividad de la enzima, se realizó la búsqueda en la base de datos Uniprot (uniprot.org).



|               |            |            |            |            |                    |             |            |            |   |
|---------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|-------------|------------|------------|---|
|               | 5          |            |            |            |                    |             |            |            | 75  |
| SBEIIb-K0326Y |            |            |            |            |                    |             |            |            | GLFLTRGA RVGCSGTHGA MRAAAAARKA VMVPEGENDG LASRADSQF |
| SBEIIb-W64Ao2 |            |            |            |            |                    |             |            |            | GLFLTRGA RVGCSGTHGA MRAAAAARKA VMVPEGENDG LASRADSQF |
| SBEIIb-CML176 |            |            |            |            |                    |             |            |            | -----   |
|               | 85         |            |            |            |                    |             |            |            | 155   |
| SBEIIb-K0326Y | QSDELEVPI  | SEETTCGAGV | ADAQALNRVR | VVPPPSDGQK | IFQIDPMLQG         | YKYHLEYRYS  | LYRRIRSDID | EHEGGLEAFS |   |
| SBEIIb-W64Ao2 | QSDELEVPI  | SEETTCGAGV | ADAQALNRVR | VVPPPSDGQK | IFQIDPMLQG         | YKYHLEYRYS  | LYRRIRSDID | EHEGGLEAFS |   |
| SBEIIb-CML176 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----              | -----       | -----      | -----      |   |
|               | 165        |            |            |            |                    |             |            |            | 235   |
| SBEIIb-K0326Y | RSYEKFGFNR | SAEGITYREW | APGAFSAALV | GDFNNWDPNA | DRMSKNEFGV         | WEIFLPNNAD  | GTSPIPHGSR | VKVRMDTPSG |   |
| SBEIIb-W64Ao2 | RSYEKFGFNR | SAEGITYREW | APGAFSAALV | GDFNNWDPNA | DRMSKNEFGV         | WEIFLPNNAD  | GTSPIPHGSR | VKVRMDTPSG |   |
| SBEIIb-CML176 | -----      | -----      | -----      | -----      | -----              | -----       | -----      | -----      |   |
|               | 245        |            |            |            |                    |             |            |            | 315   |
| SBEIIb-K0326Y | IKDSIPAWIK | YSVQAPGEIP | YDGIYYDPPE | EVKYVFRHAQ | PKRPKSLRIY         | ETHVGMSSPE  | PKINTYVNFN | DEVLPRIKKL |   |
| SBEIIb-W64Ao2 | IKDSIPAWIK | YSVQAPGEIP | YDGIYYDPPE | EVKYVFRHAQ | PKRPKSLRIY         | ETHVGMSSPE  | PKINTYVNFN | DEVLPRIKKL |   |
| SBEIIb-CML176 | IKDSIPAWIK | YSVQAPGEIP | YDGIYYDPPE | EVKYVFRHAQ | PKRPKSLRIY         | ETHVGMSSPE  | PKINTYVNFN | DEVLPRIKKL |   |
|               | 325        |            |            |            |                    |             |            |            | 395   |
| SBEIIb-K0326Y | GYNAVQIMAI | QEHSYYGSFG | YHVTNFFAPS | SRFGTPEDLK | SLIDRAHELG         | LLVLMDEVVHS | HASSNTLDGL | NGFDGTDTHY |   |
| SBEIIb-W64Ao2 | GYNAVQIMAI | QEHSYYGSFG | YHVTNFFAPS | SRFGTPEDLK | SLIDRAHELG         | LLVLMDEVVQC | HASSNTLDGL | NGFDGTDTHY |   |
| SBEIIb-CML176 | GYNAVQIMAI | REHSYYGSFG | YHVTNFFAPS | SRFGTPEDLK | SLIDRAHELG         | LLVLMDEVVHS | HASSNTLDGL | NGFDGTDTHY |   |
|               | 405        |            |            |            |                    |             |            |            | 475   |
| SBEIIb-K0326Y | FHSGPRGHHW | MWDSRLFNYG | NWEVLRFLLS | NARWWLEEYK | <b>FDGFRFDG</b> VT | SMMYTHHGLQ  | VTFTGNFNEY | FGFATDVDAV |   |
| SBEIIb-W64Ao2 | FHSGPRGHHW | MWDSRLFNYG | NWEVLRFLLS | NARWWLEEYK | <b>FDGFRFDG</b> VT | SMMYTHHGLQ  | VTFTGNFNEY | FGFATDVDAV |   |
| SBEIIb-CML176 | FHSGPRGHHW | MWDSRLFNYG | NWEVLRFLLS | NARWWLEEYK | <b>FDGFRFDG</b> VT | SMMYTHHGLQ  | VTFTGNFNEY | FGFATDVDAV |   |

**Figura 7.** Secuencia de aminoácidos de la enzima SBEIIb en las líneas de maíz K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen *Amylose extender 1*. Se indica con asterisco las diferencias de aminoácidos entre los parentales K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2. La sección marcada con gris indica el dominio catalítico, la sección de color gris mas intenso indica la región catalítica, las letras en negrita indican los aminoácidos implicados en el sitio activo de la enzima, los aminoácidos seleccionados con flechas indican la triada catalítica de la enzima, la sección en negro indica el probable péptido transitorio ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

485 ↓ 555

SBEIIb-K0326Y VYLMLVNDLI HGLYPEAVTI **G**EDVSGMPTF ALPVHDG--G VGFDYRMHMA VADKWIDLLK QSDETWKMGD IVHTLTNRRW

SBEIIb-W64A02 VYLMLVNDLI HGLYPEAVTI **G**EDVSGMPTL TNPVHDG--G VGFDYRMHMA VADKWIDLLK QSDETWKMGD IVHTLTNRRW

SBEIIb-CML176 VYLMLVNDLI HGLYPEAVTI **G**EDVSGMPTF ALPVHDG--G VVFDYRIHMA VADKWIDLLK QSDETWKMGD IVHTLTNRRW

565 ↓ \* \* \* 635

SBEIIb-K0326Y LEKCVTYAES **H**DQALVGDKT IAFWLMDKDM YDFMALDRPS TPTIDRGIAL HKMIRLITMG LGGEGYLNFMGNEFGHPEWI

SBEIIb-W64A02 LEKCVTYAES **H**DQALVGDKT IAFWLMDKDM YDFMALDRPS TPTIDRGIAL HKMIRLITMG LGGEGYLNFMGNEFGHPEWI

SBEIIb-CML176 LEKCVTYAES **H**DQALVGDKT IAFWLMDKDM YDFMALDRPS TPTIDRGIAL HKMIRLITMG LGGEGYLNFMGNEFGHPEWI

645 715

SBEIIb-K0326Y DFPRGPQRLP SGKFIPGNNN SYDKCRRRFD LGDADYLRYP GMQEFDQAMQ HLEQKYEFMT SDHQYISRKH EEDKVIVFEK

SBEIIb-W64A02 DFPRGPQRLP SGKFIPGNNN SYDKCRRRFD LGDADYLRYP GMQEFDQAMQ HLEQKYEFMT SDHQYISRKH EEDKVIVFEK

SBEIIb-CML176 DFPRGPQRLP SGKFIPGNNN SYDKCRRRFD LGDADYLRYP GMQEFDQAMQ HLEQKYEFMT SDHQYISRKH EEDKVIVFEK

725 795

SBEIIb-K0326Y GDLVVFVNFH CNNSYFDYRI GCRKPGVYKV VLDS DAGLFG GFSRIHAAE HFTADCSDHN RPYSFSVYTP SRTC VVYAPV

SBEIIb-W64A02 GDLVVFVNFH CNNSYFDYRI GCRKPGVYKV VLDS DAGLFG GFSRIHAAE HFTADCSDHN RPYSFSVYTP SRTC VVYAPV

SBEIIb-CML176 GDLVVFVNFH CNNSYFDYRI GCRKPGVYKV VLDS DAGLFG GFSRIHAAE HFTADCSDHN RPYSFSVYTP SRTC VVYAPV

801

SBEIIb-K0326Y E

SBEIIb-W64A02 E

SBEIIb-CML176 E

**Figura 7.** Continuación.

|              |  |     |
|--------------|--|-----|
| 5            |  | 75  |
| GBSS1-K0326Y | WDTSVVSEIK MGDGYETVRF FHCYKRGVDR VFVDHPLFLE RVWGKTEEKI YGPVAGTDYR DNQLRFSLLC QAALAPRIL         |     |
| GBSS1-W64Ao2 | WDTSVVSEIK MGDGYETVRF FHCYKRGVDR VFVDHPLFLE RVWGKTEEKI YGPDAGTDYR DNQLRFSLLC QAALAPRIL         |     |
| 85           | *  | 155 |
| GBSS1-K0326Y | SLNPNPYFSG PYGEDVVFVC NDWHTGPLSC YLKSNEYQSHG IYRKTAFCI HNISYQGRFA FSDYPELNLP ERFKSSFDFI        |     |
| GBSS1-W64Ao2 | SLNPNPYFSG PYGEDVVFVC NDWHTGPLSC YLKSNEYQSHG IYRKTAFCI HNISYQGRFA FSDYPELNLP ERFKSSFDFI        |     |
| 165          |  | 235 |
| GBSS1-K0326Y | DGYEKPVEGR KINWMKAGIL EADRVLTVSP YYAEELISGI ARGCELDNIM RLTGITGIVN GMDVSEWDPS RDKYIAVKYD        |     |
| GBSS1-W64Ao2 | DGYEKPVEGR KINWMKAGIL EADRVLTVSP YYAEELISGI ARGCELDNIM RLTGITGIVN GMDVSEWDPS RDKYIAVKYD        |     |
| 245          |  | 315 |
| GBSS1-K0326Y | VSTAVEAKAL NKEALQAEVG LPVDRNIPLV AFIG <b>RLEEQK</b> GPDVMAAAIP QLMEMVEDVQ IVLLGTGKKKFERMLMSAEE |     |
| GBSS1-W64Ao2 | VSTAVEAKAL NKEALQAEVG LPVDRNIPLV AFIG <b>RLEEQK</b> GPDVMAAAIP QLMEMVEDVQ IVLLGTGKKKFERMLMSAEE |     |
| 325          |  | 395 |
| GBSS1-K0326Y | KFPGKVRVAV <b>K</b> FNAALAHHI MAGADVLAVT SRFEPCLIQ LQGMRYGTPC ACASTGGLVD TIEGKTGFHMGRLSVDCNV   |     |
| GBSS1-W64Ao2 | KFPGKVRVAV <b>K</b> FNAALAHHI MAGADVLAVT SRFEPCLIQ LQGMRYGTPC ACASTGGLVD TIEGKTGFHMGRLSVDCNV   |     |
| 405          |  | 475 |
| GBSS1-K0326Y | VEPADVKKVA TTLQRAIKVV GTPAYEEMVR NCMIQDLSWK GPAKNWENVL LSLGVAGGEP GVEGEEIAPL AKENVAAP          |     |
| GBSS1-W64Ao2 | VEPADVKKVA TTLQRAIKVV GTPAYEEMVR NCMIQDLSWK GPAKNWENVL LSLGVAGGEP GVEGEEIAPL AKENVAAP          |     |

**Figura 8.** Secuencia de aminoácidos de la enzima GBSSI en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen *Waxy 1*. Se indican con asterisco las diferencias de aminoácidos entre las dos líneas, la sección marcada con gris indica los dominios predichos de la proteína, las letras en negrita indican los aminoácidos implicados en sitios de unión a ADP ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

En el caso de la enzima SBEIIb se encontraron 7 aminoácidos implicados en el sitio activo de la enzima en las posiciones: Asp<sup>442</sup>, Arg<sup>445</sup>, Asp<sup>447</sup>, Gly<sup>448</sup>, Glu<sup>502</sup>, His<sup>571</sup> y Asp<sup>570</sup>, mismos que se encuentran conservados en los tres parentales, coincidiendo con lo reportado por Kumar (2011) quien identificó la secuencia motivo de los miembros de la familia de la glucósido hidrolasa 13. Dentro de este grupo de aminoácidos se destaca la triada Asp<sup>447</sup>, Glu<sup>502</sup>, Asp<sup>570</sup> la cual está implicada en la catálisis de la enzima generando enlaces de ramificación  $\alpha$ -1,6 en los glucanos  $\alpha$  a través de la escisión de los enlaces  $\alpha$ -1,4 internos (Barker y Bourne, 1953). Esta misma triada fue reportada por Kuriki y col. (1996) al analizar el centro activo de la enzima ramificadora II del endospermo de maíz mediante mutagénesis dirigida.

Libessart y Preiss (1998) y Funane y col. (1998) realizaron análisis de mutaciones y estudios de modificación química con SBEIIb de maíz demostrando la importancia de Arg<sup>445</sup> conservada para la catálisis y mostraron que dos residuos de histidina conservados (His<sup>381</sup> en la región 1 y His<sup>569</sup> de la región 4 del sitio catalítico) son críticos para la unión del sustrato; dichos aminoácidos se lograron identificar correctamente en el presente estudio. La enzima también presenta un péptido transitorio N terminal de aproximadamente 57 aminoácidos, el cual se encuentra conservado en los parentales K0326Y-QPM y W64Ao2 (Figura 8), lo que coincide con lo reportado por Fisher y col. (1993) quienes evaluaron la enzima ramificadora del almidón II en el endospermo de maíz.

Para la enzima GBSSI se encontraron 7 sitios de unión a ADP en las posiciones: Lys<sup>95</sup>, Gly<sup>100</sup>, Asp<sup>405</sup>, Lys<sup>411</sup>, Lys<sup>462</sup>, Lys<sup>602</sup>, Gln<sup>491</sup>, mismos que se encuentran conservados en los parentales K0326Y-QPM y W64Ao2. Estos sitios de unión a ADP coinciden con lo reportado por Momma y Fujimoto (2012) en estudios realizados en arroz (*Oryza sativa subsp. Japonica*). Taira y col. (1996) reportaron que esta enzima presenta un péptido transitorio al igual que la enzima SBEIIb de aproximadamente 70 aminoácidos, el cual no fue posible identificar en el presente estudio ya que la secuencia obtenida fue incompleta en la región 5'.

Algunos polimorfismos pueden ser responsables de crear nuevos fenotipos dependiendo de la región en la que se localicen. Se sabe que polimorfismos ubicados

en sitios regulatorios de un gen pueden llegar a afectar la tasa de transcripción y por lo tanto modificar la expresión de su proteína. Por otro lado, los polimorfismos encontrados en regiones codificantes ocurren en menor frecuencia (Nickerson y col., 1998), aunque existen reportes de mutaciones de un solo nucleótido dentro de regiones codificantes que pueden resultar en alteraciones en la expresión, así como en el plegado de sus proteínas afectando de una manera antagónica o sinérgica la actividad de las enzimas (Chamary y col., 2006; Gupta y Lee, 2008).

Wu y col. (2015) caracterizaron los genes que codifican para las enzimas pullulanasa y almidón sintasa III (*Zpu1* y *SSIII*) en materiales contrastantes en vitrosidad (*W64A+*, *W64Ao2* y *K0326Y*) donde pudieron observar que *W64A+* y *W64Ao2* conservaban el mismo alelo para *Zpu1* mientras que *K0326Y* presentó cuatro polimorfismos en las posiciones 1,789(C>T), 2,284(A>T), 2,854(A>C) y 2,966(T>A), resaltando el polimorfismo ubicado en la posición 2,854 ya que provocó un cambio en la secuencia de aminoácidos para la enzima pullulanasa (955 Thr→Pro). Los autores observaron una actividad significativamente mayor en la enzima pullulanasa de *K0326Y* con respecto a *W64Ao2* y *W64A+* .

El análisis de la secuencia del gen *Ae1* mostró la presencia de polimorfismos implicados en el cambio de aminoácidos localizados en la región codificante, de los cuales cuatro se localizaron en el sitio activo de la enzima ramificadora (*SBEIIb*) sustituyendo: 379 His→Gln, 380 Ser→Cys, 510 Phe→Leu, 511 Aln→Thr, 512 Leu→Asp y 520 Gly→Val. Es de resaltar los cambios de aminoácidos en las posiciones 510, 511, 512, 520 ya que se encontraron muy cercanos a uno de los aminoácidos implicados en el sitio catalítico (Glu<sup>502</sup>) (Kuriki y col., 1996) de dicha enzima y a su vez podrían estar interfiriendo en la actividad de la misma. González Núñez (2016) evaluó la actividad de las enzimas *SBEIIb* y *GBSSI* en endospermo en desarrollo (30 DDP) de *K0326Y-QPM* y *W64Ao2*, encontrando una mayor actividad de la enzima *SBEIIb* en *W64Ao2*, la cual forma ramificaciones con enlaces  $\alpha$ -(1-6) durante la biosíntesis de la amilopectina en el gránulo de almidón, lo cual a su vez correspondió con un mayor contenido de amilopectina en esta línea. En cambio, la enzima *GBSSI* presentó una mayor actividad en la línea *K0326Y-QPM* (4.55 U/g PF) con respecto a

W64Ao2 (3.3U/g PF), lo cual coincidió con el mayor contenido de amilosa en K0326Y-QPM. Estos resultados sugieren que las variantes nucleotídicas encontradas en el alelo de K0326Y-QPM del gen *Wx1* podrían estar relacionadas con la mayor actividad de la enzima GBSSI en esta línea, mientras que las variantes del alelo de W64Ao2 del gen *Ae1* podrían ser responsables de la mayor actividad de SBEIIb en la línea opaca. Sin embargo, el demostrar esta asociación requiere expresar las variantes alélicas en un sistema heterólogo y evaluar la actividad enzimática de la proteína purificada.

## **B EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN RIL DERIVADAS DE K0326Y-QPM x W64Ao2 Y CML176QPM x W64Ao2**

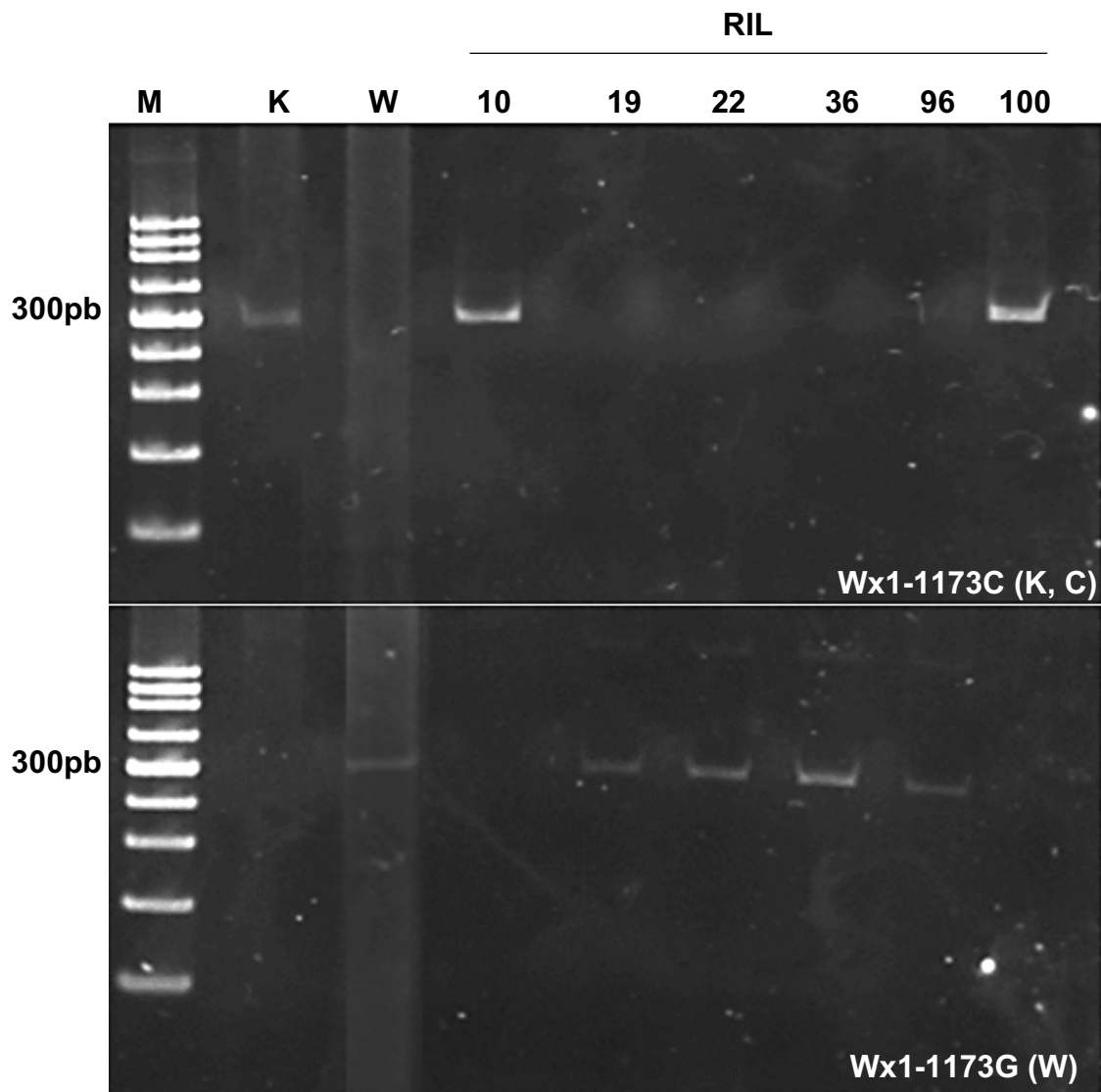
Para la evaluación de los polimorfismos de genes de síntesis de almidón en las RIL se diseñaron oligos alelo específicos para K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64Ao2. En el Cuadro 7 se muestra la descripción de estos marcadores para los genes *Wx1* y *Ae1*, donde se indica la secuencia de los oligos y las condiciones más críticas de la reacción de PCR. En la Figura 9 se muestra la separación del fragmento amplificado por PCR para la obtención del genotipo del marcador *Wx1*-1173(C/G) en las líneas parentales K0326Y-QPM y W64Ao2, así como 6 RIL derivadas de su cruce y contrastantes en vitrosidad; el polimorfismo para este marcador se identificó por las variantes en los nucleótidos C/G en las RIL para K0326Y-QPM (10, 100) y W64Ao2 (19, 22, 36, 96).

Se realizó un análisis de ligamiento entre el genotipo de los marcadores para los genes *Wx1* y *Ae1* y el de 22 SSR reportados por Holding y col (2011) para la población de RIL derivadas de K0326Y-QPM x W64Ao2, así como con 14 SSR en RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2 (Grimaldi-Olivas (2017)). Los grupos de ligamiento en los cromosomas 5 y 9 para la población de RIL derivadas de K0326Y-QPM x W64Ao2 se muestra en la Figura 10. Los marcadores *Ae1*-1136, *Ae1*-1509 y *Ae1*-1579 se localizaron a una distancia de 4.6 cM del microsatélite Bnlg2323, el cual está ubicado en el bin 5.04 muy cercano al gen *Ae1*.

**Cuadro 7.** Descripción de los marcadores utilizados para el mapeo genético.

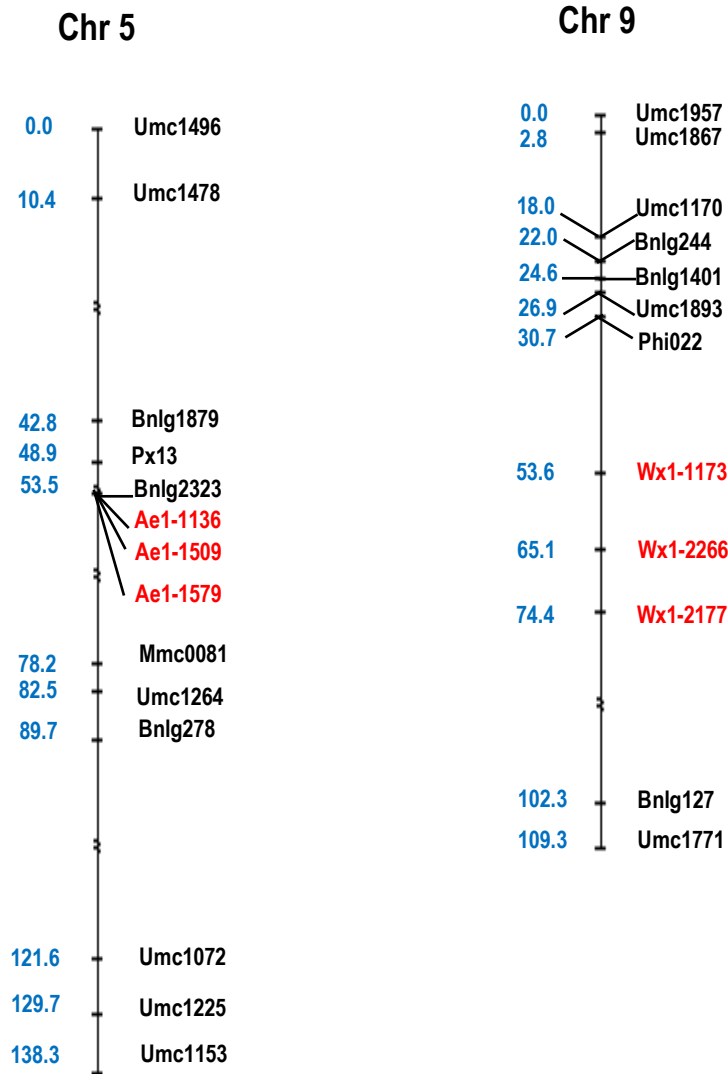
| Genes      | Nombre                       | Secuencia de los iniciadores<br>(5' - 3') | Tm<br>(°C) | Región |
|------------|------------------------------|---|------------|--------|
| <i>ae1</i> | F:Ae1509-T(K, C)             | GGAATGCCTACATTAACCAA                      | 56         | ORF    |
|            | F:Ae1509-A (W)               | GGAATGCCTACATTTGCCCT                      |            | ORF    |
|            | R:Ae-c2                      | TCTTGTCGCCGACTAATGCT                      |            |        |
|            | F: Ae1-1579-T(K, C)          | GTAGGTTTTGACTATCGGATG<br>CAC              | 58         | ORF    |
|            | F:Ae1-1579-C(W)              | GTAGGTTTTGACTATCGGATG<br>CAT              |            | ORF    |
|            | Ae-c2R                       | TCTTGTCGCCGACTAATGCT                      |            |        |
| <i>wx1</i> | F:Wx1-1926C-<br>1927C (K, C) | AGAGTTCGGCCTGCAGCC                        | 63         | 3'UTR  |
|            | F:Wx1-1926G-<br>1927G(W)     | AGTTCGGCCTGCAGGG                          |            | 3'UTR  |
|            | R: Wx1-2177-2178             | CGATAAGAACACCGAACAGCA<br>GGGA             | 55         |        |
|            | F:Wx1-2266C (K, C)           | GTGATATGGACAAGTATGTGT<br>AGC              |            | 3'UTR  |
|            | F:Wx1-2266A (W)              | TGTGATATGGACAAGTATGTG<br>TAGA             |            | 3'UTR  |
|            | R: WX-2266                   | CTATACGAGGAGCGATAA                        |            |        |
|            | F: WX1-1173                  | GAAGGACGACTTGAATCTCTC<br>C                | 58         |        |
|            | R: Wx1R1173-G (K,<br>C)      | CTCAACAACAACCCATACTTCT<br>CC              |            | ORF    |
|            | R: Wx1R1173-C(W)             | CTCAACAACAACCCATACTTCT<br>CG              |            | ORF    |

F: Forward (5'-3'); R: Reverse (3'-5'); Ta: Temperatura de alineamiento; *Ae1*: *Amylose extender 1*; *Wx1*: *Waxy 1*. ORF: Open Reading frame; 3-UTR: Region 3' no-traducida.

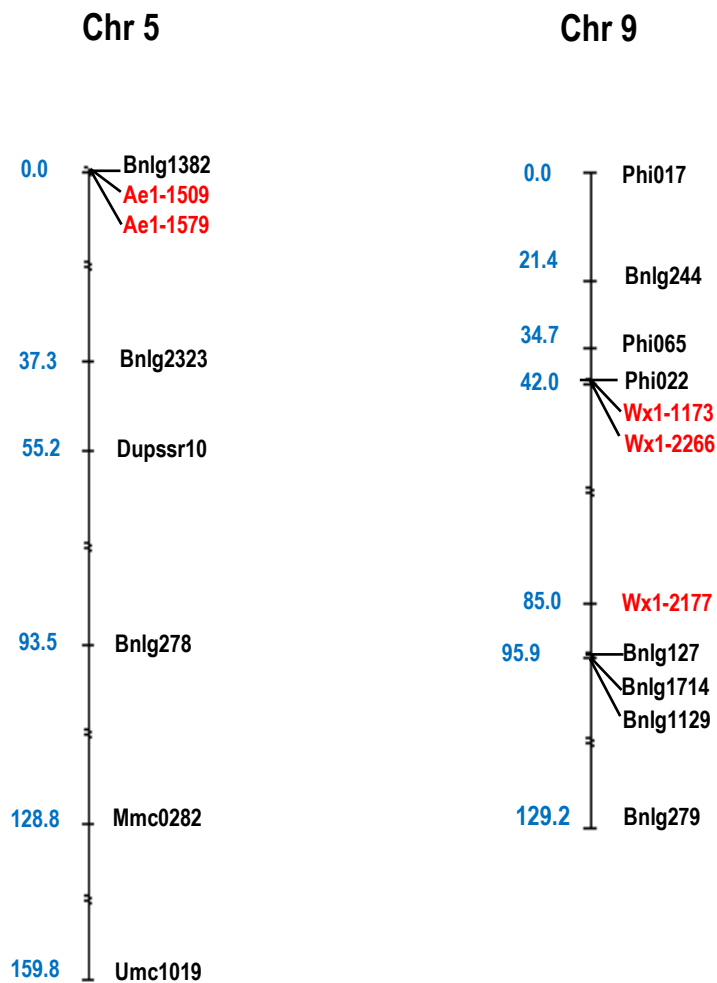


**Figura 9.** Análisis electroforético de polimorfismos en el gen *Wx1* ubicado en la posición 1,173 (C>G). Se muestran los resultados de marcador en los parentales K0326Y-QPM, W64Ao2 y 6 líneas recombinantes (RIL) derivadas de su cruce.





**Figura 10.** Mapeo de los marcadores Ae1-1136, Ae1-1509, Ae1-1509, Wx1-1173, Wx1-2266 y Wx1-2177 en una población derivada de K0326Y-QPM x W64Ao2. Los grupos de ligamiento de los microsatélites utilizados corresponden a los cromosomas 5 y 9. La distancia genética se indica en centimorgan (cM). En color rojo se indican los SNAP utilizados para cada gen.



**Figura 11.** Mapeo de los marcadores Ae1-1509, Ae1-1579, Wx1-1173, Wx1-2266 y Wx1-2177 en una población derivada de CML176-QPM x W64Ao2. Los grupos de ligamiento de los microsatelites utilizados corresponden a los cromosomas 5 y 9. La distancia genética se indica en centimorgan (cM). En color rojo se indican los SNAP utilizados para cada gen.

En el caso de los tres marcadores para el gen *Wx1* (*Wx1-1173*, *Wx1-2177* y *Wx1-2266*), *Wx1-1173* se encontró ligado al microsatélite *Phi022* (22.9 cM), cuyo locus corresponde al gen *Wx1*(<http://www.maizegdb.org>).

En la Figura 11 se observa la ubicación de los marcadores *Ae1-1509* y *Ae1-1579* en la población derivada de *CML176-QPM x W64Ao2* para el cromosoma 5, los cuales se localizaron cerca del marcador *Bnlgl382* (37.3 cM) que a su vez se ubica en el bin 5.04 cercano al gen *Ae1*. En el cromosoma 9, los marcadores *Wx1-1173* y *Wx1-2266* se encontraron fuertemente ligados al marcador *Phi022* y a una distancia de 53.9 cM del marcador *Bnlgl127*, mientras que el marcador *Wx1-2177* se localizó a una distancia de 43 y 10.9 cM de los microsatélites *Phi022* y *Bnlgl127*, respectivamente. ubicándose cercanos al Bin 9.3 donde se encuentra el gen *Wx1*. El análisis de ligamiento confirmó la ubicación de los marcadores específicos para cada uno de sus genes (<http://www.maizegdb.org>).

## **C VARIABILIDAD EN PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN EN EL ENDOSPERMO DE RIL DERIVADAS DE CML176-QPM x W64Ao2.**

### **1 Contenido de amilosa**

La amilosa es un componente importante ya que es responsable de los procesos de gelificación y retrogradación del almidón cuando éste es sometido a procesamiento como cocción y almacenamiento, por lo que RIL con bajo contenido de amilosa pudieran ser seleccionadas para productos con textura más suave y mayor digestibilidad (Biliaderis, 1991).

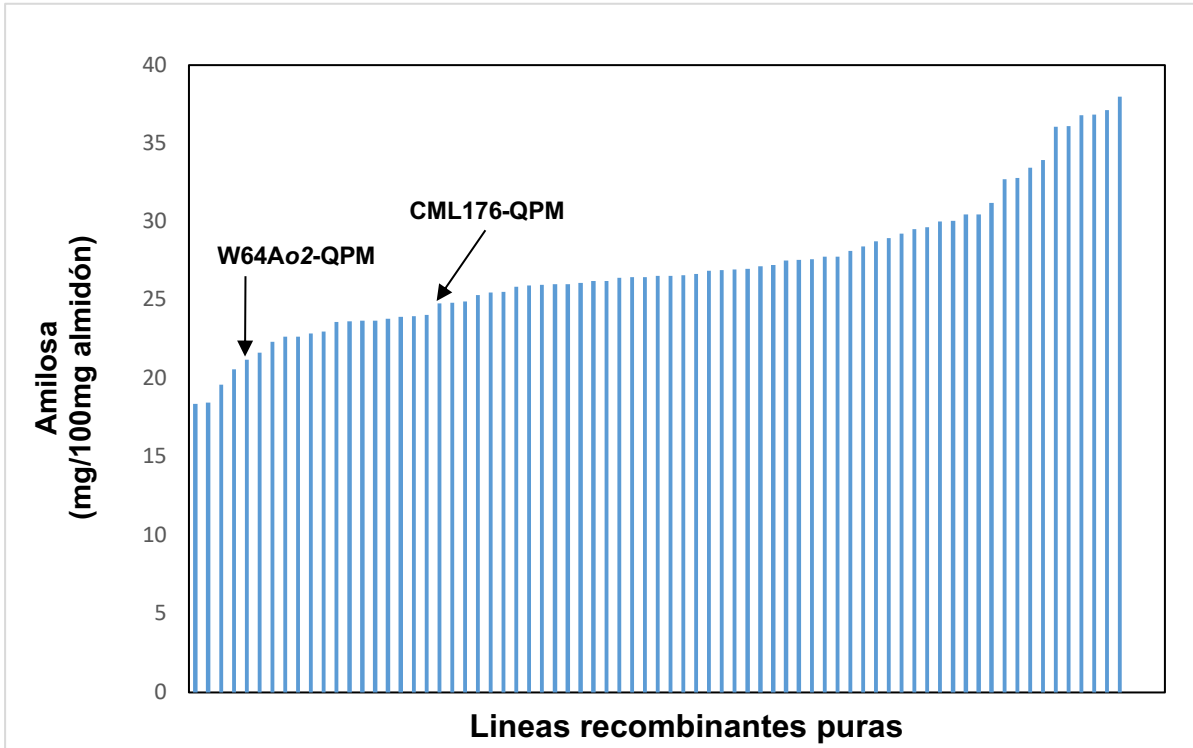
Los contenidos de amilosa obtenidos para las líneas parentales fueron de 21.1% para *W64Ao2* y 24.56% para *CML176*. Sánchez y col. (2007) y Hasjim y col. (2009) reportaron en líneas QPM valores promedio de amilosa de 27.7% y 26%, respectivamente, los cuales fueron cercanos a los obtenidos para la línea parental *CML176-QPM* en este estudio.

Las RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2 presentaron un rango de variación de 18.49% a 33.96% (Figura 12), el cual corresponde con lo reportado previamente por De la Rosa-Millán y col. (2010) y Agama-Acevedo y col. (2011) quienes reportaron un rango del 13 al 33.3% para maíces azules de nuestro país. De manera general, los granos opacos presentaron un menor contenido de amilosa, mientras que en los granos vítreos se observó lo opuesto. Estos resultados son similares a los reportados previamente para otros genotipos QPM (Hasjim y col., 2009).

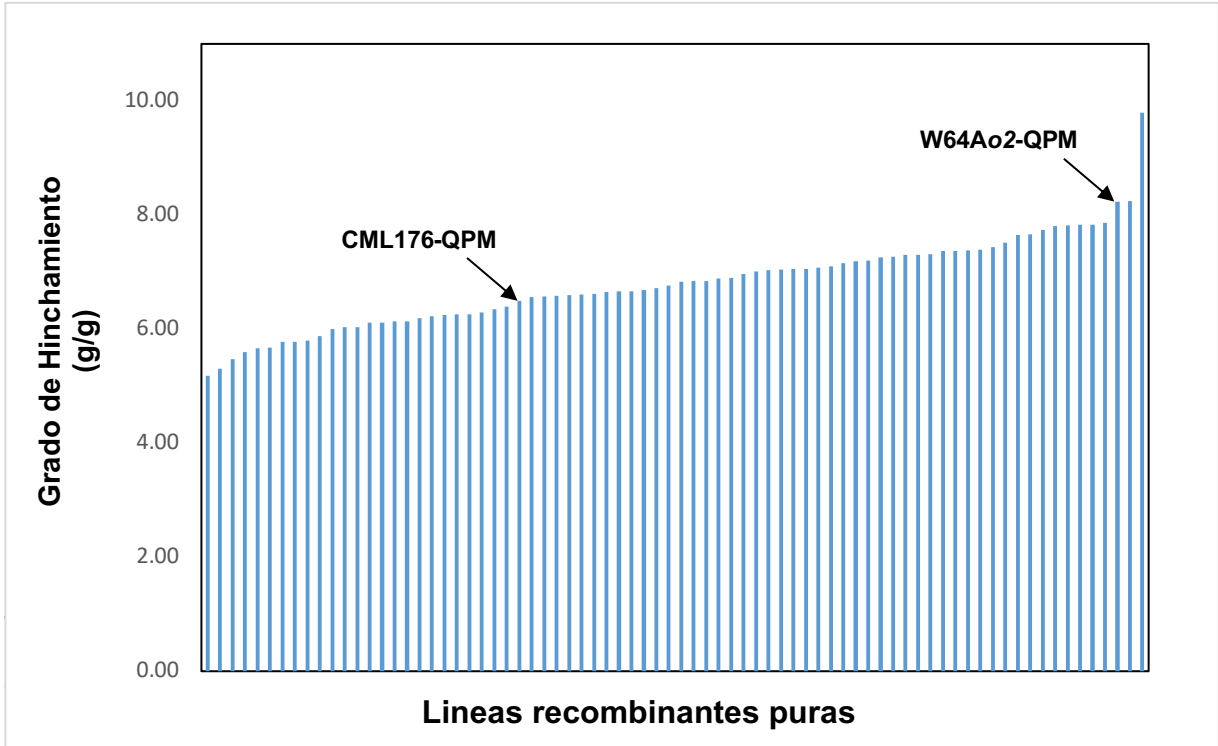
## **2 Grado de hinchamiento**

El grado de hinchamiento (GH) se utiliza frecuentemente como una medida indirecta de la adquisición de agua durante la gelatinización del almidón (Konik-Rose y col., 2001). Los valores de GH obtenidos para las RIL derivadas de CML176 x W64Ao2 variaron de 5.17 a 9.79 g/g (Figura 13), siendo estos valores similares al rango de de 5.63 a 10.09 g/g reportado por Álvarez Hernández (2014) en RIL derivadas de K0326Y-QPM x W64o2 e inferiores al rango de 12.6-16.7 g/g reportado por Hasjim y col. (2009) en algunos genotipos o2 y QPM, lo cual se puede atribuir a diferencias en la base genética y el método empleado en la determinación. Sin embargo, el rango de valores obtenido en el presente estudio sugiere una amplia variabilidad en las propiedades que dependen de este parámetro, como lo son las reológicas.

El hinchamiento de los gránulos de almidón está relacionado con la disrupción parcial de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares y depende de muchos factores, dentro de los que destacan la composición y estructura del gránulo. Debido a que el almidón ceroso (casi 100% amilopectina) se hincha más que el almidón normal, GH parecer ser una propiedad principalmente asociada con la amilopectina; la presencia de regiones menos cristalinas en el gránulo por la distribución asimétrica de moléculas de amilopectina parece favorecer la entrada del agua y por lo tanto el GH, mientras que la amilosa puede actuar como un diluyente o bien formar complejos con lípidos que inhiben el hinchamiento (Tester y col., 1993).



**Figura 12.** Variación en el contenido de amilosa de las líneas de maíz CML176-QPM, W64Ao2 y 76 RIL derivadas de su cruce. Los valores representan la media de tres determinaciones con tres repeticiones en cada una de ellas.



**Figura 13.** Variación en grado de hinchamiento de las líneas de maíz CML176-QPM, W64Ao2 y 76 RIL derivadas de su cruce. Los valores representan la media de tres determinaciones con tres repeticiones en cada una de ellas.

En este sentido, el GH es inversamente proporcional al contenido de amilosa de los parentales y las RIL; el parental CML176-QPM con un endospermo vítreo y valor alto

de amilosa (24.56%) mostró un valor de GH bajo ( 6.42 g/g) mientras que la línea W64Ao2 con un endospermo blando y contenido relativamente bajo de amilosa (21.12%) presentó un valor de GH más alto (9.22 g/g); estos resultados corresponden con otros estudios donde reportan que endospermos duros necesitan más tiempo para la hidratación (Dombrink-Kurtzman y Knutson, 1997).

## **D ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN Y CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA MODIFICACIÓN DEL ENDOSPERMO EN LÍNEAS DE MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA**

La asociación o mapeo genético se realizó entre los polimorfismos de los genes de síntesis de almidón y los datos cuantitativos de características relacionadas con la modificación del endospermo evaluadas por Álvarez Hernández (2014) en la población derivada de K0326Y-QPM x W64Ao2 (vitrosidad, amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización) y para las RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2 la característica de vitrosidad evaluada previamente por Grimaldi-Olivas (2017), así como el contenido de amilosa y grado de hinchamiento evaluadas en el presente estudio.

La vitrosidad presentó una asociación significativa con los marcadores Ae1-1509 y Wx1-1173 en la población de K0326Y-QPM x W64Ao2 (KxW) (Cuadro 8), mientras que en la población de CML176-QPM x W64Ao2 (CxW) se encontró asociación con los marcadores Ae1-1579 y Wx1-1173 (Cuadro 9), ubicados en los genes que codifican para las enzimas almidon sintasa unida al gránulo (GBSSI) y ramificadora de almidón IIb (SBEIIb), respectivamente. Análisis genéticos previos en maíz han identificado loci asociados con características de dureza en los cromosomas 5 y 9, cercanos a los genes Ae1 y Wx1 (Holding y col., 2008; Rojas y col., 2010; Holding y col., 2011; Apodaca Tamayo, 2017).

**Cuadro 8.** Asociación entre polimorfismos de genes de síntesis de almidón y características relacionadas con la modificación del endospermo en 90 RIL derivadas de K0326Y-QPM x W64Ao2.

| <b>Gen</b>                          | <b>Marcador</b> | <b>Chr</b> | <b>LSR</b> | <b>LSR</b>    | <b>Varianza</b> | <b>Efecto</b>  |
|-------------------------------------|-----------------|------------|------------|---------------|-----------------|----------------|
|                                     |                 |            |            | <b>limite</b> | <b>(%)</b>      | <b>aditivo</b> |
| <b>Vitrosidad</b>                   |                 |            |            |               |                 |                |
| <b>Ae1</b>                          | Ae1-1509        | 5          | 12.8       | 9.5           | 9               | +              |
| <b>Wx1</b>                          | Wx1-1173        | 9          | 11.3       | 9.0           | 9               | +              |
| <b>Amilosa</b>                      |                 |            |            |               |                 |                |
| <b>Ae1</b>                          | Ae1-1136        | 5          | 11.8       | 8.9           | 10              | +              |
| <b>Wx1</b>                          | Wx1-2266        | 9          | 15         | 12.8          | 13              | +              |
| <b>Grado de hinchamiento</b>        |                 |            |            |               |                 |                |
| <b>Ae1</b>                          | Ae1-1509        | 5          | 12.4       | 8.7           | 14              | +              |
| <b>Wx1</b>                          | Wx1-1173        | 9          | 14.8       | 10            | 8               | -              |
| <b><math>\Delta H_g</math>(J/g)</b> |                 |            |            |               |                 |                |
| <b>Ae1</b>                          | Ae1-1509        | 5          | 11.9       | 9.0           | 12              | +              |
| <b>Wx1</b>                          | Wx1-2266        | 9          | 19.2       | 11.8          | 10              | +              |

LRS: cociente de máxima verosimilitud, obtenido a partir de mapeo por intervalos compuesto. Valores significativos ( $\alpha=0.05$ )

**Cuadro 9.** Asociación entre polimorfismos de genes de síntesis de almidón y características relacionadas con la modificación del endospermo en 76 RIL derivadas de CML176-QPM x W64Ao2.



| <b>Gen</b>                   | <b>Marcador</b> | <b>Chr</b> | <b>LSR</b> | <b>LSR<br/>limite</b> | <b>Varianza<br/>(%)</b> | <b>Efecto<br/>aditivo</b> |
|------------------------------|-----------------|------------|------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Vitrosidad</b>            |                 |            |            |                       |                         |                           |
| <b>Ae1</b>                   | Ae1-1579        | 5          | 14.8       | 7.5                   | 35                      | -                         |
| <b>Wx1</b>                   | Wx1-1173        | 9          | 11.5       | 6.1                   | 21                      | -                         |
| <b>Amilosa</b>               |                 |            |            |                       |                         |                           |
| <b>Wx1</b>                   | Wx1-1173        | 9          | 18.6       | 14.2                  | 26                      | -                         |
| <b>Grado de hinchamiento</b> |                 |            |            |                       |                         |                           |
| <b>Ae1</b>                   | Ae1-1509        | 5          | 16.6       | 12.8                  | 30                      | -                         |
| <b>Wx1</b>                   | Wx1-1173        | 9          | 14.5       | 14.2                  | 41                      | +                         |

LRS: cociente de máxima verosimilitud, obtenido a partir de mapeo por intervalos compuesto. Valores significativos ( $\alpha=0.05$ )

El marcador Wx1-1173 se encontró asociado con vitrosidad y amilosa, lo que coincide con la correlación positiva y significativa observada previamente por Álvarez

Hernández (2014) y Grimaldi-Olivas (2017) para estas dos características de dureza del grano en las poblaciones KxW y CxW, respectivamente. Esto corresponde a su vez con la hipótesis previa que relaciona el incremento de regiones amorfas de amilosa en la periferia de los gránulos del endospermo duro con una mayor compactación y forma poligonal en los mismos (Dombrink-Kurtzman y Knutson, 1997; Salazar-Salas y col., 2014).

El contenido de amilosa se encontró asociado con los marcadores Ae1-1136 y Wx1-2266 para los genes *Ae1* y *Wx1* en la población KxW, los cuales explican en promedio el 10 y 13% de la variación observada (Cuadro 8), mientras que para la población de CxW sólo se encontró asociación con el marcador Wx1-1173 para *Wx1* que explica el 26% de la variación en el contenido de amilosa (Cuadro 9). González Núñez (2016) analizó la actividad de SBEIIb y GBSSI en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2 a los 30 DPP, encontrando una mayor acumulación de la proteína GBSSI y un mayor contenido de amilosa en la línea K0326Y-QPM, mientras que en el caso de SBE observó una menor actividad en esta línea y correspondió con un menor contenido de amilopectina (González Núñez, 2016).

El grado de hinchamiento y la entalpía de gelatinización de la población KxW mostraron una asociación significativa con los marcadores Wx1-1173, Wx1-2266, Ae-1509, explicando en conjunto el 22% de la variación observada en cada una de las características (Cuadro 8). En la población CxW solo se evaluó el grado de hinchamiento permitiendo una asociación con los marcadores Wx1-1173 y Ae1-1509 que explican el 41 y 30% de la variación observada, respectivamente (Cuadro 9) . Esta asociación pudiera deberse a que tanto la entalpía de gelatinización como el grado de hinchamiento se ven grandemente influenciadas por la cristalinidad del gránulo, la cual a su vez se relaciona con la proporción de amilopectina en esta estructura, por lo que contenidos altos de amilosa resultan en una disminución de estas características (Matveev y col., 2001; Tester y col., 2004). Los cambios en la composición del almidón se ven reflejados en alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas, ya que por ejemplo un aumento en el contenido de amilosa aumenta las regiones amorfas y compresibilidad de los gránulos de almidón, lo cuales presentan

una mayor compactación y de esta forma pueden contribuir al fenotipo vítreo asociado con la modificación del endospermo en QPM (Jia y col., 2013; Salazar-Salas y col., 2014).

## **IX CONCLUSIONES**

- El análisis de secuencias de genes de síntesis de almidón reveló 24 polimorfismos entre las líneas K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64A $\alpha$ 2 que corresponden a una variación nucleotídica de 0.28%.
- Algunos de los polimorfismos observados en los genes *Wx1* y *Ae1* resultaron en cambios de aminoácidos en los sitios activos de las enzimas almidón sintasa unida al gránulo (GBSS1) y ramificadora del almidón (SBEIIb), lo que sugiere que estas variaciones podrían estar relacionadas con las diferencias de actividad enzimática y propiedades fisicoquímicas del almidón observadas entre las líneas K0326Y-QPM, CML176-QPM y W64A $\alpha$ 2.
- La variación en vitrosidad y propiedades fisicoquímicas del almidón de dos poblaciones de maíz de calidad proteínica (QPM) se asoció significativamente con polimorfismos de los genes de síntesis de almidón *Wx1* y *Ae1*, lo que sugiere que las variantes alélicas de estos genes son responsables de cambios en la proporción amilosa/amilopectina y propiedades del gránulo de almidón, las cuales a su vez tienen gran influencia en la conversión del fenotipo blando a vítreo en el endospermo de maíz QPM.

## X BIBLIOGRAFÍA

- Agama-Acevedo E, Salinas-Moreno Y, Pacheco-Vargas G, Bello-Pérez L. 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:317-329.
- Álvarez Hernández HA. 2014. Análisis genético de características de calidad proteínica y propiedades fisicoquímicas del almidón en maíz QPM [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autonoma de Sinaloa 103 p.
- Apodaca Tamayo I. 2017. Identificación de loci genéticos asociados con características de dureza en una población derivada del maíz de calidad proteínica CML176-QPM [Tesis de Licenciatura]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autonoma de Sinaloa. 86 p.
- Baker LA, Rayas-Duarte P. 1998. Freeze-thaw stability of amaranth starch and the effects of salt and sugars. *Cereal Chemistry* 75(3):301-307.
- 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* 55(4):1054-1059.
- Barker SA, Bourne EJ. 1953. Enzymic synthesis of polysaccharides. *Quarterly Reviews, Chemical Society* 7(1):56-83.
- Biliaderis C. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69:60-78.
- Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD. 2006. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nature Reviews Genetics* 7(2):98-108.
- Chandrashekar A, Mazhar H. 1999. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. *Journal of Cereal Science* 30(3):193-207.
- Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138(3):963-971.
- Comparot-Moss S, Denyer K. 2009. The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *Journal of Experimental Botany* 60(9):2481-2492.
- Dannenhoffer JM, Bostwick DE, Or E, Larkins BA. 1995. opaque-15, a maize mutation with properties of a defective opaque-2 modifier. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92(6):1931-1935.

- De la Rosa-Millán J, Agama-Acevedo E, Jimenez-Aparicio AR, Bello-Pérez LA. 2010. Starch characterization of different blue maize varieties. *Starch - Stärke* 62(11):549-557.
- Dombrink-Kurtzman MA, Knutson CA. 1997. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. *Cereal Chemistry* 74(6):776-780.
- Eckhoff S, Paulsen M, Yang S. 2003. Maize. En: Caballero B, Trugo LC, Finglas PM, editores. Encyclopedia of Food Science and Nutrition. 2da ed. Oxford: Academic Press Elsevier Science. p. 3647-3653.
- Eliasson A-C. 2017. Starch: physicochemical and functional aspects. En: Eliasson A-C, editor. Carbohydrates in Food. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. p. 479-578.
- FAOSTAT. 2019. FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en <http://faostat.fao.org>. (Consultado en Agosto 2019).
- Fisher DK, Boyer CD, Hannah LC. 1993. Starch branching enzyme II from maize endosperm. *Plant Physiology* 102(3):1045-1046.
- Funane K, Libessart N, Stewart D, Michishita T, Preiss J. 1998. Analysis of essential histidine residues of maize branching enzymes by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Journal of Protein Chemistry* 17(7):579.
- Gevers HO, Lake JK. 1992. Development of modified opaque2 maize in South Africa. En: Mertz ET, editor. St. Paul: American Association of Cereal Chemists p. 49-78.
- Gibbon BC, Larkins BA. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics* 21(4):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 of Sciences USA* 100(26):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.

- González Núñez DG. 2016. Análisis de la acumulación y actividad de enzimas de síntesis de almidón y su relación con la modificación del endospermo en maíz QPM [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa Universidad Autónoma de Sinaloa. 109 p.
- Grimaldi-Olivas JC. 2017. Identificación de loci genéticos asociados con la modificación del endospermo en una población derivada del maíz de alta calidad proteínica CML176-QPM [Tesis de Licenciatura]. Culiacán, Sinaloa Universidad Autónoma de Sinaloa 98 p.
- Guan HP, Preiss J. 1993. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiology* 102(4):1269.
- Guo X, Ronhovde K, Yuan L, Yao B, Soundararajan MP, Elthon T, Zhang C, Holding DR. 2012. Pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase induction and attenuation of Hsp gene expression during endosperm modification in quality protein maize. *Plant Physiology* 158(2):917.
- Gupta P, Lee K. 2008. Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* 101:967-974.
- Hannah LC, James M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current Opinion in Biotechnology* 19(2):160-165.
- Hasjim J, Srichuwong S, Scott MP, Jane J-I. 2009. Kernel composition, starch structure, and enzyme digestibility of opaque-2 maize and quality protein maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5):2049-2055.
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics* 10(8):551-564.
- Holding DR, Hunter BG, Chung T, Gibbon BC, Ford CF, Bharti AK, Messing J, Hamaker BR, Larkins BA. 2008. Genetic analysis of opaque2 modifier loci in quality protein maize. *Journal of Plant Breeding Research* 117(2):157.
- Holding DR, Hunter BG, Klingler JP, Wu S, Guo X, Gibbon BC, Wu R, Schulze J-M, Jung R, Larkins BA. 2011. Characterization of opaque2 modifier QTLs and candidate genes in recombinant inbred lines derived from the K0326Y quality protein maize inbred. *Plant Molecular Biology* 122(4):783-794.

- Huang DP, Rooney LW. 2001. Starches for snack foods. En: Lusas EW, Rooney LW, editores. *Snack foods processing*. p. 115-130.
- James MG, Denyer K, Myers AM. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3):215-222.
- Jane J-L, Robyt JF. 1984. Structure studies of amylose-V complexes and retro-graded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research* 132(1):105-118.
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(6):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 opaque2mutant by transcriptional and proteomic analysis. *BMC Plant Biology* 13(1):60.
- Karim A, Hani N, Seow CC. 2000. Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry* 71:9-36.
- Konik-Rose C, Moss R, Rahman S, Appels R, Stoddard F, McMaster G. 2001. Evaluation of the 40 mg swelling test for measuring starch functionality. *Starch - Stärke* 53:14-20.
- Krieger K, Pollak L, Brumm T, White P. 1998. Effects of pollination method and growing location on starch thermal properties of corn hybrids. *Cereal Chemistry* 75:656-659.
- Kumar V. 2011. Identification of the sequence motif of glycoside hydrolase 13 family members. *Bioinformatics* 6(2):61-63.
- Kuriki T, Guan H, Sivak M, Preiss J. 1996. Analysis of the active center of branching enzyme II from maize endosperm. *Journal of Protein Chemistry* 15(3):305-313.
- Lending CR, Larkins BA. 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell* 1(10):1011-1023.
- Li J, Baroja-Fernández E, Bahaji A, Muñoz FJ, Ovecka M, Montero M, Sesma MT, Alonso-Casajús N, Almagro G, Sánchez-López AM, Hidalgo M, Zamarbide M, Pozueta-Romero J. 2013. Enhancing sucrose synthase activity results in



- increased levels of starch and ADP-Glucose in maize (*Zea mays* L.) seed endosperms. *Plant and Cell Physiology* 54(2):282-294.
- 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(4):1147.
- Liao P-Y, Lee K. 2010. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochemical Engineering Journal* 49:149-158.
- Libessart N, Preiss J. 1998. Arginine residue 384 at the catalytic center is important for branching enzyme II from maize endosperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 360(1):135-141.
- Liu F, Ahmed Z, Lee EA, Donner E, Liu Q, Ahmed R, Morell MK, Emes MJ, Tetlow IJ. 2011. 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(3):1167-1183.
- Liu F, Makhmoudova A, Lee EA, Wait R, Emes MJ, Tetlow IJ. 2009. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein–protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Journal of Experimental Botany* 60(15):4423-4440.
- Liu H, Shi J, Sun C, Gong H, Fan X, Qiu F, Huang X, Feng Q, Zheng X, Yuan N, Li C, Zhang Z, Deng Y, Wang J, Pan G, Han B, Lai J, Wu Y. 2016. Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa  $\gamma$ -zein for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 113(18):4964-4969.
- Lopes MA, Larkins BA. 1991. Gamma-zein content is related to endosperm modification in quality protein maize. *Crop Science* 31(6):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(5):603-613.
- MaizeGDB. 2019. Maize Genetics and Genomics Database. Disponible en <http://www.maizegdb.org>. (Consultado en Agosto 2019).

- Manly KF, Cudmore JRH, Meer JM. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12(12):930-932.
- Matveev YI, van Soest J, Nieman C, Wasserman L, Protserov VA, Ezernitskaja M, Yuryev VP. 2001. The relationship between thermodynamic and structural properties of low and high amylose starches. *Carbohydrate Polymers* 44:151-160.
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145(3629):279.
- Miles MJ, Morris VJ, Orford PD, Ring SG. 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research* 135(2):271-281.
- Momma M, Fujimoto Z. 2012. Interdomain disulfide bridge in the rice granule bound starch synthase I catalytic domain as elucidated by X-ray structure analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 76:1591-1595.
- 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(2):213-227.
- Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Boerwinkle E, Sing CF. 1998. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nature Genetics* 19(3):233-240.
- Okello D, Manna R, Imanywoha J, Pixley K, Edema R. 2006. Agronomic performance and breeding potential of selected inbred lines for improvement of protein quality of adapted Ugandan maize germplasm. *African Crop Science Journal* 14(1):37-47.
- Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA. 2006. Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas. México: Fondo de Cultura Económica.
- Pereira R, Davide L, Pedrozo C, Carneiro N, Souza I, Paiva E. 2008. Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grains. *Genetics and Molecular Research* 7( 2):498-508.
- Pfister B, Zeeman SC. 2016. Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(14):2781-2807.

- Pineda-Hidalgo KV, Lavin-Aramburo M, Salazar-Salas NY, Chavez-Ontiveros J, Reyes-Moreno C, Muy-Rangel MD, Larkins BA, Lopez-Valenzuela JA. 2011. Characterization of free amino acid QTLs in maize opaque2 recombinant inbred lines. *Journal of Cereal Science* 53(2):250-258.
- Rojas A, Betrán J, Scott P, Atta H, Menz M. 2010. Quantitative trait loci for endosperm modification and amino acid contents in quality protein maize. *Crop Science* 50:870-879.
- SAGARPA. 2019. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México D.F. Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (Consultado en Agosto 2019).
- 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(1):255-263.
- Sánchez F, Salinas M, Vázquez C, Velázquez C, Aguilar G. 2007. Efecto de las prolaminas del grano de maíz (*Zea mays* L.) sobre la textura de la tortilla. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57:295-301.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74(12):5463-5467.
- Shannon JC, Pien FM, Cao H, Liu KC. 1998. Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplasmidial synthesized ADP--glucose into amyloplasts of maize endosperms. *Plant Physiology* 117(4):1235-1252.
- Shin J-H, Kwon S-J, Lee JK, Min H-K, Kim N-S. 2006. Genetic diversity of maize kernel starch-synthesis genes with SNAPs. *Genome* 49(10):1287-1296.
- Sierra Macías M, Palafox Caballero A, Espinosa Calderón A, Caballero Hernández F, Rodríguez Montalvo F, Barrón Freyre S, Valdivia Bernal R. 2005. Adaptabilidad de híbridos triples de maíz y de sus progenitores para la región tropical del sureste de México. *Agronomía Mesoamericana* 16(1):13-18.

- Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi N, 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, Ziegler J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* 95(1):163-173.
- Sofi P, Wani S, Rather A, Wani S. 2009. Review article: Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 1:244-253.
- Soto Lopez 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. 119 p.
- 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, IIa and IIb. *New Phytologist* 137(2):215-222.
- Taira T, Fujita N, Wadano A, Kozaki S, Takaoka K, Okabe S. 1996. Comparison of the primary structure of waxy proteins (granule-bound starch synthase) between polyploid wheats and related diploid species. *Biochemical Genetics* 34(11-12):403-413.
- Teng B, Zeng R, Wang Y, Liu Z, Zhang Z, Zhu H, Ding X, Li W, Zhang G. 2012. Detection of allelic variation at the Wx locus with single-segment substitution lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* 30(1):583-595.
- Tester R, Morrison WR, Schulman A. 1993. Swelling and gelatinization of cereal starches. V. Riso mutants of Bomi and Carlsberg II barley cultivars. *Journal of Cereal Science* 17:1-9.
- Tester RF, Debon SJJ. 2000. Annealing of starch — a review. *International Journal of Biological Macromolecules* 27(1):1-12.

- Tester RF, Karkalas J. 1997. Starch: the polysaccharide fractions. En: Frazier PJ, Donald AM, Richmond P, editores. *Starch: Structure and Functionality*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. p. 163-171.
- Tester RF, Karkalas J, Qi X. 2004. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39(2):151-165.
- Tetlow IJ, Emes MJ. 2014. A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis. *IUBMB Life* 66(8):546-558.
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 55(406):2131-2145.
- Van Soest JJG, De Wit D, Tournois H, Vliegenthart JFG. 1994. Retrogradation of potato starch as studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Starch-Stärke* 46(12):453-457.
- Villegas E, Vasal SK, Bjarnason 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. 27-35.
- 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(1):255.
- 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(1):191-196.
- Wang K, Henry RJ, Gilbert RG. 2014. Causal Relations Among Starch Biosynthesis, Structure, and Properties. *Springer Science Reviews* 2(1):15-33.
- Watson SA. 1987. Structure and composition. En: Watson SA, Ramstad PE, editores. *Corn: Chemistry and Technology*. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. p. 53-82.
- 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(2):139-149.

- Wu H, Clay K, Thompson SS, Hennen-Bierwagen TA, Andrews 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(6):e0130856.
- Wu Y, Holding DR, Messing J. 2010.  $\gamma$ -Zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107(29):12810-12815.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134-134.
- Yoo SH, Jane JL. 2002. Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydrate Polymers* 49(3):297-305.
- Young VR. 1998. Human amino acid requirements: Counterpoint to Millward and the importance of tentative revised estimates. *The Journal of Nutrition* 128(9):1570-1573.
- Yuan L, Dou Y, Kianian SF, Zhang C, Holding DR. 2014. Deletion mutagenesis identifies a haploinsufficient role for  $\gamma$ -zein in *opaque2* endosperm modification. *Plant Physiology* 164(1):119.
- Zarkadas CG, Hamilton RI, Yu ZR, Choi VK, Khanizadeh S, Rose NGW, 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(11):5351-5361.
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. 2010. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61(1):209-234.
- Zhou R, Cheng L. 2005. Binding of 3-phosphoglycerate leads to both activation and stabilisation of ADP-glucose pyrophosphorylase from apple leaves. *Functional Plant Biology* 32(9):839-848.

## ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| °C           | Grados Celsius  |
| $\Delta H_g$ | Entalpía de gelatinización  |
| $\mu g$      | Microgramo(s)   |
| $\mu L$      | Microlitro(s)   |
| $\mu m$      | Micrómetro(s)   |
| A            | Adenina   |
| <i>Ae1</i>   | Mutacion amylose extender 1   |
| ADN          | Ácido desoxirribonucleico   |
| ADP-glucosa  | Adenosin difosfato-glucosa  |
| AGPasa       | Adenosin difosfato glucosa pirofosforilasa; ADP glucosa pirofosforilasa |
| ARN          | Ácido ribonucleico  |
| ARNm         | Ácido ribonucleico mensajero  |
| ATP          | Adenosin trifosfato   |
| <i>bt1</i>   | Brittle 1   |
| <i>bt2</i>   | Brittle 2   |
| C            | Citosina  |
| CDB          | Calorimetría diferencial de barrido                                     |
| cDNA         | Ácido ribonucleico complementario                                       |
| DBE          | Enzima desramificadora de almidón                                       |
| DDP          | Días después de la polinización   |
| dNTP         | Desoxirribonucleotido trifosfato  |
| <i>Du1</i>   | Mutación sintasa soluble IIa  |
| EDTA         | Ácido etilendiamino tetraacético  |
| FAOSTAT      | Estadística de la Organización para la Alimentación y Agricultura       |
| G            | Guanina   |
| <i>g</i>     | Gravedad  |
| GBSS         | Almidón sintasa unida al granulo  |
| GP           | Grado de polimerización   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| HCl               | Ácido clorhídrico  |
| KCl               | Cloruro de potasio   |
| LiCl              | Cloruro de litio   |
| <i>Loci</i>       | Plural de locus  |
| <i>Locus</i>      | Posicion que ocupa un gen en el genoma                                       |
| LRS               | Valor de máxima verosimilitud  |
| m                 | Metro(s)   |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloruro de magnesio  |
| min               | Minutos  |
| mL                | Mililitro(s)   |
| mM                | Milimolar  |
| NaCl              | Cloruro de sodio   |
| ng                | Nanogramo(s)   |
| kDa               | Kilodalton(es)   |
| <i>o2</i>         | Mutación <i>opaco-2</i>  |
| pb                | Pares de bases   |
| PCR               | Reacción en cadena de la polimerasa  |
| pH                | Potencial hidrogeno  |
| p/v               | Peso/volumen   |
| QTL               | Loci de carácter cuantitativo  |
| QPM               | Maíz de Calidad Proteínica   |
| RIL               | Líneas recombinantes puras   |
| SAGARPA           | Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación |
| SBE               | Enzima ramificadora de almidón   |
| SDS               | Dodecil sulfato de sodio   |
| <i>sh1</i>        | Shrunken 1   |
| SS                | Almidón sintasa  |
| SSR               | Repetidos de secuencias sencillas  |
| SSS               | Almidón sintasa soluble  |
| <i>SuSy</i>       | Sacarosa sintasa   |



|             |                           |
|-------------|---------------------------|
| <i>su1</i>  | Sugary 1                  |
| T           | Timina                    |
| Ton         | Tonelada(s)               |
| Tris-HCl    | Tris-ácido clorhídrico    |
| UDP-glucosa | Uridina difosfato-glucosa |
| v/v         | Volumen/volumen           |
| Wx1         | Waxy (ceroso)             |
| <i>Zpu1</i> | Mutación pululanasa 1     |