



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

**Identificación de Polimorfismos de un solo  
Nucleótido en Genes de Síntesis de Almidón  
y su asociación con Características  
Fisicoquímicas del Grano en Maíz QPM**

**T E S I S**

que presenta

**IBT Alejandro Ríos Lozano**

para obtener el grado de

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

**Directores de Tesis**

**Dr. José Angel López Valenzuela**  
**Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo**

**Culiacán Rosales, SIN, MEX**

**Julio de 2017**

## **Presentación**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Maestría en Ciencia con Orientación en Biotecnología, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), bajo la dirección del Dr José Ángel López Valenzuela y la Dra Karen Virginia Pineda Hidalgo. Contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) - UAS. El IBT. Alejandro Ríos Lozano recibió Beca Nacional para Estudios de Posgrado (Maestría en Ciencias) del CONACYT.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, 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.

Al **Dr. José Angel López Valenzuela**, por brindarme la oportunidad la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y permitirme crecer un poco más en el ámbito profesional.

A la **Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo**, por todas esas horas extras hacia el final de este proyecto que me permitieron salir adelante, de verdad gracias por todo.

A la **MC. Jeanett Chávez Ontiveros**, por estar siempre preocupada por nosotros, motivarnos a seguir adelante y a nunca perder el paso en este difícil camino.

A la **Dra. Nancy Yareli Salazar Salas**, por los consejos y ayuda brindada en todo este tiempo.

Al **MC. Elthon Vega Álvarez** por ser mi mentor de principio a fin y por inculcarme que el trabajo duro tiene sus recompensas, MUCHAS GRACIAS Elthon por siempre estar ahí.

A mis compañeros de generación, gracias a todos por la amistad.

A mis compañeros de laboratorio, presentes y ausentes: **Fernanda, Grimaldi, Itzel, Glenda, Alexis, David, Erika, Denisse, Milton y Lulú** quien se convirtió en una gran amiga, gracias compa!! A todos ellos quienes hicieron un excelente ambiente de trabajo y por supuesto al gran **Pierre**, un abrazo hasta donde estés...

A mis amigos **Jesús, Chiri, Summa, Rubén, Romina, Carlos, Roberto, Guillermo, Fernando, Brito, Marco, Gustavo y Belén**. Gracias chicos por los ánimos !!!

Al DT: **Cristian, Yael, Omar y Mario**.

A mi familia "Culichí", mi tía **Socorro** y mis primos **Omar, Mario y Sabi**, por abrirme las puertas de su hogar y recibirme como parte de ustedes, les estaré infinitamente agradecido.

Y en especial a mi novia **Valeria**, quien siempre estuvo apoyándome y motivándome para que siguiera adelante, te amo tita y por supuesto a mis padres **Jorge y Ana**, este logro es para ustedes, a mis hermanos **Jorge y Dámaso**, tía **Chepina**, gracias los quiero a todos!.

***"Estudiar es el mayor acto de rebeldía contra el sistema. El saber rompe las cadenas de la esclavitud."***

**-Tomás Bulat-**

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISION DE LITERATURA	7
A IMPORTANCIA DE LOS CEREALES	7
B MAÍZ	9
1. Origen	9
2. Taxonomía y descripción botánica	9
3. Importancia económica y social	11
4. Estructura y composición del grano	11
C ALMIDÓN	17
1. Estructura del gránulo de almidón	18
2. Biosíntesis	20
a. Formación de ADP-glucosa por ADP-glucosa pirofosforilasa	20
b. Elongación de la cadena de glucano por almidón sintasas	23
1) Síntesis de amilosa	24
2) Síntesis de amilopectina	24
c. Enzimas ramificadoras de almidón	25
d. Papel de las enzimas desramificadoras en la síntesis de almidón	25
e. Interacciones entre las enzimas de biosíntesis de almidón	26
f. Genes involucrados en la síntesis de almidón	27
g. Propiedades fisicoquímicas del granulo de almidón	32

D MAIZ DE CALIDAD PROTEÍNICA	33
1. Mecanismo relacionado al incremento de gamma zeínas	34
2. Mecanismo relacionado con la modificación de la estructura del almidón	36
E GENÉTICA MOLECULAR	37
1. Introducción	37
2. Marcadores moleculares	38
a. SNP	39
F ESTUDIOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS ACERCA DE LA MODIFICACIÓN DEL ENDOSPERMO EN EL MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA	40
IV OBJETIVOS	45
A OBJETIVO GENERAL	45
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
V MATERIALES Y MÉTODOS	46
A MATERIALES	46
B MÉTODOS	46
1. Extracción de RNA	46
2. Tratamiento con DNAasa	47
3. Síntesis de cDNA	47
4. Diseño de oligos y amplificación de fragmentos a partir de cDNA por medio de PCR	48
5. Secuenciación de genes de síntesis de almidón	48
6. Diseño de oligos alelo específico para K0326Y-QPM y W64Ao2	49
7. Evaluación de marcadores SNP	49
8. Análisis de asociación	50
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52

A. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN LAS LÍNEAS K0326Y-QPM Y W64A <sub>o</sub> 2	52
B. EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN 84 LÍNEAS RECOMBINANTES PURAS	67
C. ASOCIACIÓN ENTRE SNP Y CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL AMIDÓN EN LÍNEAS RECOMBINANTES PURAS DERIVADAS DE LA CRUZA ENTRE K0326Y-QPM Y W64A <sub>o</sub> 2	71
VII CONCLUSIONES	76
VIII BIBLIOGRAFIA	77
ABREVIATURAS	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Principales cereales producidos a nivel mundial en el año 2014	8
2	Corte longitudinal del grano de maíz	14
3	Estructura química de amilosa y amilopectina	19
4	Representación esquemática de la estructura granular del almidón por niveles de organización	21
5	Biosíntesis de almidón en el endospermo de cereales	22
6	Comparación de endospermos de diferentes genotipos de maíz	35
7	Microscopia electrónica de barrido de muestras contrastantes en vitrosidad	43
8	Secuencia de nucleótidos del gen <i>Amylose extender 1</i> en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2	53
9	Secuencia de nucleótidos del gen <i>Waxy 1</i> en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2	56
10	Secuencia de nucleótidos del gen <i>Brittle endosperm 2</i> en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2	57
11	Secuencia de nucleótidos del gen <i>Sugary 1</i> en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2	59
12	Secuencia de aminoácidos de la enzima SBEIIb en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen <i>Amylose extender 1</i>	61
13	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>	63



14	Secuencia parcial de aminoácidos de la enzima AGPS1 en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen <i>Brittle endosperm 2</i> .	64
15	Secuencia parcial de aminoácidos de la enzima ISA1 en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen <i>Sugary 1</i> . Se indica con asterisco las diferencias de aminoácidos entre las dos líneas.	66
16	Mapeo de los marcadores Zpu 1115, Ae 1136, Ae 1509, Sh 5650, Wx 131, Wx 2507 y SSIII 1963.	70

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Clasificación taxonómica del maíz	10
2	Principales países productores de maíz en 2014	12
3	Principales estados productores de maíz en el año 2014	13
4	Composición química (% bs) del grano de maíz	16
5	Principales genes de biosíntesis de almidón endospermo de maíz y su localización en el mapa genético	30
6	Descripción de los marcadores SNP utilizados para el mapeo genético	68
7	Asociación de propiedades fisicoquímicas del almidón con SNP en 84 RIL derivadas de la cruce de K0326Y-QPM y W64Ao2	72
8	Segregación de marcadores SNAP asociados con valores extremos en el contenido de almidón, amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización	75

## I RESUMEN

La mutación *opaco-2* (*o2*) casi duplica el contenido de lisina del endospermo de maíz mejorando la calidad de sus proteínas, pero su pobre desempeño agronómico limitó su uso en programas de fitomejoramiento. El desarrollo del maíz de calidad proteínica (QPM, Quality Protein Maize), el cual combina la calidad nutricional de *o2* con un endospermo vítreo y rendimiento normal, ha despertado el interés en el desarrollo agronómico de estos materiales. Este proceso ha sido lento debido al escaso conocimiento acerca de las bases genéticas y bioquímicas de la acumulación de lisina y modificación de la textura del grano. Estudios previos sugieren que varios factores están involucrados en la conversión del fenotipo blando de la mutación *o2* en vítreo en QPM, incluyendo un incremento en la acumulación de  $\gamma$ -zeínas y la alteración de la estructura del almidón con la consecuente modificación de las propiedades de los gránulos. La síntesis de almidón involucra principalmente la actividad de cuatro grupos de enzimas: ADP-glucosa pirofosforilasas (AGP), almidón sintasas (SS), enzimas ramificadoras de almidón (SBE) y enzimas desramificadoras de almidón (DBE). Los principales genes que codifican para estas enzimas y que intervienen en la síntesis de almidón son: *Sh1*, *Sh2*, *Bt2*, *Wx1*, *Ae1* y *Su1*. Sin embargo, se requiere información acerca de las variantes específicas de estos genes que controlan las características del almidón. El objetivo del presente proyecto fue identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes de síntesis de almidón y su relación con las propiedades fisicoquímicas del gránulo en maíz QPM. Se utilizaron las líneas K0326Y-QPM y W64A*o2* y líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruce. Primeramente se extrajo ARN total de endospermos en desarrollo con 20 días después de la polinización (DPP) de las líneas K0326Y-QPM y W64A*o2*. Se sintetizó ADN complementario, el cual se

utilizó para amplificar por PCR fragmentos de los genes de síntesis de almidón *Ae1*, *Wx1*, *Bt2* y *Su1* usando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias reportadas para la línea de maíz B73. Los fragmentos de PCR fueron secuenciados y los SNP identificados entre K0326Y-QPM y W64Ao2 para los genes fueron utilizados como marcadores en un mapeo genético con propiedades fisicoquímicas del almidón evaluadas previamente en las RIL de estudio. El análisis de secuenciación permitió identificar un total de 14 SNP, revelando una diversidad de nucleótidos del 0.3 % entre K0326Y-QPM y W64Ao2. Ocho de los 14 SNP identificados resultaron en un cambio de aminoácido en la secuencia de sus respectivas enzimas. Estos SNP y dos previamente identificados para los genes *Zpu1* y *Du1* fueron utilizados como marcadores alelo-específicos. El mapeo genético permitió establecer asociaciones significativas de las propiedades fisicoquímicas de almidón con los marcadores Sh1 5650, Zpu 1115, Ae 1136, Ae 1509, Wx 2507 y SSIII 1963, los cuales en promedio explicaron más del 20% de la variación en almidón, amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización. Los marcadores que corresponden a los genes *Ae1* (Ae 1509, Ae 1136) y *Wx1* (Wx 2507) se encontraron asociados con la mayoría de las propiedades fisicoquímicas del almidón, 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 que a su vez influyen sobre la modificación del endospermo en maíz QPM.

## ABSTRACT

The opaque-2 (*o2*) mutation almost doubles the lysine content in maize endosperm improving the protein quality, but the agronomic problems associated with a soft endosperm limited its use in breeding programs. The discovery of quality protein maize (QPM), which combines the nutritional quality of *o2* with a vitreous phenotype, has motivated the interest in the development of these materials. This process has been slow due to the poor knowledge about the genetic and biochemical bases of lysine accumulation and the modification of the endosperm texture. Previous studies suggest that several factors are involved in this modification, including an increase in the content of  $\gamma$ -zeins and the alteration of starch structure with the consequent modification of the starch granule properties. Starch synthesis involves mainly the activity of four groups of enzymes: ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP), starch synthases (SS), starch branching enzymes (SBE) and starch debranching enzymes (DBE). The main genes encoding these enzymes are *Sh1*, *Sh2*, *Bt2*, *Wx1*, *Ae1* and *Su1*. However, further information is required about the allelic variants of these genes that control starch related properties. The aim of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) in starch synthesis genes and their relationship with the physicochemical properties of the granule. The lines K0326Y-QPM and W64A*o2*, as well as 84 recombinant inbred lines (RIL) derived from their cross were used. Total RNA was extracted from developing endosperms 20 days after pollination (DAP) from K0326Y-QPM and W64A*o2*. Complementary DNA was synthesized and used to amplify by PCR fragments of the starch synthesis genes *Ae1*, *Wx1*, *Bt2* y *Su1* by using oligonucleotides designed from sequences reported for the line B73. The PCR fragments were sequenced and the SNP identified between K0326Y-QPM and W64A*o2* for the genes were used as

markers for the genetic mapping of starch physicochemical properties evaluated previously in the RIL. Sequence analysis identified 14 SNP, showing a nucleotide diversity of 0.3% between K0326Y-QPM and W64Ao2. Eight of the 14 SNP lead to changes in aminoacids in the sequence of the respective enzymes. These SNP and two previously identified for the genes *Zpu1* and *Du1* were used as allele-specific markers. The genetic mapping detected significant associations between the starch physicochemical properties and the markers Sh1 5650, Zpu 1115, Ae 1136, Ae 1509, Wx 2507 and SSIII 1963, which on average explained more than 20% of the variation in total starch, amylose, swelling power and gelatinization enthalpy. The markers corresponding to the genes *Ae1* (Ae 1509, Ae 1136) and *Wx1* (Wx 2507) were found associated with most of the starch physicochemical properties, suggesting that the allelic variants of these genes are responsible for the changes in the proportion of amylose/amylopectin and starch granule properties than influence the modification of the endosperm in QPM.

## II INTRODUCCION

La mutación *opaco2* (*o2*) casi duplica el contenido de lisina en el endospermo de maíz mejorando la calidad proteínica del grano (Mertz y col., 1964), pero presenta serios problemas agronómicos asociados con su endospermo blando. Para superar estos inconvenientes se desarrolló el maíz de calidad proteínica o QPM (del inglés, Quality Protein Maize), el cual resulta de la selección de genes modificadores que convierten el endospermo blando de la mutante *o2* en un endospermo vítreo manteniendo la calidad proteínica. Los mecanismos responsables de esta modificación aún no se conocen por completo, pero dentro de los que se han propuesto se encuentran una mayor 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 maíz y por lo tanto es el que tiene mayor injerencia 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 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*) (Gustafson y col., 2006; Shin y col., 2006).

Un análisis genético utilizando una población de líneas recombinantes puras derivadas de la cruce entre K0326Y-QPM y W64Ao2 identificó tres loci genéticos en los cromosomas 1, 7 y 9 asociados con vitrosidad, densidad y dureza del grano (Holding y col., 2011); el locus en el cromosoma 7 se ubicó

cerca de un locus para  $\gamma$ -zeína de 27 kDa y el del cromosoma 9 cerca de genes que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de almidón.

Salazar-Salas y col (2014) evaluaron el efecto de estos loci sobre la acumulación de proteínas y propiedades fisicoquímicas del almidón, encontrando que la modificación de QPM está asociada con un incremento en el contenido de  $\gamma$ -zeínas, así como con la síntesis de almidón con menor grado de cristalinidad y mayor contenido de amilosa, lo cual parece reflejarse en una mayor proporción de regiones amorfas en el gránulo que favorecen un mayor empaquetamiento de estas estructuras, contribuyendo con ello al fenotipo vítreo del grano QPM.

Sin embargo, no existe información acerca de la variación alélica que presentan estos materiales en genes de síntesis de almidón que permita asociarlos con propiedades fisicoquímicas del almidón y características del grano como vitrosidad, lo cual además de contribuir en el entendimiento del mecanismo relacionado con la modificación del endospermo de maíz QPM, también permitiría apoyar programas de mejoramiento asistido por marcadores.



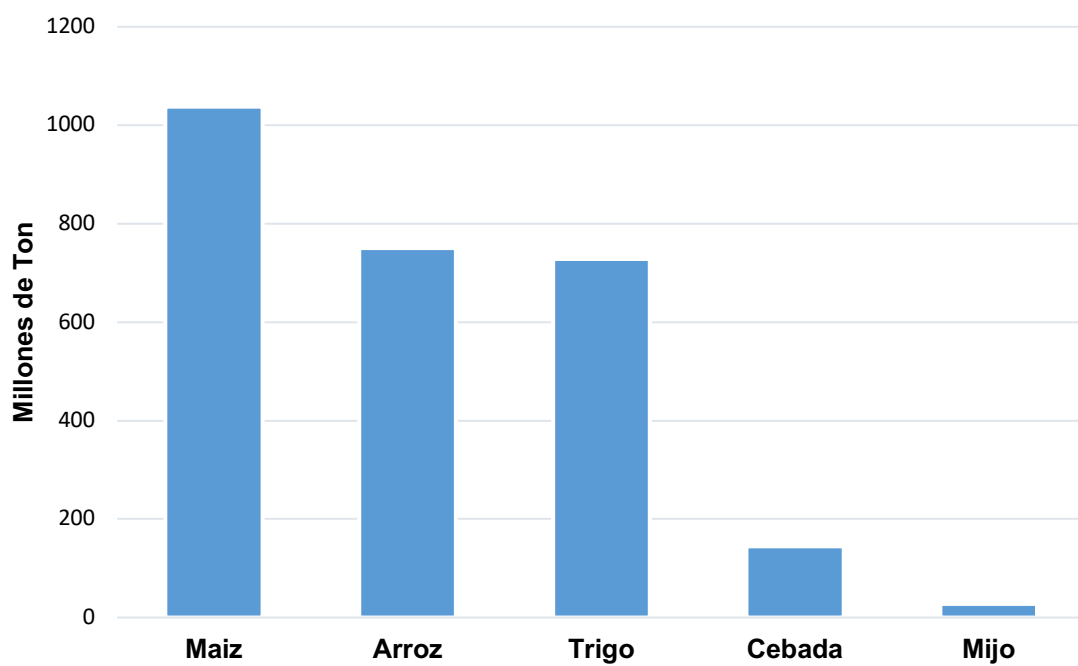
### **III REVISION DE LA LITERATURA**

#### **A IMPORTANCIA DE LOS CEREALES**

Los cereales son la principal fuente de calorías y proteínas en la dieta de los seres humanos y constituyen la base de la alimentación de los países en vías de desarrollo. Son los cultivos predominantes en la agricultura, con una producción mundial en el año 2014 de 2,818 millones de toneladas; dentro de los principales cereales producidos en el mundo se encuentran el maíz, el arroz y el trigo, seguido en menor proporción de cebada, sorgo y mijo, entre otros (Fig 1) (FAOSTAT 2017).

Las principales razones para el éxito de los cereales incluyen su adaptabilidad, altos rendimientos y la facilidad de la cosecha y el almacenamiento. Los polisacáridos que componen los cereales no solo son fuentes importantes de calorías, sino que también presentan beneficios para la salud, los cuales están relacionados con sus propiedades fisicoquímicas, digestión en el intestino delgado y la fermentación en el colon (Lafiandra y col., 2014). En este sentido, el almidón y componentes de la pared celular de los cereales se han asociado con la reducción del riesgo de obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon (Lafiandra y col., 2014).

Debido al gran aporte nutrimental, nutracéutico y a su alta producción a nivel mundial, los cereales contribuyen de manera vital a la seguridad alimentaria en el presente e igualmente deberán jugar un papel muy importante en el futuro, ya que el crecimiento continuo de la población en el mundo demanda una mayor producción de alimentos (Dunwell, 2014).



**Figura 1.** Principales cereales producidos a nivel mundial en el año 2014.  
FAOSTST (2017)

## **B MAÍZ**

### **1 Origen**

Existen varias teorías acerca del origen del maíz. Una de ellas lo ubica en el continente asiático, misma que propone este cereal se originó en la región del Himalaya producto de un cruzamiento entre *Coix* spp. y algunas Andropogóneas, probablemente especies de *Sorghum*, ambos parentales con cinco pares de cromosomas (Anderson, 1945). Otra de las teorías estipula que el maíz se originó en Sudamérica en la región de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú (Mangelsdorf y Reeves, 1959); esta hipótesis es basada en la presencia de maíz reventón en América del Sur y la amplia diversidad genética presente en los maíces andinos, especialmente en las zonas altas de Perú. Sin embargo, muchos investigadores creen que el maíz se originó en México y hoy en día la teoría más aceptada es la que postula al teocintle anual mexicano como ancestro del maíz cultivado (Kato y col., 2009), esto debido a las similitudes que presentan, entre las que se puede mencionar que ambos tienen 10 cromosomas, poseen muchos genes en común y su cruce produce descendencia fértil (Doebley, 1993; Galinat, 1995).

### **2 Taxonomía y descripción botánica**

El maíz ha sido clasificado dentro de la familia Gramineae (Poaceae), género *Zea* y especie *mays* (Cuadro 1) (Reyes, 1990), y dentro de esta misma familia también se encuentran otros cultivos de importancia como son trigo, arroz, avena, cebada, centeno y sorgo.

La planta de maíz es de tipo anual con un gran desarrollo vegetativo y puede medir de 1 a 5 m de altura; presenta un sistema radicular fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. En la parte media de la planta se desarrollan una o dos yemas laterales en la axila de las hojas, las

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del maíz

<b>Categoría</b>		<b>Carácter distintivo</b>
Reino	Vegetal	Planta anual
División o Phylum	Tracheophyta	Sistema vascular
Sub división	Pteropsidae	Producción de flores
Clase	Angiosperma	Semilla cubierta
Subclase	Monocotiledónea	Cotiledón único (Escutelo)
Orden	Graminales	Tallos con nudos prominentes.
Familia	Gramínea	Grano-cereal
Tribu	Maydeae	Flores unisexuales
Género	<i>Zea</i>	Único
Especie	<i>Mays</i>	Maíz común
	<i>Mexicana</i>	Teocintle anual
	<i>Perennis</i>	Teocintle perenne

Adaptado de Reyes (1990)

cuales terminan en una inflorescencia femenina que se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas modificadas que la envuelven. La parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculina o panoja; esta tiene una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas que producen granos de polen (FAO, 2001).

### **3 Importancia económica y social**

El maíz es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, ocupando el primer lugar de producción con aproximadamente 1,038 millones de toneladas en el año 2014, seguido del arroz y el trigo con una producción de 740 y 728 millones de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2017). En el Cuadro 2 se muestran los principales países productores de maíz, donde se observa que Estados Unidos ocupa el primer lugar de producción al aportar el 34.7% del total (361 millones de toneladas), mientras que México ocupa el séptimo lugar con 23 millones de toneladas (FAOSTAT, 2017). En cuanto a la producción de maíz en nuestro país, Sinaloa es el principal estado productor con el 15.8 % de la producción nacional, seguido de Jalisco y Michoacán, con 14.9 y 8.31%, respectivamente (Cuadro 3). Sinaloa se caracteriza por ser un estado altamente productivo gracias a las inversiones realizadas en sus tierras, obteniendo altos rendimientos y producciones con calidad internacional (SAGARPA, 2015).

### **4 Estructura y composición del grano**

Las principales estructuras que componen el grano de maíz son: pericarpio, endospermo, germen y pedicelo (Fig 2). El germen está constituido por el embrión y el escutelo, cotiledón único por medio del cual se encuentra adherido o fusionado al endospermo. El germen se considera como primer tejido de reserva debido a que almacena una buena cantidad de nutrientes que son utilizados durante la germinación; almacena la mayoría de los lípidos del grano (McKevith, 2004).

**Cuadro 2.** Principales países productores de maíz en 2014.

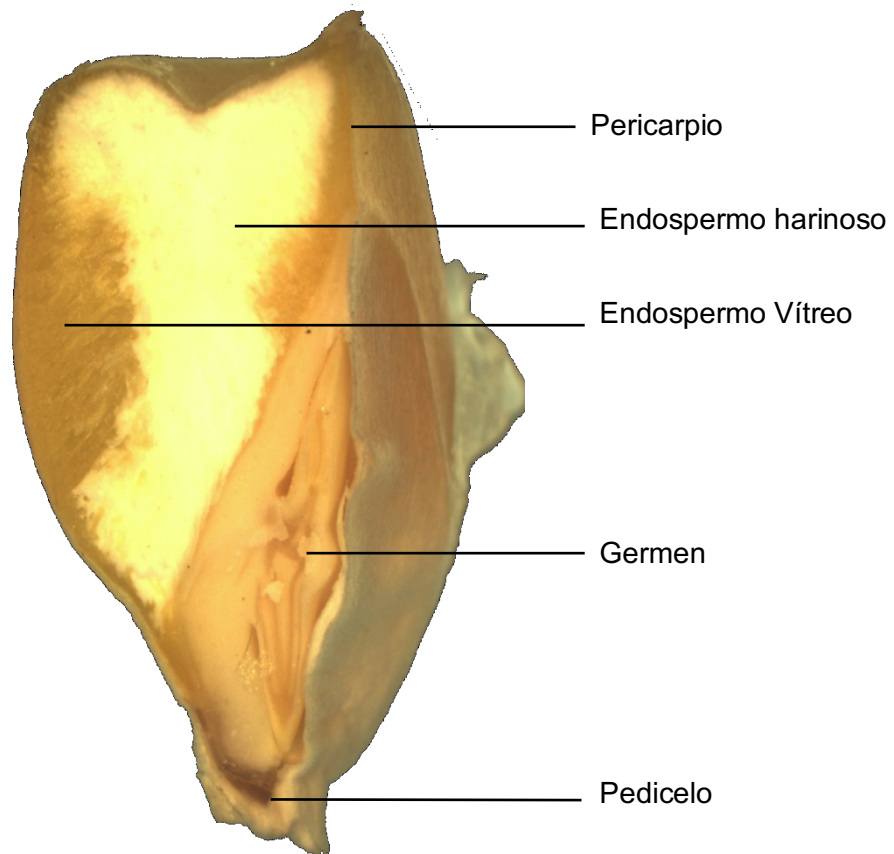
<b>País</b>	<b>Producción (Ton)</b>
Estados Unidos	361,091,140.00
China	215,646,300.00
Brasil	79,877,714.00
Argentina	33,000,000.00
Ucrania	28,496,810.00
India	23,670,000.00
México	23,273,257.00
Indonesia	19,008,426.00
Francia	18,541,780.00
Otros	235,675,608.00
<b>Total</b>	<b>1,038,281,035.00</b>

FAOSTAT (2017)

**Cuadro 3.** Principales estados de México productores de maíz en el año 2014.

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

SAGARPA (2017)



**Figura**

**2.**

Corte longitudinal del grano de maíz.

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



El endospermo representa la fracción mayoritaria del grano de maíz y comprende cerca del 83 % del peso seco del grano y aproximadamente el 86-89% es almidón (Paredes-López y col., 2006). El endospermo se clasifica en dos tipos: vítreo (duro) y harinoso (blando); el vítreo es de consistencia dura y de apariencia translúcida mientras que el harinoso es de consistencia suave y de apariencia opaca (Reyes, 1990).

El pedicelo es la estructura por medio de la cual el grano se encuentra unido al olote y presenta células bien adaptadas para la rápida absorción de humedad, además de transportar nutrientes al grano. Cerca de la etapa final de maduración del grano, se puede distinguir una capa negra a través de la región del pedicelo lo cual sirve como una barrera para proteger al grano de insectos y microorganismos (Eckhoff y col., 2003).

Los principales componentes químicos del grano de maíz son carbohidratos, proteínas, lípidos, cenizas y fibra cruda (Cuadro 4) (Watson, 1987). Esta composición se ve afectada por las condiciones climatológicas, genotipo y condiciones de cultivo; también varía entre las diferentes estructuras del grano, lo cual es aprovechado por la industrias (Uarrota y col., 2011).

El almidón es el carbohidrato más abundante del grano ocupando alrededor del 70 % del peso del mismo (Watson, 1987). Este es almacenado en forma de gránulos principalmente en la región del endospermo y debido a su importancia será abordado en mayor detalle en apartados posteriores.

Las proteínas son el segundo componente mayoritario del grano de maíz (10 %) y se encuentran distribuidas principalmente en el endospermo y el germen (Cuadro 4). Las principales proteínas de almacenamiento del endospermo son solubles en alcohol (prolaminas) y se conocen como zeínas, mientras que las más abundantes en el germen son solubles en soluciones salinas y se conocen como globulinas (Shotwell y Larkins, 1988).

**Cuadro 4.** Composición química (% bs) del grano de maíz.

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

% bs: porcentaje en base seca

Watson, 1987

Los lípidos constituyen alrededor del 5% del peso del grano y se encuentran principalmente en el germen. La mayoría son ácidos grasos insaturados, principalmente oleico y linoleico (Paredes-López y col., 2008) y en menor proporción ácidos grasos saturados, siendo los principales el ácido palmítico y esteárico.

El maíz contiene la mayoría de las vitaminas solubles y de las liposolubles principalmente  $\beta$ -caroteno o provitamina A y  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E. La provitamina A se pierde paulatinamente con el almacenamiento prolongado. Por otro lado, el contenido de niacina en el grano de maíz es muy alto en comparación con los requerimientos mínimos, pero no está presente en forma asimilable por el cuerpo humano. Sin embargo, técnicas de procesamiento del grano como la nixtamalización, extrusión y tostado, hidrolizan la niacina, permitiendo su liberación como ácido nicotínico y su posterior asimilación (Hamaker y Larkins, 2000; Paredes-López y col., 2000).

Por último, el germen contiene el 78% del total de los minerales del grano, de los cuales el componente inorgánico más abundante es el fósforo que se encuentra principalmente en las sales de potasio y magnesio del ácido fítico. Este mineral puede llegar a representar hasta el 1 % de la masa del grano. El azufre es el cuarto elemento más abundante en el grano, está contenido en forma orgánica como parte de los aminoácidos metionina y cisteína. El contenido de hierro es muy variable dependiendo del tipo de maíz, puede llegar a contener tanto pequeñas trazas como llegar a cubrir el 50% de los requerimientos mínimos diarios.

## **C ALMIDÓN**

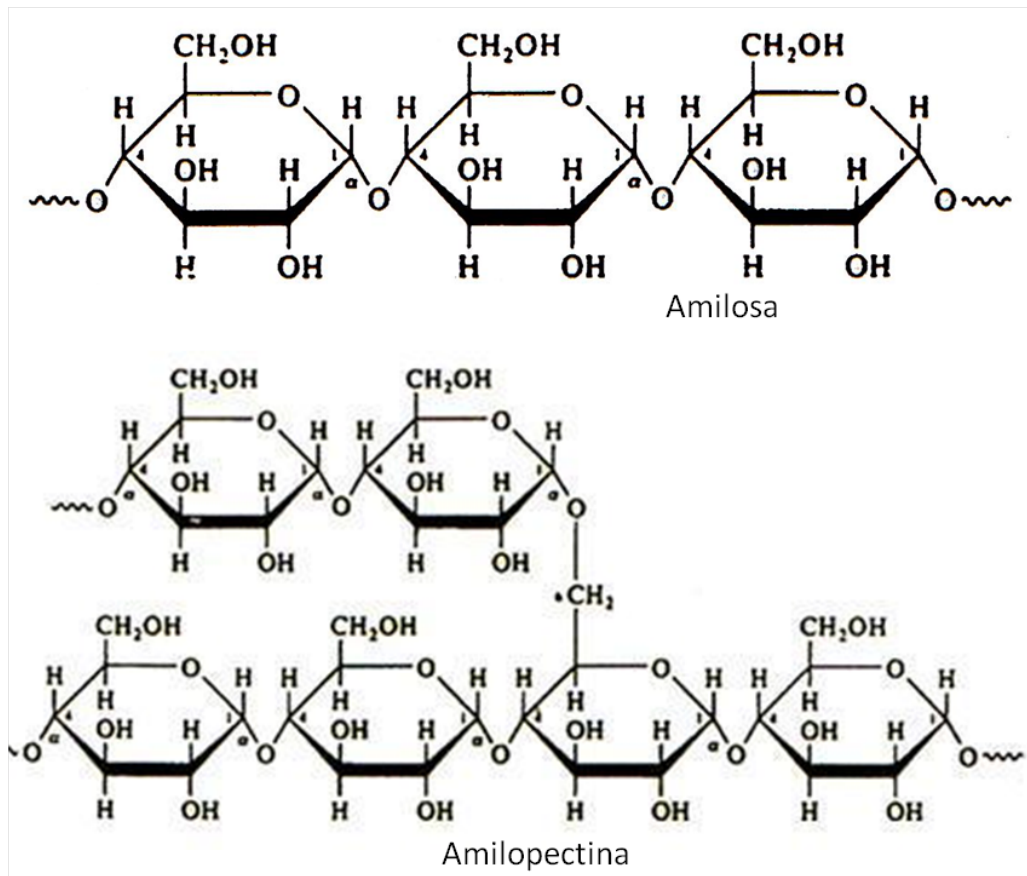
El almidón es la principal forma de reserva de carbono en los cereales, representando cerca del 70-80% del peso del grano, por lo que este componente es mayormente responsable del valor energético, nutricional y económico que

tienen los granos (Paredes-López y col., 2006). Las moléculas de almidón se encuentran formando gránulos que se depositan en las células del endospermo, ocupando la mayor parte de su volumen (Hamaker y Larkins 2000). En los últimos años, el estudio de la estructura del almidón y su relación con la actividad de las diferentes enzimas involucradas en su biosíntesis se ha incrementado, ya que esto repercute en las características morfológicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón. Por ello, el entendimiento de los procesos relacionados con la biosíntesis de almidón es esencial para el mejoramiento del rendimiento y la calidad de los cereales, así como de sus usos en la industria.

## **1 Estructura del gránulo de almidón**

El almidón está formado por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina. La amilosa es un polisacárido esencialmente lineal de moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, mientras que la amilopectina además de poseer porciones lineales con enlaces  $\alpha$ -1,4, también tiene enlaces  $\alpha$ -1,6 que hacen este polisacárido altamente ramificado (Fig 3). Durante la síntesis del almidón, estos dos polisacáridos se acumulan y forman el gránulo de almidón. En maíz normal, el gránulo de almidón contiene aproximadamente 22-30% de amilosa y 70-75% de amilopectina (FAO, 1993; Jeon y col., 2010).

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  $\mu$ m y con formas elípticas, esféricas o angulares (Huang y Rooney, 2001). La compleja estructura del 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.



**Figura 3.** Estructura química de amilosa y amilopectina.

Tester y Karkalas (2002)

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

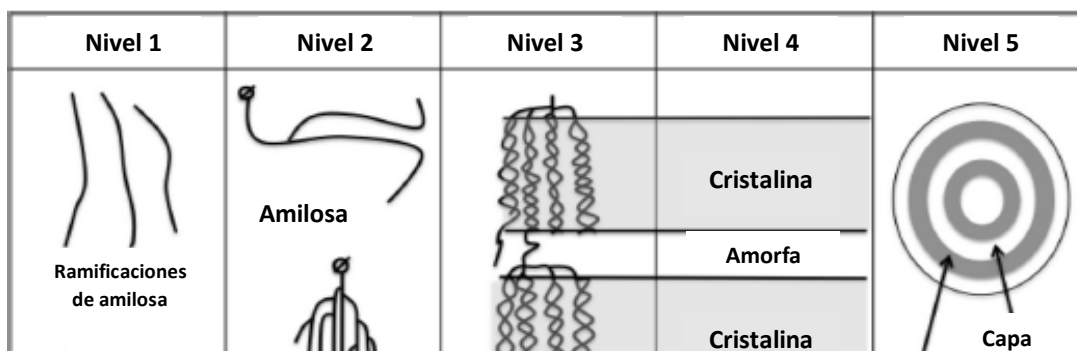
amilopectina de doble hélice forman estructuras conocidas como laminillas cristalinas, mientras que la zona donde nacen las ramificaciones son conocidas como zonas amorfas, en conjunto las zonas cristalinas y amorfas constituyen el cuarto nivel de organización. El quinto nivel está constituido por un crecimiento alterno de zonas cristalinas y amorfas en el granulo de almidón (Fig 4) (Wang y col., 2014).

## 2 Biosíntesis

La biosíntesis del almidón se lleva a cabo en el endospermo de los cereales, donde se requiere la acción coordinada de distintas enzimas, así como algunas que participan en su degradación (Tetlow y col., 2004). Teniendo como más importantes a la adenosina 5'difosfato-glucosa pirofosforilasa(AGPasa), almidón sintasa unida al granulo (GBSS), almidón sintasa (SS), enzimas ramificadoras de almidón (BE) y por último enzimas desramificadoras de almidón (DBE) (Fig 5).

### a Formación de ADP-glucosa por ADP-glucosa pirofosforilasa

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



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura granular del almidón por niveles de organización.

Wang y col. (2014).





encuentra en dos lugares diferentes, en el citosol, donde tiene su mayor actividad, y en el plástido, donde tiene una menor actividad (Nagai y col 2009). La AGPasa es una enzima heterotetramérica compuesta por dos subunidades grandes y dos pequeñas producidas por los genes *shrunk2 (sh2)* y *brittle (bt2)*, respectivamente (Hannah y col., 2008). Una vez sintetizada, la ADP-glucosa es transportada a los amiloplastos mediante la proteína brittle-1 (BT1), la cual posee un sitio de unión similar al de almidón sintasa y actúa comúnmente mediante intercambio con adenina monofosfato (AMP) (Shannon y col., 1998). La presencia de AGPasa citosólica en el endospermo de los cereales, a diferencia de otras plantas que solamente poseen AGPasa plastidial, supone una ventaja debido a la entrada directa de ADP-glucosa permitiendo su uso de manera directa en la síntesis de almidón, mientras que la fuente de carbono que es transportada en forma de hexosa fosfato puede ser utilizada para otras rutas metabólicas (Smith y col., 2001).

#### **b Elongación de la cadena de glucano por almidón sintasas**

Las enzimas almidón sintasas catalizan la transferencia del grupo glucosil del precursor soluble ADP-glucosa al extremo reductor de un primer glucano con enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) pre-existente para sintetizar los polímeros insolubles, amilosa y amilopectina (Wang y col., 2014). Estas enzimas se pueden clasificar en dos grupos principales, uno de ellos involucrado mayormente en la biosíntesis de amilosa, y el segundo grupo confinado principalmente a la biosíntesis de amilopectina.

### **1) Síntesis de Amilosa**

La almidón sintasa unida al granulo (GBSS) es la única enzima responsable de la biosíntesis de la amilosa en los cereales. Esta enzima presenta dos isoformas, la GBSSI y GBSSII, que tienen la función específica de producir cadenas lineales de amilosa.

La GBSSI es una proteína de 60 kDa codificada por el locus *Waxy* (*wx*) en cereales, que funciona especialmente en la elongación de la amilosa en el endospermo, donde es enzimáticamente activa tanto en la periferia como en el interior del gránulo de almidón, a diferencia de otras isoformas de almidón sintasa (Denyer y col, 2001). En el caso de GBSSII que es codificada por otro gen, es la enzima responsable de la síntesis de almidón en hojas y otros tejidos que no son de reserva, los cuales acumulan de manera transitoria almidón (James y col., 2003).

## **2) Síntesis de Amilopectina**

La amilopectina se forma por la acción de la enzima ramificadora de almidón y almidón sintasa (SBE y SS, respectivamente). SBE introduce sitios ramificados en la molécula de amilopectina por hidrólisis de cadenas  $\alpha$ -1,4 de glucanos de 15-20 unidades al extremo no reductor. Cuando cataliza la formación de enlaces  $\alpha$ -1,6 une el extremo reductor de cadenas adheridas con otros residuos de glucosa. Las almidón sintasas, designadas SSI, SSII, SSIII y SSIV, están involucradas exclusivamente en la síntesis de amilopectina y su distribución dentro del plástido entre el estroma y los gránulos de almidón varía entre cada especie, tejido y estado de desarrollo (Zeeman y col., 2010).

Se ha reportado que la SSI es la responsable de la síntesis de cadenas más cortas de glucano (grado de polimeración de 10 o menos) y la extensión de

las cadenas medianas y largas se da por la actividad de las isoformas SSII y SSIII (Tetlow y col., 2004).

### **c Enzimas ramificadoras de almidón**

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 C6 de un residuo de glucosa de otra cadena formando la estructura ramificada de la molécula de amilopectina. En el endospermo de cereales se expresan dos isoformas de enzimas ramificadoras: enzima ramificadora I (SBEI) y enzima ramificadora II (SBEII) (Sun y col., 1997). Estas isoformas difieren en términos de longitud de la cadena de glucano transferida y de la especificidad del sustrato; SBEI muestra mayor afinidad por amilosa y transfiere cadenas más largas que SBEII, la cual transfiere cadenas más cortas y presenta mayor afinidad hacia amilopectina (Guan y Preiss, 1993).

La isoforma SBEIIa se expresa en todos los tejidos de los cereales que sintetizan almidón, mientras que SBEIIb se encuentra únicamente en las células del endospermo. La isoforma SBEIIa tiene la función de apoyar el papel que juegan otras SBE sin cambio aparente en la estructura de la amilopectina cuando ésta enzima está deficiente; sin embargo, un defecto en la isoforma SBEIIb resulta en un incremento en amilosa, jugando un papel muy importante en la producción de cadenas tipo A (cortas) de la amilopectina (Yun y Matheson, 1993).

### **d Papel de las enzimas desramificadoras en la síntesis de almidón**

Existen dos tipos de enzimas desramificadoras (DBE) en plantas superiores y se definen sobre la base de sus especificaciones de sustrato: enzimas desramificadoras tipo-isoamilasa y enzimas desramificadoras tipo-pululanasa (James y col., 2003).

En maíz, la ausencia de actividad pululanasa de mutantes *zpu1204* provoca la acumulación de malto-oligosacáridos ramificados, indicando su función de hidrolasa en el almidón. 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). Además, la pre-amilopectina se ha considerado un paso obligatorio para la síntesis de almidón (Wang y col., 1993).

### **e Interacciones entre las enzimas de biosíntesis de almidón**

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

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

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

Jiang y col (2013) analizaron los perfiles de transcritos en 2 líneas genéticamente modificadas (C7-4-2 y C7-11-5) y la línea híbrida H99 como control. En las líneas se sobre-expresaron los genes Bt2, Sh2, GBSSIa y Sh1 para mejorar la actividad de las enzimas sacarosa sintasa, AGPasa y almidón sintasa unida al gránulo; además bloquearon la expresión de SBEI y SBEIIb mediante RNA de interferencia. Los autores observaron una disminución significativa en la expresión de los genes que codifican para las enzimas SBEI y SBEIIb en ambas líneas, lo cual se asoció con un alto contenido de amilosa; sin embargo, también se presentó un aumento significativo en la expresión de los genes que codifican para la enzima AGPasa, resultando en un alto contenido de almidón en las líneas genéticamente modificadas y como consecuencia la relación amilosa/amilopectina en el endospermo de las muestras fue similar.

#### **f Genes involucrados en la síntesis de almidón**

Se han caracterizado varias mutantes en maíz que presentan alteraciones en la biosíntesis de almidón y el estudio de estas mutantes ha resultado una técnica eficaz para revelar 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 en el endospermo de maíz 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 5.

El gen *Sh1* codifica para la enzima sacarosa sintasa 1 (SH1), los genes *Sh2* y *Bt2* para las subunidades grande y pequeña de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), *Wx1* para la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSS I), mientras que *Ae1* y *Su1* codifican para las enzimas ramificadora IIb (SBEIIb) y desramificadora tipo isoamilasa 1 (ISA1), respectivamente.

Mutaciones en estos genes reflejan fenotipos diferentes en donde se presentan reducciones en la concentración de almidón, así como cambios en la relación amilosa/amilopectina y la estructura fina de la amilopectina (Wilson y col., 2004). Estudios en la mutante *wx1* (GBSSI) han proporcionado información muy valiosa de la participación de GBSSI en la producción de amilosa, ya que un defecto en el gen *wx1* presenta contenidos muy bajos o nulos de amilosa en el endospermo de maíz (Tsai, 1974).

Aún no se conocen mutantes para la enzima SSI en maíz; sin embargo, en una mutante de arroz en la enzima SSI, Fujita y col (2006) observaron alteraciones en el grado de polimerización (GP) y longitud de cadenas de la amilopectina, presentándose una menor cantidad de cadenas cortas (GP 8-12) y una mayor cantidad de cadenas con GP 16-19 comparado con su contraparte normal sin aparente cambio en el contenido de almidón, lo cual sugiere que otras enzimas SS pueden ser capaces de compensar, al menos parcialmente, la reducción o completa ausencia de SSI. El efecto en mutación de la enzima SSIIa en maíz (mutante *su2*) muestra una disminución en las cadenas intermedias con GP de 12-25 y un incremento en las cadenas cortas de 6-10 de la amilopectina (Zhang y col., 2004). Por otro lado, en la mutante *du1* (SSIII) en arroz se observa una disminución de cadenas largas e incremento en cadenas cortas e intermedias de la amilopectina, con alteraciones significativas sobre la estructura de la misma (Fujita y col., 2007).

La mutante de maíz *ae1* (BE11b) presenta un fenotipo con un alto contenido de amilosa (Fisher y col., 1996; Kim y col., 1998), mientras que en el caso de la mutante *su1* (ISA1) en maíz, la alteración en la actividad desramificadora se asoció con una reducción en el contenido de amilopectina, una mayor proporción de cadenas cortas, así como la acumulación de fitoglucógeno, un polisacárido soluble altamente ramificado (James y col., 1995; Dingest y col., 2001).

Existe una amplia diversidad en estos genes dependiendo del genotipo de maíz, y como consecuencia las diferencias en expresión, la acumulación y actividades de las enzimas codificadas también presenta una amplia variabilidad, lo que se ve reflejado en diferencias en la composición (relación amilosa/amilopectina), estructura y propiedades del almidón, así como en las características del grano sobre las cuales este impacta.

Diversos estudios se han enfocado a la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphism) en genes de biosíntesis de almidón y su asociación con características de interés del grano. Wilson y col (2004) analizaron seis genes de biosíntesis de almidón (*Ae1*, *Bt2*, *Sh1*, *Sh2*, *Su1* y *Wx1*) y su asociación con características fisicoquímicas y de calidad del almidón (contenidos de amilosa, amilopectina) de este polisacárido en 102 líneas de maíz recolectadas de diversos programas de mejoramiento alrededor del mundo, esto con la finalidad de identificar variantes alélicas que puedan ser usadas en estudios de mejoramiento y manipulación de estas características agronómicas de gran importancia.

**Cuadro 5.** 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 (BIN)</b>
SuSyl	<i>sh1</i>	Sacarosa sintasa I	9.01
AGPS1	<i>bt2</i>	ADP-glucosa pirofosforilasa, subunidad pequeña	4.05
AGPL1	<i>sh2</i>	ADP-glucosa pirofosforilasa, subunidad grande	3.09
GBSSI	<i>wx1</i>	Almidón sintasa unida al granulo 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 isoamilasa	4.05

Fuente: <http://www.maizegdb.org/>



Los autores observaron que 4 de los 6 genes presentaron una asociación significativa para más de una de las características analizadas; los genes *Ae1* y *Sh1* presentaron asociación con el contenido de amilosa, mientras que *Sh2* se asoció con características relacionadas con la viscosidad del almidón y contenido de amilosa. Shin y col (2006) realizaron un diseño de oligos a partir de SNP para los genes de síntesis de almidón *Ae1*, *Bt2*, *Sh1*, *Su1* y *Wx1* en poblaciones de maíz waxy, dent y sweet, encontrando un gran número de haplotipos (72 de 81); al realizar el agrupamiento de los maíces con estos marcadores se observaron 3 grupos correspondientes a los 3 tipos de maíz.

Park y col (2011) realizaron un estudio de diversidad genética en una población de amaranto enfocándose en el gen *Wx*; este gen presentó un nivel de conservación del 99.7% en la población de estudio y se identificó un polimorfismo ubicado en el exón 10, el cual consta de la sustitución de guanina (G) por timina (T) lo que tiene como resultado la conversión de un codón de ácido glutámico (GAG) por un codón de paro (TAG), provocando una mutación sin sentido. Este SNP sirvió para la construcción de marcadores alelo específicos, los cuales fueron utilizados para la identificación de distintos fenotipos de características agronómicas deseables en el amaranto.

Otro de los cereales donde se ha empleado estos marcadores, es en arroz donde los estudios se han enfocado en la identificación de genotipos con alto contenido de amilosa, el cual es importante para la industria alimentaria, ya que granos con alto porcentaje de amilosa son resistentes a tratamientos térmicos adquiriendo características deseables para el consumo como un grano seco y firme (Dobo y col., 2010). Uno de los estudios realizados por Sano y col. (1985), quienes han reportado dos variantes del gen *Wx1* (*Wx<sup>a</sup>* y *Wx<sup>b</sup>*) las cuales están relacionadas con el contenido de GBSS y amilosa aparente, siendo *Wx<sup>a</sup>* el que sintetiza mayor contenido de enzima y contenido de amilosa aparente, estudios subsecuentes identificaron un SNP (G→T) en la posición +1 del intrón número 1,

el cual es responsable del alelo  $Wx^b$  y un segundo SNP ubicado en el exón número 6 (A→C), el cual provoca el cambio de un aminoácido en la enzima lo que genera fenotipos con contenidos de amilosa aparente variables (Larkin y Park, 2003). Así mismo, Dobo y col (2010) analizaron la relación entre los alelos para GBSS y el contenido de amilosa aparente en arroz americano y europeo utilizando los SNP del intrón 1 y del exón 6 descritos anteriormente, agregando un tercer SNP localizado en el exón 10, los cuales les permitieron clasificar distintas accesiones de arroz con base en su contenido de amilosa aparente.

### **g Propiedades fisicoquímicas del gránulo de almidón**

El gránulo de almidón presenta una alta estabilidad y organización debido a las múltiples interacciones que existen entre sus componentes, lo que ocasiona que sea insoluble en agua fría; sin embargo, cuando se calienta en un porcentaje mayor a 70% de agua, ocurre una pérdida de cristalinidad, debido principalmente al desajuste molecular de éstos dos constituyentes. Esta transición de orden-desorden ha sido estudiada usando calorimetría diferencial de barrido (CDB), una técnica analítica utilizada para cuantificar la cantidad de calor absorbido o liberado durante los cambios de estado físico o químico (Tester y col., 2000).

Durante el proceso, las moléculas de almidón vibran rompiendo los puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas amorfas, lo que provoca el hinchamiento del granulo, una vez hidratada la zona amorfa, la cristalina inicia un proceso semejante pero requiere mayor energía (entalpía de gelatinización), cuando se alcanza cierta temperatura (temperatura de gelatinización, 65-75 °C) el gránulo hinchado, incapaz para retener más líquido, se rompe parcialmente alterando significativamente su estructura debido a la solubilización de la amilosa y amilopectina (Parker y col., 2001). La amilosa comienza a difundirse hacia el agua y la amilopectina queda dentro del gránulo para posteriormente perder su orden, la amilosa fuera del gránulo forma una malla y produce un gel (Biliaderis, 1991).

La temperatura y entalpía de gelatinización se han relacionado con las características del gránulo de almidón, como el grado de cristalinidad (Krieger, 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, 1990).

Otra característica importante del almidón es la retrogradación, en la cual las interacciones presentes en el almidón (puentes de hidrogeno) vuelven a su estado de equilibrio, en otras palabras, la retrogradación se puede ver como el fenómeno opuesto a la gelatinización. Los polímeros solubles del almidón y los fragmentos insolubles se re-asocian después del calentamiento. Eventualmente se forman cristales, acompañados por un incremento gradual en la rigidez y la separación de fases entre el polímero y el solvente. La aparición de cristales influye en la textura, digestibilidad y aceptación de los productos con base en almidón (Huang y Rooney, 2001). 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, 1994).

## **D MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA**

La mutación *opaco2* (*o2*) casi duplica el contenido de lisina en el endospermo de maíz mejorando la calidad proteínica del grano (Mertz y col., 1964). Sin embargo, el uso potencial de esta mutante ha sido limitado debido a las características agronómicas indeseables que presenta asociadas con un endospermo blando, por lo que se realizaron esfuerzos interdisciplinarios para desarrollar lo que se conoce como maíz de calidad proteínica o QPM (del inglés, Quality Protein Maize), el cual resultó de la introducción de genes modificadores de la textura del grano manteniendo la calidad nutricional del maíz *o2* (Zarkadas y col., 2000). No obstante, este ha sido un proceso lento debido al escaso conocimiento de los

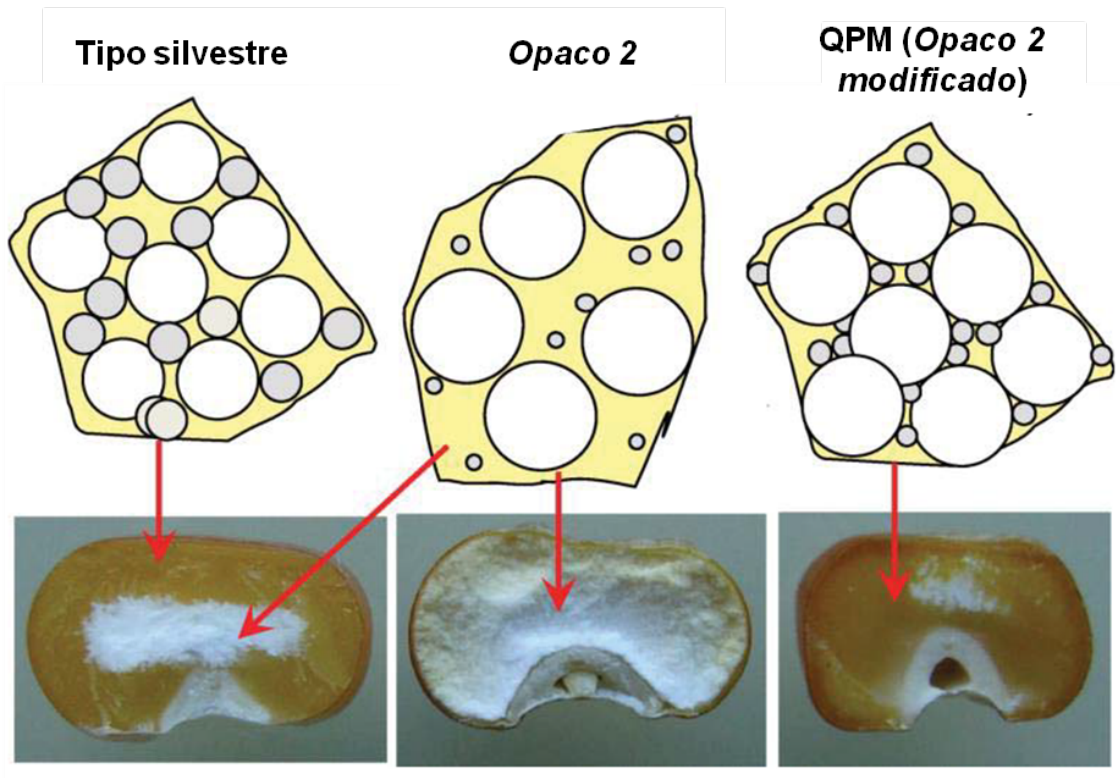
mecanismos mediante los cuales se da la conversión del fenotipo opaco a vítreo en QPM, por lo que existe interés por entender las bases genéticas y bioquímicas de esta modificación.

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

El mecanismo por el cual 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; Larkins y col., 1996) ya que endospermos con mayor contenido de esta proteína contienen un mayor número de estas estructuras (Dannenhoffer y col., 1995).

El maíz QPM presenta una acumulación de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa de 2 a 4 veces mayor a las observadas en sus similares comunes o la mutante  $\alpha 2$ , mientras que las proteínas  $\alpha$ -zeínas parecen no presentar ningún cambio entre QPM y  $\alpha 2$  (Wallace y col., 1990). Estudios de mapeo genético realizados por Lopes y col (1995) sugiere una asociación entre la dureza del grano y el contenido de la proteína de almacenamiento  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa.

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  $\alpha 2$  (Fig. 6). Recientemente Wu y col (2010) demostraron el papel esencial de  $\gamma$ -zeínas bloquearon la expresión de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa en la línea



**Figura 6.** Comparación de endospermos de diferentes genotipos de maíz. Los círculos grandes blancos representan los gránulos de almidón, mientras que los círculos más pequeños grises los cuerpos proteínicos. Comparado con el genotipo silvestre y *opaco 2*, el maíz QPM presenta un endospermo con un mayor número de cuerpos proteínicos más pequeños debido a un incremento de la proteína  $\gamma$ -zeína de 27 kDa. Adaptada de Yuan y col (2014).

de maíz *CM105mo2* mediante técnicas moleculares de RNA de interferencia (RNAi), encontrando que esta proteína juega un papel esencial en la modificación del endospermo en QPM, es decir que el RNAi causo la reversión del QPM a *opaco-2*.

Hallazgos similares fueron reportados por Yuan y col (2014) quienes utilizaron mutagenesis por radiación- $\gamma$  para identificar genes relacionados con la modificación de la mutante *o2*, encontrando que la línea K0326Y comparada con W64A+ mostraba una disminución generalizada de las  $\alpha$ -zeínas y un incremento de las  $\gamma$ -zeínas, principalmente la de 27 kDa y 50 kDa; los autores propusieron 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.

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

Gibbon y col. (2003) realizaron un análisis de proteómica del endospermo de las líneas de maíz casi isogénicas *CM105+*, *CM105o2* y *CM105mo2* para investigar proteínas del tipo no-zeínas que pudieran contribuir al fenotipo vítreo de QPM. Uno de los cambios más importantes encontrados en *CM105mo2* fue el aumento en el contenido de una enzima de síntesis de almidón asociada al gránulo. El análisis de la estructura del almidón en *CM105mo2* reveló la presencia de ramificaciones más cortas en la amilopectina con respecto al almidón normal y *o2*.

Como consecuencia de estas diferencias, el almidón del maíz QPM presenta más expansión y los gránulos en el endospermo se asocian unos con otros. Un modelo derivado del estudio anterior sugiere que moléculas de amilopectina amorfa presentes en la superficie de los gránulos de almidón del endospermo del maíz QPM pueden interaccionar y formar contactos que unen los gránulos entre sí. Estos contactos proveen un mecanismo que complementa

lo mencionado anteriormente, donde se propone que cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -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 de los granos se caracteriza por tener 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, influenciando por lo tanto la vitrosidad del grano.

En los granos vítreos el empaquetamiento es más organizado y los espacios intergranulares son perfectamente llenados (Gibbon y col., 2003; Gibbon y Larkins, 2005). Lo anterior sugiere 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.

## **E GENÉTICA MOLECULAR**

### **1 Introducción**

Uno de los principales objetivos de la genética molecular es el elucidar las bases genéticas de la variación natural de caracteres complejos involucrados en la aptitud, adaptación al ambiente y evolución de las poblaciones. De la misma forma, los fitomejoradores están interesados en realizar un escrutinio de grandes colecciones de recursos genéticos para identificar regiones cromosómicas, genes o polimorfismos involucrados en la variación de caracteres agronómicos que puedan ser utilizados en programas de mejoramiento genético. Para ello se requiere analizar la diversidad genética preferentemente con marcadores

moleculares neutros (ADN) y relacionar el genotipo de estos marcadores con la variación fenotípica del carácter de interés mediante un análisis estadístico.

## **2 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un carácter genético. Dependiendo del nivel de detección de los marcadores moleculares se pueden dividir principalmente en dos clases: marcadores de proteínas (isoenzimas) y marcadores de ADN (Tanksley 1983).

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante permitió el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN y actualmente se cuenta con una gran cantidad de ellos. Sin duda el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió el rápido desarrollo de marcadores moleculares que presentan la principal ventaja de requerir una menor cantidad de ADN para su estudio, además del tiempo relativamente corto y alta reproducibilidad de resultados dependiendo del marcador utilizado (Brown y Kresovich, 1996).

Los marcadores de ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1998). Algunos ejemplos de ellos son los RFLP (Polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción), AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) y SSR (Repetidos de secuencias sencillas), estos son los que se han utilizado más ampliamente. Sin embargo, a pesar de que estos marcadores pueden detectar la diversidad genética eficientemente, el tener variaciones en la secuencia de nucleótidos es una alternativa para obtener información más precisa en la diversidad genética de los genes de interés de una población de algún cultivo. En este sentido, el polimorfismo en un solo nucleótido



(SNP) ha proporcionado una alternativa para detectar la diversidad genética (Buckler y Thornsberry 2002). Además, las variaciones en un solo nucleótido pueden aplicarse al análisis de asociación con una variación fenotípica.

#### **a SNP**

Los SNP (Polimorfismo en un solo nucleótido) son la variación de la secuencia de ADN que ocurre cuando un solo nucleótido (A, T, C o G) en el genoma difiere entre miembros de una especie (o entre par de cromosomas de un individuo). Los SNP proveen evidencia directa de la variación genética por medio del análisis de asociación (Wilson y col, 2004), son muy abundantes y pueden estar localizados en regiones codificantes y no codificantes (Weising y col., 2005; Owusu, 2008). Un método para la identificación de alelos fue desarrollado a partir de variaciones SNP el cual es conocido como SNAP (single-nucleotide amplified polymorphisms).

Las variantes alélicas en los marcadores SNAP pueden ser detectadas usando iniciadores de PCR alelo-específicos diseñados de tal forma que el nucleótido del extremo 3' del iniciador corresponda al sitio SNP. De este modo, existirá un iniciador cuya secuencia coincide al 100% con el alelo de interés, el cual tiene un apareamiento correcto y permitirá la amplificación del fragmento específico, mientras que en el caso del otro iniciador el nucleótido en el extremo terminal 3' estaría no apareado y normalmente su extensión es nula o con poca eficiencia por parte de la ADN polimerasa.

## **F ESTUDIOS 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 su mecanismo de acción involucrados en este fenotipo, recientemente en maíz QPM se han identificado marcadores moleculares ligados a *loci* asociados a la modificación del endospermo en QPM (Holding y col, 2008; Gutiérrez-Rojas y col., 2010). 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 características como 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 algunas rutas metabólicas y la expresión de algunas subunidades enzimáticas.

Soto-López (2012) utilizó estas RIL para identificar loci genéticos asociados con la composición de zeínas y almidón. Uno de los loci corresponde a genes de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa y los niveles de esta proteína mostraron una correlación positiva con la vitrosidad del grano en las líneas QPM analizadas; algunos de los loci identificados para amilosa se encontraron cerca de genes de síntesis de almidón y el contenido de este 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).

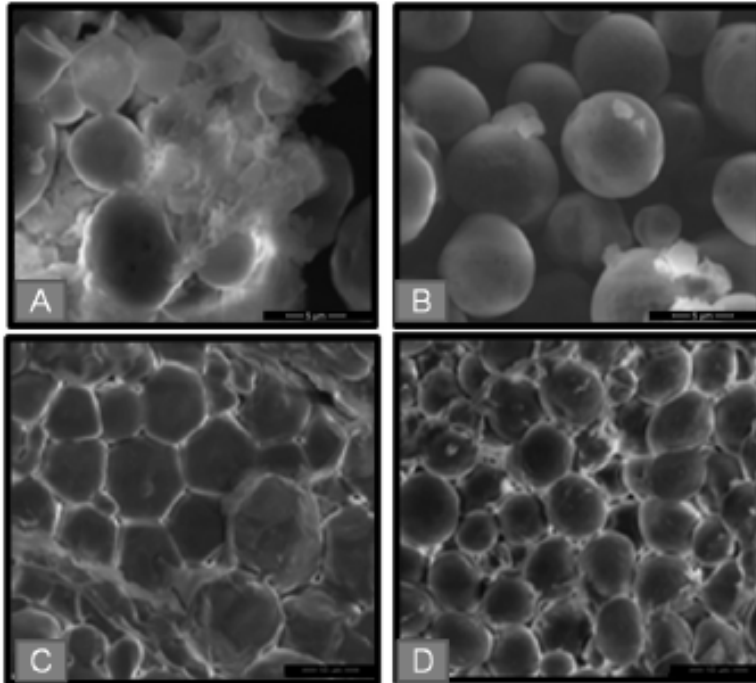
Álvarez-Hernández (2014) amplió la identificación de loci asociados a características relacionadas con la modificación de la dureza del endospermo. Algunos loci ubicados en los cromosomas 5 y 9 resultan interesantes por su cercanía con genes para las enzimas ramificadora de almidón II (SBEIIb) y almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI); ambas enzimas están involucradas en la biosíntesis de almidón, lo cual, a su vez impacta sobre las características fisicoquímicas del gránulo.

Salazar-Salas y col (2014) evaluaron el efecto de estos loci genéticos sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón y acumulación de proteínas en el endospermo maduro de dos grupos de RILs contrastantes en vitrosidad que fueron derivadas de la cruce de 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 (Fig 7).

Esto apoya la idea de que alteraciones en la estructura/interacción de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón juegan un papel importante en la modificación del endospermo en QPM; la mayor acumulación de  $\gamma$ -zeína de 27-kDa podría estar facilitando la formación de más cuerpos proteínicos, aunado a modificaciones en la composición y estructura de los gránulos que facilitan una mayor compactación como consecuencia de cambios en la acumulación de enzimas involucradas en la biosíntesis del almidón.

Con el fin de esclarecer aún más la formación del endospermo vítreo, Wu y col (2015) analizaron la influencia que tienen las enzimas SSII y pululanasa sobre la modificación del endospermo, observando que una menor acumulación de la enzima SSIII afecta directamente la actividad enzimática de la pululanasa, como es común en genotipos Zpu1, en donde la longitud de las cadenas de glucosa se ve disminuido, lo cual está directamente relacionado con la formación del endospermo vítreo.

En relación a esto, Soto-López (2015) evaluó a nivel transcripcional la expresión de genes de síntesis de almidón (Wx1, Ae1, Bt2, Sh2, Su1 y Zpu1) en endospermo en desarrollo (20 días después de la polinización) de las líneas de maíz K0326Y QPM y W64Ao2, así como una selección de líneas recombinantes puras derivadas de su cruce; en general encontró cambios significativos en los niveles de transcritos de los genes estudiados, destacando una mayor expresión en endospermos opaco del gen Waxy-1, el cual codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), responsable de la síntesis de amilosa, lo cual correspondió con el hecho de que estas muestras presentaron los mayores contenidos de amilosa en endospermo en desarrollo y a su vez una mayor acumulación de dicha enzima.



**Figura 7.**

Microscopía electrónica de barrido en gránulos de almidón aislados de endospermos maduros de muestras contrastantes en vitrosidad. (A-B) Gránulos de almidón en líneas parentales K0326Y QPM y W64Ao2. (C-D) Gránulos de almidón en RIL Q208 (vítrea) y O39 (opaca). Tomada de Salazar-Salas y col (2014).

Los resultados observados en los estudios anteriores apoyan la idea de que la modificación del endospermo en K0326Y-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, no existe información acerca de la variación alélica o polimorfismos presentes en los genes de síntesis de almidón que pueda relacionarse con dichas características.

#### **IV OBJETIVOS**

## **A OBJETIVO GENERAL**

Identificar polimorfismos de un solo nucleótido en genes de síntesis de almidón y su asociación con propiedades fisicoquímicas del gránulo en maíz QPM.

## **B OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la secuencia de genes de síntesis de almidón en dos líneas de maíz contrastantes en vitrosidad (K0326Y-QPM y W64A02).
2. Evaluar los polimorfismos de genes de síntesis de almidón encontrados entre las líneas K0326Y-QPM y W64A02 (marcadores alelo específicos) en una población de 84 líneas recombinantes puras derivadas de su cruce.
3. Establecer asociaciones entre los polimorfismos de genes de síntesis de almidón y propiedades fisicoquímicas del gránulo (Contenido de almidón y amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización) relacionadas con la modificación del endospermo en las líneas de maíz estudiadas.

## **V MATERIALES Y MÉTODOS**

## **A MATERIALES**

Se utilizaron las líneas de maíz K0326Y-QPM (endospermo vítreo) y W64Ao2 (endospermo blando), así como una población de 84 líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruce, las cuales son contrastantes en vitrosidad. Para la extracción de RNA se utilizaron granos en desarrollo cosechados 20 días después de la polinización (20 DDP).

## **B MÉTODOS**

### **1 Extracción de RNA**

La extracción de RNA de endospermo se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Leiva y col (2002) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de endospermo en desarrollo, se le añadieron 200  $\mu$ L de buffer de extracción [Tris-HCl 50 mM (pH 8), LiCl 150 mM, EDTA 5 mM (pH 8), SDS 1% (v/v)] y fue macerado utilizando un mortero; enseguida se añadió 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo (1:1), se agitó y colocó en hielo durante 5 min mezclando ocasionalmente. La solución fue transferida a tubos de bloqueo de fase para una posterior centrifugación a una velocidad de 9,402 g por 10 min a 4°C. Fueron añadidos 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo y se repitieron las condiciones de centrifugación antes mencionadas. La fase superior fue transferida a un tubo nuevo al cual se le agregó 1 mL de Trizol, se agitó durante 15 s y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo fueron añadidos 200  $\mu$ L de cloroformo, se agito y se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a una velocidad de 9,500 g por 10 min a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol, se agitó e incubó por 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 9,402 g por 10 min a 4°C. Una vez que las fases se separaron el precipitado de RNA pudo ser visualizado. Se agregó etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 9,402 g por 10 min a



4°C. La pastilla de RNA se re-suspendió en 50 µL de agua tratada con pirocarbonato de dietilo, inhibidor irreversible de ribonucleasas.

## **2 Tratamiento con DNAsa**

Para eliminar el DNA genómico presente en la muestra se utilizó el kit DNase I (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). A 1-2 µg de RNA total se le agregó 1 µL de amortiguador de reacción 10X, 1 µL de DNAsa I (1 U/µL) y 6 µL de agua DEPC. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 1µL de la solución Stop y se incubó durante 15 min a 65 °C, para finalmente colocándolo en hielo para la síntesis de cDNA.

## **3 Síntesis de cDNA**

La síntesis del cDNA se llevó a cabo utilizando el sistema de transcripción reversa ImProm-II™ (Promega, Madison, USA). Se tomaron 8 µL del RNA tratado con DNAsa I (1 U/µL) y se le adicionó 1 µL de primer oligo (dT)<sub>15</sub> (500 µg/mL), la mezcla se incubó 70 °C durante 5 min e inmediatamente después se colocó en hielo durante 5 min; posteriormente fue centrifugada durante 10 s y colocada en hielo. En otro tubo se realizó una mezcla de reacción de transcripción reversa, la cual consistió de 4 µL de amortiguador de reacción 5X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de mezcla de nucleótidos (dNTPs) (10 mM), 2 µL de inhibidor de ribonucleasas (20 U/µL) y 1 µL de la enzima transcriptasa reversa (RT) (200 U/µL). Ambas mezclas se combinaron para tener un volumen final de 20 µL, el cual fue incubado a temperatura ambiente durante 5 min (etapa de alineamiento), seguida de otra incubación a 42 °C por 50 min (etapa de extensión) y finalmente se inactivó la enzima transcriptasa reversa por calentamiento a 70 °C durante 15 min; la mezcla de cDNA fue almacenada a -20 °C hasta su uso.

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

Se obtuvieron las secuencias completas de cDNA de genes de síntesis de almidón de la línea de maíz B73 de la base de datos del genoma del maíz <http://www.maizegdb.org/>. A partir de estas secuencias se diseñaron oligos utilizando el programa Primer-BLAST disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Estos oligos cubrieron el total de la secuencia del cDNA de cada uno de los genes de síntesis de almidón. Para la amplificación de los fragmentos se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla consistió de 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) de cada una de las muestras, 1.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción de PCR 10X (200 Mm Tris-HCl (pH 8.4), 500 Mm KCl), 0.6  $\mu\text{L}$  de dNTPs 100  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 Mm, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa, 0.25  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos iniciadores 25  $\mu\text{M}$  y agua desionizada estéril para un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Las amplificaciones 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) 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 fue teñido con una solución de bromuro de etidio (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y los productos se digitalizaron en presencia de luz ultravioleta con un fotodocumentador Chemidoc XRS (BIO-RAD, CA, USA).

## **5 Secuenciación de genes de síntesis de almidón**

La secuencia de los genes se obtuvo a partir de los fragmentos amplificados usando los oligos diseñados a partir 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 agregó 0.3 mL/ 0.1 g de agarosa de una solución caotrópica (NaI), una vez agregada la sal los tubos fueron incubados durante 5 min a 55°C. Posteriormente se agregaron 12 µL de una solución 50:50 de silica y buffer, el tubo se agitó por 5 min y posteriormente se centrifugó durante 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 fue resuspendida en 25µL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril e incubada 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° hasta su secuenciación. Los fragmentos purificados fueron secuenciados por el método de terminación de cadena de 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 y W64Ao2**

Las secuencias obtenidas a partir del análisis de secuenciación fueron analizadas con el fin de detectar los SNP presentes, los cuales sirvieron para el diseño de oligos alelo específicos para cada parental (K0326Y-QPM y W64Ao2).

## **7 Evaluación de marcadores SNP**

La estandarización de esta metodología se realizó según lo descrito por Pineda-Hidalgo y col. (2013). La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió de 1 µL de ADN (50 ng/µL) de cada una de las muestras, 1.5 µL de amortiguador de reacción de PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0.5 µL de dNTPs 100 µM, 0.63 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 unidad de Taq ADN polimerasa, 0.25 µL de oligonucleótidos iniciadores 25 µM y agua desionizada estéril para un volumen final de 15 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo 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 7) y 1.5 min a 72 °C (extensión), con un período final de extensión a 72 °C por 5 min.

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 fue teñido con una solución de bromuro de etidio (0.01 µg/mL) y los productos se digitalizaron 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.

## **8 Análisis de asociación**

Se utilizaron los marcadores SNAP alelo específicos para K0326Y-QPM y W64Ao2 en genes de síntesis de almidón para evaluar las variantes alélicas en 84 RIL derivadas de su cruce (Holding y col., 2011). A partir de estos datos genotípicos y con las propiedades fisicoquímicas del almidón (composición de almidón, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización) previamente evaluadas por Álvarez-Hernández (2014) en la población 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 loci o regiones del cromosoma asociadas con las características de interés, todos estos análisis se realizaron con ayuda del programa MapManager QTX 20 (Manly y col., 2001). Para cada uno de los SNAP utilizados, se realizó un mapeo de ligamiento entre las variantes alélicas de cada uno de los genes y el genotipo de 55 SSR de los cromosomas 2, 5, 9 y 10, utilizados previamente por Holding y col. (2011). La distancia

genética entre los marcadores SNAP y SSR se determinó con el programa Map Manager QTX20 utilizando la función de mapeo Kosambi.

## **VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

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

Para la identificación de SNP entre las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2, se determinó la secuencia de los genes *Ae1*, *Wx1*, *Bt2* y *Su1*. La secuencia de

los genes se obtuvo a partir de fragmentos amplificados por PCR con oligos iniciadores obtenidos de secuencias de cDNA reportadas para la línea de maíz B73. El diseño de los oligos se realizó tomando en consideración características como porcentaje de guanina-citosina, auto complementariedad, tamaño de los amplificados, así como temperaturas de alineamiento (Ye y col., 2012). A continuación se presentaran las secuencias de nucleótidos para cada uno de los genes, tomando en cuenta únicamente las regiones codificantes de sus respectivas enzimas.

En la Figura 8 se muestra la secuencia codificante del gen *Amylose extender 1 (Ae1)* en la líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2. El tamaño de la secuencia codificante obtenida para ambos casos fue de 2,400 pares de bases (pb), lo cual coincide con lo reportado por Schnable y col. (2009) para el mismo gen en la línea B73 (ID: AFW71659.1).

El análisis de las secuencias de *Ae1* reveló la presencia de 8 SNP localizados en las posiciones 1,222 (T/A), 1,223 (A/T), 1,530 (T/A), 1,531 (G/A), 1,534 (C/A), 1,535(T/A), 1,551(T/G) y 1,578(T/C) (Fig 7). Shin y col. (2006) reportaron 4 SNP para este gen en maíces waxy, dent y sweet, aunque solo uno de ellos dentro de la región codificante, el cual no fue identificado en el presente estudio; esto podría deberse a las diferencias en la base genética de las líneas de maíz utilizadas para cada estudio.

	1	85
K0326Y	ATGGCGTTTCGCGGTTTCTGGGGCGGTGCTCGGTGGGGCCGTAAGGGCTCCCCGACTCACCGGCGGCGGGGAGGGTAGTCTAGTCT	
W64Ao2	ATGGCGTTTCGCGGTTTCTGGGGCGGTGCTCGGTGGGGCCGTAAGGGCTCCCCGACTCACCGGCGGCGGGGAGGGTAGTCTAGTCT	
	86	170
K0326Y	TCCGGCACACCGGCCTCTTCTTAACTCGGGGTGCTCGAGTTGGATGTTTCGGGGACGCACGGGGCCATGCGCGCGGCGGCCGCGGC	
W64Ao2	TCCGGCACACCGGCCTCTTCTTAACTCGGGGTGCTCGAGTTGGATGTTTCGGGGACGCACGGGGCCATGCGCGCGGCGGCCGCGGC	
	171	255
K0326Y	CAGGAAGGCGGTATGGTTCTGAGGGCGAGAATGATGGCCTCGCATCAAGGGCTGACTCGGCTCAATTCAGTCGGATGAACTG	
W64Ao2	CAGGAAGGCGGTATGGTTCTGAGGGCGAGAATGATGGCCTCGCATCAAGGGCTGACTCGGCTCAATTCAGTCGGATGAACTG	
	256	340
K0326Y	GAGGTACCAGACATTTCTGAAGAGACAACGTGCGGTGCTGGTGTGGCTGATGCTCAAGCCTTGAACAGAGTTCGAGTGGTCCCCC	
W64Ao2	GAGGTACCAGACATTTCTGAAGAGACAACGTGCGGTGCTGGTGTGGCTGATGCTCAAGCCTTGAACAGAGTTCGAGTGGTCCCCC	
	341	425
K0326Y	CACCAAGCGATGGACAAAAAATATTCCAGATTGACCCCATGTTGCAAGGCTATAAGTACCATCTTGAGTATCGGTACAGCCTCTA	

W64Ao2 CACCAAGCGATGGACAAAAATATTCCAGATTGACCCCATGTTGCAAGGCTATAAGTACCATCTTGAGTATCGGTACAGCCTCTA  
 426 510  
 K0326Y TAGAAGAATCCGTTCCAGACATTGATGAACATGAAGGAGGCTTGAAGCCTTCTCCCGTAGTTATGAGAAGTTTGGATTTAATCGC  
 W64Ao2 TAGAAGAATCCGTTCCAGACATTGATGAACATGAAGGAGGCTTGAAGCCTTCTCCCGTAGTTATGAGAAGTTTGGATTTAATCGC  
 511 595  
 K0326Y AGCGCGGAAGGTATCACATATCGAGAATGGGCTCTGGAGCATTCTGCGCAGCATTGGTGGGTGACTTCAACAAC TGGGATCCAA  
 W64Ao2 AGCGCGGAAGGTATCACATATCGAGAATGGGCTCTGGAGCATTCTGCGCAGCATTGGTGGGTGACTTCAACAAC TGGGATCCAA  
 596 680  
 K0326Y ATGCAGATCGTATGAGCAAAAATGAGTTGGTGTGGGAAAATTTTCTGCCTAACAAATGCAGATGGTACATCACCTATTCTCA  
 W64Ao2 ATGCAGATCGTATGAGCAAAAATGAGTTGGTGTGGGAAAATTTTCTGCCTAACAAATGCAGATGGTACATCACCTATTCTCA  
 681 765  
 K0326Y TGGATCTCGTGTAAAGGTGAGAATGGATACTCCATCAGGGATAAAGGATTCAATCCAGCCTGGATCAAGTACTCAGTGCAGGCC  
 W64Ao2 TGGATCTCGTGTAAAGGTGAGAATGGATACTCCATCAGGGATAAAGGATTCAATCCAGCCTGGATCAAGTACTCAGTGCAGGCC  
 766 850  
 K0326Y CCAGGAGAAAATACCATATGATGGGATTTATTATGATCCTCTGAAGAGGTAAAGTATGTGTTTCAGGCATGCGCAACCTAAACGAC  
 W64Ao2 CCAGGAGAAAATACCATATGATGGGATTTATTATGATCCTCTGAAGAGGTAAAGTATGTGTTTCAGGCATGCGCAACCTAAACGAC  
 851 935  
 K0326Y CAAAATCATTGCGGATATATGAAACACATGTCGGAATGAGTAGCCCGAACC GAAGATAAACACATATGTAACCTTTAGGGATGA  
 W64Ao2 CAAAATCATTGCGGATATATGAAACACATGTCGGAATGAGTAGCCCGAACC GAAGATAAACACATATGTAACCTTTAGGGATGA  
 936 1020  
 K0326Y AGTCTCCCAAGAATAAAAAAATTGGATACAATGCAGTGCAAATAATGGCAATCCAAGAGCACTCATATTATGGAAGCTTTGGA  
 W64Ao2 AGTCTCCCAAGAATAAAAAAATTGGATACAATGCAGTGCAAATAATGGCAATCCAAGAGCACTCATATTATGGAAGCTTTGGA  
 1021 1105  
 K0326Y TACCATGTAAC TAATTTTTTTCGCCAAGTAGTCGTTTTGGTACCCAGAAGATTTGAAGCTTTTGATTGATAGAGCACATGAGC  
 W64Ao2 TACCATGTAAC TAATTTTTTTCGCCAAGTAGTCGTTTTGGTACCCAGAAGATTTGAAGCTTTTGATTGATAGAGCACATGAGC  
 1106 1190  
 K0326Y TTGGTTTGCTAGTTCTCATGGATGTGGTTCATAGTCATGCGTCAAGTAATACTCTGGATGGGTTGAATGGTTTTGATGGTACAGA  
 W64Ao2 TTGGTTTGCTAGTTCTCATGGATGTGGTTCATAGTCATGCGTCAAGTAATACTCTGGATGGGTTGAATGGTTTTGATGGTACAGA  
 1191 1275  
 K0326Y TACACATTACTTTACAGTGGTCCACGTGGCCATCACTGGATGTGGGATTCTCGCCTATTTAACTATGGGAAC TGGGAAGTTTTA  
 W64Ao2 TACACATTACTTTACAGTGGTCCACGTGGCCATCACTGGATGTGGGATTCTCGCCTATTTAACTATGGGAAC TGGGAAGTTTTA  
 1276 1360  
 K0326Y AGATTTCTTCTCTCCAATGCTAGATGGTGGCTCGAGGAATATAAGTTTGATGGTTTTCCGTTTTGATGGTGTGACCTCCATGATGT  
 W64Ao2 AGATTTCTTCTCTCCAATGCTAGATGGTGGCTCGAGGAATATAAGTTTGATGGTTTTCCGTTTTGATGGTGTGACCTCCATGATGT  
 1361 1445  
 K0326Y ACACCTACCACGGATTACAAGTAACATTTACGGGGAAC TCAATGAGTATTTGGCTTTGCCACCGATGTAGATGCAGTGGTTTA  
 W64Ao2 ACACCTACCACGGATTACAAGTAACATTTACGGGGAAC TCAATGAGTATTTGGCTTTGCCACCGATGTAGATGCAGTGGTTTA  
 1446 1530  
 K0326Y CTTGATGCTGGTAAATGATCTAATTCATGGACTTTATCCTGAGGCTGTAACCATTGGTGAAGATGTTAGTGGAAATGCCTACATTT  
 W64Ao2 CTTGATGCTGGTAAATGATCTAATTCATGGACTTTATCCTGAGGCTGTAACCATTGGTGAAGATGTTAGTGGAAATGCCTACATTT  
 \*

**Figura 8.** Secuencia de nucleótidos del gen *Amylose extender 1* en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2. Las variantes o SNP presentes entre ambas secuencias se encuentran señalados con asteriscos.

1531 1615  
 K0326Y GCCCTTCCTGTTACGATGGTGGGGTAGGTTTTGACTATCGGATGCATATGGCTGTGGCTGACAAATGGATTGACCTTCTCAAGC  
 W64Ao2 ACCAATCCTGTTACGATGGGGGGTAGGTTTTGACTATCGGATGCATATGGCTGTGGCTGACAAATGGATTGACCTTCTCAAGC  
 \* \*\* \* \*  
 1616 1700  
 K0326Y CAAAGTGATGAAACTTGAAGATGGGTGATATTGTGCACACTGACAAATAGGAGGTGGTTAGAGAAGTGTGTAACCTATGCTG  
 W64Ao2 CAAAGTGATGAAACTTGAAGATGGGTGATATTGTGCACACTGACAAATAGGAGGTGGTTAGAGAAGTGTGTAACCTATGCTG  
 1701 1785  
 K0326Y AAAGTCATGATCAAGCATTAGTCGGCGACAAGACTATTGCGTTTTGGTTGATGGACAAGGATATGTATGATTTTATGGCCCTCGA  
 W64Ao2 AAAGTCATGATCAAGCATTAGTCGGCGACAAGACTATTGCGTTTTGGTTGATGGACAAGGATATGTATGATTTTATGGCCCTCGA  
 1786 1870  
 K0326Y TAGACCTTCAACTCCTACCATTGATCGTGGGATAGCATTACATAAGATGATTAGACTTATCACAATGGGTTTAGGAGGAGAGGGC  
 W64Ao2 TAGACCTTCAACTCCTACCATTGATCGTGGGATAGCATTACATAAGATGATTAGACTTATCACAATGGGTTTAGGAGGAGAGGGC

```

1871
K0326Y TATCTTAATTTTCATGGGAAATGAGTTTGGACATCCTGAATGGATAGATTTTCCAAGAGGTCCGCAAAGACTTCCAAGTGGTAAGT 1955
W64Ao2 TATCTTAATTTTCATGGGAAATGAGTTTGGACATCCTGAATGGATAGATTTTCCAAGAGGTCCGCAAAGACTTCCAAGTGGTAAGT 2040
1956
K0326Y TTATTCCAGGGAATAACAACAGTTATGACAAATGTCGTCGAAGATTTGACCTGGGTGATGCAGACTATCTTAGGTATCATGGTAT 2041
W64Ao2 TTATTCCAGGGAATAACAACAGTTATGACAAATGTCGTCGAAGATTTGACCTGGGTGATGCAGACTATCTTAGGTATCATGGTAT 2125
2041
K0326Y GCAAGAGTTTGATCAGGCAATGCAACATCTTGAGCAAAAATATGAATTCATGACATCTGATCACCAGTATATTTCCCGGAAACAT 2126
W64Ao2 GCAAGAGTTTGATCAGGCAATGCAACATCTTGAGCAAAAATATGAATTCATGACATCTGATCACCAGTATATTTCCCGGAAACAT 2210
2126
K0326Y GAGGAGGATAAGGTGATTGTGTTGAAAAGGGAGATTTGGTATTTGTGTTCAACTTCCACTGCAACAACAGCTATTTTGACTACC 2211
W64Ao2 GAGGAGGATAAGGTGATTGTGTTGAAAAGGGAGATTTGGTATTTGTGTTCAACTTCCACTGCAACAACAGCTATTTTGACTACC 2295
2211
K0326Y GTATTGGTTGTCGAAAGCCTGGGGTGATAAGGTGGTCTTGACTCCGACGCTGGACTATTTGGTGGATTTAGCAGGATCCATCA 2266
W64Ao2 GTATTGGTTGTCGAAAGCCTGGGGTGATAAGGTGGTCTTGACTCCGACGCTGGACTATTTGGTGGATTTAGCAGGATCCATCA 2380
2266
K0326Y CGCAGCCGAGCACTTCACCGCCGACTGTTGCGATGATAATAGGCCATATTCATTCTCGGTTTATACACCAAGCAGAACATGTGTC 2381
W64Ao2 CGCAGCCGAGCACTTCACCGCCGACTGTTGCGATGATAATAGGCCATATTCATTCTCGGTTTATACACCAAGCAGAACATGTGTC
2381
K0326Y GTCTATGCTCCAGTGGAGTGA ---
W64Ao2 GTCTATGCTCCAGTGGAGTGATAG

```

**Figura 8.** Continuación.

Para el gen *Wx1*, el cual codifica la enzima GBSSI encargada de la síntesis de amilosa, la línea de referencia B73 presenta de una longitud de 1,830 pb (ID: AFW85998). En lo que respecta a las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2, se obtuvieron secuencias de 1,407 pb (Fig. 9). Fan y col. (2009) reportaron para este gen secuencias que van desde las 1,803 pb a las 1,815 pb en líneas de maíz tipo waxy provenientes de China (Lancangnuobaogu, ID: GQ354130 y Jiangsunonpin, ID: GQ354131).



Al comparar las secuencias obtenidas para este gen en K0326Y- QPM y W64Ao2 se observaron 4 SNP, los cuales se ubican en las posiciones 131 (T/A), 420 (G/C), 534 (G/C) y 1,326 (C/T) (Fig 8). Shin y col. (2006) caracterizaron la secuencia de este gen en 83 accesiones de maíz de tipo waxy, dent y sweet, quienes reportaron dos SNP en la posición 131 y 534, los cual corresponde con lo encontrado en el presente estudio, excepto que el SNP ubicado en la posición 131 por estos autores corresponde a una sustitución de C→A mientras que el encontrado en la misma posición para K0326Y-QPM y W64Ao2 corresponde a una sustitución de T→A.

En la Figura 9 se muestra la secuencia parcial del gen *Brittle endosperm 2 (Bt2)* con una longitud de 1,086 pb. Cabe mencionar que para este gen no fue posible cubrir una región de aproximadamente 500 pb del extremo 5', ya que este fragmento no pudo ser amplificado por PCR con los oligonucleótidos iniciadores diseñados a partir de la secuencia de la línea B73, lo cual sugiere que las secuencias en la región 5' son muy diferentes en las líneas estudiadas, por lo que no se da la unión del oligo diseñado aún a bajas temperaturas. De la secuencia parcial obtenida se identificó un SNP en la posición 402, presentando la base Adenina para K0336Y-QPM y Guanina para W64Ao2 (Fig 10), esta última coincidiendo con lo reportado para el maíz B73.

	1	85
K0326Y	ATGGGAGACGGGTACGAGACGGTCAGGTTCTTCCACTGCTACAAGCGCGGAGTGGACCGCGTGTTCGTTGACCACCCACTGTTCC	
W64Ao2	ATGGGAGACGGGTACGAGACGGTCAGGTTCTTCCACTGCTACAAGCGCGGAGTGGACCGCGTGTTCGTTGACCACCCACTGTTCC	
	86	170
K0326Y	TGGAGAGGGTTTGGGGAAAGACCGAGGAGAAGATCTACGGGCTGTGCTGGAACGGACTACAGGGACAACCAGCTGCGGTTTCAG	
W64Ao2	TGGAGAGGGTTTGGGGAAAGACCGAGGAGAAGATCTACGGGCTGACGCTGGAACGGACTACAGGGACAACCAGCTGCGGTTTCAG	
	171	255
		*
K0326Y	CCTGCTATGCCAGGCAGCACTTGAAGCTCCAAGGATCCTGAGCCTCAACAACAACCCATACTTCTCCGGACCATACGGGGAGGAC	
W64Ao2	CCTGCTATGCCAGGCAGCACTTGAAGCTCCAAGGATCCTGAGCCTCAACAACAACCCATACTTCTCCGGACCATACGGGGAGGAC	
	256	340
K0326Y	GTCGTGTTTCGTCTGCAACGACTGGCACACCGGCCCTCTCTCGTGCTACCTCAAGAGCAACTACCAGTCCCACGGCATCTACAGGA	
W64Ao2	GTCGTGTTTCGTCTGCAACGACTGGCACACCGGCCCTCTCTCGTGCTACCTCAAGAGCAACTACCAGTCCCACGGCATCTACAGGA	
	341	425
K0326Y	CAAAGACCGCTTTCTGCATCCACAACATCTCTACCAGGGCCGGTTCGCTTCTCCGACTACCCGGAGCTGAACCTCCCCGAGAG	
W64Ao2	CAAAGACCGCTTTCTGCATCCACAACATCTCTACCAGGGCCGGTTCGCTTCTCCGACTACCCGGAGCTGAACCTCCCCGAGAG	
	426	* 510

K0326Y ATTC AAGTCGTCCTTCGATTTTCATCGACGGCTACGAGAAGCCCGTGGAAGGCCGGAAGATCAACTGGATGAAGGCCGGGATCCTC  
 W64Ao2 ATTC AAGTCGTCCTTCGATTTTCATCGACGGCTACGAGAAGCCCGTGGAAGGCCGGAAGATCAACTGGATGAAGGCCGGGATCCTC  
 511 595  
 K0326Y GAGGCCGACAGGGTCTCACCGTGAGCCCCACTACGCCGAGGAGCTCATCTCCGGCATCGCCAGGGGCTGCGAGCTCGACAACA  
 W64Ao2 GAGGCCGACAGGGTCTCACCGTGAGCCCCACTACGCCGAGGAGCTCATCTCCGGCATCGCCAGGGGCTGCGAGCTCGACAACA  
 596 \* 680  
 K0326Y TCATGCGCCTCACCGGCATCACCGGCATCGTCAACGGCATGGACGTGAGCGAGTGGGACCCAGCAGGGACAAGTACATCGCCGT  
 W64Ao2 TCATGCGCCTCACCGGCATCACCGGCATCGTCAACGGCATGGACGTGAGCGAGTGGGACCCAGCAGGGACAAGTACATCGCCGT  
 681 765  
 K0326Y GAAGTACGACGTGTCGACGGCCGTGGAGGCCAAGGCGCTGAACAAGGAGGCGCTGCAGGCGGAGGTCGGGCTCCCGTGGACCGG  
 W64Ao2 GAAGTACGACGTGTCGACGGCCGTGGAGGCCAAGGCGCTGAACAAGGAGGCGCTGCAGGCGGAGGTCGGGCTCCCGTGGACCGG  
 766 850  
 K0326Y AACATCCCCTGGTGGCGTTCATCGGCAGGCTGGAAGAGCAGAAGGGCCCCGACGTGATGGCGGCCCATCCCGCAGCTCATGG  
 W64Ao2 AACATCCCCTGGTGGCGTTCATCGGCAGGCTGGAAGAGCAGAAGGGCCCCGACGTGATGGCGGCCCATCCCGCAGCTCATGG  
 851 935  
 K0326Y AGATGGTGGAGGACGTGCAGATCGTTCTGCTGGGCACGGGCAGAGAAGAAGTTCGAGCGCATGCTCATGAGCGCCGAGGAGAAGTT  
 W64Ao2 AGATGGTGGAGGACGTGCAGATCGTTCTGCTGGGCACGGGCAGAGAAGAAGTTCGAGCGCATGCTCATGAGCGCCGAGGAGAAGTT  
 936 1020  
 K0326Y CCCAGGCAAGGTGCGCGCCGTGGTCAAGTTCAACGCGGCGCTGGCGCACACATCATGGCCGGCGCCGACGTGCTCGCCGTCAAC  
 W64Ao2 CCCAGGCAAGGTGCGCGCCGTGGTCAAGTTCAACGCGGCGCTGGCGCACACATCATGGCCGGCGCCGACGTGCTCGCCGTCAAC  
 1021 1105  
 K0326Y AGCCGCTTCGAGCCCTGCGGCCCTCATCCAGCTGCAGGGGATGCGATACGGAACGCCCTGCGCCTGCGCGTCCACCGTGGACTCG  
 W64Ao2 AGCCGCTTCGAGCCCTGCGGCCCTCATCCAGCTGCAGGGGATGCGATACGGAACGCCCTGCGCCTGCGCGTCCACCGTGGACTCG  
 1106 1190  
 K0326Y TCGACACCATCATCGAAGGCAAGACCGGGTTCACATGGGCCCGCTCAGCGTCGACTGCAACGTGTCGGAGCCGGCGGACGTCAA  
 W64Ao2 TCGACACCATCATCGAAGGCAAGACCGGGTTCACATGGGCCCGCTCAGCGTCGACTGCAACGTGTCGGAGCCGGCGGACGTCAA  
 1191 1245  
 K0326Y GAAGGTGGCCACCACCTTGCAGCGCGCATCAAGTGGTGGCACGCCGGCGTACGAGGAGATGGTGAAGAACTGCATGATCCAG  
 W64Ao2 GAAGGTGGCCACCACCTTGCAGCGCGCATCAAGTGGTGGCACGCCGGCGTACGAGGAGATGGTGAAGAACTGCATGATCCAG  
 1246 1330  
 K0326Y GATCTCTCTGGAAGGGCCCTGCCAAGAACTGGGAGAACGTGCTGCTCAGCCTCGGGGTCGCCGGCGGAGCCAGGGGTTGAAAG  
 W64Ao2 GATCTCTCTGGAAGGGCCCTGCCAAGAACTGGGAGAACGTGCTGCTCAGCCTCGGGGTCGCCGGCGGAGCCAGGGGTTGAAAG  
 1331 \*  
 K0326Y GCGAGGAGATCGCGCCGCTCGCCAAGGAGAACGTGGCCGCGCCCTGA  
 W64Ao2 GCGAGGAGATCGCGCCGCTCGCCAAGGAGAACGTGGCCGCGCCCTGA

**Figura 9.** Secuencia de nucleótidos del gen *Waxy 1* en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2. Las variantes o SNP presentes entre ambas secuencias se encuentran señalados con asteriscos.

1 85  
 K0326Y GGGCACATTGGAGGGTACAAGAATGAAGGGTTGTTGAAGTCTTAGCTGCACAGCAGAGCCAGATAATCCAAACTGGTTTCAGG  
 W64Ao2 GGGCACATTGGAGGGTACAAGAATGAAGGGTTGTTGAAGTCTTAGCTGCACAGCAGAGCCAGATAATCCAAACTGGTTTCAGG  
 86 170  
 K0326Y G TACTGCAGATGCTGTAAGGCAGTACTTGTGGTTGTTGAGGAGCATAATGTGATGGAATTTCTAATTCCTTGTGGCGATCACCT  
 W64Ao2 G TACTGCAGATGCTGTAAGGCAGTACTTGTGGTTGTTGAGGAGCATAATGTGATGGAATTTCTAATTCCTTGTGGCGATCACCT  
 171 255  
 K0326Y GTACCGGATGGACTATGAAAAGTTCATTTCAGGCACACAGAGAAAACAAATGCTGATATTACCGTTGCTGCCCTACCGATGGATGAG  
 W64Ao2 GTACCGGATGGACTATGAAAAGTTCATTTCAGGCACACAGAGAAAACAAATGCTGATATTACCGTTGCTGCCCTACCGATGGATGAG  
 256 340  
 K0326Y AAACGTGCAACTGCATTTGGCCTCATGAAAATGATGAAGAAGGGAGGATCATTGAGTTTGTGAGAAACC GAAAGGAGAGCAGT  
 W64Ao2 AAACGTGCAACTGCATTTGGCCTCATGAAAATGATGAAGAAGGGAGGATCATTGAGTTTGTGAGAAACC GAAAGGAGAGCAGT  
 341 425  
 K0326Y TGAAGCAATGATGGTTGACACCACCATCTTGGCCTTGATGACGTGAGGGCAAAGGAAATACCTTATATTGCTAGCATGGGTAT  
 W64Ao2 TGAAGCAATGATGGTTGACACCACCATCTTGGCCTTGATGACGTGAGGGCAAAGGAAATGCCTTATATTGCTAGCATGGGTAT  
 426 \* 510

```

K0326Y CTATGTTTTAGCAAGATGTAATGCTTCAGCTCCTCCGTGAACAATTTCTGAAGCCAATGACTTTGGAAGTGAGGTTATTCCA
W64Ao2 CTATGTTTTAGCAAGATGTAATGCTTCAGCTCCTCCGTGAACAATTTCTGAAGCCAATGACTTTGGAAGTGAGGTTATTCCA
511 595
K0326Y GGTGCAACCAGCATTGGAAGAGGGTTCAGGCTTATCTGTATGATGGTTACTGGGAAGATATCGGTACCATTGCGGCATTTTATA
W64Ao2 GGTGCAACCAGCATTGGAAGAGGGTTCAGGCTTATCTGTATGATGGTTACTGGGAAGATATCGGTACCATTGCGGCATTTTATA
596 680
K0326Y ATGCAAACCTTGGGAATAACCAAGAAGCCAATGCCAGATTTTCAGCTTCTATGACCGTTTTGCTCCAATTTATACACAACCTCGACA
W64Ao2 ATGCAAACCTTGGGAATAACCAAGAAGCCAATGCCAGATTTTCAGCTTCTATGACCGTTTTGCTCCAATTTATACACAACCTCGACA
681 765
K0326Y CCTGCCACCTTCAAAGGTTCTTGATGCTGATGTGACAGACAGTGTATTGGTGAAGGATGTGTTATTAATAACTGCAAGATAAAC
W64Ao2 CCTGCCACCTTCAAAGGTTCTTGATGCTGATGTGACAGACAGTGTATTGGTGAAGGATGTGTTATTAATAACTGCAAGATAAAC
766 850
K0326Y CATTCTGTAGTTGGATCCGATCTTGCATATCTGAAGGTGCTATCATAGACGGACAGTTTACTAATGGGTGCGGACTACTATGAGA
W64Ao2 CATTCTGTAGTTGGATCCGATCTTGCATATCTGAAGGTGCTATCATAGACGGACAGTTTACTAATGGGTGCGGACTACTATGAGA
851 935
K0326Y CAGAAGCTGATAAAAACTCCTTGCCGAAAAAGGTGGCATTCTATTGGTATTGGGAAAAATTCATGCATCAGGAGAGCAATCAT
W64Ao2 CAGAAGCTGATAAAAACTCCTTGCCGAAAAAGGTGGCATTCTATTGGTATTGGGAAAAATTCATGCATCAGGAGAGCAATCAT
936 1020
K0326Y TGACAAGAATGCTCGAATTGGAGACAATTTAAGATACTCAATGCTGACAATGTTCAAGAAGCTGCAAGGGGAGACAGACGGGTAC
W64Ao2 TGACAAGAATGCTCGAATTGGAGACAATTTAAGATACTCAATGCTGACAATGTTCAAGAAGCTGCAAGGGGAGACAGACGGGTAC
1021
K0326Y TTCATCAAAGGTGGAATTGTCACAGTGATCAAGGATGCTTTACTCCCTAGTGAACAGTTATATGA
W64Ao2 TTCATCAAAGGTGGAATTGTCACAGTGATCAAGGATGCTTTACTCCCTAGTGAACAGTTATATGA

```

**Figura 10.** Secuencia de nucleótidos parcial del gen *Brittle endosperm 2* en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2. Las variantes o SNP presentes entre ambas secuencias se encuentran señalados con asteriscos.

En el caso del gen *Sugary1 (Su1)* se presentó un problema similar a lo mencionado para el gen *Bt2*, solo que en este caso no fue posible la amplificación por PCR de fragmentos en ambos extremos del gen (5' y 3'). La secuencia obtenida para *Su1* fue de 1,719 pb (Fig. 10), la cual carece de aproximadamente 720 pb en el extremo 5' y 480 pb en el 3', tomando como referencia la secuencia reportada para la línea B73. Para esta secuencia parcial solo se pudo identificar un SNP entre ambas líneas de maíz, el cual se ubicó en la posición 1,333 presentándose G para el parental vítreo y A para el parental opaco (Fig 11).

Los SNP encontrados en regiones codificantes del genoma pueden clasificarse en 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 (Liao y col., 2009). Para conocer el efecto de los SNP identificados sobre la secuencia predicha de aminoácidos, se utilizó la plataforma de traducción ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). Este análisis permitió identificar 8 alteraciones en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas, los cuales se describen a continuación.

En la Figura 12 se muestra la secuencia de aminoácidos de la enzima SBEIIb predicha de la secuencia de nucleótidos del gen *Ae1*. De los 8 SNP encontrados en *Ae1*, 5 dieron lugar a diferencias en aminoácidos ubicados en la posición 379 con His/Gln, 380 con Ser/Cys, 510 con Phe/Leu, 511 con Ala/Thr y 512 con Leu/Asn para K0326Y-QPM y W64A02, respectivamente. Al realizar una comparación entre las secuencias de aminoácidos de K0326Y-QPM, W64A02 y lo reportado para la línea B73, no se observaron diferencias en el número de aminoácidos presentes en la cadena (799 aa).

	1	85
K0326Y	ATAATCTCTTCTATAATAAGTTTGATTGGCAAGGTGACCTACCCCTTGGGTACCATCAGAAGGACCTTGT	CATATATGAAATGC
W64A02	ATAATCTCTTCTATAATAAGTTTGATTGGCAAGGTGACCTACCCCTTGGGTACCATCAGAAGGACCTTGT	CATATATGAAATGC
	86	170
K0326Y	ATTTGCGTGGATTCAAAAGCACAACTCAAGCAAGACAAAACCCAGGAACCTACATTGGTGTGTGTCAAAGCTTGACCATCT	
W64A02	ATTTGCGTGGATTCAAAAGCACAACTCAAGCAAGACAAAACCCAGGAACCTACATTGGTGTGTGTCAAAGCTTGACCATCT	
	171	255
K0326Y	AAAGGAACCTGGAGTGAACGTATAGAGCTAATGCCCTGCCATGAGTTCAATGAGCTAGAGTACTTCAGCTCCTCTTCGAAGATG	
W64A02	AAAGGAACCTGGAGTGAACGTATAGAGCTAATGCCCTGCCATGAGTTCAATGAGCTAGAGTACTTCAGCTCCTCTTCGAAGATG	
	256	340
K0326Y	AACCTCTGGGGATATTCCACAATAAAATTTTTCTACCAATGGCAAGATATTCTTCAAGTGGCATAAGAGACTCTGGATGTGGTG	
W64A02	AACCTCTGGGGATATTCCACAATAAAATTTTTCTACCAATGGCAAGATATTCTTCAAGTGGCATAAGAGACTCTGGATGTGGTG	
	341	425
K0326Y	CCATAAATGAATTTAAAGCTTTTGTAAGGGAGGCCACAAACGGGAATTGAGGTGATCATGGATGTTGTCTTCAATCATAACAGC	
W64A02	CCATAAATGAATTTAAAGCTTTTGTAAGGGAGGCCACAAACGGGAATTGAGGTGATCATGGATGTTGTCTTCAATCATAACAGC	
	426	510
K0326Y	TGAAGGTAATGAGAAAGGCCCAATATTATCCTTTAGGGGGATAGATAAATAGTACATACTACATGCTTGACCTAAGGGAGAGTTT	
W64A02	TGAAGGTAATGAGAAAGGCCCAATATTATCCTTTAGGGGGATAGATAAATAGTACATACTACATGCTTGACCTAAGGGAGAGTTT	
	511	595
K0326Y	TATAATTATTCTGGTTGTGGAAATACCTTCAATTGTAATCATCCTGTAGTCCGTGAATTTATAGTGGATTGCTTGAGATACTGGG	
W64A02	TATAATTATTCTGGTTGTGGAAATACCTTCAATTGTAATCATCCTGTAGTCCGTGAATTTATAGTGGATTGCTTGAGATACTGGG	

	596		680
K0326Y	TAACAGAAATGCATGTTGATGGTTTTCGTTTTGACCTTGCATCTATACTGACCAGAGGATGCAGTCTATGGGATCCAGTTAATGT		
W64Ao2	TAACAGAAATGCATGTTGATGGTTTTCGTTTTGACCTTGCATCTATACTGACCAGAGGATGCAGTCTATGGGATCCAGTTAATGT		
	681		765
K0326Y	GTATGGAAGTCCAATGGAAGGTGACATGATTACGACAGGGACACCTCTTGTGCCCCACCACTTATTGACATGATTAGCAATGAC		
W64Ao2	GTATGGAAGTCCAATGGAAGGTGACATGATTACGACAGGGACACCTCTTGTGCCCCACCACTTATTGACATGATTAGCAATGAC		
	766		850
K0326Y	CCAATTCTGGAAATGTCAAGCTCATTGCTGAAGCATGGGATGCAGGAGGTCTCTATCAAGTTGGTCAGTTTCCTCACTGGAACG		
W64Ao2	CCAATTCTGGAAATGTCAAGCTCATTGCTGAAGCATGGGATGCAGGAGGTCTCTATCAAGTTGGTCAGTTTCCTCACTGGAACG		
	851		935
K0326Y	TTTGGTCAGAGTGAATGGAAGTATCGCGATACCGTGCCTCAGTTCATCAAAGGCACAGATGGATTTGCTGGTGCTTTTGCTGA		
W64Ao2	TTTGGTCAGAGTGAATGGAAGTATCGCGATACCGTGCCTCAGTTCATCAAAGGCACAGATGGATTTGCTGGTGCTTTTGCTGA		
	936		1020
K0326Y	ATGCCTATGTGGAAGTCCACAGTTATACAGGCAGGGGGAGGAAGCCTTGGCAGATATCAACTTTGTATGTGCACACGATGGA		
W64Ao2	ATGCCTATGTGGAAGTCCACAGTTATACAGGCAGGGGGAGGAAGCCTTGGCAGATATCAACTTTGTATGTGCACACGATGGA		
	1021		1105
K0326Y	TTTACACTGGCTGATTTGGTCACATAACAATAGCAAGTACAACCTGTCAAATGGTGAGGACAACAGAGATGGGAAAATCATAATC		
W64Ao2	TTTACACTGGCTGATTTGGTCACATAACAATAGCAAGTACAACCTGTCAAATGGTGAGGACAACAGAGATGGGAAAATCATAATC		
	1106		1190
K0326Y	TTAGCTGGAATTTGGGGAGGAAGGAGAATTTGCAAGTCTGTGAGTCCGAAGATTAAGGAAGAGGCAAATGCGCAATTTCTTTGT		
W64Ao2	TTAGCTGGAATTTGGGGAGGAAGGAGAATTTGCAAGTCTGTGAGTCCGAAGATTAAGGAAGAGGCAAATGCGCAATTTCTTTGT		
	1191		1245
K0326Y	TTGTCTTATGGTTTCTCAGGGAGTTCGAATGTTCTACATGGGCGATGAATATGGTCACACAAAGGGAGGGAACAACAATACGTAC		
W64Ao2	TTGTCTTATGGTTTCTCAGGGAGTTCGAATGTTCTACATGGGCGATGAATATGGTCACACAAAGGGAGGGAACAACAATACGTAC		
	1246		1330
K0326Y	TGCCATGACCATTATGTCAATTATTTCCGTTGGGATAAGAAGGAAGAACAATCCTCTGATTTGTACAGATTCTGCCGTCTCATGA		
W64Ao2	TGCCATGACCATTATGTCAATTATTTCCGTTGGGATAAGAAGGAAGAACAATCCTCTGATTTGTACAGATTCTGCCGTCTCATGA		

**Figura 11.** Secuencia de nucleótidos parcial del gen *Sugary 1* en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2. Las variantes o SNP presentes entre ambas secuencias se encuentran señalados con asteriscos.

	1331		1415
K0326Y	CCGAATTCGCAAGAATGTAATCTCTTGGCCTTGAGGACTTCCCGACTTCAGAACGGGTTGAAATGGCACGGTCATCAGCCCGG		
W64Ao2	CCAAATTCGCAAGAATGTAATCTCTTGGCCTTGAGGACTTCCCGACTTCAGAACGGGTTGAAATGGCACGGTCATCAGCCCGG		
	*		
	1416		1500
K0326Y	GAAGCCTGACTGGTCAGAGGCAAGCCGATTGCTTGCCTTACCATGAAGGACGAAACCAAAGGCGAGATCTACGTGGCCTTCAAC		
W64Ao2	GAAGCCTGACTGGTCAGAGGCAAGCCGATTGCTTGCCTTACCATGAAGGACGAAACCAAAGGCGAGATCTACGTGGCCTTCAAC		
	1501		1585
K0326Y	ACCAGTCACCTTCCGGTGGTTGTTGGGCTTCCAGAGCGCTCTGGGTTCCGATGGGAGCCGGTGGTGGACACCGGCAAGGAGGCAC		
W64Ao2	ACCAGTCACCTTCCGGTGGTTGTTGGGCTTCCAGAGCGCTCTGGGTTCCGATGGGAGCCGGTGGTGGACACCGGCAAGGAGGCAC		
	1586		1670
K0326Y	CATATGACTTCTCACCAGTGGCCTGCCAGATCGTGCTGTACCCGTCTACCAGTTCTCTCATTTCTCAACTCCAATCTCTATCC		
W64Ao2	CATATGACTTCTCACCAGTGGCCTGCCAGATCGTGCTGTACCCGTCTACCAGTTCTCTCATTTCTCAACTCCAATCTCTATCC		
	1671		
K0326Y	TATGCTCAGCTACTCTCCATCATCCTTGTATTGCGCCCTGATGTCTGA		
W64Ao2	TATGCTCAGCTACTCTCCATCATCCTTGTATTGCGCCCTGATGTCTGA		

**Figura 11.** Continuación.

	1		85
K0326Y	MAFAVSGAVLGGAVRAPRLTGGGEGSLVFRHTGLFLTRGARVGCSTHGAMAAAAARKAVMVP	EGENDGLASRADS	QFQSD
W64A02	MAFAVSGAVLGGAVRAPRLTGGGEGSLVFRHTGLFLTRGARVGCSTHGAMAAAAARKAVMVP	EGENDGLASRADS	QFQSD
	86		170
K0326Y	EVPDISEETTCGAGVADAQALNRVRVPPPSDGQKIFQIDPMLQGYKYHLEYRYSLYRRI	RSIDEHEGGLEAF	SRSYEKFGFNR
W64A02	EVPDISEETTCGAGVADAQALNRVRVPPPSDGQKIFQIDPMLQGYKYHLEYRYSLYRRI	RSIDEHEGGLEAF	SRSYEKFGFNR
	171		255
K0326Y	SAEGITYREWAPGAFSAALVGFNNDPNADRMSKNEFGVWEIFLPNNADGTSPIPHGSRV	KVRMDTPSGIKD	SIPAWIKYSVQA
W64A02	SAEGITYREWAPGAFSAALVGFNNDPNADRMSKNEFGVWEIFLPNNADGTSPIPHGSRV	KVRMDTPSGIKD	SIPAWIKYSVQA
	256		340
K0326Y	PGEIPYDGIYYDPPEEVKYVFRHAQPKRPKSLRIYETHVGMSSPEPKINTYVNRDEVL	PRIKKLGYN	AVQIMAIQEHSYYGSFG
W64A02	PGEIPYDGIYYDPPEEVKYVFRHAQPKRPKSLRIYETHVGMSSPEPKINTYVNRDEVL	PRIKKLGYN	AVQIMAIQEHSYYGSFG
	341		425
K0326Y	YHVTNFFAPSSRFGTPEDLKSLIDRAHELGLLVLMDDVVHSHASSNTLDGLNGFDGTD	THYFHSGPRGHH	MWDSRLEFNYGNWEVL
W64A02	YHVTNFFAPSSRFGTPEDLKSLIDRAHELGLLVLMDDVVQCHASSNTLDGLNGFDGTD	THYFHSGPRGHH	MWDSRLEFNYGNWEVL
	426	**	510
K0326Y	RFLLSNARWLEEKFDGFRFDGVTSMYTHHGLQVTFGTGNFNEYFGFATD	VDVAVVYLM	VNDLIHGLYPEAVTIGEDVSGMPTF
W64A02	RFLLSNARWLEEKFDGFRFDGVTSMYTHHGLQVTFGTGNFNEYFGFATD	VDVAVVYLM	VNDLIHGLYPEAVTIGEDVSGMPTL
			*
	511		595
K0326Y	ALPVHDGGVGFDRMHMAVADKWIDLKQSDETWKMGDIVHTLTNRRWLEKCVTYAESHDQ	ALVGDKTIAFWL	MDKMDYDFMALD

```

W64Ao2 TNPVHDGGVGFDIRMHMAVADKWIDLLKQSDETWKMGDIVHTLTNRRWLEKCVTYAESHDQALVGDKTIAFWLMDKDMYDFMALD
**
596
K0326Y RPSTPTIDRGIALHKMIRLITMGLGGEGYLNFMGNEFGHPEWIDFPRGPQRLPSGKFIPGNNSYDKCRRRFDLGDADYLRYHGM 680
W64Ao2 RPSTPTIDRGIALHKMIRLITMGLGGEGYLNFMGNEFGHPEWIDFPRGPQRLPSGKFIPGNNSYDKCRRRFDLGDADYLRYHGM
681 765
K0326Y QEFDQAMQHLEQKYEFMTSDHQYISRKHEEDKVIVFEKGLVVFVFNHCNNSYFDYRIGCRKPGVYKVVLDSDAGLFGGFSRIHH
W64Ao2 QEFDQAMQHLEQKYEFMTSDHQYISRKHEEDKVIVFEKGLVVFVFNHCNNSYFDYRIGCRKPGVYKVVLDSDAGLFGGFSRIHH
766
K0326Y AAHFTADCSDHNRPYFSVYTPSRTC VVYAPVE
W64Ao2 AAHFTADCSDHNRPYFSVYTPSRTC VVYAPVE

```

**Figura 12.** Secuencia de aminoácidos de la enzima SBEIIb en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen *Amylose extender 1*. Se indica con asterisco las diferencias de aminoácidos entre las dos líneas, en color gris se señala la región catalítica predicha.

La línea de maíz K0326Y-QPM presentó 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 ambas líneas de maíz.

En el caso de la enzima GBSSI codificada por *Wx1* presentó una longitud de 468 aminoácidos para ambas líneas de maíz (Fig. 13), lo cual difiere de lo reportado para B73 en donde tiene una longitud de 609 aa (ID: NM\_001111531). Existiendo reportes de variaciones en la longitud para esta enzima, (Bao y col., 2012) en maíces tipo waxy procedentes de China, quienes reportan longitudes

variantes entre los 600 y 605 aa esta enzima. En relación a los SNP encontrados en el gen *Wx1* solo uno de ellos provocó el cambio en un aminoácido, ubicado en la posición 44 dando como resultado Val (V) para la línea K0326Y-QPM y Pro (P) para W64Ao2 (Fig.12).

En el caso de la enzima AGPS1 solo se presentan 359 aa (Fig. 14) correspondientes a la secuencia de nucleótidos parcial del gen *Bt2*. Esta secuencia resulta en casi 100 aa más corta que la reportada en la línea de maíz B73 (AFW61819.1), donde la enzima consta de un total de 475 aa. Las secuencias reportadas para esta enzima en diferentes líneas de maíz muestran un gran porcentaje de homología, pero debido a la sección faltante de la secuencia es imposible establecer el porcentaje de homología de estas secuencias. Dentro de la secuencia solo se localizó una alteración en la posición 47 de la secuencia predicha el aminoácido Ile (I) para el parental K0326Y-QPM contra el aminoácido Met (M) para W64Ao2, siendo el único cambio registrado para ambas secuencias (Fig 13).

	1		85
K0326Y	MGDGYETVRRFFHCYKRGVDRVFDHPLFLERVWGKTEEKIYGPVAGTDYRDNQLRFSLLCQAAL	EAPRILSLN	NNPYFSGPYGED
W64Ao2	MGDGYETVRRFFHCYKRGVDRVFDHPLFLERVWGKTEEKIYGPVAGTDYRDNQLRFSLLCQAAL	EAPRILSLN	NNPYFSGPYGED
	85	*	170
K0326Y	VVFCNDWHTGPLSCYLKSNYQSHGIYRTKTAFCIHNISYQGRFAFS	DYPELNLP	PERFKSSFDFIDGYEKPVEGRKINWMKAGIL
W64Ao2	VVFCNDWHTGPLSCYLKSNYQSHGIYRTKTAFCIHNISYQGRFAFS	DYPELNLP	PERFKSSFDFIDGYEKPVEGRKINWMKAGIL
	171		255
K0326Y	EADRVLTVSPYYAEELISGIARGCELDNIMRLTGITGIVNGMDVSEWDPSRD	KYIAVKYDV	STAVEAKALNKEALQAEVGLPVDR
W64Ao2	EADRVLTVSPYYAEELISGIARGCELDNIMRLTGITGIVNGMDVSEWDPSRD	KYIAVKYDV	STAVEAKALNKEALQAEVGLPVDR
	256		340
K0326Y	NIPLVAFIGRLEEQKGPDMVAAAIPQLMEMVEDVQIVLLGTGKKKFERMLMSA	EKFPGKVR	AVVVFNAALAHHIMAGADVLAVT
W64Ao2	NIPLVAFIGRLEEQKGPDMVAAAIPQLMEMVEDVQIVLLGTGKKKFERMLMSA	EKFPGKVR	AVVVFNAALAHHIMAGADVLAVT
	341		425
K0326Y	SRFEPCLIQLGMRYPGPCACASTGGLVDTIIEGKTGFHMGRLSVDCN	VVEPADVK	KVATTLQRAIKVVGTPAYEEMVRNCMIQ
W64Ao2	SRFEPCLIQLGMRYPGPCACASTGGLVDTIIEGKTGFHMGRLS		
	426		
K0326Y	DLSWKGPAKNWENVLLSLGVAGGEPGVEGEEIAPLAKENVAAP		
W64Ao2	DLSWKGPAKNWENVLLSLGVAGGEPGVEGEEIAPLAKENVAAP		



**Figura 13.** 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, en color gris se señala la región catalítica predicha.

```

1                                                                                               85
K0326Y IGGYKNEGFVEVLAAQQSPDNPWFQGTADAVRQYLWLFEEHNVMEFLILAGDHLRYMDYEKFIQAHRETNADITVAALPMDEKR
W64Ao2 IGGYKNEGFVEVLAAQQSPDNPWFQGTADAVRQYLWLFEEHNVMEFLILAGDHLRYMDYEKFIQAHRETNADITVAALPMDEKR
86                                                                                               170
K0326Y ATAFGLMKIDEEGRIIIEFAEKPKGEQLKAMMVDTTILGLDDVRAKEIPYIASMGIYVFSKDVMLQLLREQFPEANDFGSEVIPGA
W64Ao2 ATAFGLMKIDEEGRIIIEFAEKPKGEQLKAMMVDTTILGLDDVRAKEMPYIASMGIYVFSKDVMLQLLREQFPEANDFGSEVIPGA
171                                                                                               255
K0326Y TSIGKRVQAYLYDGYWEDIGTIAAFYNANLGITKKPMPDFSFYDRFAPIYTPRHLPPSKVLDADVTDVIGEGCVIKNCKINHS
W64Ao2 TSIGKRVQAYLYDGYWEDIGTIAAFYNANLGITKKPMPDFSFYDRFAPIYTPRHLPPSKVLDADVTDVIGEGCVIKNCKINHS
256                                                                                               340
K0326Y VVGLRSCISEGAIIEDSLLMGADYYETEADKLLAEKGGIPIGIGKNSCIRRAIIDKNARIGDNVKILNADNVQEAARETDGYFI
W64Ao2 VVGLRSCISEGAIIEDSLLMGADYYETEADKLLAEKGGIPIGIGKNSCIRRAIIDKNARIGDNVKILNADNVQEAARETDGYFI
341
K0326Y KGGIVTVIKDALLPSGTVI
W64Ao2 KGGIVTVIKDALLPSGTVI

```

**Figura 14.** Secuencia parcial de aminoácidos de la enzima AGPS1 en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen *Brittle endosperm 2*. Se indican con asterisco las diferencias de aminoácidos entre las dos líneas, en color gris se señala la región catalítica predicha.

La secuencia parcial de aminoácidos de la enzima ISA1 predicha del gen *Su1* (ISA1) es de 555 aa (Fig. 15), la cual es más pequeña en alrededor de 230 aa con respecto a lo reportado para B73 (789 aa) (AFW61494.1). Como se mencionó anteriormente, no se obtuvieron las secuencias completas por problemas durante la amplificación de los extremos 5' y 3'. Sin embargo, la región no amplificada del extremo 3' no afectó la predicción de la proteína puesto que la región secuenciada contiene el codón de paro para esta proteína. En lo que respecta al SNP encontrado, este provoca la presencia del aminoácido Glu (E)

en K0326Y-QPM y Lys (K) en W64Ao2 encontrándose en la posición 428 de la secuencia predicha.

Algunos SNP pueden ser responsables de crear nuevos fenotipos dependiendo de la región en la que se localicen. Se sabe que SNP 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 SNP 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 (Chamary y col., 2006, Gupta y col., 2008).

Dentro de los genes estudiados se encontraron 3 SNP que provocan un cambio de aminoácido localizados en regiones catalíticas predichas. Para la enzima almidón sintasa unida al granulo (GBSSI) la sustitución de Val→Pro y los cambios de His→Gln y Ser→Cys para la enzima ramificadora (SBEIIb).

	1	85
K0326Y	MHLRGFTKHNSKTKHPGTYIGAVSKLDHLKELGVNCIELMPCHEFNELEYFSSSSKMNFWGYSTINFFSPMARYSSSGIRDSGC	
W64Ao2	MHLRGFTKHNSKTKHPGTYIGAVSKLDHLKELGVNCIELMPCHEFNELEYFSSSSKMNFWGYSTINFFSPMARYSSSGIRDSGC	
	86	170
K0326Y	GAINEFKAFVREAHKRGIEVIMDVFNHTAEGNEKGPILSFRGIDNSTYYMLAPKGEFYNYSGCGNTFNCNHPVREFIVDCLRY	
W64Ao2	GAINEFKAFVREAHKRGIEVIMDVFNHTAEGNEKGPILSFRGIDNSTYYMLAPKGEFYNYSGCGNTFNCNHPVREFIVDCLRY	
	171	255
K0326Y	WVTEMHVDGFRFDLASILTRGCSLWDPVNVYVYSPMEGDMITGTPLVAPPLIDMISNDPILGNVKLIAEAWDAGGLYQVGFPHW	
W64Ao2	WVTEMHVDGFRFDLASILTRGCSLWDPVNVYVYSPMEGDMITGTPLVAPPLIDMISNDPILGNVKLIAEAWDAGGLYQVGFPHW	
	256	340
K0326Y	NVWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFAGAFAECLCGSPQLYQAGGRKPWHSINFVCAHDGFTLADLVTYNSKYNLNGEDNRDGENH	
W64Ao2	NVWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFAGAFAECLCGSPQLYQAGGRKPWHSINFVCAHDGFTLADLVTYNSKYNLNGEDNRDGENH	
	341	425
K0326Y	NLSWNCGEEGEFASLSVRRLRKRQMRNFFVCLMVSQGVPMFYMGDEYGHYKGGNNNTYCHDHVYNYFRWDKKEEQSSDLYRFCRL	
W64Ao2	NLSWNCGEEGEFASLSVRRLRKRQMRNFFVCLMVSQGVPMFYMGDEYGHYKGGNNNTYCHDHVYNYFRWDKKEEQSSDLYRFCRL	
	426	510
K0326Y	MTEFRKECESLGLDFPTSERLKWGHGQPGKPDWSEASRFVAFMKDETKGEIYVAFNTSHLPVVVGLPERSGFRWEPVVDTGKE	
W64Ao2	MTKFRKECESLGLDFPTSERLKWGHGQPGKPDWSEASRFVAFMKDETKGEIYVAFNTSHLPVVVGLPERSGFRWEPVVDTGKE	
	*	
	511	

K0326Y APYDFLTDGLPDRAVTVYQFSHFLNSNLYPMLSYSIIILVLRPDV  
W64Ao2 APYDFLTDGLPDRAVTVYQFSHFLNSNLYPMLSYSIIILVLRPDV

**Figura 15.** Secuencia parcial de aminoácidos de la enzima ISA1 en las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2 predicha a partir del gen *Sugary 1*. Se indica con asterisco las diferencias de aminoácidos entre las dos líneas, en color gris se señala la región catalítica predicha.

Estos cambios de aminoácidos podrían afectar la actividad enzimática. Gonzales-Nuñez (2016) evaluó la actividad de estas enzimas en endospermo en desarrollo (30 DDP) de K0326Y-QPM y W64Ao2, encontrando una mayor actividad de GBSSI 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. SBEIIb forma ramificaciones con enlaces  $\alpha$ -(1-6) durante la biosíntesis de la amilopectina en el gránulo de almidón y su actividad fue mayor en W64Ao2, lo cual corresponde con el mayor contenido de amilopectina observado en esta línea. 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 LINEAS RECOMBINANTES PURAS DERIVADAS DE K0326Y-QPM Y W64Ao2

Para la evaluación en las líneas recombinantes puras se diseñaron oligos para utilizarlos como marcadores tipo SNAP en los genes de síntesis de almidón. En el Cuadro 6 se muestra la descripción de estos marcadores, donde se indica la secuencia de los oligos y las condiciones más críticas de la reacción de PCR.

**Cuadro 6.** Descripción de los marcadores SNP utilizados para el mapeo genético. La letra K indica que el marcador corresponde al parental K0326Y-QPM y W para el parental W64Ao2.

Genes	Nombre	Secuencia de los iniciadores (5´- 3´)	Ta (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)
<i>Ae1</i>	Ae1136-FA (K)	TCTCATGGATGTGGTTCATA	48	2.5
	Ae1136-FT (W)	TCTCATGGATGTGGTTCAAT		
	Ae1136-R	GGCGAGAATCCCACATCCAG		
<i>Ae1509</i>	Ae1509-FA (W)	GGAATGCCTACATTAACCAA	48	2.0
	Ae1509-FT (K)	GGAATGCCTACATTTGCCCT		
	Ae1509-R	TCTTGTCGCCGACTAATGCT		

<i>Du1</i>	SSIII1963-F (K)	AACTTGTCACAGAAACA	60	2.5
	SSIII1963-R	GTGGACATAGATGTCTCATC		
<i>Wx1</i>	Wx131-FA (W)	TCTCATGGATGTGGTTCATA	48	1.75
	Wx131-FT (K)	GAGAAGATCTACGGGCCTGT		
	Wx131-R	TACGAAGACTGCAACTCTTACC		
<i>Zpu1</i>	Zpu1115-FA (W)	AGCCAGGCAGTCTGCGTACGACA	60	1.5
	Zpu1115-FC (K)	AGCCAGGCAGTCTGCGTACGACC		
	Zpu1115-R	CTGGAAAATAGGGTGGTTCACC		

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

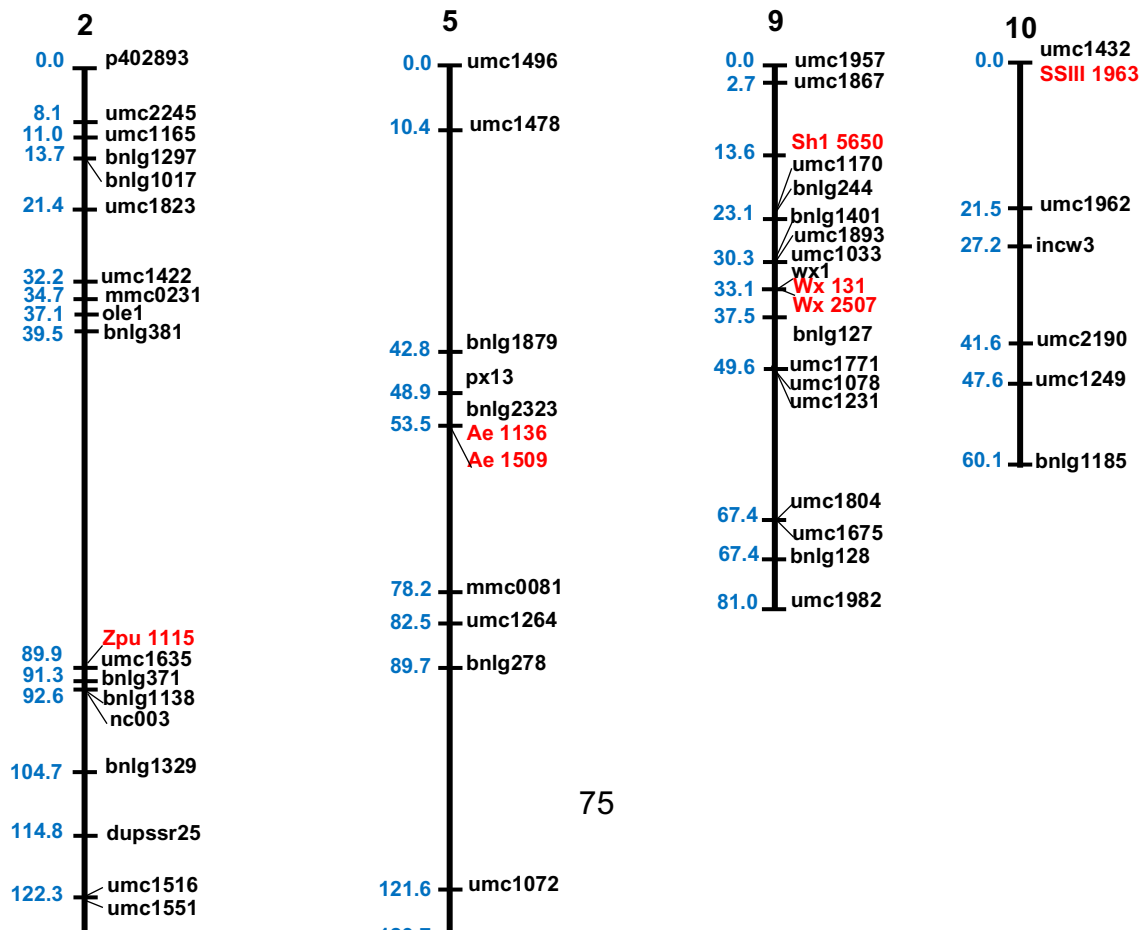
*Ae1*: amylose extender 1; *Du1*: Dull1; *Su1*: sugary 1 y *Wx1*: Waxy 1.

Se utilizaron un total de 9 SNP correspondientes a los genes *Ae1*, *Wx1*, *Bt2*, *Su1*, *Zpu1*, *Sh1* y *Du1*. En el caso de los marcadores Zpu 1115 y SSIII 1963 fueron diseñados a partir de las secuencias reportadas por Wu y col (2015) para los genes *Zpu1* y *Du1*, respectivamente. Los marcadores Wx 2507 y Sh1 5650 fueron sintetizados a partir de lo reportado por Shin y col (2006). En cuanto los marcadores Su1 1333 y Bt2 402 no fue posible determinar su variación alélica esto pudiera deberse a que las condiciones de PCR no permitieron su amplificación, el resto de los marcadores resultaron polimórficos para las 84 RIL, permitiendo determinar la variabilidad alélica de estos genes.

El genotipo de 55 SSR reportados por Holding y col (2011) en esta población de RIL fue utilizado para realizar un análisis de ligamiento entre estos marcadores y lo SNAP para los genes *Zpu1*, *Ae1*, *Sh1*, *Wx1* y *Du1*. El análisis

colocó al marcador Zpu 1115 a una distancia de 1.4 centimorgan (cM) de umc1635 (2.05) (Fig. 16), esto coincide con la localización reportada para este gen en el bin 2.05 del cromosoma 2 (<http://www.maizegdb.org>).

En lo que respecta a los marcadores Ae 1136 y Ae 1509, se localizaron a una distancia de 4.6 cM y 24 cM de los microsatélites px13 y mmc0081, respectivamente, los cuales se ubican cerca del bin 5.04 donde se encuentra el gen *Ae1*. En el cromosoma 9 se ubicaron SNAP para los genes *Sh1* (Sh1 5350) y *Wx1* (Wx 1131, Wx 2507). El mapeo del marcador Sh1 5350 lo ubicó en el brazo corto del cromosoma 9, cercano al marcador umc1867 (10.9 cM) presente en el bin 9.01 donde se ha reportado el gen *Sh1*. Los marcadores Wx 131 y Wx 2507 se encontraron fuertemente ligados al marcador bnlg127 (bin 9.03) con una distancia de 3.2 cM. Por último, el marcador SSIII 1963 se posicionó a 21.5 cM del marcador umc1962 coincidiendo en el locus para el gen *Du1* (9.03). El análisis de ligamiento confirmó la ubicación de los SNAP como marcadores específicos para cada uno de sus genes.



**Figura 16.** Mapeo de los marcadores Zpu-1115, Ae-1136, Ae1509, Sh-5650, Wx-131, Wx2507 y SSIII-1963. Los grupos de ligamiento de los microsatelites utilizados corresponden a los cromosomas 2, 5, 9 y 10. La distancia genética se indica en centimorgan (cM). En color rojo se indican los SNAP utilizados para cada gen.

### **C. ASOCIACIÓN ENTRE SNP DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN Y CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN EN LÍNEAS PURAS DERIVADAS DE LA CRUZA ENTRE K0326Y-QPM Y W64Ao2**

El análisis de asociación mediante marcadores SNAP se realizó a partir de la variabilidad alélica en cada uno de los genes de síntesis de almidón y los datos cuantitativos de propiedades fisicoquímicas del almidón (contenido y composición de almidón, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización) previamente evaluadas por Álvarez-Hernández (2014). En el Cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos de este análisis.

El contenido de almidón presentó una asociación significativa con el marcador Sh1 5650 (Cuadro 7), un polimorfismo de un solo nucleótido presente en el gen *Sh1* que codifica para la enzima sacarosa sintasa I (SuSy I), la cual cataliza la hidrólisis de sacarosa en UDP-glucosa y fructosa (Comparot Moss y



Denver, 2009; Jeon y col., 2010). Li y col 2013 evaluaron el contenido y composición de almidón en el endospermo de líneas de maíces transgénicos en las cuales se sobreexpresó el gen *StSUS4* que codifica para una isoforma de SuSy en papa, encontrando un mayor contenido de almidón y amilosa en las líneas transgénicas. Los autores sugirieron que la acción coordinada de SuSy I y ADP glucosa pirofosforilasa es clave en el inicio de la síntesis de almidón en el endospermo de maíz.

El marcador Zpu 1115 se encontró asociado con el contenido de almidón y amilosa, explicando el 13% y 10% de la variación, respectivamente. *Zpu1* codifica para la enzima desramificadora de almidón tipo pululanasa (PUL) que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina y pulunanos, proporcionando polímeros lineales de glucosa que pueden ser reutilizados para la producción de amilosa o amilopectina (Beatty y col., 1999).

**Cuadro 7.** Asociación de propiedades fisicoquímicas del almidón con SNP en 84 RIL derivadas de la cruce de K0326Y-QPM y W64Ao2.

<b>Cromosoma</b>	<b>SNP</b>	<b>LRS</b>	<b>LRS Límite (<math>\alpha=0.05</math>)</b>	<b>Varianza (%)</b>	<b>Efecto aditivo</b>
<b>Almidón</b>					
<b>9.01</b>	Sh1 5650	15.8	8.5	16	-
<b>2.05</b>	Zpu 1115	12.5	9.6	13	+
<b>Amilosa</b>					
<b>2.05</b>	Zpu 1115	10.3	8.4	10	-
<b>5.04</b>	Ae 1136	11.8	8.9	10	+
<b>9.03</b>	Wx 2507	17.5	8.3	16	-
<b>Grado de hinchamiento</b>					

<b>5.04</b>	Ae 1509	12.4	8.7	14	+
<b>9.03</b>	Wx 2507	15.8	8.1	15	+
<b>10.03</b>	SSIII 1963	12.0	7.6	13	+
<b>Entalpía de gelatinización</b>					
<b>5.04</b>	Ae 1509	11.9	9.0	12	+
<b>9.03</b>	Wx 2507	13.6	8.5	14	+

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

La actividad enzimática de PUL fue evaluada previamente en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2 por Wu y col (2015) en endospermos en desarrollo de 18 DPP y por González-Núñez (2016) en endospermos con 20 y 30 DPP, encontrando una mayor actividad de esta enzima en la línea vítrea K0326Y-QPM respecto a la línea opaca W64Ao2, lo que a su vez coincidió con un mayor contenido de amilosa en K0326Y-QPM.

El contenido de amilosa se encontró asociado con los marcadores Ae 1136 y Wx 2507 identificados para los genes *Ae1* y *Wx1*, respectivamente. El gen *Wx1* codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), responsable de la formación de amilosa, mientras que el gen *Ae1* codifica para la enzima ramificadora de almidón IIb (SBEIIb) que cataliza la formación del enlace glucosídico  $\alpha$ -1,6 durante la síntesis de amilopectina en la biosíntesis de almidón (Jeon y col 2010). El análisis de la actividad de GBSSI y SBE en las líneas

K0326Y-QPM y W64Ao2 a los 30 DPP correspondió con una mayor acumulación de la proteína GBSSI y un mayor contenido de amilosa en la línea K0326Y-QPM, mientras que la menor actividad de SBE en esta línea correspondió con una menor proporción de amilopectina (González-Núñez, 2016).

En relación al grado de hinchamiento y la entalpía de gelatinización se encontró una asociación significativa con los marcadores Ae 1509 y Wx 2507 que explican el 29 y 26% de la variación observada, respectivamente (Cuadro 7). Esta asociación pudiera deberse a que tanto la entalpía de gelatinización como el grado de hinchamiento se ven grandemente influenciadas por la cristalinidad que a su vez se relaciona con la proporción de amilopectina en el gránulo de almidón, encontrándose que contenidos altos de amilosa resultan en una disminución de estas características (Matveev y col., 2001; Tester y Karkalas, 2002). Diversos estudios han indicado que cambios en la composición del almidón se ven reflejados en alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas que contribuyen al fenotipo vítreo asociado con la modificación del endospermo en QPM (Jia y col., 2013; Salazar-Salas y col., 2014), lo que a su vez coincide con la correlación inversa observada entre estas características y amilosa en las RIL utilizadas como población de mapeo en el presente estudio (Álvarez-Hernández, 2014).

El efecto aditivo, es decir la contribución de cada alelo en los SNAP al valor del fenotipo se indica en el cuadro 7. El efecto de cada SNAP varió dependiendo de la característica, observándose que en amilosa el efecto aditivo presentó efectos negativos, lo que indica que los alelos heredados de K0326Y-QPM son los que están contribuyendo a la variación observada en amilosa, esto corresponde con el mayor contenido de amilosa observado en esta línea. En el caso de grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización se observaron valores positivos, siendo los alelos del parental W64Ao2 los responsables de la variación observada en estas características. Esto coincide con los mayores

valores de grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización observados en esta línea (Álvarez-Hernández 2014).

Para confirmar el ligamiento entre los marcadores SNAP asociados con las propiedades fisicoquímicas del almidón (almidón, amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización), se realizó una prueba ji-cuadrada utilizando 30 líneas con valores altos y 30 líneas con valores bajos. La hipótesis nula planteada fue que la proporción de alelos de K0326Y-QPM y W64Ao2 para cada marcador es 1:1, existiendo ligamiento significativo en los casos donde se rechazó la hipótesis planteada. Se observó cosegregación en los marcadores Zpu 1115 (almidón y amilosa), Wx 2507 y SSIII 1963 (grado de hinchamiento), en donde los alelos de alelos de W64Ao2 mayormente cosegregan y por ende contribuyen a niveles bajos, mientras que los alelos de K0326Y son los que cosegregan para los niveles altos de cada característica (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Segregación de marcadores SNAP asociados con valores extremos en el contenido de almidón, amilosa, grado de hinchamiento y entalpía de gelatinización.

Característica	Marcador	Cromo soma	RIL con alto nivel				RIL con bajo nivel			
			A	B	$\chi_i^2$	P	A	B	$\chi_i^2$	P
Almidón	Zpu 1115	2	23	7	8.40	**	27	3	16.5	***
	Sh 5650	9	21	8	5.60	**	17	12	0.80	NS
Amilosa	Zpu 1115	2	25	5	13.2	***	21	9	4.80	*
	Ae 1136	5	12	18	1.20	NS	17	13	0.40	NS
	Wx 2507	9	17	11	1.26	NS	10	20	3.20	NS
	Ae 1509	5	15	15	0	NS	22	8	6.40	**

Grado de hinchamiento	Wx 2507	9	5	24	12	***	22	7	7.40	**
	SSIII 1963	10	22	8	6.40	**	21	9	4.80	*
Entalpía de gelatinización	Ae 1509	5	17	13	0.40	NS	25	5	13.2	***
	Wx 2507	9	11	18	1.6	NS	14	15	0.06	NS

A, Número de líneas homocigóticas para el alelo K0326Y-QPM. B, Número de líneas homocigóticas para W64Ao2.  $\chi^2$ , prueba ji cuadrada, con niveles de significancia de 0.05\*, 0.01\*\*, 0.001\*\*\* y NS, no significativas.

## VII. CONCLUSIONES

- El análisis de secuencias de genes de síntesis de almidón reveló una diversidad de nucleótidos del 0.3% entre K0326Y-QPM y W64Ao2.
- Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) resultaron en cambios de aminoácidos en regiones catalíticas de las enzimas almidón sintasa unida al gránulo (GBSS1) y ramificadora (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 y W64Ao2.
- Se encontró asociación significativa entre el contenido y propiedades fisicoquímicas del almidón con SNP presentes en los genes de síntesis de almidón *Zpu1*, *Wx1*, *Ae1* y *Du1*, 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 que a su vez influyen sobre la modificación del endospermo en maíz QPM.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 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 Autónoma de Sinaloa. 103 p.
- Bao, J.D., Yao, J.Q., Zhu, J.Q., Hu, W.M., Cai, D.G., Li, Y., Shu, Q.Y. Fan, L.J. 2010. Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of waxy gene. *Mol Breeding* 30 (4): 1707-1714.
- Barichello, V., Yada, R. Y., Coffin, R. H., Stanley, D. W. 1990. Low-Temperature Sweetening in Susceptible and Resistant Potatoes - Starch Structure and Composition. *J Food Sci* 55(4): 1054-1059.
- Beatty, M.K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A.M., James, M.G. 1999. Purification and molecular genetics characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. *Plant Physiol* 119:255-266.

- Billaderis, C.G. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Can J Physiol Pharmacol*, 69(1), 60-78.
- Brown, S.M., Kresovich, S. 1996. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. En: Paterson A. (ed.), *Genomic mapping in plants*. Austin, TX: R.G. Landes. p 85-93.
- Buckler, E.S., Thornsberry, J.M. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 5:107-111.
- Chamary, J.V., Parmley, J.L., Hurst, L.D. 2006. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals, *Nat Rev Genet* 7: 98–108.
- Chandrashekar, A., Mazhar, H. 1999. The Biochemical Basis and Implications of Grain Strength in Sorghum and Maize. *J Cereal Sci* 30(3): 193-207.
- Churchill, G.A., Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Comparot-Moss M, Denver K. 2009. The evolution of the steel biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *J Exp Bot* 60: 2481-2492.
- Dannenhoffer, J. M., Bostwick, D. E., Or, E., Larkins, B. A. 1995. Opaque-15, a Maize Mutation with Properties of a Defective Opaque-2 Modifier. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(6): 1931-1935.
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A. M. 2001. The control of amylose synthesis. *J Plant Physiol* 158(4): 479-487.
- Dingest, J.R., Colleoni, C., Myers, A.M., James, M.G. 2001. Molecular structure of three mutations at the maize sugary1 locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol* 125: 1406-1418.
- Dobo, M., Ayres, N., Walker, G., Park, W. D. 2010. Polymorphism in the GBSS gene affects amylose content in US and European rice germplasm. *J Cereal Sci* 52(3): 450-456.
- Doebley, J. 1993. Genetics, development and plant evolution. *Curr Opin Gen Dev* 3:865-872.

- Dunwell, J.M. 2014. Transgenic cereals: current status and future prospects. *J Cereal Sci* 59:419-434.
- Eckhoff, S.R., Paulsen, M.R., Yang, S.C. 2003. Maize: Encyclopedia of Food Science and Nutrition. 2a ed. Vol 6. Oxford: Academic Press Elsevier Science. p 3647-3653.
- Fan, L., Bao, J., Wang, Y., Yao, J., Gui, Y., Hu, W., Zhu, J., Zeng, M., Li, Y. Xu, Y. 2009. Post-domestication selection in the maize starch pathway. *PLoS ONE*, 4(10), e7612.
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO. Alimentación y nutrición Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.html>. (Consultado en Octubre de 2015).
- FAO. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Dirección de producción y Protección Vegetal. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc>. Consultado en enero de 2017).
- FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization. Database FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org>. (Consultado en Julio 2017).
- Fisher, D.K., Gao, M., Kim, K.N., Boyer, C.D., Gultinan, M.J. 1996. Allelic analysis of the maize amylase-extenders locus suggests that independent genes encode starch-branching enzymes IIa and IIb. *Plant Physiol* 110: 611-619.
- Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y. 2006. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol* 140:1070-1084.
- Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J.H., Jane, J.L., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y. 2007. Characterization of SSIIIa deficient mutants of rice: the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol* 144:2009-2023.
- Galinat W. 1995. The origin of maize: grain of humanity. *Econ Bot* 49:3-12.



- Gibbon, B. C., Larkins, B. A. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends Genet* 21(4): 227-233.
- Gibbon, B. C., Wang, X., Larkins, B. A. 2003. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(26): 15329-15334.
- González-Nuñez DG. 2016. Analisis de la acumulación y actividad de enzimas de síntesis de almidon y su relacion con la modificación del endospermo en maíz QPM [Tesis de Maestria]. Culiacan, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 111 p.
- Guan, H. P., Preiss, J. 1993. Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* 102(4): 1269-1273.
- Gupta Hold, P., Lee, K.H. 2008. Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates. *Biotechnol Bioeng* 101967–974.
- Gustafson, J., Shin, J.-H., Kwon, S.-J., Lee, J. K., Min, H.-K., Kim, N.-S. 2006. Genetic diversity of maize kernel starch-synthesis genes with SNAPs. *Genome* 49(10): 1287-1296.
- Gutierrez-Rojas A, Bertrán J, Scott MP, Atta H, Menz M. 2010. Quantitative trait loci for endosperm modification and aminoacid contents in quality protein maize. *Crop Sci* 50: 870-879.
- Hamaker, B.R., Larkins, B.A. 2000. Maize Food and Feed: A Current Perspective and Consideration of Future Possibilities. En: Kachatourians A, McHughen R, Scora WK, Hui YH (eds.), *Transgenic Plants*. Marcel Dekker, Inc. NY, EUA. p 637-653.
- Hannah, L. C., James, M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Curr Opin Biotechnol* 19(2): 160-165.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P.L. 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic

- enzymes in high molecular weight complexes: A model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiol* 149:1541-1559.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Liu, F., Marsh, R.S., Kim, S., Gan, Q., Tetlow, I.J., Emes, M.J., James, M.G., Myers, A.M. 2008. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol* 146:1892-1908.
- Holding, D. R., Hunter, B. G., Chung, T., Gibbon, B. C., Ford, C. F., Bharti, A. K., Larkins, B. A. 2008. Genetic analysis of opaque2 modifier loci in quality protein maize. *Theor Appl Genet* 117(2): 157-170.
- Holding, D. R., Hunter, B. G., Klingler, J. P., Wu, S., Guo, X., Gibbon, B. C., Larkins, B. A. 2011. Characterization of opaque2 modifier QTLs and candidate genes in recombinant inbred lines derived from the K0326Y quality protein maize inbred. *Theor Appl Genet* 122(4): 783-794.
- Huang, D. P., Rooney, L. W. 2001. Starches for snack foods. *Snack Foods Processing* 115-130.
- James, M. G., Denyer, K., Myers, A. M. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6(3): 215-222.
- James, M.G., Robertson, D.S., Myers, A.M. 1995. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernel. *Plant Cell* 7:417-429.
- Jane, J. L., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., Robyt, J. F. 1994. Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron-Microscopy. *Starch-Starke* 46(4): 121-129.
- Jeon, J. S., Ryoo, N., Hahn, T. R., Walia, H., Nakamura, Y. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem* 48(6): 383-392.
- Jia, M., Wu, H., Clay, K.L., Jung, R., Larkins, B.A., Gibbon, B.C. 2013. Identification and characterization of lysine rich proteins and starch biosynthesis genes in the opaque2 mutant by transcriptional and proteomic analysis. *BMC Plant Biol* 13: 60-74.

- Jiang, L., Yu, X., Qi, X., Yu, Q., Deng, S., Bai, B., Li, N., Zhang, A., Zhu Ch, Liu, B., Pang, J. 2013. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. *Transg Res* 22:1133-1142.
- Kato, T.A., Mapes, C., Mera, L.M., Serratos, J.A., Bye, R.A. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 p.
- Kim, K.N., Fisher, D.K., Gao, M., Guiltinan, M.J. 1998. Molecular cloning and characterization of the amylase-extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize. *Plant Mol Biol* 38:945-956.
- Larkin, P. D., Park, W. D. 2003. Association of waxy gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed* 12(4): 335-339.
- Larkins, B. A., Dannenhoffer, J. M., Bostwick, D. E., Or E, M., G. A., Lopes, M. A. 1996. In BA Larkins, ET Mertz (ed). *Quality Protein Maize: 1964-1994*. 133-148.
- Leading, C. R., Larkins, B. A. 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Plant Cell* 1: 1011-1023.
- Leiva J, Dante R, Holding D. 2002. RNA extraction from maize endosperm using SDS- TRIZOL protocol. Disponible en: [www.ag.arizona.edu/research/larkinslab/ protocols.htm](http://www.ag.arizona.edu/research/larkinslab/protocols.htm) (Consultado en Marzo 2016).
- Lafiandra, D., Riccardi, G., Shewry, P.R. 2014. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. *J Cereal Sci* 59:312-326.
- Li, J., Baroja-Fernandez, E., Abdeltif Bahaji, Muñoz, F.J., Ovecka, M., Montero, M., Sesma, Ma. T., Alonso-Casajús, Sánchez-Lopez, A., Hidalgo, H., Pozueta-Romero, J. 2013. Enhancing Sucrose Synthase Activity Results in Increased

- Levels of Starch and ADP-Glucose in Maize (*Zea mays* L.) Seed Endosperm. *Plant Cell Physiol* 54(2): 282-294.
- Liao Yu, P., Kelvin, H.L. 2010. From SNPs functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochem Eng J* 49: 149-158.
- Lopes, M. A., Larkins, B. A. 1991. Gamma-zein content is related to endosperm modification in Quality Protein Maize. *Crop Sci.* 31: 1655-1662.
- Lopes, M. A., Takasaki, K., Bostwick, D. E., Helentjaris, T., Larkins, B. A. 1995. Identification of two opaque2 modifier loci in QPM. *Mol Gen Genet* 247: 603-613.
- Mangelsdorf, P.C., Reeves, R.G. 1959. The origin of corn. III. Modern races, the product of teosinte introgression. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 18:389-411.
- Manly, K. F., Cudmore, R. H., Jr., Meer, J. M. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome*, 12(12): 930-932.
- Matveev, Y. I., Van Soest, J. J. G., Nieman, C., Wasserman, L. A., Protserov, V. A., Ezernitskaja, M., & Yuryev, V. P. 2001. The relationship between thermodynamic and structural properties of low and high amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers* 44(2): 151-160.
- McKevith B. 2004. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* 29:111-142.
- Mechin, V., Thévenot, C., Le Guilloux, M., Prioul, J.L., Damerval, C. 2007. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate orthophosphate dikinase. *Plant Physiol* 143:1203–1219.
- Mertz, E. T., Bates, L. S., Nelson, O. E. 1964. Mutant gene that changes the protein composition and increases the lysine content of maize endosperm. *Science* 145(3629): 279-280.
- Nagai, Y.S., Sakulsingharoj, C., Edwards, G.E., Satoh, H., Greene, T.W., Blakeslee, B., Okita, T.W. 2009. Control of starch synthesis in cereals: Metabolite analysis of transgenic rice expressing an up-regulated cytoplasmic

- ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds. *Plant Cell Physiol* 50:635-643.
- Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Weiss, K.M., Clark, A.G., Hutchinson, R.G., Stengard J., Salomaa, V., Vartiainen, E., Boerwinkle, E., Sing, C.F. 1998. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet* 19: 233–240.
- Owusu, A.K. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *Afr J Biotechnol* 7(4):331-341.
- Paredes-López O, Serna-Saldívar SO, Guzmán-Maldonado SH. 2000. *Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas de México – El Caso de la Tortilla*. Culiacán: El Colegio de Sinaloa. 82 p.
- Paredes López O, Guevara Lara F, Bello Pérez LA. 2006. *Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas*. Fondo de Cultura Económica, México. 205 p.
- Park, Y.J., Nemoto, K., Nishikawa, T., Matsushima, K., Minami, M., & Kawase, M. 2011. Genetic diversity and expression analysis of granule bound starch synthase I gene in the new world grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *J Cereal Sci* 53(3): 298-305.
- Parker, R., Ring, S. G. 2001. Aspects of the physical chemistry of starch. *J Cereal Sci* 34(1): 1-17.
- Pineda-Hidalgo K.V., Lavin-Arámburo M., Salazar-Salas N.Y., Chávez-Ontiveros J., Reyes-Moreno C., Muy-Rangel M.D., Larkins B.A., López-Valenzuela J.A. 2011. Characterization of free aminoacid QTLs in maize opaque2 recombinant inbred lines. *J Cereal Sci* 53: 250-258.
- Reyes CP. 1990. *El maíz y su cultivo*. México, D.F: AGT-EDITOR S.A. 22 p.
- SAGARPA. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario de la Producción Agrícola. México, D.F. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (Consultado en Octubre 2015).

- Salazar-Salas, N.Y., Pineda-Hidalgo K.V., Chavez-Ontiveros J., Gutierrez-Dorado R., Reyes-Moreno C., Bello-Pérez L.A., Larkins B.A., Lopez-Valenzuela J.A. 2014. Biochemical characterization of QTLs associated with endosperm modification in quality protein maize. *J Cereal Sci* 60: 255-263.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467.
- Sano, Y., Katsumata, M., & Amano, E. 1985. Correlations between the amounts of amylose and Wx protein in rice endosperm. *Sabrao Journal* 17: 121-127.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., y Minx, P. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115.
- Shannon, J. C., Pien, F. M., Cao, H., Liu, K. C. 1998. Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplasmidial synthesized ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperms. *Plant Physiol* 117: 1235-1252.
- Shin, J. H., Kwon, S. J., Lee, J. K., Min, H. K., & Kim, N. S. 2006. Genetic diversity of maize kernel starch-synthesis genes with SNAPs. *Genome* 49(10): 1287-1296.
- Shotwell, M.A., Larkins, B.A. 1988. The Biochemistry and Molecular Biology of Seed Storage Proteins. En BJ Mifflin (ed.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 15 Academic Press, NY, EUA. p 297-345.
- Smith, A., Beckles, D., Rees, T. 2001. A Cytosolic ADP/Glucose Pyrophosphorylase is a feature of Gramineous endosperms, but not of other starch/storing organs. *Plant Physiol* 125:818-827.
- Soto-López OA. 2012. Mapeo de loci genéticos asociados con la composición de zeínas y almidón en el endospermo de maíz de calidad proteínica [Tesis de licenciatura] Culiacán, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 93 p.
- Sun, Y., Carneiro, N., Clore, A. M., Moro, G. L., Habben, J. E., Larkins, B. A. 1997. Characterization of maize elongation factor 1A and its relationship to protein quality in the endosperm. *Plant Physiol* 115(3): 1101-1107.

- Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol* 1:3-8.
- Tester, R. F., Debon, S. J. 2000. Annealing of starch—a review. *Int J Biol Macromol* 27(1): 1-12.
- Tester, R.F., Karkalas, J. 2002. Starch: Biopolymers. Polysaccharides. En: Steinbüchel A, Vandamme EJ, de Beats S, Steinbüchel A editores. II Polysaccharides from Eukaryote. Vol. 6. Wiley-VCH: Weinheim. p 328-438.
- Tetlow, I. J., Morell, M. K., Emes, M. J. 2004a. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55(406): 2131-2145.
- Tetlow, I.J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C.G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M.K., Emes, M.J. 2004b. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein–protein interactions. *Plant Cell* 16:694-708.
- Tsai, C.Y. 1974. The function of waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem Genet* 11:83-96.
- Uarrota, V. G., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Maraschin, M. 2011. Histochemical analysis and protein content of maize landraces (*Zea mays* L.). *J Agron* 10(3): 92-98.
- Wallace, J. C., Lopes, M. A., Paiva, E., Larkins, B. A. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of  $\gamma$ -zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiol* 92(1): 191-196.
- Wang, K., Henry, R. J., Gilbert, R. G. 2014. Causal Relations Among Starch Biosynthesis, Structure, and Properties. *Springer Science Reviews* 2(1-2): 15-33.
- Wang, Y., White, P., Pollak, L., Jane, J. 1993. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. *Cereal Chem* 70: 171-171.

- Watson, S.A. 1987. Structure and composition. En: Watson SA, Ramstad PE, (eds.), Corn: chemistry and technology. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. p 53-82.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants principles, methods and applications. Broken Sound Parkway NW: Taylor & Francis Group. p 301-303.
- Wilson, L. M., Whitt, S. R., Ibáñez, A. M., Rocheford, T. R., Goodman, M. M., Buckler, E. S. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *Plant Cell* 16(10): 2719-2733.
- Wu, H., Clay, K., Thompson, S. S., Hennen-Bierwagen, T. A., Andrews, B. J., Zechmann, B., Gibbon, B. C. 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, D. R., Messing, J. 2010. Gamma-zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(29): 12810-12815.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13(1): 134.
- Yuan, L., Dou, Y., Kianian, S.F., Zhang, C., Holding, D.R. 2014. Deletion mutagenesis identifies a haploinsufficient role for  $\gamma$ -Zein in opaque2 endosperm modification. *Plant Physiol* 164:119-130.
- Yun, S. H., Matheson, N. K. 1993. Structure of the amylopectins of waxy, normal, amylose-extender, and wx:ae genotypes and of the phytoglycogen of maize. *Carbohydrate Research* 243: 307-321.
- Zarkadas, C.G., Hamilton, R. I., Yu, Z. R., Choi, V. K., Khanizadeh, S., Rose, N. G., Pattison, P. L. 2000. Assessment of the protein quality of 15 new northern adapted cultivars of quality protein maize using amino acid analysis. *J Agric Food Chem* 48(11): 5351-5361.



Zeeman, S.C., Kossmann, J., Smith, A. M. 2010. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61: 209-234.

Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Sirghie-Colleoni, M., James, M.G., Myers, A.M. 2004. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol Biol* 54:865-879.

## ABREVIATURAS

%bs	Porcentaje en base seca
°C	Grados Celsius
$\Delta$ HG	Entalpía de gelatinización
$\mu$ g	Microgramo(s)
$\mu$ L	Microlitro(s)
$\mu$ m	Micrometro(s)
A	Adenina
<i>Ae1</i>	Mutacion amylose extender 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP-glucosa	Adenosin difosfato-glucosa
<i>Ae</i>	Amilose extender
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
SNAP	Polimorfismo de un solo nucleótido amplificado
SNP	Polimorfismo en un solo nucleótido
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

*Zpu1*

Mutación pululanasa 1