



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

**Análisis de expresión génica y actividad de  
enzimas de síntesis de almidón y su asociación  
con la modificación del endospermo en maíz de  
calidad proteínica**

**TESIS**

Que presenta

**MC David Guillermo González Núñez**

Como requisito para obtener el grado de

**Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Directores

**Dr. José Ángel López Valenzuela**

**Dra. Nancy Yareli Salazar Salas**

Culiacán, Sinaloa, México, Febrero de 2025



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



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

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, gracias por la vida y la salud.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado a través del Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Ángel López Valenzuela y la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas, por su dirección en este proyecto.

A la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo, gracias por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de este trabajo, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo a pesar de la pandemia cuando nadie se atrevía a salir jajajaja. En verdad ¡Muchas Gracias!

Al Dr. Jorge Sánchez López y la Facultad de Agronomía de la UAS por las facilidades otorgadas para el cultivo de los maíces utilizados en el presente estudio.

Gracias al Dr. Samuel López Moreno por permitirme usar su laboratorio para este proyecto y a Mary Criss por apoyarme en los análisis en medio de la pandemia.

A la Dra. María Elena Báez y personal de la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms” por el apoyo para los análisis de expresión génica.

A la Dra. Edith Agama Acevedo y el Dr. Arturo Bello Pérez del CEPROBI-IPN por apoyarme en los análisis del almidón.

Y en especial gracias a mis padres **Braulio y Luz**, a mi abuela **Antonia** y a mis hermanos **Rafael y Esthela** por el apoyo otorgado en todo momento. ¡Muchas Gracias!

"El alma que pecare, esa morirá: el hijo no llevará por el pecado del padre, ni el padre llevará por el pecado del hijo: la justicia del justo será sobre él, y la impiedad el impío será sobre él" Ezequiel 18:20

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A GENERALIDADES DEL MAÍZ	8
1 Importancia económica y social	8
2 Estructura y composición química del grano de maíz	11
B ALMIDÓN	15
1 Estructura del almidón	16
2 Propiedades fisicoquímicas del almidón	18
3 Biosíntesis del almidón	21
a ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	23
b Almidón sintasas	24
1) Síntesis de amilosa	24
2) Síntesis de amilopectina	25
c Enzimas ramificadoras de almidón (SBE)	25
d Enzimas desramificadoras de almidón (DBE)	26

4 Interacciones entre las enzimas de biosíntesis de almidón	27
5 Proteínas asociadas al gránulo de almidón	28
6 Genes relacionados en la biosíntesis de almidón	29
C EXPRESIÓN DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS CODIFICADAS EN CEREALES	32
1 Estudios de expresión de genes involucrados en la síntesis de almidón	32
2 Estudios de actividad de enzimas de síntesis de almidón en cereales	35
3 Evaluación de actividad de enzimas de síntesis de almidón empleando sistemas heterólogos	38
a Sistema heterólogo	38
b Antecedentes sobre el uso de sistemas heterólogos	39
D MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA	41
1 Importancia del Maíz de Calidad Proteínica	42
2 Mecanismos propuestos para la modificación del endospermo en maíz QPM	46
a Mecanismo relacionado al incremento de $\gamma$ -zeínas	46
b Relación entre la estructura del gránulo de almidón y la modificación del endospermo en QPM	50
c Mecanismo asociado con la modulación de la composición de carotenoides en la envoltura del amiloplasto y la respuesta al estrés mediante el aumento de la disponibilidad energética.	51

3 Análisis genéticos, bioquímicos y moleculares relacionados con la modificación del endospermo en maíz QPM	52
IV JUSTIFICACIÓN	58
V HIPÓTESIS	59
VI OBJETIVOS	60
A OBJETIVO GENERAL	60
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
VII MATERIALES Y MÉTODOS	61
A MATERIALES	61
B MÉTODOS	61
1 Determinación de almidón total	61
2 Aislamiento de gránulos de almidón	62
3 Determinación de amilosa	63
4 Propiedades térmicas del almidón	63
5 Grado de hinchamiento	64
6 Distribución de la longitud de cadenas ramificadas de amilopectina	64
7 Acumulación de proteínas asociadas al gránulo de almidón	65
a Extracción de proteínas asociadas al gránulo	65
b Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	66
8 Expresión de genes de síntesis de almidón	67
a Extracción de ARN	67



b RT-qPCR	68
9 Actividad de enzimas de biosíntesis de almidón	68
a ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	68
b Almidón Sintasa Unida al Gránulo (GBSS)	70
c Enzima ramificadora de almidón (SBE)	72
d Enzima pululanasa (PUL)	73
10 Secuenciación y obtención de variantes alélicas del gen <i>Ae1</i>	74
a Síntesis de cDNA	74
b Diseño de oligos iniciadores y amplificación de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	74
c Secuenciación del gen <i>Ae1</i>	77
11 Expresión de las variantes alélicas del gen <i>Ae1</i> en sistema heterólogo y evaluación de la actividad de las enzimas SBEIIb recombinantes	78
a Transformación de <i>E. coli</i> BL21	78
b Análisis de transformantes	79
c Expresión, purificación y actividad de la proteína recombinante	80
12 Análisis estadístico	81
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
A COMPOSICIÓN, PROPIEDADES TÉRMICAS Y DISTRIBUCIÓN DE CADENAS DE AMILOPECTINA DEL ALMIDÓN EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD	82
1 Contenido y composición del almidón	82

2 Propiedades térmicas del almidón	84
3 Distribución de la longitud de ramificaciones de amilopectina	87
B ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE ALMIDÓN (PAG) EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD	89
C EXPRESION DE GENES DE SINTESIS DE ALMIDÓN EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD	92
1 <i>Bt2</i>	92
2 <i>Wx1</i>	94
3 <i>Ae1</i>	96
4 <i>Zpu1</i>	98
D ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS DE ALMIDÓN EN EL ENDOSPERMO DE LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD	98
1 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	100
2 Almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS)	100
3 Enzima ramificadora de almidón (SBE)	103
4 Enzima pululanasa (PUL)	105
E VARIANTES ALELICAS DEL GEN <i>Ae1</i> Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN SISTEMA HETEROLOGO	106
1 Alineamiento de las secuencias de alelos del gen <i>Ae1</i>	106
2 Modelado tridimensional de SBEIIb	111
3 Actividad de las enzimas recombinantes de SBEIIb	113

F CONSIDERACIONES FINALES	116
IX CONCLUSIONES	118
X BIBLIOGRAFÍA	120
ABREVIATURAS	139

,

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Principales estructuras del grano de maíz.	12
2	Estructura química de amilosa y amilopectina.	17
3	Estructura del gránulo de almidón.	19
4	Biosíntesis de almidón en el endospermo de cereales.	22
5	Formación del endospermo vítreo en el maíz de calidad de proteínica.	49
6	Microscopía electrónica de barrido en gránulos de almidón aislados de endospermos maduros de muestras contrastantes en vitrosidad.	55
7	Análisis electroforético de proteínas asociadas al gránulo de almidón en endospermo en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	90
8	Expresión relativa del gen <i>Bt2</i> en endospermo en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	93
9	Expresión relativa del gen <i>Wx1</i> (GBSSI) en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	95
10	Expresión relativa del gen <i>Ae1</i> (SBEIIb) en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	97
11	Expresión relativa del gen <i>Zpu1</i> (Pululanasa) en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	99
12	Actividad de la enzima AGPasa en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	101

13	Actividad de la enzima GBSS en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	102
14	Actividad de la enzima SBE en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	104
15	Actividad de la enzima pululanasa en endospermos en desarrollo (28 DPP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	107
16	Alineamiento múltiple de las secuencias completas de nucleótidos de la región codificante de <i>Ae1</i> en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2.	108
17	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la enzima ramificadora de almidón (SBEIIb) de K0326Y-QPM y W64Ao2 traducidas a partir de las secuencias de nucleótidos del gen <i>Ae1</i> .	110
18	Modelos tridimensionales de SBEIIb de K0326Y-QPM y W64Ao2.	112
19	Expresión de la proteína recombinante SBEIIb de K0326Y-QPM y W64Ao2.	114

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Principales países productores de maíz en 2022.	9
2	Principales estados productores de maíz en México en 2022.	10
3	Composición química del grano de maíz (% en base seca).	14
4	Principales genes de biosíntesis de almidón en el endospermo de maíz y su localización en el mapa genético.	30
5	Requerimientos mínimos necesarios diarios de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano en personas de distintas edades.	43
6	Contenido de aminoácidos lisina y triptófano en el endospermo de maíz común y QPM.	47
7	Oligonucleótidos iniciadores empleados para RT-qPCR.	69
8	Oligonucleótidos iniciadores usados para secuenciar el gen <i>Ae1</i> .	76
9	Contenido y composición de almidón de endospermo en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	83
10	Propiedades térmicas del almidón de endospermo en desarrollo de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad	85
11	Distribución de la longitud de ramificaciones de la amilopectina de almidones de endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.	88
12	Actividad específica de la enzima recombinante SBEIIb de <i>Ae1</i> -K0326Y-QPM y <i>Ae1</i> -W64Ao2.	115

## I RESUMEN

El maíz de calidad proteínica (QPM) resulta de la conversión del endospermo blando de la mutante *opaco2* (*o2*) en vítreo. Estudios previos con líneas recombinante puras (RIL) derivadas de la cruce entre K0326Y-QPM y W64Ao2 sugieren que esta modificación del endospermo en QPM está asociada con la expresión y actividad de enzimas de síntesis almidón durante el desarrollo del grano. El objetivo del presente estudio fue analizar cambios en la expresión y actividad de enzimas de síntesis de almidón relacionados con la modificación del endospermo en QPM. Se utilizaron las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2, así como una selección de RIL derivadas de su cruce y contrastantes en vitrosidad. Se obtuvieron endospermos en desarrollo a los 28 días después de la polinización (DDP), de los cuales una parte se liofilizó para obtener harina y medir el contenido de almidón total. Del endospermo en desarrollo se aisló el almidón y se determinó su composición, propiedades térmicas, grado de hinchamiento y patrón de ramificación de la amilopectina; también se analizaron las proteínas involucradas en su biosíntesis. Se extrajo RNA para el análisis de expresión de cuatro genes involucrados en la síntesis de almidón: *Brittle2* (*Bt2*), *Waxy1* (*Wx1*), *Amylose extender1* (*Ae1*) y *Pullulanase* (*Zpu1*). También se prepararon extractos proteicos para medir la actividad de enzimas codificadas por estos genes: ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), enzima ramificadora (SBE) y desramificadora (PUL). Se determinaron las secuencias nucleotídicas de las variantes alélicas de K0326Y-QPM y W64Ao2 del gen *Ae1* que codifica para SBE y se expresaron en *Escherichia coli* para determinar si las enzimas codificadas difieren en actividad. El análisis de la composición química del almidón reveló que el contenido de amilosa fue mayor en las líneas vítreas con respecto a las

opacas, mientras que en el caso del contenido de almidón y amilopectina se observó lo opuesto. El almidón de las líneas vítreas presentó menor grado de hinchamiento (GH), menor entalpía de gelatinización ( $\Delta H_g$ ) y mayor porcentaje de retrogradación (%R), lo cual correspondió con el mayor contenido de amilosa en estas líneas. La expresión del gen *Wx1*, la acumulación y la actividad de GBSSI fueron superiores en las líneas vítreas respecto a las opacas, lo cual correspondió con el contenido de amilosa, mientras que la expresión de *Ae1* y actividad de SBE fue mayor en líneas opacas respecto a las vítreas y correspondió con el contenido de amilopectina. Las secuencias de las SBE codificadas por las variantes del gen *Ae1* en K0326Y-QPM y W64Ao2 variaron en cinco aminoácidos, de los cuales algunos parecen afectar el sitio catalítico de la enzima, lo cual podría ser responsable de la menor actividad de SBE y contenido de amilopectina observados en las líneas vítreas. Sin embargo, las SBE recombinantes producidas en *E. coli* mostraron una actividad similar. Los resultados sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios en la expresión y actividad de las enzimas de biosíntesis del almidón que afectan la composición del almidón durante el desarrollo del endospermo, así como sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. La mayor actividad de GBSSI y la menor actividad de SBE producen gránulos de almidón con mayores proporciones de amilosa y regiones amorfas, favoreciendo una mayor compactación entre estas estructuras, contribuyendo al fenotipo vítreo en QPM.



## ABSTRACT

Quality protein maize (QPM) results from the conversion of the soft endosperm of the *opaque2* (*o2*) mutant into a vitreous phenotype. Previous studies with recombinant inbred lines (RIL) derived from the cross between K0326Y-QPM and W64Ao2 suggest that endosperm modification in QPM is associated with the expression and activity of starch biosynthetic enzymes during kernel development. The aim of the present study was to analyze changes in the expression and activity of starch biosynthetic enzymes related to endosperm modification in QPM. The lines K0326Y-QPM and W64Ao2 were used, as well as a selection of RIL derived from their cross and contrasting in vitreousness. Developing endosperms were obtained 28 days after pollination (DAP) and part of them were freeze-dried to measure total starch content. Starch was isolated from developing endosperms to measure their composition, thermal properties, swelling power and amylopectin branching pattern, as well as to analyze proteins involved in its biosynthesis. RNA was extracted to analyze the expression of four genes involved in starch biosynthesis: *Brittle2* (*Bt2*), *Waxy1* (*Wx1*), *Amylose extender1* (*Ae1*) y *Pullulanase* (*Zpu1*). Protein extracts were also prepared to measure the activity of enzymes encoded by these genes: ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), granule-bound starch synthase (GBSSI), branching enzyme (SBE) and debranching enzyme (PUL). The nucleotide sequences of the allelic variants of the *Ae1* gene from K0326Y-QPM and W64Ao2 were determined and expressed in *Escherichia coli* to determine if the SBE encoded by these genes differ in activity. Analysis of the chemical composition of starch showed a higher amylose content in the vitreous lines with respect to the opaques, while the opposite was observed for starch and amylopectin

content. Starch from the vitreous lines showed lower swelling power (SP), lower enthalpy of gelatinization ( $\Delta H_g$ ) and higher percentage of retrogradation (%R), which corresponded with the higher amylose content in these lines. The expression of the *Wx1* gene, the accumulation and GBSSI activity were higher in the vitreous lines compared to the opaques, which corresponded with the amylose content, whereas the expression of *Ae1* and the activity of SBE were higher in the opaque than the vitreous lines, which corresponded with the amylopectin content. The sequences of the SBE enzymes encoded by the *Ae1* variants from K0326Y-QPM and W64A $\alpha$ 2 differed in five amino acids, some of which appear to affect the catalytic site of the enzyme, which may be responsible for the lower activity and amylopectin content observed in the vitreous lines. However, the recombinant SBE enzymes produced in *E. coli* showed similar activity. The results suggest that endosperm modification in QPM is associated with changes in the expression and activity of starch biosynthetic enzymes, which affect starch composition during endosperm development, as well as its physicochemical and structural properties. The higher activity of GBSSI and the lower activity of SBE produce starch granules with larger proportions of amylose and amorphous regions, favoring a greater compaction between these structures, contributing to the vitreous phenotype in QPM.

## II INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) ocupa el primer lugar de producción entre los cereales y representa la base de la alimentación en países en desarrollo como México. Sin embargo, al igual que otros cereales las proteínas del maíz son deficientes en aminoácidos esenciales, principalmente lisina y triptófano (Yau y col 1999). Es por esta razón que surge la necesidad de obtener un cereal con buena calidad proteínica. En este sentido, Mertz y col (1964) reportaron que la mutación *opaque-2* (*o2*) duplica el contenido de lisina en el endospermo de maíz y mejora la calidad proteínica del grano; sin embargo, presenta un endospermo blando que trae consigo consecuencias como un pobre desempeño agronómico y problemas poscosecha. Para solucionar dichos inconvenientes, fitomejoradores del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) desarrollaron mutantes *o2* con un endospermo duro (vítreo) conocidos como maíz de calidad proteínica (QPM), los cuales fueron obtenidos mediante retrocruzas tradicionales (Maqbool y col 2021) y mantienen la calidad nutricional de la mutante *o2*. Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos involucrados en la conversión del fenotipo blando de *o2* en vítreo en QPM. Dentro de los factores involucrados en esta modificación se incluyen la alteración de la estructura y composición del almidón (Gibbon y col 2003; Salazar-Salas y col 2014), el aumento en la acumulación de pequeños cuerpos proteínicos enriquecidos en  $\gamma$ -zeína de 27 kDa y recientemente la pérdida de la envoltura de los amiloplastos debido a una reducción de los carotenoides no polares (Wu y col 2010; Wang y col 2020).

El almidón es el principal componente del maíz y por ende el que tiene mayor influencia sobre las propiedades del grano. Está formado por dos polímeros de

glucosa, amilosa y amilopectina, que se acumulan en forma de gránulos durante el desarrollo del endospermo. La biosíntesis de almidón involucra principalmente la actividad de cuatro grupos de enzimas: las ADP-glucosa pirofosforilasas (AGPasa) formadas por una subunidad grande codificada por el gen *Shrunken2* (*Sh2*) y una subunidad pequeña codificada por el gen *Brittle2* (*Bt2*); las almidón sintetasas que comprenden la unida al gránulo de almidón (GBSS) codificada por el gen *Waxy1* (*Wx1*), responsable de la síntesis de amilosa, y las solubles (SSI, II, III y IV) que son responsables de la síntesis de amilopectina; enzimas ramificadoras de almidón (SBE) destacando la codificada por el gen *Amilose extender1* (*Ae1*) y enzimas desramificadoras de almidón (DBE y PUL), codificadas por los genes *Sugary1* (*Su1*) y Pullulanase (*Zpu1*) (Hannah y James 2008).

El análisis genético en una población de líneas recombinantes puras (RIL) derivada de la cruce entre K0326Y QPM (endospermo vítreo) y W64Ao2 (endospermo blando) identificó tres *loci* genéticos asociados con vitrosidad, una característica relacionada con la dureza del grano, en los cromosomas 1, 7 y 9 (Holding y col 2011); el *locus* en el cromosoma 7 correspondió a  $\gamma$ -zeína de 27 kDa y el del 9 se encontró muy cerca de genes de síntesis de almidón. Salazar-Salas y col (2014) evaluaron el efecto de estos *loci* genéticos sobre algunas propiedades fisicoquímicas del almidón y la acumulación de proteínas de almacenamiento y relacionadas con la síntesis de almidón en el endospermo maduro. Sus resultados sugieren que las modificaciones en la estructura e interacción de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón contribuyen de manera importante en la modificación del endospermo en QPM. Estudios de expresión génica (Vega-Alvarez y col 2022) y actividad enzimática (González-Núñez

2016) en endospermo en desarrollo de las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2 sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios significativos en los niveles de transcritos de genes de síntesis de almidón y en la actividad de las enzimas codificadas por dichos genes durante el desarrollo del grano, lo cual repercute en las propiedades fisicoquímicas y estructurales del almidón. Sin embargo, es necesario ampliar los análisis de expresión y actividad usando líneas derivadas de la cruce entre K0326Y-QPM y W64Ao2 para demostrar dicha asociación, además de determinar las secuencias de las variantes alélicas de genes síntesis de almidón en las líneas parentales K0326Y-QPM y W64Ao2 y expresarlos en un sistema heterólogo para evaluar la actividad de las enzimas correspondientes, lo cual permitirá determinar si las diferencias de actividad se deben a diferencias estructurales de las enzimas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión y actividad de enzimas de biosíntesis de almidón y su asociación con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica.

### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A GENERALIDADES DEL MAÍZ

##### 1 Importancia económica y social

Dentro de los cereales el maíz destaca en importancia económica a nivel mundial, ocupando el primer lugar de producción con aproximadamente 1,210 millones de toneladas en el año 2022, seguido del arroz y el trigo con una producción de 787 y 770 millones de toneladas para ese mismo año, respectivamente (FAOSTAT 2024). En el Cuadro 1 se muestran los principales países productores de maíz, destacando Estados Unidos de América que ocupa el primer lugar de producción al aportar el 31.7% del total mundial, mientras que México ocupa el séptimo lugar con una producción de 27.5 millones de toneladas (FAOSTAT 2024). En cuanto a la producción de maíz en México, Sinaloa es el principal estado productor con el 22% de la producción nacional, seguido de Jalisco y Estado de México, con 14.5 y 8%, respectivamente (Cuadro 2). Sinaloa es altamente productivo por la calidad de sus tierras, la tecnificación y uso de híbridos con un alto desempeño agronómico, logrando así obtener rendimientos altos que se pueden comparar incluso con los de los principales países productores de maíz (SIAP 2024)

El maíz es de gran importancia social en países como el nuestro donde representa la base de la alimentación, pudiendo aportar hasta un 70% de las calorías y un 60% de las proteínas en la dieta. En México, el consumo *per cápita* de maíz es de 120.39 kg/año (FAOSTAT 2024), lo cual se debe a su uso en la mayoría de los platillos de consumo habitual por la población.

**Cuadro 1.** Principales países productores de maíz en 2022.

<b>País</b>	<b>Producción (Ton)</b>
Estados Unidos	370,960,390
China	259,071,000
Brasil	97,721,860
Argentina	49,475,895
Ucrania	28,720,000
India	27,952,000
México	27,762,481
Otros	273,083,041
<b>Total</b>	<b>1,210,235,135</b>

FAOSTAT (2024)

**Cuadro 2.** Principales estados productores de maíz en México en 2022.

<b>Estado</b>	<b>Producción (ton)</b>
Sinaloa	6,167,095.85
Jalisco	4,024,863.86
Edo. México	2,219,616.11
Michoacán	1,911,238.75
Guanajuato	1,642,835.37
Guerrero	1,357,556.76
Chiapas	1,296,939.60
Otros	9,142,334.7
<b>Total</b>	<b>27,762,481.00</b>

SIAP (2024)

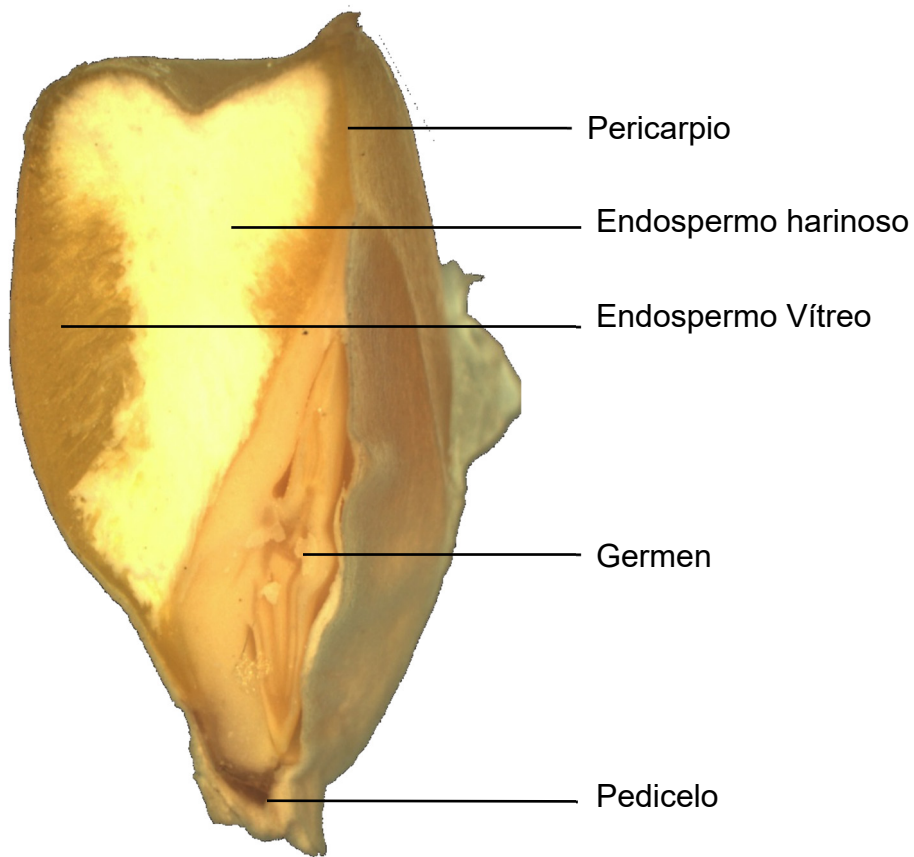


## **2 Estructura y composición química del grano de maíz**

El grano de maíz está constituido por cuatro estructuras principales (Figura 1), pericarpio, endospermo, germen y pedicelo. El pedicelo es la estructura del grano mediante la cual se une al olote y por lo tanto está formado de haces vasculares que finalizan en la porción basal del pericarpio. También consta de una capa externa de abscisión que tiene la función de sellar la punta del grano maduro. El pedicelo ocupa un 0.8% del peso total del grano (Watson 1987).

El pericarpio es la capa exterior fibrosa y dura que encierra y protege al grano. En la parte externa el pericarpio está constituido por epicarpio, mesocarpio y endocarpio, mientras que en la parte interna está conformado por células cruzadas cuya función es evitar que el grano pierda humedad y por células tubulares que sirven para el reparto del agua que se absorbe por el germen durante la germinación. En el grano maduro también tiene la función de impedir el ingreso de hongos y bacterias. El pericarpio constituye alrededor de un 5.3% del peso del grano y está constituido en su gran mayoría de fibra.

El endospermo ocupa la mayor proporción del grano con un 80-84% del peso total. La capa más externa de esta estructura es la aleurona y son las únicas células vivas después de la desecación del grano. Hacia el interior se encuentra el endospermo vítreo y luego hacia el centro del grano el endospermo harinoso que en un maíz normal ocupa la mayor proporción (Figura 1). El endospermo funciona como la principal reserva energética de la planta durante su etapa temprana de desarrollo y está compuesto mayoritariamente de almidón (90%) y proteínas (7%), y en menor proporción de lípidos, minerales y otros compuestos (Serna-Saldivar 2019).



**Figura 1.** Principales estructuras del grano de maíz.

Proporcionada por Joao T. Leiva (Depto. Ciencia de Plantas, Universidad de Arizona).

El germen ocupa un 9.5-12% del peso total del grano y está formado principalmente del eje embrionario y el escutelo. El escutelo (cotiledón único) constituye cerca del 90% del germen y sirve como almacén de nutrientes que utiliza el embrión durante la germinación. El germen contiene aproximadamente el 35-40% del total de lípidos del grano de maíz (Serna-Saldivar 2019).

En lo que respecta a la composición química del grano de maíz, esta se ve afectada por el genotipo, así como por las condiciones climáticas y de crecimiento; a su vez, la composición química varía entre las diferentes estructuras del grano como se puede observar en el Cuadro 3. Los componentes mayoritarios son el almidón (~70 %) y las proteínas (~10 %). El almidón está formado por amilosa y amilopectina, cuyas características serán descritas en mayor detalle en la siguiente sección. Las proteínas representan en promedio un 10.3 % y se encuentran en mayor porcentaje en el germen.

Las proteínas de reserva más abundantes en el grano de maíz son las prolaminas (solubles en alcohol), denominadas zeínas, ocupando el 70-80% del total en el endospermo, mientras que las albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones salinas) se encuentran principalmente en el germen (Glover y Mertz 1987). Debido a que las zeínas son las proteínas mayoritarias del endospermo de maíz, una clasificación más sencilla divide a las proteínas totales en zeínas y no-zeínas (Hamaker y Larkins 2002). Las no-zeínas son un grupo heterogéneo de proteínas, las cuales forman parte del citoplasma y de la pared celular, pero ocupan una menor proporción en el endospermo.

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

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

FAO (1993)

En la composición química del grano de maíz se distinguen también otros componentes como son lípidos (~5 %), cenizas (~1-3 %) y fibra (1-2 %). El contenido lipídico se encuentra en su mayoría en el germen del grano y los ácidos grasos no saturados (oleico y linoleico) son los que predominan en general. Con respecto al contenido de cenizas, los minerales se encuentran principalmente en el germen del grano (78 %), donde el más abundante es el fósforo que puede llegar a representar el 1 % del peso del grano (Serna-Saldivar 2019).

## **B ALMIDÓN**

El almidón es la principal forma de reserva de carbono en los cereales, representando cerca del 70-80% del peso del grano, por lo que este componente es mayormente responsable del valor energético, nutricional y económico que tienen los granos (Paredes-López y col 2006). Las moléculas de almidón se encuentran formando gránulos que se depositan en las células del endospermo, ocupando la mayor parte de su volumen (Hamaker y Larkins 2002). En los últimos años, el estudio de la estructura del almidón y su relación con la actividad de las diferentes enzimas involucradas en su biosíntesis se ha incrementado, ya que esto repercute en las características morfológicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón. Por ello, el entendimiento de los procesos relacionados con la biosíntesis de almidón es esencial para el mejoramiento del rendimiento y la calidad de los cereales, así como de sus usos en la industria.

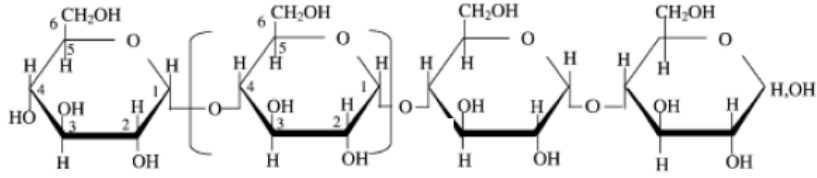
## 1 Estructura del almidón

El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Figura 2). Estas moléculas se organizan en anillos concéntricos para dar lugar a la estructura de los gránulos. La distribución de la amilosa dentro de los anillos concéntricos varía entre las regiones centrales y periféricas del gránulo, ya que solo ocupa los espacios que deja disponibles la amilopectina después de su síntesis (Tetlow y col 2004).

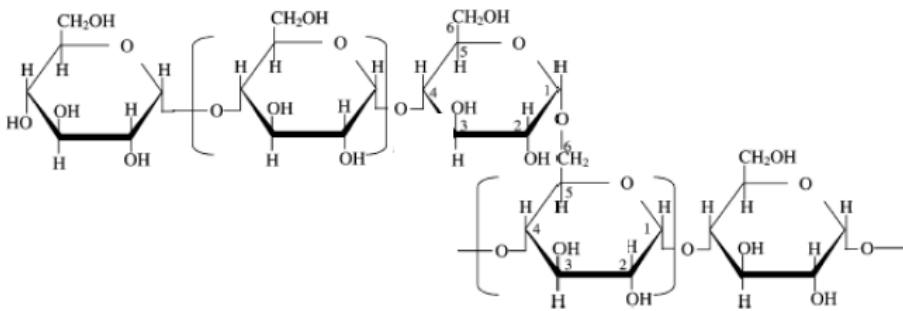
La amilosa es una molécula esencialmente lineal formada por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4) y tiene un peso molecular de alrededor de  $1 \times 10^5$  correspondiente al grado de polimerización (GP) de 1000-10,000 unidades de glucosa. Un porcentaje menor al 0.5% de la glucosa en amilosa se encuentra unida por enlaces  $\alpha$ -(1,6), resultando en un bajo grado de ramificación y una estructura de 3-11 cadenas de aproximadamente 200-700 residuos de glucosa por molécula (Copeland y col 2009).

Por otro lado, la amilopectina es un polímero de mayor tamaño con un peso molecular alrededor de  $1 \times 10^8$  y GP de hasta un millón de unidades de glucosa. Un almidón normal contiene 25-30% de amilosa y 70-75% de amilopectina; sin embargo, algunos almidones con alto contenido de amilosa ( $> 50\%$ ) pueden tener 30-50% de amilopectina, mientras que los almidones de maíces tipo ceroso (*waxy*) contienen entre el 90 y 99% de amilopectina.

### Amilosa



### Amilopectina



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

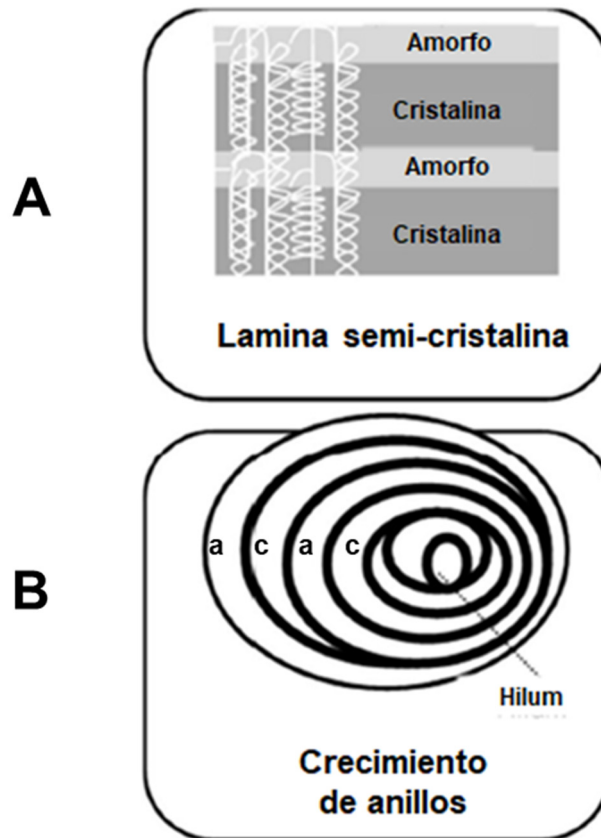
Tester y col (2004).

Aproximadamente el 5% de las unidades de glucosa de la amilopectina están unidas mediante enlaces  $\alpha$ -(1,6), otorgándole un alto grado de ramificación a la molécula. La estructura tipo árbol y la compleja arquitectura molecular puede variar sustancialmente entre almidones, lo cual depende de la posición y la longitud de la ramificación (Copeland y col 2009). La organización de estos racimos genera la formación de zonas semicristalinas y amorfas del gránulo de almidón (Figura 3A). Es decir, los gránulos de almidón crecen a partir del hilum (centro del gránulo), formando anillos concéntricos amorfos y semicristalinos alternados rodeando al hilum (Figura 3B), estas últimas formadas por laminas amorfas y cristalinas alternadas con un espesor entre 100 y 400 nm. Las lamelas amorfas contienen los puntos de ramificación que conectan las dobles hélices de la amilopectina y amilosa intercaladas aleatoriamente mientras que las lamelas cristalinas comprenden segmentos cortos y lineales de las cadenas ramificadas de la amilopectina (Waterschoot y col 2015).

## **2 Propiedades fisicoquímicas del almidón**

La estabilidad y propiedades fisicoquímicas del almidón dependen grandemente de la naturaleza de las regiones cristalinas y amorfas que lo conforman. Debido a ello, se han aplicado muchas técnicas para probar el orden estructural de los polímeros del almidón. Dentro de las más utilizadas se encuentran la calorimetría diferencial de barrido (DSC), ya que permite establecer diferencias en la estructura del almidón, cambios en estados físicos e interacciones de los polímeros del almidón con otros constituyentes.





**Figura 3.** Estructura del gránulo de almidón. (A) Cadena de amilopectina, formada por laminillas amorfas y cristalinas. (B) Gránulo entero formado por el apilamiento de anillos concéntricos amorfos (a) y semicristalinos (c) alternados rodeando al hilum. Dhital y col (2017)

Debido a su estructura semicristalina, los gránulos de almidón son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando estos son colocados en suficiente agua, los gránulos de almidón tienden a absorber una parte y se hinchan. Cuando se calienta el almidón, ocurre una pérdida del orden estructural debido al desarreglo molecular de los polímeros amilosa y amilopectina. Se ha demostrado que el rompimiento del orden estructural dentro de los gránulos de almidón está caracterizado por ser un proceso endotérmico llamado transición de orden-desorden (Cooke y Gidley 1992).

Durante este proceso endotérmico (gelatinización del almidón) se disocia la estructura de dobles hélices (cristalina) produciendo la desorganización molecular, provocando un incremento de la viscosidad de la pasta formada y la hidrólisis enzimática (Srichuwong y Jane 2007). Este proceso de gelatinización es medido a partir de calorimetría diferencial de barrido (DSC); el almidón es calentado a una velocidad constante conocida y los cambios en la capacidad calorífica se miden en función de la temperatura (Wang y col 1998), registrándose la temperatura ( $T_g$ ) y entalpía de gelatinización ( $\Delta H_g$ ).

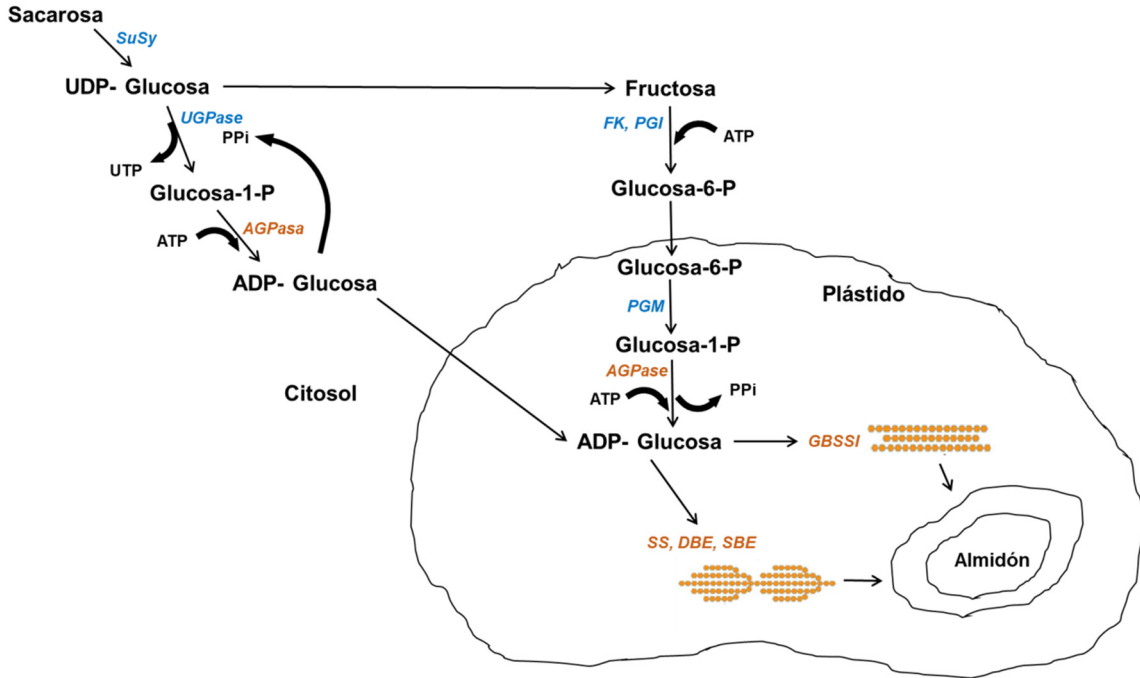
La gelatinización comienza con la absorción de agua en la región amorfa, los puentes de hidrógeno son más débiles y menos rígidos en esta región, y no tan numerosos como en las regiones cristalinas. Cuando la parte amorfa se hidrata por completo, la parte cristalina inicia un proceso similar, pero requiere mayor energía (entalpía de gelatinización), cuando se alcanza cierta temperatura (temperatura de gelatinización, 65-75°C), el gránulo hinchado se rompe parcialmente alterando significativamente su estructura debido a la solubilización de la amilosa y la amilopectina. La amilosa comienza a difundirse hacia el agua y la amilopectina queda dentro del gránulo para posteriormente perder su orden, la amilosa fuera del gránulo

forma una malla y produce un gel (Biliaderis 1991). La gelatinización y el hinchamiento del gránulo dependen principalmente de la estructura de la amilopectina (peso molecular, longitud y patrón de ramificaciones), de la proporción amilosa/amilopectina, del contenido de fósforo y la arquitectura del gránulo (Tester 1997).

La temperatura y entalpía de gelatinización son parámetros que han sido relacionados con las características del gránulo de almidón, incluyendo la cristalinidad (Krieger y col 1998). Conforme aumenta la cristalinidad también aumenta la temperatura de gelatinización, lo cual indica una mayor estabilidad estructural del gránulo que lo hace más resistente a la gelatinización (Barichello y col 1990).

### **3 Biosíntesis del almidón**

El almidón se produce en el endospermo de cereales por medio de la acción coordinada de diversas enzimas involucradas en la síntesis de este polisacárido y en su degradación (Tetlow y col 2004). Dentro de estas enzimas se encuentran la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasas (GBSS, SS), enzimas ramificadoras de almidón (SBE) y enzimas desramificadoras de almidón (DBE) (Pfister y Zeeman 2016) (Figura 4).



**Figura 4.** Biosíntesis de almidón en el endospermo de cereales. La ADP-glucosa se puede sintetizar en el citosol o en el plástido. Las abreviaturas de las enzimas se muestran en color y en cursiva: *Susy*: sacarosa sintasa; *UGPase*: UDP glucosa pirofosforilasa; *FK*: fructocinasa; *PGI*: fosfoglucosa isomerasa; *PGM*: fosfoglucomutasa; *AGPase*, ADP-glucosa pirofosforilasa; *GBSSI*: almidón sintasa unida al gránulo; *SS*: almidón sintasa; *DBE*: enzima desramificadora de almidón; *SBE*: enzima ramificadora de almidón. Tomada de González-Núñez y col (2023)

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

El catabolismo de la sacarosa en el citosol produce glucosa-6-fosfato y en la mitocondria ATP, sustratos para la biosíntesis de almidón. La glucosa-6-fosfato es trasladada al interior del amiloplasto donde se convierte en glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. Posteriormente, la glucosa-1-fosfato se convierte en ADP-Glucosa (ADP-Glu) mediante la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), enzima clave en la regulación de la biosíntesis de almidón, ya que controla el flujo de carbono (Pfister y Zeeman 2016) (Figura 4).

En la mayoría de los tejidos vegetales donde se sintetiza almidón la AGPasa está localizada en el amiloplasto; sin embargo, en los cereales se encuentra en dos compartimentos celulares diferentes, en el citosol, donde tiene su mayor actividad, y en el plástido, donde tiene una actividad menor (Nagai y col 2009).

La enzima AGPasa se compone de dos subunidades grandes y dos pequeñas, cuyas diferencias en composición, actividades catalíticas y regulatorias en los diferentes órganos da como resultado variaciones en la forma cómo regula el flujo de carbono durante la síntesis de almidón (Smith y col 1997). La actividad catalítica de la enzima se atribuye generalmente a las subunidades pequeñas, mientras que las subunidades grandes tienen como principal función el modular las propiedades regulatorias, lo que al parecer incrementa la respuesta de las subunidades pequeñas hacia los reguladores alostéricos 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fósforo inorgánico (Jeon y col 2010).

## **b Almidón sintasas**

Las enzimas almidón sintasas (SS) utilizan como sustrato la ADP-glucosa para agregar glucosa al extremo no reductor de una cadena de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) durante la síntesis de amilosa y amilopectina. Una gran cantidad de isoformas de almidón sintasas han sido identificadas en el endospermo de cereales (Jeon y col 2010), las cuales se dividen principalmente en dos grupos, uno de ellos responsable principalmente en la síntesis de amilosa, y el otro involucrado en la síntesis de amilopectina.

### **1) Síntesis de amilosa**

La síntesis de amilosa se lleva a cabo por las enzimas almidón sintasa unida al gránulo I y II (GBSSI y GBSSII). En cereales, GBSSI es codificada por el gen *Waxy1* y una vez sintetizada se localiza normalmente dentro de la matriz del gránulo de almidón en las células del endospermo, mientras que la GBSSII participa en la síntesis de amilosa en hojas y otros tejidos que solo acumulan almidón de forma transitoria (Huang y col 2021). GBSSI también parece participar en la síntesis de amilopectina, ya que se ha reportado que puede agregar unidades de glucosa en las cadenas largas de la amilopectina en lugar de las de amilosa (Vrinten y Nakamura 2000; Yoo y Jane 2002).

## **2) Síntesis de amilopectina**

En la síntesis de amilopectina se han descrito cuatro isoformas de almidón sintetasas abreviadas como SSI, SSII, SSIII y SSIV, las cuales se encuentran asociadas a los gránulos de almidón. Cada isoforma una de las cuatro isoformas tiene diferentes propiedades y un rol distinto durante la síntesis de amilopectina, formando cadenas de diferente longitud (Zeeman y col 2010).

En el endospermo de maíz, la isoforma con la mayor actividad es SSI (Li y col 1999). A partir del análisis de los patrones de ramificación de la amilopectina en mutantes para esta isoforma se ha sugerido que es la principal responsable de la síntesis de cadenas cortas, las cuales tienen grados de polimerización (GP) de 8-12 y se producen a partir de cadenas de GP=6-7 presentes en los puntos de ramificación de las cadenas A o B<sub>1</sub>; mientras que las isoformas SSII y SSIII se han involucrado en la formación de cadenas intermedias (GP=13-25) y largas (GP>30), respectivamente (Nakamura y col 2005).

### **c Enzimas ramificadoras de almidón (SBE)**

Las SBE generan las ramificaciones de la amilopectina mediante enlaces  $\alpha$ -(1,6), para lo cual rompen enlaces  $\alpha$ -(1,4) de una cadena lineal y transfieren la cadena al C<sub>6</sub> de una glucosa presente en otra cadena. Se han reportado dos isoformas de SBE en el endospermo de cereales: enzima ramificadora I (SBEI) y enzima ramificadora II (SBEII) (Sun y col 1997). Las diferencias entre ambas se encuentran en la longitud de la cadena de glucosas transferida y en la especificidad del sustrato; SBEII tiene mayor afinidad por la amilopectina y transfiere cadenas más cortas que la SBEI, la cual transfiere cadenas de mayor longitud y presenta mayor afinidad por la amilosa (Guan

y Preiss 1993). En cereales, la isoforma SBEIIa se encuentra en todos los tejidos que sintetizan almidón, mientras que la isoforma SBEIIb se encuentra exclusivamente en el endospermo. SBEIIa al parecer tiene la función de apoyar a las otras SBE ya que no se han observado cambios en la estructura de la amilopectina cuando ésta enzima es deficiente; sin embargo, un defecto en la isoforma SBEIIb resulta en un incremento en amilosa, jugando un papel muy importante en la producción de cadenas tipo A (cortas) de la amilopectina (Huang y col 2021). Por lo general la isoforma SBEIIa es más activa en trigo y cebada, mientras que la SBEIIb es más activa en arroz y maíz (Regina y col 2010).

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

Las DBE rompen los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,6). En plantas superiores existen dos tipos que se definen con base en sus sustratos específicos: enzimas desramificadoras tipo isoamilasa y tipo pululanasa (James y col 2003). La DBE tipo isoamilasa remueve las ramificaciones de la amilopectina y del fitoglucógeno, mientras que la DBE tipo pululanasa rompe las ramificaciones de pululanos y amilopectina, pero no de fitoglucógeno. El fitoglucógeno es un polímero de glucosa con enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6), que presenta un patrón de ramificación diferente a la amilopectina, siendo este más ramificado y menos organizado, lo cual impide la formación de cristales dentro del gránulo de almidón (Wong y col 2003). Como parte de la correcta síntesis del almidón, las enzimas DBE pueden participar en la remoción de ramificaciones mal posicionadas (pre-amilopectina), las cuales se producen en la superficie de los gránulos de almidón durante su desarrollo, lo cual pudiera prevenir la cristalización (Tetlow y col 2004b).



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

Se requiere un gran número de enzimas para la biosíntesis de almidón y la formación del gránulo, pero la manera en cómo 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 enzimas 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 evidencia 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 PPDK es una enzima clave en la regulación del flujo de carbono entre la biosíntesis de almidón y proteína durante el desarrollo del endospermo debido al efecto negativo que presenta la acumulación de PPI sobre la enzima AGPasa, enzima clave en la síntesis de almidón, cambiando el flujo de carbono hacia la biosíntesis de proteínas (Méchin y col 2007).

## **5 Proteínas asociadas al gránulo de almidón**

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

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

## 6 Genes relacionados con la biosíntesis de almidón

Se han realizado distintos estudios enfocados en identificar los principales genes que participan en la biosíntesis del almidón, destacando los siguientes: *Shrunken 1 y 2* (*Sh1* y *Sh2*), *Brittle 2* (*Bt2*), *Waxy 1* (*Wx1*), *Amylose extender 1* (*Ae1*) y *Sugary 1* (*Su1*); la localización de estos genes en el genoma del maíz se muestra en el Cuadro 4.

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

**Cuadro 4.** Principales genes de biosíntesis de almidón en el 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: MaizeGDB (2023)

Las mutaciones en el gen *Wx1* resultan en la pérdida de la actividad de la enzima GBSSI y el contenido de amilosa puede variar entre 0 y 5% dependiendo de la base genética (Yu y col 2015).

Aún no se conocen mutantes para la enzima SSI en maíz; sin embargo, Fujita y col (2006) reportan que en una mutante de arroz para la enzima SSI se observaron alteraciones en la longitud de cadenas de la amilopectina, presentándose una menor cantidad de cadenas cortas (GP 8-12) y una mayor cantidad de cadenas con GP 16-19 comparado con su contraparte normal sin aparente cambio en el contenido de almidón, lo cual sugiere que otras enzimas SS pueden ser capaces de compensar, al menos parcialmente, la reducción o completa ausencia de SSI. La mutación de la enzima SSIIa en maíz (mutante *su2*) muestra una disminución en las cadenas intermedias con GP de 12-25 y un incremento en las cadenas cortas de 6-10 de la amilopectina (Zhang y col 2004). En la mutante de maíz *dull1* deficiente en la enzima SSIII 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 (Zhu y col 2013).

Por otro lado, la mutante de maíz *ae1* (SBEIIb) presenta un fenotipo con un alto contenido de amilosa (Fisher y col 1996; Kim y col 1998); además, en otros estudios se ha encontrado que esta mutante también provoca una disminución en la frecuencia de ramificación en el almidón (Liu y col 2011). En el caso de la mutante *su1* (ISA1) en maíz, la alteración en la actividad desramificadora se asoció con una reducción en el contenido de amilopectina, una mayor proporción de cadenas cortas, así como la acumulación de fitoglucógeno, un polisacárido soluble altamente ramificado (James y col 1995; Dinges y col 2001; Lin y col 2012). Se ha encontrado que la mutante de maíz

*zpu1* que codifica para la enzima pululanasa ocasiona una mayor acumulación de maltooligosacáridos ramificados y menor acumulación de maltooligosacáridos lineales en el endospermo, además de un mayor contenido de fitoglucogeno, sugiriendo una participación como degradadora en la síntesis del almidón (Dinges y col 2003).

## **C EXPRESIÓN DE GENES DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS CODIFICADAS EN CEREALES**

### **1 Estudios de expresión de genes involucrados en la síntesis de almidón**

Se han realizado estudios de expresión diferencial de los principales genes involucrados en la biosíntesis del almidón en granos de maíz en diferentes estados de desarrollo. Ding y col (2009) realizaron un análisis de expresión semi-cuantitativo por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa) de 17 genes de síntesis de almidón pertenecientes a las familias de enzimas de almidón sintasas unidas al gránulo (GBSS), almidón sintasas solubles (SS), enzimas ramificadoras (SBE) y desramificadoras del almidón (DBE), en 2 líneas híbridas waxy y una línea híbrida normal como control, de las cuales se obtuvieron granos en desarrollo después de 1, 2, 3 y 4 semanas de la polinización. Como era de esperarse, para el grupo de las GBSS observaron una expresión nula del gen *GBSSIIB* en las 2 líneas híbridas cerosas, mientras que para los grupos de SBE y DBE los patrones de expresión de los diferentes genes son similares en las tres líneas a excepción de los genes *ISA2* e *ISA3*, los cuales no presentaron transcritos en las líneas híbridas; no obstante, para el grupo de las SSS tres de los siete genes mostraron patrones similares mientras que los otros cuatro genes mostraron patrones de expresión distintos entre las tres líneas. Los autores sugieren que las diferencias en expresión en las líneas híbridas waxy se deben

a que estas también presentaron múltiples mutaciones en GBSSI, GBSSIIb, ISA2 e ISA3, las cuales fueron producidas por diferentes causas genéticas; estas mutaciones se asociaron con cambios en el contenido de almidón total, contenido de amilosa y azúcares solubles.

Huang y col (2011) caracterizaron genes que codifican para ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) de diferentes órganos (hoja, embrión y endospermo) en la línea híbrida de maíz 08-614. Los granos en desarrollo y las hojas fueron cosechados a los 1, 7, 10, 13, 16, 20, 25 y 30 días después de la polinización (DDP). Para elucidar las funciones de estos isogenes, realizaron un análisis de expresión por PCR-tiempo real (q-PCR). Se utilizaron 6 genes, 3 para la subunidad grande de AGPasa (agpl1, agpl2 y agpl3) y 3 para la subunidad pequeña (agps1, agps2 y agps3). Los patrones de expresión permitieron dividir los 6 genes en 3 grupos: (1) de expresión estable tanto en hoja como en grano, específicamente en embrión (AGPI1, AGPs1 y AGPI2); (2) de tejido y de expresión desarrollo-específico (AGPI3 y AGPs2) también conocidos como *Shrunken2* y *Brittle2*, respectivamente, los cuales se expresan solamente en endospermo de cereales en las fases intermedias y finales de desarrollo; (3) de expresión tejido-específico (AGPs3) cuyos transcritos se mantuvieron constantes durante el desarrollo y solo se observaron en el grano de maíz (embrión). Los perfiles de expresión de *Brittle2* en este estudio sugieren que glucosa-1-fosfato (Glu-1-P) o glucosa-6-fosfato (Glu-6-P) pueden ser transportadas dentro del plástido tanto en fases tempranas como tardías de desarrollo del endospermo del grano de maíz.

Un estudio reveló la presencia de 24 genes pertenecientes a las familias de las ADP-glucosa pirofosforilasas (AGPasas), almidón sintasas unidas al gránulo (GBSS), almidón sintasas solubles (SS), enzimas ramificadoras (SBE) y desramificadoras del

almidón (DBE) en la línea de maíz híbrida 08-614 (Chen y col 2011). En este estudio se cosecharon endospermos en desarrollo a los 7, 12, 17, 22, 27 y 32 DDP y los resultados de PCR tiempo real mostraron grandes cambios de expresión en 15 de los 24 genes (AGPI2, AGPI3, AGPs2, AGPs3, SSI, SSIIa, SSIIc, SSIIIa, GBSSI, GBSSIIb, SBEI, SBEIIb, SBEIII, ISA2 y PUL) en el endospermo de maíz; la mayoría de estos cambios se presentaron en etapas tempranas e intermedias de desarrollo del endospermo, sugiriendo así la existencia de una co-expresión entre estos genes de biosíntesis de almidón.

Jiang y col (2013) generaron plantas de maíz transgénico (C7-4-2 y C7-11-5) a partir de líneas de maíz elite endogámicas (H99) para evaluar la sobre expresión de los genes *Bt2*, *Sh2*, *Sh1* y *GbssIIa* y la supresión de los genes *Sbel* y *Sbellb*. Estos autores encontraron que en endospermos de maíz transgénico de 20 DDP la expresión de los transgenes (RNAm) de *Bt2*, *Sh2* y *Sh1* en las líneas C7-4-2 y C7-11-5 fue 1.50-2.50 veces mayor que en las plantas normales, mientras que los niveles de transcritos de *GbssIIa* en las mismas plantas fueron 167 y 130 veces mayores que las de tipo normal, respectivamente. Los niveles de transcritos de *SBEI* y *SBEIIb* en la línea C7-4-2 se redujeron en 16 y 25%, respectivamente, mientras que en la línea C7-11-5 esta reducción fue de 29 y 23 %, respectivamente. Esto demuestra que todos los genes fueron modulados en las plantas transgénicas de 20 DPP, el cual es un periodo de rápida biosíntesis de almidón en el endospermo del maíz, lo que sugiere la posibilidad de un considerable impacto en la cantidad de almidón y de su calidad. En este sentido, los autores encontraron un aumento en el contenido de almidón de 2.8 a 7.7% y de 37.8 a 43.7% en el contenido de amilosa en las plantas transgénicas comparado con



las plantas de tipo normal, donde las diferencias fueron estadísticamente significativas. Los autores resaltan el papel importante de estos genes en la biosíntesis del almidón.

## **2 Estudios de actividad de enzimas de síntesis de almidón en cereales**

Además de los análisis genéticos, también se han realizado muchos estudios de actividad enzimática en distintos cereales, esto con el fin de observar el gran papel que tienen las enzimas en la biosíntesis del almidón. En este sentido, Doehlert y Knutson (1991) analizaron la actividad de las enzimas desramificadoras de almidón isoamilasa (I y II) y pululanasa en líneas híbridas del maíz OH43. Los resultados obtenidos por estos investigadores muestran que la actividad de pululanasa fue mayor para la hidrólisis de sustratos como el pululano y  $\beta$ -dextrina límite y en menor proporción para la amilopectina y el fitoglucógeno, reportando que la velocidad de hidrólisis de  $\beta$ -dextrina límites fue 5 veces mayor respecto a la de amilopectina. Por el contrario, la actividad de la isoamilasa II fue superior en la degradación de amilopectina y fitoglucógeno, obteniendo una velocidad de degradación de amilopectina 15 veces mayor que la pululanasa y demostrando que esta enzima no degrada pululano. La actividad de estas enzimas repercutió en un incremento en el índice de tinción de almidón con yodo lo que sugiere que juegan un papel muy importante en la degradación del almidón, sugiriendo que la enzima pululanasa podría encargarse de las ramificaciones  $\alpha$  (1-6) más expuestas y la isoamilasa de las menos expuestas.

Respecto a la enzima ramificadora de almidón, Nishi y col (2001) realizaron un estudio en arroz donde observaron el efecto de la mutación del gen *amilosa-extender* (*ae*) sobre la biosíntesis de los componentes del almidón. Se encontró que las líneas mutantes presentaron una disminución de la actividad de la enzima ramificadora de

almidón IIb (BEIIb) con respecto a las líneas de arroz normales. También observaron una disminución en la actividad de la enzima almidón sintasa I (SSI), lo que sugiere un efecto pleiotrópico causado por la mutación; la disminución de la actividad de estas enzimas en líneas mutantes se relacionó con una disminución del contenido de amilopectina, así como en el grado de polimerización de las cadenas ramificadas de amilopectina, concluyendo que la mutación *ae* tiene un gran efecto sobre la actividad enzimática de BEIIb y que dicho efecto puede ser usado para modificar las propiedades fisicoquímicas y reológicas del almidón, de tal forma que dicha información puede ser aplicada en la producción de arroz con características específicas para su uso en la preparación de alimentos.

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

de amilosa, mientras que las líneas que presentaron mayor acumulación de amilopectina tuvieron una actividad superior de SSS y enzima-Q. Además, se encontró que las enzimas GBSS, SSS y AGPasa presentaron una correlación positiva significativa con el contenido de almidón, amilosa y amilopectina en todas las líneas, sugiriendo una acción coordinada de estas enzimas en la síntesis de almidón operando como complejos multiproteínicos con actividad funcional. Resultados similares también fueron observados por Lü y col (2008), quienes analizaron los efectos de la actividad de enzimas de síntesis de almidón sobre el desarrollo del endospermo en granos de arroz; los autores reportan una correlación significativa entre las tasas de máxima actividad de AGPasa, SSS y SBE con el contenido de almidón, amilosa y amilopectina, además de que observaron una correlación significativa entre las tasas máximas de actividad de las enzimas pululanasa e isoamilasa con el contenido de amilopectina, confirmando el papel importante de estas enzimas en la biosíntesis de almidón.

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

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

Los estudios realizados de actividad enzimática indican que las enzimas de síntesis de almidón juegan un papel muy importante en la formación del endospermo en los granos de los cereales.

### **3 Evaluación de la actividad de enzimas de síntesis de almidón empleando sistemas heterólogos**

#### **a Sistema heterólogo**

Un sistema heterólogo consiste básicamente en células eucariotas o procariotas transformadas genéticamente mediante la inserción de un gen específico con el fin de producir una proteína de interés, la cual no es producida por dichas células. Esto implica la introducción de genes en una célula o tejido con el uso de un vector, el cual lleva integrado el o los genes que se deseen transferir (Gutierrez-M y col 2003).

La transformación genética consta básicamente de cuatro etapas: (1) el desarrollo de células competentes, (2) la unión de la molécula de ADN a la superficie de la célula, (3) su entrada y procesamiento y, (4) la expresión del gen introducido (Serrano-Rivero y col 2013).

## **b Antecedentes sobre el uso de sistemas heterólogos**

Muchos investigadores han hecho uso de los sistemas heterólogos ya que por medio de estos se puede obtener una gran cantidad de proteína, lo cual, de forma natural es complicado lograr, además de que es posible aislar las mismas de forma más sencilla y eliminar de esta manera el ruido que otras proteínas pudieran estar introduciendo al momento de evaluar la actividad enzimática de la misma. Seo y col (2002) evaluaron la actividad enzimática de las distintas isoformas de la enzima ramificadora de almidón (SBEI, SBEIIa y SBEIIb) del maíz con el propósito de conocer la posible función de cada isoforma, para lo cual llevaron a cabo la transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los autores lograron producir con éxito la proteína recombinante evaluando además la actividad enzimática para cada isoforma, concluyendo que SBEI tienen una gran influencia en la estructura de amilopectina, esto siempre y cuando estén presentes las isoformas SBEIIa y SBEIIb, ya que observaron que estas enzimas generan diferentes grados de polimerización, produciendo cadenas más cortas la isoforma SBEIIb en comparación con las otras dos, y al combinarlas en un mismo sistema observaron que las isoformas SBEIIa y SBEIIb empiezan su actividad catalítica antes que SBEI, es decir, actúan en un complejo donde se complementan.

Liu y col (2012) transformaron células de *Escherichia coli* mediante la inserción de dos alelos recesivos de amilosa extender (*ae*), *ae1-Elmore* y *ae1-ref* de maíz, con el objetivo de observar cómo afecta la mutación a la proteína y como al suprimir la actividad de SBEIIb en la biosíntesis de almidón influye sobre la actividad de las enzimas sintetas solubles (SS). Los autores observaron que la inactividad de la mutante SBEIIb es debido a que carece de un péptido de 28 aminoácidos (Val272 –

Pro299) y no puede unirse a la amilopectina. Los resultados obtenidos apoyan fuertemente la hipótesis de que el complemento de complejos heteroméricos de proteínas implicadas en la síntesis de amilopectina (SBE y SS) contribuye a la estructura fina y a la arquitectura del gránulo de almidón. Esta misma enzima fue estudiada por Makhmoudova y col (2014) quienes produjeron SBEIIb recombinante mediante la transformación de *Escherichia coli* cepa XL1-Blue, esto con el fin de identificar sitios de fosforilación y su efecto en la actividad de la enzima, logrando identificar múltiples sitios de serina de los cuales tres fueron fosforilados por dos cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , concluyendo que estos sitios de fosforilación son muy importantes como mecanismos de regulación en la biosíntesis de almidón en cereales.

La enzima ramificadora de almidón en arroz también fue estudiada por Nakamura y col (2010), quienes transformaron *E. coli* para producir distintas isoformas (SBEI, SBEIIa y SBEIIb) con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos de cada una de ellas, ya que éstos son indispensables para esclarecer el rol específico que tienen estas isoformas en la biosíntesis del almidón.

Otra enzima que ha sido estudiada en un sistema heterólogo es la enzima almidón sintasa unida al granulo (GBSS). Dian y col (2003) transformaron *E. coli* y clonaron exitosamente un gen de GBSS de arroz (*OsGBSSII*), esto con el fin de determinar si este gen codificaba para dicha enzima y producir anticuerpos que ayudaran a su detección en las hojas. Estos autores analizaron la expresión y actividad de la proteína recombinante y confirmaron el papel de este gen, con lo que pudieron determinar el efecto regulatorio de los azúcares y del ritmo circadiano endógeno sobre la expresión de *OsGBSSII* en las hojas de las plantas. En este mismo sentido, Hebelstrup y col (2017) también transformaron *E. coli* mediante la inserción del gen *HvGBSSIa* de una

variedad de cebada cerosa (waxy) para medir la actividad de GBSSI, enzima clave en la biosíntesis de almidón en el endospermo de los granos. Los autores confirmaron la pérdida de actividad de esta enzima y observaron que las variedades cerosas de cebada tienen hasta un 90% de pérdida de actividad catalítica, lo cual sugirieron que se debe a una focalización deficiente de HvGBSS1a en los gránulos de almidón.

Harn y col (1998) analizaron en *E. coli* las isoformas de la enzima almidón sintasa soluble (SS) SSIIa y SSIIb de la línea de maíz W64A. Para ello, insertaron los genes *zSSIIa* y *zSSIIb* en la bacteria con el fin de producir proteína recombinante, la cual secuenciaron y midieron su actividad catalítica; obteniendo como resultado que los genes *zSSIIa* y *zSSIIb* tienen características distintas en cuanto a su actividad y secuencia con respecto a los que codifican para la enzima almidón sintasa unida al granulo (GBSSI) y la enzima almidón sintasa soluble I (SSI).

En el caso de las enzimas desramificadoras de almidón también se han realizado estudios empleando como sistema heterólogo a *E. coli*. Li y col (2017) produjeron la enzima pululanasa y evaluaron su actividad, mientras que Sim y col (2014) analizaron la actividad y estructura de la enzima isoamilasa. Todos estos estudios demuestran la utilidad de un sistema heterólogo en el análisis de las enzimas de síntesis de almidón, apoyando con ello el uso de este en el presente estudio.

## **D MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICA**

Las proteínas en un maíz normal contienen 1.5-2.0% de lisina y aproximadamente 0.4% de triptófano, valores que son bajos y no satisfacen los requerimientos diarios de

estos aminoácidos (Cuadro 5), razón por la cual el maíz es considerado nutricionalmente pobre (FAO 1993).

Debido a las deficiencias en los aminoácidos lisina y triptófano que presenta el grano de maíz normal y su importancia como base en la alimentación humana directa e indirectamente, se han realizado diversas investigaciones para mejorar su calidad proteínica. Mertz y col (1964) reportaron que la mutante *opaco-2* (*o2*) posee el doble del contenido de lisina presente en el maíz normal (1.5-2.0%); sin embargo, el endospermo blando de esta mutante se asoció con una menor densidad del grano y mayor susceptibilidad a insectos, agentes patógenos y daño mecánico, lo que impidió que fuese agrónomicamente aceptable. Por tal motivo, investigadores del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en México (Villegas y col 1992) y de la Universidad de Natal en Sudáfrica (Gevers y Lake 1992), desarrollaron mediante mejoramiento tradicional mutantes *o2* modificadas denominadas Maíz de Calidad Proteínica o QPM por sus siglas en inglés (Quality Protein Maize), las cuales mantienen la calidad nutricional de *o2* pero poseen un endospermo vítreo, además de presentar rendimientos similares a maíces normales (Zarkadas y col 2000).

## **1 Importancia del Maíz de Calidad Proteínica**

De acuerdo con registros de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2022 un total de 821 millones de personas padecían desnutrición, de las cuales 150 millones son infantes (FAOSTAT 2024). Debido a que el 98% de estas personas son de países en desarrollo y muchos tienen una dieta basada en cereales, el consumo de maíz QPM podría contribuir significativamente a mejorar su nutrición.



**Cuadro 5.** Requerimientos mínimos necesarios diarios de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano en personas de distintas edades.

Edad (años)	Aminoácidos requeridos (mg/kg/d)	
	Lisina	Triptófano
0.5	63	9.5
1-2	44	6
3-10	35	4.8
11-14	35	4.8
15-18	33	4.4
>18	30	4.0

CMR-Institute (2010)

Diversas investigaciones reportan que el maíz QPM tiene mejor aporte en la nutrición humana y animal. Este material ha mostrado ser particularmente eficaz para mejorar la nutrición de los niños. Un estudio realizado por Akuamoah (2002) en Etiopía reveló que el peso de los niños alimentados con QPM aumentó 15% en comparación con aquellos que consumieron maíz normal. Akalu y col (2010) evaluaron el efecto del maíz QPM en la nutrición de niños (0.5-5 años) que consumían alimentos típicos de la región hechos de maíz QPM en la zona occidental de Etiopía. Los autores encontraron que niños alimentados con QPM crecieron 15% más que los alimentados con maíz normal, concluyendo que el maíz QPM puede ayudar a prevenir el déficit de crecimiento y ayudar a ganar peso en los infantes en desarrollo.

Sumbo y Ikujeunola (2014) contrastaron la composición química y perfil de aminoácidos de maíz QPM con la del maíz común, observando que los materiales QPM presentaron un contenido significativamente mayor en aminoácidos esenciales como lisina, fenilalanina e isoleucina, sugiriendo de esta manera que el maíz QPM puede integrarse en la dieta familiar y especialmente en la formulación de alimentos de destete para lactantes donde la desnutrición por proteínas es un problema. Un estudio realizado por Gunaratna y col (2019) en niños destetados del sur de Etiopía sugiere que el maíz de calidad proteínica (QPM) puede reducir el riesgo de ingesta inadecuada de proteínas, lo que ratifica más la importancia de estos materiales como fuente de alimento.

De Groote y col (2014) evaluaron la aceptabilidad del maíz QPM en países del sur de África, encontrando una buena aceptabilidad, incluso mejor que la de alimentos hechos con maíz convencional, lo que indica que sus características sensoriales no

son un impedimento para su adopción y resalta la importancia del uso del maíz QPM como base en la alimentación ya que aportaría una mejor nutrición respecto al maíz convencional. Algo similar fue observado por Gunaratna y col (2016) quienes evaluaron la aceptabilidad del maíz QPM, concluyendo que la aceptabilidad sensorial de este es poco probable que impida su aceptación como alimento principalmente en infantes de 6 a 24 meses. En el mismo sentido, Desalegn y col (2015) evaluaron la aceptabilidad de alimentos hecho a base de maíz QPM y garbanzo, encontrando que todos los alimentos complementarios basados en QPM preparados en el estudio fueron aceptados a nivel comunitario y cumplieron con la dosis diaria mínima recomendada de energía (370 kcal) y proteínas (10.9 g) para niños de 6 a 36 meses, así como dos terceras partes de la dosis diaria recomendada de hierro y zinc y hasta el 50% de la vitamina A, resaltando la importancia del maíz QPM en la elaboración de alimentos.

En otro estudio similar, Belayneh y col (2018) evaluaron la aceptabilidad sensorial del maíz QPM en 95 niñas adolescentes de dos escuelas primarias en Etiopía con un producto popular local; ellos demostraron que QPM ganó alta aceptabilidad del consumidor y que puede tener un gran potencial sustituyendo el uso de maíz convencional en los programas de alimentación escolar y de esta manera contrarrestar el déficit de proteína que este posee. Estos investigadores recomiendan la sustitución de maíz convencional por QPM no solo por su superioridad nutricional sino también por su mayor aceptación sensorial.

Los estudios anteriores sugieren que el maíz QPM puede satisfacer de mejor manera los requerimientos diarios de lisina y triptófano recomendados por la FAO para niños de 1-2 años (Cuadro 6), teniendo así un impacto positivo en la nutrición y aceptabilidad, lo que lo hace un candidato importante como fuente de alimento tanto en personas como en animales. Es por todo esto que es importante investigar los mecanismos responsables de la mejora en la calidad proteínica y la modificación de la vitrosidad del grano en maíz QPM.

## **2 Mecanismos propuestos para la modificación del endospermo en maíz QPM**

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

En maíz QPM la acumulación de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa es de 2 a 4 veces mayor que la encontrada en un maíz normal o la mutante *o2*, mientras que los niveles de  $\alpha$ -zeínas parecen no presentar ningún cambio en QPM comparado con *o2* (Wallace y col 1990). Aunque los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de este aumento son desconocidos, un mapeo genético de genes modificadores *o2* (*mo2*) reveló una asociación estrecha entre la dureza del grano y el contenido de la proteína de almacenamiento  $\gamma$ -zeína de 27 kDa (Lopes y col 1995).

El endospermo del maíz QPM acumula un mayor número de cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa, lo que sugiere la formación de una matriz más rígida, además de que estas proteínas son ricas en cisteína y se orientan en la periferia de los cuerpos proteínicos (Lending y Larkins 1989), por lo que se ha sugerido que la unión de las  $\gamma$ -zeínas y otras proteínas ricas en cisteína favorecen la formación de una red de proteínas que rodea a los gránulos de almidón (Lopes y Larkins 1991).

**Cuadro 6.** Contenido de los aminoácidos lisina y triptófano en el endospermo de maíz común y QPM.

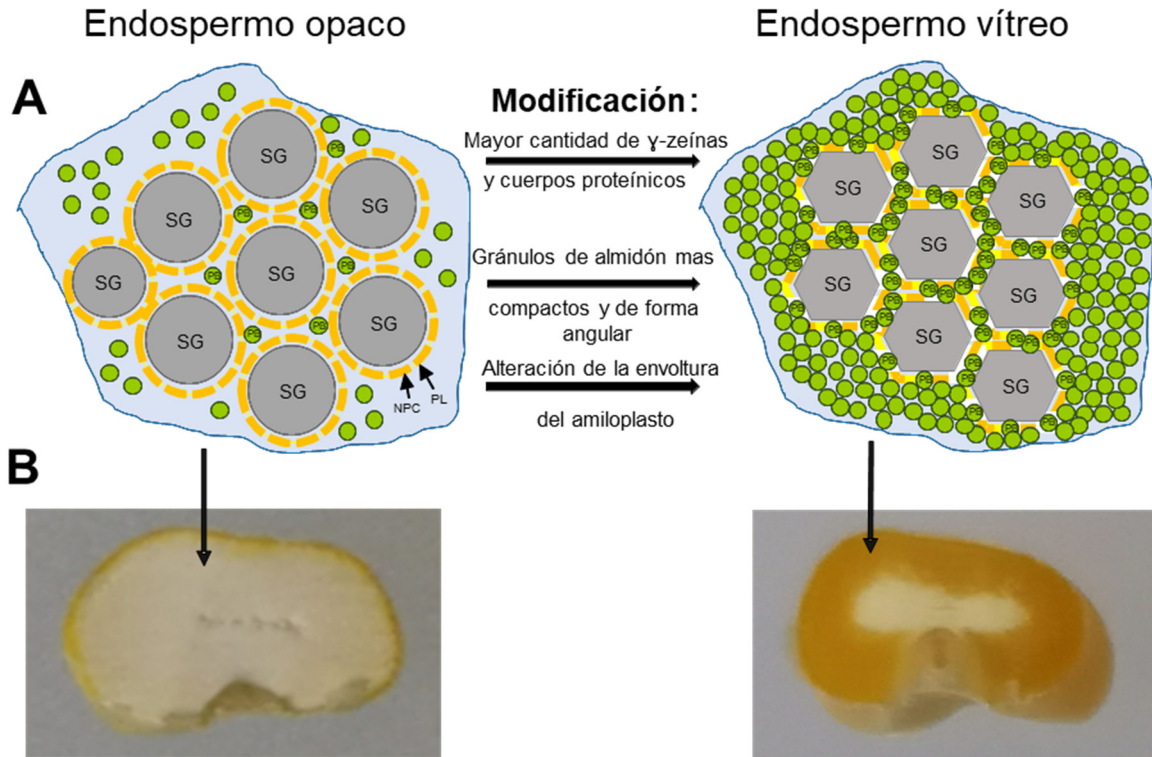
<b>Aminoácidos</b>	<b>Maíz común (g/100g proteína)</b>	<b>Maíz QPM (g/100g proteína)</b>
<b>Lisina</b>	1.80-2.0	3.5-4.68
<b>Triptófano</b>	0.38-0.40	0.61-0.88

Pereira y col (2008); Mendoza-Elos y col (2006).

De los resultados de estos estudios se sugirió que el aumento en el número de cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -zeínas y su compactación entre los gránulos de almidón es uno de los mecanismos responsables de la modificación del endospermo *o2* (Figura 5A).

Evidencias moleculares sugieren que una mayor estabilidad del mRNA de  $\gamma$ -zeína y/o una mayor velocidad de transcripción de éste pueden ser responsables de una mayor expresión de la proteína  $\gamma$ -zeína de 27 kDa en genotipos *o2* modificados (Geetha y col 1991; Or y col 1993). Wu y col (2010) bloquearon la expresión de  $\gamma$ -zeínas de 27 kDa en la línea de maíz CM105*mo2* mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi), encontrando que esta proteína juega un papel esencial en la modificación del endospermo en QPM, es decir, el RNAi causó la reversión del fenotipo vítreo de QPM a *opaco*.

Hallazgos similares fueron reportados por Yuan y col (2014) quienes utilizaron mutagénesis por radiación- $\gamma$  para identificar genes responsables de la modificación en la mutante *o2*, encontrando que una mutante en la línea QPM K0326Y mostró una pérdida de la expresión de las  $\gamma$ -zeínas de 27 y 50 kDa, así como una pérdida del fenotipo vítreo; los autores confirmaron el rol de la  $\gamma$ -zeína de 27 kDa en la formación de cuerpos proteínicos y la modificación del endospermo *o2*, sugiriendo que la  $\gamma$ -zeína de 50 kDa a pesar de ser menos abundante también pudiera estar implicada en dicha modificación.



**Figura 5.** Formación del endospermo vítreo en el maíz de calidad de proteínica. **(A)** Principales mecanismos sugeridos para la modificación del endospermo: incremento en el número de cuerpos proteínicos (PB) enriquecidos en  $\gamma$ -zeína 27 kDa que llenan los espacios entre los gránulos de almidón (SG); cambios en la composición y morfología de los gránulos de almidón que favorecen su compactación e interacción con PBs; ruptura de la membrana del amiloplasto que favorece las interacciones entre los gránulos de almidón y PBs. PL, fosfolípidos; NPC, carotenoides no polares. **(B)** Sección transversal de granos maduros de genotipos opaco-2 y QPM mostrando la extensión del endospermo vítreo. Tomada de González-Núñez y col (2023).

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

Para identificar otros factores involucrados en la formación del fenotipo vítreo, Gibbon y col (2003) realizaron un análisis proteómico del endospermo de las líneas de maíz casi isogénicas CM105+, CM105o2 y CM105mo2 (QPM), con la finalidad de investigar proteínas del tipo no-zeínas que pudieran contribuir a la modificación del endospermo en maíz QPM. Uno de los cambios más importantes encontrados en CM105mo2 fue el aumento en el contenido de la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSS). Se encontró que la amilopectina de CM105mo2 tiene ramificaciones más cortas con respecto al almidón normal y o2. Debido a esto, el almidón de QPM presenta una mayor expansión y los gránulos en el endospermo se asocian unos con otros. Los resultados de este estudio sugieren que regiones amorfas localizadas en la superficie de los gránulos de almidón permiten la interacción y unión de los gránulos entre sí en el endospermo QPM. Este mecanismo complementa el descrito anteriormente donde se indica que el incremento en cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -zeína (27 kDa) llena los espacios entre los gránulos de almidón, dando lugar al endospermo vítreo (Dannenhoffer y col 1995; Chandrashekar y Mazhar 1999).

El endospermo de maíz se caracteriza por tener una mezcla compleja de cuerpos proteínicos y gránulos de almidón, por lo que las características físicas del grano dependen de como interaccionan estos componentes. Las proteínas de almacenamiento también juegan un papel muy importante en la estructura física del grano maduro, ya que favorecen la asociación entre los gránulos de almidón y la matriz proteínica del endospermo, influenciando la dureza del grano. Por ejemplo, en los granos vítreos suele presentarse un mayor empaquetamiento, por lo que los espacios



intergranulares se llenan completamente (Gibbon y col 2003; Gibbon y Larkins 2005). Pereira y col (2008) observaron un mayor número de cuerpos proteínicos en granos de maíz con endospermo vítreo con respecto a los blandos, sugiriendo que eso favorece tener gránulos de almidón mayormente asociados y organizados. Estos resultados indican que la mayor resistencia física de los granos de maíz requiere de endospermos con un mayor contenido de proteína total, una mayor síntesis de  $\gamma$ -zeína de 27 kDa y cuerpos proteínicos, así como una adecuada organización de los gránulos de almidón sin importar su tamaño.

### **c Mecanismo asociado con la modulación de la composición de carotenoides en la envoltura del amiloplasto y la respuesta al estrés mediante el aumento de la disponibilidad energética**

Wang y col (2020) identificaron a *Ven1* como un QTL importante que influye en el fenotipo vítreo en el grano de maíz maduro. *Ven1* codifica para la enzima  $\beta$ -caroteno hidroxilasa 3, que modula la composición de carotenoides en la envoltura del amiloplasto. Ellos observaron que en el endospermo opaco existe un alelo *Ven1* disfuncional que disminuye el contenido de carotenoides polares y aumenta el contenido de carotenoides no polares en la envoltura del amiloplasto, lo que proporciona mayor estabilidad a esta estructura que en circunstancias normales desaparece durante la desecación del grano. La no disrupción de la envoltura del amiloplasto da como resultado una mala interacción entre los cuerpos proteínicos y los gránulos de almidón, lo que conduce a un endospermo blando (Figura 5A).

El desarrollo del endospermo  $\alpha 2$  implica una respuesta al estrés que reduce los niveles de energía y afecta a los procesos dependientes de ATP como la síntesis de proteínas tipo zeínas (Li y col 2020). Esto puede deberse a una reducción en la expresión del gen para piruvato fosfato dicinasa 1 (PPDK1), lo que afecta la glucólisis y la producción de energía. Holding y col (2008) y Holding y col (2011) identificaron varios genes regulados positivamente de manera diferencial en QPM, incluido fructosa-6-fosfato-1-fosfotransferasa dependiente de pirofosfato ( $\alpha$ -PFP), una enzima glucolítica no dependiente de ATP. Se propuso que la mayor actividad de  $\alpha$ -PFP en QPM compensa la menor disponibilidad de ATP en el endospermo  $\alpha 2$  (Guo y col 2012). Estos autores también identificaron una PPDK2 citosólica como una enzima glucolítica independiente de ATP. Li y col (2020) también encontraron que  $\alpha$ -PFP es un gen candidato para la modificación del endospermo en QPM e identificaron a la enolasa citosólica (ENO) como otra enzima glucolítica independiente de ATP. Por lo tanto, la mayor síntesis de enzimas que no requieren ATP para la glucólisis en QPM proporciona energía mediante un mecanismo que se encuentra reprimido en el endospermo  $\alpha 2$ .

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

Las investigaciones acerca de la modificación del endospermo en QPM han creado una oportunidad para entender de mejor manera esta característica. Sin embargo, hace falta más información acerca de cuáles son los genes específicos, su localización en los cromosomas, así como los mecanismos mediante los cuales se genera este

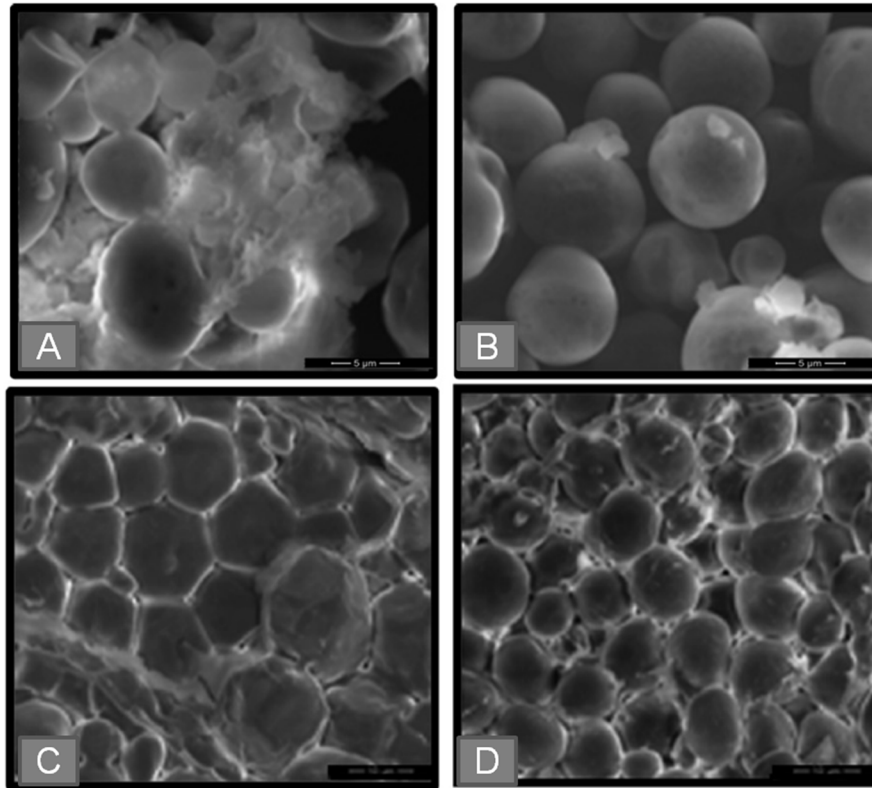
fenotipo. Una de las herramientas utilizadas para este fin es la identificación de *loci* genéticos asociados al fenotipo vítreo del endospermo que presenta QPM. Se han identificado marcadores moleculares ligados a *loci* asociados a la modificación de la dureza del grano (Gutiérrez-Rojas y col 2010). Holding y col (2008) en una progenie F2 identificaron 7 *loci* asociados a genes *mo2* los cuales explican el 75% de la variación fenotípica; dos de estos *loci* fueron localizados en los cromosomas 7 y 9 y tienen el mayor efecto en la dureza del endospermo (~40 % de la variación). Holding y col (2011) crearon una población de líneas recombinantes puras derivada de la cruce entre K0326Y QPM y W64Ao2 (*o2*), las cuales fueron caracterizadas para tres caracteres relacionados con la dureza del endospermo: vitrosidad, densidad y dureza. El mapeo genético en estas líneas confirmó los *loci* previamente identificados asociados con la modificación del endospermo en K0326Y QPM.

Jia y col (2013) realizaron un análisis de los perfiles de transcritos en la línea W64Ao2 respecto a su contraparte normal W64A+. Ambas líneas se cosecharon a 22 DDP. Dentro de los genes alterados en *opaco2* se encontraron los relacionados con el metabolismo de carbohidratos, incluyendo gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH), sorbitol deshidrogenasa 1 (SDH1), enolasa 1, entre otros. También se encontraron diferencias en la expresión de genes de biosíntesis de almidón, tal es el caso de almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), enzima desramificadora tipo pululanasa (Zpu1) y enzima ramificadora de almidón IIb (BEIIb). El análisis de GBSSI por PCR en tiempo real reveló una menor expresión de este gen en W64Ao2 con respecto a W64A+. En el caso de Zpu1 y SBEIIb, su expresión fue mayor en la línea opaco respecto al maíz de referencia. La regulación de estos genes podría relacionarse con la alteración de los patrones de ramificación de la amilopectina de los

gránulos de almidón en el maíz *opaco2*, lo cual podría estar contribuyendo a la generación del endospermo blando característico de W64Ao2.

Salazar-Salas y col (2014) evaluaron el efecto de estos *loci* genéticos sobre algunas propiedades fisicoquímicas del almidón, la acumulación de zeínas y de enzimas involucradas en la síntesis de almidón en el endospermo maduro de RIL contrastantes en vitrosidad derivadas de la cruce entre K0326Y QPM y W64Ao2. Se observó que las líneas vítreas presentaron una mayor acumulación de  $\gamma$ -zeína de 27-kDa, así como un mayor contenido de amilosa que se relacionó con una mayor expresión de la enzima responsable de su síntesis (GBSS). El almidón de las líneas vítreas también requirió menos energía para su gelatinización y presentó una menor cristalinidad, lo cual se asoció con una mayor compresibilidad de los gránulos adoptando formas poligonales y una mayor compactación (Figura 6).

Estos resultados sustentan la idea de que las modificaciones en la estructura de los cuerpos proteínicos y gránulos de almidón, así como su interacción, son muy importantes para la modificación del endospermo en QPM; la mayor acumulación de cuerpos proteínicos ricos en  $\gamma$ -zeína de 27-kDa permite llenar completamente los espacios entre los gránulos de almidón, los cuales presentan una mayor compactación y favorecen la creación del fenotipo vítreo.



**Figura 6.** Microscopía electrónica de barrido en gránulos de almidón aislados de endospermos maduros de muestras contrastantes en vitrosidad. (A-B) Gránulos de almidón de las líneas parentales K0326Y QPM y W64Ao2. (C-D) Gránulos de almidón de las líneas Q208 (vítreo) y O39 (opaco).

Tomada de Salazar-Salas y col (2014)

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 la expresión de los genes estudiados, destacando mayores niveles de transcritos del gen *Waxy-1* en líneas con endospermo vítreo; la enzima codificada por este gen (GBSSI) sintetiza la amilosa y su acumulación fue mayor en las líneas vítreas, lo cual correspondió con el mayor contenido de amilosa en estas líneas. Esto sugiere que la modificación del endospermo o2 está asociada con cambios en la expresión de genes de síntesis almidón a nivel transcripcional.

Recientemente Vega-Alvarez y col (2022) llevo a cabo un estudio de expresión de genes de síntesis de almidón en líneas QPM a 30 DDP, encontrando que los niveles de transcritos de *Wx1* fueron tres veces mayor en K0326Y QPM con respecto a W64Ao2 y ocho veces mayor en las líneas vítreas que en las opacas, lo que estuvo de acuerdo con la mayor acumulación de GBSSI y el mayor contenido de amilosa observado en las líneas vítreas. Por lo tanto, la síntesis de almidón con un mayor contenido de amilosa durante el desarrollo del grano podría facilitar el empaquetamiento de los gránulos de almidón, resultando en el endospermo vítreo del maíz QPM.

Wu y col (2015) evaluaron la actividad de la enzima pululanasa y almidón sintasa III (SSIII) en endospermo en desarrollo (18 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Los autores encontraron la línea vítrea K0326Y QPM tuvo una mayor abundancia y actividad de SSSIII comparado con la línea W64Ao2 (opaca). En el mismo sentido, observaron una mayor actividad de pululanasa en K032Y6 QPM con

respecto a W64Ao2. Además, encontraron una asociación positiva entre la actividad de la enzima pululanasa y la vitrosidad del grano, evidenciando que la pululanasa y SSIII juegan un papel muy importante en la conversión del endospermo de blando en la mutante o2 a vítreo en maíz QPM.

González-Núñez (2016) evaluó la actividad de enzimas de síntesis de almidón (GBSS, SS, SBE, AGPasa y PUL) en endospermo en desarrollo de las líneas de maíz K0326Y QPM y W64Ao2, encontrando diferencias significativas entre ambas líneas, las cuales correspondieron con los cambios en contenido y composición del almidón. Sin embargo, se requiere evaluar dichas actividades en un mayor número de líneas derivadas de la cruce entre K0326Y QPM y W64Ao2 para establecer de manera más robusta su asociación con las propiedades fisicoquímicas del almidón y el fenotipo vítreo del grano de maíz QPM. También es necesario confirmar mediante un sistema heterólogo si las variantes alélicas de las líneas parentales son responsables de los cambios en actividad y como consecuencia de los cambios en propiedades y vitrosidad del grano, lo cual nos permitirá entender de mejor manera los mecanismos involucrados en la modificación del endospermo en QPM.

## IV JUSTIFICACIÓN

Estudios previos con líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de la cruce entre K0326Y-QPM (vítreo) y W64Ao2 (opaco o blando) identificaron *loci* genéticos asociados con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica (QPM). Las líneas parentales presentan cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas del almidón, así como en la expresión y actividad de enzimas de síntesis de almidón, sugiriendo una asociación entre estos cambios y la formación del endospermo vítreo en maíz QPM. Sin embargo, es necesario incluir el análisis de expresión y actividad enzimática de RIL derivadas de la cruce entre K0326Y-QPM y W64Ao2 para demostrar dicha asociación. También es necesario confirmar si las variantes alélicas de las líneas parentales son responsables de los cambios en actividad mediante su expresión en un sistema heterólogo. Esta información nos permitirá una mejor comprensión de las bases moleculares que subyacen a la modificación del endospermo en el maíz QPM, facilitando con ello el desarrollo más rápido y eficiente de materiales de este tipo con buenas características agronómicas y que reúnan las recomendaciones de aminoácidos para la nutrición humana y animal.



## **V HIPÓTESIS**

La modificación del endospermo en el maíz de calidad proteínica está relacionada con cambios en la expresión génica y actividad de enzimas de síntesis de almidón durante el desarrollo del grano, los cuales a su vez se asocian con cambios en las propiedades fisicoquímicas y estructurales del gránulo que dan lugar a un fenotipo vítreo.

## **VI OBJETIVOS**

### **A OBJETIVO GENERAL**

Analizar cambios en la expresión y actividad de enzimas de síntesis de almidón relacionados con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica.

### **B OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar propiedades fisicoquímicas y estructurales del almidón en endospermo en desarrollo de las líneas de maíz K0326Y-QPM y W64Ao2, así como de líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruce y contrastantes en vitrosidad.
2. Determinar la abundancia de enzimas de síntesis de almidón en el endospermo en desarrollo de las líneas parentales y RIL contrastantes en vitrosidad.
3. Analizar la expresión de genes de síntesis de almidón en el endospermo en desarrollo de las líneas parentales y RIL contrastantes en vitrosidad.
4. Analizar la actividad de enzimas de síntesis de almidón (ADP glucosa pirofosforilasa, almidón sintasa unida al granulo, enzimas ramificadora y desramificadora) en el endospermo en desarrollo de las líneas parentales y RIL contrastantes en vitrosidad.
5. Determinar la secuencia de las variantes alélicas de genes de síntesis de almidón en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2.
6. Comparar la actividad de enzimas de síntesis de almidón codificadas por las variantes alélicas de las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2 expresadas en un sistema heterólogo.

## **VII MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A MATERIALES**

Se utilizaron las líneas de maíz K0326Y-QPM (endospermo vítreo) y W64Ao2 (endospermo blando), así como seis líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruce (Holding y col 2011). Las RIL fueron seleccionadas con base en el genotipo de marcadores que flanquean loci genéticos asociados con la modificación del endospermo en QPM. Las RIL vítreas son homocigotas para el alelo de K0326Y-QPM y las opacas son homocigotas para el alelo de W64Ao2. Estas líneas fueron cultivadas bajo condiciones de riego en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa durante el ciclo otoño-invierno 2019-2020. Se realizó una polinización controlada y se cosecharon granos en desarrollo a los 28 DDP. Los elotes se congelaron en nitrógeno líquido, se removieron los granos en desarrollo y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Una parte de los granos fue liofilizada para la obtención de harinas, que posteriormente se emplearon en el análisis del contenido de almidón.

### **B MÉTODOS**

#### **1 Determinación de almidón total**

El contenido de almidón total se determinó utilizando el kit de análisis de almidón total STA20 (Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA). A 50 mg de harina se le agregaron 5 ml de etanol al 80% y se incubó la mezcla por 5 min a 85°C. Posteriormente se le añadieron otros 5 mL de etanol al 80%, se mezcló y centrifugó a 1000 g por 10 min. Se tomó la pastilla y se repitió el proceso de lavado con etanol. Una vez lavada la

pastilla se le agregó 0.2 mL de etanol, mientras que en otro tubo vacío se agregó la misma cantidad de etanol para usarse como blanco. A la mezcla se le añadieron 3 mL de agua más 0.02 mL de alfa-amilasa y se incubó por 5 min a 60°C. Posteriormente se enfrió la mezcla y los tubos fueron aforados a 10 mL con agua destilada. De esta mezcla se tomó una alícuota de 1 mL y se mezcló con 1 mL de amiloglucosidasa incubándose a 60°C por 15 min en un baño metabólico. Posteriormente se ajustó el volumen hasta 10 mL con agua destilada y se tomó una alícuota de 1 mL a la cual se le agregaron 2 mL de glucosa oxidasa peroxidasa (GOP), dejando reaccionar a 37°C por 30 min y deteniendo con ácido sulfúrico 12 N. Finalmente se midió la absorbancia de la mezcla a 540 nm.

## **2 Aislamiento de gránulos de almidón**

Los gránulos de almidón se aislaron de granos de maíz en desarrollo según lo reportado por Vega-Álvarez y col. (2022). Los granos se remojaron en una solución de metabisulfito de sodio 0.3% (p/v) y ácido láctico al 85% (v/v) pH 3.8, por 48 h a 50 °C. El germen y el pedicelo fueron retirados de manera manual y los endospermos fueron macerados con un mortero y pistilo en presencia de amortiguador de extracción de almidón [Tris-HCl 50 mM pH 7, glicerol 10% (v/v), EDTA 10 mM, DTT 1.25 mM] a 4 °C. El homogenizado se pasó a través de un filtro de 100 µm y se centrifugó a 13,000 g por 15 min. El almidón obtenido se lavó dos veces con amortiguador de extracción, etanol al 95% y acetona fría, y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h.

### **3 Determinación de amilosa**

El contenido de amilosa se determinó usando la metodología de la ISO 6647:2020. Se lavaron 110 mg de almidón con 1 mL de metanol puro. Posteriormente se secó el almidón a temperatura ambiente y se pesaron 100 mg. Se le agregó 1 mL de etanol al 95 más 9 mL de NaOH 1 N. La mezcla se dejó en reposo 16-20 h. Posteriormente, el volumen de la mezcla se ajustó con agua destilada a un volumen de 100 mL, de la solución se tomaron 5 mL y se mezclaron con 1 mL de ácido acético 1 N y 2 mL de Yodo al 2%. La mezcla se dejó en reposo por 20 min a 37 °C en oscuridad y se midió la absorbancia a 620 nm.

### **4 Propiedades térmicas del almidón**

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

La temperatura pico de gelatinización ( $T_p$ ), la entalpía de gelatinización ( $\Delta H_g$ ) y la entalpía de retrogradación ( $\Delta H_r$ ) se obtuvieron del análisis realizado con el programa

TA Universal Analysis 2000 incluido con el equipo (TA Instruments). Se reporta el promedio de tres réplicas. El porcentaje de retrogradación se calculó con la siguiente fórmula:

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

## 5 Grado de hinchamiento

Se determinó de acuerdo con el método descrito por Vega-Álvarez y col. (2022). Se utilizaron 40 mg de harina, registrando el peso seco de la misma (S) con base en la humedad, la muestra se agregó a un tubo de 1.5 mL, se le agregó 1 mL de agua, se agitó fuertemente en vortex y se incubó por 30 min a 92.5°C en un termoagitador Compact (Eppendorf, Hamburg, Alemania) con agitaciones suaves por inversión (~20 veces/min y 2 veces por periodos de 1.5, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15 y 25 min). La muestra se colocó en un baño de agua (20°C, 3 min), agitando suavemente al tiempo cero y después de 1.5 min. Posteriormente se centrifugó (17,000 g, 10 min), se retiró el sobrenadante y se pesó la pastilla obtenida (B). El grado de hinchamiento se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

## 6 Distribución de la longitud de cadenas ramificadas de amilopectina

Se utilizó el procedimiento descrito por Chávez-Murillo y col (2012). El almidón (10 mg) se mezcló con 3.2 mL de agua desionizada y se gelatinizó calentando en un baño

de agua a ebullición durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la muestra se desramificó añadiendo 0.4 mL de acetato de sodio 0.1 mol/L (pH 3.5) y 5  $\mu$ L de isoamilasa (EC 3.2.1.68) (59 000 U/mg, Hayashibara Biochemical Laboratories, Japón) e incubando la mezcla a 40 °C durante 16 h. La actividad enzimática fue detenida por neutralización con 210  $\mu$ L de NaOH 0.2 M en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Posteriormente, la muestra se dejó enfriar por 5 min y se filtró en un tamaño de poro de 0.45 mm, finalmente se transfirieron 0.6 mL de la muestra filtrada a un vial-automuestreador para ser inyectada en el equipo. El almidón desramificado se analizó con un sistema de cromatografía iónica equipado con un detector de pulsos amperométricos (*Dionex* ICS 5000 con un auto muestreador *Dionex* AS-AP (Thermo Scientific Waltham Massachusetts, USA). Las columnas utilizadas fueron *Carbopac* PA200 de 3x250 mm y 3x50 mm. Se utilizaron dos fases móviles (eluyente A y eluyente B), el eluyente A se realizó a base de hidróxido de sodio 150 mM y el eluyente B con hidróxido de sodio y acetato de sodio 500 mM. El flujo utilizado fue de 0.5 mL/min con un gradiente de concentración A:B de 95:5% durante 5 min, 60:40% a los 18 min, 15:85% a los 55 min y 95:5% a los 75 min. Los datos se analizaron con el software Chromeleon 6.80 (Thermo Scientific, MA, EE. UU.). La distribución de las longitudes de cadena se determinó como un porcentaje del área total del pico.

## **7 Acumulación de proteínas asociadas al gránulo de almidón**

### **a Extracción de proteínas asociadas al gránulo**

Las proteínas asociadas al gránulo (PAG) se extrajeron usando el método reportado por Grimaud y col (2008) con algunas modificaciones. El almidón (150 mg)

se lavó con agua fría, amortiguador de gelatinización [Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v)] y etanol 95% (v/v) para remover proteínas superficiales; las muestras de almidón fueron incubadas con amortiguador de gelatinización por 15 min en un baño maría en ebullición para la liberación de las PAG. Inmediatamente después la pasta formada fue congelada por 1 h a -20 °C, descongelada por 20 min a 40 °C en un baño maría y centrifugada a 13,000 g por 30 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 30% en acetona para la precipitación de las proteínas por al menos 2 h a -20 °C. Después de centrifugar durante 15 min a 4 °C y 13,000 g, la pastilla obtenida de PAG se lavó dos veces con acetona fría y se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Las proteínas se resuspendieron en un amortiguador de tiourea [Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM, Triton-X100 0.2% (v/v)].

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

La separación de proteínas se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). Se utilizó una unidad electroforética CBS intermedia (CBS Scientific, CA, EUA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, EUA). Extractos de proteínas equivalentes a 8 y 21 mg de almidón se mezclaron con un amortiguador de carga [Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), SDS 2% (p/v), glicerol 25% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0.01%] y después se aplicaron en los pozos de geles de poliacrilamida al 10% (p/v) para su separación a voltaje constante (100 V) por aproximadamente 8 h. Las proteínas se visualizaron por tinción con una



solución de azul brillante de Coomassie R-250 0.25% (p/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) en metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Las imágenes de los geles se adquirieron con un sistema de fotodocumentación XRS (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA). El contenido relativo de las diferentes proteínas asociadas al gránulo se estimó por triplicado mediante un análisis densitométrico utilizando el programa Quantity One (BioRad, Hércules, CA, EUA). La identidad de las proteínas se reportó previamente por Vega-Alvarez y col (2022).

## **8 Expresión de genes de síntesis de almidón**

### **a Extracción de ARN**

Se utilizó la metodología de Holding y col (2008) con algunas modificaciones. El ARN total se aisló de endospermos en desarrollo (28 DDP). Aproximadamente 0.1 g de tejido de endospermo se molió en 200  $\mu$ L de amortiguador de extracción de ARN [Tris-HCl 50 mM (pH 8), LiCl 150 mM, EDTA 5 Mm (pH 8), SDS 10% (p/v)] y la molienda continuó mientras se añadían 200  $\mu$ L de fenol/cloroformo (1:1) pH 8. El homogeneizado se mezcló, se colocó por 5 min en hielo y la fase acuosa se separó por centrifugación (13,000 g, 10 min, 4 °C). El almidón se eliminó utilizando 1 mL del reactivo trizol (Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo (1:1) y la mezcla se centrifugó (10,000 g, 10 min, 4 °C). Los ácidos nucleicos se precipitaron de la fase acuosa con 1 volumen de isopropanol y se recuperaron por centrifugación (10,000 g, 10 min, 4 °C); la pastilla obtenida se lavó con etanol (70%) y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua tratada con DEPC. El ADN contaminante se eliminó utilizando el Kit DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.).

## **b RT-qPCR**

Para el análisis de expresión se utilizaron aproximadamente 20 ng de ARN en conjunto con el kit SCRIPT One-Step RT-PCR (Jena Bioscience, California, EE. UU.). Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores fueron reportadas previamente por diferentes autores (Huang y col 2011; Jia y col 2013) (Cuadro 7). La amplificación se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Carlsbad, EE. UU.) utilizando las siguientes condiciones: 30 min a 50 °C para la síntesis de ADNc, luego 95 °C durante 5 min (desnaturalización), seguido de 40 ciclos a 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min) con una rampa de 2.2 °C/s. Los niveles de expresión relativa de los genes se calcularon utilizando el método de doble delta ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ); el gen RRb1 (proteína 1 del retinoblastoma) se utilizó como control interno y K0326Y-QPM se utilizó como muestra de referencia para la cuantificación relativa. Para cada uno de los genes se realizó el análisis de la curva de fusión para evaluar la especificidad de los productos amplificados.

## **9 Actividad de enzimas de biosíntesis de almidón**

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

Se usó la metodología reportada por Nishi y col (2001) con algunas modificaciones. Se tomaron 0.5 g de endospermo en desarrollo (28 DDP) y se maceraron en un mortero (0 - 4 °C) empleando 2 mL de amortiguador de extracción frío [HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.2), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, glicerol 12.5% (v/v)]. El macerado se centrifugó a 15,000 g por 15 min a 2 °C y el sobrenadante resultante se recolectó y se consideró como el extracto enzimático.

**Cuadro 7.** Oligonucleótidos iniciadores empleados para RT-qPCR.

<b>Nombre del gen</b>	<b>Secuencia del oligonucleótido</b>
<i>Brittle2 (Bt2)</i>	F: ATTACCGTTGCTGCCCTACC R: ACTGCTCTCCTTTTCGGTTTCTC
<i>Waxy1 (Wx1)</i>	F: GAGGACGTCGTGTTTCGTCTG R: CAGTTGATCTTCCGGCCTTC
<i>Amylose extender 1 (Ae1)</i>	F: CCGACGCTGGACTATTTGGT R: GCAACGAAGTACCCCGCTATC
<i>Pullulanase (Zpu1)</i>	F: GCTTCAGTTGCATCCAGTGC R: TGGGCAACGTCTTATTCAATC
<i>Retinoblastoma related-protein 1 (RRB1)</i>	F: GCTGTTTCTGGTTATGTCTGTCCT R: CTTTTGAGTACTTCTGTGCCTGAC

F: Forward (directo), R: Reverse (inverso). (Huang y col 2011; Jia y col 2013)

Para determinar la actividad primeramente se llevó a cabo una incubación a 30 °C por 20 min mezclando 150 µL de solución de reacción (HEPES-NaOH 100 mM (pH 7.4), 3-fosfoglicerato 3 mM, ADP-glucosa 1.2 mM, pirofosfato de sodio 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 4 mM) y 100 µL de la dilución del extracto enzimático. La mezcla de reacción se detuvo colocando la mezcla en agua en ebullición por 2 min. Después se agregaron 350 µL de agua destilada y se centrifugó a 15,000 g por 10 min a 2 °C. Se tomaron 500 µL del sobrenadante, se mezclaron con 0.15 mg de NADP<sup>+</sup>, 0.4 U de fosfoglucomutasa (Sigma, P3397) y 0.5 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tipo XV, Sigma G6378), seguido de incubación a 30 °C por 30 min. La actividad enzimática se registró como el aumento de absorbancia a 340 nm.

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

#### **b Almidón Sintasa Unida al Gránulo (GBSS )**

Primeramente se realizó una extracción a partir de los endospermos de maíz en desarrollo siguiendo la metodología descrita por Umemoto y Terashima (2002) y Lee y col (2014) con algunas modificaciones. Una muestra de 0.5 g de endospermo se maceró manualmente con 2 mL de amortiguador de extracción en frío [Tris 100 mM, pH 7.2, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, etilenglicol 10% (v/v)]; el macerado se recolectó en tubos de 15 mL, se lavó el mortero con 1 mL de amortiguador y se mezcló en el mismo tubo. El homogenizado se centrifugó a 15,500 g por 30 min a 2 °C. La pastilla se lavó

tres veces con 3 mL de amortiguador de extracción a 15,500 g /10 min a 2 °C. La pastilla obtenida se suspendió en 3 mL de amortiguador de extracción y se utilizó para evaluar la actividad. Se mezclaron 150 µL del extracto enzimático de GBSSI con 150 µL de solución A (HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.4), ADP glucosa 1.6 mM, 0.7 mg de amilopectina, DTT 15 mM) y se incubó a 30 °C durante 1 h. La reacción se detuvo colocando la mezcla en un baño con agua hirviendo durante 30-40 s y luego se incubó en hielo durante 10 min. Después, a la mezcla se le añadieron 100 µL de solución B [HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.4), fosfocreatina 10 mM, KCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 5 U de creatina fosfoquinasa (Tipo I)] y se incubó a 30 °C durante 30 min. El ADP producido por la reacción de la GBSSI se convirtió en ATP y la solución resultante se calentó en un baño con agua hirviendo durante 30-40 s, seguido de incubación en hielo durante 10 min y después se centrifugó a 17,000 g durante 25 min a 2 °C. El sobrenadante (0.3 mL) se mezcló con 300 µL de solución C (HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.4), glucosa 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NADP<sup>+</sup> 2 mM). La actividad de GBSSI se midió como el aumento de absorbancia a 340 nm después de la adición de 1.4 U de hexocinasa (*Sacharomyces cerevisiae*, Sigma H6380) y 0.35 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tipo XV, Sigma G6378) a 25 °C durante 30 min.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y la actividad de la GBSSI se expresó en unidades internacionales (UI), µmoles de NADPH producido por minuto. Para el análisis se utilizó un control negativo en el cual se utilizaron 150 µL del extracto enzimático desnaturalizado en agua hirviendo por 40 s e incubado en hielo por 10 min. Se utilizó como blanco una mezcla conteniendo 150 µL de amortiguador de extracción en lugar de los 150 µL del extracto enzimático.

### **c Enzima ramificadora de almidón (SBE)**

Se siguió la metodología reportada por Yamanouchi y Nakamura (1992) y Lee y col (2014) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 0.5 g de endospermo en desarrollo (28 DDP) y se maceraron con 2.5 mL de amortiguador de extracción frío [HEPES-NaOH 50 mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, glicerol 12.5%(v/v)]. El macerado se centrifugó a 17,000 g por 25 min a 2 °C y el sobrenadante se filtró (0.45 µm, Whatman). Los filtrados se tomaron como el extracto enzimático para evaluar la actividad.

La actividad enzimática se determinó monitoreando la estimulación de la síntesis de α-glucano a partir de glucosa-1-fosfato por una fosforilasa de músculo de conejo (Hawker y col 1974). Una alícuota de 100 µL del filtrado se mezcló con 100 µL de solución de reacción (HEPES-NaOH 50 mM pH 7.0, glucosa-1-fosfato 50 mM, AMP 2.5 mM, 1.2 U de fosforilasa a de músculo de conejo, Sigma P1261) fría e inmediatamente se incubó a 30 °C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de HCl 1 M y se mezcló con 500 µL de DMSO. Posteriormente, se agregaron 700 µL de una solución de yodo-potasio y yoduro (KI 120 mM, I<sub>2</sub> 8 mM) y a continuación se incubó a 30 °C durante 30 min en la oscuridad. La actividad de SBE se determinó usando la absorbancia a 540 nm.

La actividad de la enzima ramificadora se expresó como µmol por minuto (UI). Para el análisis se usó un control negativo conteniendo 100 µL del filtrado enzimático desnaturalizado con 50 µL de HCl 1M. Como blanco se utilizaron 100 µL de amortiguador de extracción en lugar de los 100 µL del filtrado enzimático.

#### **d Enzima pululanasa (PUL)**

Primeramente se llevó a cabo una extracción de acuerdo con lo reportado por Wu y col (2015) con algunas modificaciones. Se pesaron y se molieron endospermos en desarrollo (28 DDP) hasta obtener un polvo fino en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. Por cada mg de polvo fino se añadieron 2  $\mu$ L de amortiguador de extracción frío (Tris-Acetato 50 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM, DTT 5 mM), se mezcló por suspensión por 2 min y se centrifugó a 16,000 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína colorimétricamente usando el método de Bradford (1976). Se diluyó la concentración de proteína con amortiguador de acetato de sodio (200 mM pH 5) a 1  $\mu$ g/ $\mu$ L.

Para medir la actividad se usó el kit Red-pullulan (Megazyme, Wicklow, Ireland). La solución diluida de proteína y la solución de red-pullulan (2% p/v, KCl 0.5 M) se pre-equilibraron a 40 °C por 5 min. Posteriormente se mezclaron 500  $\mu$ L de solución de proteína con 250  $\mu$ L de solución de red-pullulan. Rápidamente se pusieron en incubación a 40 °C por 10 min. La reacción se detuvo añadiendo 1.25 mL de etanol al 95 % seguido de un mezclado en un vortex por 10 s. Se dejó en reposo por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1,000 g por 10 min y se utilizó el sobrenadante para medir la absorbancia a 510 nm. La actividad se determinó usando la siguiente ecuación proporcionada por el Kit:

$$\text{Unidades / mL} = 906 \times \text{Abs} + 17$$

Los resultados se expresaron finalmente como como UI/gramo de peso fresco (g PF) donde cada unidad correspondió a la cantidad de enzima requerida para liberar un  $\mu$ mol de D-glucosa en equivalentes de azúcar reductor por minuto.

## **10 Secuenciación y obtención de variantes alélicas del gen *Ae1***

### **a Síntesis de cDNA**

El cDNA se sintetizó con el kit Go Script™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). En un tubo se colocaron 8 µL del RNA tratado con DNAsa I (1 U/µL), se agregó 1 µL de primer oligo (dT) 15 (500 µg/mL), seguido de incubación por 5 min a 70 °C y luego en hielo durante 5 min; la muestra se centrifugó por 10 s y se dejó en hielo.

La mezcla de reacción para la transcripción reversa consistió en 4 µL de amortiguador de reacción 5X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL 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). Esta mezcla se combinó con la anterior para un volumen final de 20 µL, se incubó a temperatura ambiente por 5 min (alineamiento), luego se incubó de nuevo a 42 °C por 50 min (extensión) y finalmente se inactivó la RT calentando la mezcla a 70 °C por 15 min; la muestra de cDNA se guardó a -20 °C hasta su uso.

### **b Diseño de oligos iniciadores y amplificación de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Primeramente, se obtuvieron de la base de datos del genoma del maíz (<http://www.maizegdb.org/>) las secuencias de cDNA para genes de síntesis de almidón de la línea de maíz B73. Estas secuencias se utilizaron para diseñar oligonucleótidos iniciadores que fueron utilizados para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las secuencias de los genes de síntesis de almidón en las líneas K0326Y-QPM y W64A02 (Cuadro 8). Se utilizó el programa Primer-BLAST



(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La amplificación por PCR de cada uno de los fragmentos de los genes se realizó según lo reportado por Vega-Alvarez y col (2022). La mezcla de reacción consistió en 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción de PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 0.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.6  $\mu\text{L}$  de dNTPs (100  $\mu\text{M}$ ), 1 U de Taq ADN polimerasa, 0.25  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos iniciadores (25  $\mu\text{M}$ ) y agua desionizada estéril en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Se utilizó un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, CA, USA) con la siguiente programación: 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a X °C (unión de iniciadores) (Cuadro 8) y 1 min a 72 °C (extensión), con un período final de extensión de 5 min a 72 °C (Pineda-Hidalgo y col 2011). La separación de los amplicones se realizó en geles de poliacrilamida (15%, p/v) usando como amortiguador de corrida TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM). La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se digitalizó bajo luz UV con un fotodocumentador Chemidoc XRS (BIO-RAD, CA, USA).

**Cuadro 8.** Oligonucleótidos iniciadores usados para secuenciar el gen *Ae1*.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Temperatura de alineamiento (°C)</b>	<b>Inicio</b>	<b>Fin</b>	<b>pb</b>
Ae1-F1	GTAGCCCTGCAGTCA	52	1	644	644
Ae1-R644	CCCATTCTCGATATGTGATAC				
Ae1-F571	GGAAGCCTTCTCCCGTAGTTA	58	571	1106	536
Ae1-R1106	ATGAGTGCTCTTGGATTGCCA				
Ae1-981F	AGCCCGGAACCGAAGATAAA	58	981	1649	669
Ae1-1649R	ACCTACCCACCATCGTGAA				
Ae1-1627F	CTGTTACGATGGTGGGGTA	58	1627	2403	777
Ae1-2403R	TATCATGCGAACAGTCGGCG				
Ae1-2024F	CCAAGAGGTCCGCAAAGACT	58	2024	2743	720
Ae1-2743R	CAAACAATCAGCCATCAAGCA				

F: Forward (directo); R: Reverse (inverso); Pb: Pares de bases

### **c Secuenciación del gen *Ae1***

Las secuencias del gen *Ae1* se obtuvieron a partir de los fragmentos amplificados por PCR con oligonucleótidos correspondientes a la línea B73. Se purificaron los fragmentos con el kit UltraClean 15 DNA Purification (MO BIO, California, USA). Se corrieron los fragmentos en un gel de agarosa al 2% (p/v), se cortaron las bandas del gel y se colocaron en tubos de 1.5 mL. Se les agregó una solución caotrópica (NaI) (0.3 mL/0.1 g de agarosa) y se incubaron a 55 °C por 5 min. Luego se les agregaron 12 µL de una solución 50:50 de silica y buffer, seguido de agitación (5 min) y centrifugación durante 5 min. Para eliminar posibles residuos de agarosa y mantener el ADN ligado a la silica, la pastilla se resuspendió en 1 mL de etanol al 50% y la mezcla se centrifugó nuevamente. La pastilla obtenida se resuspendió en 25 µL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril, se centrifugó (10,000 g, 1 min) y el sobrenadante se almacenó a -20 °C.

Las secuencias de los fragmentos del gen *Ae1* purificados se obtuvieron mediante un servicio externo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos. Se utilizó el método de terminación de cadena (Sanger y col 1977).

## **11 Expresión de las variantes alélicas del gen *Ae1* en sistema heterólogo y evaluación de la actividad de las enzimas SBELLb recombinantes**

### **a Transformación de *E. coli* BL21**

La transformación de *E. coli* BL21 se realizó siguiendo el protocolo indicado por Sambrook y col (1989). Primeramente, se hicieron células competentes para lo cual se

descongeló un vial de *E. coli* BL21, se cultivó toda la noche a 37 °C en medio BHI sin antibiótico, posteriormente se realizó un subcultivo en 50 mL de medio BHI, se incubó a 37°C hasta que las bacterias alcanzaron una densidad óptica de 0.4-0.6 a 600 nm. El cultivo se transfirió a tubos de 15 mL y se dejaron enfriar en hielo durante 10 min, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 250 µL de solución MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM-20 mM), luego se añadieron 10 mL de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM-20 mM), la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 250 µL de la solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M fría, posteriormente se transfirió el volumen completo a tubos de 1.5 mL, se agregaron 500 µL de la solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M fría y se incubaron en hielo durante 1 h. Finalmente, se tomaron alícuotas de 200 µL de las células competentes y se almacenaron a -80°C. Para la transformación se utilizó el vector pET-29a(+) conteniendo alguna de las secuencias del gen *Ae1* que codifica para la enzima ramificadora de almidón SBE11b en el endospermo de maíz. Se utilizaron dos constructos sintetizados por ProteoGenix (<https://www.proteogenix.science/>) a partir de las secuencias de cDNA obtenidas para las variantes del gen *Ae1* en las líneas K0326Y QPM y W64A $\alpha$ 2. A 200 µL de células competentes se le agregaron 20 µL del constructo, se homogeneizó la mezcla y se incubó en hielo durante 30 min. Los tubos se transfirieron a baño maría a 42°C durante 1.5 min, e inmediatamente se colocaron en hielo por 2 min. Posteriormente se agregaron 800 µL de medio BHI sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante 45 min. Por último, las células transformadas se sembraron en medio TSA suplementado con kanamicina a 100 mg/mL. El cultivo se dejó creciendo toda la noche a 37°C para realizar la selección de colonias transformantes al día siguiente.

## **b Análisis de transformantes**

Se llevó a cabo la selección de colonias transformadas una vez que se observó crecimiento en las placas Petri, tomando algunas colonias al azar con un asa bacteriológica de siembra y se cultivaron en 5 mL de medio SOB suplementado con kanamicina (100 mg/mL) durante toda la noche. Posteriormente, se obtuvo la biomasa centrifugando el cultivo a 14,000 rpm durante 5 min. Se realizó la extracción del ADN recombinante mediante el protocolo de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina (Birnboim 1983). La biomasa se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución I fría [Glucosa 50 mM, EDTA 10 Mm, Tris 25 mM (pH 8)] mediante vórtex y se transfirió a un tubo de 1.5 mL libre de nucleasas. Se adicionaron 400  $\mu$ L de solución II (NaOH 0.1 M, SDS 1%), se homogenizó siete veces por inversión y se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 300  $\mu$ L de solución III fría para la neutralización [Acetato de potasio 3 M-ácido acético (pH 4.8)], la mezcla se homogeneizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 600  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló y se dejó reposando por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con etanol al 70% (v/v) centrifugando 10 min a 14,000 rpm y decantando el sobrenadante. Por último, se dejó secando la pastilla a temperatura ambiente, se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se visualizó la calidad de la extracción mediante un gel de agarosa al 1% y se comparó el tamaño molecular del plásmido. A partir del ADN plasmídico se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción BglI usando la metodología del fabricante (Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Se

visualizaron los productos de la digestión en geles de agarosa al 1.5% y se analizaron los pesos moleculares para confirmar la correcta transformación.

### **c Expresión, purificación y actividad de la proteína recombinante**

La expresión de pET-29a(+)-Ae1 se realizó transfiriendo 500  $\mu$ L del cultivo de *E. coli* BL21 transformada. El cultivo se propagó toda la noche a 37 °C, posteriormente se transfirió 1 mL a 100 mL de medio SOB suplementado con 100  $\mu$ g/mL de kanamicina y se incubó a temperatura ambiente con movimiento constante. Se monitoreó la densidad óptica hasta que esta alcanzó un valor de 0.4-0.6. Se adicionaron 230  $\mu$ L de isopropil- $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG) para la inducción de la expresión recombinante y la obtención de una concentración final de 1 mM de IPTG en el medio. El cultivo se mantuvo en agitación constante por 7 horas. La biomasa obtenida fue almacenada a -20 °C hasta su procesamiento. Para la extracción de las proteínas se llevó a cabo la solubilización de los cuerpos de inclusión para lo cual las biomásas recolectadas se resuspendieron en 1 mL de buffer de extracción pH 8 [buffer PBS (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 30 mM), 1% de NaCl, inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM, Bestatin 2 mM, E-64 0.3 mM) y lisozima 1%], la mezcla se sonicó [3s, intensidad 3, amplitud 20, pulsos 2] y se centrifugó a 14000 g por 10 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se mezcló con cloruro de guanidinio 5M y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna quelante HiTrap™ HP (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU) usando la metodología descrita por el fabricante. Para visualizar la proteína purificada se separó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente la proteína en el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-ECL™ Amersham Bioscience, Reino Unido). La membrana se bloqueó con leche descremada

al 5% (Svelty, Nestle®) y se incubó con un anticuerpo anti-His 6X (Sigma, SAB4301134), seguido de IgG de cabra anti-conejo conjugada con HRP (Sigma) como anticuerpo secundario. La actividad de las enzimas SBEIIB recombinantes se determinó como se describió previamente para el endospermo (Lee y col 2014) usando 80 µg del extracto purificado.

## **12 Análisis estadístico**

Las evaluaciones se realizaron por triplicado y los resultados de las características evaluadas se analizaron mediante un ANOVA unifactorial completamente al azar, tomando como factor la línea de maíz utilizada y como variables de respuesta la composición de almidón, las propiedades térmicas, distribución de longitud de cadenas ramificadas de amilopectina, la expresión de genes de síntesis de almidón, así como las actividades enzimáticas. Se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba de Fisher (LSD) con un  $\alpha=0.05$ . Se utilizó una prueba t-student para la comparación del promedio de longitud de ramificaciones de amilopectina entre líneas vítreas y opacas. Todos los análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurión versión 15.2.06 (Stat Point Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA).

## VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A COMPOSICIÓN, PROPIEDADES TÉRMICAS Y DISTRIBUCIÓN DE LONGITUD DE CADENAS DE AMILOPECTINA DEL ALMIDÓN EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD

#### 1 Contenido y composición del almidón

El contenido de almidón total y sus componentes en el endospermo en desarrollo (28 DDP) de las líneas de maíz QPM se muestran en el Cuadro 9. El contenido de almidón varió de 50.8 a 53 g/100 g de harina, siendo la línea 21 con endospermo vítreo la que presentó el valor más bajo y la opaca 73 la que mostró el valor más alto. En el caso de las líneas parentales no se observaron diferencias significativas en el contenido de almidón, lo que corresponde con lo observado por Vega-Alvarez y col (2022) en las mismas líneas a 30 DDP y por Pereira y col (2008) al comparar la mutante *opaco-2* y una línea de maíz QPM a 30 DDP. Sin embargo, las RIL opacas mostraron valores significativamente más altos que las líneas vítreas (Cuadro 9).

Estos resultados sugieren que las RIL opacas presentan un estado de desarrollo más avanzado que las vítreas a los 28 DDP y por ende una mayor acumulación de almidón. Sin embargo, después de los 30 DDP normalmente no se observan diferencias en el contenido de almidón entre líneas opacas y vítreas (Vega-Alvarez y col 2022). Este comportamiento también fue observado por Juárez-García y col (2013) al comparar maíces con endospermo vítreo y harinoso a los 20 y 50 DDP. Otros autores han reportado un mayor contenido de almidón en maíces con endospermo harinoso (Dombrink-Kurtzman y Knutson 1997; Zhang y Xu 2019), pero esta asociación no es clara al menos en maíces QPM.



**Cuadro 9.** Contenido y composición de almidón de endospermo en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.

<b>Línea de maíz</b>	<b>Almidón (g/100 g harina)</b>	<b>Amilosa (g/100 g almidón)</b>	<b>Amilopectina (g/100 g almidón)</b>
K0326Y-QPM (V)	52.2 ± 0.3 <sup>bc</sup>	20.6 ± 0.4 <sup>bc</sup>	79.4 ± 0.4 <sup>cd</sup>
W64A $\sigma$ 2 (O)	52.8 ± 0.4 <sup>ab</sup>	18.3 ± 0.4 <sup>d</sup>	81.7 ± 0.4 <sup>b</sup>
21 (V)	50.8 ± 0.2 <sup>e</sup>	22.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	77.6 ± 0.3 <sup>e</sup>
305 (V)	51.5 ± 0.2 <sup>cd</sup>	21.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	78.9 ± 0.7 <sup>d</sup>
346 (V)	51.3 ± 0.5 <sup>de</sup>	19.7 ± 0.6 <sup>c</sup>	80.3 ± 0.6 <sup>c</sup>
55 (O)	52.6 ± 0.4 <sup>ab</sup>	16.2 ± 0.9 <sup>e</sup>	83.4 ± 0.9 <sup>a</sup>
73 (O)	53.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	16.5 ± 0.4 <sup>e</sup>	83.5 ± 0.4 <sup>a</sup>
123 (O)	52.9 ± 0.3 <sup>ab</sup>	16.9 ± 0.5 <sup>e</sup>	83.1 ± 0.5 <sup>a</sup>

V: Muestras vítreas con el genotipo correspondiente a K0326Y-QPM; O: Muestras opacas con el genotipo correspondiente a W64A $\sigma$ 2. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher.

En cuanto a la composición del almidón, el contenido de amilosa varió de 16.2 a 22.4 g/100 g de almidón, siendo la línea vítrea 21 la que presentó el valor más alto mientras que las tres líneas opacas mostraron los valores más bajos. El contenido de amilopectina se obtuvo restando del almidón total el contenido de amilosa (77.6-83.5 g/100 g de almidón), por lo que la línea vítrea 21 presentó el menor valor y las líneas opacas los valores más altos de este polisacárido ramificado.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Vega-Alvarez y col (2022) quienes también reportaron mayor contenido de amilosa en líneas vítreas QPM a 30 DDP. Estos resultados también corresponden con lo reportado en grano maduro por Salazar-Salas y col (2014), quienes observaron una mayor proporción de amilosa en las líneas vítreas, lo cual se asoció con almidón menos cristalino y gránulos más compactos con formas angulares. En otro estudio realizado por Xu y col (2019) también se mostró un mayor contenido de amilosa y almidón menos cristalino en el endospermo vítreo de granos maduros de cinco líneas endogámicas de maíz normal, lo que indica un papel importante de la amilosa en la formación del fenotipo vítreo. Estos estudios respaldan la relación entre un mayor contenido de amilosa y la vitrosidad del endospermo, lo que a su vez concuerda con los hallazgos de Robutti y col (2000) quienes reportaron una correlación positiva entre el contenido de amilosa y la dureza del grano.

## **2 Propiedades térmicas del almidón**

Las propiedades térmicas del almidón en líneas QPM a 28 DDP se muestran en el Cuadro 10. La temperatura pico de gelatinización ( $T_p$ ) presentó un rango estrecho de 69.5-70.8 °C. Se ha reportado que dicho parámetro es importante para determinar

**Cuadro 10.** Propiedades térmicas del almidón de endospermo en desarrollo de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.

Línea de maíz	Tp (°C)	$\Delta H_g$ (J/g)	R (%)	GH (g/g almidón)
K0326Y-QPM (V)	70.6 ± 0.2 <sup>ab</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>d</sup>	46.3 ± 3.9 <sup>b</sup>	13.6 ± 0.4 <sup>c</sup>
W64Ao2 (O)	69.9 ± 0.2 <sup>c</sup>	12.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	33.4 ± 2.1 <sup>c</sup>	14.7 ± 0.5 <sup>ab</sup>
21 (V)	69.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	6.5 ± 0.2 <sup>f</sup>	59.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	13.5 ± 0.2 <sup>cd</sup>
305 (V)	70.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.2 <sup>f</sup>	45.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	12.9 ± 0.4 <sup>de</sup>
346 (V)	69.5 ± 0.1 <sup>d</sup>	7.9 ± 0.5 <sup>e</sup>	46.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	12.5 ± 0.2 <sup>e</sup>
55 (O)	69.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	11.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	33.6 ± 1.1 <sup>c</sup>	14.7 ± 0.3 <sup>b</sup>
73 (O)	69.9 ± 0.5 <sup>c</sup>	10.9 ± 0.5 <sup>bc</sup>	32.3 ± 4.2 <sup>c</sup>	15.3 ± 0.3 <sup>a</sup>
123 (O)	70.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	30.3 ± 3.1 <sup>c</sup>	15.2 ± 0.6 <sup>ab</sup>

V: Muestras vítreas con el genotipo correspondiente a K0326Y-QPM; O: Muestras opacas con genotipo correspondiente a W64Ao2. Tp: Temperatura pico de gelatinización;  $\Delta H_g$ : Entalpía de gelatinización; R: Retrogradación; GH: Grado de hinchamiento. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las medias de acuerdo con la prueba de Fisher.

las variables de cocimiento, ya que maíces con mayor  $T_p$  se podrían utilizar para elaborar productos que requieran altas temperaturas durante su procesamiento (Raguzzoni y col 2013). La entalpía de gelatinización mostró un rango de 6.5-12.3 J/g, siendo la línea vítrea 21 la que obtuvo el menor valor y la línea parental opaca W64Ao2 la que presentó el valor más alto. En general, las líneas opacas presentaron valores significativamente superiores a las líneas vítreas, lo cual corresponde con el mayor contenido de amilopectina de estas líneas (Cuadro 9). La entalpía de gelatinización se ha empleado como una medida general de la cristalinidad (tanto en calidad como en cantidad de cristales) y como un indicador de la pérdida de orden molecular en el gránulo. Este proceso implica la disociación de las dobles hélices que constituyen la estructura cristalina de la amilopectina cuando hay un exceso de agua presente (Tester y Morrison 1990; Cooke y Gidley 1992). Lo anterior podría explicar la mayor energía registrada en las líneas con mayor contenido de amilopectina (Cuadro 9) y la correlación positiva observada entre estas propiedades ( $r = 0.81$ ,  $p < 0.001$ ). Resultados similares también fueron observados por Salazar-Salas y col (2014) y Wu y col (2015) en el endospermo maduro de maíz.

La retrogradación es un indicador del re-arreglo estructural de las moléculas de almidón en un tiempo determinado. Se obtuvo un rango de 30.3-59.9 % y de manera general las líneas vítreas presentaron valores significativamente superiores respecto a las líneas opacas (Cuadro 10). La retrogradación se atribuye principalmente a la amilosa como resultado de la interacción de sus cadenas lineales mediante puentes de hidrógeno, lo cual forma una malla que crece o aumenta de espesor conforme avanza el tiempo de almacenamiento (Chung y Liu 2009; Yu y col 2009), por lo que a

mayor contenido de amilosa mayor retrogradación, lo que concuerda con lo observado en el presente estudio ya que las líneas vítreas presentaron mayor contenido de amilosa y porcentaje de retrogradación, observándose una correlación positiva entre estos dos parámetros ( $r = 0.89$ ,  $p < 0.001$ ). Este comportamiento también fue observado por Juárez-García y col (2013) al reportar un mayor porcentaje de retrogradación en un maíz vítreo con respecto a un maíz harinoso.

En cuanto al parámetro de grado de hinchamiento, este permite estimar la capacidad de retención de agua del almidón gelatinizado. El rango obtenido para este parámetro fue de 12.5-15.3 g/g almidón, siendo las líneas opacas las que mostraron valores superiores con respecto a las vítreas, lo cual se asoció con una correlación negativa con el contenido de amilosa ( $r = -0.738$ ,  $p < 0.001$ ). Esto concuerda con el hecho de que la distribución asimétrica de la amilopectina en los gránulos de almidón favorece la entrada de agua, mientras que la amilosa actúa como diluyente o puede formar complejos con lípidos que evitan el hinchamiento (Tester y Morrison 1990).

### **3 Distribución de la longitud de ramificaciones de amilopectina**

La distribución de cadenas de amilopectina se refiere a la organización y longitud de las cadenas ramificadas de este polisacárido. Esta se mide por medio de los grados de polimerización (GP) de tal manera que las cadenas se clasifican como cortas ( $GP < 12$ ), cortas-intermedias ( $GP 13-24$ ), intermedia-largas ( $GP 25-36$ ) y largas ( $GP \geq 37$ ). Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 11. Las líneas parentales K0326Y QPM y W64Ao2 no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, los almidones de las RIL opacas mostraron en general una mayor proporción de cadenas

**Cuadro 11.** Distribución de la longitud de ramificaciones de la amilopectina de almidones de endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad.

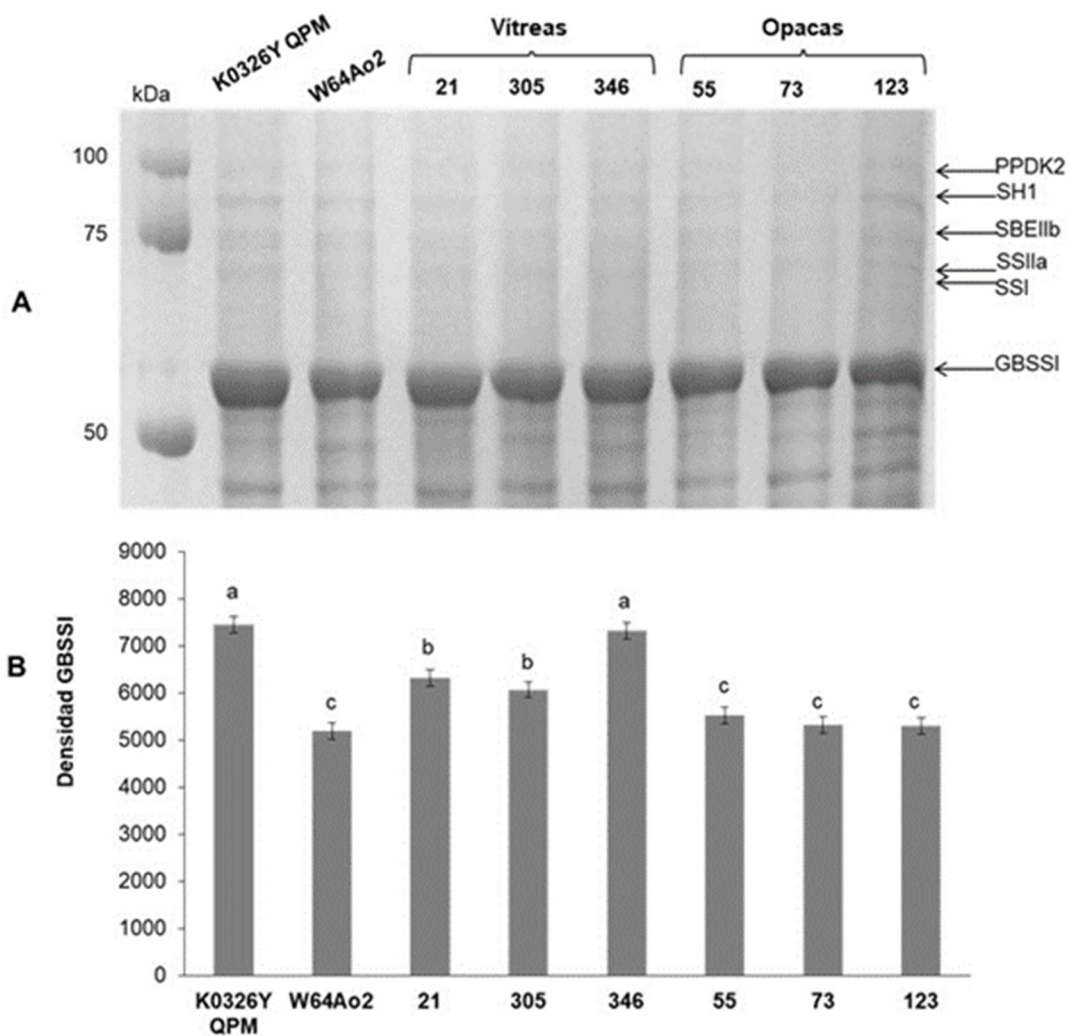
Línea de Maíz	GP (6-12)	GP (13-24)	GP (25-36)	GP $\geq$ 37	CL
K0326Y-QPM (V)	25.15 <sup>d</sup>	52.13 <sup>a</sup>	15.39 <sup>ab</sup>	7.33 <sup>a</sup>	19.30
21 (V)	25.51 <sup>d</sup>	52.05 <sup>a</sup>	15.49 <sup>ab</sup>	6.18 <sup>b</sup>	19.15
305 (V)	27.80 <sup>c</sup>	52.18 <sup>a</sup>	13.91 <sup>c</sup>	6.14 <sup>b</sup>	18.62
346 (V)	28.70 <sup>bc</sup>	50.14 <sup>bc</sup>	14.94 <sup>bc</sup>	6.26 <sup>b</sup>	18.69
<b>Media vítreas</b>	26.78 <sup>B</sup>	51.62 <sup>A</sup>	14.93 <sup>A</sup>	6.47 <sup>A</sup>	18.94
W64Ao2 (O)	25.36 <sup>d</sup>	51.06 <sup>ab</sup>	16.27 <sup>a</sup>	7.30 <sup>a</sup>	19.50
55 (O)	30.90 <sup>a</sup>	48.87 <sup>c</sup>	13.89 <sup>c</sup>	6.32 <sup>b</sup>	18.45
73 (O)	30.00 <sup>ab</sup>	48.92 <sup>c</sup>	13.90 <sup>c</sup>	7.17 <sup>a</sup>	18.68
123 (O)	29.67 <sup>ab</sup>	49.50 <sup>bc</sup>	14.14 <sup>c</sup>	6.68 <sup>ab</sup>	18.66
<b>Media opacas</b>	28.98 <sup>A</sup>	49.59 <sup>A</sup>	14.55 <sup>A</sup>	6.87 <sup>A</sup>	18.80

DP= grado de polimerización; CL= longitud promedio de cadena. Letras minúsculas diferentes en una columna indican diferencias entre las líneas de maíz ( $P \leq 0.05$ ). Letras mayúsculas diferentes entre los valores promedio de líneas vítreas y opacas en la última fila indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba t ( $p \leq 0.05$ ).

cortas (GP 6-12) con respecto a las vítreas. Por otro lado, la proporción de cadenas cortas-intermedias (GP 13-24) fue ligeramente mayor en la mayoría de las RIL vítreas, mostrando una asociación positiva con el contenido de amilosa ( $r= 0.781$ ,  $p<0.001$ ) y lo opuesto con la entalpía de gelatinización ( $r= -0.491$ ,  $p<0.01$ ). Estos resultados coinciden con estudios previos que indican una mayor proporción de cadenas cortas-intermedias en muestras de almidón de endospermo maduro de líneas vítreas QPM, las cuales también mostraron menor cristalinidad (Salazar-Salas y col 2014). También concuerdan con lo observado en muestras de almidón de maíz de alto contenido de amilosa (Han y col 2022). Las líneas opacas presentaron mayor proporción de amilopectina lo cual se relacionó con un mayor número de cadenas cortas (GP 6-12), tendencia similar a la observada por Zhang y col (2024) quienes reportaron una mayor proporción de cadenas cortas (GP 6-12) en líneas de maíz ceroso.

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

La separación por electroforesis de las proteínas asociadas al gránulo (PAG) en endospermo en desarrollo (28 DDP) se muestra en la Figura 7. Los patrones electroforéticos son similares a los reportados por Sidebottom y col (1998) y por Juárez-García y col (2013) al analizar endospermos de maíz en distintos estados de desarrollo. La proteína más abundante presentó un peso molecular de alrededor de 55 kDa y corresponde a la enzima almidón sintasa unida al gránulo I (GBSSI), la cual es responsable de la síntesis de amilosa. Pesos moleculares similares fueron reportados



**Figura 7.** Análisis electroforético de proteínas asociadas al gránulo de almidón en endospermo en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. (A) Separación por SDS-PAGE. Los tamaños moleculares de marcadores preteñidos se indican a la izquierda y la identidad de las proteínas se indica a la derecha. GBSSI, Almidón sintasa unida al gránulo I; SSI, Almidón sintasa I; SSIIa, Almidón sintasa IIa; SBEIIb, Enzima ramificadora de almidón IIb; SHI, Sacarosa sintasa I; PPK2, Piruvato fosfato dicinasa 2. (B) Análisis densitométrico de GBSSI. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).



para esta enzima en cebada, arroz y maíz (Borén y col 2004; Umemoto y Aoki 2005; Vega-Alvarez y col 2022). La acumulación de GBSSI fue mayor en el parental vítreo K0326Y-QPM comparado con el opaco W64Ao2 y este mismo comportamiento fue observado en las RIL, teniendo mayor acumulación de GBSSI en las líneas vítreas, lo cual corresponde a su vez con los mayores contenidos de amilosa obtenidos en estas mismas líneas. Resultados similares fueron obtenidos por Vega-Alvarez y col (2022) en endospermo en desarrollo (30 DDP) y por Salazar-Salas y col (2014) en endospermo maduro de líneas de maíz QPM, quienes reportaron una acumulación significativamente mayor de GBSSI en endospermo de las líneas vítreas con respecto a las opacas.

Las otras proteínas presentes fueron identificadas por Vega-Alvarez y col (2022) como almidón sintasa I (SSI), almidón sintasa IIa (SSIIa), enzima ramificadora de almidón IIb (SBEIIb), sacarosa sintasa 1 (SH1) y piruvato fosfato dicinasa 2 (PPDK2) (Figura 7), las cuales corresponden a enzimas involucradas en la biosíntesis de amilopectina y en el metabolismo de carbohidratos.

Investigaciones sobre amiloplastos en el endospermo de maíz indican que las enzimas interactúan formando complejos que establecen la estructura de la amilopectina. Se ha propuesto que un complejo trimérico que incluye SSI, SSIIa y SBEIIb participa en la formación de clusters de amilopectina de tamaño pequeño a intermedio en la superficie del gránulo (Liu y col 2009). Sin embargo, la escasa acumulación de estas isoformas observada en este estudio limitó el análisis densitométrico para detectar variaciones entre las muestras contrastantes. En cuanto a las enzimas PPDK2 y SH1, no se sabe con certeza como impactarían en el

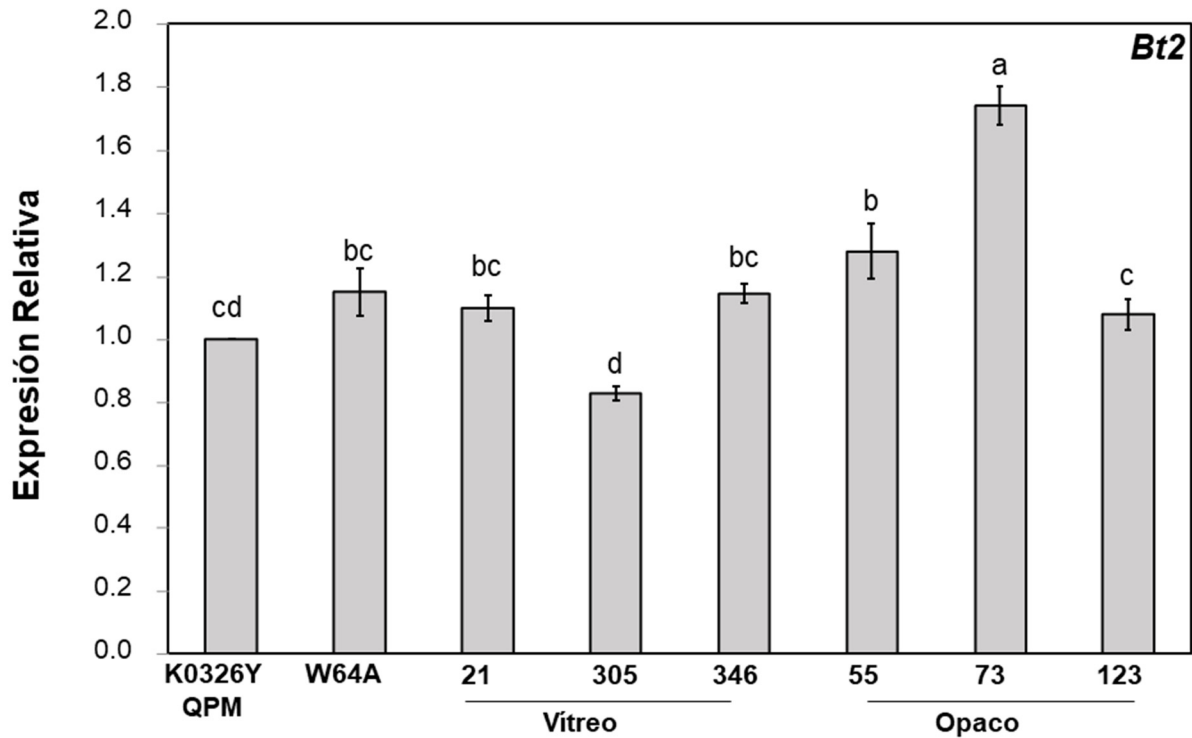
endospermo en QPM. No obstante, Lappe y col (2018) realizaron un estudio donde midieron la expresión de los genes de PPDK para observar su función en el desarrollo del endospermo de maíz, observando que un fenotipo opaco de maíz tenía baja presencia de PPDK lo que relacionaron con una pérdida de características de un endospermo vítreo, por lo que los autores sugieren que PPDK modula el metabolismo del endospermo, potencialmente a través de ajustes reversibles en la carga energética, y revelan que las mutaciones *o2* pueden afectar el fenotipo opaco mediante la regulación de PPDK.

## **C EXPRESION DE GENES DE SINTESIS DE ALMIDÓN EN LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD**

Se investigaron las bases moleculares de la variación en las propiedades del almidón midiendo la expresión de cuatro genes relacionados con la biosíntesis de este polisacárido (*Bt2*, *Wx1*, *Ae1* y *Zpu1*) en K0326Y-QPM, W64Ao2 y seis RIL contrastantes en vitrosidad. Se eligieron granos en una etapa intermedia-avanzada de desarrollo del endospermo (28 DDP) porque los niveles de expresión y las propiedades del almidón pueden mostrar una mejor asociación con el fenotipo vítreo del endospermo en estado maduro.

### **1 *Bt2***

El gen *Bt2* codifica la subunidad pequeña de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa cuya actividad catalítica es clave en la biosíntesis del almidón (Giroux y Hannah 1994). Los niveles de expresión de este gen no fueron significativamente diferentes entre las líneas parentales (Figura 8), lo cual corresponde con los valores obtenidos para el



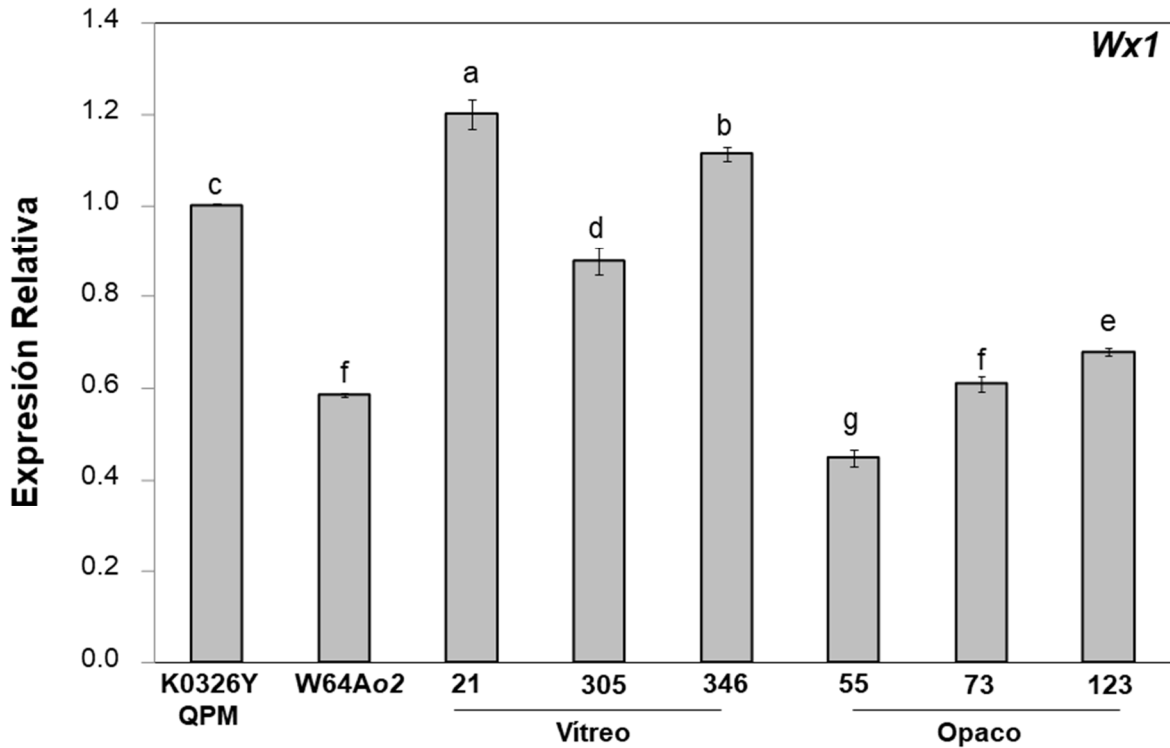
**Figura 8.** Expresión relativa del gen *Bt2* en endospermo en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Se utilizó como referencia el gen que codifica la proteína relacionada con el retinoblastoma-1 (RRB1). Los valores de expresión son relativos a los de la línea K0326Y-QPM. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

contenido de almidón de estas líneas (Cuadro 9) y lo observado previamente por Vega-Alvarez y col (2022) a los 30 DDP en las mismas líneas.

De manera general no se pudo observar diferencia significativa entre las RIL con excepción de la línea 73, la cual también mostró los mayores valores de almidón (Cuadro 9). Se ha observado que un aumento en el nivel de transcritos de *Bt2* se asocia con un incremento significativo en el contenido de almidón, por lo tanto la sobreexpresión de este gen podría favorecer el flujo de carbono hacia la biosíntesis del almidón (Jia y col 2013). Esto se pudo observar en el presente estudio ya que las líneas con mayor expresión también mostraron mayor contenido de almidón.

## **2 *Wx1***

El gen *Wx1* codifica para la enzima almidón sintasa unida al gránulo (GBSSI), la cual es responsable de la síntesis de amilosa (Denyer y col 2001). La expresión de este gen fue casi dos veces mayor en las líneas vítreas con respecto a las líneas opacas (Figura 9). La línea vítrea 21 presentó los mayores valores de expresión, mientras que la línea opaca 55 mostró los menores valores. La mayor expresión de *Wx1* en las líneas vítreas se asoció con una mayor acumulación de amilosa en estas líneas (Cuadro 9), lo cual se reflejó en una alta correlación entre estas dos características ( $r=0.85$ ,  $p=0.001$ ). Resultados similares fueron observados por Zhong y col (2020) quienes también reportaron mayor expresión de *Wx1* en líneas de maíz con alto contenido de amilosa respecto a líneas normales. Vega-Alvarez y col (2022) también observaron niveles de expresión más altos de *Wx1* en endospermos en desarrollo (30 DDP) de líneas vítreas con respecto a las opacas. Estos resultados sugieren que la mayor expresión de este gen favorece la producción de gránulos de

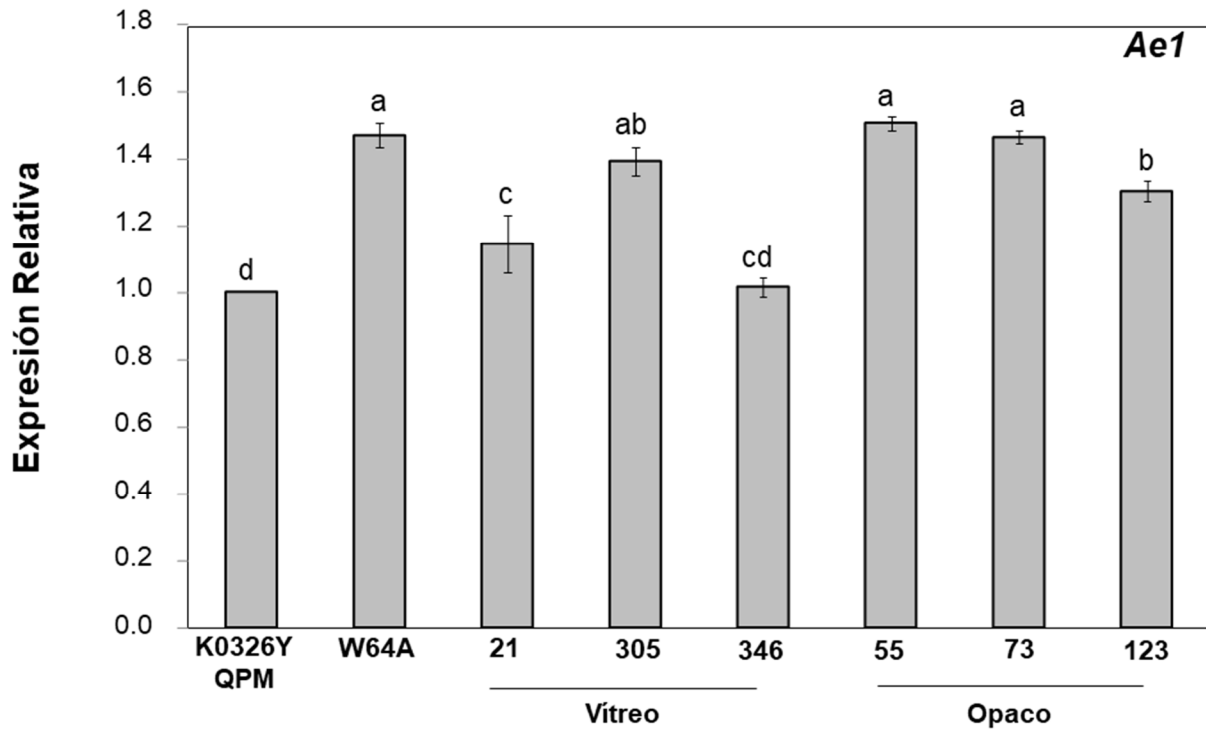


**Figura 9.** Expresión relativa del gen *Wx1* (GBSSI) en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Se utilizó como referencia el gen que codifica la proteína relacionada con el retinoblastoma-1 (RRB1). Los valores de expresión son relativos a los de la línea K0326Y-QPM. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

almidón con una mayor proporción de amilosa y regiones amorfas que facilitan su compactación y la formación del fenotipo vítreo en QPM (Salazar-Salas y col 2014).

### **3 Ae1**

El gen *Ae1* codifica para la enzima ramificadora de almidón IIb (SBEIIb), la cual genera enlaces de ramificación  $\alpha$ -1,6 durante la síntesis de amilopectina (Tetlow y Emes 2014). En general, el parental W64Ao2 y las RIL opacas mostraron los mayores valores de expresión de este gen con respecto a las líneas vítreas (Figura 10), siendo la línea opaca 55 la que obtuvo el mayor valor y la línea vítrea 346 la que presentó la menor expresión. Los mayores valores de expresión obtenidos en las líneas opacas concuerdan con una menor acumulación de amilosa y una mayor acumulación de amilopectina en dichas líneas (Cuadro 9). Una tendencia similar fue reportada por Jia y col (2013) quienes encontraron una mayor expresión del gen que codifica para SBEIIb en W64Ao2 con respecto a su contraparte normal W64A+ a los 22 DDP. Los autores sugieren que la mayor expresión de SBEIIb en W64Ao2 podría favorecer la producción de gránulos de almidón con mayores regiones cristalinas, lo cual podría explicar el fenotipo opaco característico de esta mutante.



**Figura 10.** Expresión relativa del gen *Ae1* (SBEIIb) en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Se utilizó como referencia el gen que codifica la proteína relacionada con el retinoblastoma-1 (RRB1). Los valores de expresión son relativos a los de la línea K0326Y-QPM. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

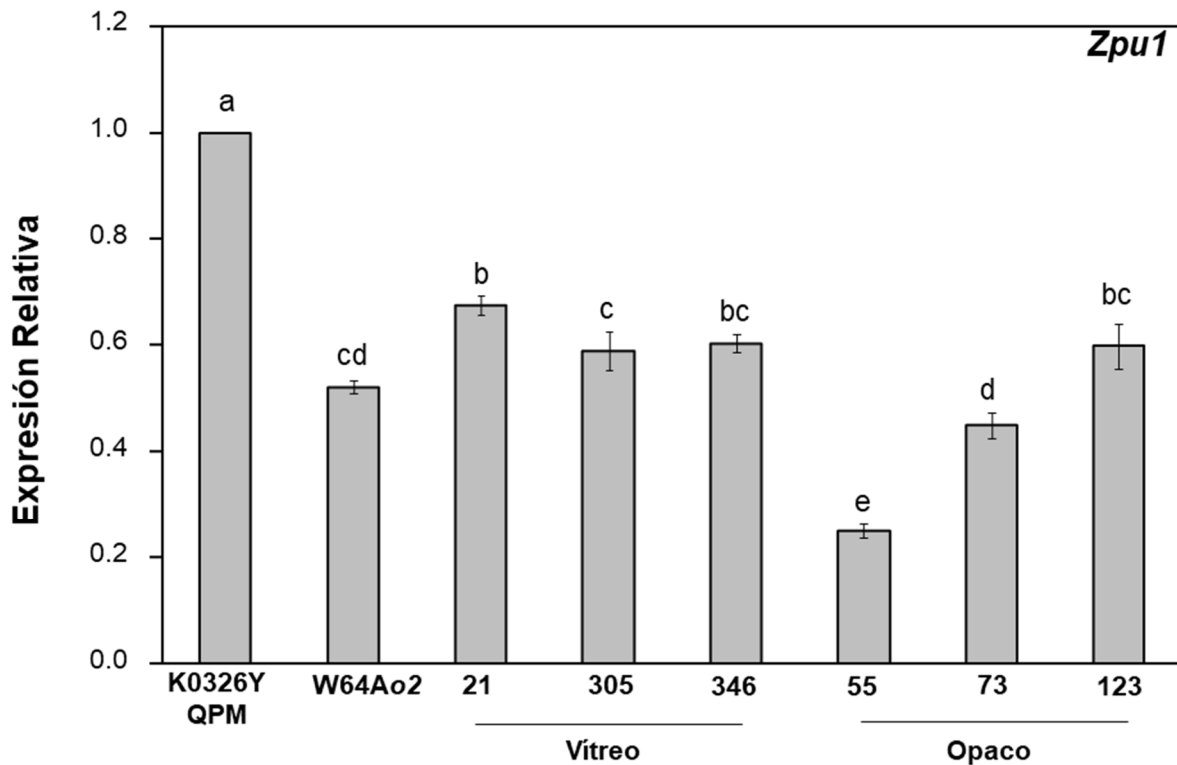
#### **4 *Zpu1***

El gen *Zpu1* codifica para una enzima desramificadora del almidón tipo pululanasa y su expresión fue dos veces mayor en K0326Y-QPM con respecto a W64Ao2 (Figura 11). Este valor es similar al observado por Vega-Alvarez y col (2022) al analizar líneas de maíz a 30 DDP, mientras que en las RIL los valores de expresión fueron en general mayores en las líneas vítreas que en las líneas opacas. Estos resultados corresponden con la correlación encontrada previamente entre la actividad de la pululanasa y el fenotipo vítreo (Wu y col 2015), lo que sugiere que la pululanasa también tiene un impacto positivo en la modificación del endospermo vítreo en QPM.

#### **D ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS DE ALMIDÓN EN EL ENDOSPERMO DE LÍNEAS DE MAÍZ QPM CONTRASTANTES EN VITROSIDAD**

La variabilidad observada en las propiedades fisicoquímicas de los gránulos de almidón en las líneas estudiadas sugiere un papel importante de esta macromolécula en la modificación de la dureza del endospermo en maíz QPM. Esta variabilidad puede deberse a cambios en la actividad de las enzimas clave en la biosíntesis de almidón, por lo que se analizó la actividad de cuatro de ellas (AGPasa, GBSS, SBE y PUL) en endospermo en desarrollo (28 DDP) en líneas contrastantes en vitrosidad.





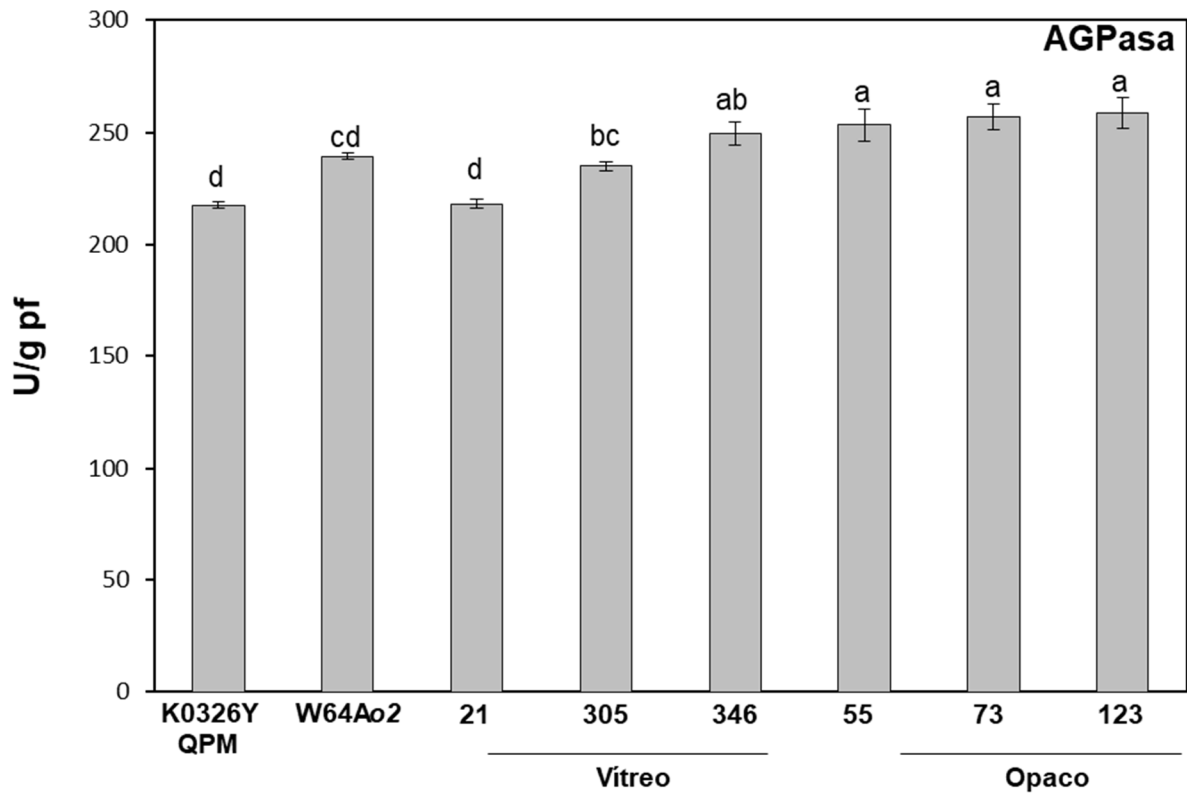
**Figura 11.** Expresión relativa del gen *Zpu1* (Pululanasa) en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Se utilizó como referencia el gen que codifica la proteína relacionada con el retinoblastoma-1 (RRB1). Los valores de expresión son relativos a los de la línea K0326Y-QPM. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

## **1 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)**

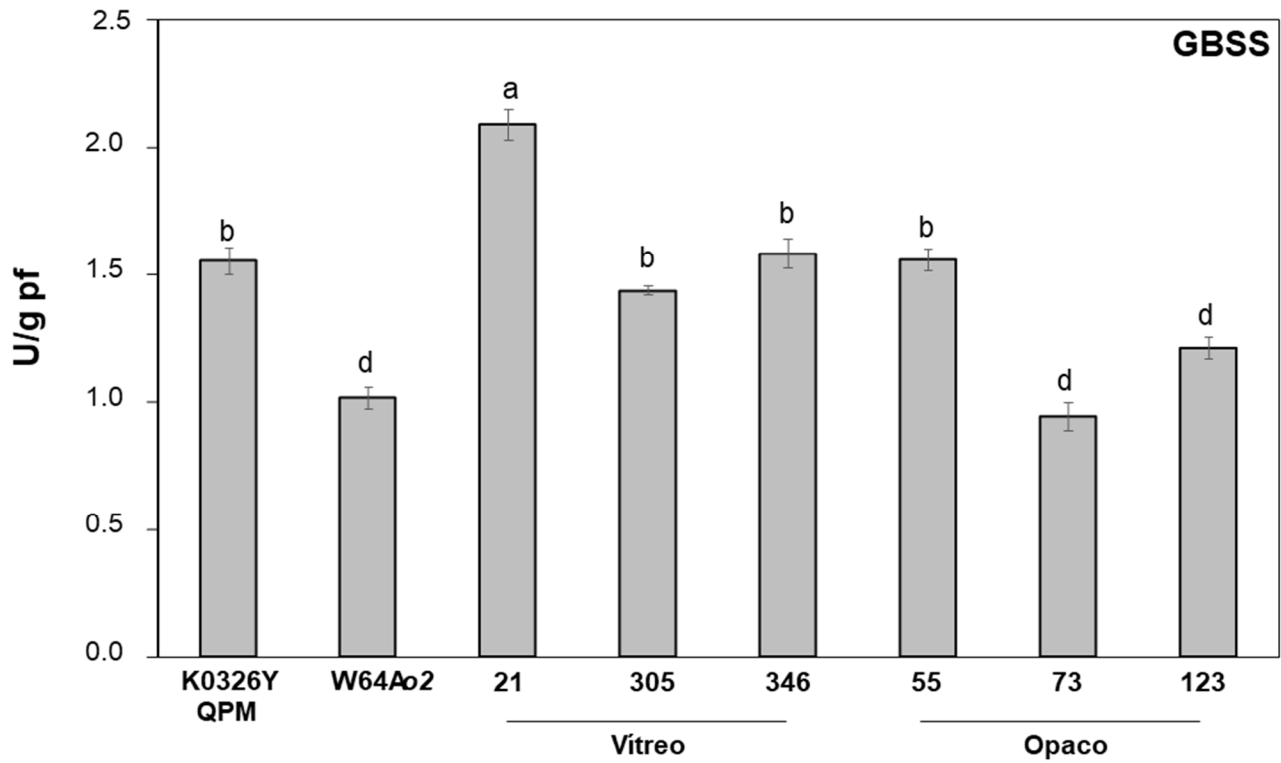
La ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) es una enzima clave en la biosíntesis de almidón ya que cataliza la formación del sustrato ADP-glucosa a partir de glucosa 1-fosfato y ATP. Los valores de actividad variaron entre 217.5 y 258.8 U/g pf (Figura 12). La actividad de esta enzima no fue significativamente diferente entre los parentales W64A<sub>o</sub>2 y K0326Y-QPM, aunque las RIL opacas en general mostraron valores de actividad más altos que las líneas vítreas. Estos resultados coinciden con los mayores contenidos de almidón observados en las líneas opacas con respecto a las vítreas (Cuadro 9). Estudios realizados en otros cereales como trigo (Dai 2010) y en líneas de maíz de alto contenido de almidón reportan una correlación positiva entre la actividad de AGPasa y el contenido de almidón (Zhang y col 2008). Dicha relación pudo observarse en el presente estudio ya que las líneas con mayor actividad también presentaron los mayores contenidos de almidón.

## **2 Almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS)**

La enzima GBSS es responsable de la síntesis de amilosa y está fuertemente unida a los gránulos de almidón donde polimeriza glucosa mediante enlaces  $\alpha$ -(1,4). La línea vítrea 21 presentó el mayor valor de actividad (2.1 U/ gpf), mientras que la línea opaca 73 presentó el menor valor (0.94 U/g pf) (Figura 13). En general, las líneas vítreas mostraron una mayor actividad de GBSS en comparación con las líneas opacas, lo cual corresponde con la mayor expresión del gen *Wx1* (Figura 9) y la mayor acumulación de la enzima (Figura 7) observada en las líneas vítreas. La actividad de GBSS también mostró una correlación positiva con el contenido de amilosa ( $r= 0.678$ ,  $p<0.001$ ), lo que corresponde con lo reportado previamente por Zhang y col (2008).



**Figura 12.** Actividad de la enzima AGPasa en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

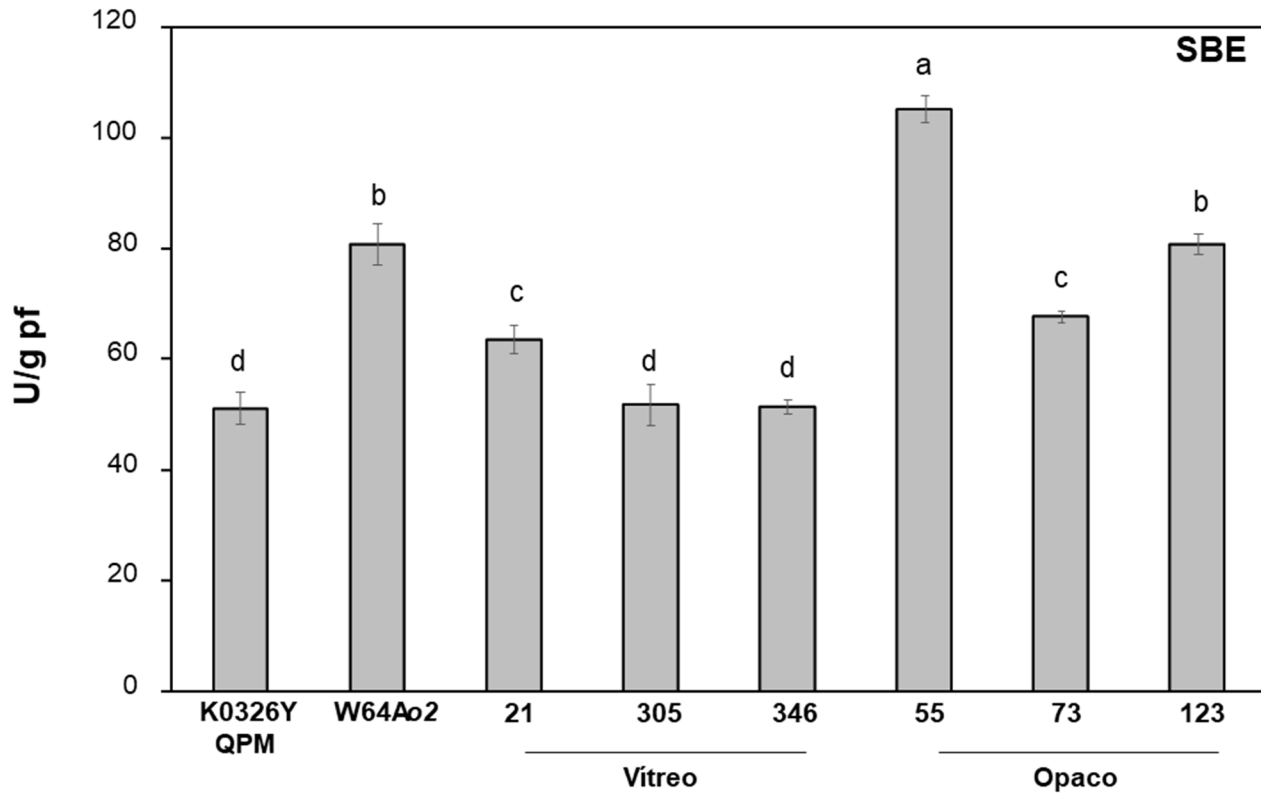


**Figura 13.** Actividad de la enzima GBSS en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

Resultados similares fueron reportados por Sidebottom y col (1998) al analizar líneas de maíz de bajo contenido de amilopectina; los autores observaron que estas líneas mostraron una mayor actividad de GBSS con respecto a maíces normales, lo que atribuyeron a una compensación de la baja cantidad de amilopectina con amilosa y una mayor acumulación de la enzima GBSS, correspondiente con lo observado en el presente trabajo. En otro estudio realizado por Zhang y col (2007) reportaron una correlación significativa entre las tasas de acumulación de amilosa y la actividad enzimática de GBSS en líneas de maíz a 30 DDP, concluyendo que GBSS juega un papel muy importante en la regulación de la síntesis de amilosa. Así, la mayor actividad de GBSS durante el desarrollo del endospermo en las líneas vítreas QPM contribuye a la síntesis de gránulos de almidón con una mayor proporción de amilosa y regiones amorfas que favorecen su compactación e interacción con cuerpos proteínicos, resultando en el fenotipo vítreo del endospermo maduro (Salazar-Salas y col 2014).

### **3 Enzima ramificadora de almidón (SBE)**

La enzima ramificadora del almidón (SBE) es la responsable de la formación de los puntos de ramificación  $\alpha$ -(1,6) durante la biosíntesis de amilopectina. El rango de valores de actividad de esta enzima en las líneas fue 51.1-105.1 U/g pf (Figura 14). La línea parental W64Ao2 y las RIL opacas mostraron una mayor actividad de SBE con respecto a las líneas vítreas, lo cual coincide con la correlación positiva observada entre la actividad de esta enzima y el contenido de amilopectina ( $r= 0.683$ ,  $p=0.001$ ). Este resultado es similar al obtenido por Zhang y col (2007) quienes reportaron una asociación directa entre estos caracteres en maíz.



**Figura 14.** Actividad de la enzima SBE en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

La principal isoforma de SBE en el endospermo de maíz es SBEIIb y la deficiencia de esta isoforma conduce a una menor proporción de cadenas cortas de amilopectina ( $DP \leq 12$ ) (Tetlow y Emes 2014). Además, las mutaciones en esta enzima reducen la síntesis de almidón, el cual posee un alto contenido de amilosa mientras que la amilopectina posee una mayor proporción de cadenas internas largas y una menor proporción de ramificaciones cortas lo que conduce a gránulos de almidón alargados y más pequeños asociados con una mayor resistencia a la gelatinización y la hidrólisis (Zhong y col 2020; Han y col 2022). Las líneas parentales K0326Y-QPM y W64A02 no mostraron diferencias significativas en el patrón de ramificaciones de amilopectina, pero en general los almidones de las líneas opacas mostraron una mayor proporción de cadenas cortas (GP 6-12) (Cuadro 11), cuyos valores mostraron una correlación positiva con la actividad de SBE ( $r = 0.407$ ,  $p < 0.05$ ). Además, las líneas opacas también presentaron los mayores valores de expresión del gen *Ae1* (Figura 10) que codifica para la enzima SBEIIb.

Se ha sugerido que SBEIIb forma complejos con las sintasas solubles de almidón SSI y SSIIa que modulan la estructura fina de la amilopectina mediante el ensamblaje de racimos de tamaño pequeño a intermedio (Liu y col 2009). Por lo tanto, SBEIIb también puede desempeñar un papel importante en la formación del endospermo vítreo mediante la síntesis de amilopectina menos cristalina que favorece la compactación de los gránulos de almidón.

#### **4 Enzima pululanasa (PUL)**

La pululanasa pertenece al grupo de enzimas desramificadoras de almidón (DBE) e hidroliza principalmente los enlaces  $\alpha$ -(1,6) de la amilopectina y glucógeno. La

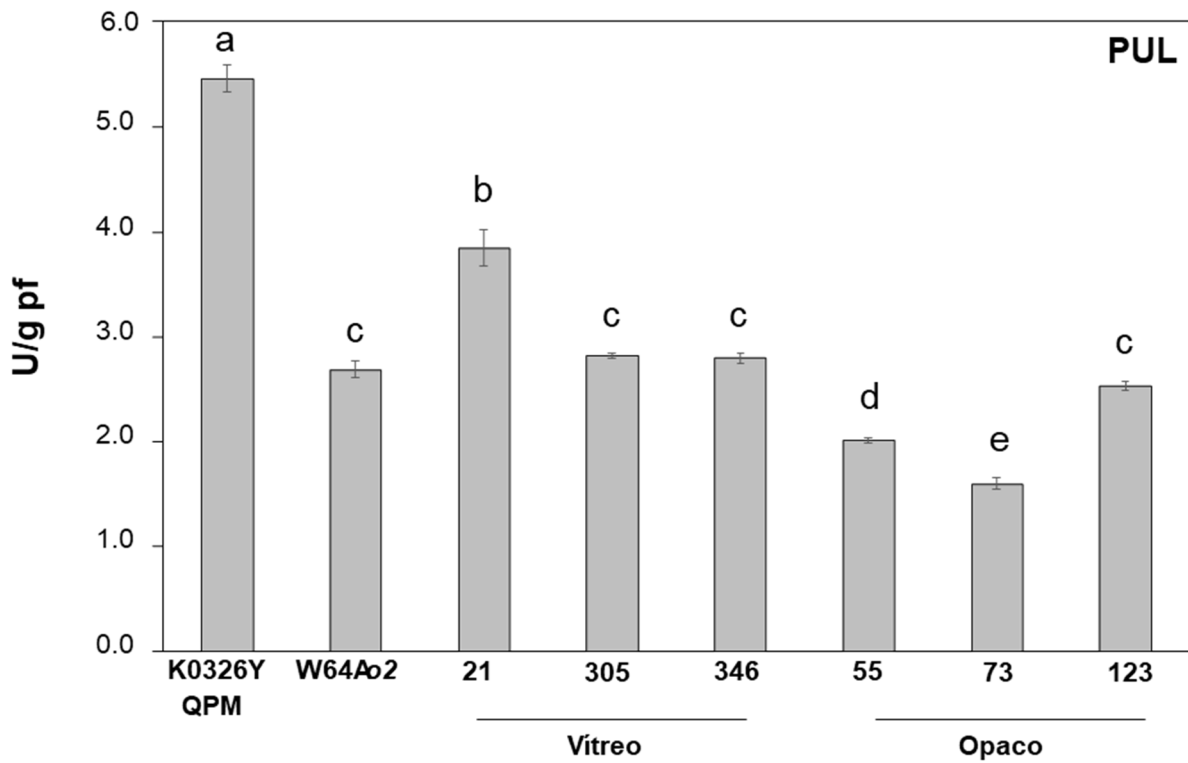
actividad de esta enzima varió entre 1.6 y 5.5 U/g pf (Figura 15). Las líneas vítreas presentaron en general los mayores valores de actividad en comparación con las líneas opacas, lo que correspondió con la mayor expresión del gen *Zpu1* en estas mismas líneas (Figura 11) y la correlación positiva entre la actividad de esta enzima y la vitrosidad ( $r=0.613$ ,  $p<0.05$ ) reportada por Wu y col (2015). Estos autores propusieron que la actividad de pululanasa se ve afectada por SSIII y en conjunto influyen en la vitrosidad del endospermo alterando la estructura de la amilopectina.

## **E VARIANTES ALELICAS DEL GEN *Ae1* Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN SISTEMA HETEROLOGO**

### **1 Alineamiento de las secuencias de los alelos del gen *Ae1***

Se obtuvieron las secuencias completas de ADNc (2675 pb) del gen *Ae1* de K0326Y-QPM y W64A02, las cuales se ensamblaron a partir de cinco fragmentos de RT-PCR superpuestos usando como secuencia base la de la línea de maíz B73 (acc. AFW71659.1). El alineamiento de las secuencias mostró ocho polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; Figura 16): 1137 (T≠A), 1138 (A≠T), 1530 (T≠A), 1531 (G≠A), 1534 (C≠A), 1535 (T≠A), 1551 (T≠G) y 1578 (T≠C). Cinco de estos SNP generaron cambios en la secuencia codificada de aminoácidos para SBEIIb en las posiciones 379 His→Gln, 380 Ser→Cys, 510 Phe→Leu, 511 Ala→Thr y 512 Leu→Asn (Figura 17). Estos aminoácidos están cerca de otros ubicados en el sitio activo de la enzima, Asp397, His402, Arg445, Asp447, Glu502, His569 y Asp570 (Abad y col 2002), los cuales se encontraron correctamente conservados en las dos líneas parentales. Se ha demostrado que la triada formada por Asp447, Glu502 y Asp570 está implicada en la





**Figura 15.** Actividad de la enzima pululanasa en endospermos en desarrollo (28 DDP) de líneas de maíz QPM contrastantes en vitrosidad. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

1 30 60  
 K0326Y QPM ATGGCGTTTCGCGGTTTCTGGGGCGGTGCTCGGTGGGGCCGTAAGGGCTCCCCGACTACCGGCGGGCGGGG  
 W64Ao2 ATGGCGTTTCGCGGTTTCTGGGGCGGTGCTCGGTGGGGCCGTAAGGGCTCCCCGACTACCGGCGGGCGGGG  
 90 120  
 K0326Y QPM AGGGTAGTCTAGTCTTCCGGCACACCGGCCTCTTCTTAACTCGGGGTGCTCGAGTTGGATGTTCCGGGGACGC  
 W64Ao2 AGGGTAGTCTAGTCTTCCGGCACACCGGCCTCTTCTTAACTCGGGGTGCTCGAGTTGGATGTTCCGGGGACGC  
 150 180 210  
 K0326Y QPM ACGGGGCCATGCGCGCGGGCGGCCGCGCCAGGAAGGCGGTTCATGGTTCCTGAGGGCGAGAATGATGGCCT  
 W64Ao2 ACGGGGCCATGCGCGCGGGCGGCCGCGCCAGGAAGGCGGTTCATGGTTCCTGAGGGCGAGAATGATGGCCT  
 240 270  
 K0326Y QPM CGCATCAAGGGCTGACTCGGCTCAATTCCAGTCGGATGAACTGGAGGTACCAGACATTTCTGAAGAGACAACG  
 W64Ao2 CGCATCAAGGGCTGACTCGGCTCAATTCCAGTCGGATGAACTGGAGGTACCAGACATTTCTGAAGAGACAACG  
 300 330  
 K0326Y QPM TGCGGTGCTGGTGTGGCTGATGCTCAAGCCTTGAACAGAGTTCGAGTGGTCCCCCACCAGCGATGGACAA  
 W64Ao2 TGCGGTGCTGGTGTGGCTGATGCTCAAGCCTTGAACAGAGTTCGAGTGGTCCCCCACCAGCGATGGACAA  
 360 390 420  
 K0326Y QPM AAAATATTCCAGATTGACCCCATGTTGCAAGGCTATAAGTACCATCTTGAGTATCGGTACAGCCTCTATAGAAG  
 W64Ao2 AAAATATTCCAGATTGACCCCATGTTGCAAGGCTATAAGTACCATCTTGAGTATCGGTACAGCCTCTATAGAAG  
 450 480  
 K0326Y QPM AATCCGTTTCAGACATTGATGAACATGAAGGAGGCTTGAAGCCTTCTCCCGTAGTTATGAGAAGTTTGGATTTA  
 W64Ao2 AATCCGTTTCAGACATTGATGAACATGAAGGAGGCTTGAAGCCTTCTCCCGTAGTTATGAGAAGTTTGGATTTA  
 510 540 570  
 K0326Y QPM ATCGCAGCGCGGAAGGTATCACATATCGAGAATGGGCTCCTGGAGCATTCTGCGAGCATTGGTGGGTGACTT  
 W64Ao2 ATCGCAGCGCGGAAGGTATCACATATCGAGAATGGGCTCCTGGAGCATTCTGCGAGCATTGGTGGGTGACTT  
 600 630  
 K0326Y QPM CAACAACCTGGGATCCAAATGCAGATCGTATGAGCAAAAATGAGTTTGGTGTGGGAAATTTTCTGCCTAACA  
 W64Ao2 CAACAACCTGGGATCCAAATGCAGATCGTATGAGCAAAAATGAGTTTGGTGTGGGAAATTTTCTGCCTAACA  
 660 690 720  
 K0326Y QPM ATGCAGATGGTACATCACCTATTCTCATGGATCTCGTGTAAAGGTGAGAATGGATACTCCATCAGGGATAAAG  
 W64Ao2 ATGCAGATGGTACATCACCTATTCTCATGGATCTCGTGTAAAGGTGAGAATGGATACTCCATCAGGGATAAAG  
 750 780  
 K0326Y QPM GATTCAATTCCAGCCTGGATCAAGTACTCAGTGCAGGCCCCAGGAGAAATACCATATGATGGGATTTATTATGA  
 W64Ao2 GATTCAATTCCAGCCTGGATCAAGTACTCAGTGCAGGCCCCAGGAGAAATACCATATGATGGGATTTATTATGA  
 810 840 870  
 K0326Y QPM TCCTCCTGAAGAGGTAAAGTATGTGTTTCAAGCATGCGCAACCTAAACGACCAAAAATCATTGCGGATATATGAAA  
 W64Ao2 TCCTCCTGAAGAGGTAAAGTATGTGTTTCAAGCATGCGCAACCTAAACGACCAAAAATCATTGCGGATATATGAAA  
 900 930  
 K0326Y QPM CACATGTCGGAATGAGTAGCCCGGAACCGAAGATAAACACATATGTAACTTTAGGGATGAAGTCCCTCCCAAGA  
 W64Ao2 CACATGTCGGAATGAGTAGCCCGGAACCGAAGATAAACACATATGTAACTTTAGGGATGAAGTCCCTCCCAAGA  
 960 990 1020  
 K0326Y QPM ATAAAAAACTTGATACAATGCAGTGCAAAATATGGCAATCCAAGAGCACTCATATTATGGAAGCTTTGGATAC  
 W64Ao2 ATAAAAAACTTGATACAATGCAGTGCAAAATATGGCAATCCAAGAGCACTCATATTATGGAAGCTTTGGATAC  
 1050 1080  
 K0326Y QPM CATGTAACATAATTTTTGCGCCAAGTAGTCTGTTTTGGTACCCAGAAAGATTTGAAGTCTTTGATTGATAGAGCA  
 W64Ao2 CATGTAACATAATTTTTGCGCCAAGTAGTCTGTTTTGGTACCCAGAAAGATTTGAAGTCTTTGATTGATAGAGCA  
 1110 1140 1170  
 K0326Y QPM CATGAGCTTGGTTTGTAGTTCTCATGGATGTGGTTCATAGTTCATGCGTCAAGTAATACTCTGGATGGGTTGAA  
 W64Ao2 CATGAGCTTGGTTTGTAGTTCTCATGGATGTGGTTCATAGTTCATGCGTCAAGTAATACTCTGGATGGGTTGAA  
 1200 1230  
 K0326Y QPM TGGTTTTGATGGTACAGATACACATTACTTTACAGTGGTCCACGTGGCCATCACTGGATGTGGGATTCTCGCC  
 W64Ao2 TGGTTTTGATGGTACAGATACACATTACTTTACAGTGGTCCACGTGGCCATCACTGGATGTGGGATTCTCGCC  
 1260 1290 1320  
 K0326Y QPM TATTTAACTATGGGAACGGGAAGTTTTAAGATTTCTTCTCTCCAATGCTAGATGGTGGCTCGAGGAATATAAGT  
 W64Ao2 TATTTAACTATGGGAACGGGAAGTTTTAAGATTTCTTCTCTCCAATGCTAGATGGTGGCTCGAGGAATATAAGT  
 1350 1380  
 K0326Y QPM TTGATGGTTTCCGTTTTGATGGTGTGACCTCCATGATGTACACTCACCACGGATTACAAGTAACATTTACGGGG  
 W64Ao2 TTGATGGTTTCCGTTTTGATGGTGTGACCTCCATGATGTACACTCACCACGGATTACAAGTAACATTTACGGGG  
 1410 1440 1470  
 K0326Y QPM AACTTCAATGAGTATTTTGGCTTTGCCACCGATGTAGATGCAGTGGTTTACTTGTGCTGGTAAATGATCTAATT  
 W64Ao2 AACTTCAATGAGTATTTTGGCTTTGCCACCGATGTAGATGCAGTGGTTTACTTGTGCTGGTAAATGATCTAATT

**Figura 16.** Alineamiento múltiple de las secuencias completas de nucleótidos de la región codificante de *Ae1* en las líneas K0326Y-QPM y W64Ao2. Las diferencias de nucleótidos con fondo gris representan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

K0326Y QPM 1500 1530  
 W64Ao2 CATGGACTTTATCCTGAGGCTGTAACCCATTGGTGAAGATGTTAGTGAATGCCTACATTTGCCCTTCCTGTTCA  
 CATGGACTTTATCCTGAGGCTGTAACCCATTGGTGAAGATGTTAGTGAATGCCTACATTTAAACCAATCCTGTTCA

K0326Y QPM 1560 1590  
 W64Ao2 CGATGGTGGGGTAGGTTTTGACTATCGGATGCATATGGCTGTGGCTGACAAATGGATTGACCTTCTCAAGCAA  
 CGATGGGGGGGTAGGTTTTGACTATCGGATGCACATGGCTGTGGCTGACAAATGGATTGACCTTCTCAAGCAA

K0326Y QPM 1620 1650 1680  
 W64Ao2 AGTGATGAAACTTGGAAGATGGGTGATATTGTGCACACACTGACAAATAGGAGGTGGTTAGAGAAGTGTGTAA  
 AGTGATGAAACTTGGAAGATGGGTGATATTGTGCACACACTGACAAATAGGAGGTGGTTAGAGAAGTGTGTAA

K0326Y QPM 1710 1740  
 W64Ao2 CTTATGCTGAAAGTCATGATCAAGCATTAGTCGGCGACAAGACTATTGCGTTTTGGTTGATGGACAAGGATATG  
 CTTATGCTGAAAGTCATGATCAAGCATTAGTCGGCGACAAGACTATTGCGTTTTGGTTGATGGACAAGGATATG

K0326Y QPM 1770 1800 1830  
 W64Ao2 TATGATTTTCATGGCCCTCGATAGACCTTCAACTCCTACCATTGATCGTGGGATAGCATTACATAAGATGATTAGA  
 TATGATTTTCATGGCCCTCGATAGACCTTCAACTCCTACCATTGATCGTGGGATAGCATTACATAAGATGATTAGA

K0326Y QPM 1860 1890  
 W64Ao2 CTTATCACAATGGGTTTTAGGAGGAGAGGGCTATCTTAATTTTCATGGGAAATGAGTTTGGACATCCTGAATGGATA  
 CTTATCACAATGGGTTTTAGGAGGAGAGGGCTATCTTAATTTTCATGGGAAATGAGTTTGGACATCCTGAATGGATA

K0326Y QPM 1920 1950 1980  
 W64Ao2 GATTTTCCAAGAGGTCCGCAAAGACTTCCAAGTGGTAAGTTTTATTCCAGGGAATAACAACAGTTATGACAAATGT  
 GATTTTCCAAGAGGTCCGCAAAGACTTCCAAGTGGTAAGTTTTATTCCAGGGAATAACAACAGTTATGACAAATGT

K0326Y QPM 2010 2040  
 W64Ao2 CGTCGAAGATTTGACCTGGGTGATGCAGACTATCTTAGGTATCATGGTATGCAAGAGTTTATGATCAGGCAATGCA  
 CGTCGAAGATTTGACCTGGGTGATGCAGACTATCTTAGGTATCATGGTATGCAAGAGTTTATGATCAGGCAATGCA

K0326Y QPM 2070 2100 2130  
 W64Ao2 ACATCTTGAGCAAAAATATGAATTCATGACATCTGATCACCAGTATATTTCCCGGAAACATGAGGAGGATAAGGT  
 ACATCTTGAGCAAAAATATGAATTCATGACATCTGATCACCAGTATATTTCCCGGAAACATGAGGAGGATAAGGT

K0326Y QPM 2160 2190  
 W64Ao2 GATTGTGTTCCGAAAAGGGAGATTTGGTATTTGTGTTCAACTTCCACTGCAACAACAGCTATTTTACTACCGTAT  
 GATTGTGTTCCGAAAAGGGAGATTTGGTATTTGTGTTCAACTTCCACTGCAACAACAGCTATTTTACTACCGTAT

K0326Y QPM 2220 2250 2280  
 W64Ao2 TGGTTGTGCAAAGCCTGGGGTGTATAAGGTGGTCTTGGACTCCGACGCTGGACTATTTGGTGGATTTAGCAGG  
 TGGTTGTGCAAAGCCTGGGGTGTATAAGGTGGTCTTGGACTCCGACGCTGGACTATTTGGTGGATTTAGCAGG

K0326Y QPM 2310 2340  
 W64Ao2 ATCCATCACGCAGCCGAGCACTTCACCGCCGACTGTTCCGATGATAATAGGCCATATTCATTCTCGGTTTATAC  
 ATCCATCACGCAGCCGAGCACTTCACCGCCGACTGTTCCGATGATAATAGGCCATATTCATTCTCGGTTTATAC

K0326Y QPM 2370 2400 2430  
 W64Ao2 CCAAGCAGAACATGTGTCGTCTATGCTCCAGTGGAGTGATAGCGGGGTAAGTTCGTTGCTGCGCGGCATGTGTG  
 CCAAGCAGAACATGTGTCGTCTATGCTCCAGTGGAGTGATAGCGGGGTAAGTTCGTTGCTGCGCGGCATGTGTG

K0326Y QPM 2460 2490  
 W64Ao2 GGGCTGTCGATGTGAGGAAAAACCTTCTTCCAAAACCGGCAGATGCATGCATGCATGCTACAATAAGTTTCTGA  
 GGGCTGTCGATGTGAGGAAAAACCTTCTTCCAAAACCGGCAGATGCATGCATGCATGCTACAATAAGTTTCTGA

K0326Y QPM 2520 2550 2580  
 W64Ao2 TACTTTAATCGATGCTGGAAAGCCCATGCATCTCGCTGCGTTGCTCTCTATATATAAGACCTTCAAGGTGT  
 TACTTTAATCGATGCTGGAAAGCCCATGCATCTCGCTGCGTTGCTCTCTATATATAAGACCTTCAAGGTGT

K0326Y QPM 2610 2640  
 W64Ao2 CAATTAACATAGAGTTTTTCGTTTTTCGCTTTCCTAATGCTTGATGGCTGATTGTTTGCACCTGTTTCAAAAAAAA  
 CAATTAACATAGAGTTTTTCGTTTTTCGCTTTCCTAATGCTTGATGGCTGATTGTTTGCACCTGTTTCAAAAAAAA

K0326Y QPM 2675  
 W64Ao2 AAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Figura 16.** Continuación

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
K0326Y-QPM	MAFAVSGAVLGGAVRAPRLTGGGEGSLVFRHTGLFLTRGARVGCSTHGAMRAAAAARKAVMVP	EGENDGLASRADSAQFQSD	LEVPDI	SEETTCGAGV							
W64Ao2	MAFAVSGAVLGGAVRAPRLTGGGEGSLVFRHTGLFLTRGARVGCSTHGAMRAAAAARKAVMVP	EGENDGLASRADSAQFQSD	LEVPDI	SEETTCGAGV							
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
K0326Y-QPM	ADAQALNRVRVPPPSDGQKIFQIDPMLQGYKYHLEYRYSLYRRIRSDIDEHEGGLEAFSRSY	EKFGFN	RSAEGITYREWAPGAFSAALV	GDFN	NWDPNA						
W64Ao2	ADAQALNRVRVPPPSDGQKIFQIDPMLQGYKYHLEYRYSLYRRIRSDIDEHEGGLEAFSRSY	EKFGFN	RSAEGITYREWAPGAFSAALV	GDFN	NWDPNA						
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
K0326Y-QPM	DRMSKNEFGVWEIFLPNNADGTSPIPHGSRVKVRMDTPSGIKDIPAWIKYSVQAPGEIPYDGI	YDPP	EEVKYVFRHAQPKRPKSLRI	YETHVGMSSPE							
W64Ao2	DRMSKNEFGVWEIFLPNNADGTSPIPHGSRVKVRMDTPSGIKDIPAWIKYSVQAPGEIPYDGI	YDPP	EEVKYVFRHAQPKRPKSLRI	YETHVGMSSPE							
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
K0326Y-QPM	PKINTYVNRDEVLPRIKLLGYNVQIMAIQEH	SYGSGFYHVTNFFAPSSRF	GTPEDLKSLIDRAHELGLL	VMDVV	H	SHASSNTLDGLNG	FDGTD	THY			
W64Ao2	PKINTYVNRDEVLPRIKLLGYNVQIMAIQEH	SYGSGFYHVTNFFAPSSRF	GTPEDLKSLIDRAHELGLL	VMDVV	Q	CHASSNTLDGLNG	FDGTD	THY			
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
K0326Y-QPM	FHSGPRGHHWMDSRLFN	YGNWEVLRFLLSNARW	LEEKFDGFRFD	GVTS	SMYTHHGLQV	FTGNFNEYFGFATD	VDAVVYMLVNDLIHGLY	PEAVTI			
W64Ao2	FHSGPRGHHWMDSRLFN	YGNWEVLRFLLSNARW	LEEKFDGFRFD	GVTS	SMYTHHGLQV	FTGNFNEYFGFATD	VDAVVYMLVNDLIHGLY	PEAVTI			
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
K0326Y-QPM	GEDVSGMPTFALPVHDGGVGF	YRMMHMAVADK	WIDLKQSD	ETWKM	GDIVHTLTNRRWLEKCV	YAESHD	QALVGD	KTIAFWLMDK	DMYDFMALDRP	STP	
W64Ao2	GEDVSGMPTLTPVHDGGVGF	YRMMHMAVADK	WIDLKQSD	ETWKM	GDIVHTLTNRRWLEKCV	YAESHD	QALVGD	KTIAFWLMDK	DMYDFMALDRP	STP	
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
K0326Y-QPM	TIDRGIALHKMIRLITMGLGG	EGLNFMGNEFGHPEWIDF	PRGPQRLPSGK	FIPGNNSYDKCRRR	FDLGDADYLRYHGMQ	EFDQAMQHLEKQY	EFTSD				
W64Ao2	TIDRGIALHKMIRLITMGLGG	EGLNFMGNEFGHPEWIDF	PRGPQRLPSGK	FIPGNNSYDKCRRR	FDLGDADYLRYHGMQ	EFDQAMQHLEKQY	EFTSD				
	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	799
K0326Y-QPM	HQYISRKHEEDKVI	VEKGDLVVFVFNHCN	NSYFDYRIGCRKPGVYK	VLDS	DAGLFGGFSRIHHA	AEHFTADCSD	HNRPYSFSVYTP	SRTCVVYAPVE*			
W64Ao2	HQYISRKHEEDKVI	VEKGDLVVFVFNHCN	NSYFDYRIGCRKPGVYK	VLDS	DAGLFGGFSRIHHA	AEHFTADCSD	HNRPYSFSVYTP	SRTCVVYAPVE*			

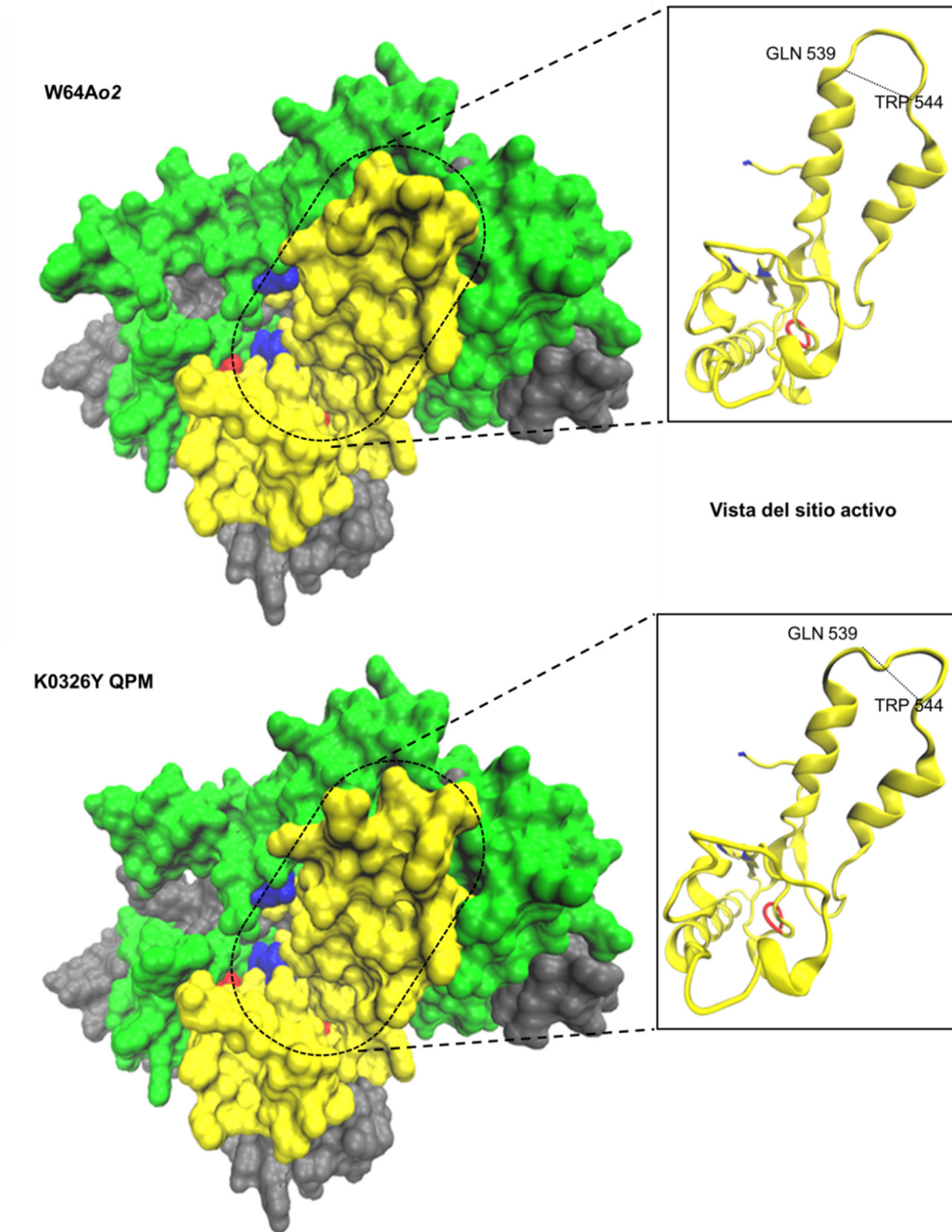
**Figura 17.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la enzima ramificadora de almidón (SBEIIb) de K0326Y-QPM y W64Ao2 traducidas a partir de las secuencias de nucleótidos del gen *Ae1*. El dominio catalítico está resaltado en gris y el posible sitio activo en amarillo. Las diferencias de aminoácidos entre las líneas parentales están indicadas en rojo y la tríada catalítica está resaltada en azul.

catálisis de la enzima generando enlaces de ramificación  $\alpha$ -1,6 en los glucanos  $\alpha$  a través de la escisión de los enlaces  $\alpha$ -1,4 internos (Baba y col 1991). Kuriki y col (1996) también encontraron mediante mutagénesis dirigida que esta triada participa en el centro activo de la enzima ramificadora II del almidón en endospermo de maíz.

Libessart y Preiss (1998) realizaron análisis de mutaciones dirigidas demostrando la importancia de la Arg445 conservada para la catálisis, mientras que Funane y col (1998) mediante estudios de modificación química con SBEIIb de maíz mostraron que dos residuos de histidina conservados en el sitio catalítico (His381 en la región 1 y His569 en la región 4) son indispensables para la unión del sustrato; estos aminoácidos se identificaron correctamente en las secuencias del presente estudio. SBEIIb también posee un péptido transitorio N-terminal de 57 aminoácidos, el cual se encontró conservado en las líneas parentales K0326Y-QPM y W64Ao2 (Figura 16). Fisher y col (1993) también identificaron el mismo péptido transitorio en el extremo N-terminal al analizar la secuencia de la enzima SBEIIb en maíz.

## **2 Modelado tridimensional de SBEIIb**

La comparación de las secuencias de aminoácidos de SBEIIb de las líneas parentales mostró cinco diferencias de aminoácidos en posiciones cercanas al sitio activo de la enzima (Figura 17). A partir de las secuencias de aminoácidos obtenidas para los parentales K0326Y-QPM y W64Ao2 se construyó una predicción del modelo tridimensional de la proteína SBEIIb utilizando la herramienta informática PHYRE2 (Kelley y col 2015) y como modelo de referencia el PDB 3AMK (Noguchi y col 2011) (Figura 18). Este modelo en 3D reveló que los cambios de aminoácidos en las



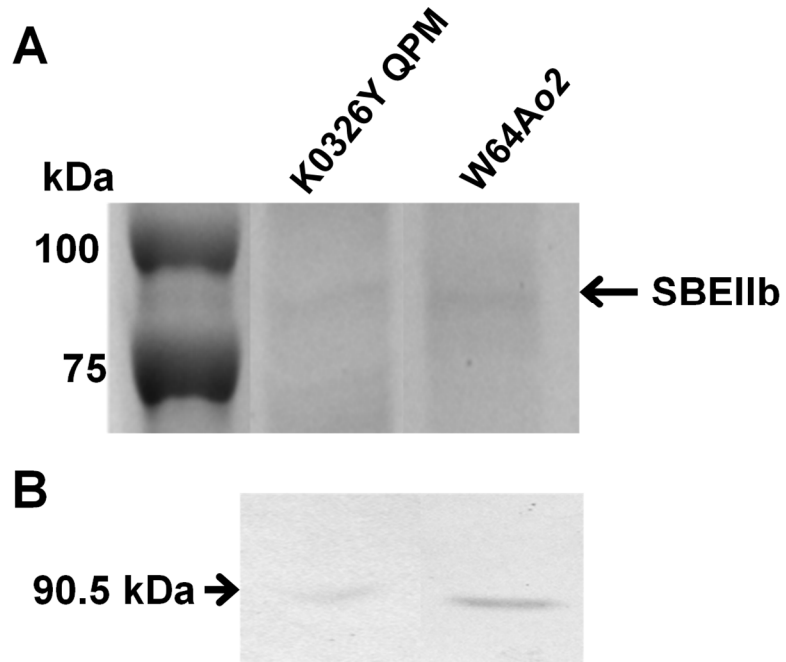
**Figura 18.** Modelos tridimensionales de SBEIIb de K0326Y-QPM y W64Ao2. El sitio activo de la enzima se representa con un modelo de hélice alfa y láminas beta. El dominio catalítico está resaltado en gris y el posible sitio activo en amarillo. Las diferencias de aminoácidos entre las líneas parentales están indicadas en rojo y la tríada catalítica está resaltada en azul.

posiciones 510, 511 y 512 provocan alteraciones en la estructura de la enzima, afectando su sitio catalítico (Figura 18). Se observó una mayor apertura entre dos hélices alfa en el sitio activo de la línea opaca W64Ao2 en comparación con la línea vítrea K0326Y-QPM. Es posible que esta mayor apertura en el sitio activo de SBEIIb facilite la interacción enzima-sustrato, contribuyendo a la mayor actividad observada en las líneas opacas (Figura 14).

### **3 Actividad de las enzimas recombinantes de SBEIIb**

Para determinar si las diferencias de actividad de la SBEIIb en el endospermo de K0326Y-QPM y W64Ao2 se deben a las variaciones de aminoácidos, se transformaron células de *E. coli* BL21 con plásmidos expresando las secuencias de maíz *Ae1-K0326Y-QPM* y *Ae1-W64Ao2*. La separación electroforética por SDS-PAGE y la inmunodetección por Western blot revelaron una banda esperada de 90.5 kDa correspondiente a la proteína SBEIIb recombinante (Figura 19). Estos patrones son similares a los reportados por otros autores en maíz (Liu y col 2009; Liu y col 2012).

El análisis de la actividad de SBEIIb de los extractos proteicos purificados de las transformantes *Ae1-K0326Y-QPM* y *Ae1-W64Ao2* no mostró diferencias significativas (Cuadro 12). Esto no concuerda con las mediciones de actividad determinadas a partir de extractos de endospermo (Figura 14) y con las diferencias predichas entre los sitios activos (Figura 17), que sugirieron que *Ae1-W64Ao2* codifica una enzima con mayor actividad. Estas discrepancias pueden atribuirse al hecho de que la actividad de SBE en el endospermo del maíz está influenciada por la fosforilación y la formación de complejos proteicos heteroméricos con otras enzimas de biosíntesis de almidón (Liu y col 2009).



**Figura 19.** Expresión de la proteína recombinante SBEIIb de K0326Y-QPM y W64Ao2. (A) Separación por SDS-PAGE de los extractos de proteína purificada por afinidad. La banda correspondiente a SBEIIb se indica a la derecha. (B) Inmunodetección por Western blot de SBEIIb recombinante con anticuerpos anti-His. El peso molecular de la proteína se indica en kDa.



**Cuadro 12.** Actividad específica de la enzima recombinante SBEIIb de *Ae1-K0326Y-QPM* y *Ae1-W64Ao2*.

Genotipo	Actividad (U/mg proteína)
<i>Ae1-K0326Y QPM</i>	3.56 ± 0.21 <sup>a</sup>
<i>Ae1-W64Ao2</i>	4.16 ± 0.44 <sup>a</sup>

Diferentes letras superíndices en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

Alternativamente, las diferencias en la actividad observadas en el endospermo podrían deberse solo a las diferencias en la expresión de las variantes alélicas (Figura 10). Con base en los modelos tridimensionales predichos de SBEIIb (Figura 18), se planteó la hipótesis de que una mayor apertura en el sitio activo puede facilitar la interacción enzima-sustrato en W64A $\alpha$ 2, resultando en una mayor actividad. Sin embargo, se requieren estudios adicionales como el uso de un sistema heterólogo eucariota y mutagénesis dirigida al sitio para confirmar esta hipótesis.

## **F CONSIDERACIONES FINALES**

Este trabajo proporciona información adicional acerca de los mecanismos asociados con la modificación del endospermo en QPM. La actividad de enzimas de biosíntesis de almidón en endospermo en desarrollo de genotipos vítreos se asoció con la síntesis de gránulos de almidón con un mayor contenido de amilosa y menor cristalinidad, lo cual podría favorecer su compactación e interacción con cuerpos proteínicos y otros componentes celulares después de la ruptura de la membrana del amiloplasto durante la desecación del grano. Esto complementa el mecanismo asociado con un aumento en el número de cuerpos proteínicos pequeños enriquecidos en  $\gamma$ -zeína de 27 kDa que llenan los espacios entre los gránulos de almidón (Wu y col 2010). La interacción entre los gránulos de almidón y los cuerpos proteínicos es muy importante no solo para el fenotipo vítreo sino también para la mejora del valor nutricional de QPM. El contenido de lisina en este tipo de maíces se incrementa como resultado de una disminución en la síntesis de  $\alpha$ -zeínas que carecen de lisina y por el incremento de proteínas ricas en lisina que pueden estar asociadas al citoesqueleto que rodea a los

cuerpos proteínicos (Lopez-Valenzuela y col 2004). Este reequilibrio en el proteoma del endospermo del maíz QPM incluye proteínas involucradas en el metabolismo de almidón y sacarosa, biosíntesis de aminoácidos y procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, la mayoría de las cuales poseen niveles importantes de los aminoácidos lisina, triptófano y metionina, siendo de esta manera las principales responsables de la mejora en el valor nutricional (Zhao y col 2023).

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ha liberado cientos de genotipos QPM y este esfuerzo está siendo replicado por otros programas de mejoramiento de maíz alrededor del mundo (Maqbool y col 2021). Sin embargo, el desarrollo de maíz QPM es complejo ya que requiere la introducción de múltiples modificadores de la mutación *o2* en un genotipo *o2* adaptado agrónomicamente mientras se mantiene la calidad nutricional del mismo. Actualmente se encuentran disponibles o están siendo desarrollados marcadores moleculares ligados a la dureza del grano y contenido de aminoácidos, lo cual representa una herramienta efectiva y de costo accesible para asistir en el desarrollo de genotipos QPM. En el presente trabajo también se investigó si las diferencias en la secuencia de los genes que codifican para la enzima ramificadora de almidón (SBEIIb) podría ser un marcador molecular potencial, pero se requieren estudios adicionales para establecer esta posible asociación.

## IX CONCLUSIONES

- El almidón de endospermo en desarrollo (28 DDP) de las líneas vítreas presentó una mayor proporción de amilosa y cadenas cortas-intermedias (GP 12-24), así como una menor entalpía de gelatinización y grado de hinchamiento, lo que sugiere que poseen gránulos con una menor cristalinidad y mayor proporción de regiones amorfas que podrían estar favoreciendo su compactación.
- El análisis de las proteínas asociadas al gránulo de almidón mostró una mayor acumulación de la enzima almidón sintasa unida al granulo (GBSSI) en el endospermo en desarrollo de las líneas vítreas, lo cual se relacionó con un mayor contenido de amilosa.
- Las líneas vítreas mostraron una mayor expresión de los genes que codifican para GBSSI y la enzima desramificadora (PUL), así como una menor expresión del gen para la enzima ramificadora (SBE), lo cual se asoció con una mayor proporción de amilosa/amilopectina en dichas líneas.
- Los análisis enzimáticos mostraron una mayor actividad de GBSS y PUL, así como una menor actividad de SBE en las líneas vítreas, lo cual se relacionó con la expresión génica y una mayor proporción de amilosa/amilopectina en estas líneas.
- El análisis de las variantes del gen *Ae1* en el endospermo de K0326Y-QPM y W64A02 reveló cinco polimorfismos que cambian aminoácidos en la SBE, algunos en el sitio activo y que podrían afectar su actividad. Sin embargo, la expresión heteróloga de estas variantes no mostró diferencias de actividad, sugiriendo que las diferencias de actividad observadas en el endospermo se deben a las diferencias de expresión génica.

- Los resultados del presente estudio sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con cambios en los niveles de transcritos de los genes de síntesis de almidón, los cuales influyen en las diferencias de actividad de las enzimas de biosíntesis de almidón. La mayor actividad de GBSSI y la menor actividad de SBE producen gránulos de almidón con mayores proporciones de amilosa y regiones amorfas, favoreciendo una mayor compactación entre estas estructuras, contribuyendo al fenotipo vítreo en QPM.

## X BIBLIOGRAFÍA

- Abad MC, Binderup K, Rios-Steiner J, Arni RK, Preiss J, Geiger JH. 2002. The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme. *Journal Biological Chemistry* 277(44):42164-42170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205746200>
- Ahmed N, Tetlow IJ, Nawaz S, Iqbal A, Mubin M, Nawaz ul Rehman MS, Butt A, Lightfoot DA, Maekawa M. 2015. Effect of high temperature on grain filling period, yield, amylose content and activity of starch biosynthesis enzymes in endosperm of basmati rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(11):2237-2243. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6941>
- Akalu G, Taffesse S, Gunaratna NS, De Groote H. 2010. The effectiveness of quality protein maize in improving the nutritional status of young children in the Ethiopian highlands. *Journal Food Nutrition Bulletin* 31(3):418-430. <https://doi.org/10.1177/156482651003100304>
- Akuamo B. 2002. Quality protein maize: infant feeding trials in ghana. En: (Ghana) A, editor. *Ghana Health Service*. p. 13.
- Baba T, Kimura K, Mizuno K, Etoh H, Ishida Y, Shida O, Arai Y. 1991. Sequence conservation of the catalytic regions of amylolytic enzymes in maize branching enzyme-I. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181(1):87-94. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)81385-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)81385-3)
- Barichello V, Yada RY, Coffin RH, Stanley DW. 1990. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: starch structure and composition. *Journal of Food Science* 55(4):1054-1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01596.x>
- Belayneh D, Yetneberk S, Teklewold A, De Groote H. 2018. Quality protein maize (QPM) for school feeding in Ethiopia: stakeholders consultation, sensory evaluation and potential impact. *Journal of Nutritional Health and Food Engineering* 8(6):377-382. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2018.08.00299>
- Biliaderis CG. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Journal of Physiology and Pharmacology* 69(1):60-78. <https://doi.org/10.1139/y91-011>

- Birnboim HC. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*. Academic Press. p. 243-255.
- Borén M, Larsson H, Falk A, Jansson C. 2004. The barley starch granule proteome— internalized granule polypeptides of the mature endosperm. *Plant Science* 166(3):617-626. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.028>
- Chandrashekar A, Mazhar H. 1999. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. *Journal of Cereal Science* 30(3):193-207. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1999.0264>
- Chávez-Murillo CE, Méndez-Montevalvo G, Wang Y-J, Bello-Pérez LA. 2012. Starch of diverse Mexican rice cultivars: physicochemical, structural, and nutritional features. *Starch - Stärke* 64(9):745-756. <https://doi.org/10.1002/star.201200016>
- Chen J, Huang B, Li Y, Du H, Gu Y, Liu H, Zhang J, Huang Y. 2011. Synergistic influence of sucrose and abscisic acid on the genes involved in starch synthesis in maize endosperm. *Carbohydrate Research* 346(13):1684-1691. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.05.003>
- Chung H-J, Liu Q. 2009. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers* 77(4):807-815. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.004>
- CMR-Institute. 2010. Requerimientos de aminoácidos de lactantes y niños. Disponible en <https://www.cmrinstitute.org/nni/espanol/content/module2/groups>. Consultado el 10 de agosto de 2019.
- Cooke D, Gidley MJ. 1992. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research* 227:103-112. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(92\)85063-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(92)85063-6)
- Copeland L, Blazek J, Salman H, Chiming-Tang M. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids* 23:1527-1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Dai Z. 2010. Activities of enzymes involved in starch synthesis in wheat grains differing in starch content. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(1):74-78. <https://doi.org/10.1134/S1021443710010103>

- Dannenhoffer JM, Bostwick DE, Or E, Larkins BA. 1995. Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective opaque-2 modifier. *Journal Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(6):1931-1935. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.1931>
- De Groote H, Gunaratna NS, Okuro JO, Wondimu A, Chege CK, Tomlins K. 2014. Consumer acceptance of quality protein maize (QPM) in east Africa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(15):3201-3212. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6672>
- Denyer K, Sidebottom C, Hylton CM, Smith AM. 1993. Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. *The Plant Journal* 4(1):191-198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04010191.x>
- Denyer Kay, Johnson P, Zeeman S, Smith AM. 2001. The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology* 158(4):479-487. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00360>
- Desalegn BB, Abegaz K, Kinf E. 2015. Effect of blending ratio and processing technique on physicochemical composition, functional properties and sensory acceptability of quality protein maize (QPM) based complementary food. *Journal of Food Science and Nutrition Engineering* 5:121-129. <https://doi.org/10.5923/j.food.20150503.03>
- Dhital S, Warren FJ, Butterworth PJ, Ellis PR, Gidley MJ. 2017. Mechanisms of starch digestion by  $\alpha$ -amylase—Structural basis for kinetic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(5):875-892. 10.1080/10408398.2014.922043
- Dian W, Jiang H, Chen Q, Liu F, Wu P. 2003. Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Journal of Plant Biology* 218(2):261-268. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1101-9>
- Ding XZ, Wang BG, Gao QH, Zhang Q, Yan GQ, Duan K, Huang JH. 2009. Molecular diversity and differential expression of starch-synthesis genes in developing kernels of three maize inbreds. *Plant Cell Reports* 28(10):1487-1495. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0748-5>



- Dinges JR, Colleoni C, James MG, Myers AM. 2003. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *The Plant Cell* 15(3):666-680. <https://doi.org/10.1105/tpc.007575>
- Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, James MG. 2001. Molecular structure of three mutations at the maize sugary1 locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiology* 125(3):1406-1418. <https://doi.org/10.1104/pp.125.3.1406>
- Doehlert DC, Knutson CA. 1991. Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels. *Journal of Plant Physiology* 138(5):566-572. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80242-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80242-7)
- Dombrink-Kurtzman MA, Knutson CA. 1997. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. *Cereal Chemistry* 74(6):776-780. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.6.776>
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. Disponible en <http://www.fao.org/3/T0395S/T0395S00.htm> Consultado el (Consultado en Agosto 2019).
- FAOSTAT. 2024. Food and Agriculture Organization Statistical database. Food and Agriculture Organization. Disponible en <http://faostat.fao.org>. Consultado el 15 de Agosto 2024.
- Fisher DK, Boyer CD, Hannah LC. 1993. Starch branching enzyme II from maize endosperm. *Plant Physiology* 102(3):1045-1046. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.1045>
- Fisher DK, Gao M, Kim KN, Boyer CD, Guiltinan MJ. 1996. Allelic analysis of the maize amylose-extender locus suggests that independent genes encode starch-branching enzymes Ila and IIb. *Plant Physiology* 110(2):611-619. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.611>
- Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. 2006. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiology* 140(3):1070-1084. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071845>

- Funane K, Libessart N, Stewart D, Michishita T, Preiss J. 1998. Analysis of essential histidine residues of maize branching enzymes by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Journal Protein Chemistry* 17(7):579-590. <https://doi.org/10.1007/bf02780959>
- Geetha KB, Lending CR, Lopes MA, Wallace JC, Larkins BA. 1991. Opaque-2 modifiers increase gamma-zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *The Plant Cell* 3(11):1207-1219. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.11.1207>
- Gevers H, Lake J. 1992. Development of modified opaque2 maize in South Africa. En: Mertz ET editores. *Quality Protein Maize* ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. p. 49-78.
- Gibbon BC, Larkins BA. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics* 21(4):227-233. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.02.009>
- Gibbon BC, Wang X, Larkins BA. 2003. Altered starch structure is associated with endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100(26):15329-15334. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136854100>
- Giroux MJ, Hannah LC. 1994. ADP-glucose pyrophosphorylase in shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize. *Molecular Gen Genetic* 243(4):400-408. <https://doi.org/10.1007/bf00280470>
- Glover D, Mertz E. 1987. Corn. En: Olson RA, Frey KJ editores. *Nutritional Quality of Cereal Grains: Genetic and Agronomic Improvement* ed. Madison: American Society for Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. p. 183–336.
- González-Núñez DG. 2016. Análisis de la acumulación y actividad de enzimas de síntesis de almidón y su relación con la modificación del endospermo en maíz QPM [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa, México Universidad Autónoma de Sinaloa. 109 p.
- González-Núñez DG, Pineda-Hidalgo KV, Salazar-Salas NY, López-Valenzuela JA. 2023. Mechanisms associated with endosperm modification in quality protein

- maize: endosperm modification in maize. *Biotecnia* 25(2):79-89.  
<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i2.1905>
- Grimaud F, Rogniaux H, James MG, Myers AM, Planchot V. 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59(12):3395-3406. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern198>
- Guan HP, Preiss J. 1993. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiology* 102(4):1269. <https://doi.org/10.1104/pp.102.4.1269>
- Gunaratna N, Moges D, De Groote H. 2019. Biofortified maize can improve quality protein intakes among young children in southern Ethiopia. *Nutrients* 11:192-207. <https://doi.org/10.3390/nu11010192>
- Gunaratna NS, Bosha T, Belayneh D, Fekadu T, De Groote H. 2016. Women's and children's acceptance of biofortified quality protein maize for complementary feeding in rural Ethiopia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(10):3439-3445. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7526>
- Guo X, Ronhovde K, Yuan L, Yao B, Soundararajan MP, Elthon T, Zhang C, Holding DR. 2012. Pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase induction and attenuation of Hsp gene expression during endosperm modification in quality protein maize *Plant Physiology* 158(2):917-929. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191163>
- Gutierrez-M A, Santacruz-R F, Cabrera-P JL, Rodriguez-G B. 2003. Mejoramiento genético vegetal "*in vitro*". *e-Gnosis* 1(4):1-19. 730/73000104
- Gutiérrez-Rojas A, Betrán J, Scott MP, Atta H, Menz M. 2010. Quantitative trait loci for endosperm modification and amino acid contents in quality protein maize. *Crop Science* 50(3):870-879. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.10.0634>
- Hamaker BR, Larkins BA. 2002. Maize food and feed: a current perspective and consideration of future possibilities. En: Kachatourians A, McHughen R, Scora WK, Hui YH ed. *Transgenic Plants*. Marcel Dekker, Inc. NY, EUA: CRC Press. p. 635-652.

- Han N, Li W, Xie C, Fu F. 2022. The effects of SBELLb gene mutation on physicochemical properties of starch in maize. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 34(3):381-393. <https://doi.org/10.1007/s40626-022-00251-3>
- Hannah LC, James M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current Opinion in Biotechnology* 19(2):160-165. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.013>
- Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, Guan H, Keeling PL, Wasserman BP. 1998. Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Molecular Biology* 37(4):639-649. <https://doi.org/10.1023/A:1006079009072>
- Hawker JS, Ozbun JL, Ozaki H, Greenberg E, Preiss J. 1974. Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose  $\alpha$ -1,4-glucan  $\alpha$ -4-glucosyl transferase and  $\alpha$ -1,4-glucan,  $\alpha$ -1,4-glucan-6-glycosyl transferase in synthesis of branched  $\alpha$ -glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 160(2):530-551. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90430-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90430-5)
- Hebelstrup KH, Nielsen MM, Carciofi M, Andrzejczak O, Shaik SS, Blennow A, Palcic MM. 2017. Waxy and non-waxy barley cultivars exhibit differences in the targeting and catalytic activity of GBSS1a. *Journal of Experimental Botany* 68(5):931-941. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw503>
- Hennen-Bierwagen TA, Lin Q, Grimaud F, Planchot V, Keeling PL, James MG, Myers AM. 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiology* 149(3):1541. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135293>
- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, Tetlow IJ, Emes MJ, James MG, Myers AM. 2008. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiology* 146(4):1892. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116285>
- Holding DR, Hunter BG, Chung T, Gibbon BC, Ford CF, Bharti AK, Messing J, Hamaker BR, Larkins BA. 2008. Genetic analysis of opaque2 modifier loci in quality protein

- maize. *Journal of Plant Breeding Research* 117(2):157. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0762-y>
- Holding DR, Hunter BG, Klingler JP, Wu S, Guo X, Gibbon BC, Wu R, Schulze J-M, Jung R, Larkins BA. 2011. Characterization of opaque2 modifier QTLs and candidate genes in recombinant inbred lines derived from the K0326Y quality protein maize inbred. *Plant Molecular Biology* 122(4):783-794. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1486-3>
- Huang B, Chen J, Zhang J, Liu H, Tian M, Gu Y, Hu Y, Li Y, Liu Y, Huang Y. 2011. Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase encoding genes in source and sink organs of maize. *Plant Molecular Biology Reporter* 29(3):563-572. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0262-5>
- Huang L, Tan H, Zhang C, Li Q, Liu Q. 2021. Starch biosynthesis in cereal endosperms: an updated review over the last decade. *Plant Commun* 2(5):100237. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100237>
- James MG, Denyer K, Myers AM. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3):215-222. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00042-6)
- James MG, Robertson DS, Myers AM. 1995. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *The Plant Cell* 7(4):417-429. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.4.417>
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(6):383-392. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.03.006>
- Jia M, Wu H, Clay KL, Jung R, Larkins BA, Gibbon BC. 2013. Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the opaque2mutant by transcriptional and proteomic analysis. *BMC Plant Biology* 13(1):60. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-60>
- Jiang L, Yu X, Qi X, Yu Q, Deng S, Bai B, Li N, Zhang A, Zhu C, Liu B, Pang J. 2013. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. *Transgenic Research* 22(6):1133-1142. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9717-4>

- Juárez-García E, Agama-Acevedo E, Gómez-Montiel NO, Pando-Robles V, Bello-Pérez LA. 2013. Proteomic analysis of the enzymes involved in the starch biosynthesis of maize with different endosperm type and characterization of the starch. *Journal Science Food Agriculture* 93(11):2660-2668. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6054>
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10(6):845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim KN, Fisher DK, Gao M, Guiltinan MJ. 1998. Molecular cloning and characterization of the amylose-extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize. *Plant Molecular Biology* 38(6):945-956. <https://doi.org/10.1023/a:1006057609995>
- Krieger KM, Pollak LM, Brumm TJ, White PJ. 1998. Effects of pollination method and growing location on starch thermal properties of corn hybrids. *Cereal Chemistry* 75(5):656-659. <https://doi.org/10.1094/cchem.1998.75.5.656>
- Kuriki T, Guan H, Sivak M, Preiss J. 1996. Analysis of the active center of branching enzyme II from maize endosperm. *Journal Protein Chemistry* 15(3):305-313. <https://doi.org/10.1007/bf01887119>
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lappe RR, Baier JW, Boehlein SK, Huffman R, Lin Q, Wattedled F, Settles AM, Hannah LC, Borisjuk L, Rolletschek H, Stewart JD, Scott MP, Hennen-Bierwagen TA, Myers AM. 2018. Functions of maize genes encoding pyruvate phosphate dikinase in developing endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(1):E24-e33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715668115>
- Lee HJ, Jee MG, Kim J, Nogoy FMC, Niño MC, Yu DA, Kim MS, Sun M, Kang KK, Nou I, Cho YG. 2014. Modification of starch composition using RNAi targeting soluble starch synthase I in *Japonica* rice. *Plant Breeding and Biotechnology* 2(3):301-312. <https://doi.org/10.9787/PBB.2014.2.3.301>

- Lending CR, Larkins BA. 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Journal The Plant Cell* 1(10):1011-1023. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.10.1011>
- Li C, Xiang X, Huang Y, Zhou Y, An D, Dong J, Zhao C, Liu H, Li Y, Wang Q, Du C, Messing J, Larkins BA, Wu Y, Wang W. 2020. Long-read sequencing reveals genomic structural variations that underlie creation of quality protein maize. *Nature Communications* 11(1):17. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14023-2>
- Li T, Ding Y, Zhang J, Jiao G, Sun L, Liu Z, Qiu L. 2017. Improving the expression of recombinant pullulanase by increasing mRNA stability in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology* 29:63-67. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.07.001>
- Li Z, Chu X, Mouille G, Yan L, Kosar-Hashemi B, Hey S, Napier J, Shewry P, Clarke B, Appels R, Morell MK, Rahman S. 1999. The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant Physiology* 120(4):1147. <https://doi.org/10.1104/pp.120.4.1147>
- Libessart N, Preiss J. 1998. Arginine residue 384 at the catalytic center is important for branching enzyme II from maize endosperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 360(1):135-141. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0960>
- Lin Q, Huang B, Zhang M, Zhang X, Rivenbark J, Lappe RL, James MG, Myers AM, Hennen-Bierwagen TA. 2012. Functional interactions between starch synthase III and isoamylase-type starch-debranching enzyme in maize endosperm. *Plant Physiology* 158(2):679-692. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189704>
- Liu F, Ahmed Z, Lee EA, Donner E, Liu Q, Ahmed R, Morell MK, Emes MJ, Tetlow IJ. 2011. Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions. *Journal of Experimental Botany* 63(3):1167-1183. <https://doi.org/10.1093/jxb/err341>
- Liu F, Ahmed Z, Lee EA, Donner E, Liu Q, Ahmed R, Morell MK, Emes MJ, Tetlow IJ. 2012. Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein



- interactions. *Journal of Experimental Botany* 63(3):1167-1183. <https://doi.org/10.1093/jxb/err341>
- Liu F, Makhmoudova A, Lee EA, Wait R, Emes MJ, Tetlow IJ. 2009. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Journal of Experimental Botany* 60(15):4423-4440. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp297>
- Lopes MA, Larkins BA. 1991. Gamma-zein content is related to endosperm modification in Quality Protein Maize. *Crop Science* 31(6):1655-1662. <https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100060055x>
- Lopes MA, Takasaki K, Bostwick DE, Helentjaris T, Larkins BA. 1995. Identification of two opaque2 modifier loci in Quality Protein Maize. *Journal Molecular General and Genomics* 247(5):603-613. <https://doi.org/10.1007/bf00290352>
- Lopez-Valenzuela JA, Gibbon BC, Holding DR, Larkins BA. 2004. Cytoskeletal proteins are coordinately increased in maize genotypes with high levels of eEF1A. *Plant Physiology* 135(3):1784-1797. 10.1104/pp.104.042259
- Lü B, Guo Z, Liang J. 2008. Effects of the activities of key enzymes involved in starch biosynthesis on the fine structure of amylopectin in developing rice (*Oryza sativa* L.) endosperms. *Life Sciences* 51(10):863-871. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0120-y>
- MaizeGDB. 2022. Maize Genetics and Genomics Database. Disponible en <http://www.maizegdb.org>. Consultado el 10 de Agosto de 2022.
- Makhmoudova A, Williams D, Brewer D, Massey S, Patterson J, Silva A, Vassall KA, Liu F, Subedi S, Harauz G, Siu KW, Tetlow IJ, Emes MJ. 2014. Identification of multiple phosphorylation sites on maize endosperm starch branching enzyme IIb, a key enzyme in amylopectin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 289(13):9233-9246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.551093>
- Maqbool MA, Beshir Issa A, Khokhar ES. 2021. Quality protein maize (QPM): importance, genetics, timeline of different events, breeding strategies and varietal adoption. *Plant Breeding* 140(3):375-399. <https://doi.org/10.1111/pbr.12923>
- Méchin V, Thévenot C, Le Guilloux M, Prioul JL, Damerval C. 2007. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate



- orthophosphate dikinase. *Plant Physiology* 143(3):1203-1219. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092148>
- Mendoza-Elos M, Andrio-Enríquez E, Juárez-Goiz J, Mosqueda-Villagómez C, Latournerie-Moreno L, Castañón-Nájera G, López-Benítez A, Moreno-Martínez E. 2006. Contenido de lisina y triptófano en genotipos de maíz de alta calidad proteica y normal. *Universidad y ciencia* 22:153-161. <https://doi.org/10.19136/era.a22n2.318>
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145(3629):279-280. <https://doi.org/10.1126/science.145.3629.279>
- Nagai YS, Sakulsingharoj C, Edwards GE, Satoh H, Greene TW, Blakeslee B, Okita TW. 2009. Control of starch synthesis in cereals: metabolite analysis of transgenic rice expressing an up-regulated cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds. *Plant and Cell Physiology* 50(3):635-643. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp021>
- Nakamura Y, Francisco PB, Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A, Fujita N. 2005. Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties. *Plant Molecular Biology* 58(2):213-227. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-6507-2>
- Nakamura Y, Utsumi Y, Sawada T, Aihara S, Utsumi C, Yoshida M, Kitamura S. 2010. Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant and Cell Physiology* 51(5):776-794. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq035>
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiology* 127(2):459-472. <https://doi.org/10.1104/pp.010127>
- Noguchi J, Chaen K, Vu NT, Akasaka T, Shimada H, Nakashima T, Nishi A, Satoh H, Omori T, Kakuta Y, Kimura M. 2011. Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding. *Glycobiology* 21(8):1108-1116. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr049>

- Or E, Boyer SK, Larkins BA. 1993. opaque2 modifiers act post-transcriptionally and in a polar manner on gamma-zein gene expression in maize endosperm. *The Plant Cell* 5(11):1599-1609. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.11.1599>
- Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA. 2006. *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- Pereira R, Davide L, Pedrozo C, Carneiro N, Souza I, Paiva E. 2008. Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grains. *Genetics and Molecular Research* 7( 2):498-508. <https://doi.org/10.4238/vol7-2gmr446>
- Pfister B, Zeeman SC. 2016. Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(14):2781-2807. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2250-x>
- Pineda-Hidalgo K, M L-A, Ny S-S, Chavez J, Reyes Moreno C, Muy D, Larkins B. 2011. Characterization of free amino acid QTLs in maize opaque2 inbred lines. *Journal of Cereal Science* 53:250/258. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.01.005>
- Raguzzoni JC, Lopes da Silva JA, Maraschin M, Delgadillo I. 2013. Characterization of the physicochemical and thermal properties of unexplored starches with potential industrial uses from six Brazilian maize landraces. *Starch - Stärke* 65(11-12):938-946. <https://doi.org/10.1002/star.201200236>
- Regina A, Kosar-Hashemi B, Ling S, Li Z, Rahman S, Morell M. 2010. Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany* 61(5):1469-1482. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq011>
- Robutti J, Borrás F, Ferrer M, Percibaldi M, Knutson CA. 2000. Evaluation of quality factors in argentine maize races. *Cereal Chemistry* 77(1):24-26. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.1.24>
- Salazar-Salas NY, Pineda-Hidalgo KV, Chavez-Ontiveros J, Gutierrez-Dorado R, Reyes-Moreno C, Bello-Pérez LA, Larkins BA, Lopez-Valenzuela JA. 2014. Biochemical characterization of QTLs associated with endosperm modification in quality protein maize. *Journal of Cereal Science* 60(1):255-263. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.04.004>

- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 2200 p.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(12):5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Seo B-s, Kim S, Scott MP, Singletary GW, Wong K-s, James MG, Myers AM. 2002. Functional interactions between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthases of Brewer's yeast. Plant Physiology 128(4):1189-1199. <https://doi.org/10.1104/pp.010756>
- Serna-Saldivar SO. 2019. Chemistry and Technology. 3rd ed. Woodhead Publishing and AACC International Press. Duxford, U.K.
- Serrano-Rivero Y, Hernández-García A, Fando-Calzada R. 2013. Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 44(2). 181227534009
- SIAP. 2024. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciudad de México: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/>. Consultado el 15 de Agosto 2024.
- Sidebottom C, Kirkland M, Strongitharm B, Jeffcoat R. 1998. Characterization of the difference of starch branching enzyme activities in normal and low-amylopectin maize during kernel development. Journal of Cereal Science 27(3):279-287. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1997.0170>
- Sim L, Beeren SR, Findinier J, Dauvillee D, Ball SG, Henriksen A, Palcic MM. 2014. Crystal structure of the *Chlamydomonas* starch debranching enzyme isoamylase ISA1 reveals insights into the mechanism of branch trimming and complex assembly. Journal of Biological Chemistry 289(33):22991-23003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.565044>
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegler J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. Theoretical and Applied Genetics 95(1):163-173. <https://doi.org/10.1007/s001220050544>

- Soto-López OA. 2015. Análisis de la expresión de genes de síntesis de almidón y su relación con la modificación de la dureza del endospermo de maíz de calidad proteínica [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa. 115 p.
- Srichuwong S, Jane JI. 2007. Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: a review. *Food Science and Biotechnology* 16(5):663-674.
- Sumbo H, Ikujuola A. 2014. Comparison of chemical composition, functional properties and amino acids composition of quality protein maize and common maize (*Zea mays* L). *African Journal of Food Science and Technology* 5:81-89. <https://doi.org/10.14303/ajfst.2014.024>
- Sun C, Sathish P, Ahlandsberg S, Deiber A, Jansson C. 1997. Identification of four starch-branching enzymes in barley endosperm: partial purification of forms I, IIa and IIb. *New Phytologist* 137(2):215-222.
- Tester R. 1997. Starch: the polysaccharide fractions. En: Frazier PJ DA, Richmond P, editor. *Starch: Structure and Functionality*. Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry. p. 163-171.
- Tester R, Morrison W. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry* (67):558-563.
- Tester RF, Karkalas J, Qi X. 2004. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39(2):151-165. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>
- Tetlow IJ, Emes MJ. 2014. A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis. *IUBMB Life* 66(8):546-558. <https://doi.org/10.1002/iub.1297>
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 55(406):2131-2145. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh248>
- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ. 2004b. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates

- starch branching enzyme activity and protein–protein interactions. *The Plant Cell* 16(3):694. <https://doi.org/10.1105/tpc.017400>
- Umemoto T, Aoki N. 2005. Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme. *Functional Plant Biology* 32(9):763-768. <https://doi.org/10.1071/fp04214>
- Umemoto T, Terashima K. 2002. Research note: activity of granule-bound starch synthase is an important determinant of amylose content in rice endosperm. *Functional Plant Biology* 29:1121-1124. <https://doi.org/10.1071/PP01145>
- Vega-Alvarez E, Pineda-Hidalgo KV, Salazar-Salas NY, Soto-López OA, Canizalez-Roman VA, Garzón-Tiznado JA, Gutierrez-Dorado R, Lopez-Valenzuela JA. 2022. Genetic and molecular analysis of starch physicochemical properties and its relationship with endosperm modification in quality protein maize. *Biocencia* XXIV(3):140-149. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v24i3.1725>
- Villegas E, Vasal S, Bjarnason M, Mertz E. 1992. Quality protein maize-what is it and how was it developed. *Science*. En: Mertz ET. *Quality Protein Maize* ed. St Paul: American Society of Cereal Chemists. p. 27-48.
- Vrinten PL, Nakamura T. 2000. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiology* 122(1):255. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.255>
- Wallace JC, Lopes MA, Paiva E, Larkins BA. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of  $\gamma$ -zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiology* 92(1):191-196. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.191>
- Wang H, Huang Y, Xiao Q, Huang X, Li C, Gao X, Wang Q, Xiang X, Zhu Y, Wang J, Wang W, Larkins BA, Wu Y. 2020. Carotenoids modulate kernel texture in maize by influencing amyloplast envelope integrity. *Nature Communications* 11(1):5346. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19196-9>
- Wang TL, Bogracheva TY, Hedley CL. 1998. Starch: as simple as A, B, C. *Journal of Experimental Botany* 49(320):481-502. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.320.481>
- Wang Z, Li W, Qi J, Shi P, Yin Y. 2011. Starch accumulation, activities of key enzyme and gene expression in starch synthesis of wheat endosperm with different starch

- contents. *Journal of Food Science Technology* 51(3):419-429.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0520-z>
- Waterschoot J, Gomand SV, Fierens E, Delcour JA. 2015. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. 67(1-2):14-29. <https://doi.org/10.1002/star.201300238>
- Watson SA. 1987. Structure and composition. En: Watson SA, Ramstad PE, editores. *Corn: Chemistry and Technology*. Saint Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists. p. 52-82.
- Wilson LM, Whitt SR, Ibáñez AM, Rocheford TR, Goodman MM, Buckler ES. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *The Plant Cell* 16(10):2719-2733.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.025700>
- Wong KS, Kubo A, Jane JL, Harada K, Satoh H, Nakamura Y. 2003. Structures and properties of amylopectin and phytoglycogen in the endosperm of sugary-1 mutants of rice. *Journal of Cereal Science* 37(2):139-149.  
<https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0485>
- Wu H, Clay K, Thompson SS, Hennen-Bierwagen TA, Andrews BJ, Zechmann B, Gibbon BC. 2015. Pullulanase and starch synthase III are associated with formation of vitreous endosperm in quality protein maize. *PloS One* 10(6):e0130856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130856>
- Wu Y, Holding DR, Messing J. 2010.  $\gamma$ -zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(29):12810-12815.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1004721107>
- Xu A, Lin L, Guo K, Liu T, Yin Z, Wei C. 2019. Physicochemical properties of starches from vitreous and floury endosperms from the same maize kernels. *Food Chemistry* 291:149-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.024>
- Yamanouchi H, Nakamura Y. 1992. Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-Enzyme) in rice. *Plant and Cell Physiology* 33(7):985-991.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078351>

- Yau JC, Bockholt AJ, Smith JD, Rooney LW, Waniska RD. 1999. Maize endosperm proteins that contribute to endosperm lysine content. *Cereal Chemistry* 76(5):668-672. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.5.668>
- Yoo SH, Jane JL. 2002. Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydrate Polymers* 49(3):297-305. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00338-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00338-1)
- Yu S, Ma Y, Sun D-W. 2009. Impact of amylose content on starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage. *Journal of Cereal Science* 50(2):139-144. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.003>
- Yu X, Yu H, Zhang J, Shao S, Xiong F, Wang Z. 2015. Endosperm structure and physicochemical properties of starches from normal, waxy, and super-sweet maize. *International Journal of Food Properties* 18(12):2825-2839. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1015732>
- Yuan L, Dou Y, Kianian SF, Zhang C, Holding DR. 2014. Deletion mutagenesis identifies a haploinsufficient role for gamma-zein in opaque2 endosperm modification. *Plant Physiology* 164(1):119-130. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230961>
- Zarkadas CG, Hamilton RI, Yu ZR, Choi VK, Khanizadeh S, Rose NGW, Pattison PL. 2000. Assessment of the protein quality of 15 new northern adapted cultivars of quality protein maize using amino acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(11):5351-5361. <https://doi.org/10.1021/jf000374b>
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. 2010. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Plant Biology* 61(1):209-234. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112301>
- Zhang H-y, Dong S-t, Gao R-q, Sun Q-q. 2007. Starch Accumulation and enzyme activities associated with starch synthesis in maize kernels. *Agricultural Sciences in China* 6(7):808-815. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(07\)60116-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60116-3)
- Zhang H, Qin F, Xu G, Geng S, Yuan Y, Wang M, Jiao F, Chen J. 2024. The relationship between starch synthesis enzyme activity, gene expression, and amylopectin fine structure in waxy maize. *Cereal Research Communications* 52(4):1579-1586. <https://doi.org/10.1007/s42976-024-00509-3>

- Zhang H, Xu G. 2019. Physicochemical properties of vitreous and floury endosperm flours in maize. *Food Science & Nutrition* 7(8):2605-2612. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1114>
- Zhang JJ, Hu YF, Huang YB. 2008. Relationship between activities of key enzymes involved in starch synthesis and accumulation in maize inbred lines during grain filling. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(2):249-255. <http://doi.org/10.1134/s1021443708020131>
- Zhang X, Colleoni C, Ratushna V, Sirghie-colleoni M, James M, Myers A. 2004. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene sugary2 codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Molecular Biology* 54(6):865-879. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0312-1>
- Zhao H-l, Qin Y, Xiao Z-y, Sun Q, Gong D-m, Qiu F-z. 2023. Revealing the process of storage protein rebalancing in high quality protein maize by proteomic and transcriptomic. *Journal of Integrative Agriculture* 22(5):1308-1323. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.08.031>
- Zhong Y, Liu L, Qu J, Li S, Blennow A, Seytahmetovna SA, Liu X, Guo D. 2020. The relationship between the expression pattern of starch biosynthesis enzymes and molecular structure of high amylose maize starch. *Carbohydrate Polymers* 247:116681. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116681>
- Zhu F, Bertoft E, Källman A, Myers AM, Seetharaman K. 2013. Molecular structure of starches from maize mutants deficient in starch synthase III. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(41):9899-9907. <https://doi.org/10.1021/jf402090f>



## ABREVIATURAS

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

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

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SBE	Enzimas ramificadoras del almidón
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH1	Sacarosa sintasa 1
<i>Sh1</i>	Mutación <i>Shrunken 1</i>
<i>Sh2</i>	Mutación <i>Shrunken 2</i>
SS	Almidón sintasa
SSS	Almidón sintasas solubles
<i>su1</i>	Mutación <i>sugary 1</i>
TCA	Ácido tricloroacético
T <sub>p</sub>	Temperatura pico de gelatinización
Ton	Toneladas
UI	Unidades internacionales
UGPasa	UDP glucosa pirofosforilasa
v/v	Volumen/volumen
<i>Wx1</i>	Waxy1
<i>Zpu1</i>	Mutación pululanasa 1
$\Delta H_g$	Entalpía de gelatinización
$\Delta H_r$	Entalpía de retrogradación
%R	Porcentaje de retrogradación